

Aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck  
Direktor Prof. Dr. med. S. Perner  
in Zusammenarbeit mit der LungenClinic Großhansdorf

---



# **EINFLUSS IMMUNZyto-/-HISTOCHEMISCHER ANALYSEN AUF TYPISIERUNG UND SUBTYPISIERUNG VON LUNGENKARZINOMEN**

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER  
DOKTORWÜRDE  
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

-AUS DER SEKTION MEDIZIN  
-VORGELEGT VON Hatice Elmas  
aus Malatya/Türkei

Lübeck, 2020

1. Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. med. Lutz Welker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr.med. dent. Samer Hakim

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2020

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.06.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin

***Für Çağın Karya und Yasin Elmas***

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. EPIDEMIOLOGIE DES LUNGENKARZINOMS .....	2
1.2. KLINISCHE DIAGNOSTIK DES LUNGENKARZINOMS .....	3
1.3. TNM-KLASSIFIKATION UND STADIENEINTEILUNG.....	5
1.4. ZIELGERICHTETE THERAPIE .....	9
<b>2. HISTOLOGISCHE KLASSIFIKATION</b> .....	<b>12</b>
2.1. HISTOGENESE UND MORPHOLOGISCHE HETEROGENITÄT VON LUNGENKARZINOMEN.....	14
2.2. HAUPTTYPEN DES LUNGENKARZINOMS.....	16
2.2.1. Adenokarzinom.....	16
2.2.2. Plattenepithelkarzinom .....	21
2.2.3. Neuroendokrine Karzinome .....	25
2.2.3.1. Karzinoid .....	26
2.2.3.2. Kleinzelliges Karzinom .....	29
2.2.3.3. Großzelliges neuroendokrines Karzinom.....	31
2.2.4. Großzelliges Karzinom .....	33
2.3. IMMUNZYTOCHEMIE .....	35
2.3.1. Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1.....	35
2.3.2. Cytokeratine .....	36
2.3.3. Napsin A.....	38
2.3.4. p40 ( $\Delta$ Np63) .....	39
2.3.5. CEA.....	39
2.3.6. CD56 .....	40
2.3.7. Synaptophysin .....	41
<b>3. ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>42</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>44</b>
4.1. AUSWAHL DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	44
4.2. BIOPSIEMATERIAL.....	45
4.3. PATIENTENBESCHREIBUNG.....	46
4.4. AUFARBEITUNG DES UNTERSUCHUNGSGUTES .....	46
4.4.1. Giemsa-färbeprotokoll.....	46
4.4.2. Immunzytochemie .....	47
4.5. AUSWERTUNG.....	49
4.5.1. Vorgehensweise bei der Datenerhebung.....	51
4.5.2. Auswertung der Daten .....	51
4.5.2.1. Datenerfassung und statistische Auswertung.....	51
4.5.2.2. Statistische Methoden.....	51
<b>5. ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
5.1. ALTERS- UND GESCHLECHTSVERTEILUNG .....	53
5.2. ERGEBNISSE DER IMMUNHISTO-/ZYTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	54
<b>6. DISKUSSION</b> .....	<b>65</b>

6.1. ALTERS- UND GESCHLECHTSVERTEILUNG IM UNTERSUCHUNGSGUT .....	65
6.2. IMMUNCHEMISCHE ANTIKÖRPER-EXPRESSION PRIMÄRER LUNGEN-KARZINOME	66
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>9. ANHÄNGE .....</b>	<b>98</b>
<b>10. DANKSAGUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>11. LEBENSLAUF .....</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AC</b>	Atypisches Karzinoid
<b>ADC</b>	Adenokarzinom
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ALK</b>	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>CD</b>	Cluster-Differenzierte
<b>CEA</b>	Carcinoembryonales Antigen
<b>CK</b>	<i>Cytokeratin</i>
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>EKG</b>	<i>Elektrokardiographie</i>
<b>ERS</b>	<i>European Respiratory Society</i>
<b>FNA</b>	Feinnadelaspiration
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HER</b>	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i>
<b>IASLC</b>	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
<b>ICC</b>	Immunzytologie
<b>IHC</b>	Immunhistologie
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>LCNEC</b>	Großzelliges neuroendokrines Karzinom
<b>LCC</b>	Großzelliges Karzinom
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>MEK</b>	<i>Mitogen-Activated extracellular signal-regulated Kinase</i>
<b>MET</b>	<i>Hepatocyte Growth factor Receptor</i>
<b>MIA</b>	Minimal invasives Adenokarzinom
<b>NEC</b>	Neuroendokrines Karzinom
<b>NCAM</b>	Neuronales Zelladhäsionsmolekül
<b>NSCC</b>	Nicht-kleinzelliges Karzinom
<b>NSCC-NOS</b>	Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert
<b>PD-1</b>	<i>Immun-Checkpoint-Proteine programmed death 1</i>

<b>PD-L1</b>	<i>Programmed Cell Death-Ligand 1</i>
<b>PET</b>	Positronenemissionstomografie
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>SCLC</b>	Kleinzelliges Karzinom
<b>Syn</b>	Synaptophysin
<b>SQC</b>	Plattenepithelkarzinom
<b>TC</b>	Typisches Karzinoid
<b>TNM</b>	Tumor-Node-Metastasis
<b>TTF-1</b>	Thyreoidaler Transkriptionsfaktor-1
<b>UICC</b>	<i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>
<b>VATS</b>	Video-Assistierte-Thorakoskopie
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>ZT</b>	Zielgerichtete Therapie

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: TNM Stadien nach IASLC *Lung Cancer Staging Project*
- Tabelle 2: Lymphknotenstationen und Lymphknotengruppen beim Lungenkarzinom gemäß IASLC
- Tabelle 3: Hauptgruppen, Wirkprinzipien und Substanznamen zielgerichteter Medikamente
- Tabelle 4: Histologische Klassifikation der Lungenkrebstypen nach aktueller WHO-Klassifikation
- Tabelle 5: Pulmonales Adenokarzinom - zytologische Merkmale
- Tabelle 6: Plattenepithelkarzinom - zytologische Merkmale
- Tabelle 7: Typische und atypische Karzinoide - zytologische Merkmale
- Tabelle 8: Kleinzelliges Karzinom - zytologische Merkmale
- Tabelle 9: Großzelliges neuroendokrines Karzinom - zytologische Merkmale
- Tabelle 10: Großzelliges Karzinom - zytologische Merkmale
- Tabelle 11: Auswahl der von uns eingesetzten immunzytologischen Antikörper (Hersteller und Verdünnung)
- Tabelle 12: Vier-Felder-Tafel zur Darstellung der Testergebnisse in Bezug auf die Erhebung der Sensitivität, Spezifität und diagnostische Sicherheit
- Tabelle 13a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels TTF-1 bzw. CK7
- Tabelle 13b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels TTF-1 bzw. CK7
- Tabelle 14a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CK5/6/ CK5/14 bzw. p40 ( $\Delta$ Np63)

- Tabelle 14b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CK5/6 bzw. p40 ( $\Delta$ Np63)
- Tabelle 15a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CD56 bzw. Synaptophysin
- Tabelle 15b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CD56 bzw. Synaptophysin.
- Tabelle 16a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit TTF-1 und CK7 bzw. negativer CK5/6 /CK5/14 Färbung (TTF-1+ CK7+ bzw. TTF-1+ CK5/6 /CK5/14-)
- Tabelle 16b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit TTF-1 und CK7 bzw. negativer CK5/6 Färbung (TTF-1+ CK7+ bzw. TTF-1+ CK5/6-)
- Tabelle 17a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CK5/6 /CK5/14 und p40 ( $\Delta$ Np63) bzw. positiver CK5/6 /CK5/14 Färbung und negativer Anfärbung mittels TTF-1
- Tabelle 17b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CK5/6 und p40 ( $\Delta$ Np63) bzw. positiver CK5/6 Färbung und negativer Anfärbung mittels TTF-1
- Tabelle 18a: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CD56 und Synaptophysin bzw. fehlender Anfärbung gegenüber TTF-1 und CK5/6 /CK5/14
- Tabelle 18b: IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter

positiver Anfärbung mit CD56 und Synaptophysin bzw. fehlender Anfärbung gegenüber TTF-1 und CK5/6

Tabelle 19: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei einer kombinierten positiven Anfärbung mit TTF-1 und CK7 und fehlender CK5/6 /CK5/14 Anfärbung (TTF-1+ CK7+ CK5/6 /CK5/14-) bzw. fehlender Anfärbung mit TTF-1 und CK7 und positiver Reaktion gegenüber CK5/6 /CK5/14

Tabelle 20: ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei einer fehlender Anfärbung mit TTF-1 und positiver Reaktion gegenüber CK5/6 /CK5/14 und p40 ( $\Delta$ Np63)

Tabelle 21: Kreuzmatrix mit Darstellung der (Fehl-)Diagnosen von Lungenkrebstypen bei Vergleich von Standard- und Immunzytologie-basierten Diagnosen

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Intrathorakale Lymphknoten nach dem sogenannten Naruke-Schema
- Abbildung 2: Empfehlungen zur Diagnostik von Lungenkarzinomen
- Abbildung 3: Pulmonales Adenokarzinom
- Abbildung 4: Pulmonales Adenokarzinom
- Abbildung 5: Plattenepithelkarzinom
- Abbildung 6: Plattenepithelkarzinom
- Abbildung 7: Typisches Karzinoid
- Abbildung 8: Atypisches Karzinoid
- Abbildung 9: Kleinzelliges Karzinom
- Abbildung 10: Großzelliges neuroendokrines Karzinom
- Abbildung 11: Großzelliges Karzinom
- Abbildung 12: Das Grundprinzip der indirekten immunzytochemischen Färbung
- Abbildung 13: Anteil unterschiedlicher Tumortypen im eigenen Untersuchungsgut
- Abbildung 14: Anteil unterschiedlicher Biopsieverfahren am Untersuchungsgut
- Abbildung 15: Standard Giemsa-Färbung
- Abbildung 16a-l: Immunzytochemische Aufarbeitung
- Abbildung 17a: Nukleäres Expressionsmuster
- Abbildung 17b: Zytoplasmatisches Expressionsmuster
- Abbildung 17c: Membranöses Expressionsmuster
- Abbildung 18: Altersverteilung zum Untersuchungszeitpunkt.
- Abbildung 19: Geschlechtsverteilung primärer Lungenkarzinome im vorliegenden Untersuchungsgut.

## 1. Einleitung

Weltweit weisen Lungenkrebse eine steigende Inzidenz auf. In der Bundesrepublik Deutschland gehören in 2014 Lungenkarzinome mit 53.800 Fällen zu den häufigsten Todesursachen (148). In der Praxis wird die Erkrankung bei der weit überwiegenden Zahl der Patienten häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium entdeckt, in dem thoraxchirurgische Verfahren mit kurativer Zielsetzung zumeist nicht mehr indiziert sind (188). Die neuen endoskopischen Techniken haben die Biopsiediagnostik nicht nur revolutioniert, sondern zu erheblichen, quantitativen und qualitativen Veränderungen in der Beschaffenheit und Zusammensetzung des entsprechend bioptisch gewonnenen Materials geführt. Vergleichbares gilt für die Einführung der Immunzytochemie zur Verbesserung der Genauigkeit der morphologischen Typisierung von Lungenkarzinomen. Mit der zunehmenden Gewinnung kleiner Biopsien und zytologischer Proben sind die Bedeutung und der Einfluss zytologischer und immunzytochemischer Beurteilungskriterien auf die Krebsdiagnostik deutlich gestiegen.

Die für die morphologische Diagnostik nachweislich folgenreichste Entwicklung dürfte aber auf die Einführung der zielgerichteten Therapie (ZT, englisch *targeted therapy*) Nicht-kleinzelliger Karzinome (NSCC) zurückzuführen sein (181). So haben alle bis 2015 gültigen histologischen Klassifikationen *expressis verbis* zytologische Proben zur Typisierung von Lungentumoren ausgeschlossen. Abseits der in der Pathologie etablierten Lehrmeinungen gab es in der Inneren Medizin bereits seit den 50er Jahren ein großes wissenschaftliches Interesse an der extragenitalen klinisch-zytologischen Diagnostik (53). Erst 2015, ein halbes Jahrhundert nach der klinischen Etablierung der Zytologie, hat diese vollumfänglich Eingang in eine *World Health Organization* (WHO) Klassifikation für Lungentumoren gefunden (181).

Derartige wesentliche Änderungen sowohl des bioptischen Untersuchungsgutes, als auch der Beurteilungskriterien werfen zwangsläufig eine Vielzahl von Fragen auf, deren Beantwortung in vielen Fällen noch aussteht.

Die personellen und sachlichen Besonderheiten der bioptischen Diagnostik in der LungenClinic Großhansdorf gaben Anlass, den Stellenwert immunzytochemischer Beurteilungskriterien anhand einer großen Zahl diagnostizierter Lungenkarzinome

## Einleitung

zu analysieren und mit den unterschiedlichen Biopsieverfahren bzw. Gewebeproben in Beziehung zu setzen. Dazu wurden die im Rahmen der routine-/immunzytologischen Diagnostik (ICC) im Zytologischen Labor der LungenClinic Großhansdorf erhobenen Befunde und die histo-/immunhistologisch an den Biopsaten bzw. am Resektionsmaterial im Pathologischen Institut des Leibniz-Forschungszentrums Borstel erhobenen Diagnosen miteinander verglichen. Die Definition der zytologischen Typen erfolgte entsprechend der in der WHO 2015 für Lungentumoren festgelegten Regeln (181). Konnte eine histologische Sicherung eines fortgeschrittenen Lungenkarzinoms nicht erreicht werden, wurde der klinische Verlauf zur Validierung der zytologischen Befunde herangezogen.

Übergeordnetes Ziel der Arbeit ist, anhand des eigenen Untersuchungsgutes auf die Bedeutung zytochemischer Verfahren für die klinische Diagnostik des Lungenkarzinoms einzugehen und besonders zu den Fragen Stellung zu nehmen, welche Unterschiede einerseits hinsichtlich der einzelnen Biopsieverfahren zu erwarten sind und sich andererseits aus dem im Vergleich mit der Histologie zunehmenden Anteil zytologischer Diagnosen ergeben. Die Analyse der bioptischen und morphologischen Diagnostik des Lungenkarzinoms führt zwangsläufig auch zur kritischen Auseinandersetzung mit dem aktuellen Publikationen.

### **1.1. Epidemiologie des Lungenkarzinoms**

Das Bronchialkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland sowie weltweit. Laut Robert-Koch-Institut wurden im Jahr 2014 pro 100.000 Einwohner etwa 19.300 Frauen und 34.500 Männer mit bösartigen Tumoren der Lunge diagnostiziert. Die Krankheit verlief bei 15.524 Frauen und 29.560 Männer tödlich (148). Für das Jahr 2018 werden in Deutschland geschätzt 33.700 Männer und 22.000 Frauen neu an Lungentumoren erkranken (46). Die Häufigkeit von Neuerkrankungen an Lungenkrebs entwickelt sich allerdings seit vielen Jahren bei Männern und Frauen unterschiedlich. Laut Robert-Koch-Institut erkranken und versterben aktuell in Deutschland ca. fünf Mal so viele Frauen an Lungenkrebs wie noch vor 50 Jahren (148). Da das Lungenkrebsrisiko mit dem Alter steigt und die Bevölkerung in Deutschland immer älter wird, prognostizieren Experten für beide Geschlechter eine Zunahme der absoluten Fallzahlen bis mindestens 2020.

## Einleitung

Während bei Frauen die Altersgruppe der 65- bis 74-Jährigen am häufigsten erkrankt, ist bei Männern die Gruppe der 80- bis 84-Jährigen am häufigsten betroffen (148). Im internationalen Vergleich sind unter den ausgewählten Ländern die höchsten Inzidenzraten für Frauen in Dänemark und für Männer in Belgien zu sehen (148).

In der Altersgruppe der 25- bis 44-Jährigen sind die prognostizierten Lungenkrebsraten in der Europäischen Union bei Männern und Frauen vergleichbar hoch, was auf ähnliche Rauchgewohnheiten in den jungen Generationen beider Geschlechter innerhalb der letzten Jahrzehnte zurückgeführt wurde (46). Dies bestätigt, dass der Einfluss des Rauchens auf die Entwicklung von Lungenkrebsen bei Männern und Frauen geschlechtsunabhängig gleich ist (135).

Das aktive Rauchen stellt den größten Risikofaktor dar. Aber auch das Passivrauchen steigert das Krebsrisiko. 90% der erkrankten Männer und 60% erkrankten der Frauen haben aktiv geraucht. Andere Risikofaktoren spielen im Gegensatz zum Rauchen eine vergleichsweise untergeordnete Rolle. Weitere bekannte Risikofaktoren sind die Exposition gegenüber Asbest, Nickel, Chrom, Arsen, Radon, Strahlung und Luftverschmutzung (13, 65, 148, 162, 169, 175, 181).

### **1.2. Klinische Diagnostik des Lungenkarzinoms**

Anamnese und Klinik Lungenkrebskranker sind häufig uncharakteristisch. In der Regel fehlen Frühsymptome. Husten, Hämoptysen, Atemnot (Dyspnoe), Gewichtsverlust und/oder Fatigue gehören zu den häufigen Symptomen meist fortgeschrittener Tumorleiden.

Die Basisdiagnostik umfasst eine sorgfältige Anamnese und vollständige körperliche Untersuchung. Dabei geht es zunächst um die Erfassung relevanter Risikofaktoren (Rauchgewohnheiten, berufliche Exposition gegenüber relevanten Schadstoffen etc.). Für die klinische Untersuchung steht die komplette Erfassung des somatischen Status, insbesondere der Thoraxorgane und der Lymphknotenstationen (supraklavikulär, zervikal und axillär) im Vordergrund. Auf Anzeichen eines Pleuraergusses, einer Atelektase, einer Pneumonie, einer oberen Einflusstauung, einer Rekurrens- oder Phrenikusparese, eines Horner-Syndroms, einer respiratorischen Insuffizienz oder einer Herzinsuffizienz ist dabei besonders

## Einleitung

zu achten (185). Die Labordiagnostik ist vor allem auf die Erkennung von Begleiterkrankungen gerichtet. Gleiches gilt für die Herz-/Kreislaufdiagnostik wie Blutdruckmessung und (Belastungs-) Elektrokardiographie (EKG). Eine zentrale Bedeutung kommt der Lungenfunktionsanalyse (Spirometrie, Bodyplethysmographie, Diffusionskapazität, Blutgasanalyse) zu. Mittels der kardio-pulmonalen Leistungsdiagnostik werden die entscheidenden Parameter zur Beurteilung der funktionellen Operabilität erfasst.

Die bildgebenden Verfahren (konventionelle Röntgenthoraxuntersuchung in zwei Ebenen, Oberbauchsonographie, Computertomographie (CT) des Thorax) dienen der Tumorlokalisierung und der Einschätzung der Tumorausdehnung sowie der Suche nach potentiell vorliegenden Metastasen. Die Positronenemissionstomografie (PET) hat darüber hinaus unter den bildgebenden Verfahren für die Einschätzung der Tumorausbreitung eine hohe Bedeutung.

Die bildgebenden Verfahren sind allerdings nur bedingt zur Beurteilung der Dignität geeignet (108). Dementsprechend ist eine feingewebliche Sicherung eines potentiell vorliegenden Tumors zwingend erforderlich. Wesentlicher Bestandteil der klinischen Diagnostik ist die bronchoskopische Diagnostik. Über die Beurteilung im Sichtbereich vorliegender endobronchialer Veränderungen hinaus ergänzen endosonographische Untersuchungsverfahren das diagnostische Spektrum. In Abhängigkeit von der Ausdehnung und Lokalisation des Tumors eignen sich Zangenbiopsien (Imprintzytologien), Bürsten- und Katheterbiopsien zentraler und peripherer Läsionen, sowie die perbronchiale/peroesophageale Feinnadelaspiration (FNA) und die Aspiration von Bronchialsekret für die Gewinnung repräsentativer Zell- und Gewebeproben.

In Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung und -ausdehnung stehen weitere bioptische Verfahren wie die perkutane FNA peripherer Lymphknoten (LK), CT-Thorax- bzw. ultraschallgestützte transthorakale FNA zur Verfügung. Einen besonderen Stellenwert besitzt die Untersuchung von Flüssigkeiten der serösen Höhlen (Pleura, Perikard, Peritoneum).

Ergänzend können chirurgische Verfahren und Methoden wie die Mediastinoskopie, die Video-Assistierte-Thorakoskopie (VATS, englisch *Video-assisted thoracoscopic*

## Einleitung

*surgery*) und/oder die Thorakotomie einschließlich intraoperativ gewonnener FNA, Abkratzen- und Abtupfpräparate für die Diagnostik herangezogen werden (15).

Erst die vollständige Erfassung des Erkrankungsstadiums erlaubt schließlich die Entscheidung über die Art und das Ausmaß der erforderlichen Therapie, die Durchführung lungenresezierender Eingriffe und/oder weiterer onkologischer Therapiekonzepte einschließlich der Strahlentherapie (60, 128, 139).

### **1.3. TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung**

Anfang Juni 2017 wurde die 8. Auflage der TNM-Klassifikation von der UICC (Union Internationale Contre Le Cancer) publiziert (siehe Tabelle 1) (38, 56, 198). Diese ist für alle histopathologische Subtypen gültig. Im internationalen TNM-System werden folgende Abkürzungen verwendet:

T (Tumor) = Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors

N (Node) = Fehlen oder Vorhandensein regionaler LK-Metastasen

M (Metastasis) = Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen.

Beim TNM-System handelt es sich in erster Linie um eine Klassifikation, die eine Einteilung aufgrund der anatomischen Ausbreitung der Erkrankungen im Körper ermöglicht. Im Vordergrund stehen die Einschätzung der Prognose und die Entscheidung über die effektivste Behandlungsoption. Dafür ist eine objektive Bestimmung der anatomischen Ausbreitung der Erkrankung erforderlich.

## Einleitung

**Tabelle 1.** TNM Stadien nach IASLC *Lung Cancer Staging Project*

Stadium	Kurzbeschreibung	Stadium	Kurzbeschreibung
<b>T0</b>	kein primärer Tumor nachweisbar	<b>T2</b>	Tumor > 3 ≤ 5 cm oder
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> (SQC oder ADC)	<b>T2a</b>	Tumor mit Beteiligung viszerale Pleura, Hauptbronchus (nicht Karina), Atelektase bis zum Hilus
<b>T1</b>	Tumor ≤ 3 cm	<b>T2b</b>	Tumor > 3 ≤ 4 cm
<b>T1mi</b>	Minimalinvasives Adenokarzinom	<b>T3</b>	Tumor > 4 ≤ 5 cm
<b>T1a</b>	Tumor ≤ 1 cm, oberflächliches Wachstum in den zentralen Atemwegen		Tumor > 5 ≤ 7 cm
<b>T1b</b>	Tumor > 1 ≤ 2 cm	<b>T4</b>	Tumor, oder Einbruch in die Brustwand, das Perikard, N. phrenicus, oder separate(r) Tumorknoten im selben Lappen
<b>T1c</b>	Tumor > 2 ≤ 3 cm		
Stadium	Kurzbeschreibung	Stadium	Kurzbeschreibung
<b>N0</b>	keine Metastasen in den regionalen LK	<b>N2</b>	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen oder subkarinalen LK
<b>N1</b>	Metastasen in ipsilateralen pulmonalen oder hilären LK	<b>N3</b>	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, hilären oder supraclaviculären LK
Stadium	Kurzbeschreibung	Stadium	Kurzbeschreibung
<b>M0</b>	keine Fernmetastasen	<b>M1a</b>	Maligner Pleura- oder Perikarderguss, Pleura- oder Perikardknoten oder separate Tumorknoten in einem kontralateralen Lappen
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden	<b>M1b</b>	Einzelne extrathorakale Metastasen
		<b>M1c</b>	Multiple extrathorakale Metastasen (ein oder mehrere Organe)

Abkürzungen: TNM, dient in der Medizin zur Einteilung (Klassifikation) von malignen Tumoren; IASLC, *The International Association for the Study of Lung Cancer*; T, Primärtumor; N, Node; LK, Lymphknoten; M, Metastasis; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom (modifiziert nach 38, 114)

## Einleitung

Für jede Lokalisation werden zwei verschiedene Klassifikationen verwendet:

- i. **Klinische Klassifikation:** Die prätherapeutische klinische Klassifikation, die als TNM oder cTNM bezeichnet wird, ist wichtig für die Auswahl und Bewertung der Behandlungsverfahren. Sie beruht auf vor der Behandlung erhobenen Befunden, die sich aufgrund von klinischer Untersuchung, bildgebenden Verfahren, Endoskopie, Biopsie, chirurgischer Exploration und anderen relevanten Untersuchungen ergeben haben.
- ii. **Pathologische Klassifikation:** Die postoperative histopathologische Klassifikation, die als pTNM bezeichnet wird, wird für die Indikation zur adjuvanten Therapie verwendet. Sie liefert zusätzliche Daten zur Abschätzung der Prognose und zur Berechnung der Endergebnisse. Die vor der Behandlung erhobenen Befunde werden laut dieser Art der Klassifikation durch Erkenntnisse, die während chirurgischer Eingriffe und pathologischer Untersuchungen gewonnen wurden, ergänzt oder modifiziert (198).

### **Lymphknotenlokalisierung in der Lunge:**

Für die Klassifikation regionaler LK in der Lunge wurde von der UICC und dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) das Naruke-Schema übernommen und veröffentlicht (Tabelle 2 und Abbildung 1) (115).

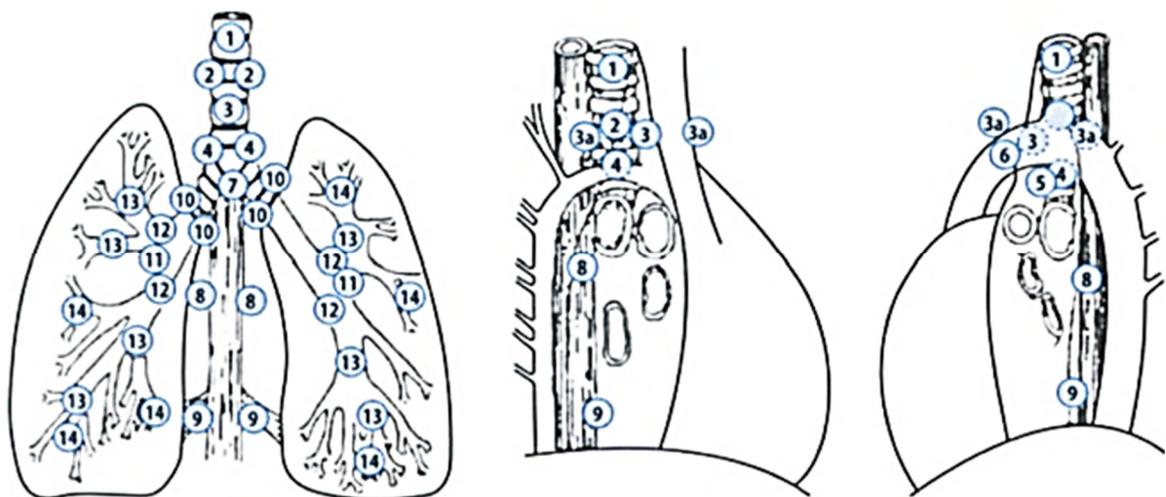
Ziel ist eine vergleichbare klinische prä- und postoperative Beschreibung unterschiedlicher LK-Positionen im Thorax.

## Einleitung

**Tabelle 2.** Lymphknotenstationen und Lymphknotengruppen beim Lungenkarzinom gemäß IASLC

Station		Gruppen	
1	Höchste (obere) mediastinale	Obere mediastinale LK	Mediastinale LK
2	Paratracheale (obere paratracheale)		
3	Prätracheale		
3a	Vordere (anteriore) mediastinale		
3b	Retrotracheale (hintere) mediastinale		
4	Tracheobronchiale (untere paratracheale) (inklusive sog. Azygoslymphknoten)	Aortale LK	
5	Subaortale (LK im Aortenfenster)		
6	Paraaortale (LK an Aorto ascendes oder phrenische LK)	Untere mediastinale LK	
7	Subkarinale		
8	Praösophageale (unter Carina)		
9	LK im Ligula Pulmunale	Hiläre LK	
10	Hiläre (am Stammbronchus)		
11	Interlobäre		
12	Lobäre		
13	Segmentale	Peribronchiale (intrapulmonale) LK	
14	Subsegmentale		

Abkürzungen: IASLC, *The International Association for the Study of Lung Cancer*; LK, Lymphknoten; N, Node (modifiziert nach 114)



**Abbildung 1.** Intrathorakale Lymphknoten nach dem sogenannten Naruke-Schema

1, oberste mediastinale Lymphknoten (LK); 2, obere paratracheale LK; 3, prä-retrotracheale LK; 4, untere paratracheale LK; 5, subaortale LK; 6, paraaortale LK; 7, subkarinale LK; 8, paraösophageale LK; 9, Ligamentum pulmonale LK; 10, hiläre LK; 11, interlobäre LK; 12, lobäre LK; 13, segmentale LK; 14, subsegmentale LK (modifiziert nach 115)

#### 1.4. Zielgerichtete Therapie

Zu den etablierten Therapieverfahren von Lungentumoren gehören die chirurgische Resektion, die Strahlentherapie und die klassische Chemotherapie mit Zytostatika. Obwohl diese Verfahren sowohl mit kurativer als auch mit palliativer Zielsetzung in einem Teil der Fälle erfolgreich eingesetzt werden, verfügen sie bei der Mehrzahl fortgeschrittener Tumorleiden nur über eine begrenzte Effizienz. Chirurgische Therapiekonzepte stoßen aus funktionellen Gründen häufig an ihre Grenzen. Die konventionelle Strahlen- und Chemotherapie werden durch ihre teilweise erheblichen Nebenwirkungen limitiert.

Am Anfang der ZT stand die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers (AK) Rituximab. McLaughlin et al. gelang 1997 erstmals der Beweis für die Wirksamkeit einer solchen Therapie (102, 104).

In den letzten zehn Jahren hat sich durch Fortschritte in Genetik, Zellbiologie und Medikamentenentwicklung die ZT auch beim Lungenkarzinom fest etabliert (23). Über den Primärtumor hinaus werden auch entfernt vom eigentlichen Primärtumor lokalisierte, kleinste Tumormetastasen effektiv erfasst. Dies erklärt die häufig dramatische Besserung primär inkurabler Tumorleiden.

Aktuell kommen unter anderem gentechnisch hergestellte monoklonale AK (Namensendung '-mab') oder niedermolekulare Verbindungen (englisch *small molecules*) (Namensendung '-mib' oder '-nib') zum Einsatz (Tabelle 3). Die einzelnen Medikamente folgen dabei unterschiedlichen Wirkprinzipien. *Small molecules*, Tyrosinkinase-Inhibitoren wie z. B. Gefitinib oder Erlotinib gelingt es gezielt in den Stoffwechsel von Krebszellen einzugreifen, die Übertragung von Wachstumssignalen zum Zellkern zu blockieren und diese damit am Wachstum zu hindern. Andere Wirkstoffe, wie z.B. der monoklonale AK Bevacizumab sind gegen den Prozess der Blutgefäßbildung in Tumorgewebe (Tumorangiogenese) (212), insbesondere durch den Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), gerichtet und hemmen die Gefäßneubildung durch Tumorzellen (Antiangiogenese). Mangels einer ausreichenden Blutversorgung fehlen dann die für ein adäquates Tumorwachstum erforderlichen Nährstoffe und Sauerstoff.

**Tabelle 3.** Hauptgruppen, Wirkprinzipien und Substanznamen zielgerichteter Medikamente

ZT Hauptgruppen	Wirkprinzipien ZT Medikamente	Substanznamen	Literatur
(Wachstums-) Rezeptor-Inhibitoren	Intrazelluläre Tyrosinkinase-Inhibitoren	Afatinib (EGFR)	30, 69, 131, 179, 205
		Erlotinib (EGFR, HER)	24, 91
		Gefitinib (EGFR)	80, 09, 111, 166
		Osimertinib (EGFR T790M)	19, 100, 110, 128, 170
	Extrazelluläre Rezeptor-Inhibitoren	Bevacizumab (VEGF)	5, 88, 157, 207
		Cetuximab (EGFR)	57, 103
Trastuzumab (HER2)		26, 67, 96, 134	
Protein-Inhibitoren	ALK Inhibitoren	Alectinib (ALK, MET, ROS1)	10, 43, 172, 214
		Ceritinib (ALK, MET, ROS1)	36, 97, 156
		Crizotinib (ALK, MET, ROS1)	106, 207
	BRAF Inhibitoren	Dabrafenib	82, 99, 124, 136
		Vemurafenib	47, 98
	MEK Inhibitoren	Trametinib	95, 126
	Medikamente zur Immun-therapie	Immun-Checkpoint-Inhibitoren	Atezolizumab (PD-L1)
Nivolumab (PD-1)			163, 203, 211
Pembrolizumab (PD-1)			49, 131, 213

Abkürzungen: EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*; HER, *Human Epidermal growth factor Receptor 2*; VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*; ALK, *Anaplastic Lymphoma Kinase*; MET, *Hepatocyte Growth factor Receptor*; ROS, *Reactive oxygen species*; BRAF, ein menschliches Gen, das ein Protein namens B-Raf kodiert; MEK, *mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase*; PD-1, *Immun-Checkpoint-Proteine programmed death 1*; PD-L1, *Programmed Cell Death-Ligand 1*

Bei einigen Krebsarten kommt es jedoch auch ohne Einwirkung äußerer Wachstumsfaktoren zu einer kontinuierlichen Stimulation von Tumorzellen. Genau in dieser Situation können eine Signaltransduktion störende Inhibitoren, wie z.B. der BRAF-Inhibitor (Vemurafenib), wirksam werden (92, 174). Eine weitere Hauptgruppe der ZT sind Medikamente zur Immuntherapie. Sie bewirken eine vom Immunsystem ausgelöste Zerstörung der Krebszellen. Bindet ein monoklonaler AK an spezifische, auf der Oberfläche von Krebszellen lokalisierte Zielmoleküle, kann es zur direkten Zerstörung dieser Zellen kommen. Einen Sonderfall stellen die sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren (z.B. Ipilimumab, Nivolumab) dar. Immun-Checkpoint-Inhibitoren richten sich gegen die natürlichen Regulationsmechanismen der Immunzellen, indem sie die Immunsystem „bremsenden“ Faktoren durch eine spezifische AK-Bindung ausschalten (45, 64, 101).

