

Der diagnostische Stellenwert der MIB-1- und PCNA - Immunhistometrie
in der Differentialdiagnostik follikulärer Schilddrüsentumoren

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Silke Eichler

aus

München

Berichter: Herr Professor
Dr.med. Stefan Biesterfeld

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Christian Mittermayer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	S. 1
1.1	Diagnostische Abklärung knotiger Veränderungen der Schilddrüse	S. 1
1.2	Follikuläre Tumoren der Schilddrüse	S. 5
1.2.1	Follikuläre Schilddrüsenadenome	S. 5
1.2.2	Follikuläre Schilddrüsenkarzinome	S. 7
1.3	Differentialdiagnostik follikulärer Adenome und follikulärer Karzinome der Schilddrüse durch morphologische und molekulare Methoden	S. 10
1.4	Problemstellung	S. 18
2.	Proliferationsmarker	S. 19
2.1	PCNA	S. 19
2.2	MIB-1	S. 20
3	Material und Methode	S. 23
3.1	Material	S. 23
3.2	Materialvorbereitung	S. 23
3.2.1	MIB-1-Färbung/PCNA-Färbung	S. 24
3.2.2	Anhang zur Färbanleitung	S. 26
3.3	Der CM-2-Bildzytometer	S. 27
3.3.1	Bildanalyse	S. 28
3.3.2	Messung der Präparate	S. 39
3.3.3	Auswertung der Meßergebnisse	S. 30
3.4	Statistische Untersuchungen	S. 31
4	Ergebnisse	S. 32
4.1	Korrelation zwischen flächen- und kernzahlbezogenen Parametern	S. 32
4.1.1	Korrelation zwischen der kernzahl- und flächenbezogenen Mittelwertbestimmung	S. 34
4.1.2	Korrelation zwischen der kernzahl- und flächenbezogenen Maximalwertbestimmung	S. 35
4.1.3	Korrelation der flächenbezogenen Mittel- und Maximalwerte	S. 36
4.1.4	Korrelation der kernzahlbezogenen Mittel- und Maximalwerte	S. 37
4.2	Korrelation zwischen flächen- und kernzahlbezogener MIB-1- und PCNA-Expression	S. 38

4.2.1	Korrelation der kernzahlbezogenen Mittelwerte von MIB-1 und PCNA	S. 39
4.2.2	Korrelation der flächenbezogenen Mittelwerte von MIB-1 und PCNA	S. 40
4.3	Verteilung der MIB-1- und PCNA Expression bei normalen Schilddrüsengewebe, follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen	S. 41
4.4	Diagnostische Dateninterpretation zur Differenzierung zwischen follikulären Adenomen und Karzinomen sowie zwischen normalen Schilddrüsenparenchym und Tumoren der Schilddrüse	S. 44
4.4.1	MIB-1 _{mean}	S. 44
4.4.2	MIB-1 _{max}	S. 47
4.4.3	PCNA _{mean}	S. 49
4.4.4	PCNA _{max}	S. 52
5	Diskussion	S. 55
5.1	Standards in der makroskopischen und histologischen Aufarbeitung von Schilddrüsenresektaten	S. 55
5.2	Relevanz ergänzender molekularer und morphologischer Untersuchungsmethoden	S. 59
5.2.1	Molekularbiologische Anwendung und Bestimmung von Differenzierungsmarkern	S. 59
5.2.2	Untersuchungen zur DNA-Zytometrie	S. 60
5.2.3	Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose	S. 61
5.3	Resumée	S. 69
6.	Zusammenfassung	S. 71
7.	Datenanhang	S. 73
8.	Literaturverzeichnis	S. 78

für meine Eltern

1. Einleitung

1.1 Diagnostische Abklärung knotiger Veränderungen in der Schilddrüse

Vergrößerungen der Schilddrüse stellen in Mitteleuropa, besonders in endemischen Jodmangelgebieten, ein häufiges Ereignis dar. Da eine Schilddrüsenvergrößerung auf ganz verschiedene Krankheiten zurückgehen kann, wird sie stets als eine Indikation zur weiterführenden Abklärung durch bildgebende, funktionelle und/oder morphologische Untersuchungen angesehen.

Neben der Bestimmung des Schilddrüsenhormonstatus (basaler TSH-Test, fT₄-Bestimmung) ist die Sonographie obligater Bestandteil der Basisdiagnostik. Mit ihrer Hilfe werden Form, Lage und Größe der Schilddrüse beurteilt. Anatomische Details können mit dieser Methode besser dargestellt werden als durch Schilddrüsenszintigraphie (Solbiati et al. 1985). Insbesondere bietet die Sonographie die Möglichkeit, zwischen homogenen und inhomogenen, knotigen Veränderungen zu unterscheiden. Zum anderen ist es in Grenzen auch möglich, Inhomogenitäten zu differenzieren, z.B. in der Unterscheidung zwischen zystischen und soliden Raumforderungen.

Innerhalb der Gruppe der soliden Raumforderungen stellen die follikulären Schilddrüsentumoren einen erheblichen Anteil. Mikrofollikuläre Adenome erscheinen sonographisch oft echoarm, makrofollikuläre Adenome hingegen sind im Vergleich zum umgebenden Schilddrüsengewebe echogleich mit umgebendem echoarmen Randsaum oder echoreich. Dopplersonographisch weisen Adenome eine verstärkte Perfusion im Randbereich oder in der Peripherie auf. Auch wenn sonographisch keine eindeutige Dignitätszuordnung möglich ist, deuten Läsionen mit unscharfer Begrenzung und inhomogener Binnenstruktur, solitäre echoarme Läsionen, zentrale Vaskularisation in der Dopplersonographie und vergrößerte regionale

Lymphknoten auf einen malignen, infiltrativ wachsenden Prozess hin (Gritzmann et al. 2000).

Als weitere Methode ist die Szintigraphie zu nennen. In der Routinediagnostik kommt radioaktives Technetium (^{99m}Tc -PTT) zum Einsatz. Für spezielle Fragestellungen (retrosternale Struma, ektopes/dystopes Schilddrüsengewebe) wird radioaktives Jod (^{123}J) verwendet. Mit Hilfe der Szintigraphie lassen sich Aussagen über Lage, Form und Größe der Schilddrüse treffen, zusätzlich kann ektopes Schilddrüsengewebe lokalisiert werden. Funktionell unterscheidet man neben diffusen Veränderungen kalte Knoten mit verminderter Nuklidspeicherung, warme Knoten mit normaler Funktion, sowie heiße Knoten (nuklidspeichernder Knoten bei sonst supprimierter Schilddrüse).

Ursachen von kalten Knoten können sowohl Zysten, Blutungen, Entzündungen, Fibrosierungen, Metastasen, hormonell inaktive Adenome, als auch Schilddrüsenkarzinome sein. Im Operationsmaterial sind Knoten, die sich szintigraphisch kalt darstellten, in 15%-40% follikuläre Adenome, in 42%-77% nicht-neoplastische Strumaknoten und in 3%-12% Schilddrüsenkarzinome (Brown 1981, Riccabona 1987, Rojeski und Gharis 1985). Die häufigste Ursache eines heißen Knotens ist ein dekompenziertes autonomes Adenom der Schilddrüse. Jedoch auch bei Patienten mit einem heißen Knoten im Schilddrüsenszintigramm konnten in einigen Fällen Schilddrüsenkarzinome nachgewiesen werden (Hoving et al. 1981, Hayes et al. 1996).

Sonographische und szintigraphische Herdbefunde müssen miteinander verglichen werden. Jeder solide Knoten über 1 cm Durchmesser ist eine Indikation zur Szintigraphie. Kalte Knoten, insbesondere solche die sonographisch echoarm erscheinen, sollten punktionszytologisch abgeklärt werden. Stanzbiopsien, wie sie z.B. in Italien vorgenommen werden, sind

in Deutschland wegen des Blutungsrisikos unüblich bzw. sogar ungebrauchlich.

Bei der Feinnadelaspirationsbiopsie wird mit einer dünnen Nadel (Durchmesser 0,6 mm - 0,8 mm) durch ein Saugbiopsieverfahren Gewebe zur zytologischen Untersuchung gewonnen. Die Methode ist bei erfahrenen Zytologen geeignet, Aussagen über eine Entzündung der Schilddrüse, das Vorliegen einer Zyste, einer Struma oder auch eines papillären Schilddrüsenkarzinoms zu treffen. Ein Problem liegt allerdings systemimmanent in der Abgrenzung zellreicher Strumaknoten von follikulären Adenomen und von differenzierten follikulären Karzinomen, da sich das Zellbild hier weitestgehend gleicht (Gharib et al. 1984, Block et al. 1983).

Die Magnetresonanztomographie und Computertomographie finden, insbesondere bei sehr großen Strumen z.B. mit Ausdehnung ins Mediastinum, welche sonographisch schwer zu erfassen sind, Einsatz. Bei malignen Schilddrüsentumoren können der angrenzende Larynx, die Trachea und eine eventuelle Gefäßinvasion beurteilt werden. In der Schilddrüse können Verkalkungen (besser im CT darstellbar), zystische Formationen, Nekrosen, Einblutungen, extraglanduläres Wachstum und Lymphknotenmetastasen erfaßt werden. Malignitätsverdächtig sind Läsionen mit schlechter Abgrenzbarkeit im Randbereich, offenbar organüberschreitendem Wachstum, Lymphknotenbeteiligung, Infiltration des Larynx oder der Trachea. Jedoch auch gut abgrenzbare Tumoren schließen Malignität nicht aus. Vorsichtig sollte der Einsatz jodhaltiger Kontrastmittel in der Computertomographie erfolgen, da eine Schilddrüsenszintigraphie in den nachfolgenden 4-8 Wochen nicht durchgeführt werden kann (Weber et al. 2000).

Oftmals wird man sich letztendlich unter Würdigung aller klinischer, laborchemischer, bildgebender und zytologischer Befunde zu einem operativen Eingriff entschließen, um sicheren Aufschluß über den biologischen Cha-

rakter der Raumforderung zu erhalten. Eine großzügige OP-Indikation kalter Knoten besteht dabei bei jungen Patienten, insbesondere Männern mit Solitärknoten, schnellem Wachstum des Knotens, vorangegangener Bestrahlung des Halses oder vergrößerten Lymphknoten im kaudalen Halsbereich (Delorme und Hoffner 2003).

Auch wenn sich in einer Reihe von Fällen die entnommenen Knoten letztendlich als hyperplastische oder regressiv veränderte Strumaknoten erpuppen, so bleibt trotzdem von entscheidender Relevanz, die klinisch besonders wichtige Diagnose eines malignen Tumors zu stellen. Schilddrüsenkarzinome sind insgesamt nicht selten, sie stellen die häufigsten endokrinen Neoplasien mit einer jährlichen Inzidenz von 4,1 Neuerkrankungen je 100.000 Menschen (Schmid und Böcker 1997) dar. Den größten Anteil daran haben die differenzierten Schilddrüsenkarzinome, die aufgrund ihres unterschiedlichen klinischen Verhaltens in follikuläre und papilläre Karzinome unterteilt werden.

Während die papillären Schilddrüsenkarzinome offenbar de novo entstehen und für sie kein gutartiger gleichartiger Tumor, etwa ein „papilläres Schilddrüsenadenom“, definiert ist, gehen follikuläre Schilddrüsenkarzinome üblicherweise aus follikulären Schilddrüsenadenomen hervor. Somit ist verständlich, daß der in dieser Arbeit untersuchten Differentialdiagnostik zwischen diesen beiden follikulären Tumorformen eine besondere Bedeutung zukommt.

Im folgenden sollen daher zunächst die epidemiologischen, klinischen und morphologischen Charakteristika der follikulären Tumoren der Schilddrüse dargestellt werden; danach werden bisherige Überlegungen zur exakteren Differentialdiagnostik vorgestellt.

1.2 Follikuläre Tumoren der Schilddrüse

Von der WHO (Hedinger et al. 1988) werden diejenigen differenzierten Tumoren der Schilddrüse als follikulär definiert, die

- von Thyreozyten ausgehen,
- follikulär aufgebaut sind
- und nicht die histologischen oder zytologischen Kriterien papillärer Schilddrüsenkarzinome erfüllen (s.u.).

Die Vorgabe, daß die follikulären Tumoren der Schilddrüse vom Schilddrüsenepithel selber ausgehen müssen, schließt die von den C-Zellen abstammenden medullären Karzinome, die durchaus follikulär aufgebaut sein können, aus dieser Gruppe aus.

1.2.1 Follikuläre Schilddrüsenadenome

Das follikuläre Adenom ist die häufigste Neoplasie der Schilddrüse. Es ist ein gutartiger, von einer Kapsel umschlossener Tumor, der vom Follikel-epithel ausgeht. Follikuläre Adenome können einzeln oder multipel auftreten. Bei Obduktionen finden sie sich in den untersuchten Schilddrüsen zu 3% bis 20% Adenome (Rosai et al. 1992, Doniach 1978). Bevorzugt betroffene Patienten sind Frauen im mittleren Lebensalter. Mikroskopisch lassen sich normofollikuläre (einfache), makrofollikuläre (kolloidale), mikrofollikuläre (fetale) und trabekuläre (embryonale) Adenome unterscheiden (Rosai 1996). Es gibt Korrelationen zwischen dem mikroskopischen Erscheinungsbild und der Aktivitätsanreicherung bei der Szintigraphie (Campbell et al. 1973). Häufig finden sich regressive Veränderungen wie Nekrosen, Vernarbungen, Einblutungen, Zysten oder Verkalkungen (Schmid et al. 1996).

Immunhistochemisch konnte die Expression von Keratin und Thyreoglobulin im Zytoplasma sowie Laminin an den Follikeln nachgewiesen werden (Miettinen und Virtanen 1984). Außerdem exprimieren sie den im Zellkern

immunhistochemisch nachweisbaren Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) (Kato et al. 2000).

Follikuläre Adenome sind klonalen Ursprungs (Namba et al. 1990). Punktmutationen konnten in den drei Proto-Onkogenen Hras, K-ras und N-ras sowohl bei follikulären Adenomen als auch bei follikulären Karzinomen nachgewiesen werden und dienen somit nicht zur Differenzierung der beiden Tumoren. Da die ras-Aktivierung sowohl in benignen, als auch in malignen Schilddrüsenneoplasien zu finden ist, stellt sie offenbar ein frühes Ereignis in der Tumorgenese dar (Lemoine et al. 1989, Namba et al. 1990). In einer Arbeit konnte gezeigt werden, daß die terminale Region des langen Arm des Chromosom 19 eine Bedeutung für die Entstehung eines follikulären Adenoms zu haben scheint (Dal Cin et al. 1992).

Differentialdiagnostisch muß bei einem follikulären Adenom an eine noduläre Hyperplasie, ein follikuläres Karzinom, insbesondere an ein minimal invasives follikuläres Karzinom, oder die follikuläre Variante des papillären Karzinoms gedacht werden. Gerade bei der Abgrenzung gegenüber dem minimal invasiven Karzinom bestehen große Probleme. Li Volsi (1990), Schmid und Böcker (1997) und Franssila et al. (1985) definierten als entscheidende Malignitätskriterien den Einbruch des Tumors in ein Gefäßlumen und/oder den Durchbruch der Kapsel (s.u.).

Adenome werden bei fehlendem Nachweis von Gefäß- und/oder Kapselinvasion als typische Adenome bezeichnet, welche weder rezidivieren noch metastasieren (Lang et al. 1980). Daneben existiert der Begriff des atypischen Adenoms, dessen Hauptunterscheidungsmerkmal in Abgrenzung zum typischen Adenom in der erhöhten proliferativen Aktivität liegt. Weitere diagnostische Kriterien sind eine erhöhte Zellulärität, erhöhte Kerngröße und eine gestörte Architektur. Daneben können fakultativ eine fragliche Kapselinvasion (z.B. Aufsplitterung der Kapsel) oder eine fragli-

che Gefäßinvasion (z.B. isolierte zelluläre Aggregate im Gefäßlumen) nachweisbar sein. Die Abgrenzung zum minimal invasiven Karzinom ist auch hier besonders schwierig (Lang et al. 1980).

Werden in einem Schilddrüsenresektat zweifelsfreie follikuläre Adenome gefunden, so ergibt sich hieraus keine weiterführende therapeutische Konsequenz.

1.2.2 Follikuläre Schilddrüsenkarzinome

Der Begriff des follikulären Schilddrüsenkarzinoms umfaßt die von den Thyreozyten ausgehenden malignen Tumoren mit follikulärer Zelldifferenzierung, die keine histologischen (Papillen) und keine zytologischen (Milchglaskerne) Merkmale des papillären Karzinoms aufweisen. Es handelt sich somit in der Abgrenzung zu den papillären Karzinomen um eine „Negativdefinition“, die der Tatsache Rechnung trägt, daß es zytologisch eindeutig papilläre Karzinome gibt, die einen reinen follikulären Wachstumstyp aufweisen. Die exakte Abgrenzung beider Karzinomentitäten ist wichtig, weil follikuläre Karzinome eine hämatogenen Metastasierungsweg nehmen, während papilläre Karzinome vornehmlich lymphatisch in die Halslymphknoten metastasieren; die papillären Karzinome vom follikulären Wachstumstyp, auch Lindsay-Tumor genannt, verhalten sich hierbei wie andere papilläre Karzinome auch.

Makroskopisch sind die follikulären Karzinome zumindest teilweise von einer Kapsel umgeben und verfügen über eine rötliche glasige, zum Teil auch grau-weiße Schnittfläche. Mikroskopisch zeigen sie ein variables Erscheinungsbild, welches gut ausgebildete Follikel, schlecht differenzierte Follikel, kribriforme Areale oder eine trabekuläre Anordnung beeinhaltet kann (Rosai 1996). Die Kerne sind normo- oder hyperchromatisch (Fransila et al. 1985). Diese histologischen Kriterien reichen zur Unterscheidung

gegenüber einem follikulären Adenom aber nicht aus. Vielmehr muß der Nachweis einer Kapsel- oder Gefäßinvasion erbracht werden; in Abhängigkeit vom Ausmaß der Invasion werden mikroinvasive von grob invasiven Karzinomen unterschieden.

- Minimal invasive follikuläre Karzinome

Diese Tumoren, die 37% bis 50% der follikulären Karzinome ausmachen (Schmid et al. 1996, Schröder 1988), sind meistens vollständig von einer Kapsel umgeben. Die Kapsel ist oft dicker und unregelmäßiger als die von Adenomen (Evans 1984). Das mikroskopische Wachstumsmuster hat häufig Ähnlichkeit mit embryonalen, fetalen oder atypischen Adenomen.

Der Nachweis der Invasion von Blutgefäßen sollte bei Gefäßen von venösem Kaliber erfolgen. Diese sollten sich in oder direkt außerhalb der Kapsel befinden. In den Gefäßen sollten ein oder mehrere Tumorzellnester an der Wand anhaften und sich in das Lumen vorwölben.

Das Kriterium des Kapseldurchbruchs ist nur bei Unterbrechung der kompletten Breite der Kapsel anzuwenden. Der Nachweis eines Einbruchs in die innere Hälfte der Kapsel, oder das Vorhandensein von Tumorzellen innerhalb der Kapsel sind diagnostisch nicht ausreichend für ein Karzinom. Der Tumor breitet sich nach Durchbruch der Kapsel häufig pilzförmig in das umliegende Gewebe aus und kann eine zweite ihn umgebende Kapsel bilden (nach Rosai 1996).

- Grob invasive follikuläre Karzinome

Diese Tumorform ist gekennzeichnet durch multiple Infiltrationen in Blutgefäße und/oder Wachstum in das umliegende Schilddrüsengewebe. Eine umgebende Tumorkapsel fehlt häufig oder ist nur noch unvollständig.

Die Unterscheidung bei Subtypen des follikulären Karzinoms ist sinnvoll, da hämatogene Metastasen beim grob invasiven Karzinom gehäuft auftreten. Hingegen lassen sich bei der minimal invasiven Form mit Gefäßinvasion in weniger als 5% und bei Karzinomen, die nur nach minimaler Kapselinvasion diagnostiziert werden, in weniger als 1% Metastasen nachweisen (Cady et al. 1985, Iida 1977, Lang et al. 1986).

Die Therapie des follikulären Schilddrüsenkarzinoms besteht in der totalen Thyroidektomie mit zentraler Lymphknotendissektion. Dabei werden die perithyroidalen, prälaryngealen und prätrachealen isthmusnahen Lymphknoten entfernt. Bei palpablen oder sonographisch verdächtig lateralen Halslymphknoten erfolgt des weiteren eine ipsilaterale, gegebenenfalls auch kontralaterale Dissektion der lateralen Halslymphknoten.

Anschließend an die totale Thyroidektomie wird eine Radiojodtherapie mit ¹³¹Jod zur Ablation von eventuell vorhandenem Restschilddrüsengewebe und zum Nachweis speichernder Lymphknoten- und Fernmetastasen und deren Behandlung durchgeführt. Nach der Radiojodbehandlung wird lebenslang eine Levothyroxinmedikation in TSH-suppressiver Dosierung eingeleitet. Zur Nachsorge sollte risikoorientiert zunächst halbjährlich, nach 5 Jahren jährlich eine Halssonographie sowie die Bestimmung des Thyreoglobulinspiegels und der Thyreoglobulinantikörper erfolgen. Eine ¹³¹Jod-Ganzkörperszintigraphie sollte 3-4 Monate nach Radiojodtherapie sowie ein Jahr danach erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft 2002).

Die Prognose differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist im allgemeinen, bezogen auf andere maligne Tumorentitäten, im wesentlichen gut; die altersbereinigte relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt im 626 Patienten umfassenden Kollektiv des Tumorregisters München (Hölzel 1996) bei 80%, die relative 10-Jahres-Überlebensrate bei 76%. Im besonderen hängt die Prognose wie bei fast allen anderen Tumorentitäten auch besonders stark vom Tumorstadium ab; für Schilddrüsenkarzinome in den Stadien T1N0

bis T3N0 liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 96% bis 100% und entspricht somit einer normalen Lebenserwartung; ähnlich verhält es sich mit den für T1N0 und T2N0 vorliegenden Daten zur relativen 10-Jahres-Überlebensrate (jeweils 95%). Fortgeschrittene Lymphknotenmetastasierung oder das Vorliegen von Fernmetastasen bei Diagnosestellung bedingen eine wesentlich schlechtere Prognose. Im Vergleich zu den papillären Schilddrüsenkarzinomen (relative 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate von 94% bzw. 93%) schneiden die follikulären schlechter ab (88% bzw. 78%), wahrscheinlich wegen ihrer Neigung zur späteren Entwicklung von Fernmetastasen. Andere Arbeitsgruppen geben für die Prognose der minimal invasiven follikulären Karzinome eine 10-Jahres-Überlebensrate von über 90% an, so daß dieser Tumortyp sich günstiger als das grob invasive Karzinom verhält; als bedeutsam wurde hier das Ausmaß der Operationsradikalität angegeben (Schmid et al. 1996). Die grob invasiven follikulären Karzinome haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von circa 50% eine schlechtere Prognose (Schröder 1988, Woolner 1971).

Anerkannte Faktoren von ungünstiger prognostischer Bedeutung sind darüber hinaus ein Alter über 50 Jahre bei Diagnosestellung, vaskuläre Tumordinvasion, Einbruch in das umliegende Gewebe und das Vorliegen von Fernmetastasen bei Diagnosestellung (Brennan et al. 1991). Auch ausgeprägte Zellatypien waren in einer Studie ein unabhängiger prognostischer Faktor (Tennvall et al. 1985).

1.3 Differentialdiagnostik follikulärer Adenome und follikulärer Karzinome durch morphologische und molekulare Methoden

In den vergangenen Jahren wurde mit verschiedenen Methoden versucht, eine Verbesserung der Differentialdiagnostik zwischen beiden Tumorentitäten zu erreichen. Im folgenden sollen wesentliche Ergebnisse solcher Arbeiten dargestellt werden. Dabei fällt auf, daß überwiegend Studien mit nur kleinen Kollektiven vorliegen, so daß die Aussagekraft deutlich eingeschränkt sein kann.

Differenzierungseigenschaften

Galectin-3

Der Marker Galectin-3, ein 31 kD schweres β -Galaktosidase-bindendes Lektin, wurde in den vergangenen Jahren als Marker differenzierter Schilddrüsenkarzinome etabliert. Diese zeigen offenbar eine gleichmäßige Expression von Galectin-3, während hyperplastische Knoten und Adenome, wenn sie überhaupt eine Expression zeigen, nur positive Zellcluster, d.h. gruppierte Ansammlungen von positiven Zellen, aufweisen (Coli et al. 2000, Xu et al. 1995, Orlandi et al. 1998, Inohara et al. 1999). Aus einer vergleichenden Literaturübersicht aus dem Jahr 2002 geht hervor, daß die Galectin-3-Expression bei papillären Karzinomen (173/175, 98,9%) am häufigsten ist, gefolgt von follikulären Karzinomen (53/63, 84,1%). Hyperplastische Strumaknoten (9/70, 12,9%) und follikuläre Adenome (22/148, 14,9%) waren in geringerer Zahl positiv (Coli et al. 2000). Aus den Ergebnissen wurde insgesamt geschlossen, daß es sich bei Galectin-3 um einen Marker für maligne Transformation in der Schilddrüse handelte; legt man die oben genannten Ergebnisse (ohne Berücksichtigung etwaiger Informationen aus dem Färbemuster, s.o.) zugrunde, so ergäbe sich für die Unterscheidbarkeit von follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen eine Sensitivität von 84,1% und eine Spezifität von 85,1%. Erste Untersuchungen an präoperativen Feinnadelaspirationen führten zu ähnlichen Ergebnissen (Fernandez et al. 1997, Inohara et al. 1999).

Bedacht werden muß allerdings, daß auch medulläre Karzinome Galectin-3-positiv sein können (7/17, 41,2%) (Coli et al. 2000), so daß eine Markierung mit diesem Marker nicht hilft, zwischen einem Tumor der Thyreozyten oder der C-Zellen zu unterscheiden.

Retinoblastomprotein-Expression

Beim Retinoblastomgen handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen. Der Verlust des immunhistochemischen Nachweis des Genprodukts Rb-1 ist

ein indirekter Indikator für den Verlust des 2. Allels des Gens und somit der Funktion als Tumorsuppressorgen. 96% der Fälle von hyperplastischen Strumaknoten und follikulären Adenomen (51/53) waren Rb-1-positiv, während 82% der verschiedenen untersuchten Typen von Schilddrüsenkarzinomen Rb-1-negativ waren, darunter auch acht von neun follikulären Karzinomen (89%) (Anwar et al. 2000). Folglich wäre mit einer Rb-1-Untersuchung eine Differenzierung zwischen einem hyperplastischen Strumaknoten und einem follikulären Tumor möglich - diesem Vergleich kommt aber klinisch keine entscheidende Bedeutung zu.

Telomerase

Unter dem Telomerasekomplex versteht man einen Ribonucleoprotein-komplex, der eine Telomerase-RNA-Komponente (hTR), ein Telomerase-assoziiertes Protein (TP1) und eine katalytische Telomerase-Untereinheit (hTERT) umfaßt (Hoang-Vu et al. 2002). Der Telomerasekomplex ist in vielen Tumoren und in immortalisierten Zellen aktiviert.

Eine vergleichende Übersicht der bislang erschienenen Arbeiten zeigt allerdings, daß sich Hoffnungen in einen Tumormarker oder einen Marker für Malignität hier nicht erfüllen, da sich sehr heterogene Ergebnisse von Gruppe zu Gruppe zeigen und auch das zusammenfassende Gesamtergebnis keine eindeutigen Auftrennungen erlaubt: Eine erhöhte Telomeraseaktivität war demnach in normalem Schilddrüsengewebe selten (7/180, 3,9%) und trat in steigendem Maße in follikulären Adenomen (28/137, 20,4%), follikulären Karzinomen (52/156, 33,3%) und papillären Karzinomen (109/243, 44,9%) auf (Hoang-Vu et al. 2002). Für die Unterscheidbarkeit von follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen ergäbe sich eine Sensitivität von 33,3% und eine Spezifität von 79,6%.

In einem gemischten Patientenkollektiv aus 24 Fällen maligner und benigner Schilddrüsenveränderungen fanden sich an Feinnadelaspirationsbiopsien allerdings hTERT-basierte positive und negative Voraussagewer-

te für Malignität von 93% bzw. 90% (Zeiger et al. 1999); zu bedenken bleibt hier aber das noch kleine Patientenkollektiv.

Typ-1-Blutgruppenantigene

In einer Studie, die sich vornehmlich mit papillären Schilddrüsenkarzinomen befaßte, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen DU-PAN2, Ca19-9, Le(a) und Le(b) durchgeführt. Während papilläre Karzinome in 33% bis 98% der Fälle mit den Markern positiv reagierten, waren die Kontrollen der 29 follikulären Adenome und der 23 follikulären Karzinome nur in wenigen Fällen positiv (0% - 21%) (Kamoshida et al. 2000).

HBME-1

Der monoklonale Antikörper HBME-1 ist gegen Mikrovilli an der Oberfläche von Mesothelzellen gerichtet, reagiert aber auch mit Zellen von Schilddrüsenkarzinomen, und zwar sowohl an Feinnadelaspiraten, als auch an Paraffinschnitten. Eine Arbeit an 14 Schilddrüsenkarzinomen, darunter fünf follikuläre Karzinome, ergab eine HBME-1-Positivität in vier Fällen (80%); von fünf follikulären Adenomen waren drei positiv (60%). In einer anderen Studie erwiesen sich allerdings alle 40 untersuchten follikulären Adenome als negativ (Cheung et al. 2001).

TTF-2

Nachdem der thyroid-Transkription-Faktor 1 (TTF-1) als wichtiger Marker in der Erkennung einer epithelialen Zellen als zugehörig zur Schilddrüse oder zum respiratorischen Epithel der Bronchialschleimhaut anerkannt ist, wurde 2001 ein weiterer Transkriptionsfaktor, TTF-2, vorgestellt, der als schilddrüsen-spezifisch angenommen wird. Er war in verschiedenen Gruppen von Schilddrüsenerkrankungen unterschiedlich oft exprimiert; die follikulären Adenome waren in 15 von 21 Fällen positiv (71%), die follikulären Karzinome in 8 von 18 Fällen (44%) (Sequeira et al. 2001). Dieser Un-

terschied ist wahrscheinlich zu gering, um differentialdiagnostisch von Nutzen zu sein; das Resultat war im Pearson Chi²-Test überdies nicht signifikant ($p > 0.05$). Darüber hinaus war TTF-2 auch in 18 der 36 Kontrollen von normalem Schilddrüsengewebe positiv (50%).

Proliferation und Apoptose

DNA-Zytometrie

Mit Hilfe der DNA-Zytometrie ist es in der Diagnostik möglich, vor allem am Plattenepithel, z.B. der Cervix uteri oder der Mundhöhle, Aussagen über das Risiko zu treffen, daß sich eine dysplastische Läsion progredient verhalten wird, d.h. zum Karzinom werden wird, oder regressiv sein wird, d.h. sich zurückbilden wird.

In der Unterscheidung von Adenomen und Karzinomen liegen für Läsionen, die aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz hervorgehen wie das Adenom und das Karzinom des Dickdarms, keine guten Erfahrungen vor. Ähnlich verhält es sich auch bei follikulären Schilddrüsentumoren. In einer Zusammenfassung verschiedener fremder und eigener Arbeiten ermittelten Grant et al. (1990) eine nicht-diploide DNA-Stammlinie in 43,1% der follikulären Adenome (143/332) und in 58,5% der follikulären Karzinome (196/335), so daß keine scharfe Trennlinie zwischen benigne und maligne gezogen werden kann; die Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant (Pearson Chi²-Test: $p > 0,05$; eigene Berechnung). Die entsprechenden Werte für Sensitivität und Spezifität betragen 58,5% bzw. 56,9%.

Proliferation

Untersuchungen zur Proliferation wurden vorwiegend immunhistochemisch mit den Antikörpern MIB-1 bzw. PCNA durchgeführt. Eine Übersicht über die Daten zeigt, daß üblicherweise follikuläre Karzinome über höhere Werte als follikuläre Adenome verfügen. Die Datenverteilungen lassen oftmals auch erkennen, daß ein statistisch signifikanter Unterschied vor-

liegen dürfte; diese Annahme gilt aber nicht für alle Arbeiten. Darüber hinaus fällt auf, daß z.B. die Mittelwerte pro untersuchter Krankheitsentität von Gruppe zu Gruppe deutlich schwanken (z.B. MIB-1-Expression follikulärer Adenome: 0,5% bis 4,5%) (Lewy-Trenda und Bienkiewicz 1999, Erickson et al. 1998, Resnick et al. 1998, Yoshida et al. 1999, Katoh et al. 1995).

Außerdem fehlen vielfach Werte zur Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsergebnisse im Hinblick auf ihre diagnostische Trennschärfe. Nur in einer Arbeit an 16 follikulären Adenomen (MIB-1-Expression: $4.1\% \pm 0.6\%$) bzw. 23 follikulären Karzinomen (MIB-1-Expression: $15.3\% \pm 3.1\%$) werden Sensitivität (56.5%) und Spezifität (100%) angegeben (Erickson et al. 1995).

Apoptosequantifizierung

Das sehr komplexe System der Apoptoseregulation ist in den vergangenen Jahren verschiedentlich untersucht worden, vornehmlich mit der TUNEL-Methode; hierbei handelt es sich um eine modifizierte in situ-Hybridisierung, mit der Apoptose anzeigende DNA-Fragmente an Parafinschnitten visualisiert und quantifiziert werden können. Entzündliche Schilddrüsenerkrankungen weisen gegenüber Tumoren und normalem Schilddrüsengewebe erhöhte Werte für die Apoptoserate auf (Übersicht bei: Biesterfeld et al. 2003) . Nur in einer Arbeit wurde die Apoptoserate von 14 follikulären Adenomen ($0.5\% \pm 0.4\%$) mit der von 30 differenzierten, vorwiegend papillären Karzinomen ($0.4\% \pm 0.3\%$) verglichen und erwies sich dabei als etwa gleich hoch (Yoshida et al. 1999).

AgNOR

Die Darstellung argyrophiler Proteine in der Umgebung der Nukleolusorganisierender Regionen (AgNOR) hat sich bei papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen als hilfreich in der Vorhersage eines Tumorrezidivs erwiesen (Kawasaki et al. 2000). Für differentialdiagnostische Ent-

scheidungen zwischen follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen hat sich die AgNOR-Verteilung ebenfalls bewährt. Sie erlaubte eine annähernd vollständige Differenzierung beider Tumorentitäten in einer Arbeit an Gewebeschnitten; als mittlere AgNOR-Zahl wurde für follikuläre Adenome ($n = 22$) 3.5 ± 0.3 und für follikuläre Karzinome ($n = 17$) 5.0 ± 0.7 angegeben (Rüschoff et al. 1993). Diese Ergebnisse wurden im Prinzip in einer anderen Arbeit an Feinnadelaspirationsbiopsien bestätigt, in der die follikulären Adenome ($n = 40$) eine mittlere AgNOR-Zahl von 2.17 ± 0.73 aufwiesen, die follikulären Karzinome ($n = 9$) hingegen von 5.04 ± 0.53 (Mehrotra et al. 1998). Die Ergebnisse sind erfahrungsgemäß in beiden Arbeiten statistisch signifikant; entsprechende Werte wurden aber nicht dargestellt.