## Einleitung

Der Einsatz der ZT ist allerdings nur unter bestimmten Voraussetzungen erfolgversprechend. So kann z.B. der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) beim Lungenkarzinom durch eine EGFR-Mutation überaktiviert sein und so normales Gewebe unkontrolliert zu einem Tumor auswachsen. Zielgerichtete Medikamente können an diesen mutierten EGFR andocken und somit das permanente Wachstumssignal unterbinden. Diese EGFR-Hemmer oder EGFR-Inhibitoren wirken allerdings nur bei Patienten, deren Lungenkarzinom die spezifische Veränderung des EGFR aufweist (EGFR-mutationspositive Patienten). In Europa liegen entsprechende Mutationen bei 10 bis 15 Prozent der Lungenkarzinom-Patienten vor.

Die meisten molekularen Tests werden aktuell an kleinen Biopsaten und zytologischen Proben durchgeführt (127). Wesentlich ist, dass zytologische Proben in dieser Hinsicht den kleinen für die Histologie gewonnenen Gewebeproben in nichts nachstehen (58, 68).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Verbesserung der körpereigenen Antitumorimmunität. Auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Lymphozyten werden *Immun-Checkpoint-Proteine programmed death 1* (PD-1) und *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA-4) Rezeptoren exprimiert. Durch die Bindung ihrer Liganden *Programmed Cell Death-Ligand 1* (PD-L1) und Cluster-Differenzierte 86 (CD86) auf Antigen-präsentierenden Zellen, wird die Immunreaktion zum Abbau der Tumorzellen umgangen. PD-1/PD-L1-Inhibitoren (z.B. Nivolumab, Atezolizumab und Pembrolizumab) verhindern, dass die Rezeptoren und Liganden aneinander binden, wodurch die Signalübertragung unterbrochen und eine Antitumor-Immunantwort wiederhergestellt wird (3, 50).

Auch hier ist eine immunzytochemische Testung (PD-L1-Testung) Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (31, 29, 139, 160, 200, 203).

## 2. Histologische Klassifikation

Die aktuelle histologische Klassifikation der Lungenkarzinome basiert auf den Empfehlungen der WHO 2015 (181). Allgemeinen Auffassungen zufolge richtet sich die Einschätzung des vorliegenden Tumortyps bei den sehr häufig heterogen zusammengesetzten Lungenkarzinomen nach der Differenzierungsrichtung des jeweils quantitativ größten Anteils eines Tumors.

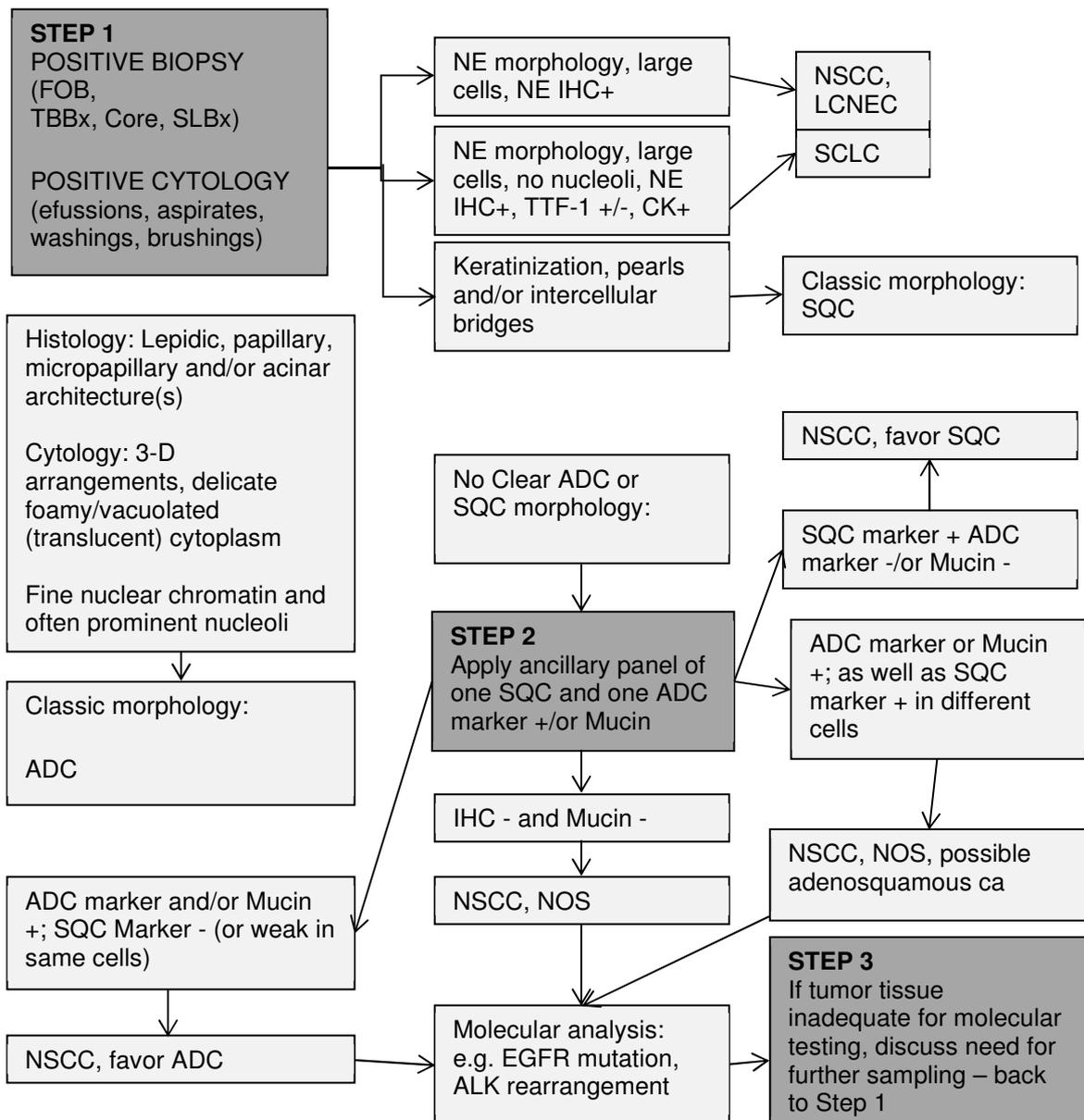
Diese Klassifikation umfasst die folgenden Lungenkrebstypen, -subtypen und -varianten (Tabelle 4).

**Tabelle 4.** Histologische Klassifikation der Lungenkrebstypen nach aktueller WHO-Klassifikation

Histologic type and subtypes	ICD-Code	Histologic type and subtypes	ICD-Code
<b>Adenocarcinoma</b>	8140/3	<b>Carcinoid tumour</b>	
Lepidic adenocarcinoma	8250/3	Typical carcinoid	8240/3
Acinar adenocarcinoma	8551/3	Atypical carcinoid	8249/3
Papillary adenocarcinoma	8260/3	<b>Large cell carcinoma</b>	
Micropapillary adenocarcinoma	8265/3	Large cell carcinoma	8012/3
Solid adenocarcinoma	8230/3	<b>Adenosquamous carcinoma</b>	<b>8560/3</b>
<b>Variants of adenocarcinoma</b>		<b>Pleomorphic, spindle cell, and giant cell carcinoma</b>	<b>8033/3</b>
Invasive mucinous adenocarcinoma	8253/3	Pleomorphic carcinoma	8022/3
Mixed invasive mucinous and non-mucinous adenocarcinoma	8254/3	Spindle cell carcinoma	8032/3
<b>Minimally invasive adenocarcinoma</b>		Giant cell carcinoma	8031/3
Non-mucinous	8250/2	<b>Carcinosarcoma</b>	<b>8980/3</b>
Mucinous	8257/3	<b>Pulmonary blastoma</b>	<b>8972/3</b>
<b>Squamous cell carcinoma</b>	<b>8070/3</b>	Large cell NEC	8013/3
Keratinizing squamous cell carcinoma	8071/3	Combined large cell NEC	8013/3
Non-keratinizing squamous cell carcinoma	8072/3	Basaloid carcinoma	8123/3
<b>Basaloid squamous cell carcinoma</b>	<b>8083/3</b>	<b>Lymphoepithelioma-like carcinoma</b>	<b>8082/3</b>
<b>Neuroendocrine tumours</b>		<b>NUT carcinoma</b>	<b>8023/3</b>
Small cell carcinoma	8041/3	<b>Salivary gland tumours</b>	
Combined small cell carcinoma	8045/3	Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
<b>Large cell NEC</b>	<b>8013/3</b>	Adenoid cystic carcinoma	8200/3
Combined large cell NEC	8013/3	Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3

Abkürzungen: ICD, Internationale Klassifikation von Krankheiten; NEC, Neuroendokrines Karzinom (modifiziert nach 181)

**Abbildung 2.** Empfehlungen zur Diagnostik von Lungenkarzinomen



Schritt 1: Fiberoptische Bronchoskopie (FOB), transbronchiale Biopsie (TBBx), Core-Nadelbiopsie (Core), chirurgische Lungenbiopsie (SLBx). Die Anwendung der Immunhistochemie (IHC) wird für Fälle, in denen die Diagnose unklar ist, bei denen entweder eine morphologische Unterscheidung zwischen Adenokarzinom (ADC) und Plattenepithelkarzinom (SQC) nicht möglich ist oder eine Neuroendokrine (NE) Morphologie vorliegt (großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) oder Kleinzelliges Karzinom (SCLC)) empfohlen. Falls keine eindeutige ADC- oder SQC-Morphologie nachweisbar ist, wird der Tumor als Nicht-kleinzelliges Karzinom (NSCC), nicht weiter spezifiziert (NOS) eingeordnet und mit Schritt 2 fortgefahren. Ist die IHC nicht verfügbar, dann sollte der Tumor als NSCC, NOS eingestuft werden. Schritt 2: NSCC, NOS kann weiter klassifiziert werden basierend auf: 1. IHC-Färbungen, 2. Schleimfärbungen (PAS- oder Mucicarmin) oder 3. molekularen Daten. Falls die Färbungen ein ADC favorisieren-positive ADC Marker (z.B. TTF-1 und/oder Schleim) bei negativen SQC Markern zeigt, dann wird der Tumor als NSCC, bevorzugt ADC klassifiziert. Falls bei negativen ADC-Markern SQC-Marker (d. H. p40 ( $\Delta p63$ ) und/oder CK5/6) positiv sind, wird der Tumor als NSCC bevorzugt SQC klassifiziert. Sind ADC- und SQC-Marker in verschiedenen Populationen von Tumorzellen beide stark positiv, wird der Tumor als NSCC, NOS klassifiziert, mit dem Hinweis darauf, dass es sich möglicherweise um ein adenosquamoses Karzinom handeln kann. Wenn alle Marker negativ sind, werden die Tumoren als NSCC-NOS klassifiziert. Molekulare Tests unterscheiden grundlegend zwischen ADC und SQC. Schritt 3: Falls das klinische Management eine über die Diagnose eines NSCC hinausgehende Typisierung erfordert, sind Rebiopsien notwendig (181).

## Histologische Klassifikation

Die Einteilung des Differenzierungsgrades gut, mäßig, schlecht differenziert, wird von dem Anteil mit der geringsten Differenzierung bestimmt. Ist eine Typisierung anhand der konventionellen Färbung allein nicht möglich, wird von der aktuell gültigen WHO-Klassifikation 2015 eine korrekte Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen durch Erfassung immunzytochemischer Kriterien vorausgesetzt (Abbildung 2).

### **2.1. Histogenese und morphologische Heterogenität von Lungenkarzinomen**

Als Stammzellen des Lungenkarzinoms kommen histogenetisch grundsätzlich vier teilungsfähige Zellen der Atemwege, Basalzellen, Clara-Zellen, Pneumozyten Typ II und neurosekretorische Zellen des APUD Systems in Betracht. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass sich Lungentumore nicht nur von diesen teilungsfähigen Zellen, sondern auch von einer „indifferenten“ Zelle als Vorstufe der Stammzelle ableiten könnten (35, 81, 204). Diese „indifferenten“ Zellen sollen nicht identisch mit den Basalzellen, den sogenannten Reservezellen sein. Laut bisherigen Erkenntnissen würden sie im normalen respiratorischen Epithel eines Erwachsenen nicht vorkommen, sondern erst durch eine Schädigung von teilungsfähigen Zellen entstehen. Obwohl hyperplastische, metaplastische und dysplastische Epithelanomalien bis hin zur Entwicklung eines *Carcinoma in situ* heute morphologisch klar definiert sind, bleiben bei der Einschätzung der Histogenese des Lungenkarzinoms viele Fragen ungeklärt (178).

Die Tumorigenese ist ein evolutionärer Prozess, der durch neue Mutationen angeheizt und durch die darwinistische Selektion angetrieben wird (48, 107, 125). Im Verlauf einer mit der Tumorprogression einhergehenden Hyperproliferation kommt es als Folge einer erhöhten genetischen Instabilität zur Ausbildung einer vielfältigen Population von Krebszellen, sog. klonalen Subpopulationen (62, 189). Krebsstammzellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit ihren Phänotyp und damit ihr malignes Verhalten in Wechselwirkung mit dem umgebenden biologischen Mikromilieu zu verändern. Die Mikroumgebung innerhalb eines Tumors ist allerdings nicht vollständig homogen. So können in Tumoren die Dichte an Blut- und Lymphgefäßen, die Zahlen und Arten infiltrierender normaler Zellen und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix variieren. Dies könnte erklären,

## Histologische Klassifikation

weshalb sich aus Tumorzellen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Mikromilieu heterogene Phänotypen entwickeln.

Diese Intra-Tumor-Heterogenität ist allerdings nicht nur auf den Phänotyp der einzelnen Zelle beschränkt, sondern betrifft praktisch alle unterscheidbaren phänotypischen Merkmale von Lungentumoren, wie z.B. Genexpression (einschließlich der Expression von Zelloberflächenmarkern, Wachstumsfaktor und Hormonrezeptoren), Stoffwechsel, Motilität und angiogenes, proliferatives, immunogenes und metastatisches Potenzial (39, 48, 70, 119, 168). Genetische Veränderungen und morphologische Phänotypen von Lungenkarzinomen sind eng miteinander verbunden. So konnte bei den heterogen differenzierten pleomorphen Karzinomen ein Zusammenhang zwischen der molekularen Heterogenität und dem KRAS-Mutationsstatus (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), der Änderungen der Genkopienzahl, dem Proteinexpressions- und Proteinphosphorylierungslevel gefunden werden (4, 11, 31, 146, 189).

Über die pleomorphen Karzinome hinaus zeichnen sich alle Lungenkarzinome durch eine ausgeprägte histologische Heterogenität aus. Von einem mikroskopischen Gesichtsfeld zum anderen und von einem histologischen Schnitt zum nächsten, können sich unterschiedliche phänotypische Muster und Differenzierungen finden. Fast 50% der Tumoren weisen mehr als einen der histologischen Haupttypen auf. Der Umstand, dass Lungenkarzinome histologisch im Allgemeinen nach der am besten differenzierten Komponente klassifiziert und der Differenzierungsgrad nach der am schlechtesten differenzierten Komponente eingestuft werden, führt zwangsläufig zu Problemen bei der Typisierung einzelner Tumore. Ist ein Tumor größtenteils undifferenziert und enthält fokal Anteile eines Plattenepithelkarzinoms (SQC) oder eines Adenokarzinoms (ADC), wird er in der gängigen Praxis dementsprechend als schlecht differenziertes SQC oder ADC eingestuft (183). Dies erklärt die zum Teil beachtliche Interobservervariabilität bei der histologischen Klassifizierung von Lungenkarzinomen, die aus klinischer Sicht Salzer und Kutschera sowohl 1969, als auch 1989 veranlasste, von einem Fiasko der Klassifizierung zu sprechen (154, 155).

Diese ausgeprägte phänotypische Variabilität der Lungenkarzinome muss insbesondere bei der Interpretation kleiner Biopsien und Zytologien berücksichtigt werden (119, 178, 183). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei der Zahl der

## Histologische Klassifikation

Lungenkrebspatienten allerdings ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor. In dieser Situation stehen in der weit überwiegenden Zahl der Fälle lediglich kleine Biopsien und Zytologien zur Verfügung. Derartige Biopsien erlauben allerdings nur eine sehr begrenzte Übersicht über die histologische Beschaffenheit und genetische Vielfalt des gesamten Tumors. Je nach Ursprung, Lokalisation und Größe der entnommenen Gewebeprobe können sie einen mehr oder weniger kleinen, möglicherweise dominanten Teil des Tumors abbilden. Methodisch bedingt erlauben sie aber weder Rückschlüsse auf die klonale Zusammensetzung des gesamten Tumors, noch auf die quantitative Verteilung unterschiedlicher histologischer Wachstumsmuster respektiver Tumortypen. Diese methodischen Einschränkungen der zytologischen Diagnostik mindern allerdings in keiner Weise nachhaltig den Wert der traditionsreichen klinischen Zytologie (52, 53). Nach Biancosino et al. 2016 erreichen durch den Thoraxchirurgen intraoperativ gewonnenen FNA-Zytologien in der Lungenkrebsdiagnostik eine mit der Histologie vergleichbare Sensitivität und Spezifität (15). Nach mehr als fünf Jahrzehnten Ablehnung durch die Pathologie fand die Zytologie 2015 mit dem *“small biopsies and cytology“* - Konzept erstmals Eingang in den Kanon der WHO-Klassifikationen von Lungentumoren (181, 182).

## 2.2. Haupttypen des Lungenkarzinoms

### 2.2.1. Adenokarzinom

Unter einem ADC versteht man einen malignen epithelialen Tumor, der entweder drüsig differenziert ist und/oder Schleim produziert, sowie azinäre, papilläre, lepidische oder solide Wachstumsmuster mit Schleimbildung bzw. eine Mischung dieser Muster zeigt.

Haupttrisikofaktor für das Entstehen eines ADC ist das Rauchen. Allerdings können sich auch bei Nichtrauchern, bevorzugt bei Frauen, ADC ausbilden (181, 182). Zu den exogenen Faktoren, die eine Entstehung von Lungenkarzinomen begünstigen, gehören Radon, ionisierende Strahlung, Asbeststäube und Luftverschmutzungen in Innenräumen. Auch chronische Lungenkrankheiten, wie die Lungenfibrose, die chronisch obstruktive Lungenerkrankung und Tuberkulose können ebenso wie eine genetische Disposition, das Risiko für ein ADC erhöhen (54).

## Histologische Klassifikation

In wenigen Fällen konnte die familiäre Vererbung einer EGFR- oder ERbb2-Mutation mit der genetischen Veranlagung zu Lungenkrebs nachgewiesen werden (181).

ADC bleiben aufgrund ihres langsamen Wachstumstempos lange Zeit lokal begrenzt. Ihre Tumorverdopplungszeit beträgt 150 bis 300 Tage (7, 89). Dennoch metastasieren sie früher als SQC und bevorzugt in das Gehirn und die Knochen (33, 194).

Klinisch gehören fortschreitende Atemnot, Husten, Schmerzen und Druck in der Brust oder im Rücken, Heiserkeit oder Stimmverlust zu den häufigsten Symptomen des ADC.

ADC entstehen häufig in der Lungenperipherie bzw. in den subpleuralen Lungenarealen und sind dementsprechend überwiegend im Lungenmantel lokalisiert.

Je nach dem vorherrschenden Wachstumsmuster neigen diese Tumore sowohl zu einer intraalveolären, lymphogenen oder hämatogenen Ausbreitung. Makroskopisch manifestieren sich die meisten invasiven ADC in Form von grauweißen Knötchen mit einer zentralen Narbenfibrose. Charakteristisch sind eine starke anthrakotische Pigmentierung und das Vorkommen von Pleura-einziehungen (sog. „Krebsnabel“) (181).

Die aktuelle WHO Klassifikation 2015 grenzt zunächst als Vorstufe von ADC die atypische adenomatöse Hyperplasie ab (181). Die Einteilung beruht im Weiteren auf der Beurteilung resezierter Tumoren und richtet sich nach dem Ausmaß des invasiven Tumorwachstums und der Tumorgroße am histologisch untersuchten Resektat. Nur an diesem Material ist eine Unterscheidung von präinvasiven in-situ ADC, minimal invasiven ADC (MIA) und invasiven ADC möglich. Die Klassifizierung der invasiv wachsenden ADC basiert auf einer, in jeweils 5% Schritten erfolgten, semiquantitativen Einschätzung des vorherrschenden, prädominanten Subtyps. Als Subtypen werden lepidisch (prädominant mit Invasionen >5 mm), papillär, azinär, mikropapillär oder solid prädominante Wachstumsmuster unterschieden. Unter einem lepidischem Wachstum versteht man ein nicht-invasives Wachstum entlang bereits existierender, alveolärer Strukturen. Der Begriff „lepidisch“ ist dabei entweder einem nicht invasiven ADC bzw. einer nichtinvasiven Komponente eines

## Histologische Klassifikation

ADC vorbehalten. Tumore, die bislang als großzellige Karzinome klassifiziert wurden, immunzytochemisch aber Pneumozytenmarker exprimieren (d. h. Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1 (TTF-1) und / oder Napsin A), werden unabhängig vom Auftreten einer Schleimbildung als ADC klassifiziert.

Obwohl die einzelnen Wachstumsmuster zytologisch ebenfalls gut erfasst werden können, sind in Anbetracht des bestehenden Missverhältnisses zwischen Biopsie- und Tumorgröße zytologische Proben für eine derartige quantifizierte Beurteilung von ADC nicht geeignet.

Hinsichtlich der Beurteilung des Differenzierungsgrades empfehlen Travis et al. 2015 ein Tumorgrading nach den Kriterien der WHO und IASLC 2011 [*International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, die *American Thoracic Society (ATS)* und der *European Respiratory Society (ERS)*] (181). Dieses System basiert auf dem Vorhandensein von fünf histologischen Wachstumsmustern und soll mit der Prognose korrelieren:

Gut differenziert (G1): prädominant lepidisch

Mäßig differenziert (G2): prädominant azinär oder papillär

Schlecht differenziert (G3): prädominant solide oder mikropapillär.

Weitere zytologische und histologische Aspekte sind bei der Beurteilung des Differenzierungsgrades von azinären und papillären ADC zu berücksichtigen. So sind mäßig und niedrig differenzierte Karzinome durch den zunehmenden Verlust von azinären und papillären Strukturen charakterisiert. Dadurch stehen die soliden Karzinome mit Schleimbildung auf dem untersten Rang. Charakteristische Wachstums- und Ausbreitungsmuster von ADC sind verstreut liegende, lockere, einschichtige Zellverbände bestehend aus eher uniformen, kubischen bis zylinderförmigen Zellen. Außerdem kommt es zu einer eher gering ausgeprägten Anisokaryose und Anisozytose. Je nach Differenzierungsgrad können lockere Haufen oder einzeln, über den Ausstrich verstreute Tumorzellen auftreten.

Die Kern-Plasma-Relation ist bei diesem Tumortyp relativ ausgeglichen. Die Zellen enthalten einen vergrößerten und meist rundlichen, hyperchromatischen Kern, der exzentrisch gelegen ist.

Die Kerne können einen Nukleolus oder auch mehrere Nukleolen enthalten. Der Nachweis von Nukleolen ist in der Giemsa-Färbung nicht immer möglich.

## Histologische Klassifikation

Im Zytoplasma können Vakuolen mit oder ohne Schleim beobachtet werden. Handelt es sich um sekretorische Zellen, so können kernnah die dafür typischen Vakuolen gefunden werden.

Ein hohes Vorkommen von zytoplasmatischem Detritus und eosinophil gekörnten, zylindrischen Zytoplasmatrümmer im Ausstrichhintergrund, welche an eine Ziliozytophthorie erinnern, sind ein weiteres Kennzeichen der ADC (159, 182, 194).

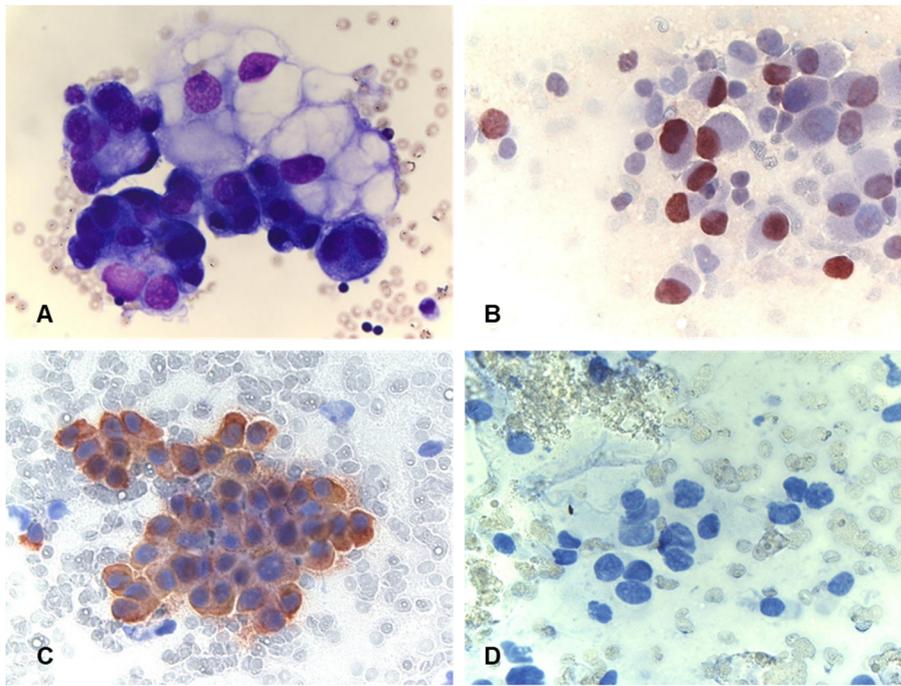
Differenzialdiagnostisch wird das ADC von anderen Lungentumoren durch die Wachstumsmuster, den Nachweis von Schleim und immunzytochemisch durch die Expression von Pneumozytenmarkern (dh. TTF-1 und/oder Napsin A) abgegrenzt. In der Tabelle 5, sowie den Abbildung 3 und 4 werden wesentliche zytologische Merkmale des ADC zusammengefasst.

**Tabelle 5.** Pulmonales Adenokarzinom - zytologische Merkmale

Lagerung	Je nach Wachstumsmuster in papillären, azinären, lockeren Haufen oder kompakten Verbänden, einzeln oder in Gruppen
Zellform	Uniforme mittelgroße bis große Tumorzellen
Kerne	Bläschenförmig, exzentrisch gelagert
Nukleolen	Meist gut erkennbare große Nukleolen
Kern/Plasma-Relation	Bei niedrig differenzierten ADC u.U. hochgradig gestört
Zytoplasma	Meist gut erkennbar, in vielen Fällen vakuolisiert, bizarr verformt sowie vergrößert
Hintergrund	Ggf. Detritus
Besonderheiten	Evtl. Zytoplasmavakuolen, Schleimbildung, PAS-positiv
Immunzytochemie	Expression von TTF-1, Napsin A, CK7, CEA, fehlende Expression von CK5/6, CK5/14, p40 ( $\Delta$ p63)

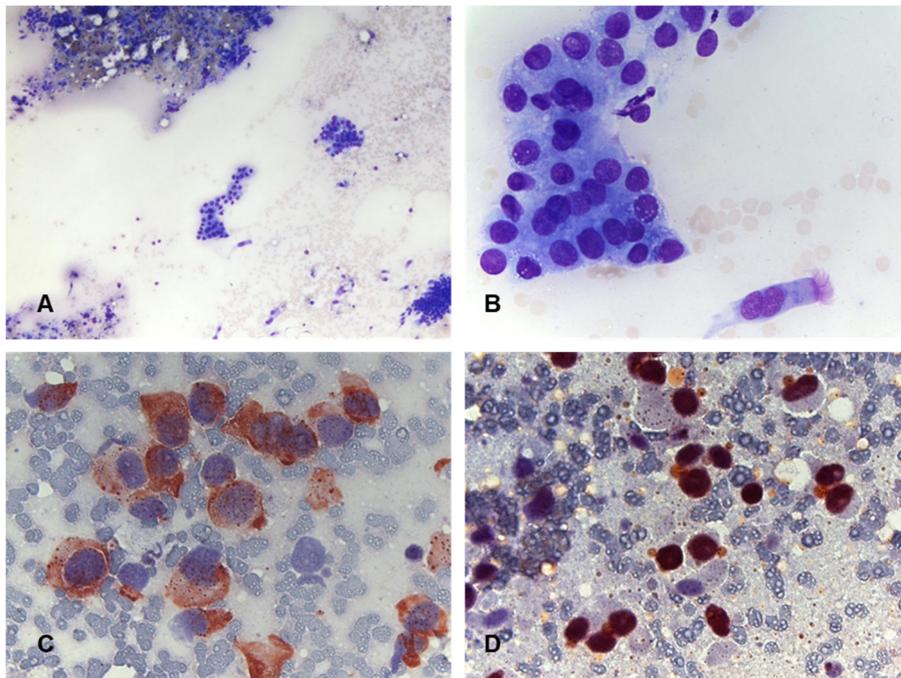
Abkürzungen: PAS, *Periodic acid-Schiff reaction*; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; CEA, Carcinoembryonales Antigen (modifiziert nach 159, 142, 202)

## Histologische Klassifikation



### Abbildung 3. Pulmonales Adenokarzinom

A, hoch differenziertes Adenokarzinom: Mikroskopisch erkennt man kleine bis mittelgroße, kubische bis zylinderförmige Tumorzellen mit uniformen runden, basal gelegenen, hyperchromatischen Kernen, kleinen Nukleolen und mäßig bis reichlich vakuolisiertem Zytoplasma (Imprintzytologie, Giemsa, 630x); B, nukleäre Expression von TTF-1 (Feinnadelaspiration-Zytologie, TTF-1, 630x); C, zytoplasmatische Expression von CK7 (Feinnadelaspiration-Zytologie, CK7, 630x); D, fehlende zytoplasmatische CK5/14-Expression (Feinnadelaspiration-Zytologie, CK5/14, 630x)



### Abbildung 4. Pulmonales Adenokarzinom

A, B, niedrig differenziertes Adenokarzinom: Mikroskopisch erkennt man kleine, einschichtige und drüsige Verbände mittelgroßer Tumorzellen, mit basal gelegenen uniformen, runden Kernen, kleinen Nukleolen und hellem Zytoplasma. Eine Differenzierung im Sinne eines ADC ist nicht deutlich erkennbar (Feinnadelaspiration-Zytologie, Giemsa, 100x, 630x); C, zytoplasmatische Expression von CK7 (Feinnadelaspiration-Zytologie, 630x); D, nukleäre Expression von TTF-1 (Feinnadelaspiration-Zytologie, 630x)

### **2.2.2. Plattenepithelkarzinom**

Das SQC ist ein maligner epithelialer Tumor, der keratinisiertes Zytoplasma (Verhornung) und/oder interzelluläre Brücken aufweist und sich von dem Bronchialepithel ableitet (159, 181). Der Hauptrisikofaktor für das Entstehen eines SQC ist das inhalative Rauchen. Aktuell sind mehrheitlich Männer betroffen (181). Weitere exogene Faktoren, die das Entstehen von Lungenkarzinomen begünstigen, sind Arsen, Asbest, Berillium, radioaktive Strahlungen und andere exogene Faktoren (181). Dosisabhängig treten SQC vermehrt in den Arealen mit der höchsten Schadstoffkonzentration, den großen Bronchien, vor allem in den Segmentbronchien auf, weshalb die SQC als sog. Reizkrebs bezeichnet werden. Sie zeigen im Allgemeinen endobronchial-polypöses, gelegentlich auch manschettenförmiges, intramurales oder intramukös-infiltrierendes Wachstum. Dabei kommt es zu einem Wachstum in hilipetaler Richtung mit Ausbildung stenosierender Tumoranteile, die bis zu einem Verschluss der Bronchuslichtung führen können. Im Umfeld der stenosierenden Schleimhautveränderungen kommt es klinisch zur Ausbildung restenotischer Pneumonien, minderbelüfteter Lungenabschnitte und reaktiv entzündlich vergrößerter LK. Generell unterscheidet man drei Subtypen:

1. Verhornende SQC
2. Nicht-verhornende SQC
3. Basaloide SQC.

Von diesen Subtypen müssen präinvasive Läsionen und SQC in situ abgegrenzt werden.

Betrachtet man die auftretenden Symptome, steht Hustenreiz als Erstsymptom im Vordergrund. Zum Teil kann es aber auch zu Fieber, Hämoptysen, rezidivierenden Bronchopneumonien, Atelektasen und Dystelektasen kommen.

Das Wachstumstempo und die Verdopplungszeit lassen sich bei gut differenzierten SQC als insgesamt recht niedrig (ca. 115 Tage) einschätzen (7). Metastasen treten in der Regel eher spät in Form großer Einzelmetastasen in der Nebenniere und der Niere auf (159).

Ganz besonders die hoch differenzierte Form des SQC ist durch eine relativ starke, makroskopisch bzw. histologisch erkennbare Nekroseneigung charakterisiert. Sie

## Histologische Klassifikation

führt über eine Ulzeration bis hin zu einem nekrotischen Zerfall des betroffenen Gewebes. Des Weiteren kann es vor allem bei einer peripheren Lokalisation zur Ausbildung einer buchtigen, dickwandigen Tumorkaverne und zu Blutungen, ggf. zu einer tödlichen Blutaspiration, kommen.

Zytologisch klarzellige Anteile finden sich sowohl bei dem verhornenden bzw. nicht-verhornenden SQC, sodass diese nicht länger als ein gesonderter Subtyp erfasst werden. Bei der Unterscheidung von ADC und SQC im Rahmen immunhistochemischer und molekularer Studien fiel auf, dass einige ADC SQC-ähnliche mehrschichtige Verbände bilden (73, 144). Wenn in der Routinefärbung eine eindeutige Verhornung fehlt, ist der Nachweis einer immunzytochemischen Expression geeigneter plattenepithelialer Markern wie p40 oder p63 erforderlich, um ein reseziertes nicht-verhornendes SQC zu erkennen. Aufgrund der Tatsache, dass die früheren Basalzellkarzinome tatsächlich SQC-Marker exprimieren, wurden diese Tumore aus der Kategorie der Großzelligen Karzinome entfernt und einem Subtyp des SQC zugeordnet.

Basaloide SQC zeigen genetisch ein spezifisches Muster von SQC (20). Diese Tumore werden nach ihrem Keratinisierungssubtyp klassifiziert, wenn irgendein Keratinisierungsgrad vorliegt bzw. unabhängig von der Anwesenheit von Keratinisierung als basaloide SQC eingeordnet, wenn diese Komponente mehr als 50% des Tumors umfasst. Bei Tumoren mit einem basaloiden Anteil von weniger als 50% kann dies in der Diagnose durch die Ergänzung „mit basaloidalen Merkmalen“ berücksichtigt werden. Zwischen den verhornenden und nicht-verhornenden SQC scheint es keine prognostischen Unterschiede zu geben (74). Einige Studien weisen auf eine schlechtere Prognose von basaloiden SQC hin (20, 21, 113), andere Studien unterstützen dies allerdings nicht (74, 84, 190). Aus klinischer Sicht ist derzeit die Erfassung der einzelnen Subtypen von SQC prognostisch nicht relevant. Die Zahl klinischer Daten zu neuen Therapien von SQC nimmt zu (z.B. Immuntherapie und neue ZT) (59).

## **Histologisches Grading**

Für die Einschätzung der Bedeutung des Differenzierungsgrades der Prognose der SQC stehen nur wenige Arbeiten zur Verfügung. Nach Kadota et al. 2014 soll der Kerndurchmesser ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Überleben sein

## Histologische Klassifikation

(74). In der Studie von Sigel et al. 2012 wurde das nukleäre Grading als prognostisches Kriterium an Aspirationsbiopsien beschrieben (165). Histologisch scheint das sog. „Tumor Budding“, das heißt das Auftreten von isolierten Tumorzellen bzw. aus maximal vier Tumorzellen bestehenden Tumorzellclustern vor der eigentlich Invasionsfront, sowohl beim pulmonalen ADC, als auch beim SQC, ein unabhängiger prognostischer Faktor zu sein (74, 199). Welche Faktoren prognostisch wirklich bedeutsam sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Die zytologische Erscheinungsform wird wesentlich durch die Art des Untersuchungsgutes (Exfoliativ-, FNA-, Bürstenbiopsie- oder Imprintmaterial, etc.) und den histologischen Differenzierungsgrad beeinflusst (22).

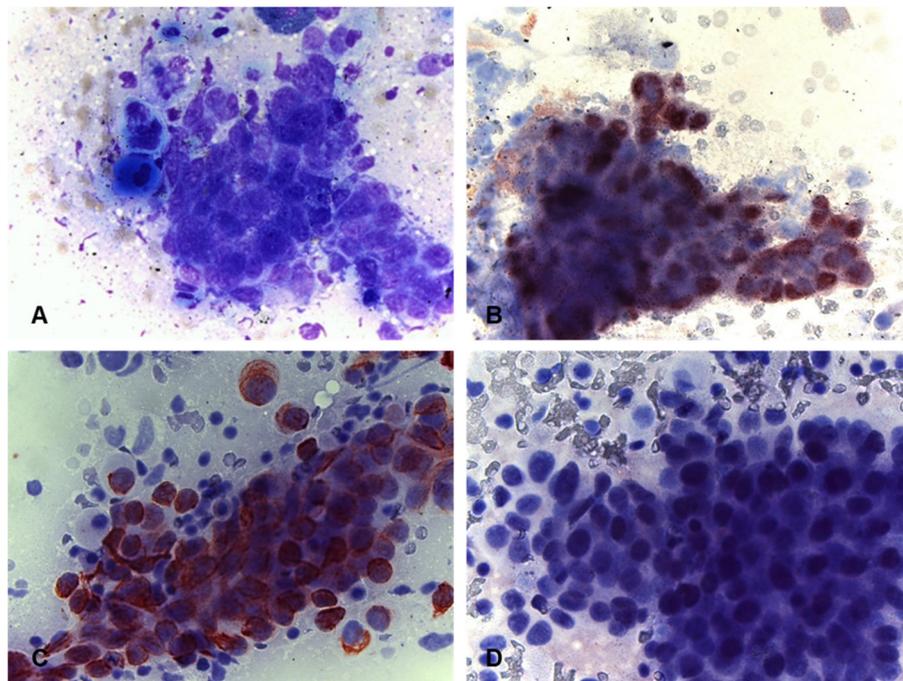
Die zytologischen Bilder von SQC hängen sowohl vom Grad der histologischen Differenzierung als auch von der Art der Probenahme ab (74). Mittels FNA, Bürsten- und Imprintzytologie gewinnt man Zellen aus unterschiedlich tiefen Schichten der Bronchialwand respektive des Tumors. Neben kohäsiven Aggregaten finden sich vor einem Präparatehintergrund aus nekrotisch zerfallenen Zellen und neutrophilen Granulozyten unterschiedlich große Tumorzellen mit zentral liegenden, unregelmäßig geformten, hyperchromatischen Kernen, mit einem oder mehreren kleinen Nukleoli und reichlich hellem, gelegentlich stahlblauen Zytoplasma. Tumorzellen sind häufig einzeln, isoliert, bizarr, spindelförmig bzw. kaulquappenartig geformt. Sie können in kohäsiven Aggregaten, sowie ein- und mehrschichtigen Verbänden auftreten. Gut differenzierte SQC weisen kernbezogene Bläschen und in der Giemsa-Färbung ein stahlblaues, in der Romanowsky-Färbung ein rötliches und in der Papanicolaou-Färbung ein orange oder gelb gefärbtes, keratinisiertes Zytoplasma auf. In exfoliativen Proben dominieren einzeln liegende Tumorzellen der Oberfläche, die häufig eine prominente Keratinisierung des Zytoplasmas und dunkle pyknotische Kerne aufweisen (105, 215).

Wesentliche zytologische Merkmale plattenepithelial differenzierter Karzinome sind in der Tabelle 6 und den Abbildungen 5 und 6 zusammengestellt.

**Tabelle 6.** Plattenepithelkarzinom - zytologische Merkmale

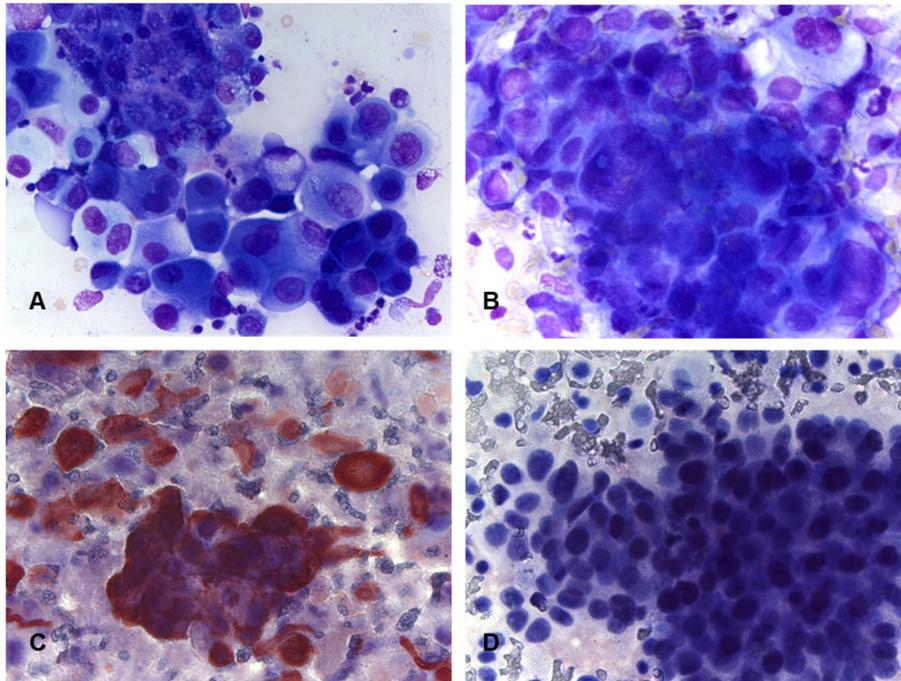
Lagerung	Einzel und in mehrschichtigen Gruppen und Verbänden liegende Tumorzellen, einzelne verhornte Zellen
Zellform	Sehr polymorph, polygonal, oft kaulquappenartig geschwänzt
Kerne	Polymorphe, kantige Kernkonturen, vesikulär, unregelmäßig geformt, pyknotisch, hyperchromatisch, scharfe Kerben und Buchten in der Kernmembran
Nukleolen	Inkonstant; in nicht keratinisierten Zellen riesig, in keratinisierten oft nicht sichtbar
Kern/Plasma-Relation	hoch, auch in keratinisierten Zellen gesteigert
Zytoplasma	Hell, stahlblau (Giemsa-Färbung) oder rötlich (Romanowsky-Färbung) bzw. orange oder gelb gefärbtes, keratinisiertes Zytoplasma (Papanicolaou-Färbung)
Hintergrund	Detritus, neutrophile Granulozyten
Besonderheiten	Atypische Plattenepithelien, evtl. Verhornung, Nekrosen, keratinisierte Tumorzellen
Immunzytochemie	Expression von CK5/6, CK5/14, p40 ( $\Delta$ p63), 34 $\beta$ E12 und Panzytokeratin, fehlende Expression von TTF-1, Napsin A, CK7, Syn, Chromogranin, CD56

Abkürzungen: CK, Cytokeratin; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; Syn, Synaptophysin; CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül-NCAM (modifiziert nach 159, 181, 202)



**Abbildung 5.** Plattenepithelkarzinom

A, hoch differenziertes Plattenepithelkarzinom: Mikroskopisch erkennt man mittelgroße bis große Tumorzellen mit runden, hyperchromatischen Kernen, perinukleären Aufhellungen, deutlich vermehrt sog. Geister- und Kaulquappenzellen, mit unregelmäßig begrenzten, hyperchromatischen Kernen und hellem, stahlblauen Zytoplasma (Feinnadelaspiration-Zytologie, Giemsa, 630x); B, nukleäre Expression von p40 ( $\Delta$ p63) (Feinnadelaspiration-Zytologie, p40 ( $\Delta$ p63), 630x); C, zytoplasmatische Expression von CK5/4 (Feinnadelaspiration-Zytologie, CK5/14, 630x); D, fehlende zytoplasmatische CK7-Expression (Feinnadelaspiration-Zytologie, CK7, 630x)



**Abbildung 6.** Plattenepithelkarzinom

A, B, niedrig differenziertes Plattenepithelkarzinom: Mikroskopisch erkennt man mittelgroße bis große Tumorzellen mit runden, unregelmäßig begrenzten, hyperchromatischen Kernen, perinukleären Aufhellungen, hyperchromatischen Kernen und hellem, hellem Zytoplasma, fehlende Nekrose, Geister- und Kaulquappenzellen. Differenzierungsmerkmale eines SQC sind nicht erkennbar (Feinnadelaspiration-Zytologie, Giemsa, 630x); C, zytoplasmatische Expression von CK5/14 (Feinnadelaspiration-Zytologie, CK5/14, 630x); D, fehlende nukleäre TTF-1-Expression (Feinnadelaspiration-Zytologie, TTF-1, 630x)

### 2.2.3. Neuroendokrine Karzinome

Neuroendokrine Karzinome (NEC) der Lunge sind epitheliale Neubildungen mit ähnlichen morphologischen, ultrastrukturellen, immunhistochemischen und molekularen Merkmalen (181). Etwa 25% aller primär pulmonalen Neoplasmen weisen eine neuroendokrine Differenzierung auf. Die WHO Klassifikation 2015 fasst in der Gruppe der NEC vier unterschiedliche pulmonale Tumore zusammen: Typische Karzinoide (TC), atypische Karzinoide (AC), großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC) und kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC). Am häufigsten treten NEC Tumore der Lunge in Form eines SCLC (20%) auf, gefolgt von LCNEC (3%), TC (2%) und AC (0,2%) (44, 55, 141, 184). Ursprungsort der NEC sind vermutlich die neuroendokrinen Zellen der Bronchialschleimhaut.

Klinisch-anamnestisch fällt auf, dass praktisch alle, die an einem SCLC oder LCNEC leiden Raucher sind. Im Gegensatz dazu sind etwa 20-40% der Patienten mit einem TC oder einem AC Nichtraucher. Bemerkenswert ist ebenso die Altersverteilung. Von einem TC oder AC Betroffene sind in der Regel jünger als

## Histologische Klassifikation

SCLC- oder LCNEC-Kranke. Zu den herausragenden zytologischen Merkmalen einer neuroendokrinen Differenzierung gehören ein feingranuläres Chromatin, sowie das Vorkommen oder Fehlen von Nekrose. Allen vier unterschiedlichen NEC gemeinsam sind Wachstumsmuster, wie organoide Nester, palisadenartige oder trabekuläre beziehungsweise rosettenartige Strukturen.

Obwohl high-grade NEC, LCNEC und SCLC große morphologische Ähnlichkeiten aufweisen, können sie lichtmikroskopisch sicher unterschieden werden. So zeigen LCNEC und SCLC üblicherweise ein stärkeres Ausmaß an nekrotischen Veränderungen als AC. Im Gegensatz zu den LCNEC und SCLC ist für TC das völlige Fehlen von Nekrose charakteristisch.

Die Erkennung neuroendokriner Kernmerkmale und Wachstumsmuster, sowie die quantitative Erfassung nekrotischer Tumoranteile gelingen an kleinen Biopsien und Zytologien ebenso sicher und reproduzierbar wie an Resektaten.

Ein wesentliches histologisches Kriterium zur Unterscheidung von TC, AC und SCLC ist die Höhe der Mitoserate. Zur Erfassung der Mitoserate soll ein Bereich mit einer hohen Aktivität ausgewählt und eine Schnittfläche von 2 mm<sup>2</sup> ausgezählt werden. Methodisch bedingt sind quantitative Analysen aber immer abhängig von der Art und Beschaffenheit, der Fixation und Anfärbung vorliegender Gewebeproben. Ein direkter Vergleich formalin-fixierter resezierter Gewebeproben und kleiner Zangenbiopsien mit FNA oder Pleuraergüssen kommt hier an seine Grenzen.

### **2.2.3.1. Karzinoid**

Karzinoide finden sich häufig in den zentralen Atemwegen und fallen endoskopisch als glatt begrenzte, polypöse und gut vaskularisierte Tumore auf. Schätzungen zufolge sollen 75% der Lungenkarzinoide zentralen (bronchial) und 25% peripheren Ursprungs sein. Lungenkarzinoide zeigen die gleichen zytologischen Merkmale wie andere NEC. Differenzialdiagnostisches Merkmal für die Unterscheidung von TC und AC ist die Höhe der Mitoserate in einer Schnittfläche von 2 mm<sup>2</sup>. Während TC eine Anzahl von 2-20 Mitosen pro 2 mm<sup>2</sup> aufweisen, liegen AC darüber. Ein weiteres Merkmal der TC ist das völlige Fehlen von Nekrose. Bei AC weist die Nekrose dagegen ein charakteristisches Erscheinungsbild auf. Sie liegt in den resezierten

## Histologische Klassifikation

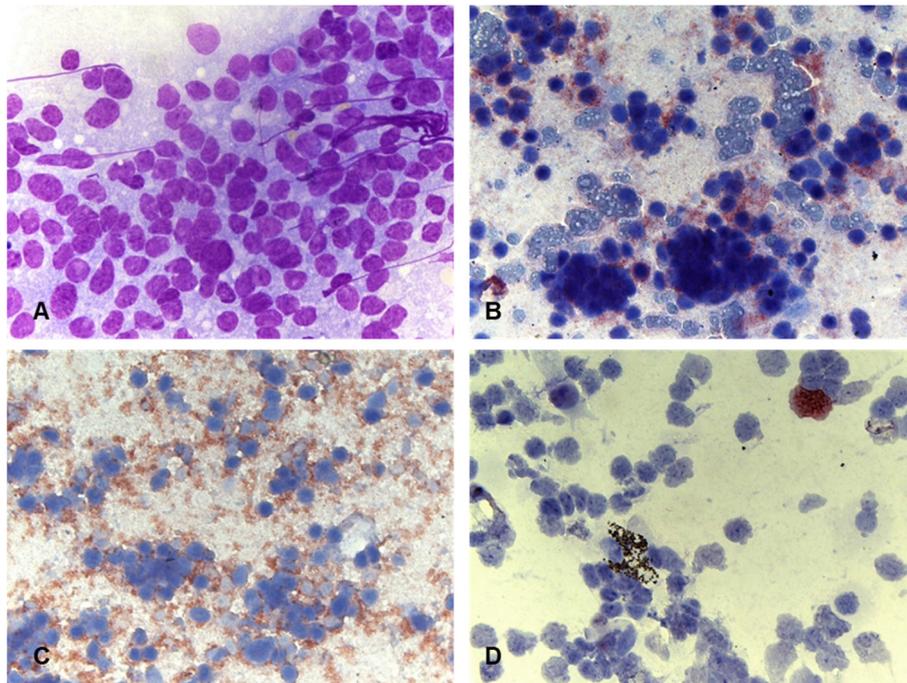
Tumoren dabei im Zentrum der Tumorknoten und ähnelt damit einer Comedonekrose. Große, geographische Nekroseareale, wie sie für die höhergradig maligne NEC typisch sind, fehlen. Üblicherweise weisen AC eine stärkere Kernpleomorphie als TC auf. Darin eingeschlossen sind auch das Auftreten von Nucleoli und Unregelmäßigkeiten der Kernmembran. Wesentliche zytologische Merkmale von Karzinoiden sind in Tabelle 7, sowie den Abbildung 7 und 8 zusammen angefasst.

**Tabelle 7.** Typische und atypische Karzinoide - zytologische Merkmale

Lagerung	Teils einzeln, teils locker ausgebreitet, teils in kleinen, einschichtigen, rosettenartigen Verbänden
Zelltypen	Relativ uniforme, kleine bis mittelgroße Tumorzellen
Kerne	Runde bis ovale Kerne, grobkörniges Chromatin (Salz-Pfeffer Struktur), Kernnasen, vereinzelt auch mit sog. „moulding“ wie bei SCLC, Kerne in Plasmaseen, reichlich Erythrozyten
Kern/Plasma-Relation	Ausgewogen oder zu Gunsten der Kerne verschoben
Zytoplasma	Wenig unscharf begrenztes, wasserklares Zytoplasma, häufig kein Zytoplasma
Hintergrund	Sauberer Hintergrund
Immunzytochemie	Expression von Syn, Chromogranin A, CD56 (NCAM), TTF-1, Ki67 (MIB1-, Proliferationsmarker)
Proliferationsrate	TC; Ki67 (<10%), AC; Ki67 (20%)

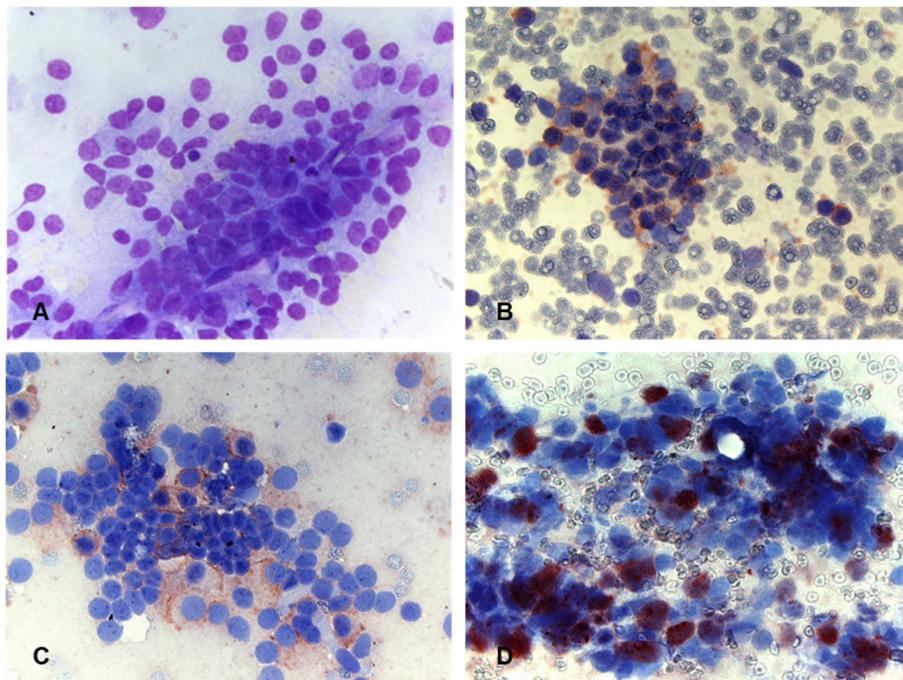
Abkürzungen: SCLC, kleinzelliges Lungenkarzinom; Syn, Synaptophysin; CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül-NCAM; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; TC, Typisches Karzinoid; AC; Atypisches Karzinoid (modifiziert nach 159, 141, 202)

## Histologische Klassifikation



### Abbildung 7. Typisches Karzinoid

A, Typisches Karzinoid: Mikroskopisch erkennt man deutlich vermehrt teils locker ausgebreitete, teils in kleinen Verbänden auf Abstand liegende, relativ uniforme Tumorzellen mit runden bis ovalen Kernen, feingranulärem Chromatin und wenig wasserklarem Zytoplasma (Imprintzytologie, Giemsa, 630x); B, zytoplasmatische Expression von Synaptophysin (Imprintzytologie, Synaptophysin, 630x); C, zytoplasmatische Expression von CD56 (Imprintzytologie, CD56, 630x); D, zytoplasmatische Expression von Ki67 1% (Imprintzytologie, Ki67, 630x)



### Abbildung 8. Atypisches Karzinoid

A, Atypisches Karzinoid: Mikroskopisch erkennt man relativ uniformen Tumorzellen mit runden bis ovalen Kernen, feingranulärem Chromatin und wenig wasserklarem Zytoplasma (Feinnadelaspiration, Giemsa 630x); B, zytoplasmatische Expression von Synaptophysin (Imprintzytologie, Synaptophysin, 630x); C, zytoplasmatische Expression von CD56 (Feinnadelaspiration, CD56, 630x); D, zytoplasmatische Expression von Ki67 <20% (Feinnadelaspiration, Ki67, 630x)

### 2.2.3.2. Kleinzelliges Karzinom

Beim Kleinzelligen Karzinom handelt es sich um einen besonders bösartigen Tumor, dessen Zellen frühzeitig in die Blutgefäße eindringen und zusätzlich über die Lymphbahnen metastasieren. In einigen Fällen sind diese Metastasen die Erstmanifestation der Tumorkrankheit.

Kennzeichen eines SCLC ist ein schnelles Wachstumstempo. Die Tumorverdopplungszeit dieser Tumoren beträgt 45 bis 86 Tage (7, 89). Zu den charakteristischen Ausbreitungs- und Wachstumsmustern von SCLC gehören die disseminierte Verteilung der Tumorzellen in kleinen Zellgruppen oder Zellverbänden, weniger in Einzelzellen. Dabei treten die Tumorzellen in kleinen Gruppen und einschichtigen Verbänden, häufig in Form sogenannter „indian files“ auf, innerhalb derer die Tumorzellen sich einden (sog. „moulding“). Die Zellen sind mechanischen Belastungen nicht gewachsen und leicht verletzbar. Das erklärt das charakteristische Auftreten von Bearbeitungsartefakten. Da die Polymorphie erst bei einer stärkeren Vergrößerung deutlich wird, erscheinen sie in der Übersicht eher einförmig, monoton, rund, oval oder spindelig und weisen eine hohe Mitoserate auf. Die Kerne sind etwa zwei bis dreimal so groß wie Lymphozyten ( $9,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$  versus  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) und sichelförmig oder rundlich, beziehungsweise haferkornartig spindelig eingebuchtet. In diesem Zusammenhang wird der Begriff „oat cell carcinoma“ (Haferzellkarzinom) verständlich. Je nach Erhaltungszustand der Zellkerne sind diese mehr oder weniger hyperchromatisch. Der Kernhintergrund kann einen tiefvioletten Farbton annehmen, während das Kernchromatin relativ fein dispers vorliegt. Nukleolen sind unauffällig oder fehlen. Gelegentlich finden sich zytologisch intranukleäre Zytoplasmaeinschlüsse (sog. „Kleinzellerbodies“). In flüssigem Untersuchungsgut (Sputum, Bronchialsekreten und BAL) erscheinen die Zellen meist kleiner als in Imprintzytologie, FNA und Bürstenbiopsien. Hier können sie einen breiteren Zytoplasmaleib von bis zu  $2 \mu\text{m}$  aufweisen. Nur in seltenen Fällen kommen auch größere und pleomorphe Tumorzellen, teils in Form von Riesenzellen vor. Der Präparatehintergrund ist durch das Vorkommen von Kernfragmenten (*apoptotic bodies*, sog. „Kernstaub“), sowie gequetschten und nekrotisch zerfallenen Zellen gekennzeichnet (Abbildung 9).

Bei den SCLC kann es zum Auftreten von intermediären Zellen (Intermediärzellen) kommen. Dieser SCLC-Typ zeichnet sich durch eine größere Anisokaryose bzw.

## Histologische Klassifikation

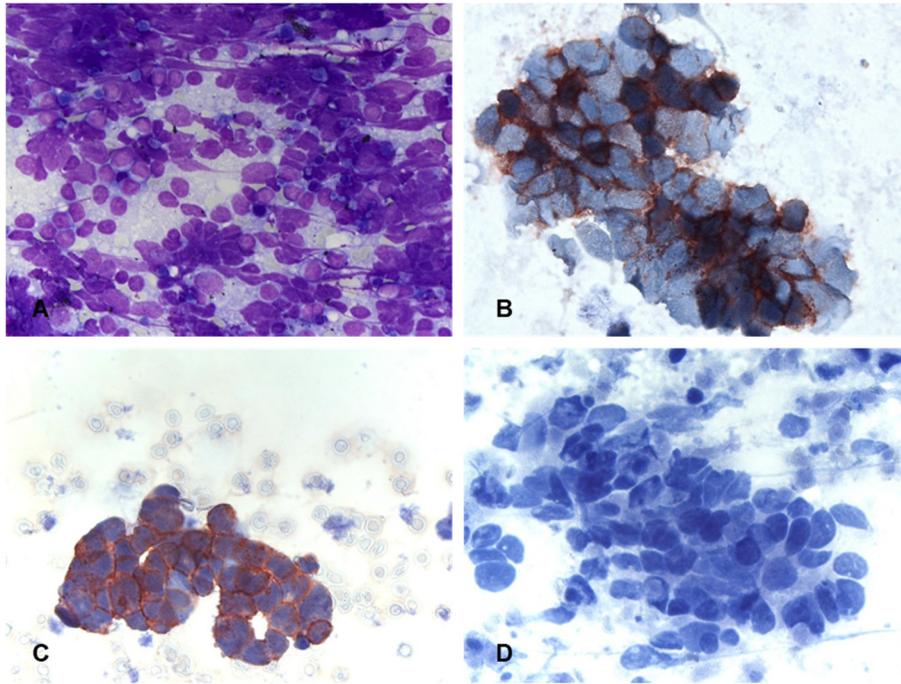
Anisozytose aus. Die klassische Kernmorphologie und das Fehlen prominenter Zellmembranen zählen dann zu den zuverlässigsten Unterscheidungsmerkmalen von LCNEC (171). Tumorzellen eines SCLC weisen ein organoides Wachstumsmuster auf. Gelegentlich können periphere palisadenartige und desmoplastische Stromareaktionen beobachtet werden, die bei einer niedrigen Vergrößerung dem basaloiden SQC ähneln (122). Die Expression neuroendokriner Marker und von TTF-1 sind dann Belege für ein SCLC, während die Expression von p40 ( $\Delta$ p63) und hochmolekularen Cytokeratinen (CK5/6 oder CK5/14) auf das Vorliegen eines basaloiden SQC deuten. Quetschartefakte werden typischerweise mit SCLC assoziiert, können allerdings auch bei einigen NSCC und Karzinoid-Tumoren beobachtet werden. In solchen Fällen kann die Bestimmung der Mitoserate mittels Ki67 (MIB1) zur validen Erkennung der Differenzierungsrichtung beitragen (132, 181).

Fokal oder in Form diskreter, kollisionsartiger Areale können in SCLC Anteile von NSCC auftreten (122). In diesen Fällen handelt es sich um kombinierte SCLC. Wesentliche zytologische Merkmale von SCLC sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

**Tabelle 8.** Kleinzelliges Karzinom - zytologische Merkmale

Lagerung	lockere Gruppen, zeilenförmige Verbände („indian files“), mosaikartige Lagerung der Kerne in den Verbänden
Zellform	Kleine polymorphe Einzelzellen, dreimal größer als kleine reife Lymphozyten (Durchmesser < 20 $\mu$ )
Kerne	Rundlich bis kantig, <i>nuclear moulding</i> , Nukleolen kaum oder nicht zu sehen, feingranuläres Chromatin
Zytoplasma	Fehlend oder kaum zu sehen, unscharf begrenzt
Kern/Plasma-Relation	Zugunsten des Kernes verschoben
Hintergrund	Feiner scholliger Detritus
Besonderheiten	In Sputum und Sekret bei schwacher Vergrößerung Gruppen von scheinbar einförmigen hyperchromatischen Kernen, Quetschartefakte, Kleinzellerbodies, <i>indian files</i>
Immunzytochemie	Expression von CD56 (NCAM), Syn, TTF-1 (Expressionsrate 85%), Ki67 (MIB-1)/(Proliferationsmarker), fehlende Expression von CK5/14, p63, CK7
Proliferationsrate	50-100%

Abkürzungen: CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül-NCAM; Syn, Synaptophysin; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1 (modifiziert nach 159)



**Abbildung 9.** Kleinzelliges Karzinom

A, Kleinzelliges Karzinom: Mikroskopisch erkennt man zwischen gequetschten und gequollenen Zellen, locker ausgebreitet einzeln und in kleinen, einschichtigen Verbänden, in Form sog. *indian files* liegende, kleine bis mittelgroße Tumorzellen mit ovalen bis kantigen Kernen, feingranulärem Chromatin und wenig Zytoplasma (Imprintzytologie Giemsa 630x); B, zytoplasmatische Expression von CD56 (Imprintzytologie, CD56, 630x); C, zytoplasmatische Expression von Synaptophysin (Imprintzytologie, Synaptophysin, 630x); D, fehlende zytoplasmatische CK7-Expression (Pleuraerguss, CK7, 630x)

### 2.2.3.3. Großzelliges neuroendokrines Karzinom

Im Gegensatz zu SCLC sind Tumorzellen eines LCNEC größer und verfügen über ein reichlich vorhandenes Zytoplasma. Die Kerne der LCNEC-Zellen erscheinen eher polygonal als fusiform, weisen ein vesikuläres oder grobes Chromatin auf und verfügen über prominente Nukleoli. Grundsätzlich ähneln die Tumorzellen mehr einem großzelligem Karzinom als einem Karzinoidtumor.