Chromosomale und molekularpathologische Untersuchungen

CGH-basierte chromosomale Untersuchungen

Die bisherigen Kenntnisse über die chromosomale Ausstattung von follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen mithilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) sind sehr widersprüchlich und lassen keine allgemein gültigen Schlußfolgerungen zu (Übersicht bei Roque et al. 2003). Sie beziehen sich andererseits aber auch nur auf 66 follikuläre Adenome und 61 follikuläre Karzinome in insgesamt sechs Untersuchungen. Überraschenderweise gelang es nicht in allen Studien, Ähnlichkeiten zwischen den CGH-Profilen beider Entitäten herauszuarbeiten.

Da die CGH-Ergebnisse zu keinem klaren Ergebnis kommen, ist auch ein DNA-Microarray, der ja üblicherweise auf der Basis von CGH-Resultaten konstruiert wird, derzeit noch nicht vorstellbar.

PAX8-PPARGamma-Fusionsonkogen

Der Nachweis durch Translokation entstandener Fusionsonkoproteine hat in der Onkologie hämatologischer Erkrankungen sowie bei Sarkomen und

papillären Schilddrüsenkarzinomen Bedeutung erlangt; ein klassisches Beispiel ist die Philadelphia-Translokation bei CML. Nachdem bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen eine Fusion des thyroid-spezifischen Transkriptionsfaktors PAX8 mit dem nukleären Rezeptor PPARGamma als Translokation t(2;3)(q13;p25) nachgewiesen worden war, wurde mit RT-PCR und immunhistochemisch untersucht, ob sich follikuläre Adenome (n = 11) und follikuläre Karzinome (n = 17) im Auftreten der Translokation unterscheiden (Cheung et al. 2003). In beiden Gruppen ließ sich in jeweils sechs Fällen (55% bzw. 35%) die Translokation nachweisen, so daß sie offenbar früh in der Tumorgenese follikulärer Schilddrüsentumoren liegt und nicht erst als Ausdruck der Malignisierung auftritt; differentialdiagnostisch ist sie somit (vorbehaltlich anderer Resultate an größeren Patientenkollektiven) mutmaßlich nicht geeignet.

Molekularpathologische Untersuchungen

Molekularbiologische Ansätze haben bisher noch keine entscheidenden Ergebnisse in der Differentialdiagnostik follikulärer Schilddrüsentumoren erbracht. Tumorspezifische mRNA-Untersuchungen geben zwar neue Einblicke in Abläufe innerhalb der Karzinogenese, lassen jedoch offenbar bisher keine Unterscheidung von Adenomen und Karzinomen zu (Takano et al. 2002). Der Aufbau einer cDNA library (Kaserer et al. 2002) nach Erkenntnissen, die an mikrodissiziertem Gewebe von verschiedenen gutartigen und bösartigen Erkrankungen der Schilddrüse sowie an Normalgewebe gewonnen wurden, wird in Zukunft eine breitere Genanalyse erlauben und zumindest experimentelle Anwendungen der c-DNA-Arraytechnik wahrscheinlich machen; zu diesem Thema liegt bisher ein Fallbericht für ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom (Chen et al. 2001) vor. Zusammenfassend kann man sagen, daß molekulare Techniken in Zukunft auch bei Schilddrüsentumoren eine größere Bedeutung auf wissenschaftlichem Sektor haben werden, klinische Fragestellungen aber erst mittelfristig beantwortet werden dürften.

1.4 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit die TV-bildanalytisch unterstützte Quantifizierung der Expression der beiden Proliferationsmarker MIB-1 und PCNA zur Lösung der differentialdiagnostischen Frage beitragen kann, ob es sich bei einer follikulären Tumorbildung der Schilddrüse um ein Adenom oder ein Karzinom handelt. Wie bereits ausgeführt (s.o.), gibt es zwar einige Voruntersuchungen hierzu, aber letztendlich kein gesichertes, auf einer breiteren Datenbasis bzw. auf einer quantifizierenden Methodik aufgebautes Wissen.

Ziel ist, die Sensitivität und Spezifität verschiedener MIB-1- und PCNA-assoziiierter Parameter in der Differentialdiagnostik der beiden Tumorentitäten zu ermitteln, Grenzwerte herauszuarbeiten, mit Hilfe derer sich eine möglichst eindeutige Diagnose erbringen läßt, und die Ergebnisse der MIB-1- und PCNA-Quantifizierung mit denen anderer Methoden in Beziehung zu setzen.

Methodisch wurde in dieser Arbeit ein bildanalytisches Verfahren eingesetzt, die Immunhistometrie, mit deren Hilfe es möglich ist, größere Zahlen von Meßzellen pro Präparat zu erfassen und somit eine höhere Datensicherheit zu erlangen.

Die Arbeit ist Teil eines Gesamtprojektes, in welchem mit den Methoden der MIB-1- und PCNA-Immunhistometrie und der TUNEL-basierten Apoptosequantifizierung im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe sowohl follikuläre Adenome und Karzinome, als auch in anderen Teilprojekten papilläre Karzinome sowie Fälle einer Hashimoto- bzw. de Quervain-Thyreoiditis untersucht werden (Biesterfeld et al. 2003).

2. Proliferationsmarker

Im folgenden soll der Stand der Forschung zu den in der Arbeit verwendeten Proliferationsmarkern wiedergegeben werden.

2.1 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)

PCNA/Cyclin wurde unabhängig voneinander von Miyachi et al. 1978 und Celis und Bravo 1980 beschrieben. Miyachi et al. (1978) berichteten in ihrer Arbeit über die Isolierung eines Autoantikörpers aus den Seren von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, der mit nukleären Antigenen proliferierender Zellen reagierte. Celis und Bravo (1980) beschrieben in ihrer Arbeit erstmals ein azides Protein mit einem Molekulargewicht von 36kD, welches sich in zweidimensionaler Gelelektrophorese verstärkt in der S-Phase des Zellzyklus nachweisen ließ und somit einen Marker für diese Phase darstellte. 1981 veröffentlichten Bravo et al., daß das von ihnen beschriebene Polypeptid im Nucleolus lokalisiert ist, und unter Bedingungen, bei denen die Zellproliferation abnimmt, ebenfalls vermindert nachgewiesen werden kann. Nach Bravo et al. (1982) wurde das entdeckte Protein zunächst unter dem Namen Cyclin geführt. 1984 entdeckte man, daß Cyclin identisch mit PCNA ist (Mathews et al. 1984). Es wurde nachgewiesen, daß PCNA für die DNA-Replikation bedeutend ist (Prelich et al. 1987, Bravo und MacDonald-Bravo 1987, Zuber et al. 1989, Celis et al. 1987). Prelich et al. (1987) beschrieben die Notwendigkeit von PCNA für die Verlängerungsphase der in vitro Replikation der simian virus 40 (SV40)-DNA. Außerdem wurde erkannt, daß PCNA die gleichen funktionellen Eigenschaften wie ein Protein besitzt, welches an der Regulation der DNA-Polymerase Delta im Kalbsthymus beteiligt ist. Beide Proteine werden von humanen anti-PCNA-Autoantikörpern erkannt. Somit postulierten Prelich et al. (1987), daß PCNA ein Hilfsprotein der DNA-Polymerase Delta ist. Zu gleichem Ergebnis kamen Bravo et al. (1987).

PCNA spielt eine Rolle bei Reparatur beschädigter Nukleotide der DNA: Anhand einer Studie mit fraktionierten Zellextrakten wurde gezeigt, daß PCNA für die DNA-Synthese nach dem Herausschneiden beschädigter Nukleotide aus dem DNA-Strang benötigt wird. Da PCNA als Hilfsprotein der DNA-Polymerase Delta angesehen wurde, postulierte man, daß die DNA-Reparatursynthese durch die DNA-Polymerase Delta durchgeführt wird (Shivji et al. 1992).

Die Expression von PCNA ist abhängig vom Zellzyklus. Die PCNA-Expression ist in der G₁-Phase leicht erhöht und erhöht sich weiter in der DNA Synthesephase (S-Phase). In der G₂-M-Phase sinkt der PCNA-Gehalt auf Werte, die zwischen denen der G₁- und S-Phase liegen (Kurki et al. 1986). In anderen Studien wurde ebenfalls gezeigt, daß die PCNA-Expression in der späten G₁- oder der frühen S-Phase erhöht ist (Takasaki et al. 1981, Celis und Celis 1985) und ein Maximum in der S-Phase erreicht (Morris et al. 1989).

1989 gelang Travali et al. die komplette Sequenzierung des humanen PCNA-Gens. Es besitzt 6 Exons und umfaßt von der Cap-Seite bis zum Poly-(A)-Signal 4961 Basenpaare. Ausgeprägte Sequenzähnlichkeiten bestehen zwischen Introns und ebenso zwischen Introns und Extrons. Außerdem wird die Identifikation einer 5'-angrenzenden Sequenz mit Promotoraktivität beschrieben.

2.2 MIB-1

Gerdes et al. beschrieben 1983 die Entdeckung eines monoklonalen Antikörpers, genannt Ki-67, der ein nukleäres Antigen erkennt, welches sich nur in proliferierenden Zellen fand. Da der Antikörper nicht mit Zellen reagierte, die sich in Ruhephase befanden, wurde daraus geschlossen, daß das von Ki-67 erkannte Antigen nicht in der G₀-Phase exprimiert wird.

Ebenso war man sich sicher, daß es sich bei dem erfassten Antigen nicht um das gleiche handelte, welches bereits von Miyachi et al. 1978 beschrieben worden war. Das Ki-67 Antigen ist ein Protein ohne Histone mit einem Molekulargewicht von 345 und 395kD (Gerdes et al. 1991). Das für die Ki-67-Expression verantwortliche Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 lokalisiert (Fronatsch et al. 1991).

Gerdes et al. (1984) fanden heraus, daß Ki-67 in der S-, G₂- und M-Phase nachweisbar ist, jedoch in der G₀-Phase fehlt. Die Antigenexpression in der G₁-Phase variiert: Zellen im Übergang von G₀ zu G₁, die dabei die Phasen G_{1T}, G_{1a} und G_{1b} durchlaufen, sind zunächst Ki-67 negativ und werden erst in der G_{1b}-Phase positiv. Zellen, die jedoch bereits eine Mitose durchlaufen haben, sind während der G₁-Phase durchgängig Ki-67 positiv. Dies ließ möglicherweise auf eine de novo-Synthese des Ki-67 Antigens während der ersten G₁-Phase nach der Wachstumsstimulation schließen und legte den Verdacht nahe, daß zyklische Zellen nach einer Mitose nicht den gleichen Weg einschlagen wie ruhende Zellen der G₀-Phase nach Wachstumsstimulation und Übergang zu G₁. Zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen G₁-Phasen schlugen Gerdes et al. (1984) vor, in der ersten G₁-Phase die Bezeichnungen G_{1a} und G_{1b} zu verwenden und nach weiteren durchlaufenen Zellzyklen G_{1A} und G_{1B}.

Der Unterschied der Subphasen liegt nicht im RNA-Gehalt, sondern in der Ki-67-Expression. G_{1T}, G_{1a} und G_{1b} stellen Startsequenzen eines Zellzyklus dar und sollten nicht in den eigentlichen Zellzyklus aufgenommen werden (Gerdes et al. 1983).

Unter Anwendung der Durchflußzytometrie beschrieben sowohl Sasaki et al. (1987), als auch Landberg et al. (1990) einen Anstieg der Ki-67 Expression während der S-Phase mit einem Maximum in der G₂/M-Phase.

Der Nachteil des Antikörpers Ki-67 besteht darin, daß er nur bei Gefrierschnitten angewendet werden kann. Ein anderer Antikörper namens MIB-1, der rekombinante Anteile des Ki-67-Antigens erkennt, wurde von Cattoretti et al. 1992 entwickelt. Nach Erwärmung in der Mikrowelle kann MIB-1 auch bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebettetem Material in der pathohistologischen Routine angewendet werden ("antigen retrieval"). Dieser Antikörper ist von verschiedenen Anbietern gewerblich erhältlich und hat den originalen Ki-67-Antikörper weitestgehend ersetzt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Für die vorliegende Arbeit wurden 49 Fälle von follikulären Schilddrüsenadenomen und follikulären Schilddrüsenkarzinomen aus den Jahrgängen 1990 bis 1995 vom Institut für Pathologie des Aachener Universitätsklinikums und vom Institut für Pathologie am Knappschafts Krankenhaus Bardenberg zur Verfügung gestellt. Unter den Präparaten befanden sich 28 follikuläre Schilddrüsenkarzinome und 21 follikuläre Schilddrüsenadenome. Das durchschnittliche Alter der Adenompatienten betrug 47,1 Jahre. Darunter befanden sich 5 männliche und 16 weibliche Patienten. Die Karzinompatienten waren mit durchschnittlich 54,2 Jahren etwas älter. Unter ihnen befanden sich 5 Männer und 23 Frauen. Von jedem Tumor wurden 2 Schnitte vom selben Paraffinblock angefertigt. Ein Schnitt wurde mit dem Marker MIB-1, der andere Schnitt mit PCNA angefärbt. Zur Kontrolle wurden 30 Fälle von normalem Schilddrüsenengewebe herangezogen, von denen jeweils 15 MIB-1- bzw. PCNA-gefärbt wurden.

3.2 Materialvorbereitung

Die Präparate wurden für beide Färbungen gleichartig vorbehandelt. Zunächst wurden sie in 10%igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 3 µm dicke Schnitte von den Paraffinblöcken angefertigt. Diese wurden zur besseren Haftung auf zuvor silanisierte und mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und für eine Nacht in einem Brutschrank von 37 °C gelagert. Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte nochmals einige Stunden in dem Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt, um während des Färbeprozesses das Abschwimmen der Präparate vom Objektträger zu vermeiden.

3.2.1 MIB-1-Färbung und PCNA-Färbung

Die beiden Färbungen stimmten in vielen Schritten überein und werden daher zusammen erläutert. Bei der MIB-1-Färbung wurden die Schnitte zur Demaskierung des Ki-67-Epitops in der Mikrowelle gekocht. Dieser Schritt entfiel bei der PCNA Färbung. Unterschiede ergaben sich weiterhin hinsichtlich der verwendeten Antikörper.

Entparaffinierung

Die Schnitte mußten zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert werden. Dazu wurden sie zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol gestellt. Anschließend wurden die Präparate zweimal für jeweils 2 Minuten in 100%igen Alkohol, danach zweimal für 2 Minuten in 96%igen Alkohol und schließlich zweimal für 2 Minuten in 70%igen Alkohol gestellt. Abschließend wurden die Schnitte in einer PBS-Pufferlösung gespült.

Hemmung der endogenen Peroxidase

Um unspezifische Peroxidasereaktionen zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase gehemmt. Dazu wurden die Präparate 30 Minuten lang in einem 1%igen Gemisch bestehend aus 30%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und reinem Methanol gestellt. Anschließend wurden die Präparate dreimal für jeweils drei Minuten in einer PBS-Pufferlösung gespült.

Demaskierung des Ki-67-Epitops (MIB-1)

Zur Demaskierung des Ki-67-Epitops wurden die Schnitte in Citratpuffer eingestellt und 3 x 5 Minuten in der Mikrowelle (Bosch) bei 600 Watt gekocht. Zwischen den einzelnen Kochphasen ließ man die Präparate 2 Mi-

nuten abkühlen und füllte den Citratpuffer auf. Anschließend mußten die Schnitte 5 Minuten lang abkühlen. Nach 10 minütiger Spülung in PBS-Pufferlösung wurden die Präparate in eine feuchte Kammer eingebracht.

Auftragen der Primärantikörper MIB-1 und PCNA

In der feuchten Kammer wurde für die MIB-1-Färbung der primäre monoklonale Maus-Antikörper gegen MIB-1 (Dianova M 505) und für die PCNA-Färbung der monoklonale Maus-Antikörper gegen PCNA (DAKO M 879) aufgetragen. Der primäre Antikörper wurde mit einer BSA-PBS-Lösung für MIB-1 1:10, für PCNA 1:50 verdünnt. Für jeden Schnitt wurden 200 µl des Antikörpermischs benötigt. Während der 60minütigen Inkubationszeit band der Antikörper an das im Zellkern befindliche Antigen Ki-67 bzw. PCNA. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS-Pufferlösung gespült.

Auftragen der Sekundärantikörper

In der feuchten Kammer wurde der sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper (goat-anti-mouse Immunotech 0817) aufgetragen. Dieser wurde bei der MIB-1-Färbung mit einer BSA-PBS-Lösung 1:100, bei der PCNA-Färbung 1:400, verdünnt auf die Schnitte gegeben. Pro Schnitt wurden 200 µl benötigt. Der sekundäre Antikörper band an den primären Antikörper. Die Schnitte verblieben für 45 Minuten in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate dreimal für 5 Minuten in PBS-Pufferlösung gespült.

Sichtbarmachen des Antikörperkomplexes durch DAB-Entwicklung

Für zwei Küvetten wurden 0,6 g Tris in 100 ml Aqua dest. eingerührt. Mit Hilfe von tropfenweise zugegebener HCl wurde der pH-Wert auf 7,6 ein-

gestellt. Anschließend wurden 6 DAB-Tabletten (0,04 g Diaminobenzidine) darin unter Rühren aufgelöst. Kurz vor der Färbung wurden 15 ml einer 30%-igen wässrigen H_2O_2 -Lösung hinzugefügt. Die Schnitte wurden 5 Minuten in dieser Lösung belassen. Über eine Peroxidasereaktion entstand eine Braunfärbung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Danach wurden die Präparate 10 Minuten lang fließend gewässert.

Gegenfärbung

Die Schnitte wurden zur Gegenfärbung 15 Minuten lang in Methylgrün gestellt, danach zweimal 5 Minuten in Butanol gespült und eine Minute in Xylol eingestellt. Abschließend wurden die Schnitte mit Canadabalsam eingedeckelt.

3.2.2 Anhang zur Färbearbeitung:

PBS („phosphate buffer saline“)

5 l Aqua dest. + 40 g NaCl + 5,75 g Na_2HPO_4 + 1,0 g KH_2PO_4 + 1,0 g KCl
mischen und auf einen pH-Wert von 7,5-7,6 einstellen

PBS/BSA-Lösung

200 ml PBS + 2 g BSA + 200 µl Triton + 200 µl Tween 20

Citratpuffer

Lösung 1: 21,01 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ in 1000 ml Aqua dest.

Lösung 2: 29,41 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_2$ in 1000 ml Aqua dest.

36 ml Lösung 1 + 164 ml Lösung 2 mit 1800 ml Aqua dest. auffüllen

Kontrollpräparate

Zur Überprüfung der Richtigkeit des jeweiligen Färbevorgangs wurden routinemäßig Kontrollpräparate mitgeführt. Mit Hilfe der K_1 -Kontrolle wurde überprüft, ob die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgreich war. Dazu wurde der Kontrollschnitt nach der Hemmung der endogenen Peroxidase ohne das Auftragen weiterer Antikörper direkt der Farbentwicklung mit DAB zugeführt. Die K_2 -Kontrolle überprüfte unspezifische Bindungsreaktionen des sekundären Antikörpers. Dies geschah durch Auslassen des Schrittes der Inkubation mit dem Primärantikörper. Zur Beurteilung der Färbequalität wurde pro Charge ein Appendixschnitt als Positivkontrolle mitgeführt.

3.3 Das CM-2-Bildzytometer

Für die Auswertung der mit den beiden Proliferationsmarkern gefärbten Schnitte wurde das TV-Bildzytometer CM-2 (Hund Wetzlar) aus dem Institut für Pathologie der RWTH-Aachen verwendet. Das System findet beispielsweise in der DNA-Zytometrie oder in der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus Anwendung. Außerdem können histologische Präparate, die mit Apoptosemarkern oder, wie in diesem Fall, mit Proliferationsmarkern angefärbt wurden, quantifiziert werden. Dabei können die einzelnen Messungen individuell modifiziert werden. Das System setzte sich aus einem Lichtmikroskop H 500 LL (Hund Wetzlar), einer CCD-Schwarz-Weiß-Kamera Pulnix TM-765 zur Bildübertragung und einem IBM-kompatiblen PC, der mit einem 80486-Prozessor, 16 MB Hauptspeicher, 200 MB Massenspeicher einem Framegrabber, Tastatur und Maus ausgestattet war, zusammen. Das Mikroskop verfügte über 5 Objektive (4x-, 10x-, 20x-, 40x- und 100x-fache Vergrößerung), zwei 10x Okulare und einer Vorrichtung zur Aufnahme eines Rot- und eines Grünfilters zwischen der Lichtquelle und dem Mikroskopstativ. Mit Hilfe der Schwarz-Weiß-

Kamera wurde bei den Messungen mit dem 20x-fach vergrößerndem Objektiv ein 0,22 mm x 0,22 mm Bildausschnitt des Präparates in Form eines 18 cm x 18 cm Standbildes auf einen Bildschirm übertragen.

3.3.1 Bildanalyse

Zur Kontrastierung positiver und negativer Zellkerne wurde eine DAB-Entwicklung und eine Methylgrün Gegenfärbung verwendet. Mit Hilfe der DAB-Entwicklung färbten sich die Proliferationsmarker-positiven Kerne braun, alle anderen Kerne wurden durch das Methylgrün grün angefärbt. Mittels eines Rotfilters (Wellenlänge 550 +/- 10 nm) konnten alle zu messenden Zellkerne analysiert werden, da somit der Kontrast zwischen immunpositiven und immunnegativen Zellkernen minimiert wurde. Durch Verwendung eines Grünfilters (Wellenlänge 623 +/- 5 nm) wurden lediglich die positiv angefärbten Kerne dargestellt, da die Proliferationsmarker-negativen methylgrüngefärbten Kerne dabei ausgeblendet wurden. Somit wurde durch das Grünfilterbild die Anzahl der immunreaktiven Zellkerne ermittelt. Als Softwareprogramm wurde das in Zusammenarbeit des Institutes für Pathologie der RWTH-Aachen und der Firma ABOS (München) entwickelte RCA-Programm verwendet.

Zur Messung eines Gesichtsfeldes wurde zunächst das Livebild des Mikroskops auf den Monitor übertragen und jeweils einmal unter Verwendung des Rot- und des Grünfilters digitalisiert und als Standbild eingezo-gen. Anschließend erschien dann das Bild des Rotfilters als großes Schwarz-Weiß-Bild im Zentrum des Bildschirms. Das Bild des Grünfilters wurde am linken oberen Rand des Monitors klein abgebildet. Das Rotfilterbild wurde anschließend mit Hilfe eines Wasserscheidenalgorithmus segmentiert. Dieses Verfahren ermöglichte die Erkennung der Konturen der einzelnen Zellen mithilfe lokaler Schwellenwerte. Durch den Untersucher konnte eine Korrektur des ermittelten Bildes mithilfe eines Masken-

editors vorgenommen werden. Durch die Anwendungen „Erosion und Dilatation“ wurden die Objekte um eine definierte Pixelgröße verkleinert bzw. vergrößert, „Close holes“ schloß nicht erkannte Innenflächen einer Kernmaske, „Opening und Closing“ glättete alle Masken zunächst durch Erosion und danach durch Dilatation, nicht erkannte Kerne konnten mit Hilfe von „Add mask“ hinzugefügt, falsch akzeptierte Kerne durch die Funktion „Delete Regions“ entfernt werden. Schließlich konnten durch Betätigung der Option „Cleaning“ zu kleine Objekte gelöscht werden. Die Bildkorrektur erforderte dementsprechend einige Erfahrung mit dem zu untersuchenden Gewebe. Nach Abschluß der Bearbeitung wurde das Segmentationsergebnis auf das Grünfilterbild transferiert und mit der gleichen zuvor erarbeiteten Kernmaske eine Messung durchgeführt. Somit wurde die Zahl und die Fläche der positiven Kerne im Verhältnis zur gesamten Kernzahl- und Fläche mit Hilfe des Grün- und des Rotfilterbildes errechnet.

3.3.2 Messung der Präparate

Nach Starten des Programmes wurde der Lichteinfall des Mikroskops nach dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip eingestellt. Dazu wurde die Aperturblende so weit geschlossen, dass sie $\frac{2}{3}$ der Objektivapertur freigab. Darauffolgend mußte ein Lichtabgleich durchgeführt werden, um die Helligkeit der Lichtblende einzustellen. Das Ziel der Einstellung der Bildausleuchtung war es optimale und standardisierte Meßergebnisse bei einem maximalen Dynamikbereich für die densitometrische Messung zu erhalten.

Anschließend mußten einige Eichmessungen durchgeführt werden, um Schwellenwerte für die mittlere optische Dichte (MOD) und für den Grauwert (Greyvalue) festzulegen, oberhalb derer alle Zellen im Grünfilterbild als immunreaktiv und somit als positiv erkannt wurden. In Gesichtsfeldern ohne immunreaktiv angefärbte Zellen durfte dabei keine Positivität akzep-

tiert werden. Zur Überprüfung des Schwellenwertes wurden Messungen an lichtmikroskopisch eindeutig positiven Kernen vorgenommen. Die Grenzwerte mußten für jedes Präparates neu festgelegt werden, durften jedoch ebenso wie die Beleuchtungseinstellung, während einer Messung nicht verändert werden. Für eine Messung wurden 20 Gesichtsfelder eines Schnittes mit einer 20fachen Vergrößerung ausgewertet. Um einen aussagekräftigen Querschnitt der Zellverteilung zu erfassen, wurden die Schnitte zur Messung der einzelnen Gesichtsfelder mäanderförmig durchgemustert.

3.3.3 Auswertung der Meßergebnisse

Es wurde sowohl eine kernzahlbezogene als auch eine flächenbezogene Auswertung der Meßergebnisse vorgenommen. Mit Hilfe des Computers wurden für den verwendeten Proliferationsmarker (MIB-1 oder PCNA) pro Gesichtsfeld folgende vier Rohwerte ermittelt:

- Zahl der gemessenen Zellkerne
- Anzahl der positiven Zellkerne
- Gesamtfläche der gemessenen Zellkerne
- Fläche der positiven Zellkerne

Darüber hinaus standen die aufsummierten Resultate für alle 20 gemessenen Gesichtsfelder zur Verfügung.

Aus den Rohdaten wurden folgende vier Meßgrößen pro Marker errechnet:

- $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ bzw. $\text{PCNA}_{\text{mean}}$: Auf die Zellkernzahl aller 20 Gesichtsfelder bezogene mittlere MIB-1- bzw. PCNA-Positivität

- $MIB-1_{areamean}$ bzw. $PCNA_{areamean}$: Auf die Kernfläche aller 20 Gesichtsfelder bezogene mittlere MIB-1- bzw. PCNA-Positivität
- $MIB-1_{max}$ bzw. $PCNA_{max}$: Auf die Zellkernzahl des maximal positiven Gesichtsfeldes bezogene MIB-1- bzw. PCNA-Positivität
- $MIB-1_{areamax}$ bzw. $PCNA_{areamax}$: Auf die Kernfläche des maximal positiven Gesichtsfeldes bezogene MIB-1- bzw. PCNA-Positivität

3.4 Statistische Untersuchungen

Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programmpaket BMDP (Unterprogramme 1D, 2D, 3D, 6D) realisiert.

An biometrischen Grunddaten standen zunächst alle Parameter der deskriptiven Statistik, d.h. Modalwert, Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie Angaben zu allen gewünschten Perzentilen zur Verfügung (BMDP 1D, BMDP 2D). Korrelationen zwischen ungestuft erhobenen Parametern wurden mithilfe des Korrelationskoeffizienten r analysiert und auf Signifikanz überprüft (BMDP 6D). Für den Korrelationskoeffizienten r gilt: $-1 \leq r \leq 1$. Eine perfekte lineare Beziehung besteht, wenn $r = 1$ oder $r = -1$ ist. Die Analyse von Meßwertverteilungen erfolgte darüber hinaus mit dem t-Test (BMDP 3D).

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein p-Niveau von $p < 0.05$ angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$, die Nullhypothese fälschlich zu verwerfen.

4. Ergebnisse

4.1. Korrelation zwischen flächen- und kernzahlbezogenen Parametern

In den Tabellen 1 bis 2 wurden die Korrelationskoeffizienten der ungestuften Meßwerte für die kernzahl- und flächenbezogenen Mittel- und Maximalwerte von MIB-1 und PCNA sowie die Signifikanzen der ungestuften Meßwerte dargestellt. Des weiteren wurde die Anzahl der Quantilwechsel nach einer 1:2:1 Quantilisierung und die Signifikanzen der gestuften Meßwerte nach dem Pearson χ^2 -Test ermittelt.

Tab. 1: Korrelation der kernzahl- und flächenbezogenen Mittel- und Maximalwerte von MIB-1-Meßparametern; n = Zahl der Fälle, r = Korrelationskoeffizient, p = p-Wert

Verglichene Meßparameter	n	r	p	Quantilzuordnung			p
				gleich	+/- 1	+/- 2	
SD-Tumoren							
MIB-1 _{mean} und MIB-1 _{areamean}	49	0,979	< 0,0001	47	2	0	< 0,0001
MIB-1 _{max} und MIB-1 _{areamax}	49	0,993	< 0,001	47	2	0	< 0,0001
MIB-1 _{areamean} und MIB-1 _{areamax}	49	0,422	0,003	37	12	0	< 0,0001
MIB-1 _{mean} und MIB-1 _{max}	49	0,329	0,021	37	12	0	< 0,0001
normale SD							
MIB-1 _{mean} und MIB-1 _{areamean}	15	0,861	< 0,001	12	3	0	0,0047
MIB-1 _{max} und MIB-1 _{areamax}	15	0,723	0,002	9	6	0	0,1795
MIB-1 _{areamean} und MIB-1 _{areamax}	15	0,766	< 0,001	10	5	0	0,0752
MIB-1 _{mean} und MIB-1 _{max}	15	0,798	< 0,001	11	4	0	0,0298

Tab. 2: Korrelation der kernzahl- und flächenbezogenen Mittel- und Maximalwerte von PCNA-Meßparametern; n = Zahl der Fälle, r = Korrelationskoeffizient, p = p-Wert

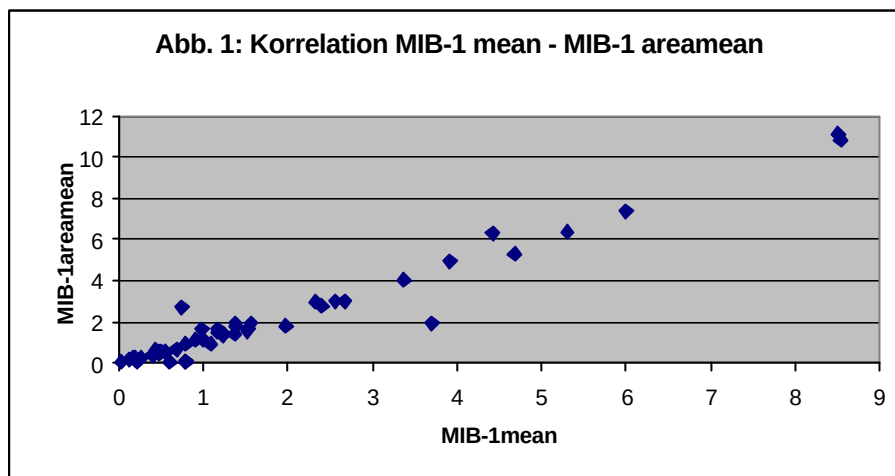
Verglichene Meßparameter	n	r	p	Quantilzuordnung			p
				gleich	+/- 1	+/- 2	
SD-Tumoren							
PCNA _{mean} und PCNA _{areamean}	49	0,968	< 0,001	46	3	0	< 0,0001
PCNA _{max} und PCNA _{areamax}	49	0,925	< 0,001	41	7	1	< 0,0001
PCNA _{areamean} und PCNA _{areamax}	49	0,86	< 0,001	41	7	1	< 0,0001
PCNA _{mean} und PCNA _{max}	49	0,909	< 0,001	40	9	0	< 0,0001
normale SD							
PCNA _{mean} und PCNA _{areamean}	15	0,994	< 0,001	15	0	0	0,0001
PCNA _{max} und PCNA _{areamax}	15	0,948	< 0,001	15	0	0	0,0001
PCNA _{areamean} und PCNA _{areamax}	15	0,964	< 0,001	15	0	0	0,0001
PCNA _{mean} und PCNA _{max}	15	0,948	< 0,001	15	0	0	0,0001

Zusammenfassend läßt sich für die Gruppe der Tumoren sagen, daß der Korrelationskoeffizient für den Vergleich zwischen gleichartigen kern- und flächenbezogenen Parametern (z.B. MIB-1_{mean} MIB-1_{areamean}) sehr hoch war ($0,925 < r < 0,993$). Für den Vergleich zwischen mittelwert- und maximalwertbezogenen Parametern (z.B. PCNA_{mean} und PCNA_{max}) ergaben sich für PCNA ($r < 0,909$) deutlich höhere Korrelationskoeffizienten als für MIB1 ($r < 0,422$); die Korrelationen waren jeweils statistisch signifikant. Für die normalen Schilddrüsenabschnitte galt ein ähnliches Verhalten.

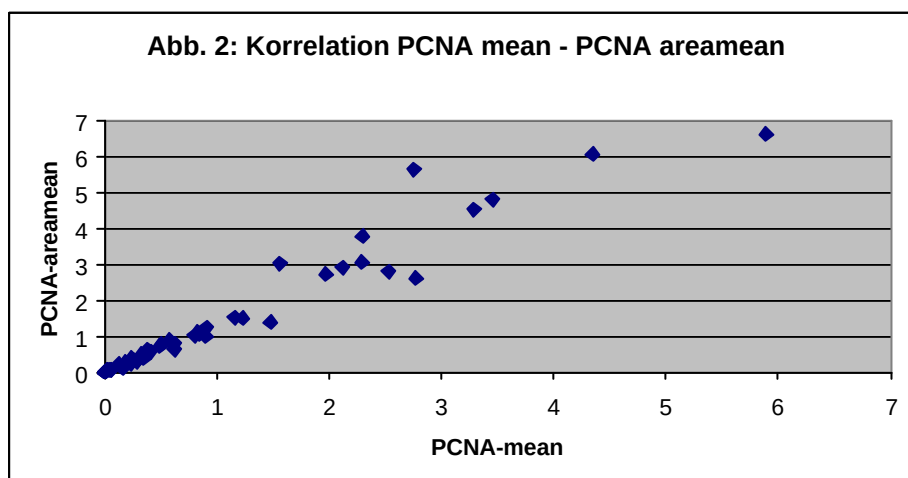
Im folgenden werden die Beziehungen noch anhand der entsprechenden Grafiken für die Gruppe der 49 Schilddrüsentumoren weiter vertieft.