LCNEC zeigen ähnliche zytologische Merkmale wie andere NEC. Charakteristisch für LCNEC sind das Vorkommen von oft großen Nekrosezonen von mehr als 10 Mitosen pro Gesichtsfeld bei großer Vergrößerung (141, 181).

LCNEC können in Kombination mit anderen Lungenkrebstypen, einschließlich ADC oder SQC, auftreten (27).

Der Einsatz von Proliferationsmarkern kann differenzialdiagnostisch hilfreich sein. So sollen LCNEC eine etwas niedrigere Proliferationsrate (Ki67, 40-80%) als SCLC (50-100%) aufweisen (147, 181). ADC weisen dagegen erwartungsgemäß einen niedrigen Ki67 Wert von etwa 20% auf (133, 181, 206).

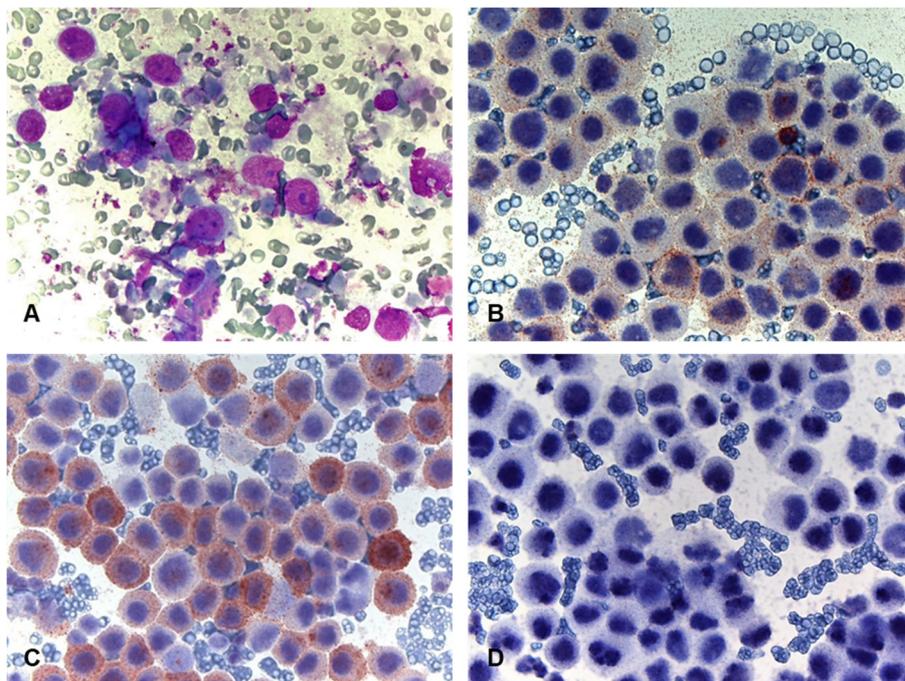
## Histologische Klassifikation

Die lichtmikroskopische Diagnostik der meisten TC und AC ist bereits ohne eine immunzytochemische Anfärbung möglich. Für LCNEC gilt dies nicht. Schwierigkeiten bestehen vor allem in der Differenzierung von LCNEC und NSCC. Wesentliche zytologische Merkmale der LCNEC sind in der Tabelle 9 und Abbildung 10 zusammengestellt.

**Tabelle 9.** Großzelliges neuroendokrines Karzinom - zytologische Merkmale

Lagerung	Teils einzeln, teils locker ausgebreitete Gruppen, zeilenförmige Verbände („nuclear moulding“)
Zelltypen	Relativ uniforme, kleine bis mittelgroße Tumorzellen
Kerne	Körnige Chromatinstruktur, mindestens dreimal größer als kleine Lymphozyten, bizarr, unregelmäßig begrenzte Kerne
Kern/Plasma-Relation	Zugunsten des Kernes verschoben
Zytoplasma	Wenig, helles Zytoplasma
Hintergrund	Sauberer Hintergrund
Besonderheiten	Morphologisch Zeichen der neuroendokrinen Differenzierung
Immunzytochemie	Expression von CD56 (NCAM), Syn, Chromogranin A, TTF-1 (Expressionsrate 50%), Ki67 (MIB-1)/(Proliferationsmarker), fehlende Expression von CK5/14, p63
Proliferationsrate	40-80%

Abkürzungen: CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül-NCAM; Syn, Synaptophysin; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin (modifiziert nach 159)



**Abbildung 10.** Großzelliges neuroendokrines Karzinom

A, Großzelliges neuroendokrines Karzinom: Mikroskopisch erkennt man mittelgroße bis große Tumorzellen mit runden Kernen, ein bis drei prominenten Nukleolen und einem relativ breiten basophilen Zytoplasmasaum (Pleuraerguss, Giemsa 630x); B, zyttoplasmatische Expression von CD56 (Pleuraerguss, CD56, 630x); C, zyttoplasmatische Expression von Ki67 >80% (Pleuraerguss, Ki67, 630x); D, fehlende zyttoplasmatische CK7-Expression (Pleuraerguss, CK7, 630x)

#### **2.2.4. Großzelliges Karzinom**

Das großzellige Karzinom (LCC) ist ein undifferenziertes NSCC, dem die für SCLC, ADC und SQC charakteristischen zytologischen Wachstums- und Ausbreitungsmuster, sowie immunhistochemischen Muster fehlen. Da es sich um eine Ausschlussdiagnose handelt, ist sie an die Untersuchung eines resezierten Tumors gebunden und lässt sich weder an Zytologien noch an (kleinen) Biopsien erheben.

Der routinemäßige Einsatz der Immunhistologie (IHC) in der histologischen Diagnostik hat zu einer Abnahme der altersjustierten Rate auf 2,3% geführt. Das Durchschnittsalter beträgt etwa 60 Jahre. In der Mehrzahl sind Männer und Raucher betroffen. Die Ätiologie und das klinische Erscheinungsbild der LCC ist ähnelt den anderen schlecht differenzierten Lungenkarzinomen. Die Patienten klagen über Husten, Thoraxschmerzen und Luftnot.

Die teils zentralen, teils peripheren Tumore sind zum Zeitpunkt der Diagnostik in der Regel größer als 5 cm.

Makroskopisch handelt es sich um unifokale, kugelförmige Tumoren mit gut erkennbaren Rändern und gewölbter, gelappter, homogener, grauweißer "Fischfleisch-ähnlicher" Schnittoberfläche. Nekrose und Blutung treten im Tumorerinneren häufig auf (eine Anthrakose fehlt) wobei bei den peripheren Tumoren die Thoraxwand häufig beteiligt ist.

Histologisch liegen die großen, polygonalen und anaplastischen Zellen einzeln in lockeren Gruppen, in einschichtigen Verbänden oder soliden Nestern vor. Definitionsgemäß fehlt eine klare ADC-, SQC- oder NEC-Morphologie. Zytologisch verfügen die abgerundeten oder polygonalen Tumorzellen über mäßig reichlich Zytoplasma, gut definierte Zellgrenzen, bläschenförmige Kerne und prominente Nukleolen. Immunzytochemisch exprimieren die Pan-Cytokeratin-positiven Tumorzellen weder TTF-1, Napsin A, p40 ( $\Delta$ Np63), Synaptophysin (Syn), Chromogranin noch CD56.

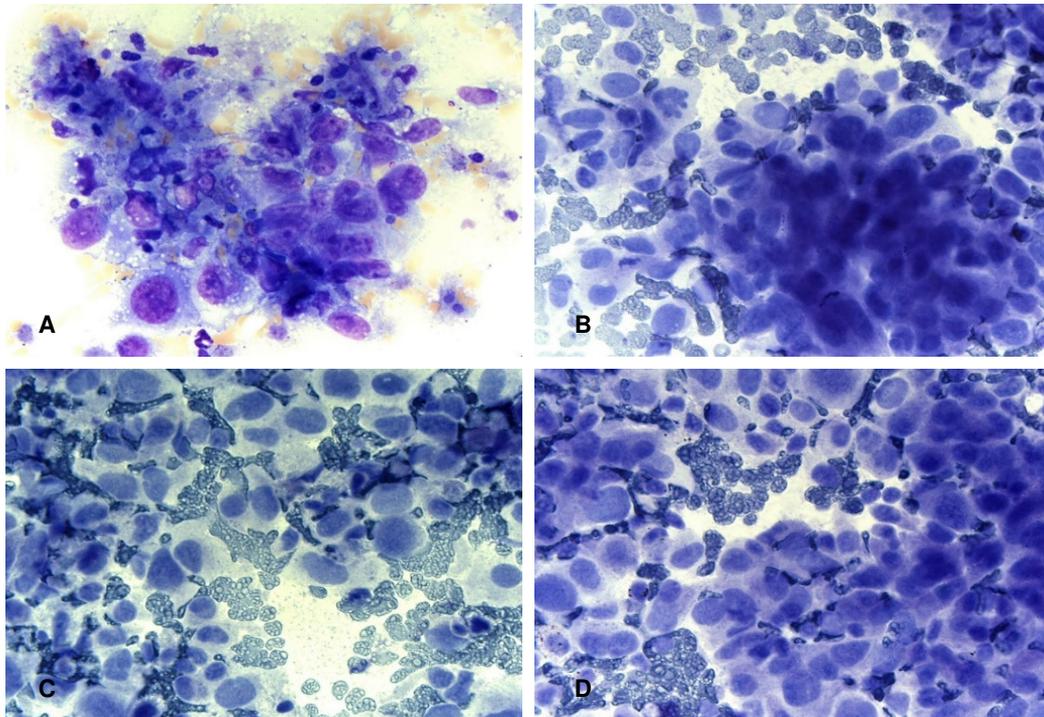
Wesentliche zytologische Merkmale sind in der Tabelle 10 und Abbildung 11 zusammengestellt.

## Histologische Klassifikation

**Tabelle 10.** Großzelliges Karzinom - zytologische Merkmale

Lagerung	Einzel oder in lockeren Gruppen, in einschichtigen Verbänden oder soliden Nestern
Zellform	Große, abgerundete, polygonale und anaplastische Zellen, deutliche Anisokaryose
Kerne	Mono- bis polymorph, bläschenförmig, unterschiedlich groß
Nukleolen	Prominent, bizarr geformt, groß
Kern/Plasma-Relation	Zugunsten der Kerne verschoben
Zytoplasma	Unterschiedlich breit, unscharf begrenzt, zyanophil, keine Schleim- oder Keratinbildung
Besonderheiten	Breiter Zytoplasmasaum, Vorkommen von Fibrozyten ähnlichen Zellen, keinem der anderen Typen des Bronchialkarzinoms zuzuordnen
Immunzytochemie	Expression von CK7, fehlende Expression von CK5/14, p63, TTF-1

Abkürzungen: CK, Cytokeratin; TTF-1 Thyreoidaler Transkriptionsfaktor-1-(modifiziert nach 159, 181)

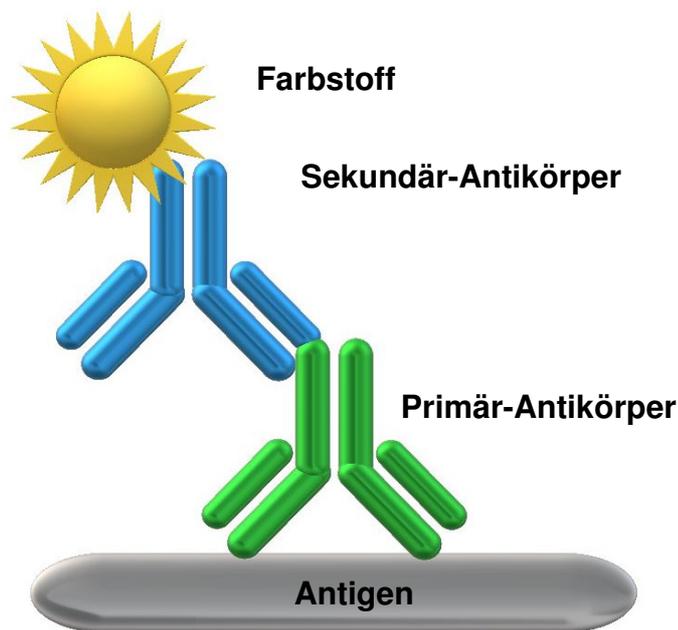


**Abbildung 11.** Großzelliges Karzinom

A, Unterschiedlich große, ein- und mehrschichtige Verbänden, mittelgroßer bis großer Tumorzellen mit runden Kernen, mässig reichlich hellem Zytoplasma (Imprintzytologie, Giemsa, 630x); B, fehlende nukleäre TTF-1-Expression (Imprintzytologie, TTF-1, 630x); C, fehlende zytoplasmatische CK7-Expression (Imprintzytologie, CK7, 630x); D, fehlende zytoplasmatische CK5/14-Expression (Imprintzytologie, CK5/14, 630x)

## 2.3. Immunzytochemie

Unter Immunzytochemie versteht man eine auf einer Antigen-/AK-Reaktion basierende Untersuchung von Zellstrukturen (Zellkern-, Zytoplasma- oder Zellmembranepitope). Dabei wird dem jeweiligen Untersuchungsgut ein an den Primär-AK bindender Peroxidase-konjugierter Sekundär-AK hinzugefügt. Die Zugabe eines Substrates ermöglicht bei der indirekten Methode die Lokalisation des Reaktionsortes. Im Gegensatz dazu würden bei einer direkten Nachweismethode ein spezifischer AK und die Peroxidase einen Immunkomplex bilden. Abbildung 12 stellt das Prinzip des indirekten Nachweissystems dar.



**Abbildung 12.** Das Grundprinzip der indirekten immunzytochemischen Färbung  
Immunzytochemische Techniken erlauben mit Hilfe von mono- bzw. polyklonalen Antikörpern den Nachweis gewebespezifischer Antigene (Proteine, Polysaccharide und Lipide). Mittels Farbstoffen werden Antigen-Antikörper Bindungen sichtbar. Bei Sekundär-Antikörpern handelt es sich um einen Antikörper, der mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) konjugiert ist und durch Bindung des entsprechenden Antigens eine spezifische Bindung mit dem Primär-Antikörper eingeht

### 2.3.1. Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1

TTF-1 ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor der NKX-2-Genfamilie, der durch normale Schilddrüsenfollikel und parafollikuläre C-Zellen, Clara-Zellen, Typ-II-Pneumozyten und Bronchialepithelzellen exprimiert wird.

Transkriptionsfaktoren sind Schlüsselmoleküle zur Bestimmung des Zellphänotyps und der Genexpressionsregulation (94, 116). TTF-1 ist für die Regulation von Thyreoglobulin, der Schilddrüsenperoxidase, sekretorischen und

## Histologische Klassifikation

oberflächenaktiven Proteinen verantwortlich. Dabei handelt es sich um ein aus 371 Aminosäuren zusammengesetztes Polypeptid mit einem Gewicht von 38 kD, das sich an den Erkennungsstellen bindet und die Phosphorylierung im Protein reguliert. Es wird angenommen, dass es eine Rolle in der Organogenese spielt.

Eine signifikante Anzahl von Karzinomen (Schilddrüsenkarzinome, pulmonale ADC und SCLC, nicht LCC) zeigen eine TTF-1 Expression (71, 78, 93). Allerdings sollen auch bei SQC der Lunge in variablen Anteilen (0-38%) eine schwache Kernfärbung auftreten (121).

Die TTF-1 Klone SPT24, SP141 und 8G7G3/1 werden üblicherweise für immunhistochemische Studien verwendet.

SPT24 ist ein sensitiver, aber nicht immer ausreichend spezifischer Klon. Der Klon 8G7G3/1 hingegen ist weniger sensitiv, dafür aber spezifischer als SPT24. In der Literatur werden für die TTF-1 Klone unterschiedliche Sensitivitäts- und Spezifitätswerte angegeben. Dies könnte möglicherweise auf die jeweils ausgewählten, verschiedenen AK-Klone zurückzuführen sein (34, 140, 208).

Betrachtet man die SQC der Lunge, liefert der Klon 8G7G3/1 eine höhere Spezifität für ADC als SPT24. Allerdings ist die Häufigkeit von positiven Nachweisen von SQC bei SPT24 größer. Es wird darauf hingewiesen, dass ein bestimmter Prozentsatz des SQC mit TTF-1 markiert sein muss, damit ein positives Ergebnis vorliegt. Dies gilt besonders für die Anwendung eines Signalverstärkungssystems.

8G7G3/1 gehört zu den spezifischsten AK zur Identifizierung von Lungen-ADC (34, 76, 130, 140, 167, 208).

### **2.3.2. Cytokeratine**

CK gehören zu den hauptsächlich in Epithelzellen vorkommenden Intermediärfilamenten. Damit stellen sie eine wichtige Komponente zur Fixierung des Zellkerns und zur Aufrechterhaltung der Zellmorphologie innerhalb des Zytoskeletts dar. Es existieren etwa 20 Unterklassen (Moll-Katalog), die sich in ihrem Molekulargewicht und dem isoelektrischen pH-Wert unterscheiden (112, 161). Nach Munding 2013 sollen alle Tumore epithelialen Ursprungs CK exprimieren (120). Die einzelnen Karzinome lassen sich durch die Bildung

## Histologische Klassifikation

unterschiedlicher charakteristischer Keratinprofile unterscheiden. Für viele CK-Subtypen wurden bereits monoklonale AK zum Nachweis entwickelt.

Das Protein CK7 besitzt eine Molekülmasse von 54kDa. Es wird in diversen Primärlokalisationen von ADC exprimiert. Ebenfalls wird CK7 bei 94% bis 100% der Lungen-ADC exprimiert. CK7 besitzt mit einer Spezifität von 50% bis 93% eine nur geringe Spezifität zum Nachweis von Lungenkarzinomen (202). Es ist vor allem in Drüsen- und Übergangsepithelien der Lunge, des Endometriums, der Harnblase, der Pankreasdrüse, der Gallenwege, des Magens, der Ovarien und der Mamma zu finden. In kolorektalen Karzinomen und Nierenzellkarzinomen wird es jedoch nicht oder nur sehr selten exprimiert (32). Epithelien, wie zum Beispiel aktivierte Alveolarepithelien, die eine Expression von CK7 in Lungenmetastasen von Kolonkarzinomen zeigen, können als Positiv-Kontrolle gewertet werden. Sie sind allerdings kein Beleg für eine CK7-Expression durch den Tumor selbst.

Zusammenfassend wird CK7 zur differenzialdiagnostischen Unterscheidung drüsiger Epithelien und als zusätzliche Färbung zur Erkennung primärer Lungentumore eingesetzt.

Bei CK5/6 handelt es sich um einen AK gegen die CK 5 und 6. CK5 und CK6 besitzen ein Molekulargewicht von 58 kDa bzw. 56 kDa oder 58 kDa und gehören damit zu den hochmolekularen CK des Grundtyps.

Diese beiden CK werden in allen Zellschichten des mehrschichtigen Epithels, des Übergangsepithels und des komplexen Epithels sowie in Mesothelzellen und in epitheloiden Mesotheliomzellen exprimiert. Des Weiteren lassen sie sich auch in den Basalzellen des Plattenepithels finden (18).

Eine Expression in einfachen Epithelien und nicht epithelalem Gewebe kommt in der Regel nicht vor.

CK5/14 und CK5/6 gehören zu den sehr zuverlässigen Markern für Plattenepithelzellen. Mit Hilfe solcher AK-Cocktails gegen diese CK ist ein Nachweis von Basalzellen und Myoepithelien möglich. CK5 gehört zu den basischen CK, wohingegen CK14 mit einem Molekulargewicht von 50 kDa zu den sauren CK zählt. CK5 und CK14 werden neben CK6 als stabile Marker für Plattenepithelzellen angesehen.

## Histologische Klassifikation

Eine der Hauptanwendungsmöglichkeiten der spezifischen AK-Cocktails CK5/6 und CK5/14 liegt in der Unterscheidung wenig differenzierter SQC (CK5/6 oder CK5/14 meist positiv) von pulmonalen ADC (CK5/6 oder CK5/14 hier meist negativ) (25, 181). Zusätzlich finden sich in Mesotheliomen positive Reaktionen.

Der Einsatz der beiden AK-Cocktails CK5/14 und CK5/6 bei bronchogenen Lungenkarzinomen erleichtert die differenzialdiagnostische Unterscheidung atypischer Zellproliferationen der Brustdrüse. Während typische duktale Hyperplasien eine starke CK5/6-Expression aufweisen, sind atypische duktale Hyperplasien und duktale in-situ Karzinome durch einen negativen Nachweis charakterisiert.

Darüber hinaus werden CK5/6 AK, ähnlich wie p63 oder CK HMW (34 $\beta$ E12), für den Nachweis benigner Drüsen der Prostata und zur Markierung von Myoepithelzellen eingesetzt (130, 151, 181).

### **2.3.3. Napsin A**

Napsin A ist eine neue Asparagin-Protease der Pepsin-Familie. Die Asparagin-Protease spielt eine Rolle bei der Reifung des Surfactant-Protein-Bs. Napsin A ist etwa 38kD schwer und wird von Epithelien des Lungenparenchyms (Pneumozyten Typ II, Alveolarmakrophagen und Clara-Zellen), den Nierentubuli, exokrinen Drüsen und dukталen Epithelien der Bauchspeicheldrüse exprimiert (2, 63).

Napsin hat zwei Isoformen, Napsin A und Napsin B. Napsin A wird vor allem von Pneumozyten Typ II, Tumorzellen pulmonaler ADC, sowie von Tumorzellen der Niere exprimiert. Napsin B kommt nur in den Immunsystem assoziierten Zellen vor (63, 173, 186).

Wie De Felice et al. 2003 zeigten, wird die Expression von Napsin A durch TTF-1 reguliert ein Mitglied der Nkx2-Familie von Transkriptionsfaktoren, die auch die Expression von Surfactant-Protein B regulieren (37).

Im Vergleich von mono- und polyklonalem Napsin A führt der erstere AK zu einer stärkeren Anfärbung (143). Monoklonales Napsin A hingegen erscheint durch eine pan-cytoplasmatische granuläre Färbung. Diese pan-cytoplasmatische Färbung ist auf eine mögliche Kreuzreaktion mit einem Pan-Mucin-Antigen und dem polyklonalen AK zurückzuführen (143).

## Histologische Klassifikation

Für die Erkennung primärer ADC der Lunge hat sich Napsin A vor allem in Kombination mit TTF-1 als ein wertvoller Marker erwiesen (17).

### **2.3.4. p40 ( $\Delta$ Np63)**

Derzeit gehören TTF-1 und p40 ( $\Delta$ Np63, fortan einfach p40) zu den Markern mit der höchsten Spezifität für die differenzialdiagnostische Unterscheidung zwischen pulmonalen ADC und SQC (17). An schwer beurteilbaren Biopsien weist p40 im Vergleich zu CK5/6 eine höhere Sensitivität und Spezifität für SQC auf (210). Das p63-Gen, das sich auf dem Chromosom 3q27-29 befindet, enthält 15 Exons und weist eine bemerkenswerte Sequenz- und Strukturhomologie mit p53 auf (123). p63 wird normalerweise in den geschichteten Epithelien (z. B. Platten-, Urothel-, Bronchialepithel), von Basalzellen einiger Drüsenepithelien (z. B. Prostata) sowie von Myoepithelzellen aus Brust- und Speicheldrüsen, Trophoblasten und Thymus exprimiert (153).

Der AK p63 tritt in zwei Isotypen auf: TAp63 and  $\Delta$ Np63 (17). Diese Isotypen unterscheiden sich strukturell in der N-Terminalen Transaktivierungsregion. Der TAp63-Isotyp besteht aus der "TA"-Kompetente-Transaktivierungsdomäne und weist Ähnlichkeiten mit P78 auf. Es spielt eine Rolle als Tumorsuppressorgen.  $\Delta$ Np63 verfügt über eine " $\Delta$ N"-inhibitorische Transkriptionsdomäne und spielt mit seiner Fähigkeit TAp63 und p53 zu antagonisieren eine Rolle in der Onkogenese (201).

Der AK p40 wird für die SQC Erkennung von Kopf- und Hals-, Ösophagus- und Urothelkarzinomen, Thymus- und gynäkologischen Tumoren eingesetzt. (17).

### **2.3.5. CEA**

Das Carcinoembryonales Antigen (CEA) bezeichnet eine heterogene Familie von onkofetalen Glykoproteinen. Sie besitzen ein Molekulargewicht von etwa 200 kDa und kommen in der Glykokalyx gastrointestinaler Zellen vor.

Normalerweise wird das CEA während der Embryogenese produziert, wobei die Produktion vor der Geburt aufhört (51). Es wird hauptsächlich von fetalen Epithelzellen produziert. Geringerer Menge von CEA können allerdings auch von adulten epithelialen Zellen exprimiert werden (192).

**Information zur Anwendung:**

Anti-CEA kann ebenso wie Calretinin, CK5/6, HBME-1, Napsin A, MOC-31 und Ber-EP4 als Marker zur Abgrenzung eines ADC von einem Mesotheliom eingesetzt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet von Anti-CEA ist die Immunphäotypisierung verschiedener metastatischer ADC. Dabei kann Anti-CEA als Hilfsmittel zur Identifizierung ihres Ursprungs dienen.

Der Nachweis von CEA in chromophilen und hellzelligen Nierenzellkarzinomen ist bisher nicht gelungen. Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung anderer Karzinomentitäten mit geringen (Mammakarzinome, Endometriumkarzinome, nichtmuzinöse Ovarialkarzinome) und hohen (Kolonkarzinome, Magenkarzinome, pankreatobiliäre Karzinome, Lungenkarzinome, ADC der Cervix uteri) Anteilen von CEA-positiven Tumoren, sollte der CEA-AK immer in Kombination mit anderen, für die Fragestellung relevanten, Markern verwendet werden.

Als diagnostischer Marker kann CEA nur bedingt eingesetzt werden. Dies ist in der eingegrenzten Spezifität begründet. Das tumorassoziierte Antigen wird nicht nur in Metastasen vermehrt exprimiert, sondern ist auch bei Leberzirrhose, Pankreatitis, Lungenemphysem und Bronchitis nachweisbar (51, 78, 87, 192).

**2.3.6. CD56**

Der Marker CD56 (neurales Zelladhäsionsmolekül, NCAM) ist am empfindlichsten für die Diagnose von SCLC. Allerdings sind 5 bis 10% der SCLC für alle drei NEC-Marker negativ. CD56 ist ein Oberflächenprotein der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle (NCAM). Es sind drei Isoformen von CD56 bekannt (NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180) (40, 205).

NCAMs Zelloberflächenmolekül ist an der Vermittlung von homo- und heterotypischen Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten verschiedenster Gewebe und deren Differenzierung beteiligt (75).

CD56 entstammt neuronalen, neuroektodermalen und neuroendokrinen Geweben. In erster Linie lässt sich eine CD56-Expression in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD8+T-Zellen, der quergestreiften Skelettmuskulatur, in Normalgeweben von Neurinomen, an Gliazellen, in Merkel-Zell Karzinomen, Karzinoiden und SCLC nachweisen (90, 187).

## Histologische Klassifikation

CD56 weist keine ausgeprägte Spezifität auf. Aus diesem Grund sollte der CD56-Ausdruck als „NEC“-Marker nur im Zusammenhang mit den morphologischen Merkmalen des NEC in der Routinefärbung (wie z.B. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung) interpretiert werden. In der IHC stellt sich CD56 in den meisten SCLC durch eine starke Membranfärbung in allen Tumorzellen dar (202). An TTF-1-negativen Tumoren, bei denen differenzialdiagnostisch ein SCLC oder ein LCNEC in Betracht kommt, empfiehlt sich zum Ausschluss eines basaloiden-SQC die Durchführung einer p40 ( $\Delta$ p63)-Färbung.

### 2.3.7. Synaptophysin

Der Syn-AK, frühere Bezeichnung Protein p38, besteht aus einem integralen Membranglykoprotein von 38 kDa, der kleinen synaptischen Vesikel (*small synaptic vesicles*, SSV). Ursprünglich wurde Syn aus den präsynaptischen Vesikeln von Rindern isoliert.

Syn wird in den Nervenendigungen durch Exo- und Endozytose „recycled“. Das Membranprotein ist in nahezu allen Neuronen vorhanden und gilt als spezifische Organelle in Nervenzellen, da in allen anderen Zellen ein entsprechendes Äquivalent fehlt. Abgesehen von der SSV-Lokalisation in Nervenzellen ist Syn bei unterschiedlichen neuroendokrinen Zellen ubiquitär auf kleinen pleomorphen Vesikeln verteilt, jedoch nicht auf den sekretorischen Granula (1, 61).

Syn reagiert mit neuroendokrinen Zellen des menschlichen Nebennierenmarks, des Glomus caroticum, der Haut, Hypophyse, Schilddrüse, Lunge, Bauchspeicheldrüse und der Magen-Darm-Schleimhaut.

Der Syn-AK markiert präsynaptische Vesikel verschiedener Nervenzelltypen und eignet sich daher zum Nachweis von Synapsen. Zusätzlich kann der AK verwendet werden, ein breites Spektrum neuroendokriner Neoplasmen, sowohl neuraler als auch epithelialer Typen, zu identifizieren (14, 16, 197).

### **3. Zielstellung**

In der modernen bioptischen Tumordiagnostik setzen die ethisch vertretbare Anzahl und Invasivität der Biopsieverfahren und die damit verfügbare Menge an Tumorgewebe dem essentiellen Ziel morphologisch (immunzyto-/-histochemisch) validierter Diagnosen und molekular-biologische Analysen vorliegender Tumoren enge Grenzen. Das führt zur Frage eines ressourcenschonenden Umgangs mit den verfügbaren Gewebeproben. Aktuell existieren unterschiedliche Empfehlungen zum Umfang bzw. zur Anzahl der einzusetzenden AK (85, 142, 176, 177).

In der Praxis beginnt der über wenige Stunden bzw. Tage in mehreren Schritten ablaufende Prozess der Aufarbeitung und Beurteilung von Biopsiepräparaten in der Regel mit einer HE- und/oder Giemsa-Färbung. Abhängig von dieser ersten Arbeitsdiagnose werden in einem engen Zeitfenster die Weichen für den weiteren Aufarbeitungsprozess gestellt und aus dem bekannten großen Antikörperspektrum gezielt geeignet scheinende Antikörper ausgewählt. Am Ende des diagnostischen Prozesses, also nach Vorlage aller klinisch-röntgenologischen Befunde, sowie weiterer bioptischer Befunde bis hin zu den Ergebnissen der chirurgischen Diagnostik, wird die am Entnahmeort vorliegende klinisch-zyto-/histologisch validierte Enddiagnose (Goldstandard) bestimmt. Alle danach zu treffenden weiteren diagnostischen und therapeutischen Entscheidungen werden davon abgeleitet.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Frage, welchen Beitrag immunzyto-/-histochemische Verfahren im Rahmen der klinisch-bioptischen Diagnostik zur Erkennung des am Entnahmeort vorliegenden Tumortyps/-subtyps von Lungenkarzinomen leisten können. Anhand des eigenen großen Untersuchungsgutes soll einerseits auf Unterschiede der einzelnen Biopsieverfahren zur Materialgewinnung für zytologische Untersuchungen eingegangen werden und andererseits die Ergebnisse der immunzyto-/-histologischen Diagnostik mit der klinisch-morphologisch am Entnahmeort gesicherten Enddiagnose (Goldstandard) verglichen werden. Im Einzelnen geht es um die Beantwortung folgender fünf Hypothesen:

## Zielstellung

1. H0: Für die Erkennung des vorliegenden Typs/Subtyps von Lungenkarzinomen sind singular eingesetzt AK sind bedeutungslos.
2. H0: Kombinationen zweier unterschiedlicher AK verbessern an kleinen Gewebeproben und Zytologien ergänzend zu singulären AK nicht zusätzlich die Sicherheit der Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen
3. H0: Kombinationen von mehr als zwei AK sind nicht geeignet im nennenswerten Umfang die Sicherheit der Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen zu verbessern.
4. H0: Verglichen mit der klinisch-morphologisch am Entnahmeort gesicherten Enddiagnose (Goldstandard) unterscheiden sich ICC und IHC nicht.
5. H0: Die Ergebnisse der Giemsa-basierten Standardfärbung wird durch die ICC nicht verbessert.