4.1.1 Korrelation zwischen der kernzahl- und flächenbezogenen Mittelwertbestimmung

Für die Korrelation zwischen $MIB-1_{mean}$ und $MIB-1_{areamean}$ fand sich ein Korrelationskoeffizient von 0,979 ($p < 0,001$, Abb. 1). 47 Fälle (95,9%) befanden sich im gleichen Quantil. In zwei Fällen (4,1%) kam eine Abweichung um ein Quantil vor.

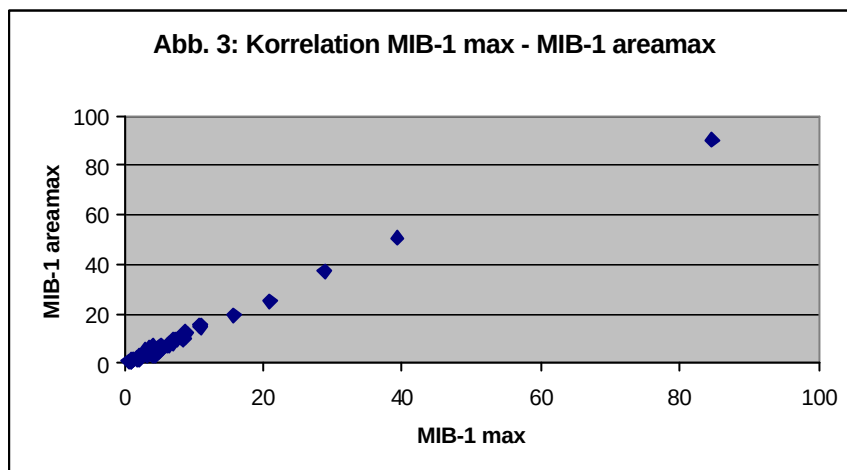


Für PCNA lag der entsprechende Korrelationskoeffizient bei 0,968 ($p < 0,001$, Abb. 2). 46 Werte (93,9%) befanden sich im gleichen Quantil. Ein Wechsel um ein Quantil lag bei 3 Fällen (6,1%) vor.

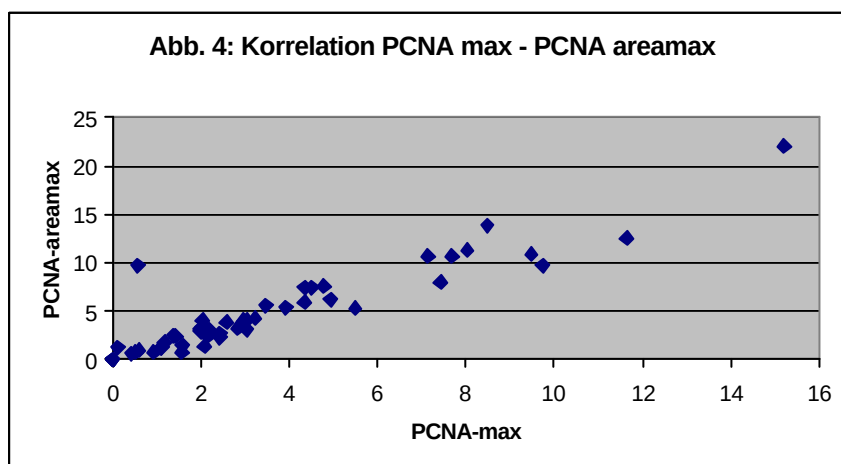


4.1.2 Korrelation zwischen der kernzahl- und flächenbezogenen Maximalwertbestimmung

Bei MIB-1 betrug der Korrelationskoeffizient r von $\text{MIB-1}_{\max}$ zu $\text{MIB-1}_{\text{areamax}}$ 0,993 ($p < 0,001$, Abbildung 3). 47 Fälle (95,9%) lagen im gleichen Quantil. In zwei Fällen (4,1%) fand ein Quantilwechsel von ± 1 statt.

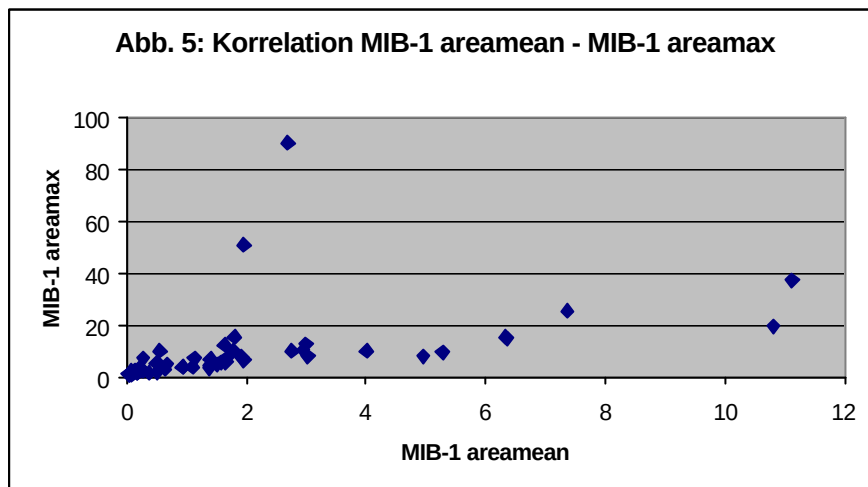


Zwischen $\text{PCNA}_{\max}$ und $\text{PCNA}_{\text{areamax}}$ bestand ebenfalls eine hohe Korrelation ($r = 0,925$, $p < 0,001$, Abb. 4). Allerdings lagen nur 41 Fälle (83,7%) im gleichen Quantil, wobei in 7 Fällen (14,3%) ein Wechsel um ein Quantil, und sogar in einem Fall (2%) ein Wechsel um 2 Quantile stattfand.

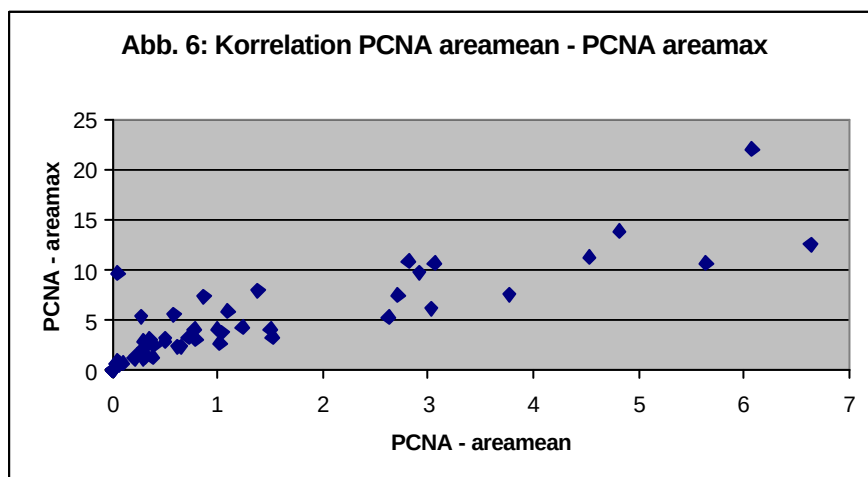


4.1.3 Korrelation der flächenbezogenen Mittel- und Maximalwerte

Bei MIB-1 betrug der Korrelationskoeffizient r von $\text{MIB-1}_{\text{areamean}}$ zu $\text{MIB-1}_{\text{areamax}}$ lediglich 0,422 ($p = 0,003$, Abb. 5). Im Rahmen der Quantilzuordnung befanden sich 37 Fälle (75,5%) im gleichen Quantil. Ein Wechsel um ein Quantil fand in 12 Fällen (24,5%) statt.

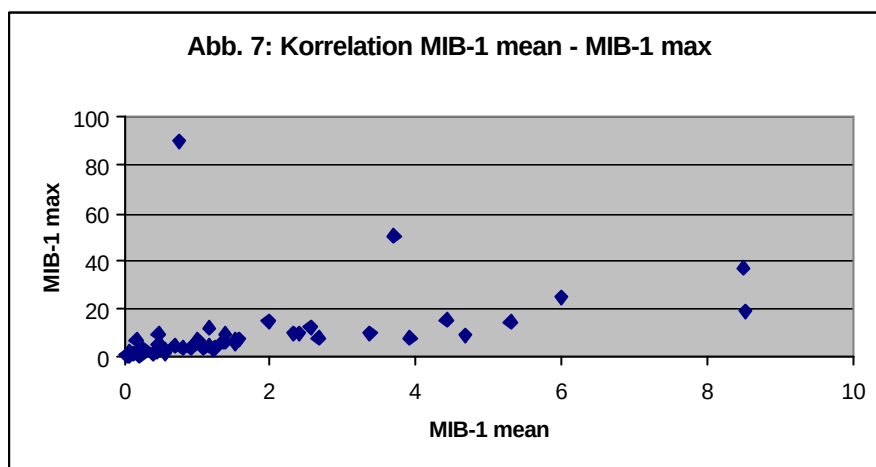


Bei PCNA lag der Korrelationskoeffizient für $\text{PCNA}_{\text{areamean}}$ zu $\text{PCNA}_{\text{areamax}}$ bei $r = 0,86$ ($p < 0,001$, Abb. 6). 41 Fälle (83,7%) lagen im gleichen Quantil, jedoch traten in 7 Fällen (14,3%) ein Wechsel um 1 Quantil und in 1 Fall (2%) ein Wechsel um 2 Quantile auf.

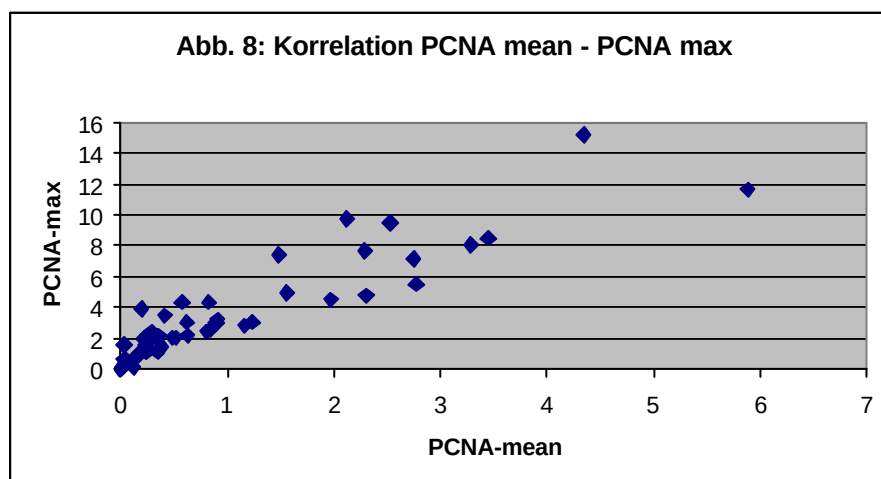


4.1.4 Korrelation der kernzahlbezogenen Mittel- und Maximalwerte:

MIB-1_{mean} wies im Vergleich zu MIB-1_{max} eine relativ niedrige Korrelation auf ($r = 0,329$, $p = 0,21$, Abb. 7). Bei der Quantilzuordnung lagen 37 Fälle (75,5%) im gleichen Quantil und in 12 Fällen (24,5%) fand ein Wechsel um ein Quantil statt.



Bei PCNA betrug der Korrelationskoeffizient für PCNA_{mean} und PCNA_{max} $r = 0,909$ ($p < 0,001$, Abb. 8). 40 Fälle (81,6%) lagen im gleichen Quantil, in 9 Fällen (18,4%) trat ein Wechsel um 1 Quantil auf.



Zusammenfassend ergab sich, daß die Korrelation zwischen flächen- und kernzahlbezogenen Größen gleicher immunhistochemischer Marker so hoch ist, daß die Ergebnisse als gleichwertig betrachtet werden können.

4.2. Korrelation zwischen flächen- bzw. kernzahlbezogener MIB-1- und PCNA-Expression

In Tabelle 3 wurden die Korrelationskoeffizienten der Meßwerte der jeweils korrespondierenden MIB-1- und PCNA-Meßparameter mit ihren p-Werten zusammengestellt. Des weiteren wurde die Anzahl der Quantilwechsel nach einer 1:2:1 Quantilisierung und die Signifikanzen der gestuften Meßwerte nach dem Pearson Chi²-Test aufgenommen.

Tab. 3: Korrelation korrespondierender kernzahl- und flächenbezogener MIB-1- und PCNA-Meßparameter; n = Zahl der Fälle, r = Korrelationskoeffizient, p = p-Wert

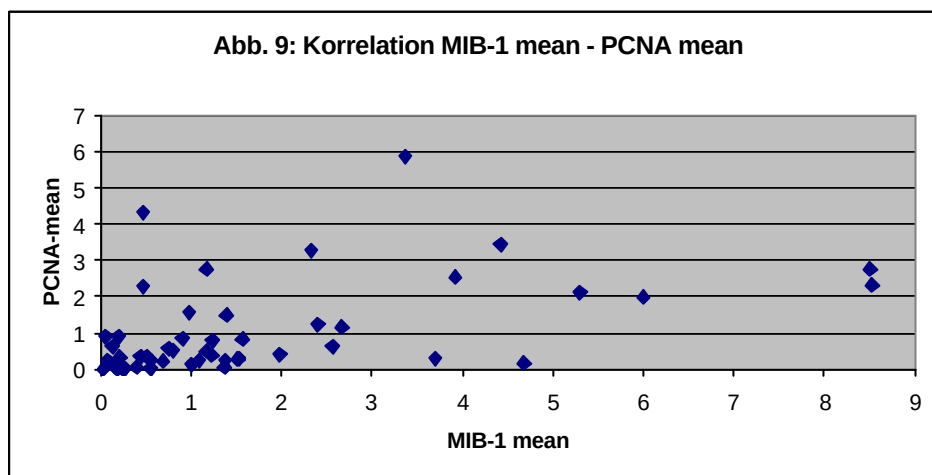
Verglichene Meßparameter	n	r	p	Quantilzuordnung			p
				gleich	+/- 1	+/- 2	
SD-Tumoren							
MIB-1 _{mean} und PCNA _{mean}	49	0,469	< 0,001	30	18	1	0,0012
MIB-1 _{max} und PCNA _{max}	49	0,192	0,186	26	23	0	0,0013
MIB-1 _{areamean} und PCNA _{areamean}	49	0,601	< 0,001	31	17	1	0,0003
MIB-1 _{areamax} und PCNA _{areamax}	49	0,254	0,079	23	26	0	0,0091
normale SD							
MIB-1 _{mean} und PCNA _{mean}	15	- 0,101	0,721	4	8	3	0,092
MIB-1 _{max} und PCNA _{max}	15	0,160	0,568	4	8	3	0,9583
MIB-1 _{areamean} und PCNA _{areamean}	15	- 0,158	0,575	5	7	3	0,0443
MIB-1 _{areamax} und PCNA _{areamax}	15	0,122	0,664	5	8	2	0,3674

Im Vergleich zwischen gleich gerichteten MIB-1 und PCNA-Parametern (z.B. $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ und $\text{PCNA}_{\text{mean}}$) waren die Korrelationen weniger deutlich; außerdem waren hier die Zuordnungen von Präparaten in verschiedene Quantilgruppen häufiger. Besonders für die Präparate von normalen Schilddrüsenabschnitten ergab sich keine Korrelation zwischen beiden Proliferationsmarkern, was aber zumindest partiell durch die im Durchschnitt sehr geringen Meßwerte bedingt sein dürfte.

Im folgenden werden die Beziehungen noch anhand der entsprechenden Grafiken für die Gruppe der 49 Schilddrüsentumoren näher dargestellt.

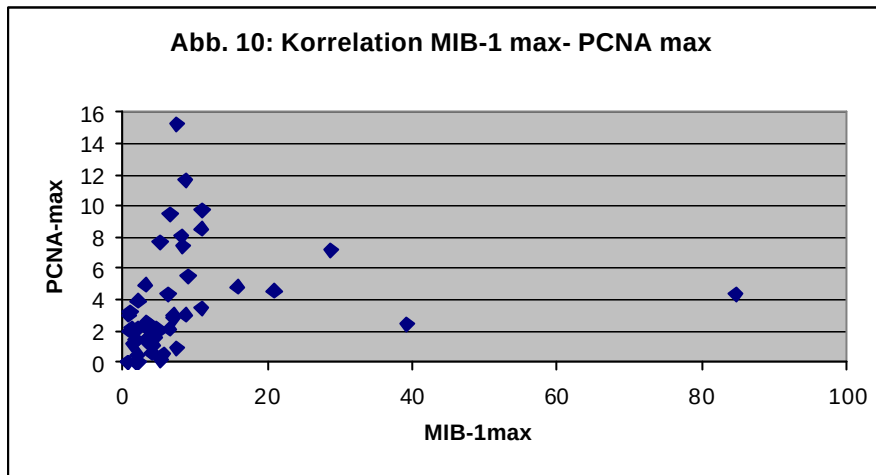
4.2.1 Korrelation der kernzahlbezogenen Meßwerte von MIB-1 und PCNA

Der Korrelationskoeffizient für $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ und $\text{PCNA}_{\text{mean}}$ betrug $r = 0,469$ ($p < 0,001$, Abb. 9). 30 Fälle (61,2%) lagen im gleichen Quantil, in 18 Fällen (36,7%) trat ein Wechsel um ein Quantil, und in einem Fall (2%) ein Wechsel um 2 Quantile auf.



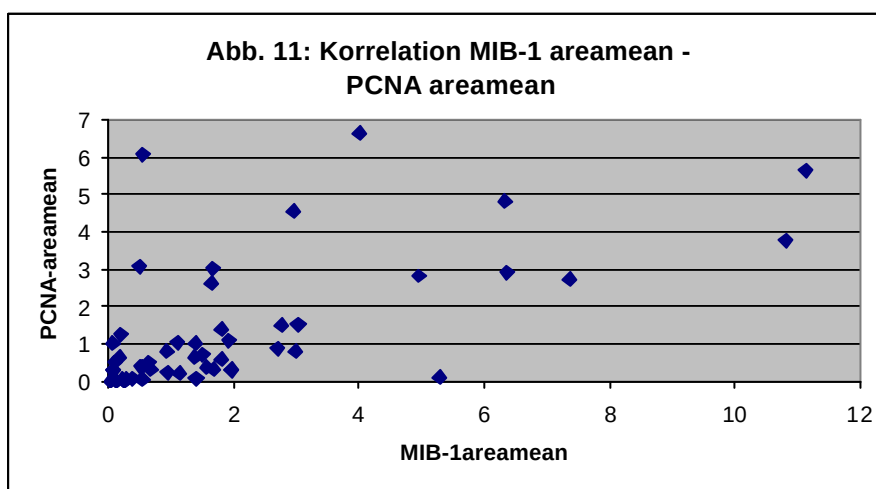
Der Korrelationskoeffizient für $\text{MIB-1}_{\text{max}}$ bezogen auf PCNA_{max} betrug lediglich $r = 0,192$ ($p = 0,186$, Abb. 10). Nach der Quantileinteilung befanden

26 Fälle (53,1%) im gleichen Quantil; ein Wechsel um ein Quantil fand sich bei 23 Fällen (46,9%).

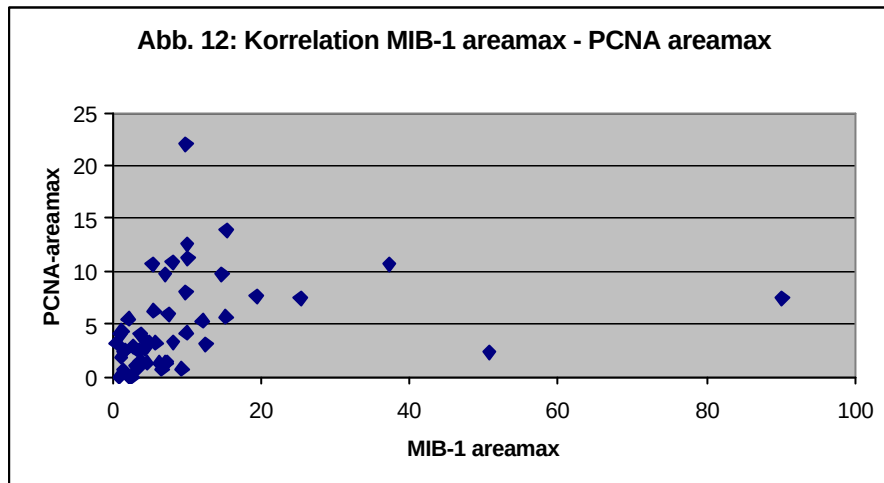


4.2.2 Korrelation der flächenbezogenen Meßwerte von MIB-1 und PCNA

Der Korrelationskoeffizient für $MIB-1_{areamean}$ bezogen auf $PCNA_{areamean}$ betrug $r = 0,601$ ($p < 0,001$, Abb. 11). 31 Fälle (63,3%) lagen im gleichen Quantil, in 17 Fällen (34,7%) fand ein Wechsel um 1 Quantil und in einem Fall (2%) ein Wechsel um 2 Quantile statt.



Für MIB-1_{areamax} verglichen mit PCNA_{areamax} zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,54$ ($p = 0,079$, Abb. 12). 23 Fälle (46,9%) lagen im gleichen Quantil; bei 26 Fällen (53,1%) fand sich ein Wechsel um 1 Quantil.



Zusammenfassend ergab sich, daß die Korrelation MIB-1 und PCNA nicht so hoch ist, als daß sich die weitere Betrachtung nur auf einen der beiden beziehen sollte.

4.3. Verteilung der MIB-1- und PCNA-Expression bei normalem Schilddrüsengewebe, follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen

Die folgende genauere Betrachtung der Meßwertverteilung beschränkt sich aufgrund der Ergebnisse, die in Absätzen 4.1 und 4.2 dargestellt wurden, auf die kernzahlbezogenen Meßwerte als einem adäquaten, zur flächenbezogenen Auswertung identischen Meßmodus, berücksichtigt aber aufgrund der zwischen beiden Markern nur bedingten Korrelationen sowohl MIB-1, als auch PCNA.

Die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie der Range der MIB-1- und PCNA-Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Verteilung der mittleren und maximalen MIB-1- und PCNA-Expression bei normalem Schilddrüsenparenchym, follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen.

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Range = Meßwertumfang

Diagnose	N	MIB-1 _{mean} (%)		MIB-1 _{max} (%)	
		MW +/- SD	Range	MW +/- SD	Range
normale Schilddrüse	15	0,14 +/- 0,08	0,04 - 0,27	1,21 +/- 0,39	0,64 - 1,83
follikuläre Adenome	21	0,70 +/- 0,83	0,06 - 3,70	8,99 +/- 19,13	0,88 - 84,62
follikuläre Karzinome	28	2,52 +/- 2,31	0,03 - 8,53	7,59 +/- 5,99	0,63 - 28,78

Diagnose	n	PCNA _{mean} (%)		PCNA _{max} (%)	
		MW +/- SD	Range	MW +/- SD	Range
normale Schilddrüse	15	0,05 +/- 0,10	0 - 0,30	0,47 +/- 0,81	0 - 2,70
follikuläre Adenome	21	0,42 +/- 0,51	0 - 2,29	2,16 +/- 1,77	0 - 7,69
follikuläre Karzinome	28	1,49 +/- 1,48	0 - 5,89	4,54 +/- 3,82	0 - 15,21

Im folgenden sind darüber hinaus die Werteverteilungen bezogen auf die drei Diagnosegruppen graphisch wiedergegeben, um vor der diagnostischen Auswertung (vgl. Abschnitt 4.4) einen ersten visuellen Überblick zu erhalten (Abb. 13-16).

Abb. 13: Meßwertverteilung MIB-1 mean

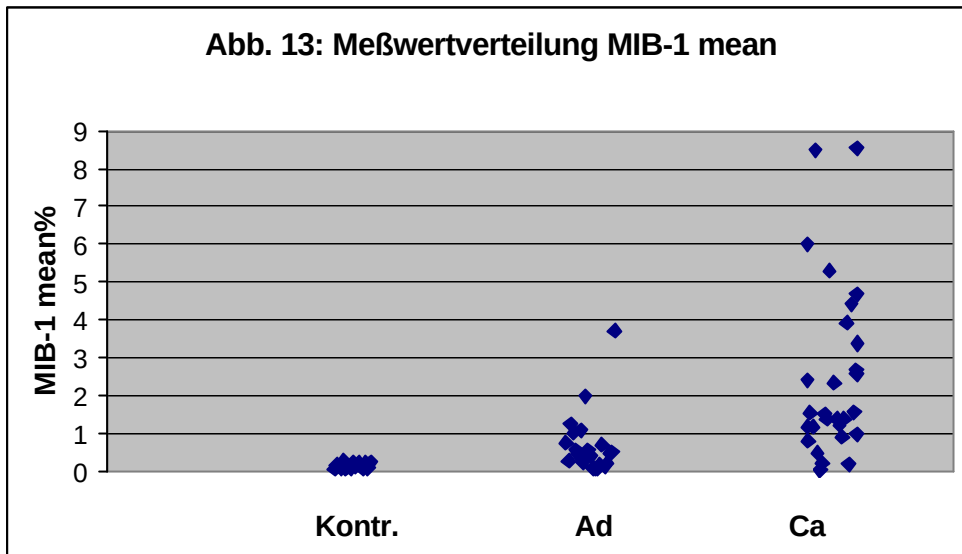


Abb. 14: Meßwertverteilung MIB-1 max

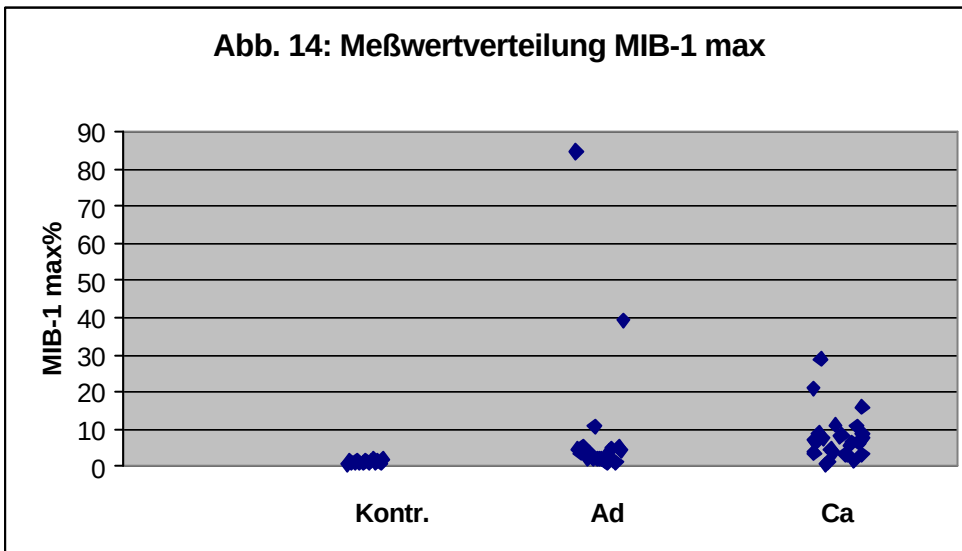
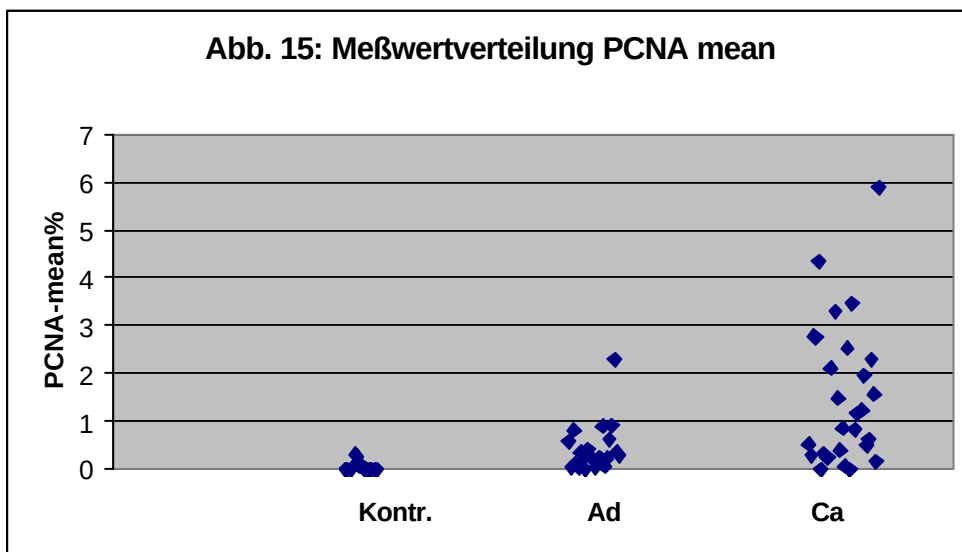
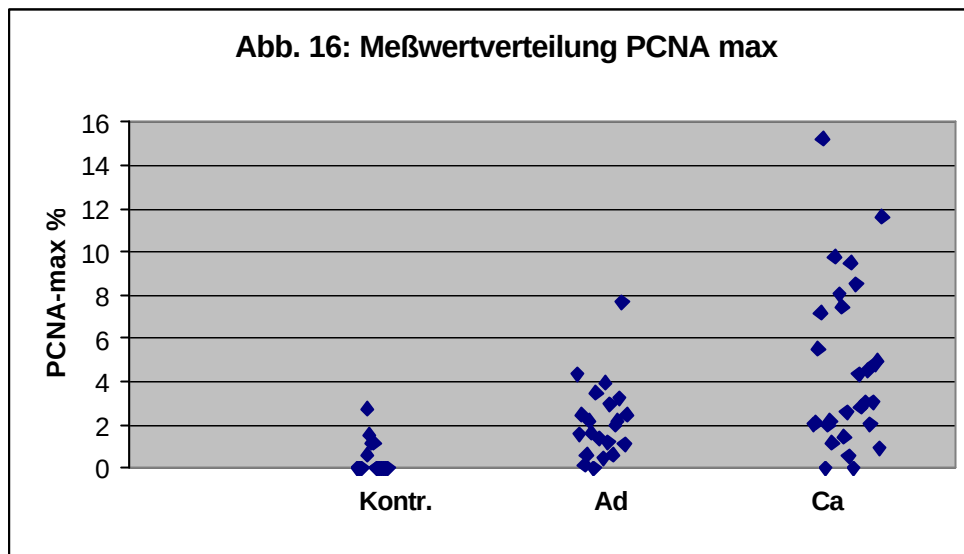


Abb. 15: Meßwertverteilung PCNA mean





4.4 Diagnostische Dateninterpretation zur Differenzierung zwischen follikulären Adenomen und Karzinomen sowie zwischen normalem Schilddrüsenparenchym und Tumoren der Schilddrüse

Zur Bewertung der vier Parameter $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$, $\text{MIB-1}_{\text{max}}$, $\text{PCNA}_{\text{mean}}$ und PCNA_{max} auf ihre Eignung in der Differentialdiagnostik von Schilddrüsenadenomen und Schilddrüsenkarzinomen wurden unter der Verwendung verschiedener Grenzwerte Sensitivitäten und Spezifitäten zur Unterscheidung zwischen Adenom und Karzinom einerseits sowie zwischen Tumor und normalem Schilddrüsenparenchym (abgekürzt „n.P.“) andererseits errechnet.

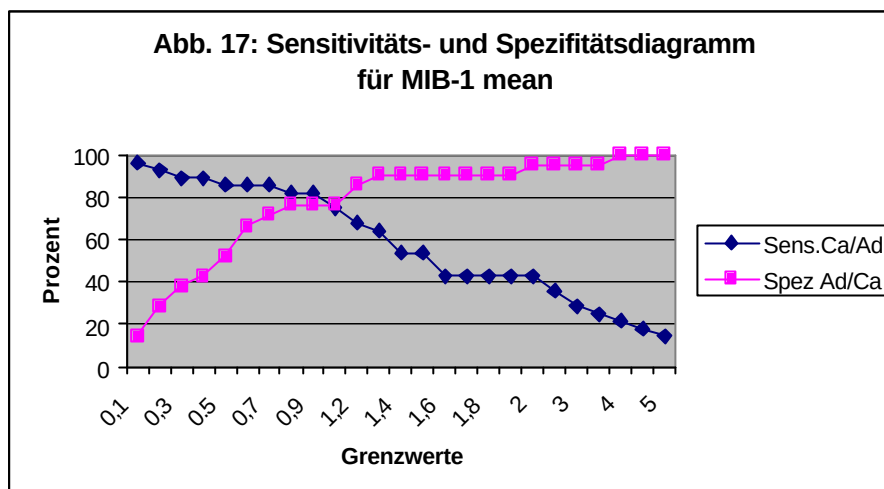
4.4.1 MIB-1_{mean}

Bei einem MIB-1_{mean}-Wert von 0,8% wurden die follikulären Schilddrüsenkarzinome mit einer Sensitivität von 82,1% (23/28) erfaßt, wobei die Spezifität zur Erkennung eines follikulären Adenoms 76,2% (16/21) betrug (vgl. Tab. 5 und Abb. 17). Bei Erhöhung der Spezifität auf über 90% (90,5%, 19/21), sank gleich-

zeitig die Sensitivität auf 64,3% (18/28). Der dazugehörige Grenzwert lag bei 1,3%.

Tab. 5: Sensitivität und Spezifität von MIB-1_{mean} in der Differentialdiagnostik von follikulären Schilddrüsentumoren

MIB-1 _{mean} [%]	Sensitivität [%] zur Erkennung		Spezifität [%] zur Erkennung	
	eines		eines	
	Karzinoms	Tumors	Adenoms	n.P.
	in Abgrenzung zu einem			
	Adenom	n.P.	Karzinom	Tumor
0,1	96,4	91,8	14,3	40
0,2	92,9	83,7	28,6	66,7
0,3	89,3	77,6	38,1	100
0,4	89,3	75,5	42,9	100
0,5	85,7	69,4	52,4	100
0,6	85,7	63,3	66,7	100
0,7	85,7	61,2	71,4	100
0,8	82,1	57,1	76,2	100
0,9	82,1	57,1	76,2	100
1	75,0	53,1	76,2	100
1,2	67,8	44,9	85,7	100
1,3	64,3	40,8	90,5	100
1,4	53,6	34,7	90,5	100
1,5	53,6	34,7	90,5	100
1,6	42,9	28,6	90,5	100
1,7	42,9	28,6	90,5	100
1,8	42,9	28,6	90,5	100
1,9	42,9	28,6	90,5	100
2	42,9	26,5	95,2	100
4	21,4	12,2	100	100



Bei den follikulären Schilddrüsenadenomen trat nur ein MIB-1_{mean}-Wert > 2% auf. Dieser betrug 3,7%. Daraus läßt sich folgern, daß bei einem MIB-1_{mean}-Wert von > 2% durch weitere Schnittdiagnostik ein Karzinom anhand des histologischen Nachweises eines Tumoreinbruchs in die Organkapsel, Gefäße oder in das umliegende Parenchym sichergestellt oder ausgeschlossen werden sollte. Niedrige MIB-1_{mean}-Werte (< 2%) kamen sowohl bei follikulären Schilddrüsenadenomen, als auch bei den follikulären Schilddrüsenkarzinomen vor. Somit lassen sich anhand niedriger Meßergebnisse (MIB-1_{mean} < 2%) offenbar keine definitiven Rückschlüsse auf die Dignität des Tumors ziehen.