## **4. Material und Methode**

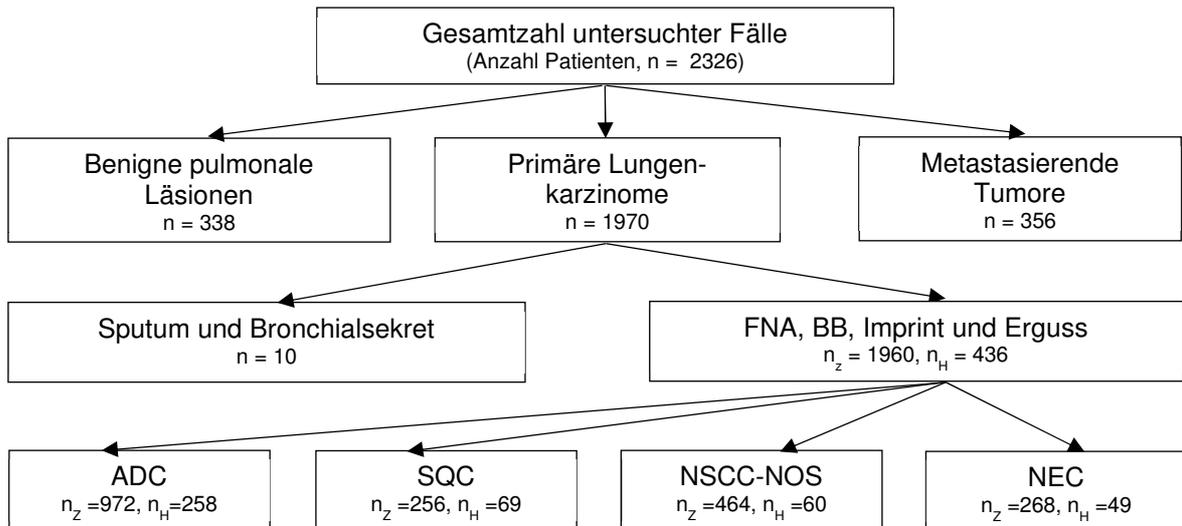
### **4.1. Auswahl des Patientenkollektivs**

Im Zeitraum von Januar 2011 bis Oktober 2016 wurden im Zytologischen Labor der LungenClinic Grosshansdorf Gewebeproben von 3419 unterschiedlichen Entnahmeorten von 2326 Tumorpatienten immunzytochemisch untersucht. Die am Entnahmeort vorliegende finale Enddiagnose (Goldstandard) basiert auf den histologischen Analysen von 1308 Resektaten und 616 Zangen- und Stanzbiopsien, sowie auf weiteren 1495 klinisch-zytologischen Befunden.

In 1970 Fällen handelte es sich um primär pulmonale Karzinome, 356 mal um Metastasen extrapulmonal gelegener Primärtumoren und 338 mal um gutartige Läsionen. In die vorliegende Analyse wurden die an FNA, Ergüssen, Bürstenbiopsien und Imprintzytologie von 1960 Patienten erhobenen zytologischen Diagnosen ein- und 10 Patienten mit Sputumproben und Bronchialsekreten ausgeschlossen. Die zytologische Typisierung erfolgte entsprechend den in der WHO-Klassifikation 2015 für Lungentumore festgelegten Regeln (181). Die Arbeit mit anonymisierten biologischen Patientenproben (Restmaterial) wurde von der Ethikkommission der Universität Lübeck unter der Fallnummer 17-144 genehmigt.

22,2% der 1960 klinisch-zytologisch/-immunzytologischen erhobenen Diagnosen konnten mit histo-/immunhistologischen Diagnosen verglichen werden, die präoperativ an Biopsaten bzw. an resezierten Tumoren in der Pathologie des Leibniz-Forschungszentrums Borstel gewonnen wurden (n=436, Abbildung 13).

## Material und Methode

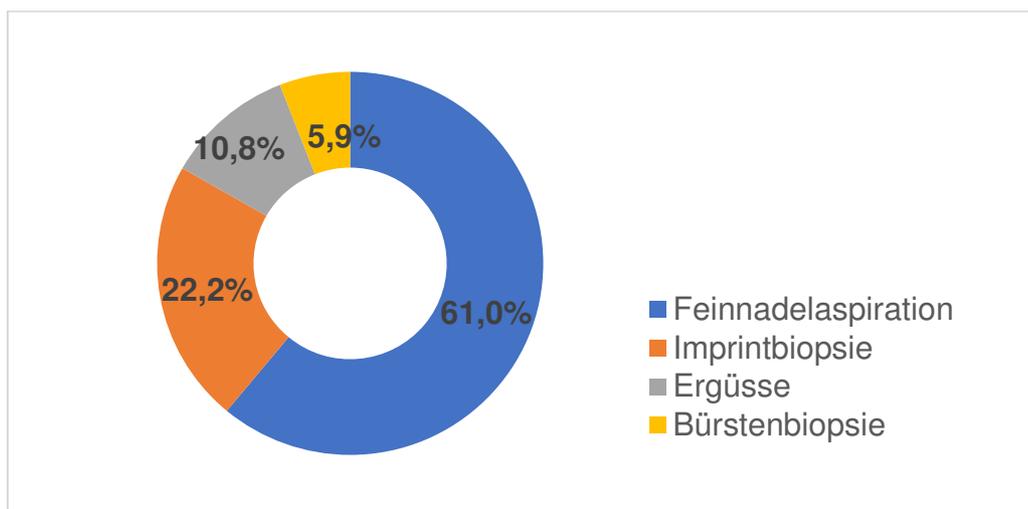


**Abbildung 13.** Anteil unterschiedlicher Tumortypen im eigenen Untersuchungsgut

Abkürzungen: n, Anzahl Patienten; n<sub>z</sub>, Anzahl Patienten der Zytologie; n<sub>H</sub>, Anzahl Patienten der Histologie; FNA, Feinnadelaspiration; BB, Bürstenbiopsie; Imprint, Abkratzen- oder Imprintzytologie von Stanz- oder Zangenbiopsien; ADC, Adenokarzinom; SQC, Plattenepithelkarzinom, NSCC, nicht-kleinzelliges Karzinom; NEC, Neuroendokrines Karzinom

### 4.2. Biopsiematerial

Bei den 1960 primären Lungenkrebsfällen handelt es sich 1196 mal um FNA, 436 mal um Abkratzen- oder Imprintzytologien von Stanz- oder Zangenbiopsien, 212 mal um Ergüsse und 116 mal um Bürstenbiopsien (Abbildung 14).



**Abbildung 14.** Anteil unterschiedlicher Biopsieverfahren am Untersuchungsgut

Innerhalb des betrachteten Untersuchungsgutes wurden 1196 Feinnadelaspiration (61,0%), 436 Imprintbiopsien (22,2%), 212 Ergüsse (10,8%) und 116 Bürstenbiopsien (5,9%) für weiterführende Untersuchungen gewonnen

### 4.3. Patientenbeschreibung

Die von uns untersuchten Proben stammen von 1157 Männern und 813 Frauen (Geschlechtsverhältnis m:w = 1,4:1, Ø Alter m 57,1 J., w 65,5 J.). Der jüngste Patient war 18 J. und der Älteste 92 J. alt. Der Erstere litt an einem Karzinoid und der Letztere an einem ADC.

### 4.4. Aufarbeitung des Untersuchungsgutes

#### 4.4.1. Giemsa-Färbeprotokoll

Zur Anfärbung der Präparate wurde eine Standard Giemsa-Färbung eingesetzt. In der Giemsa-Färbung erscheint das Chromatin der Zellkerne rotviolett und Zytoplasma sowie Nukleolen blau. Verhornende Zellen charakterisieren sich durch eine leuchtend hellblaue Färbung, die Zilien des Zylinderepithels hingegen durch eine purpurrote.

Für jede Untersuchung und jeden Patient wurden dazu jeweils vier Ausstriche angefertigt und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin folgte eine Fixierung für 5 Min. mit Methanol, um im Anschluss die Präparate über 20 Min. nach Giemsa zu färben. Nach Abschluss der Färbung wurden diese nochmals mit der Pufferlösung abgespült und erneut luftgetrocknet (Abbildung 15).

#### Vorbereitung der Giemsa-Färbelösung:

##### Färbelösung:

10 ml Giemsa Stammlösung (Merck 1.0924.2500) + 170 ml Pufferlösung

Die Giemsa Färbelösung wurde täglich frisch angesetzt.

##### Pufferlösung:

16 ml 0,5 m  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  = 87 g/l

32 ml 0,5 m  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  = 69 g/l

+ 952 ml destilliertes Wasser

**pH 6,5 – 6,8** (pH wurde mit 32% HCl eingestellt).

Die Pufferlösung sollte bei + 4° C gelagert werden.

##### Beispiel für Molare Berechnung:

0,5 Molare  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  =

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck 1.06346.0500) 34,5 g/l + 500 ml destilliertes Wasser

0,5 Molare  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  =

43,5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck 1.05101.100) g/l + 500 ml destilliertes Wasser



**Abbildung 15.** Standard Giemsa-Färbung

Luftgetrocknete Präparate wurden 5 Min. in Methonal fixiert. Luftgetrocknete Präparate wurden 20 Min. mit Giemsa-Färbelösung gefärbt. Luftgetrocknete Präparate wurden mit Pufferlösung gespült.

#### 4.4.2. Immunzytochemie

Nach erfolgter Standard-Giemsa-Färbung wurden die verschiedenen Proben zunächst visuell beurteilt und anschließend geeignete ungefärbte luftgetrocknete Präparate für die ICC ausgewählt. Tabelle 11 zeigt die von uns verwendeten immunzytochemischen Marker, die einzelnen Klone, deren Hersteller und die jeweiligen Verdünnungen.

**Tabelle 11.** Auswahl der von uns eingesetzten immunzytologischen Antikörper (Hersteller und Verdünnung)

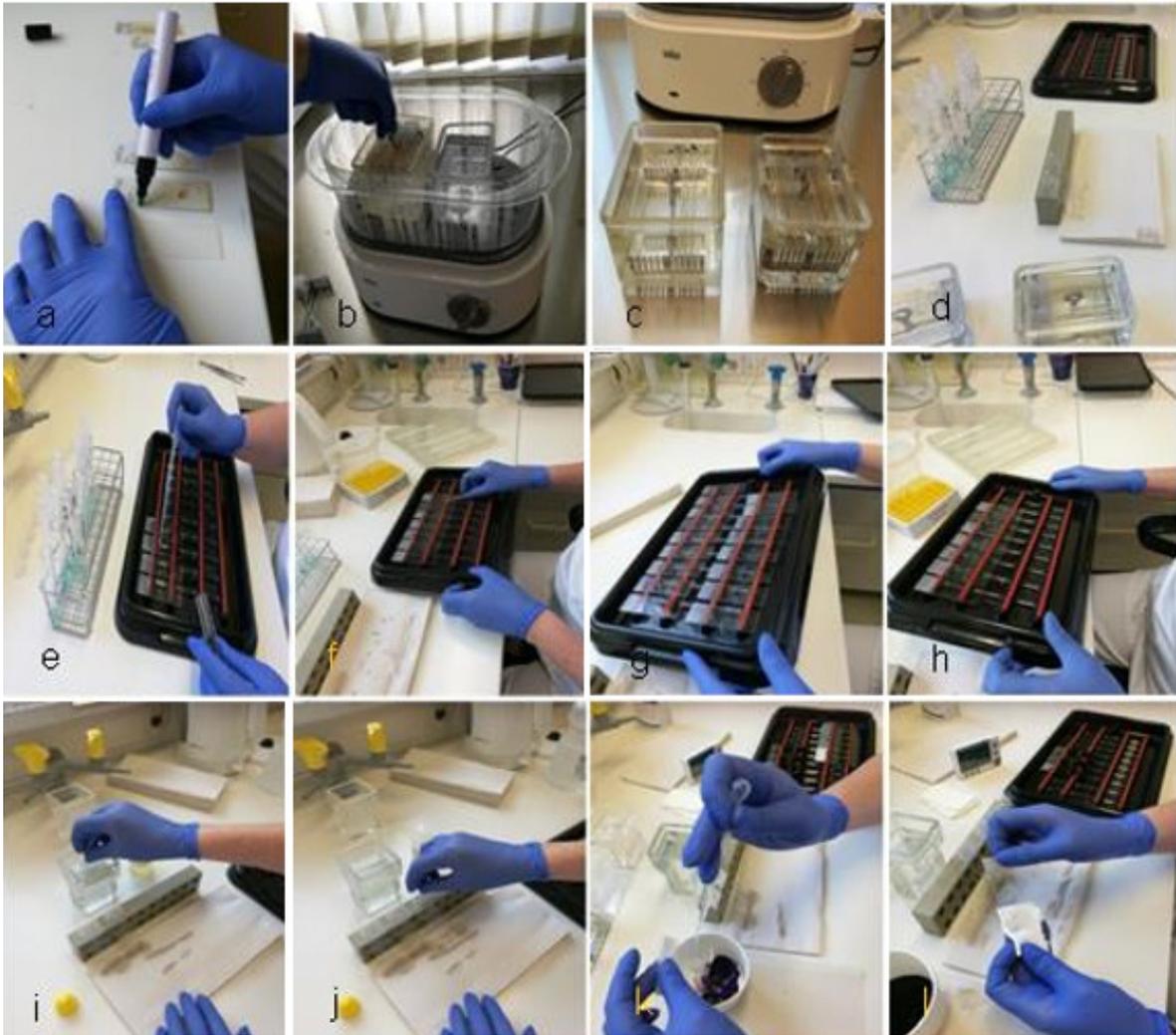
Marker	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
TTF-1	SPT24	Maus IgG1 Kappa	DCS	1/100
CK7	OV-TL 12/30	Maus IgG1 Kappa	DCS	1/150
CK5/6	D5/16 B4	Maus IgG1	DCS	1/200
CK5/14	XM26/SFI-3	XM26: Maus IgG1 Kappa+ SFI-3: Maus IgG1	DCS	1/50
Napsin A	KCGI.I	Maus IgG1	DCS	1/50
p40 ( $\Delta$ Np63)	BC4A4/plyklonal	Maus IgG2a	DCS	1/40
CEA	B01-94-11M-P	Maus IgG2b	bioGenex	1/1000
CD56	I23C3.D5	Maus IgG1	DCS	1/50
Syn	SPI I	Kaninchen IgG	DCS	1/10

Abkürzungen: TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; CEA, Carcinoembryonales Antigen; CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül-NCAM; Syn, Synaptophysin

Geeignete zytologische Proben vorausgesetzt, werden in unserem Labor mit Hilfe eines PapPens getrennt bis zu drei unterschiedliche AK eingesetzt (Abbildung 16a).

## Material und Methode

1. Lufttrocknung der Präparate
2. Fixierung der Präparate mittels M-FIX Spray (M-FIX™ spray fixative (for cytology/103981) und anschließend erneute Lufttrocknung
3. Erhitzen der Präparate für 20 Min. in heißem Citratpuffer (pH 6); der Puffer wird dafür 20 Min. im Dampfgerar vorgewärmt (Abbildung 16b)
4. Im direkten Anschluss erfolgte die Blockierung der Präparate für 3 Min. mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abbildung 16c)
5. Präparate in Trispuffer (pH 7.63- 7.64, Raumtemperatur) überführen und ab jetzt ein Austrocknen verhindern (Abbildung 16d)
6. Inkubation der Präparate mit den Primär-AK für mindestens 60 Min. bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer; Kammer gelegentlich schwenken (Abbildung 16e-h)
7. Waschen der Präparate in Trispuffer (Abbildung 16i-j)
8. Inkubation der Präparate für 30 Min. bei Raumtemperatur mit Link (PolyLink)
9. Waschen der Präparate in Trispuffer (Abbildung 16i-j)
10. Inkubation der Präparate für 30 Min. bei Raumtemperatur mit Label (Peroxidase-Label HRP)
11. Waschen der Präparate in Trispuffer (Abbildung 16i-j)
12. Inkubation der Präparate mit Substrat-Chromogen-Lösung (1:0,02) für 3 bis 15 Min.; hierfür wird die Substrat/-Chromogen-Lösung erst kurz vor Gebrauch angesetzt. Die Intensität der Färbung kann am Mikroskop beobachtet und der Färbeschritt beendet werden, sobald eine ausreichende Färbung vorliegt
13. Waschen der Präparate in Trispuffer (Abbildung 16i-j)
14. Gegenfärbung für 2-3 Min. mit Hämalalaun (Merck 109249)
15. Waschen der Präparate in Trispuffer (Abbildung 16k-l)
16. Lufttrocknung der Präparate
17. Eindecken der Objektträger mit Gelatine



**Abbildung 16a-l.** Immunzytochemische Aufarbeitung

A, Unterteilung der Präparate mit PapPen; B, Erhitzen in Citratpuffer; C, Inkubieren in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und in Tris-Puffer; D-E, Überschichten mit Primärantikörper; F-H, Schwenken der Kammer; I-J, Waschen in Tris-Puffer; K-L, gegenfärben mit Hämalaun, spülen und abtupfen

#### 4.5. Auswertung

Die Beurteilung erfolgte an einem Leica Mikroskop. Eine immunzytochemische Anfärbung von mehr als 5% der Tumorzellen wurde als positive Reaktion beurteilt. Alle Fälle mit einem geringeren Anteil positiv angefärbter Tumorzellen wurden als negativ beurteilt.

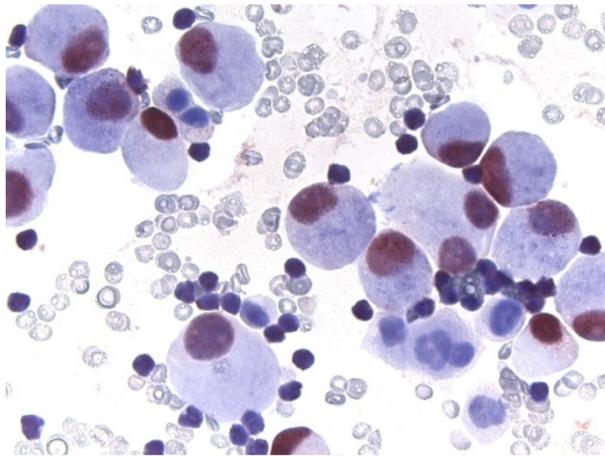
Für die Auswertung sind drei Expressionsmuster, nukleäre- und zytoplasmatische Expression, sowie die membranäre Expression von Bedeutung (Abbildung 17a, b, c).

Die Einschätzung einer positiven TTF-1- und p40 ( $\Delta$ Np63)-Reaktion ist an eine nukleäre Expression gebunden. Eine positive CK7-, Napsin A-, CEA-, CK5/6-,

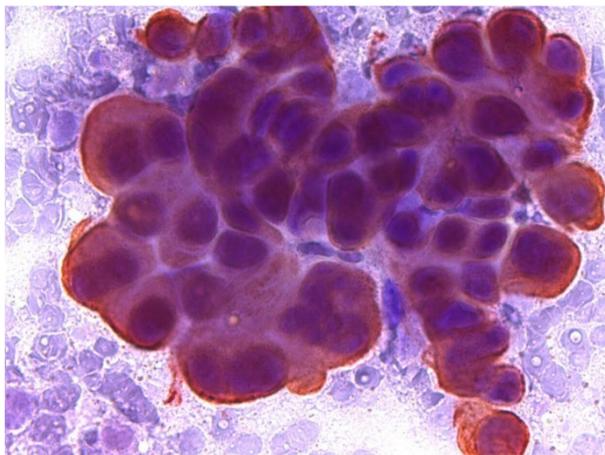
## Material und Methode

CK5/14-, CD56- und Syn-Reaktion ist an eine zytoplasmatische Anfärbung gebunden. Im Gegensatz dazu ist bei Her2 und PD-L1 eine Anfärbung der Zytoplasmamembran als positives Kriterium erforderlich.

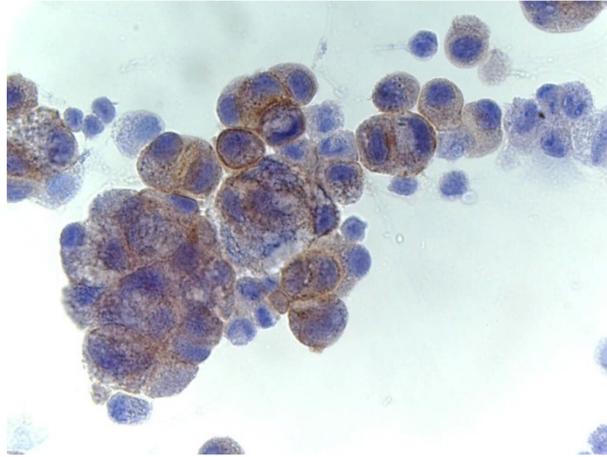
Bestandteil eines jeden Immunoassays waren geeignete interne und externe Positive und Negative Kontrollen. An Hand dieser Kontrollen wurde permanent die Qualität der Anfärbung mit den einzelnen Antikörpern überwacht. Besonders bedeutsam war dabei die Unterscheidung zwischen Tumorzellen und positiv angefärbten, normalen Bronchial- oder Lungeneithelien und Immunzellen.



**Abbildung 17a.** Nukleäres Expressionsmuster (Imprintzytologie, Adenokarzinom, TTF-1, 630x)



**Abbildung 17b.** Zytoplasmatisches Expressionsmuster (Imprintzytologie, Plattenepithelkarzinom, CK5/14, 630x)



**Abbildung 17c.** Membranöses Expressionsmuster (Pleuraerguss, Mammakarzinom, Her2, 630x)

#### **4.5.1. Vorgehensweise bei der Datenerhebung**

Retrospektiv wurden folgende Daten erhoben: Alter der Patienten, Geschlecht, Tumorlokalisierung, Art des Biopsieverfahrens (Imprintzytologie, FNA, Erguss oder Bürstenbiopsie), Standarddiagnose am Entnahmeort nach Giemsa Färbung oder HE-Färbung, alle nachfolgend erhobenen immunzyto- oder -histochemische Befunde, die am Entnahmeort klinisch-morphologisch validierte finale Enddiagnose, patientenbezogene Enddiagnose und Enddignität, sowie die Sicherungsart der patientenbezogene Enddiagnose.

#### **4.5.2. Auswertung der Daten**

##### **4.5.2.1. Datenerfassung und statistische Auswertung**

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit diente die Datenbank des Zytologischen Labors sowie die elektronische Patientenakte der LungenClinic Großhansdorf. Die nach der Standard Giemsa- oder HE-Färbung am Entnahmeort erhobenen Erstdiagnosen, alle entnahmeortsbezogenen nachfolgenden immunzyto/-histochemischen Befunde und finalen Enddiagnosen wurden daraus entnommen und mit Microsoft-Access und -Excel bearbeitet.

##### **4.5.2.2. Statistische Methoden**

Die Erfassung der Sensitivität, Spezifität und diagnostischen Sicherheit der von uns verwendeten AK stützt sich auf eine statistische Analyse aller immunzyto/-

histologischen Untersuchungen (Tabelle 12). Eine solche Vier-Felder-Tafel ist im Folgenden exemplarisch dargestellt:

**Tabelle 12.** Vier-Felder-Tafel zur Darstellung der Testergebnisse in Bezug auf die Erhebung der Sensitivität, Spezifität und diagnostische Sicherheit

	Tumortyp am Entnahmeort	
	nachweisbar ( $r_p+f_n$ )	nicht nachweisbar ( $f_p+r_n$ )
Immunreaktion positiv ( $r_p+f_p$ )	richtig positiv ( $r_p$ )	falsch positiv ( $f_p$ )
Immunreaktion negativ ( $f_n+r_n$ )	falsch negativ ( $f_n$ )	richtig negativ ( $r_n$ )

Die Sensitivität errechnet sich aus der Anzahl nachgewiesener Tumoren eines definierten Tumortyps mit positiver Immunreaktion dividiert durch die Gesamtzahl der an einem konkreten Entnahmeort nachgewiesenen Tumoren dieses jeweiligen Tumortyps. Sie berechnet sich aus:

$$\text{Sensitivität} = \text{Anzahl der richtig Positiven} / (\text{Anzahl der richtig Positiven} + \text{Anzahl der falsch Negativen})$$

Die bei einem definierten Tumortyp an einem konkreten Entnahmeort vorliegende Spezifität eines Testverfahrens hingegen beschreibt den Anteil aller abweichend typisierten Tumore bei denen die zu testende Immunreaktion negativ ausfällt dividiert durch die Gesamtzahl aller Tumoren mit abweichenden Tumortypendiagnosen. Sie berechnet sich aus:

$$\text{Spezifität} = \text{Anzahl der richtig Negativen} / (\text{Anzahl der richtig Negativen} + \text{Anzahl der falsch Positiven})$$

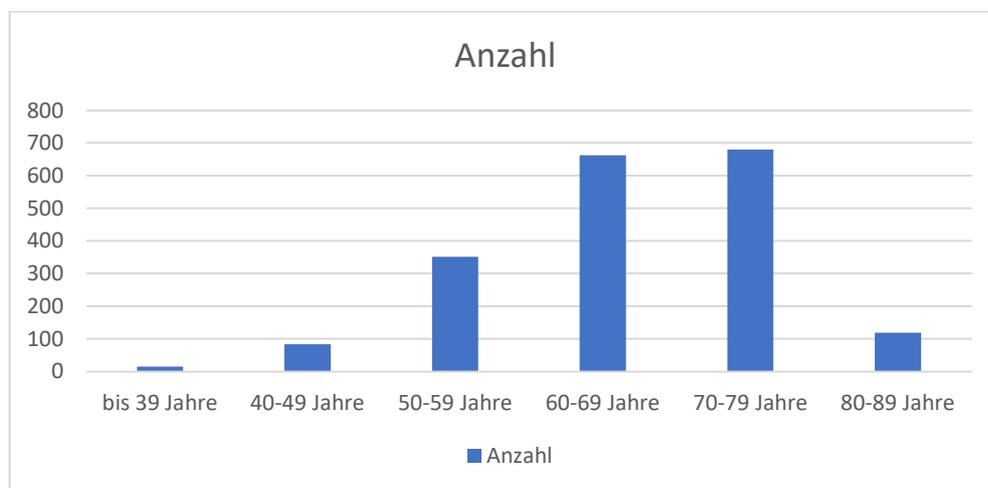
Anhand einer Bayes-Analyse der Daten wurde der Zugewinn der Wahrscheinlichkeit einzelner Hypothesen vor (*a priori*) und nach (*a posteriori*) Einsatz der AK bei den einzelnen Lungenkarzinomtypen berechnet bzw. konkret geschätzt. Die Bestimmung der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit der Diagnosen nach Bayes ermöglicht eine zusätzliche Aussagekraft über die Zytologie aus einer anderen Perspektive (195).

Das Alter der Patienten wurde, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  SD (Standardabweichung = Standard Deviation) in Jahren angegeben. Werte  $p < 0,05$  wurde als signifikant und Werte  $p < 0,001$  als hoch signifikant eingestuft.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Lungenkarzinome kommen in unserem Untersuchungsgut bis zum 39. Lebensjahr nur in wenigen Fällen vor. Ab einem Alter von 40 Jahren steigt die Anzahl der Patienten. Der zahlenmäßig größte Anteil an Erkrankungen liegt mit ca. 600 Fällen in der Gruppe der 60 bis 69 bzw. 70 bis 79 Jährigen. Der Anteil Lungenkarzinomkranker über 80 Jahren ist erwartungsgemäß hingegen deutlich geringer (Abbildung 18).



**Abbildung 18.** Altersverteilung zum Untersuchungszeitpunkt

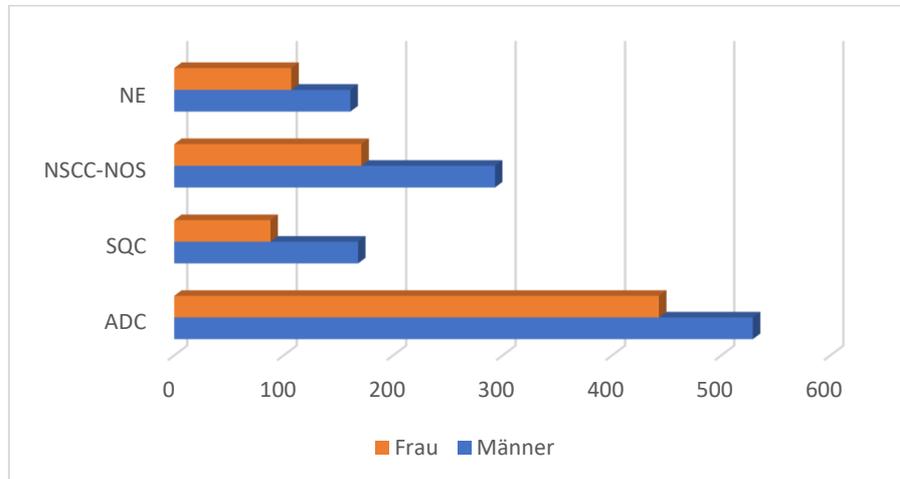
Hinsichtlich der Geschlechtsverteilung besteht bei den 972 ADC ein Verhältnis  $m:w = 1,2:1$ . Dementsprechend erkrankten 54,42% der Männer und 45,58% der Frauen an einem ADC.

Bei den 256 SQC liegt eine Geschlechtsverteilung von  $m:w = 1,9:1$  vor. Damit waren deutlich mehr Männer als Frauen von einem SQC betroffen (168 vs. 88 Fälle).

Bei den 464 Nicht-kleinzelligen Karzinomen, die nicht weiter spezifiziert (NSCC-NOS) wurden, liegt ein Geschlechtsverhältnis  $m:w = 1,7:1$  vor. Das bedeutet, dass von 464 NSCC-NOS etwa 63,1% auf Männer und 36,9% auf Frauen entfallen.

## Ergebnisse

Im Gegensatz dazu liegt bei den 268 NEC Tumoren ein Geschlechtsverhältnis m:w = 1,5:1 vor. Dabei sind 60,1% der Männern und 39,9% der Frauen von einem NEC betroffen (Abbildung 19).



**Abbildung 19.** Geschlechtsverteilung primärer Lungenkarzinome im vorliegenden Untersuchungsgut

Abkürzungen: NEC, Neuroendokrines Karzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom

## 5.2. Ergebnisse der immunhisto-/-zytochemischen Untersuchungen

Morphologische Untersuchungen an kleinen Gewebeproben und Zytologien erlauben per se nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Aussagen über die Beschaffenheit eines vorliegenden Tumors (177). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es deshalb, zunächst den Wahrscheinlichkeitsgrad zytologischer Diagnosen unterschiedlicher Lungenkrebssubtypen nach dem singulären Einsatz unterschiedlicher AK zu prüfen. Dazu wurde zunächst die *a priori* Wahrscheinlichkeit der einzelnen Typen und Subtypen im Untersuchungsgut errechnet und in Abhängigkeit von den Ergebnissen der ICC bzw. IHC mit der jeweils erreichten *a posteriori* Wahrscheinlichkeit nach der Anfärbung mit einem AK verglichen. In ausgewählten Fällen wurden diese Ergebnisse durch eine Berechnung von Sensitivität, Spezifität und negativen prädiktiven Wert für einzelne AK-Konstellationen ergänzt.

Mit 256 von 1960 Fällen (13,1%) ist die Anzahl der SQC in dem vorliegenden Untersuchungsgut vergleichsweise klein. Dem entspricht eine *a priori*

## Ergebnisse

Wahrscheinlichkeit von 13,1%. Nur vereinzelt findet sich bei SQC eine TTF-1- oder CK7-Expression (jeweils 15 Fälle, *a posteriori* Wahrscheinlichkeit 1,4 bzw. 1,7, Tabelle 13a).

**Tabelle 13a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels TTF-1 bzw. CK7

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			TTF-1			CK7		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	41,0 (98)	21,2 (143)	1,4 (15)	23,3 (183)	20,8 (58)	1,7 (15)
<b>ADC</b>	972	49,6	15,5 (37)	18,1 (122)	77,7 (813)	21,2 (167)	25,1 (70)	82,1 (735)
<b>NSSC-NOS</b>	464	23,7	32,2 (77)	52,5 (354)	3,2 (33)	24,2 (190)	48,7 (136)	15,4 (138)
<b>NEC</b>	268	13,7	11,3 (27)	8,2 (55)	17,8 (186)	31,3 (246)	5,4 (15)	0,8 (7)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	239	674	1047	786	279	895

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg., insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Damit verglichen ist die Anzahl von 268 NEC nur diskret höher (13,7%). Die Mehrzahl dieser NEC exprimiert zwar TTF-1 (n=186). Sie erreichen aber in der Gruppe der TTF-1 positiven Tumoren lediglich eine *a posteriori* Wahrscheinlichkeit von 17,8%. Hinsichtlich der CK7-Expression finden sich bei diesem Subtyp nur 7 positive Fälle (*a posteriori* Wahrscheinlichkeit 0,8%, Tabelle 13a).

NSSC-NOS Tumoren treten häufiger auf (n=464, *a priori* Wahrscheinlichkeit von 23,7%). Allerdings exprimieren diese Tumoren nur in Ausnahmefällen TTF-1 (n=33, *a posteriori* Wahrscheinlichkeit von 3,2%) oder CK7 (n=138, *a posteriori* Wahrscheinlichkeit von 15,4%). Definitionsgemäß stellen sie den größten Anteil sowohl TTF-1 als auch CK7 negativer Fälle dar.

Die überwiegende Anzahl der Lungenkarzinome sind ADC (n=972, *a priori* Wahrscheinlichkeit 49,6%). Erwartungsgemäß ist bei einer Expression von TTF-1 durch Tumorzellen in zytologischen Ausstrichen die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines ADC sehr hoch (n=813, *a posteriori* Wahrscheinlichkeit 77,7%, Sensitivität 87,0%, Spezifität 70,2%). Vergleichbares gilt für CK7 (n=735, *a posteriori* Wahrscheinlichkeit 82,1%, Sensitivität 91,3%, Spezifität 56,6%; Tabelle 13a).