Im t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der MIB-1_{mean}-Datenverteilung zwischen follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen ($p = 0,0012$).

Bei einem Grenzwert von 0,2% betrug die Sensitivität zur Erkennung eines Tumors in Abgrenzung zu normalem Parenchym 83,7% (41/49); die Spezifität zur Abgrenzung des normalen Schilddrüsenparenchyms von einem Tumor lag dabei bei 66,7% (10/15). Bei einem Grenzwert von 0,3%

wurde eine Spezifität zur Erkennung des normalen Schilddrüsenparenchyms im Vergleich zu einem Tumor von 100% (15/15) erreicht; die dazugehörige Sensitivität betrug 77,6% (38/49). Der höchste MIB-1_{mean}-Wert der Kontrollen lag bei 0,27%. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei einem MIB-1_{mean}-Wert von > 0,3% circa drei Viertel der follikulären Tumoren in Abgrenzung zu normalem Parenchym erkannt wurden. Liegen MIB-1_{mean}-Werte von > 0,3% vor, so sollte bei entsprechender klinischer Fragestellung weiteres Material zur Sicherung eines follikulären Tumors histologisch begutachtet werden.

4.4.2 MIB-1_{max}

Eine geringere Aussagekraft als MIB-1_{mean} wiesen die MIB-1_{max}-Werte auf. Es wurde bei einem Grenzwert von 4,5% eine Sensitivität von 67,9% (19/28) erreicht, wobei die Spezifität 66,7% (14/21) betrug. Um eine höhere Spezifität, von z.B. 85,7% (18/21) zu erzielen, wurde bei einem Grenzwert von 5,5% eine Sensitivität von lediglich 64,3% (18/28) erreicht (Tab. 6, Abb. 18).

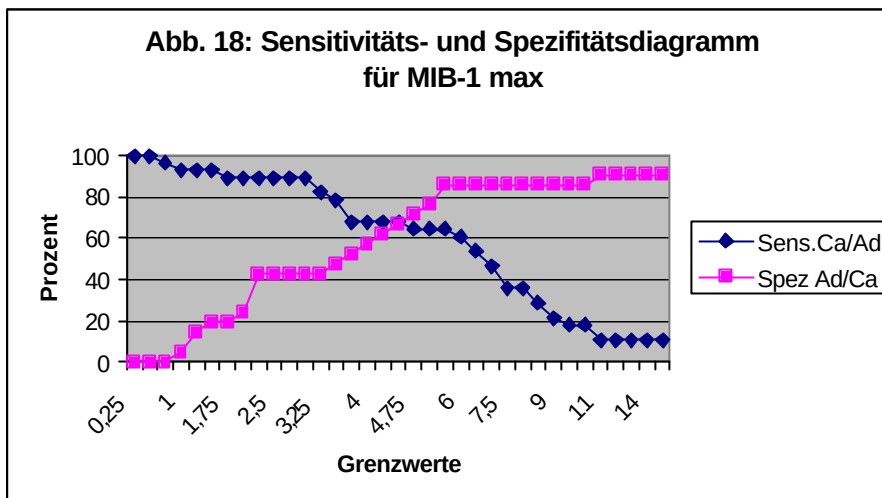
Die Aussagekraft der MIB-1_{max}-Werte war somit schwächer als die von MIB-1_{mean}. Es ist daher anscheinend nicht ausreichend, den Fokus maximaler MIB-1-Immunreaktivität herauszusuchen, um eine hinreichende diagnostische Abgrenzung zwischen follikulären Schilddrüsenadenomen und follikulären Schilddrüsenkarzinomen vornehmen zu können.

Im t-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der MIB-1_{max}-Datenverteilung ($p = 0,7168$) follikulärer Adenome und follikulärer Karzinome.

Tab. 6: Sensitivität und Spezifität von MIB-1_{max} in der Differentialdiagnostik von follikulären Schilddrüsentumoren

MIB-1 _{max} [%]	Sensitivität [%] zur Erkennung		Spezifität [%] zur Erkennung	
	eines		eines	
	Karzinoms	Tumors	Adenoms	n.P.
	in Abgrenzung zu einem			
	Adenom	n.P.	Karzinom	Tumor
0,5	100	100	0	0
1	92,9	93,9	4,8	33,3
1,5	92,9	87,8	19,1	73,3
2	89,3	83,7	23,8	100
2,5	89,3	75,5	42,9	100
3	89,3	75,5	42,9	100
3,5	78,6	67,4	47,6	100
4	67,9	57,1	57,1	100
4,5	67,9	53,1	66,7	100
5	64,3	46,9	76,2	100
5,5	64,3	42,9	85,7	100
6	60,7	40,8	85,7	100
6,5	53,6	36,7	85,7	100
7	46,4	32,7	85,7	100
7,5	35,7	26,5	85,7	100
8	35,7	26,5	85,7	100
8,5	28,6	22,5	85,7	100
9	21,4	18,4	85,7	100
10	17,9	16,3	85,7	100
15	10,7	12,2	90,5	100

Für die Trennbarkeit der untersuchten Fallgruppen bedeutet das Ergebnis der Tabelle folgendes:



Bei einem Grenzwert von 1,75% lag eine Sensitivität zur Erkennung eines Tumors in Abgrenzung zu normalem Parenchym von 85,7% (42/49) vor. Bei dem gleichen Grenzwert wurde eine Spezifität von 86,7% (13/15) erreicht. Nur ein MIB-1_{max}-Wert lag bei dem normalen Parenchym mit 1,79% über einem Wert von 1,75%. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß mit Hilfe von MIB-1_{max} eine bessere Differenzierung zwischen follikulären Schilddrüsentumoren und normalem Schilddrüsenparenchym vorgenommen werden konnte als mit MIB-1_{mean}. Diese Abgrenzung hat jedoch wenig klinische Relevanz. Im Vordergrund steht die Abgrenzung follikulärer Schilddrüsenadenome von follikulären Schilddrüsenkarzinomen, wo wie bereits gezeigt die Aussagekraft von MIB-1_{max} hinter der von MIB-1_{mean} zurückblieb.

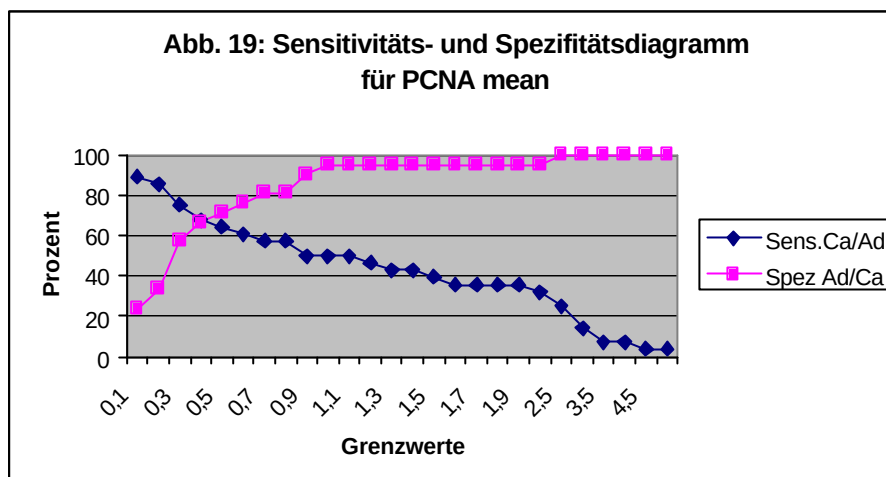
4.4.3 PCNA_{mean}

Für die PCNA_{mean}-Werte ergab sich bei einem Grenzwert von 0,5% eine Sensitivität zur Erfassung eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms gegenüber eines -adenoms von 64,3% (18/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 71,4% (15/21). Bei einer Spezifität von 95,2% wurde bei einem Grenzwert von 1,0% eine Sensitivität von 50% erzielt. Dies bedeu-

tet, daß 50% der Karzinome nicht erkannt wurden. Die Ergebnisse von PCNA_{mean} lagen in ihrer Aussagekraft also deutlich hinter denen für MIB-1 mean, wo bei einem Grenzwert von 1,3% eine Sensitivität von 64,3% und eine Spezifität von 90,5% erzielt wurde.

Tab. 7: Sensitivität und Spezifität von PCNA_{mean} in der Differentialdiagnostik von follikulären Schilddrüsentumoren

PCNA _{mean} [%]	Sensitivität [%] zur Erkennung		Spezifität [%] zur Erkennung	
	eines		eines	
	Karzinoms	Tumors	Adenoms	n.P.
	in Abgrenzung zu einem			
	Adenom	n.P	Karzinom	Tumor
0,1	89,3	83,7	23,8	93,3
0,2	85,7	77,6	33,3	93,3
0,3	75	61,2	57,1	100
0,4	67,9	53,1	66,7	100
0,5	64,3	49,0	71,4	100
0,6	60,7	44,9	76,2	100
0,7	57,1	40,8	81,0	100
0,8	57,1	40,8	81,0	100
0,9	50	32,7	90,5	100
1,0	50	30,6	95,2	100
1,2	46,4	28,6	95,2	100
1,4	42,9	26,5	95,2	100
1,6	35,7	22,5	95,2	100
1,8	35,7	22,5	95,2	100
2,0	32,1	20,4	95,2	100
2,5	25	14,3	100	100
3,0	14,3	8,2	100	100
3,5	7,1	4,1	100	100
4,0	7,1	4,1	100	100
4,5	3,6	2,0	100	100
5,0	3,6	2,0	100	100



Ähnlich wie bei den MIB-1_{mean}-Werten lag bei den follikulären Adenomen nur ein PCNA_{mean}-Wert mit 2,29% über 1%. Insofern könnte auch ein mittlerer PCNA-Färbeindex von über 1% Anlaß zu einer weiteren histologischen Diagnostik hinsichtlich eines Kzinomausschlusses geben und somit in Grenzfällen eine Zusatzinformation liefern. Jedoch liessen ebenso wie bei MIB-1_{mean} niedrige Färbeindizes (bei PCNA_{mean} < 1%) keinen Rückschluß auf Malignität oder Benignität des Tumors zu, da 50% der follikulären Karzinome ebenfalls PCNA_{mean}-Werte unter 1% aufwiesen.

Im t-Test fand sich allerdings ein signifikanter Unterschied in der PCNA_{mean}-Datenverteilung ($p = 0,0027$) zwischen Adenomen und Karzinomen.

Das normale Schilddrüsenparenchym zeigte eine niedrigere PCNA-Expression als MIB-1-Expression. Nur in 4 der 15 Fälle ließ sich eine PCNA-Anfärbung nachweisen. Bei einem Grenzwert von 0,1% betrug die Sensitivität zur Abgrenzung eines Tumors gegenüber dem normalen Schilddrüsenparenchym 83,7% (41/49); die Spezifität lag dabei bei 93,3% (14/15). Bei einem Grenzwert von 0,3% fand sich eine Sensitivität von 61,2% (30/49); wobei eine Spezifität von 100% (15/15) erreicht wurde.

Somit sollten bereits $PCNA_{mean}$ -Werte $> 0,1\%$ als verdächtig gelten und bei entsprechender klinischer Notwendigkeit Anlaß zur weiteren histologischen Begutachtung geben, da nach den vorliegenden Ergebnissen mit $PCNA_{mean}$ -Werten $> 0,1\%$ in über 80% ein follikulärer Tumor vorlag.

4.4.4 $PCNA_{max}$

Bei den $PCNA_{max}$ -Werten ergab sich bei einem Grenzwert von 2,5% eine Sensitivität zur Erkennung eines Karzinoms von 60,7% (17/28) bei einer Spezifität zur Erfassung eines Adenoms in Abgrenzung zu einem Karzinom von 71,4% (18/21). Um eine Spezifität von 90,5% (18/21) zu erreichen sank die Sensitivität auf 46,4% (13/28) ab. Der dazugehörige Grenzwert lag bei 4%.

Tab. 8: Sensitivität und Spezifität von $PCNA_{max}$ in der Differentialdiagnostik von follikulären Schilddrüsentumoren

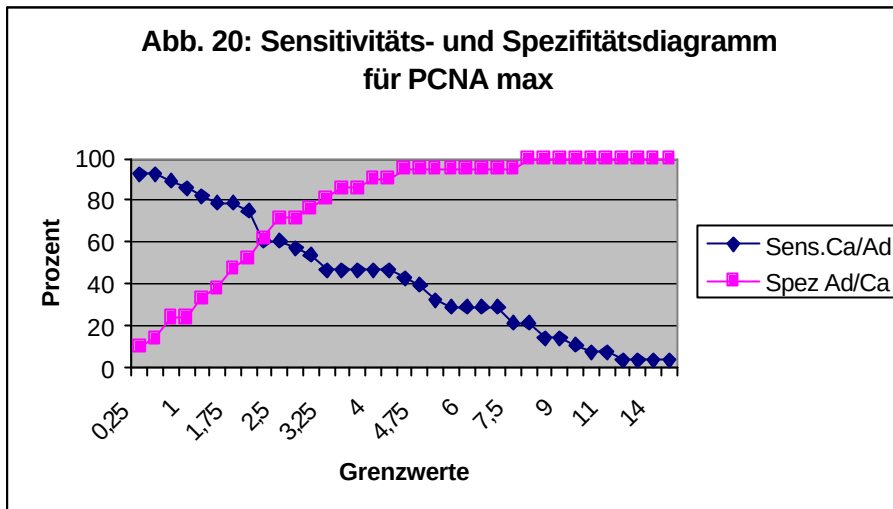
$PCNA_{max}$ [%]	Sensitivität [%] zur Erkennung		Spezifität [%] zur Erkennung	
	eines		eines	
	Karzinoms	Tumors	Adenoms	n.P.
	in Abgrenzung zu einem			
	Adenom	n.P	Karzinom	Tumor
0,25	92,9	91,8	9,5	73,3
0,5	92,9	89,8	14,3	73,3
0,75	89,3	83,7	23,8	80
1	85,7	81,6	23,8	80
1,25	82,1	75,5	33,3	93,3
1,5	78,6	71,4	38,1	93,3
1,75	78,6	67,4	47,6	100

Tab. 8 (Fortsetzung): Sensitivität und Spezifität von PCNA_{max} in der Differentialdiagnostik von follikulären Schilddrüsentumoren

PCNA _{max} [%]	Sensitivität [%] zur Erkennung		Spezifität [%] zur Erkennung	
	eines		eines	
	Karzinoms	Tumors	Adenoms	n.P.
	in Abgrenzung zu einem			
	Adenom	n.P	Karzinom	Tumor
2,0	75,0	63,3	52,4	100
2,5	60,7	46,9	71,4	100
3,0	53,6	40,8	76,2	100
3,5	46,4	32,7	85,7	100
4,0	46,4	30,6	90,5	100
4,5	42,9	26,5	95,2	100
5,0	32,1	20,4	95,2	100
6,0	28,6	18,4	95,2	100
7,0	28,6	18,4	95,2	100
8,0	21,4	12,2	100	100
9,0	14,3	8,2	100	100
10	7,1	4,1	100	100
12	3,6	2,0	100	100

Diese Werte lagen in ihrer Aussagekraft hinter denen von PCNA_{mean}. Es war somit ebenso wie bei MIB-1_{max} nicht ausreichend sich den stärksten PCNA-immunreaktiven Fokus herauszusuchen, um eine Differenzierung zwischen Adenom und Karzinom vornehmen zu können.

Im t-Test fand sich allerdings durchaus ein signifikanter Unterschied in der PCNA_{max}-Datenverteilung ($p = 0,0110$) zwischen follikulären Adenomen und Karzinomen.



Bei den PCNA_{max}-Werten ergab sich bei einem Grenzwert von 0,75% eine Sensitivität zur Erkennung eines Tumors in Abgrenzung zu normalem Parenchym von 83,7% (41/49) bei einer Spezifität von 80% (12/15). Bei einem Grenzwert von 1,75% wurde eine Spezifität von 100% (15/15) erreicht, wobei sich die Sensitivität auf 67,4% (33/49) verringerte. Somit konnte mit Hilfe von PCNA_{max} eine bessere Differenzierung zwischen normalem Schilddrüsenparenchym und einem follikulären Tumor erzielt werden als mit PCNA_{mean}. Wird eine maximale Immunreaktivität von > 1,75% erzielt, sollte dies zur histologischen Begutachtung weiterer Schnitte Anlaß geben, da nach den vorliegenden Daten in über 2/3 der Fälle ein follikulärer Tumor zu finden war.

5. Diskussion

Wie bereits zuvor ausgeführt, ist die Dignitätsbestimmung follikulärer Schilddrüsentumoren nicht immer einfach und bedarf zum Teil erheblicher diagnostischer Bemühungen. Ergänzende morphologische oder molekulare Methoden, die sich mit hoher Sensitivität und Spezifität sowie einem akzeptablen Zeit- und Kostenaufwand einführen ließen, sind somit in der diagnostischen Schilddrüsenpathologie von großem Interesse.

Um einschätzen zu können, wie weit etwaige Schwierigkeiten in der morphologischen Schilddrüsendiagnostik reichen, ist es zunächst hilfreich, die Standards der Makroskopie und der histologischen Aufarbeitung sowie ihre Umsetzung zu betrachten.