## Ergebnisse

Verglichen mit den zytologischen Präparaten finden sich in den histologisch untersuchten Schnittpräparaten seltener NSCC-NOS (*a priori* Wahrscheinlichkeiten 23,7% vs. 13,8%) und etwas häufiger ADC (*a priori* Wahrscheinlichkeiten 49,6% vs. 59,2%). Dessen ungeachtet unterscheiden sich bei ADC sowohl die jeweils erreichte *a posteriori* Wahrscheinlichkeit, als auch Sensitivität und Spezifität weder für TTF-1 noch für CK7 signifikant (83,3%, 90,1%, 65,9% bzw. 84,8%, 82,7%, 53,3%; Tabelle 13b).

**Tabelle 13b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels TTF-1 bzw. CK7

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			TTF-1			CK7		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	20,0 (38)	43,1 (31)	0,0 (0)	17,9 (66)	14,3(3)	0,0 (0)
<b>ADC</b>	258	59,2	51,1 (97)	22,2 (16)	83,3 (145)	55,8 (206)	61,9 (13)	84,8 (39)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	15,8 (30)	29,2 (21)	5,2 (9)	13,3 (49)	19,0 (4)	15,2 (7)
<b>NEC</b>	49	11,2	13,2 (25)	5,6 (4)	11,5 (20)	13,0 (48)	4,8 (1)	0,0 (0)
<b>Insg.</b>	436	100,0	190	72	174	369	21	46

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Der Einsatz von CK5/6 /CK5/14 bzw. p40 ( $\Delta$ Np63) richtet sich dagegen in erster Linie auf die Erkennung plattenepithelial differenzierter Lungentumore (Tabelle 14a).

**Tabelle 14a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CK5/6/ CK5/14 bzw. p40 ( $\Delta$ Np63)

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CK5/6 /CK5/14			p40 ( $\Delta$ Np63)		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	2,2 (30)	5,2 (19)	87,3 (207)	10,7 (187)	19,2 (33)	78,3 (36)
<b>ADC</b>	972	49,6	58,5 (794)	44,8 (164)	5,9 (14)	51,1 (890)	43,6 (75)	15,2 (7)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	20,1 (273)	48,4 (177)	5,9 (14)	23,0 (400)	35,5 (61)	6,5 (3)
<b>NEC</b>	268	13,7	19,2 (260)	1,6 (6)	0,8 (2)	15,2 (265)	1,7 (3)	0 (0)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1357	366	237	1742	172	46

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

## Ergebnisse

Die *a posteriori* Wahrscheinlichkeit ist für SQC beim Einsatz von CK5/6 an histologischen Schnittpräparaten niedriger als in den immunzytochemisch angefärbten Präparaten (87,3% vs. 49,0%). Dieser Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant ( $p > 0,71$ ). Der Nachweis p40 ( $\Delta$ Np63)-positiver Tumorzellen an zytologischen Proben erhöht die *a posteriori* Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines SQC ebenfalls deutlich. Verglichen mit Schnittpräparaten gibt es allerdings zwischen immunzyto- und immunhistochemischen Anfärbungen beim Einsatz von p40 ( $\Delta$ Np63) signifikante statistische Unterschiede. So gelingt mittels dieses AK an zytologischen Präparaten der Nachweis plattenepithelial differenzierter Tumorzellen mit einer Sensitivität von 52,2% (36 von 69 Fällen) und Spezifität von 93,3% (Tabelle 14a). Demgegenüber ist bei einer Spezifität von 68,7% (32 von 58 Fällen), vor allem die Sensitivität dieses Markers an histologischen Schnittpräparaten mit 91,4% (32 von 35 Fällen) signifikant höher ( $p < 0,0003$ ; Tabelle 14b).

**Tabelle 14b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CK5/6 bzw. p40 ( $\Delta$ Np63)

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CK5/6			p40 ( $\Delta$ Np63)		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	12,6 (43)	2,2 (1)	49,0 (25)	10,7 (34)	5,0 (3)	55,2 (32)
<b>ADC</b>	258	59,2	61,5 (209)	82,2 (37)	23,5 (12)	63,5 (202)	76,7 (46)	17,2 (10)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	11,8 (40)	15,6 (7)	25,5 (13)	11,6 (37)	13,3 (8)	25,9 (15)
<b>NEC</b>	49	11,2	14,1 (48)	0,0 (0)	2,0 (1)	14,2 (45)	5 (3)	1,7 (1)
<b>Insg.</b>	436	100,0	340	45	51	318	60	58

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Ergänzend wurde die Expression von CD56 und Syn überprüft. SQC, ADC und NSCC-NOS exprimieren immunzytochemisch CD56 oder Syn nur sporadisch. Dies gilt nicht für NEC. Erwartungsgemäß findet sich für beide Marker eine hohe Zahl positiv angefärbter NEC (204 bzw. 35 Fälle, *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten 90,3% bzw. 87,5%; Tabelle 15a).

An den histologischen Schnittpräparaten führt die IHC mittels CD56 oder Syn zu vergleichbaren Resultaten (*a posteriori* Wahrscheinlichkeiten 65,6% vs. 66,7%; Tabelle 15b).

## Ergebnisse

**Tabelle 15a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CD56 bzw. Synaptophysin

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CD56			Synaptophysin		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	15,3 (247)	4,2 (5)	1,8 (4)	13,6 (255)	2,2 (1)	0 (0)
<b>ADC</b>	972	49,6	57,2 (924)	32,5 (39)	4,0 (9)	51,2 (960)	17,8 (8)	10,0 (4)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	25,6 (413)	35,0 (42)	4,0 (9)	24,0 (450)	28,9 (13)	2,5 (1)
<b>NEC</b>	268	13,7	1,9 (30)	28,3 (34)	90,3 (204)	11,2 (210)	51,1 (23)	87,5 (35)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1614	120	226	1875	45	40

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

**Tabelle 15b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen nach Anfärbung mittels CD56 bzw. Synaptophysin

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CD56			Synaptophysin		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	18,0 (69)	0,0 (0)	0,0 (0)	16,5 (66)	21,4 (3)	0,0 (0)
<b>ADC</b>	258	59,2	62,1 (238)	61,9 (13)	21,9 (7)	61,3 (246)	50,0 (7)	23,8 (5)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	12,8 (49)	33,3 (7)	12,5 (4)	13,7 (55)	21,4 (3)	9,5 (2)
<b>NEC</b>	49	11,2	7,0 (27)	4,8 (1)	65,6 (21)	8,5 (34)	7,1 (1)	66,7 (14)
<b>Insg.</b>	436	100,0	383	21	32	401	14	21

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv; CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül

Nur eine kleine Anzahl wurde mit weiteren AK (Napsin A und CEA) angefärbt. Je zwei NSCC-NOS und ADC erwiesen sich einmal positiv und einmal negativ. In 26 Fällen wurde eine CEA Färbung durchgeführt, wobei es sich in 22 Fällen um ADC und in 4 Fällen um NSCC-NOS handelte. Sowohl SQC als auch NEC exprimierten kein CEA.

Mit Ausnahme der Anfärbung mit p40 ( $\Delta$ Np63) finden sich beim isolierten Einsatz einzelner AK zwischen ICC und IHC keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Nach der Analyse der Bedeutung eines isolierten Einsatzes einzelner AK für die Lungenkrebstypisierung stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß Kombinationen unterschiedlicher AK geeignet sind, die Lungenkrebstypisierung an kleinen Gewebeproben und Zytologien zu verbessern.

## Ergebnisse

Stellvertretend für zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten wurden sechs unterschiedliche AK-Kombinationen ausgewählt (Tabelle 16a - 18b):

**Tabelle 16a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit TTF-1 und CK7 bzw. negativer CK5/6 /CK5/14 Färbung (TTF-1+ CK7+ bzw. TTF-1+ CK5/6 /CK5/14-)

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			TTF-1+ CK7+			TTF-1+ CK5/6/CK5/14-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	22,8 (185)	14,9 (70)	0,1 (1)	12,7 (202)	25,8 (51)	1,8 (3)
<b>ADC</b>	972	49,6	22,8 (185)	27,5 (129)	96,6 (658)	50,5 (805)	7,6 (15)	91,0 (152)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	23,8 (193)	54,6 (256)	2,2 (15)	20,3 (324)	65,7 (130)	6,0 (10)
<b>NEC</b>	268	13,7	30,5 (247)	3,0 (14)	1,0 (7)	16,6 (264)	1,0 (2)	1,2 (2)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	810	469	681	1595	198	167

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg., insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

**Tabelle 16b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit TTF-1 und CK7 bzw. negativer CK5/6 Färbung (TTF-1+ CK7+ bzw. TTF-1+ CK5/6-)

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			TTF-1+ CK7+			TTF-1+ CK5/6-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	17,8 (66)	10,7 (3)	0 (0)	13,2 (46)	44,2 (23)	0 (0)
<b>ADC</b>	258	59,2	55,8 (207)	53,6(15)	97,3 (36)	60,3 (210)	26,9 (14)	94,4 (34)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	13,5 (50)	32,1 (9)	2,7 (1)	12,6 (44)	26,9 (14)	5,6 (2)
<b>NEC</b>	49	11,2	12,9 (48)	3,6 (1)	0 (0)	13,8 (48)	1,9 (1)	0 (0)
<b>Insg.</b>	436	100,0	371	28	37	348	52	36

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg., insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Bei ADC führt die Kombination von TTF-1 mit einem positiven AK (CK7) oder einem negativen AK (CK5/6 /CK5/14) gegenüber der Verwendung eines einzelnen AK zu einer Steigerung die Wahrscheinlichkeit für die zutreffende Typendiagnose um mehr als 10 Prozentpunkte (ICC 77,7% bis 82,1% vs. 96,6% bis 91,0%; Tabelle 13a, 16a) und zwar gleichermaßen für zyto- wie histologische Präparate (IHC 83,3% bis 84,8% vs. 97,3% bis 94,4%; Tabelle 13b, 16b).

## Ergebnisse

In der ICC führt eine Kombination von zwei positiven bzw. einem positiven und einem negativen AK bei SQC zu einer Verbesserung der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit der zutreffenden Typendiagnose von 87,3% bis 78,3% auf 95,0% bis 89,0% (Tabelle 14a, 17a).

**Tabelle 17a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CK5/6 /CK5/14 und p40 ( $\Delta$ Np63) bzw. positiver. CK5/6 /CK5/14 Färbung und negativer Anfärbung mittels TTF-1

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CK5/6 /CK5/14+ p40( $\Delta$ p63)+			CK5/6/CK5/14+ TTF-1-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	12,6 (235)	2,7 (2)	95,0 (19)	7,4 (105)	5,5 (22)	89,0 (129)
<b>ADC</b>	972	49,6	50,1 (935)	49,3 (36)	5,0 (1)	53,6 (759)	52,4 (209)	2,8 (4)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	23,0 (430)	46,6 (34)	0,0 (0)	20,6 (292)	40,4 (161)	7,6 (11)
<b>NEC</b>	268	13,7	14,3 (267)	1,4 (1)	0,0 (0)	18,4 (260)	1,8 (7)	0,7 (1)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1867	73	20	1416	399	145

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

**Tabelle 17b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CK5/6 und p40 ( $\Delta$ Np63) bzw. positiver CK5/6 Färbung und negativer Anfärbung mittels TTF-1

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CK5/6+ p40( $\Delta$ p63)+			CK5/6+ TTF-1-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	12,6 (43)	4,3 (2)	48,0 (24)	13,2 (46)	1,9 (1)	64,7 (22)
<b>ADC</b>	258	59,2	61,5 (209)	80,4(37)	24,0 (12)	60,3 (210)	81,5 (44)	11,8 (4)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	11,8 (40)	15,2 (7)	26,0 (13)	12,6 (44)	16,7 (9)	20,6 (7)
<b>NEC</b>	49	11,2	14,1 (48)	0 (0)	2,0 (1)	13,8 (48)	0 (0)	2,9 (1)
<b>Insg.</b>	436	100,0	340	46	50	348	54	34

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

An histologischen Schnittpräparaten verbessert nur die Kombination von CK5/6 positiven und TTF-1 negativen Anfärbungen die Erkennung eines SQC von maximal 55,2%, für p40 ( $\Delta$ Np63) auf 64,7%. Im Gegensatz dazu gilt das an kleinen Biopsaten jedoch nicht für die Kombination von CK5/6 und p40 ( $\Delta$ Np63) positiven Anfärbungen (Tabelle 14b, 17b).

## Ergebnisse

**Tabelle 18a.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CD56 und Synaptophysin bzw. fehlender Anfärbung gegenüber TTF-1 und CK5/6 /CK5/14

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CD56+ Syn+			TTF-1- CK5/14 /CK5/6-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	13,4 (256)	0,0 (0)	0,0 (0)	7,8 (117)	41,1 (131)	5,4 (8)
<b>ADC</b>	972	49,6	50,7 (966)	9,5 (2)	11,8 (4)	53,4 (797)	51,7(165)	6,7 (10)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	23,9 (455)	38,1 (8)	2,9 (1)	21,2 (316)	6,0 (19)	86,6 (129)
<b>NEC</b>	268	13,7	12,0 (228)	52,4 (11)	85,3 (29)	17,6 (262)	1,3 (4)	1,3 (2)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1905	21	34	1492	319	149

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; Syn, Synaptophysin; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv; CD, Neuronales Zelladhäsionsmolekül

Eine Kombination zweier negativer AK führt in der ICC zu einer deutlichen Verbesserung der *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen eines NSCC-NOS (52,5% für isolierten Einsatz von TTF-1, 48,7% für isolierten Einsatz von CK7 vs. 86,6% für eine Kombination von TTF-1- CK5/6 /CK5/14 Fälle, Tabelle 13a, 18a).

Vergleichbare Resultate wurden in der IHC bei einer Kombination zweier negativer AK erzielt. Die *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen eines NSCC-NOS beträgt in der IHC 29,2% für die isolierte Anwendung von TTF-1 und 19,0% für die isolierte Anwendung CK7 vs. 55,6% beim kombinierten Einsatz von TTF-1-CK5/6 /CK5/14 Fälle (Tabelle 13b, 18b).

Hinsichtlich der zytologischen Diagnostik von NEC ergibt sich aus dem kombinierten Einsatz zweier positiver AK keine weitere Verbesserung (90,3% für den isolierten Einsatz von CD56 und 87,5% für den isolierten Einsatz von Syn vs. 85,3% für die Kombination CD56 und Syn Fälle, Tabelle 15a, 18a).

In der IHC führt eine Kombination zweier positiver AK ebenfalls zu keiner Verbesserung der histologischen Diagnose von NEC (65,6% für den isolierten Einsatz von CD56, 66,7% für den isolierten Einsatz von Syn vs. 75,0% für die Kombination von CD56 und Syn (Tabelle 15b, 18b).

## Ergebnisse

**Tabelle 18b.** IHC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei kombinierter positiver Anfärbung mit CD56 und Synaptophysin bzw. fehlender Anfärbung gegenüber TTF-1 und CK5/6

	n	<i>a priori</i> in %	IHC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			CD56+ Syn+			TTF-1- CK5/6-		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	69	15,8	16,8 (69)	0 (0)	0 (0)	13,2 (46)	27,8 (22)	11,1 (1)
<b>ADC</b>	258	59,2	60,8 (250)	55,6(5)	18,8 (3)	60,3 (210)	57,0 (45)	33,3 (3)
<b>NSCC-NOS</b>	60	13,8	13,4 (55)	44,0 (4)	6,3 (1)	12,6 (44)	13,9 (11)	55,6 (5)
<b>NEC</b>	49	11,2	9,0 (37)	0 (0)	75,0 (12)	13,8 (48)	1,3 (1)	0 (0)
<b>Insg.</b>	436	100,0	411	9	16	348	79	9

Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; Syn, Synaptophysin; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Alle hier immunzyto-/histochemisch untersuchten Kombinationsmuster zweier AK unterscheiden sich weder bei SQC, noch bei ADC, NSCC-NOS oder NEC statistisch signifikant (Fisher exact Test p 0,2812 bis p 0,0599).

Ungeachtet der bisherigen Ergebnisse resultiert die Frage, ob der Einsatz von mehr als zwei AK geeignet ist die morphologische Typendiagnose weiter nachhaltig zu verbessern. Methodisch bedingt sind allerdings die zur Verfügung stehenden zyto- und histologischen Proben quantitativ limitiert. Drei AK-Kombinationen standen zur Beantwortung dieser Frage zur Verfügung (Tabelle 19 und 20).

**Tabelle 19.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei einer kombinierten positiven Anfärbung mit TTF-1 und CK7 und fehlender CK5/6 /CK5/14 Anfärbung (TTF-1+ CK7+ CK5/6 /CK5/14-) bzw. fehlender Anfärbung mit TTF-1 und CK7 und positiver Reaktion gegenüber CK5/6 /CK5/14

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)					
			TTF-1+ CK7+ CK5/6 /CK5/14-			TTF-1- CK7- CK5/6 /CK5/14+		
			n.e.	neg.	pos.	n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	11,6 (195)	34,3 (61)	0 (0)	11,6 (195)	1,4 (3)	89,2 (58)
<b>ADC</b>	972	49,6	50,9 (855)	10,7 (19)	97,0 (98)	50,9 (855)	53,7 (115)	3,1 (2)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	21,7 (364)	54,5 (97)	3,0 (3)	21,7 (364)	44,4 (95)	7,7 (5)
<b>NEC</b>	268	13,7	15,9 (267)	0,6 (1)	0 (0)	15,9 (267)	0,5 (1)	0 (0)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1681	178	101	1681	214	65

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

## Ergebnisse

**Tabelle 20.** ICC-Lungenkrebstypisierung - *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeit unterschiedlicher Tumortypen bei einer fehlender Anfärbung mit TTF-1 und positiver Reaktion gegenüber CK5/6 /CK5/14 und p40 ( $\Delta$ Np63)

	n	<i>a priori</i> in %	ICC <i>a posteriori</i> Wahrscheinlichkeiten in % (n)		
			TTF-1- CK5/6 /CK5/14+ p40( $\Delta$ Np63)+		
			n.e.	neg.	pos.
<b>SQC</b>	256	13,1	7,4 (105)	5,5 (22)	89,0 (129)
<b>ADC</b>	972	49,6	53,6 (759)	52,4 (209)	2,8 (4)
<b>NSCC-NOS</b>	464	23,7	20,6 (292)	40,4 (161)	7,6 (11)
<b>NEC</b>	268	13,7	18,4 (260)	1,8 (7)	0,7 (1)
<b>Insg.</b>	1960	100,0	1416	399	145

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; TTF-1, Thyreoidale Transkriptionsfaktor-1; CK, Cytokeratin; Insg, insgesamt; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; n.e., nicht eingeschlossen; neg., negativ; pos., positiv

Durch eine Kombination zweier positiver und eines negativen AK steigt die *a posteriori* Wahrscheinlichkeit für ADC von 96,6% auf 97%. Für SQC verringert eine Kombination von einem positiven AK und zwei negativen AK die *a posteriori* Wahrscheinlichkeit statistisch nicht signifikant für SQC von 91,0% auf 89,2% (Tabelle 16a und 19).

Auch die Kombination zweier für SQC positiver und eines negativen AK führt zu keinem relevanten Anstieg der Zahl richtig typisierter SQC (Tabelle 20).

Am Ende der Untersuchung stand die Frage, welchen konkreten Beitrag man von immunzytochemischen Anfärbungen in der Praxis erwarten darf. Zu diesem Zweck erfolgte ein Vergleich der an Giemsa-Präparaten erhobenen zytologischen Erstdiagnose mit den immunzytochemisch gesicherten Enddiagnosen (Tabelle 21).

**Tabelle 21.** Kreuzmatrix mit Darstellung der (Fehl-)Diagnosen von Lungenkrebstypen bei Vergleich von Standard- und Immunzytologie-basierten Diagnosen

	Enddiagnose nach ICC		Standarddiagnose (Giemsafärbung)				
	n	<i>a priori</i> in %	SQC	ADC	NSCC-NOS	NEC	Andere
<b>SQC</b>	256	13,1	180	11	61	0	4
<b>ADC</b>	972	49,6	16	781	155	3	17
<b>NSCC- NOS</b>	464	23,7	32	112	295	11	14
<b>NEC</b>	268	13,7	1	5	2	239	21
<b>Insg.</b>	1960	100,0	229	906	516	253	56

Abkürzungen: ICC, Immunzytochemie; n, Anzahl; SQC, Plattenepithelkarzinom; ADC, Adenokarzinom; NSCC-NOS, Nicht-kleinzelliges Karzinom nicht weiter spezifiziert; NEC, Neuroendokrines Karzinom; Insg, insgesamt

## Ergebnisse

Ungeachtet der Tatsache, dass mehr als 76% der unterschiedlichen Tumoren bereits nach erfolgter Giemsa-Standardfärbung zutreffend typisiert wurden, bedurfte es zur exakten Einordnung in 465 der 1960 Fälle immunzytochemischer Verfahren.

Eine besonders große Bedeutung besitzen ICC Verfahren bei NSCC-NOS und bei SQC. Bei Ersteren beträgt der Anteil fehltypisierter Fälle 42,8% (221/516 Fälle) und bei Letzteren 21,4% (49/229 Fälle). Im Gegensatz dazu ist der Anteil unzureichend typisierter ADC deutlich niedriger 13,8% (125/906 Fälle) bzw. letztlich sehr gering bei NEC 5,5% (14/253 Fälle).

## **6. Diskussion**

Mit der Molekularpathologie, der endoskopischen Ultraschalldiagnostik und der ZT geraten Patienten mit bisher unheilbarem Lungenkrebs in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Entsprechend der WHO-Klassifikation 2015 ist die korrekte Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen an immunzytochemische Kriterien gebunden (181). Immunfärbungen zählen seit Mitte der 1980er Jahre zu den morphologischen Routineverfahren für differentialdiagnostische Fragestellungen in der histopathologischen Diagnostik (137). Die Vorbehandlung (u.a. die Art der Fixierung), Art des Detektionssystems, jeweils verwendete AK und Auswertungskriterien beeinflussen wesentlich den diagnostischen Erfolg (42, 117).

In der vorliegenden Arbeit werden konsekutiv alle immunzyto-/histologisch zwischen 2011 und 2016, an 3419 pulmonalen Tumoren von 2326 Patienten an kleinen Biopsien und Zytologien erhobenen Befunde mit den Ergebnissen der am Entnahmeort final erhobenen Enddiagnosen (Goldstandard) verglichen.

Ziele der vorliegenden Untersuchung waren die Erkennung der Zuverlässigkeit und des diagnostischen Zugewinns durch den Einsatz der ICC/IHC ergänzend zu den Standard HE- und Giemsa-Färbungen zur differenzialdiagnostischen Erkennung der Lungenkrebstypen und –subtypen. Insgesamt fanden sich, ungeachtet aller hinsichtlich der Materialgewinnung und –verarbeitung bestehenden methodischen Unterschiede zwischen ICC und IHC, keine signifikanten diagnostischen Unterschiede an kleinen Biopsien und Zytologien.

### **6.1. Alters- und Geschlechtsverteilung im Untersuchungsgut**

Das Alter eines Patienten ist Dank der in den zurückliegenden Jahrzehnten gestiegenen Lebenserwartung, den verbesserten medikamentösen Therapien, anaesthesiologischen und thoraxchirurgischen Verfahren und Techniken aktuell kein grundsätzliches Ausschlusskriterium resezierender Eingriffe. Während in den 70er Jahren das Durchschnittsalter an Lungenkrebs operierter Patienten noch bei 55 Jahren lag, ist das Durchschnittsalter dieser Patienten aktuell höher (67 Jahren) (13, 162, 194). Auch im eigenen Beobachtungsgut beträgt das durchschnittliche

## Diskussion

Alter der Lungenkrebskranken 67 Jahre. Der jüngste Patient war 18 Jahre, der älteste 92 Jahre alt. Der Altersgipfel lag zwischen 60 und 70 Jahren.

Bemerkenswert sind ebenfalls, die im Vergleich zu den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts auffälligen Änderungen der Geschlechtsverteilung von Lungentumoren. In den 50er, 60er und 70er Jahren erkrankten als Folge des hohen Zigarettenkonsums bekanntlich bevorzugt Männer an Neoplasien (m:w=12:1 bzw. 14,9:1) (8, 83). Mit dem geänderten Tabakkonsumverhalten von Frauen veränderten sich das Geschlechtsverhältnis im Laufe der zurückliegenden Jahrzehnte jedoch deutlich zu Gunsten der Frauen (m:w=7,3:1 bzw. 7,4:1 (9, 83). Im eigenen Untersuchungsgut finden wir, ebenso wie andere Autoren, aktuell ein Verhältnis von Männern zu Frauen von 1,4:1 (149, 164).

### **6.2. Immunchemische Antikörper-Expression primärer Lungenkarzinome**

In der Immunzytochemie haben im letzten Jahrzehnt neue monoklonale AK und verbesserte Färbeprotokolle durch eine Signalverstärkung zu höheren Empfindlichkeiten und Spezifitätswerten geführt. Gleichzeitig fanden 2015 ICC- und IHC-Verfahren Eingang in die WHO-Klassifikation für Lungentumoren und werden seitdem in der Praxis routinemäßig für die Untersuchung kleiner Gewebeproben und Zytologien schlecht differenzierter Tumore verwendet. In den aktuell vorliegenden Publikationen kommen unterschiedliche Untersucher, möglicherweise als Folge einer fehlenden Standardisierung dieser immunzyto- und -histochemischer Verfahren beim Einsatz gleicher AK an vergleichbaren Tumoren, allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen (137). Wie bei jeder technischen Anwendung ergeben sich aus der Auswahl der einzelnen AK, der Interpretation der Färbeargebnisse und dem Einsatz des AK-Panels spezielle Vor- und Nachteile. Methodisch bedingt kann man bei kleinen Biopsien und Zytologien zunächst grundsätzlich ein Missverhältnis zwischen Biopsie- und Tumorgröße unterstellen. Gleichzeitig muss man regelhaft davon ausgehen, dass der Anteil diagnostisch verwertbarer Tumoranteile in diesen Proben limitiert ist. Zwangsläufig ist die Anzahl der Tumorproben, die für ergänzende Verfahren zur Verfügung stehen, limitiert. In der vorliegenden Untersuchung betrifft das vor allem NSCC. Die Hoffnung der Autoren der WHO-Klassifikation 2015, den Anteil der NSCC durch ergänzende

## Diskussion

immunhistochemische Verfahren auf insgesamt 5% begrenzen zu können, erscheint bei einem Anteil von mehr als 76,3% (1495 von 1960 Fälle) exklusiv zytologisch gesicherter Lungenkarzinomen im eigenen Untersuchungsgut als nicht realistisch. Zusätzlich zu den, der Zytologie immanenten Stichprobenfehler, hat man zu erwarten, dass die Genauigkeit der Typisierung an Biopsien mit steigenden Tumorstadien, dem Ausmaß der Entdifferenzierung und dem Auftreten von Nekrosen abnimmt (29). Gleichzeitig können Lungentumore in bis zu 50% der Fälle mehrere histologische Wachstumsmuster bzw. Tumortypen aufweisen (12). Im Hinblick auf die bekannte Heterogenität sind sowohl die Typisierung anhand von Standardfärbungen als auch die Bewertung von Immunfärbungen eine Herausforderung. Gelingt es an einer standardgefärbten Biopsie nicht Belege einer drüsigen Differenzierung oder Anhaltspunkte für ein plattenepitheliales bzw. ein neuroendokrines Wachstumsmuster zu erfassen, muss die zytologische Einschätzung des vorliegenden Tumortyps unter Verwendung von Standardfärbungen scheitern.

Unabhängig davon resultieren aus den unterschiedlichen Biopsieverfahren zur Materialgewinnung für die Zytologie Fragen zur technischen Aufarbeitung und zur Auswertung der Proben. So finden sich bei Imprintzytologie, Abkratzpräparaten, Bürstenbiopsien, Ergüssen und FNA zwischen luftgetrockneten und feuchtfixierten Ausstrichen, Zytospin- und Zellblockpräparaten nicht nur Unterschiede im diagnostischen Einzugsbereich, sondern auch hinsichtlich der Fixation, Anfärbung, der Anzahl und Verteilung diagnostisch verwertbarer Zellen bzw. deren Eignung für weitere ergänzende Untersuchungen. Im Gegensatz zur weit verbreiteten Verwendung von Färbearautomaten, bei denen die Anzahl der AK je Objektträger limitiert ist, kamen in der vorliegenden Untersuchung ressourcenschonende manuelle immunzytochemischen Anfärbungen, mit bis zu drei unterschiedlichen AK je Objektträger, zum Einsatz.

Im diagnostischen Procedere basieren immunzytochemische Verfahren grundsätzlich auf den Ergebnissen der vorausgegangenen klinischen und morphologischen Diagnostik und ergänzen diese. Als Folge limitierter Sensitivitäts- und Spezifitätswerte der einzelnen AK bedürfen aber sowohl negative als auch positive ICC Anfärbungen daher stets einer differenzialdiagnostischen Einordnung in den klinisch-morphologischen Kontext. Voraussetzung einer richtigen Negativ-

## Diskussion

Bewertung sind allerdings geeignete interne Positiv-Kontrollen (72, 158). Stehen z.B. Pneumozyten Typ II für TTF-1 oder Bronchialepithelien für p40( $\Delta$ Np63), CK5/6 /CK5/14 oder CK7 nicht zur Verfügung, bleiben Restunsicherheiten in der Beurteilung negativer immunzytochemischer Ergebnisse.

TTF-1 wird als immunhistochemischer Marker zur Identifizierung von Tumoren der Lunge oder der Schilddrüse eingesetzt. Nach allgemeiner Überzeugung exprimieren aber nicht alle Lungenkarzinome TTF-1. So sollen etwa 20% bis 25% der pulmonalen ADC, 11% der SCLC, bis zu 96% der SQC, 0% bis 100% der TC/AC und 69% der LCNEC TTF-1 negativ sein (202). Ebenso sollen schleimbildende pulmonale ADC bevorzugt TTF-1 negativ sein (93, 191).

Übereinstimmend mit diesen Literaturangaben und den Resultaten, der hier mittels ICC untersuchten Fälle, erwiesen sich in unserer Untersuchung 13,0% (122 von 935 Fällen) der ADC, 90,5% (143 von 158 Fällen) der SQC und 22,8% (55 von 241 Fällen) der NEC als TTF-1 negativ (Tabelle 13a). Unabhängig von der Typisierung handelt es sich bei den TTF-1-positiven Gewebeproben mit einer Wahrscheinlichkeit von 77,7% um ADC.

Ein TTF-1-positives Signal ist allein aber nicht beweisend für ein pulmonales ADC. So kann in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten AK-Klon ein geringer Prozentsatz extra-pulmonaler Tumore ebenfalls eine TTF-1-Expression aufweisen (34, 130) (202). Nach Ordonez 2012 und anderen Autoren soll der SPT24-Klon, als auch möglicherweise der SP141-Klon über eine geringere Spezifität für den Nachweis von primär pulmonalen ADC verfügen als der 8G7G3/1-Klon (77, 86, 130). Für die vorliegende Untersuchung zytologischer Proben wurde der Klon SPT24 und für histologische Gewebeproben der Klon SP141 verwendet.

CK gehören zur Unterfamilie der Intermediärfilamente, die in Epithelgeweben vertreten sind. CK7 wird in Tumoren der Lunge, des Magens, der Mamma, in gynäkologischen Tumoren und Mesotheliomen exprimiert und fehlt zumeist in Karzinomen des Dickdarms und der Prostata. Vor dem Hintergrund potentiell erforderlicher molekularer Analysen und dem gebotenen ressourcenschonenden Umgang mit bioptisch gewonnenen Proben empfiehlt das IASCL Pathology-Panel 2019 zur Erkennung einer drüsigen Differenzierung von einem Einsatz von CK7 abzusehen (202).

## Diskussion

Erschwerend kommt hinzu, das Kimbrell HZ 2012 in 5 bis 77% der SQC eine CK7-Expression nachweisen konnten. Diese Expression soll allerdings schwächer als bei ADC sein (85). Die meisten adenosquamösen Karzinome, großzelligen Karzinome und pleomorphen Karzinome sowie LCNEC sollen ebenfalls CK7 exprimieren (150, 193).

Als weitere Marker zur Erkennung pulmonaler ADC werden CEA und Napsin A empfohlen. Im eigenen Untersuchungsgut wurde nur eine geringe Anzahl dieser beiden AK untersucht. Dementsprechend wurde von einem Vergleich der erreichten Ergebnisse Abstand genommen.

Im vorliegenden ICC Untersuchungsgut erwiesen sich 91,3% (735 von 805 Fällen) der ADC, 20,5% (15 von 73 Fällen) der SQC, etwa die Hälfte (138 von 274 Fällen) aller NSCC und rund ein Drittel (7 von 22 Fällen) aller NEC als CK7 positiv (Tabelle 13a). In der IHC wurde nur eine kleine Anzahl (67 Fälle) der Tumoren mit CK7 angefärbt (Tabelle 13b). 39 der 52 ADC und 7 der 13 NSCC reagierten hier positiv. Ungeachtet aller differenzialdiagnostischen Einschränkungen erscheint CK7 in der Zytologie besonders bei der Erkennung der epithelialen Histogenese undifferenzierter Tumore vorteilhaft.

CK5/6 bzw. das aus technischen Gründen (Vorbehandlung in Lösungen mit einem pH-Wert von 6) ausgewählte CK5/14 dienen zur Erkennung plattenepithelial differenzierter Tumore. Nach Rekhtman et al. 2011 sollen aber 20% der schlecht differenzierten SQC nicht oder nur minimal mit CK5/6 reagieren (142). Im eigenen Untersuchungsgut exprimierten 207 der 226 SQC entsprechend 91,6% CK5/14 (Tabelle 14a). Die weitaus überwiegende Mehrzahl der ADC der NSCC und der NEC erwies sich als CK5/14 negativ (164 vs. 178 Fälle entsprechend 92,1%; 177 vs. 191 Fälle entsprechend 92,7% und 6 vs. 8 Fälle entsprechend 75%). IHC waren 44 der 70 ausgewählten ADC, NSCC und NEC CK5/6 negativ (Tabelle 14b).

Die Anfärbung mit p40 ( $\Delta$ Np63) halten Rekhtman et al. 2011 für weniger variabel als bei CK5/6 /CK5/14 (142). Nach Sailer 2015 soll die Farbreaktion mit p40 ( $\Delta$ Np63) ebenso wenig heterogen sein wie diejenige für CK5/6 (153).

Eine nur fokale oder schwache p40 ( $\Delta$ Np63) Farbreaktion kann sowohl bei ADC als auch anderen Tumoren vorkommen. Dementsprechend ist die Einschätzung einer positiven Reaktion an das Überschreiten einer Cut-off-Rate von mehr als 50%

## Diskussion

angefärbter Tumorkerne gebunden. Davon unabhängig sollen oberflächliche, mit Verhornung einhergehende Anteile von SQC häufig p40 ( $\Delta$ Np63) negativ sein (202). Unterstellt man, dass bei Gewebeentnahmen zur Zytologie möglicherweise vermehrt gerade diese oberflächlichen Anteile eines SQC erfasst werden, dann könnte sich der vergleichsweise geringe Anteil p40 ( $\Delta$ Np63)-exprimierender Tumoren in der vorliegenden Analyse erklären. Nur etwa die Hälfte der SQC (36 von 69 Fällen, entsprechend 52,2%) reagierte positiv mit p40 ( $\Delta$ Np63) (Tabelle 14a). Dagegen zeigten ADC, NSCC und NEC nur ausnahmsweise p40 ( $\Delta$ Np63) positive Anfärbungen (7 der 82 Fälle entsprechend 8,5%; keiner von 3 Fällen NEC bzw. 3 von 64 NSCC Fällen, entsprechend 4,7%) (Tabelle 14b). In der IHC finden sich vergleichbare Resultate.

Neuroendokrine Marker wie CD56, Syn und Chromogranin, nehmen eine besondere Stellung ein. Die aktuelle WHO Klassifikation für Lungentumore empfiehlt ihren Einsatz nur beim Vorliegen neuroendokriner Wachstumsmuster (organoide Zellnester, rosettenartige Strukturen, palisadenartige Muster usw). Ein relativ hoher Anteil (10-30%) der NSCC kann allerdings, ohne neuroendokrine Wachstumsmuster aufzuweisen, positive NEC-Marker exprimieren. In solchen Fällen sollen diese Tumoren als "NSCC mit NEC-Differenzierung" typisiert werden (181, 182). Einem routinemäßigen Einsatz NEC-Marker bei schlecht differenzierten nicht-kleinzelligen Karzinomen (NSCC) stehen die Autoren mangels klinischer Relevanz ablehnend gegenüber (181, 182).

Auch im eigenen Untersuchungsgut von 1960 Tumoren wurde nur ein kleiner Teil (346 bzw. 85 Fälle) für eine Anfärbung mit CD56 oder Syn ausgewählt (Tabelle 15a). Vergleichsweise selten (maximal 4,0% bzw. 10,0%) exprimieren dann tatsächlich auch SQC, ADC oder NSCC CD56 oder Syn. Demgegenüber ist die weit überwiegende Mehrzahl der NEC erwartungsgemäß CD56 oder Syn positiv (90,3% bzw. 87,5%). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich in den IHC Anfärbungen (Tabelle 15a).

Im Hinblick auf die insgesamt vorliegenden Resultate tragen bei allen Tumortypen und Subtypen pulmonaler Karzinome singular eingesetzt AK zu einer Verbesserung der Erkennung derartiger Tumoren bei. Die erste Hypothese - H0:

## Diskussion

Für die Erkennung des vorliegenden Typs/Subtyps von Lungenkarzinomen sind singulär eingesetzte AK sind bedeutungslos. – muss damit abgelehnt werden.

Im Gegensatz dazu kann die 4. Hypothese - H0: Verglichen mit der klinisch-morphologisch am Entnahmeort gesicherten Enddiagnose (Goldstandard) unterscheiden sich ICC und IHC nicht. – angenommen werden.

Um die Vorzüge der AK zu maximieren und gleichzeitig deren Nachteile zu verringern, werden in der Praxis aktuell AK-Kombinationen verwendet. Das Ziel dieser Kombinationen liegt in der effizienten Anwendung der AK zur Validierung einer nach Standardfärbung erhobenen Diagnose (6, 145, 150, 202), (vier AK p40 ( $\Delta$ Np63), CK5/6, TTF-1 und Napsin A (210), sechs AK (79,181).

Nach Thunnissen et al. 2012 erhöht der Einsatz von IHC und ICC an kleinen Biopsien und Zytologien die Wahrscheinlichkeit für die Erkennung eines vorliegenden Tumortyps (177). In der Literatur fehlen trotz einer Vielzahl an Publikationen allerdings valide Angaben zur Frage, in welchem Umfang sich die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen unterschiedlicher Lungenkrebstypen durch eine Kombination unterschiedlicher AK genau verbessern lässt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es an einer großen Zahl an Proben diese Frage zu beantworten. Dementsprechend wurden für unterschiedliche AK-Konstellationen die jeweiligen Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen einzelner Lungenkrebstypen konkret ermittelt und miteinander verglichen.

Für ADC und SQC wurden zunächst jeweils zwei AK-Kombinationen (TTF-1+ CK7+ und TTF-1+ CK5/6- /CK5/14-respektive CK5/6+ /CK5/14+ p40/ $\Delta$ p63+ und CK5/6+ /CK5/14+ und TTF-1-) und für NSCC-NOS bzw. NEC jeweils eine AK-Kombination (TTF-1- CK5/6- /CK5/14- und CD56+ Syn+) ausgewählt. Übereinstimmend mit der Literatur konnte die *a priori* Wahrscheinlichkeit von 49,6% für das Vorliegen eines ADC mittels dieser zwei AK-Kombinationen (TTF-1+ CK7+ bzw. TTF-1+ CK5/6- /CK5/14-) *a posteriori* deutlich verbessert werden (96,6% vs. 91,0%) (Tabelle 16a) (12, 142, 196, 202). Die Unterschiede zwischen den beiden AK-Kombinationen waren nicht signifikant. Verglichen mit der alleinigen Verwendung von TTF-1 resultiert ein Wahrscheinlichkeitszugewinn von rund 13 bis 19%. Vergleichbare Resultate fanden sich bei den SQC. In der ICC gelang es die *a priori* Wahrscheinlichkeit für SQC von 13,1% mittels der zwei ausgewählten AK-Muster

## Diskussion

(CK5/6+ /CK5/14+ p40/Δp63+ und CK5/6+ /CK5/14+ und TTF-1-) *a posteriori* ebenfalls deutlich zu steigern (95,0% vs. 89,0%) (Tabelle 17a). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mustern waren nicht nachweisbar.

Während die IHC an 49 bzw. 48 angefärbten ADC vergleichbare Resultate erreicht, sind die Ergebnisse bei der Anfärbung von 26 bzw. 23 angefärbten SQC, möglicherweise als Folge der kleinen Anzahl, etwas schlechter als zu erwarten (*a posteriori* Wahrscheinlichkeiten 95,0% vs. 89,0% bzw. 48,0% vs. 64,7%, Tabelle 17b).

Verglichen mit dem singulären Einsatz eines AK verbessert der Einsatz zweier unterschiedlicher AK weiter die Erkennung eines vorliegenden Tumortyps/Subtyps pulmonaler Karzinome. Die zweite Hypothese -H0: Kombinationen zweier unterschiedlicher AK verbessern an kleinen Gewebeproben und Zytologien ergänzend zu singulären AK nicht zusätzlich die Sicherheit der Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen – muss damit ebenfalls abgelehnt werden.

Im Gegensatz muß die 4. Hypothese - H0: Verglichen mit der klinisch-morphologisch am Entnahmeort gesicherten Enddiagnose (Goldstandard) unterscheiden sich ICC und IHC nicht - angenommen werden.

Ergänzend wurde der Effekt der ICC bei einer Kombination aus drei unterschiedlichen AK untersucht (TTF-1+CK7+ und CK5/6- /CK5/14- bzw. TTF-1-CK7- und CK5/6+ /CK5/14+) (Tabelle 19). Es fand sich allerdings keine signifikante Steigerung der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit (97,0% vs. 89,2%).

Fehlen in den Standardfärbungen charakteristische Wachstumsmuster für ADC, SQC oder SCLC und weisen die Tumoren keine für ADC oder SQC typische AK-Expression auf, handelt es sich nach allgemeiner Überzeugung um NSCC-NOS (202). Mit der von uns gewählten AK-Kombination (TTF-1-CK5/6- /CK5/14-) gelang immunzyochemisch an 148 gefärbten Proben eine Steigerung der *a priori* Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines NSCC von 23,7% auf 86,6% *a posteriori* entsprechend einer Reduktion des gesamten Anteils NSCC-NOS von 513 Fällen in den standardgefärbten Proben auf 464 Fälle nach erfolgter ICC (Tabelle 18a). Beachtenswert ist hier der Anteil von 193 Fällen, die nicht zu einer Untersuchung zur Verfügung standen. Vergleichbare Verhältnisse finden sich in der IHC. Hier

## Diskussion

standen lediglich 16 von 60 Proben für eine immunhistochemische Anfärbung zur Verfügung.

An Hand der vorliegenden Analysen scheint der Einsatz von mehr als zwei AK nicht geeignet die Sicherheit der bioptischen Diagnosen zu verbessern. Die 3. Hypothese - H0: Kombinationen von mehr als zwei AK sind nicht geeignet im nennenswerten Umfang die Sicherheit der Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen zu verbessern.- muss angenommen werden.

Gleiches gilt hier für die 4. Hypothese - H0: Verglichen mit der klinisch-morphologisch am Entnahmeort gesicherten Enddiagnose (Goldstandard) unterscheiden sich ICC und IHC nicht. Diese muß ebenfalls angenommen werden.

Entsprechend den Empfehlungen der WHO ist der Einsatz von NEC-Marker an das Vorliegen von NEC-Wachstumsmuster gebunden (117, 202). Derzeit besteht kein Konsens darüber, ob ein, zwei oder mehr Marker verwendet werden sollten (176). Verglichen mit dem Einsatz eines einzigen NEC-Markers, CD56 oder Syn, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit durch eine Kombination beider Marker kein diagnostischer Zugewinn (Tabelle 15a – 18a).

Im Zeitalter der Molekularbiologie und dem gebotenen ressourcenschonenden Umgang mit bioptisch gewonnen Proben stellt sich die Frage nach der erforderlichen Anzahl und Effizienz unterschiedlicher Kombinationsmuster. In der zytologischen Diagnostik gelingt es die weit überwiegende Mehrzahl der Lungenkarzinome bereits anhand der Standard-Giemsafärbung zutreffend zu typisieren. Es bleibt allerdings ein Teil zurück, bei dem die ICC tatsächlich zu einer Änderung der Diagnose führt (465 von 1960 Fällen) (Tabelle 21).

Die fünfte Hypothese - H0: Die Ergebnisse der Giemsa-basierten Standardfärbung wird durch die ICC nicht verbessert.- kann abgelehnt werden.

Die Verwendung von Immunfärbungen ist darüber hinaus in vielen Fällen geeignet das klinisch-diagnostische Vertrauen in die Arbeit von Zytologen und Pathologen zu erhöhen (176).

## 7. Zusammenfassung

Die korrekte Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen in der zytologischen Diagnostik hat insbesondere nach der WHO-Klassifikation 2015, erheblich an Bedeutung gewonnen (181). Insbesondere bei kleinen Biopsien und Zytologien ist deshalb eine verlässliche morphologische Typisierung eine unentbehrliche Voraussetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle immunzyto-/-histologisch zwischen 2011 und 2016, an 3419 pulmonalen Tumoren von 2326 konsekutiven Patienten gewonnenen Befunde untersucht.

Innerhalb der Gruppe primärer Lungenkrebsfälle (1960) finden sich 1196 FNA, 436 Imprintzytologie oder Abkratzproben von Stanz- oder Zangenbiopsien, 212 Ergüsse, 116 Bürstenbiopsien und 10 andere zytologische Proben. Die Ergebnisse der ICC und der IHC wurden mit den klinisch und/oder histologisch verifizierten Enddiagnosen korreliert.

Mittels Bayes-Analyse wurden die *a priori* und *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten unterschiedlicher immunzyto-/-histochemischer AK-Expressionsmuster (TTF-1, Napsin A, CK7, CEA, p40 ( $\Delta$ p63), CK5/6, CK5/14, CD56, Syn Kombinationen) bei vier Lungenkarzinomtypen berechnet und mit den klinisch-zytologisch bzw. histologisch gesicherten Enddiagnosen korreliert.

Bereits an den routinegefärbten zytologischen Präparaten ist, unabhängig von der konkreten Art der Materialgewinnung, die Typisierung maligner epithelialer Lungentumore mit einer hohen Sensitivität und Spezifität möglich.

ICC-Analysen zytologischer Proben erreichen eine mit der IHC vergleichbar hohe Sicherheit bei der Typisierung von Lungentumoren. Erwartungsgemäß unterscheiden sich die *a priori* Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Lungenkrebstypen in den zwei untersuchten Gruppen, ICC und IHC, nicht nennenswert.

Bei ADC führt bereits der singuläre Einsatz von TTF-1 oder CK7 zu einer Steigerung der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit um mehr als 20 Prozentpunkte. Aus der Kombination von zwei AK resultiert, unabhängig von der AK-Konstellation, eine weitere Steigerung um 10 Prozentpunkte. Bei der Diagnose von SQC und NEC wird

## Zusammenfassung

eine vergleichbare Zunahme der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit nur mittels ICC erreicht. Bei SQC als auch bei NEC führt in der IHC erst eine Kombination unterschiedlicher AK zu *a posteriori* Wahrscheinlichkeitswerten über 70%.

Bei der Typisierung von Lungenkrebs empfehlen wir in der Praxis die Verwendung von zwei Markern, eines positiven und eines negativen Markers oder zweier positiver Marker.

Der Einsatz der ICC an kleinen Biopsien und Zytologien verbessert die Sicherheit der morphologischen Lungenkrebsdiagnostik vor allem bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien und liefert damit eine geeignete Grundlage adäquater ZT.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Afube TN (2009). Synaptophysin/Synaptobrevin complex: Characterisation of the Ca<sup>2+</sup>- dependent cytosolic dissociation of the complex. Med. Diss. Berlin. 1-87.
2. Agackiran Y, Ozcan A, Akyurek N, Memis L, Findik G, Kaya S (2012). Desmoglein-3 and Napsin A double stain, a useful immunohistochemical marker for differentiation of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma from other subtypes. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 20: 350-355.
3. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK (2017). PD-1 and PD-L1 Checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. Front Pharmacol. 8: 561.
4. Alsdorf WH, Clauditz TS, Hoenig T, Quaas A, Sirma H, Koenig AM, Izbicki J, Sauter G, Marx AH, Grob T (2013). Intratumoral heterogeneity of KRAS mutation is rare in non-small-cell lung cancer. Exp Mol Pathol. 94: 155-159.
5. Alshangiti A, Chandhoke G, and Ellis PM (2018). Antiangiogenic Therapies in Non-Small-Cell Lung Cancer. Curr Oncol. 25: 45-58.
6. AO MH, Zhang H, Sakowski L, Sharma R, Illei PB, Gabrielson E, Askin F, Li QK (2014). The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer. Hum Pathol. 45: 926-934.
7. Arai T, Kuroishi T, Saito Y, Kurita Y, Naruke T, Kaneko M (1994). Tumor Doubling Time and Prognosis in Lung Cancer Patients: Evaluation from Chest Films and Clinical Follow-up Study. Jpn J Clin Oncol. 24: 199-204.
8. Ashley DJ, Davies HD (1969). Lung cancer in women. Thorax. 446-450.
9. Auerbach O, Garfinkel L, Parks VR, Conston AS, Galdi VA, Joubert L (1984). Histologic type of lung cancer and asbestos exposure. Cancer. 54:3017-3021.
10. Avrillon V, Pérol M (2017). Alectinib for Treatment of ALK -Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. Future Oncol. 13: 321-335.
11. Bai H, Wang Z, Wang Y, Zhuo M, Zhou Q, Duan J, Yang L, Wu M, An T, Zhao J, Wang J (2013). Detection and Clinical Significance of Intratumoral EGFR Mutational Heterogeneity in Chinese Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer PLoS One. 8: e54170.

## Literaturverzeichnis

12. Baumann A (2007). Primäre und Sekundäre Lungentumoren - Immunhistochemische Befunde -. Med. Diss. Bochum. 1-123.
13. Beelte AK (2008). Das Bronchialkarzinom in Schleswig-Holstein von 1999-2003. Med. Diss. Lübeck. 1-111.
14. Bhargava R und Dabbs DJ (2010). Immunohistology of metastatic carcinomas of unknown primary site. In: Diagnostic immunohistochemistry. Dabbs D, ed. 4rd eds Elsevier Saunders. 204-243.
15. Biancosino C, Krüger M, Vollmer E, Welker L (2016). Intraoperative fine needle aspirations - diagnosis and typing of lung cancer in small biopsies: challenges and limitations. *Diagn Path.* 11: 59.
16. Bieglmayer C (2010). Chromogranin A: Ein Universeller Marker Für Neuroendokrine Tumoren. *Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 3: 8-14.
17. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N (2012). p40 ( $\Delta$ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 25: 405-415.
18. Boenisch MS (2003). Färbemethoden- Detektionssysteme. In: Boenisch, MS, Hrsg. *Handbuch- Immunhistochemische Färbemethoden.* 3. Aufl., DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA und DakoCytomation GmbH, Hamburg.
19. Bollinger MK, Agnew AS, Mascara GP (2018). Osimertinib: A Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitor for Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer with the Acquired Thr790Met Mutation. *J Oncol Pharm Pract.* 24: 379-388.
20. Brambilla C, Laffaire J, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Mignotte H, Arbib F, Toffart AC, Petel F, Hainaut P, Rousseaux S, Khochbin S, de Reyniès A, Brambilla E (2014). Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. *Clin Cancer Res.* 20: 5777-5786.
21. Brambilla E, Moro D, Veale D, Brichon PY, Stoebner P, Paramelle B, Brambilla C (1992). Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol.* 23: 993-1003.

22. Bubendorf L, Feichter G, Obermann EC, Dalquen P (2011). Respirationstrakt. In: Zytopathologie. Bubendorf L, Feichter G, Obermann EC, Dalquen P, Hrsg. 3. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg. 257-305.
23. Bui KT, Cooper WA, Kao S, Boyer M (2018). Targeted molecular treatments in non-small cell lung cancer: A Clinical Guide for Oncologists. *J Clin Med.* 7: 192.
24. Bulbul A, Husain H (2018). First-Line Treatment in EGFR mutant non-small cell lung cancer: is there a best option? *Front Oncol.* 8: 94.
25. Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SA, Del Carlo Bernardi, F (2006). Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 37:542-546.
26. Cantini L, Pistelli M, Savini A, Bastianelli L, Della Mora A, Merloni F, Burattini M, Berardi R (2017). Long-responders to anti-HER2 therapies: A case report and review of the literature. *Mol Clin Oncol.* 8: 147-152.
27. Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE, Travis WD; ENETS consensus conference participants (2015). Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol.* 26: 1604-1620.
28. Cataluña JJ, Perpiñá M, Greses JV, Calvo V, Padilla JD, París F (1996). Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest.* 109:1199-1203.
29. Chae YK, Arya A, Lams W, Cruz MR, Chandra S, Choi J, Giles F (2018). Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer.* 6: 39.
30. Cheng CC, Lin HC, Tsai KJ, Chiang YW, Lim KH, Chen CG, Su YW, Peng CL, Ho AS, Huang L, Chang YC, Lin HC, Chang, Chang YF (2018). Epidermal growth factor induces STAT1 expression to exacerbate the IFN $\gamma$ -mediated PD-L1 axis in epidermal growth factor receptor-positive cancers. *Mol Carcinog.* 57: 1588-1598.
31. Cheng X, Chen H (2014). Tumor heterogeneity and resistance to EGFR-targeted therapy in advanced nonsmall cell lung cancer: challenges and perspectives. *OncoTargets Ther.* 7: 1689-1704.

## Literaturverzeichnis

32. Chu PG, Weiss LM (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 40: 403-439.
33. Coleman RE (2006). Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*. 12: 6243-6249.
34. Comp rat E, Zhang F, Perrotin C, Molina T, Magdeleinat P, Marmey B, R gnard JF, Audouin J, Camilleri-Bro t S (2005). Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Mod. Pathol*. 18: 1371-1376.
35. Cox JD, Yesner RA (1979). Adenocarcinoma of the lung: recent results from the Veterans Administration Lung Group. *Am Rev Respir Dis*. 120: 1025-1029.
36. Croegaert K, Kolesar JM (2015). Role of anaplastic lymphoma kinase inhibition in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Am J Health-Syst Pharm*. 72: 1456-1462.
37. De Felice M, Silberschmidt D, DiLauro R, Xu Y, Wert SE, Weaver TE, Bachurski CJ, Clark JC, Whitsett JA (2003). TTF-1 phosphorylation is required for peripheral lung morphogenesis, perinatal survival, and tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 278: 35574-35583.
38. Detterbeck FC (2018). The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 155: 356-359.
39. Dick JE (2008). Stem cell concepts Renew cancer research. *Blood*. 112: 4793-4807.
40. Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res*. 86: 727-43.
41. Eguchi T, Bains S, Lee MC, Tan KS, Hristov B, Buitrago DH, Bains MS, Downey RJ, Huang J, Isbell JM, Park BJ, Rusch VW, Jones DR, Adusumilli PS (2017). Impact of increasing age on cause-specific mortality and morbidity in patients with stage i non-small-cell lung cancer: A competing risks analysis. *J Clin Oncol*. 35:281-290.
42. Elmas H, Lammers M, Welker L (2018). Immunocytochemical Diagnosis: Selection of Proper Antibodies and Technical Application.  nal B, ed. *Sitopatoloji*. Ankara. T rkiye Klinikleri. 94-104.

## Literaturverzeichnis

43. Fan J, Fong T, Xia Z, Zhang J, Luo P (2018). The efficacy and safety of ALK inhibitors in the treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer: A network meta-analysis. *Cancer Med.* 7: 4993-5005.
44. Fisseler Eckhoff A, Demes M (2012). Neuroendocrine tumors of the lung. *Cancers (Basel).* 4: 777-798.
45. Fucà G, de Braud F, Di Nicola M (2018). Immunotherapy-based combinations. *Curr Opin Oncol.* 30: 345-351.
46. Gallus S, Lugo A, La Vecchia C, Boffetta P, Chaloupka FJ, Colombo P, Currie L, Fernandez E, Fischbacher C, Gilmore A, Godfrey F, Joossens L, Leon ME, Levy DT, Nguyen L, Rosenqvist G, Ross H, Townsend J, Clancy L (2014). Pricing Policies and Control of Tobacco in Europe (PPACTE) Project. *Eur J Cancer Prev.* 23: 177-85.
47. Garbe C, Abusaif S, Eigentler TK (2018). Vemurafenib. In: *Small Molecules in Oncology.* Martens U, eds., 6nd ed. Springer, Berlin. 215-225.
48. Gay L, Baker AM, Graham TA (2016). Tumour cell heterogeneity. *F1000Res.* 238.
49. Georgieva M, da Silveira Nogueira Lima JP, Aguiar PJr, de Lima Lopes GJr, Haaland B (2018). Cost-effectiveness of pembrolizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 124: 248-54.
50. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005). The B7 Family revisited. *Annual Review of Immunology.* 23: 515-548.
51. Grunnet M, Sorensen JB (2012). Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer.* 76: 138-143.
52. Grunze H (1960) A critical review and evaluation of cytodagnosis in chest diseases. *Acta Cytol* 4: 175-198.
53. Grunze H (1956). Cytologie. In: *Handbuch der Inneren Medizin.* 4. Auflage. 4. Bd. 1. Teil, Löffler W. Erkrankungen der Atmungsorgane. Bergmann G, Frey W, Schwiegk H. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg. 294-349.
54. Hammer SJ (2017). Immunhistochemische und molekularbiologische Charakterisierung von nichtkleinzelligen Lungentumoren unter besonderer Berücksichtigung von Adenokarzinomen. *Med. Diss. Rostock.* 1-72.
55. Han B, Sun JM, Ahn JS, Park K, Ahn MJ (2013). Clinical outcomes of atypical carcinoid tumors of the lung and thymus: 7-year experience of a rare malignancy at single institute. *Med Oncol.* 30: 479.

## Literaturverzeichnis

56. Harms A, Kriegsmann M, Fink L, Länger F and Warth A (2017). The new TNM classification for lung tumors: Changes and the assessment of multiple tumor foci. *Pathologe*. 38: 11-20.
57. He X, Cruz J L, Joseph S, Pett N, Chew HY, Tuong ZK, Okano S, Kelly G, Veitch M, Simpson F, Wells J W (2018). Characterization of 7A7, an anti-mouse EGFR monoclonal antibody proposed to be the mouse equivalent of cetuximab. *Oncotarget*. 9: 12250-12260.
58. Heigener D, Falk M, Kanappilly A, Tiemann M, Reck M, Welker L (2014). Molecular profiling of non-small cell lung cancer with cytologic specimens in the absence of histologic specimens. *Ann Oncol*. 25: 65-65.
59. Herbst RS, Gandara DR, Hirsch FR, Redman MW, LeBlanc M, Mack PC, Schwartz LH, Vokes E, Ramalingam SS, Bradley JD, Sparks D, Zhou Y, Miwa C, Miller VA, Yelensky R, Li Y, Allen JD, Sigal EV, Wholley D, Sigman CC, Blumenthal GM, Malik S, Kelloff GJ, Abrams JS, Blanke CD, Papadimitrakopoulou VA (2015). Lung Master Protocol (Lung-MAP)-A Biomarker-Driven Protocol for Accelerating Development of Therapies for Squamous Cell Lung Cancer: SWOG S1400. *Clin Cancer Res*. 21: 1514-24.
60. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 553: 446-454.
61. Hilbert M (2007). Immunhistologischer Nachweis und Prognostische Bedeutung der Neuroendokrinen Differenzierung beim Primären Rektumkarzinom nach Kurativer Resektion. *Med. Diss. Lübeck*. 1-78.
62. Hildegard D (2018). Die Rolle von MiR210 auf den Stammzellphänotyp in Glioblastomen. *Med. Diss. Gießen*. 1-81.
63. Hirano T, Gong Y, Yoshida K, Kato Y, Yashima K, Maeda M, Nakagawa A, Fujioka K, Ohira T, Ikeda N, Ebihara Y, Auer G, Kato H (2003). Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 41: 155-62.
64. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ Jr, Wu YL, Paz-Ares L (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 389: 299-311.
65. Hoggart C, Brennan P, Tjonneland A, Vogel U, Overvad K, Østergaard JN, Kaaks R, Canzian F, Boeing H, Steffen A, Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D, Johansson M, Palli D, Krogh V, Tumino R, Sacerdote C, Panico

- S, Boshuizen H, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Gram IT, Braaten T, Rodríguez L, Agudo A, Sánchez-Cantalejo E, Arriola L, Chirlaque MD, Barricarte A, Rasmuson T, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Riboli E, Vineis P (2012). A risk model for lung cancer incidence. *Cancer Prev Res (Phila)*. 5: 834-46.
66. Horn L, Mansfield AS, Szczerbna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, Huemer F, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, Reck M, Mok T, Lam S, Shames DS, Liu J, Ding B, Lopez-Chavez A, Kabbinavar F, Lin W, Sandler A, Liu SV (2018). First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. IMpower133 Study Group. *N Engl J Med*. 379: 2220-2229.
67. Hotta K, Aoe K, Kozuki T, Ohashi K, Ninomiya K, Ichihara E, Kubo T, Ninomiya T, Chikamori K, Harada D, Nogami N, Hirata T, Hinotsu S, Toyooka S, Kiura K (2018). A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 13: 273-279.
68. Jain D, Roy-Chowdhuri S (2018). Molecular pathology of lung cancer cytology specimens: A Concise Review. *Arch Pathol Lab Med*. 142: 1127-1133.
69. Jain P, Khanal R, Sharma A, Yan F, Sharma N (2014). Afatinib and lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 14: 1391-1406.
70. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, Shafi S, Johnson DH, Mitter R, Rosenthal R, Salm M, Horswell S, Escudero M, Matthews N, Rowan A, Chambers T, Moore DA, Turajlic S, Xu H, Lee SM, Forster MD, Ahmad T, Hiley CT, Abbosh C, Falzon M, Borg E, Marafioti T, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Shah R, Joseph L, Quinn AM, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Dentre S, Taniere P, O'Sullivan B, Lowe HL, Hartley JA, Iles N, Bell H, Ngai Y, Shaw JA, Herrero J, Szallasi Z, Schwarz RF, Stewart A, Quezada SA, Le Quesne J, Van Loo P, Dive C, Hackshaw A, Swanton C (2017). Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. TRACERx Consortium. *N Engl J Med*. 376: 2109-2121.
71. Jerome Marson V, Mazieres J, Groussard O, Garcia O, Berjaud J, Dahan M, Carles P, Daste G (2004). Expression of TTF-1 and cytokeratins in primary and

- secondary epithelial lung tumours: Correlation with histological type and grade. *Histopathology*. 45:125-134.
72. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F (2004). Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 22: 2184-91.
73. Kadota K, Nitadori J, Rekhtman N, Jones DR, Adusumilli PS, Travis WD (2015). Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*. 39: 1170-80.
74. Kadota K, Nitadori J, Woo KM, Sima CS, Finley DJ, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD (2014). Comprehensive pathological analyses in lung squamous cell carcinoma: single cell invasion, nuclear diameter, and tumor budding are independent prognostic factors for worse outcomes. *J Thorac Oncol*. 9: 1126-1139.
75. Kammin C (2009). Diagnostischer Nutzen und Prognostische Relevanz Immunhistochemischer Marker einer Neuroendokrinen Differenzierung beim Kleinzelligen und Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinom. *Med. Diss. Halle*. 1-46.
76. Karki K, Harishchandra S, Safe S (2018). Bortezomib targets Sp transcription factors in cancer cells. *Mol Pharmacol*. 94: 1187-1196.
77. Kashima K, Hashimoto H, Nishida H, Arakane M, Yada N, Daa T, Yokoyama S (2014). Significant expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary squamous cell carcinoma detected by SPT24 monoclonal antibody and CSA-II system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 22: 119-124.
78. Kaufmann O, Dietel M (2000). Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology*. 36: 415-420.
79. Kayser G, Csanadi A, Otto C, Plönes T, Bittermann N, Rawluk J, Passlick B, Werner M. (2013). Simultaneous multi-antibody staining in non-small cell lung cancer strengthens diagnostic accuracy especially in small tissue samples. *PLoS One*. 8: e56333.

80. Kazaz SN, Öztop İ (2017) Treatment after first-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in non- small-cell lung cancer. *Turk Thorac J.* 18: 66-71.
81. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science.* 317: 337.
82. Kelly RJ (2018). Dabrafenib and trametinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 18: 1063-68.
83. Kennedy A (1973). Relationship between cigarette smoking and histological type of lung cancer in women. *Thorax.* 28: 204-208.
84. Kim DJ, Kim KD, Shin DH, Ro JY, Chung KY (2003). Basaloid carcinoma of the lung: a really dismal histologic variant? *Ann Thorac Surg.* 76: 1833-1837.
85. Kimbrell ZH, Gustafson KS, Huang M, Ehya H (2012). Subclassification of Non-Small Cell Lung Cancer by Cytologic Sampling: A Logical Approach with Selective Use of Immunocytochemistry. *Acta Cytol.* 56: 419-424.
86. Klebe S, Swalling A, Jonavicius L, Henderson DW (2016). An immunohistochemical comparison of two TTF-1 monoclonal antibodies in atypical squamous lesions and sarcomatoid carcinoma of the lung, and pleural malignant mesothelioma. *J Clin Pathol.* 69: 136-41.
87. Kocer B (2006). Küçük hücre dışı akciğer kanserli olguların serum VEGF ve CEA değerleri ve mediastinal lenfadenopati pozitifliği (mediastinoskopik tetkik ile) arasındaki korelasyon. *Med. Diss. İstanbul.* 1-79.
88. Kochar AS, Madhavan M, Manjila S, Scoco A, Belle VK, Geertman RT (2018). Contemporary updates on clinical trials of antiangiogenic agents in the treatment of glioblastoma multiforme. *Asian J Neurosurg.* 13: 546-554.
89. Konietzko N, Fabel H (1996). Lung diseases Germany. In: *Pneumologie.* 50 Suppl. 2: 574-577.
90. Kontogianni K, Nicholson AG, Butcher D, Sheppard MN (2005). CD56: a useful tool for the diagnosis of small cell lung carcinomas on biopsies with extensive crush artefact. *J Clin Pathol.* 58: 978-980.
91. Landi L, Cappuzzo F (2015). Experience with erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. *Ther Adv Respir Dis.* 9: 146-163.
92. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio, M, Ribas, A (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 371: 1867-1876.

## Literaturverzeichnis

93. Lau SK, Luthringer DJ, Eisen RN (2002). Thyroid transcription factor-1: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 10: 97-102.
94. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R (1991). The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development.* 113: 1093-1104.
95. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, Tiseo M, Planchard D (2018). BRAF in non-small cell lung cancer (NSCC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev.* 66: 82-94.
96. Li BT, Shen R, Buonocore D, Olah ZT, Ni A, Ginsberg MS, Kris MG (2018). Ado-trastuzumab emtansine for patients with HER2 -mutant lung cancers: results from a Phase II basket trial. *J Clin Oncol.* 36: 2532-2537.
97. Lim SM, An HJ, Park HS, Kwon HJ, Y Kim E, Hur J, Moon YW (2018). Organizing pneumonia resembling disease progression in a non-small-cell lung cancer patient receiving ceritinib. *Medicine (Baltimore).* 97: e11646.
98. Liu X, Fang X, Hu H, Fu X, Chen Y, Yuan Y (2018). Efficacy of vemurafenib in a heavy smoker with BRAF-mutated lung adenocarcinoma: A case report and literature review. *Mol Clin Oncol.* 9: 472-476.
99. Lugowska I, Koseła-Paterczyk H, Kozak K, Rutkowski P (2015). Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *Onco Targets Ther.* 8: 2251-2259.
100. Malapelle U, Ricciuti B, Baglivo S, Pepe F, Pisapia P, Anastasi P, Tazza M, Sidoni A, Liberati AM, Bellezza G, Chiari R, Metro G (2018). Osimertinib. *Recent Results Cancer Res.* 211: 257-276.
101. Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J (2017). Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 6: 196-211.
102. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 90: 2188-2195.
103. Mazzearella L, Guida A, Curigliano G (2018). Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 18: 483-493.
104. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister

## Literaturverzeichnis

- J, Wey K, Shen D, Dallaire BK (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 16: 2825-2833.
105. Mertz A (2008). Untersuchungen zur Bedeutung von Zytokeratinen in der klinischen Zytologie. Med. Diss. Halle. 1-71.
106. Mezquita L, Planchard D (2018). The role of brigatinib in crizotinib-resistant non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res.* 10: 123-130.
107. Michor F, Iwasa Y, Nowak MA (2004). Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 4: 197-205.
108. Mielchen L (2005). Evaluation von Mediastinalen und hilären Lymphknoten mit der Multidetektor-Spiral-CT. Med. Diss. München. 1-111.
109. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M; (2010). Gefitinib versus Cisplatin plus Docetaxel in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (WJTOG3405): An Open Label, Randomised Phase 3 Trial. West Japan Oncology Group. *Lancet Oncol.* 11: 121-128.
110. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S, Papadimitrakopoulou VA (2017). Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. AURA3 Investigators. *N Engl J Med.* 376: 629-640.
111. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 361: 947-957.
112. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31: 11-24.
113. Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Diab S, Moulai N, Aubert A, Timsit JF, Brambilla C, Brichon PY, Brambilla E (2008). Lung carcinomas with a basaloid pattern: A study of 90 cases focusing on their poor prognosis. *Eur Respir J.* 31: 854-859.

## Literaturverzeichnis

114. Mountain CF, Carr DT, and Anderson WA (1974). A System for the Clinical Staging of Lung Cancer. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 120: 130-38.
115. Mountain CF, Dresler CM (1997). Regional Lymph Node Classification for Lung Cancer Staging. *Chest.* 111: 1718-1723.
116. Mu D (2013). The complexity of thyroid transcription factor 1 with both pro- and anti-oncogenic activities. *J Biol Chem.* 288: 24992-5000.
117. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL (2011). Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 35: 15-25.
118. Müller KM, Bramer VG, Hiddemann W (1986). Probleme der morphologischen Klassifikation bösartiger Lungentumoren. *Atemweg Lungenkrankheit.* 12: 459-465.
119. Müller KM, Fisseler Eckhoff A (1988). What's New in Lung Tumor Heterogeneity? *Pathol Res Pract.* 184: 108-115.
120. Munding J, Tannapfel A (2013). Pathologie des CUP-Syndroms. *Der Onkologe.* 19: 15-21.
121. Neid, M, Wittekind C (2007). TTF-1 in Der Differenzialdiagnose Zwischen Lungenkarzinom Und Lungenmetastase. *Der Onkologe.* 13: 81-90.
122. Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R, Travis WD (2002). Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol.* 26: 1184-1197.
123. Nobre AR, Albergaria A, Schmitt F (2013). P40: A p63 isoform useful for lung cancer diagnosis - a review of the physiological and pathological role of p63. *Acta Cytol.* 57: 1-8.
124. Noeparast A, Teugels E, Giron P, Verschelden G, De Brakeleer S, Decoster L, De Grève, J (2017). Non-V600 BRAF mutations recurrently found in lung cancer predict sensitivity to the combination of Trametinib and Dabrafenib. *Oncotarget.* 8: 60094-60108.
125. Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194: 23-28.
126. Odogwu L, Mathieu L, Blumenthal G, Larkins E, Goldberg KB, Griffin N, Bijwaard K, Lee EY, Philip R, Jiang X, Rodriguez L, McKee AE, Keegan P,

- Pazdur R (2018). FDA approval summary: dabrafenib and trametinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancers harboring BRAF V600E mutations. *Oncologist*. 23: 740-745.
127. Oki M, Yatabe Y, Saka H, Kitagawa C, Kogure Y, Ichihara S, Moritani S (2015). Feasibility and accuracy of molecular testing in specimens obtained with small biopsy forceps: Comparison with the results of surgical specimens. *Respiration*. 89: 235-242.
128. Okuma Y, Hosomi Y (2017). Osimertinib for advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR mutation exon 20 T790M, acquired resistant mutation for first- or second-generation EGFR-TKI. *J Thorac Dis*. 9: 470-473.
129. Opitz I, Schneider D (2018). Moderne Aspekte Der Lungenkrebschirurgie. *Praxis*. 107: 1383-1391.
130. Ordóñez NG (2012). Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 20: 429-444.
131. Paz Ares L, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M, Yang JC, Mok T, Lee KH, Lu S, Shi Y, Lee DH, Laskin J, Kim DW, Laurie SA, Kölblbeck K, Fan J, Dodd N, Märten A, Park K (2017). Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase iib LUX-Lung 7 Trial. *Ann Oncol*. 28: 270-277.
132. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J (2005). Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol*. 29: 179-187.
133. Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, Massa F, Righi L, Gatti G, Papanikolaou N, Vijayvergia N, Calabrese F, Papotti M (2017). Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res*. 6: 513-529.
134. Peters S, Stahel R, Bubendorf L, Bonomi P, Villegas A, Kowalski DM, Baik CS, Isla D, Carpeno JC, Garrido P, Rittmeyer A, Tiseo M, Meyenberg C, de Haas S, Lam LH, Lu MW, Stinchcombe TE (2018). Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in Patients with Previously Treated HER2-Overexpressing Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: Efficacy, Safety, and Biomarkers. *Clin Cancer Res*. 25: 64-72.

## Literaturverzeichnis

135. Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V (2013). The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: A prospective study of one million women in the UK. Million Women Study Collaborators. *Lancet* 381: 133-141.
136. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, Souquet PJ, Smit EF, Groen HJ, Kelly RJ, Cho BC, Socinski MA, Pandite L, Nase C, Ma B, D'Amelio A Jr Mookerjee B Curtis CM Jr Johnson BE (2016). Dabrafenib in patients with BRAF (V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 17: 642-650.
137. Pohlmann J (2008). Immunohistochemische Differentialdiagnose von kleinzelligen Lungenkarzinomen und epitheloiden Mesotheliomen. Med. Diss. Bochum. 1-165.
138. Reck M, Jotte RM, Socinski MA (2018). Atezolizumab Treatment of nonsquamous NSCC. *N Engl J Med.* 379: 1187-1188.
139. Reck M, Rabe KF (2017). Precision diagnosis and treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 377: 849-861.
140. Reis HG, Metz CHD, Baba HA Bornfeld N, Schmid KW, Metz KA (2011). TTF-1- (Klon 8G7G3/1) positives colonkarzinom. *Der Pathologe.* 32: 349-351.
141. Rekhtman N (2010). Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 134: 1628-1638.
142. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 24: 1348-1359.
143. Rekhtman N, Kazi S (2015). Nonspecific reactivity of polyclonal napsin a antibody in mucinous adenocarcinomas of various sites: a word of caution. *Arch Pathol Lab Med.* 139: 434-436.
144. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreir AL, Travis WD, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res.* 18: 1167-1176.
145. Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, Naidoo J, Arora A, Won H, Halpenny DF, Wang H, Tian SK, Litvak AM, Paik PK, Drilon AE, Socci N, Poirier JT, Shen R, Berger MF, Moreira AL, Travis WD, Rudin CM, Ladanyi M (2016). Next-

## Literaturverzeichnis

- Generation Sequencing of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma reveals small cell carcinoma-like and non-small cell carcinoma-like subsets. *Clin Cancer Res.* 22: 3618-3629.
146. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414: 105-111.
147. Rinke A, Gress TM (2017). Neuroendocrine Cancer, Therapeutic Strategies in G3 Cancers. *Digestion.* 95: 109-114.
148. Robert Koch Institut, "Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends", 7. Ausgabe, 2010.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010.pdf?__blob=publicationFile) (**Tag des Zugriffs:** 26.06.2019).
149. Robert Koch-Institut (2016). Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen\\_download.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile) (**Tag des Zugriffs:** 10.09.2019).
150. Rossi G, Mengoli MC, Cavazza A, Nicoli D, Barbareschi M, Cantaloni C, Papotti M, Tironi A, Graziano P, Paci M, Stefani A, Migaldi M, Sartori G, Pelosi G (2014). Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch.* 464: 61-8.
151. Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R (2001). Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev.* 10: 77-82.
152. Ryu R, Ward K E (2018). Atezolizumab for the first-line treatment of non-small cell lung cancer (NSCC): Current status and future prospects. *Front Oncol.* 8: 277.
153. Sailer V, Lüders C, Kuhn W, Pelzer V, Kristiansen G (2015). Immunostaining of  $\Delta$ Np63 (Using the P40 Antibody) is equal to that of P63 and CK5/6 in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. *Virchows Archiv.* 467: 67-70.
154. Salzer G (1967). Klinische Überlegungen Zur Histologie Des Bronchuskarzinoms Das Fiasko Der Klassifizierung. *Thorac Cardiovasc Surg.* 15: 121-24.

## Literaturverzeichnis

155. Salzer G, Kutschera W (1989). Die histologische Klassifizierung des Bronchuskarzinoms aus klinischer Sicht, weiterhin ein Fiasko. *Dtsch Z Onkol* 21. 5:127-131.
156. Santarpià M, Liguori A, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Daffinà MG, D'Aveni A, Marabello G, Altavilla G, Rosell R (2017). Osimertinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: Design, development and place in therapy. *Lung Cancer (Auckl)*. 8: 109-125.
157. Santos SB, Sousa Lobo JM, Silva AC (2018). Biosimilar medicines used for cancer therapy in Europe: A review. *Drug Discov Today*. 24: 293-299.
158. Scagliotti G, Brodowicz T, Shepherd FA, Zielinski C, Vansteenkiste J, Manegold C, Simms L, Fossella F, Sugarman K, Belani CP (2011). Treatment-by-histology interaction analyses in three phase iii trials show superiority of pemetrexed in nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 6: 64-70.
159. Schalleschak J (2001). Maligne Lungentumoren. In: *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura Handbuch und Farbatlas*. Pokieser L, Bernhardt K, Kreuzer A, Schalleschak J. Hrsg 1. Aufl., Springer, Wien New York. 77-120.
160. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, Rüschoff J, Schildhaus HU, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer RN, Wolf J, Büttner R (2016). Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer: Current state of the art and experiences of the first German harmonization study. *Pathologe*. 37: 557-567.
161. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Wright MW (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 174: 169-174.
162. Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Fernández-Cuesta L, Leenders F, Lu X, Ansén S, Gardizi M, Nguyen C, Berg J, Russell P, Wainer Z, Schildhaus HU, Rogers TM, Solomon B, Pao W, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Thunnissen E, Travis WD, Perner S, Wright G, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Gabler F, Wilkening I, Müller C, Dahmen I, Menon R, König K, Albus K, Merkelbach-Bruse S, Fassunke J, Schmitz K, Kuenstlinger H, Kleine MA, Binot E, Querings S, Altmüller J, Bäßmann I, Nürnberg P, Schneider PM, Bogus M, Büttner R, Perner S, Russell P, Thunnissen E, Travis WD, Brambilla E, Soltermann A, Moch H, Brustugun OT, Solberg S, Lund Iversen M, Helland Å, Muley T, Hoffmann H, Schnabel PA,

- Chen Y, Groen H, Timens W, Sietsma H, Clement JH, Weder W, Sänger J, Stoelben E, Ludwig C, Engel-Riedel W, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Nogova L, Sos ML, Mattonet C, Topelt K, Scheffler M, Goekkurt E, Kappes R, Krüger S, Kambartel K, Behringer D, Schulte W, Galetke W, Randerath W, Heldwein M, Schlesinger A, Serke M, Hekmat K, Frank KF, Schnell R, Reiser M, Hunerliturkoglu AN, Schmitz S, Meffert L, Ko YD, Litt-Lampe M, Gerigk U, Fricke R, Besse B, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Moro Sibilot D, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field JK, Hyde R, Validire P, Girard P, Muscarella LA, Fazio VM, Hallek M, Soria JC, Carter SL, Getz G, Hayes D, Wilkerson MD, Achter V, Lang U, Seidel D, Zander T, Heukamp LC, Peifer M, Bos M, Pao W, Travis WD, Brambilla E, Büttner R, Wolf J, Thomas RK, Büttner R, Wolf J, Thomas RK (2013). A genomics-based classification of human lung tumors – Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP); Network Genomic Medicine (NGM). *Sci Transl Med.* 5: 209ra153.
163. Sekine K, Kanda S, Goto Y, Horinouchi H, Fujiwara Y, Yamamoto N, Motoi N, Ohe Y (2018). Change in the lymphocyte-to-monocyte ratio is an early surrogate marker of the efficacy of nivolumab monotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 124: 179-188.
164. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 68: 7-30.
165. Sigel CS, Rudomina DE, Sima CS, Rekhtman N, Travis WD, Geisinger KR, Moreira AL (2012). Predicting pulmonary adenocarcinoma outcome based on a cytology grading system. *Cancer Cytopathol.* 120: 35-43.
166. Sim EH, Yang IA, Wood-Baker R, Bowman RV, Fong KM (2018). Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 1:CD006847. 1: CD006847.
167. Smits AJ, Vink A, Tolenaars G, Herder GJ, Kummer JA (2015). Different cutoff values for thyroid transcription factor-1 antibodies in the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 23: 416-421.
168. Sousa V, Espırıtto Santo J, Silva M, Cabral T, Alarcao AM, Gomes A, Couceiro P, Carvalho L (2011). EGFR/ErB-1, HER2/ErB-2, CK7, LP34, Ki67 and P53 expression in preneoplastic lesions of bronchial epithelium: an immunohistochemical and genetic study. *Virchows Arch.* 458: 571-581.

169. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, Shete S, Etzel CJ (2007). A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 99: 715-726.
170. Sullivan I, Planchard D (2017). Next-Generation EGFR tyrosine kinase inhibitors for treating EGFR-mutant lung cancer beyond first line. *Front Med (Lausanne).* 3: 76.
171. Sun L, Sakurai S, Sano T, Hironaka M, Kawashima O, Nakajima T (2009). High-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: comparative clinicopathological study of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma. *Pathol Int.* 59: 522-529.
172. Takigawa N (2018). How Should We Treat Alectinib-Refractory ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer? *J Thorac Oncol.* 13: 1438-1440.
173. Tatnell PJ, Powell DJ, Hill J, Smith TS, Tew DG, Kay J (1998). Napsins: New human aspartic proteinases. Distinction between two closely related genes. *FEBS Lett.* 441: 43-48.
174. Theodosakis N, Langdon CG, Micevic G, Krykbaeva I, Means RE, Stern DF, Bosenberg MW (2018). Inhibition of isoprenylation synergizes with MAPK blockade to prevent growth in treatment-resistant melanoma, colorectal, and lung cancer. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32: 292-302.
175. Thomas M, Gatzemeier U, Goerg R, Matthiessen W, Morr H, Schönfeld N, Ukena D, Stamatis G (2000). Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie.* 54: 361-371.
176. Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, Dacic S, Lantuejoul S, Russell PA, den Bakker M, Botling J, Brambilla E, de Cuba E, Geisinger KR, Hiroshima K, Marchevsky AM, Minami Y, Moreira A, Nicholson AG, Yoshida A, Tsao MS, Warth A, Duhig E, Chen G, Matsuno Y, Travis WD, Butnor K, Cooper W, Mino-Kenudson M, Motoi N, Poleri C, Pelosi G, Kerr K, Aisner SC, Ishikawa Y, Buettner RH, Keino N, Yatabe Y, Noguchi M (2017). The use of immunohistochemistry improves the diagnosis of small cell lung cancer and its differential diagnosis. An international reproducibility study in a demanding set of cases. *J Thorac Oncol.* 12: 334-346.
177. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, Rossi G, Skov BG, Weynand B, Bubendorf L, Katrien G, Johansson L, López-Ríos F, Ninane V, Olszewski W, Popper H, Jaume S, Schnabel P, Thiberville L, Laenger

- F (2012). The challenge of NSCC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer*. 76: 1-18.
178. Tomaszewski JF, Cagle PT, Carol FF, Armando E (2008). Nonneoplastic Lung Disease. In: Dail and Hammar's Pulmonary Pathology. New York, NY: Springer New York. 20-131.
179. Torigoe H, Shien K, Takeda T, Yoshioka T, Namba K, Sato H, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Sakaguchi M, Tomida S, Tsukuda K, Miyoshi S, Toyooka S (2018). Therapeutic strategies for afatinib-resistant lung cancer harboring HER2 alterations. *Cancer Sci*. 109: 1493-1502.
180. Tozuka T, Seike M, Minegishi Y, Kitagawa S, Kato T, Takano N, Hisakane K, Takahashi S, Kobayashi K, Kashiwada T, Sugano T, Takeuchi S, Kunugi S, Noro R, Saito Y, Kubota K, Gemma A (2018). Pembrolizumab and salvage chemotherapy in EGFR T790M-positive non-small-cell lung cancer with high PD-L1 expression. *Onco Targets Ther*. 11: 5601-5605.
181. Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson G (2015). Tumor of the lung. In: WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon, France. 1-150.
182. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. WHO Panel. *J Thorac Oncol*. 10: 1243-1260.
183. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E, in Collaboration with L.H. Sobin and Pathologists from 14 countries (1999). Malignant. In: WHO Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours. 3rd eds. Springer Verlag Berlin. Heidelberg. New York. 1-46.
184. Tsuta K, Raso MG, Kalhor N, Liu DD, Wistuba II, Moran CA (2011). Histologic features of low- and intermediate-grade neuroendocrine carcinoma (typical and atypical carcinoid tumors) of the lung. *Lung Cancer*. 71: 34-41.
185. Tufman A, Leuchte H, von Wulffen W, Behr J, Huber RM, Neurohr C, Müller-Lisse UG, Scheidhauer K, Winter H (2017). Diagnostik des Lungenkarzinoms. In: Manuel Tumoren der Lunge und des Mediastinum. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München. 19-28.

## Literaturverzeichnis

186. Ueno T, Linder S, Na CL, Rice WR, Johansson J, Weaver TE (2004). Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *J Biol Chem.* 279: 16178-16184.
187. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF (2017). CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol.* 8: 892.
188. Walters S, Maringe C, Coleman MP, Peake MD, Butler J, Young N, Bergström S, Hanna L, Jakobsen E, Kölbeck K, Sundström S, Engholm G, Gavin A, Gjerstorff ML, Hatcher J, Johannesen TB, Linklater KM, McGahan CE, Steward J, Tracey E, Turner D, Richards MA, Rachet B (2013). Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. ICBP Module 1 Working Group. *Thorax.* 68: 551-564.
189. Wang DC, Wang W, Zhu B, and Wang X (2018). Lung cancer heterogeneity and new strategies for drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 58: 531-546.
190. Wang LC, Wang L, Kwauk S, Woo JA, Wu LQ, Zhu H, Zhan LZ, Sun NL, Zhang L (2011). Analysis on the clinical features of 22 basaloid squamous cell carcinoma of the lung. *J Cardiothorac Surg.* 6: 10.
191. Warth A, Muley T, Herpel E, Meister M, Herth FJ, Schirmacher P, Weichert W, Hoffmann H, Schnabel PA (2012). Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology.* 61: 1017-1025.
192. Wasser B (2004). Identifizierung und Charakterisierung einer tumorentitätsspezifisch überexprimierten Proteinisoform eines bisher unbekanntes Gens. *Naturwis. Diss. Heidelberg.* 1-133.
193. Weissferdt A, Kalhor N, Rodriguez Canales J, Fujimoto J, Wistuba II, Moran CA (2017). Spindle cell and pleomorphic ("sarcomatoid") carcinomas of the lung: an immunohistochemical analysis of 86 cases. *Hum Pathol.* 59: 1-9.
194. Welker L (1989). Das periphere Adenokarzinom der Lunge. Beitrag zur Morphologie, Dignität und Prognose. *Med. Diss. Erfurt.* 1-89.
195. Welker L, Jörres RA, Costabel U, Magnussen H (2004). Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J.* 24: 1000-1006.

## Literaturverzeichnis

196. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J (2012). Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 136: 155-162.
197. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE (1986). Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 3500-3504.
198. Wittekind C (2010). TNM Klassifikation maligner Tumoren. Buch 8th eds. Vol. 7. Weinheim, Wiley-VCH.
199. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, Aokage K, Yanagi S, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A (2010). Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: Tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol.* 5: 1361-1368.
200. Yan YF, Zheng YF, Ming PP, Deng XX, Ge W, Wu YG (2019). Immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: current status and future directions. *Brief Funct Genomics.* 18: 147-156.
201. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 2: 305-316.
202. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, Geisinger KR, Noguchi M, Chirieac LR, Bolting J, Chung JH, Chou TY, Chen G, Poleri C, Lopez-Rios F, Papotti M, Sholl LM, Roden AC, Travis WD, Hirsch FR, Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Wistuba I, Moreira AL (2019). Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 14:377-407.
203. Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F (2018). Immune checkpoint inhibitors (ICIs) in non-small cell lung cancer (NSCC). *J UOEH.* 40: 173-189.
204. Yoo MH, Hatfield DL (2008). The cancer stem cell theory: is it correct? *Mol Cells.* 26: 514-516.
205. Yu L, Lu Y, Yao Y, Liu Y, Wang Y, Lai Q, Zhang R, Li W, Wang R, Fu Y, Tao Y, Yi S, Gou L, Chen L, Yang J (2017). Promiximab-duocarmycin, a new CD56 antibody-drug conjugates, is highly efficacious in small cell lung cancer xenograft models. *Oncotarget.* 9: 5197-5207.

## Literaturverzeichnis

206. Zakowski MF, Rekhtman N, Auger M, Booth CN, Crothers B, Ghofrani M, Barkan, GA (2016). Morphologic accuracy in differentiating primary lung adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in cytology specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 140: 1116-1120.
207. Zhang L, Li Y, Zhang S, Gao C, Nie K, Ji Y. (2018). Primary resistance to crizotinib treatment in a non-small cell lung cancer patient with an EML4-ALK rearrangement: a case report. *Cancer Biol Med.* 15: 178-181.
208. Zhang P, Han YP, Huang L, Li Q, Ma D L (2010). Value of napsin A and thyroid transcription factor-1 in the identification of primary lung adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 1: 899-903.
209. Zhao B, Zhang W, Yu D, Xu J, Wei Y (2018). Erlotinib in combination with bevacizumab has potential benefit in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Lung Cancer.* 122: 10-21.
210. Zhao W, Wang H, Peng Y, Peng Y, Tian B, Peng L, Zhang DC (2014). DeltaNp63, CK5/6, TTF-1 and napsin A, a reliable panel to subtype non-small cell lung cancer in biopsy specimens. *Int J Clin Exp Pathol.* 7: 4247-4253.
211. Zhao ZM, Liu SC, Xu XJ, Zhang ZF, Nie KK, Ji YX (2018). Treatment of skin reaction induced by nivolumab combined with radiotherapy in non-small cell lung cancer: A Case Report. *Chin Med Sci J.* 33: 183-187.
212. Zieher H (2007). Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren der Angiogenese und Ionisierender Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten solider Tumoren in vivo. *Veterinärmed. Diss. Gießen.* 5-126.
213. Zimmermann S, Solange P, Owinokoko T, and Gadgeel SM (2018). Immune Checkpoint Inhibitors in the Management of Lung Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 38: 682-695.
214. Ziogas DC, Tsiara A, Tsironis G, Lykka M, Liontos M, Bamias A, Dimopoulos MA (2018). Treating ALK-positive non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med.* 6: 141.
215. Zusman-Harach S B, Harach HR, Gibbs AR (1991). Cytological features of non-small cell carcinomas of the lung in fine needle aspirates. *J Clin Pathol.* 44: 997-1002.

## 9. Anhänge



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
PD Dr. med. Welker  
Zytologisches Labor  
LungenClinic Großhansdorf  
Wöhrendamm 80  
**22927 Großhansdorf**

### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Geschäftsstelle:  
Frau Dr. A. Hüppe  
Tel.: +49 451 500 51217  
ethikkommission@uni-luebeck.de

**Aktenzeichen: 17-144**

Datum: 02. Mai 2017

### **Anzeige einer retrospektiven Datenanalyse, Ihr Schireben vom 18.04.2017**

**Titel: Diagnostik des Lungenkarzinoms – Immunzytochemische Befunde**

Sehr geehrter Herr Welker,

unter der Voraussetzung, dass die in die retrospektiven Analyse einbezogenen Befunde vor Auswertung anonymisiert - und nicht wie im Studienprotokoll (Version 1 vom 12.04.2017) vermerkt nur pseudonymisiert - werden, äußert die Kommission keine Bedenken gegen das Studienvorhaben.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Alexander Katalinic  
Vorsitzender

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Lutz Welker für die zahlreichen Ideen, jahrelange, selbstlose, intensive und engagierte Unterstützung, für stets freundliche und hilfsbereite Betreuung während der gesamten Zeit. Seine aufmunternden Worte waren mir eine große Hilfe in der Bewältigung so mancher Probleme.

Nicht zuletzt mein tiefer und aufrichtiger Dank all den lieben und wertvollen Menschen, die auf ihre Weise einen wichtigen Beitrag geleistet haben, insbesondere Luise Welker, Jana Krützmann und Prof. Dr. Binnur Önal.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Oberarzt Dr. Stellmacher des Leibniz-Forschungszentrum Borstels bedanken, der zur Umsetzung der Untersuchungen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Zytologischen Labors der LungenClinic Großhansdorf Frau Dagmar Berndt, Frau Felicitas Herfert und Frau Lea I.S. van der Linde. Von Herzen möchte ich meiner ganzen Familie, vor allem meinen Großeltern, für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Yasin Elmas, der diese Arbeit zugewandt und mit besonderem Verständnis für alle damit verbundenen Probleme begleitet hat und dabei nie von meiner Seite gewichen ist.

## 11. Lebenslauf

### Personliche Daten:

Name: Hatice Elmas  
Geburtsdatum: 03.05.1985  
Geburtsort: Malatya/Türkei



1999 - 2003 Elbistan Anadolu Gymnasium, Elbistan- Türkei  
2003 - 2008 BSc in Biologie, Cukurova Universität, Adana - Türkei  
2006 - 2007 Gaststudentin (Erasmus), Ruhr Universität, Bochum -  
Deutschland  
2008 - 2011 MSc in Mikrobiologie, Afyon Kocatepe Universität (AKÜ)  
Medizinische Fakultät, Türkei

### Berufserfahrungen:

2008 - 2009 Biologin, Medizinische Mikrobiologie, AKÜ, Afyon - Türkei  
2009 - 2011 Biologin, MRL A.S., Mersin – Türkei  
2011 - 2012 Freiwilligendienst, BHH Sozialkontor gGmbH, Hamburg-  
Deutschland  
2012 - heute MTA, LungenClinic Grosshansdorf, Großhansdorf-  
Deutschland

### Promotion (vorliegend):

Thema: „Einfluss immunzyto-/-histochemischer Analysen auf Typisierung und Subtypisierung von Lungenkarzinomen“ seit 05/2017

### Präsentationen:

Elmas H (2016). Die Haupttypen des Lungenkarzinoms - Beitrag der Immunzytochemie zur Sicherheit der zytologischen Typisierung, Hallesches seminar clinical cytology in pneumology. Halle - Germany.

Welker L, Elmas H, Stellmacher F, Bianco CH (2017). Malignant mesothelioma - a diagnostic challenge. 27. National Pathology Congress Antalya - Turkey.

## Lebenslauf

Elmas H, Diel R, Rabe KF, Stellmacher F, Welker L (2017). Lung cancer typing - contribution of immunocytochemistry to the safety of cytological examination. 27. National Pathology Congress Antalya - Turkey.

Welker L, van der Linde LIS, Elmas H, Stellmacher F, Önal B, Rabe KF (2019). Zytologische Diagnostik maligner Mesotheliome. 31. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zytologie und Kölner Zytologietage. Köln - Germany.

Elmas H, Diel R, Rabe KF, Stellmacher F, Reck M, Welker L (2019). Lung cancer typing on small biopsies and cytology-Contribution of immunocytochemical analysis. ECC - Malmö - Sweden.

L. Welker, Elmas H, (2019). Typisierung von Lungenkrebs anhand kleiner Proben und der Zytologie - Beitrag der Immunzytochemie, Hallesches seminar clinical cytology in pneumology. Halle - Germany.

### Poster:

Elmas H, Diel R, Rabe KF, Stellmacher F, Welker L (2018). Beitrag der Immunzytochemie zur Sicherheit der zytologischen Typisierung von Lungenkarzinomen. 59. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Dresden. P423.

Elmas H, Wagner P, Rabe KF, Welker L (2019) Differenzialdiagnostik benigner Pleuraergüsse. 60. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. München. P504.

### Publikationen:

Welker L, Elmas H, Stellmacher F, Bianco CH (2017). Malignant mesothelioma - a diagnostic challenge, Verh. Dtsch. Ges. Zyt. 20-26.

Elmas H, Lammers M, Welker L (2018). Immunocytochemical Diagnosis: Selection of Proper Antibodies and Technical Application. Önal B, ed. Sitopatoloji. ISBN: 9786057505705. Ankara: Türkiye Klinikleri. 94-104.

Elmas H, Önal B, Welker L (2019). Cytological sampling, laboratory preparation and staining method: Cytological sampling, laboratory preparation. Önal B, ed. Techniques in cytopathology from basic to Molecular. ISBN: 9786057578068. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 45-73.

Elmas H, van der Linde LIS, Coskun S (2019). Cytological sampling, laboratory preparation and staining method: Staining method. Önal B, ed. Techniques in cytopathology from basic to Molecular. ISBN: 9786057578068. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 75-93.

## Lebenslauf

Elmas H, Schaleschak J, Önal B (2019). Immunocytochemistry. Önal B, ed. Techniques in cytopathology from basic to Molecular. ISBN: 9786057578068. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 116-126.

Elmas H, Gamsizkan M, Önal B (2019). Cell block preparation methods and advanced techniques. Önal B, ed. Techniques in cytopathology from basic to Molecular. ISBN: 9786057578068. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 130-145.

Siebolts U, Elmas H, Wickenhauser C (2019). Molecular diagnosis in liquid biopsy: Technical features of liquid biopsy. Önal B, ed Techniques in cytopathology from basic to Molecular. ISBN: 9786057578068. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.244-251.

Elmas H, Stellmacher F, Welker L (2019). Immunzytochemische Diagnostik (1) - Auswahl geeigneter Antikörper und technische Durchführung. MTA Dialog. 20(5): 414-417.

Elmas H, Stellmacher F, Welker L (2019). Immunzytochemische Diagnostik (2) - Auswahl geeigneter Antikörper und technische Durchführung. MTA Dialog. 20(6): 512-515.

Welker L, van der Linde LIS, Elmas H, Stellmacher F, Önal B, Rabe KF (2019). Malignes Mesotheliom: Vor- und Nachteile der zytologischen Untersuchung von Ergüssen. Atemwegs- und Lungenkrankheiten (In Druck).