5.1 Standards in der makroskopischen und histologischen Aufarbeitung von Schilddrüsenresektaten

Das seit 1953 existierende Werk „Ackerman's Surgical Pathology“, das, inzwischen herausgegeben von Juan Rosai, nunmehr in der 2004 erschienenen neunten Auflage vorliegt (Rosai 2004), kann als das allgemein anerkannte Standardwerk der diagnostischen Pathologie nicht nur im angloamerikanischen, sondern auch im deutschen Sprachraum gelten. Im Anschluß an die Kapitel, die einzelne Organsysteme abhandeln, sind in Anhängen u.a. auch Vorgaben für die Aufarbeitung von Operationspräparaten gemacht („Appendix E“). Diese werden dabei sowohl auf die persönliche Erfahrung des Herausgebers („mainly derived from personal experience“), aber auch auf über die Jahre gewachsene Vorgehensweisen zweier renommierter US-amerikanischer Institute für Pathologie (Barnes-Hospital in St. Louis bzw. Stanford University) bezogen.

Gegliedert werden diese Vorgaben jeweils in drei Punkte, nämlich in die makroskopische Betrachtung und Präparation („Procedure“), in die Festle-

gung der in den makroskopischen Befund aufzunehmenden Details („Description“) und in die Festlegung der zur Histologie einzubettenden Schnittführungen („Sections for histology“).

Für die Bearbeitung der Schilddrüsenresektate wird konkret vorgeschlagen:

1. „Procedure“: Wiegen und Messen des Präparates; Orientierung des Präparates und Zerlegung in 5 mm breite Längsschnitte; Darstellung etwaiger Nebenschilddrüsen im anhängenden Fettgewebe
2. „Description“: Art des Resektates (Lobektomie, Isthmusresektat, subtotale oder totale Thyroidektomie); Gewicht, Maße, Form, Farbe und Konsistenz des Gewebes; Beschaffenheit der Schnittfläche im Vergleich homogen zu knotig; bei Nachweis von Knoten Größe, Zahl und Beschaffenheit der Knoten (zystisch, verkalkt, hämorrhagisch, nekrotisch, gekapselt, invasiv) sowie Abstand der Knoten zum Resektionsrand
3. „Sections for histology“:
 - bei diffusen oder entzündlichen Veränderungen: drei Gewebsblöcke pro Lappen und einer vom Isthmus
 - bei solitärem Knoten bis 5 cm Größe: Einbettung von Gewebe unter Einbeziehung der gesamten Kapselstruktur einer makroskopischen Schnittebene inklusive angrenzendem Schilddrüsenparenchym sowie Einbettung jeweils eines weiteren Gewebeblocks pro Zentimeter Knotengröße
 - bei multinodalen Resektaten: Einbettung jeweils eines Gewebeblocks pro Knoten unter Einbeziehung der Kapsel und des angrenzenden Schilddrüsenparenchyms; weitere Gewebeblocks bei größeren Knoten

- bei papillärem Karzinom: Einbettung des gesamten Resektates unter separater Darstellung des Resektionsrandes
- bei grob-invasiven nicht-papillären Karzinomen: drei Gewebeblöcke vom Tumor, drei weitere vom makroskopisch tumorfreien Gewebe und ein weiterer aus dem Resektionsrand
- in allen Fällen Einbettung von etwaig makroskopisch nachweisbaren Nebenschilddrüsengewebe

Faßt man die Erfahrungen in diversen Instituten für Pathologie zusammen (Biesterfeld 2004), so läßt sich feststellen, daß bezüglich der ersteren beiden Aspekte überall eine weitestgehend gleichartige Vorgehensweise besteht, so daß die gemachten Vorgaben als in die Realität umgesetzt betrachtet werden können. Für den dritten Aspekt, die Auswahl und die Menge des in Gewebeblöcken einzubettenden Materials, kann dies hingegen nicht vorausgesetzt werden.

Hier ist es offenbar vielmehr so, daß außerhalb der universitären Institute, die sich in etwa an die Vorgaben halten, viel weniger eingebettet wird, so daß die Beurteilung follikulärer Schilddrüsentumoren oft schnell an Grenzen stößt. Geht man von einer durchschnittlichen Größe von 2 cm bis 3 cm aus, so kann man sich leicht vorstellen, daß ca. 6 bis 9 Paraffinblöcke in Stufen aufgearbeitet werden müßten, um einen ausreichenden Aufschluß über die Dignität einer follikulären Schilddrüsenläsion zu gewinnen. Berücksichtigt man darüber hinaus, daß in vielen Schilddrüsenresektaten multiple Knoten vorkommen, so ist klar, daß nur eine bedingt vollständige Untersuchung erfolgen kann.

Derzeit kann man davon ausgehen, daß in universitären oder anderen Krankenhausinstituten ca. 4 bis 5 Blöcke pro größerem Resektat eines Schilddrüsenlappens eingebettet werden und daß Privatinstitute üblicher-

weise nicht mehr als 2 Blöcke vorsehen - Stufenschnitte sind dabei jeweils nicht vorgesehen.

Dies bedeutet, daß man üblicherweise nicht die Genauigkeit in der Schilddrüsenbeurteilung erreicht, die man sich eigentlich wünschen sollte. Zu wenig eingebettetes Material oder auch zu wenig Einbettung aus Kapselbereichen von Knoten bedeutet schließlich, daß zum einen die Gefahr besteht, manchen kleinen follikulären Tumor gar nicht zu untersuchen bzw. nicht ausreichend sicher ein minimal invasives follikuläres Karzinom in einem follikulären Adenom auszuschließen.

Als Konsequenz wird es immer wieder Fälle geben, in denen eine in Wahrheit vorhandene Invasion eines follikulären Schilddrüsentumors nicht erkannt wird und somit fälschlich statt eines follikulären Karzinoms ein follikuläres Adenom diagnostiziert wird. Innerhalb von ca. 10 Jahren kann man in einem größeren Institut mit ein bis zwei Fällen rechnen, die aufgrund des Auftretens von Metastasen als Fehldiagnosen manifest werden. Darüber hinaus wird es eine gewisse Dunkelziffer von Fällen geben - geht man davon aus, daß in weniger als einem Drittel der Fälle der operierten differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinome der Stadien T1 bis T3 überhaupt Rezidive oder Metastasen auftreten (Hölzel et al. 1996), so wird offensichtlich, daß manche derartige Fehldiagnosen ohne klinische Konsequenzen bleiben werden.

Doch selbst wenn eine genauere Einhaltung der oben diskutierten Vorgaben in der Routineaufarbeitung der Schilddrüsenresektate vorgenommen würde, so stieße doch der notwendige Aufwand, um jede noch so kleine Läsion sicher richtig zu diagnostizieren, an eine Grenze des Machbaren. Daher bleibt zu überlegen, in wie weit neuere Methoden der Morphologie und der Molekularbiologie hilfreich sein könnten.

5.2 Relevanz ergänzender molekularer und morphologischer Untersuchungsmethoden

Die in der Einleitung aufgenommenen Untersuchungen mit diversen methodischen und inhaltlichen Ansätzen lassen erkennen, daß bisher nur wenige Marker vorhanden sind, von denen man sich eine gewisse Verbesserung der Diagnostik versprechen kann, und daß diese oft nur an noch überschaubaren kleinen Kollektiven überprüft sind. Letzteres hat dabei sicher auch damit zu tun, daß selbst in großen Instituten nur wenige Fälle follikulärer Schilddrüsenkarzinome zur Verfügung stehen. Dies verdeutlicht auch die hier vorgenommene Untersuchung, die die über 8 Jahre archivierten Fälle zweier Institute für Pathologie mit einem jährlichen Gesamteingang von mehr als 80.000 Fällen nutzen konnte und sich dennoch nur auf ca. 30 Fälle bezieht.

5.2.1 Molekularbiologische Anwendungen und Bestimmung von Differenzierungsmarkern

Die chromosomalen und molekularpathologischen Marker haben bisher noch keine für die Differentialdiagnostik von Schilddrüsentumoren relevanten Ergebnisse erbracht; ihre Daten sind im weitesten Sinne noch als experimentell zu bezeichnen; dies gilt sowohl für die CGH-basierten chromosomalen Untersuchungen (Roque et al. 2003), als auch für das PAX8-PPARGamma-Fusionsonkogen (Cheung et al. 2003) oder für andere molekularpathologische Ansätze wie tumorspezifische mRNA-Bestimmungen (Takano et al. 2002). Dennoch ist es eine attraktive Vorstellung, molekulare Techniken in Zukunft auch bei Schilddrüsentumoren vermehrt experimentell anzuwenden, um in einem späteren Schritt für klinische Fragestellungen relevante Anwendungen herauszuarbeiten.

Von den Differenzierungsmarkern verspricht bisher nur Galectin-3 eine gewisse Relevanz in der Differentialdiagnostik follikulärer Tumoren. So-

wohl die verschiedene Rate positiver Fälle (84% bei Karzinomen im Vergleich zu 15% bei den Adenomen) als auch das unterschiedliche Färbemuster positiver Fälle (Karzinome: diffus, Adenome: Zellcluster) spricht für die Anwendbarkeit dieses Markers auch in der Praxis. Die Werte für Sensitivität und Spezifität sind mit 84,1% bzw. 85,1% akzeptabel, wenn auch nicht optimal. Besonders interessant ist darüber hinaus unter tumorbiologischen Gesichtspunkten, daß nicht nur die Tumorstromawachstumsfront, sondern auch das ansonsten nicht gegenüber Adenomen abgrenzbare Karzinomgewebe im Zentrum des Tumors mitgefärbt ist (Coli et al. 2000).

Dementgegen lassen die Ergebnisse mit der Retinoblastomprotein-Expression oder der Bestimmung der Telomeraseaktivität keine klaren differentialdiagnostischen Aussagen erwarten. Ähnliches gilt auch für die Bestimmung der Typ-1-Blutgruppenantigene und mutmaßlich auch für TTF-2, dessen Werte für Sensitivität und Spezifität mit 44,4% bzw. 28,5% zu niedrig sind, um in der Routinediagnostik von wirklichem Nutzen zu sein (Sequeira et al. 2001).

5.2.2 Untersuchungen zur DNA-Zytometrie

Bei den in einer Übersichtsarbeit von Grant et al. (1990) zusammengefaßten Daten, die DNA-zytometrische Messungen an 474 follikulären Adenomen und 335 follikulären Karzinomen berücksichtigen, wurde als diagnostisches Kriterium die DNA-Stammlinienploidie zugrundegelegt. Eine nicht-diploide DNA-Stammlinie lag in 43,1% der follikulären Adenome (143/332) und in 59% der follikulären Karzinome (196/335) vor ($p > 0,05$); entsprechend betragen die Werte für Sensitivität und Spezifität nur 58,5% und 56,9%. Dies bedeutet, daß die DNA-Stammlinienploidie nicht geeignet ist, um ausreichend sicher zwischen beiden Tumorentitäten zu differenzieren.

Andere DNA-zytometrische Parameter wurden hingegen nicht berücksichtigt, so daß nicht sicher ist, ob sich gegebenenfalls nicht diagnostisch günstigere Resultate mit Parametern erzielen ließen, die statt der Lage der DNA-Stammlinie die DNA-Verteilung als ganze (z.B. 2cDI, Entropie oder mittlere Ploidie) bzw. das Vorkommen erhöhter DNA-Einzelwerte (z.B. 5cEE, 9cEE) beurteilten. Zumindest ließ sich an einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, zu dieser Studie ähnlich aufgebauten Arbeit an Leiomyomen und Leiomyosarkomen zeigen, daß modernere DNA-zytometrische Parameter als die DNA-Stammlinie durchaus zu einer besseren diagnostischen Trennung der beiden Tumorentitäten geeignet waren (Thiel 2004).

5.2.3 Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose

Da die hier vorgenommene Untersuchung mit MB-1 und PCNA in den Formenkreis der Proliferationsbestimmung einzuordnen ist, soll auf dieses Anwendungsfeld im folgenden etwas detaillierter eingegangen werden. Bei der Vielfalt der in der Literatur nachweisbaren Arbeiten zu beiden Markern (MIB-1/Ki-67: 7971, PCNA: 7186; Stand Januar 2004 [PubMed-Datenbank]) fällt allerdings auf, daß sich hiervon nur sehr wenige auf differentialdiagnostische Fragestellungen an Schilddrüsenläsionen beziehen.

Für MIB-1 (Tabelle 9) ist ein eindeutiger Trend auszumachen; alle Datensätze lassen erkennen, daß im normalen Kontrollparenchym die geringsten Werte ermittelt werden und daß sich follikuläre Adenome und follikuläre Karzinome unterscheiden, meistens auch auf signifikantem Niveau. Dies bedeutet allerdings formal nur, daß Unterschiede in der Datenverteilung nachweisbar sind; ein unmittelbarer diagnostischer Wert kommt dieser Tatsache aber nicht zu. Hierfür sind vielmehr statistische Kennwerte wie Sensitivität und Spezifität wesentlich, welche aber bedauerlicherweise vielfach nicht angeboten werden.

Tab. 9: Literaturübersicht zur MIB-1-Expression von follikulären Schilddrüsentumoren im Vergleich zum normalen Parenchym; Mittelwerte und Standardabweichungen.

Autoren	MIB-1/Ki-67-Positivität [%]		
	Normales Parenchym	Follikuläres Adenom	Follikuläres Karzinom
Eigene Arbeit 2004	0,14 +/- 0,08	0,69 +/- 0,83	2,52 +/- 2,31
Almudévar et al. 2000	keine Angaben	0,34	2,90
Lewy-Trenda und Bienkiewicz 1999	0,17 +/- 0,39	1,3 +/- 1,49	3,29 +/- 1,38
Erickson et al. 1998	2,4 +/- 0,7	4,5 +/- 0,6	15,3 +/- 3,1
Resnick et al. 1998	0,4 +/- 0,6	1,4 +/- 1,1	Subtypen: e. 3,8 +/- 2,6 f. 5,6 +/- 2,8
Yoshida et al. 1999	0,2 +/- 0,2	0,5 +/- 0,7	0,9 +/- 0,2
Kato et al. 1995	0,19 +/- 0,04	1,38 +/- 0,2 Subtypen: a. 0,9 +/- 0,2 b. 1,7 +/- 0,4 c. 3,03 +/- 0,84 d. 1,49 +/- 0,53	3,18 +/- 0,17 Subtypen: e. 2,0 +/- 0,41 f. 5,18 +/- 1,14

Erläuterungen: Follikuläre Adenome: a = normo-/makrofollikulär, b = tubulär, c = solide/trabekulär, d = oxyphil. Follikuläre Karzinome: e = minimal invasiv, f = grob invasiv.

In der Literatur fanden sich für das normale Schilddrüsenparenchym MIB-1_{mean}-Werte zwischen 0,17% +/- 0,39 (Lewy-Trenda und Bienkiewicz 1999) und 2,4% +/- 0,7 (Erickson et al. 1998). Die Ergebnisse der vorlie-

genden Arbeit waren mit MIB-1_{mean}-Werten von 0,14% +/- 0,08 für das normale Schilddrüsenparenchym vergleichsweise niedrig. Für die follikulären Adenome zeigten sich in der Literatur MIB-1_{mean}-Werte von 0,5% +/- 0,7 (Yoshida et al. 1999) bis 4,5% +/- 0,6 (Erickson et al. 1998). Der mittlere MIB-1-Wert der eigenen Arbeit von 0,69% +/- 0,83 lag somit im unteren Bereich der in der Literatur zur findenden Ergebnisse. Die follikulären Karzinome wiesen in den verschiedenen Studien MIB-1_{mean}-Werte von 0,9% +/- 0,2 bis 15,6% +/- 3,1 (Erickson et al. 1998). Mit mittleren MIB-1-Werten von 2,52% +/- 2,31 lagen die Ergebnisse der eigenen Arbeit gut im durch die Literatur abgesteckten Bereich.

In fast allen bisher erschienen Arbeiten konnten signifikante Unterschiede für die MIB-1_{mean}-Werte der follikulären Adenome im Vergleich zu den follikulären Karzinomen herausgearbeitet werden. So wiesen Lewy-Trenda und Bienkiewicz (1999) statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der MIB-1-Expression zwischen follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen nach. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Erickson et al. (1998) mit einer statistisch signifikanten Unterscheidung der beiden Tumore von $p = 0,006$, Resnick et al. (1998) mit einem p-Niveau von $p < 0,005$, Yoshida et al. (1999) mit einem p-Niveau von $< 0,05$. Katoh et al. (1995) fanden nur statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,01$) für die normo- und makrofollikulären Adenome im Vergleich zu den follikulären Karzinomen. Zwischen den hyperzellulären Adenomen (solide, trabekuläre und tubuläre Subtypen) und den follikulären Karzinomen konnten die Autoren keinen statistisch signifikanten Unterschied nachweisen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine statistisch signifikante Verteilung der MIB-1_{mean}-Ergebnisse der follikulären Adenome und der follikulären Karzinome auf einem p-Niveau von 0,0012. In allen erwähnten Arbeiten fanden sich allerdings starke Restüberschneidungen zwischen follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen, so daß keine zweifelsfreie Diagnose anhand der MIB-1-Expression möglich sein dürfte.

Unser eigenes Kollektiv ließ bei optimaler Grenzwertsetzung ($\text{MIB-1}_{\text{mean}}: 1.3\%$) eine Sensitivität von 64.3% bei einer Spezifität von 90.5% zu (vgl. Tab. 5 und Abb. 17). Eine Arbeit aus der renommierten Mayo-Klinik an 16 follikulären Adenomen und 23 follikulären Karzinomen erreichte bei einem Grenzwert für die mittlere MIB-1-Expression von 10,5% eine Sensitivität von 56,5% bei einer Spezifität von 100% (Erickson et al. 1998). Paßt man sich in unserem eigenen Kollektiv der Forderung nach einer Spezifität von 100% an, so läßt sich eine Sensitivität von nur noch 21,4% erreichen ($\text{MIB-1}_{\text{mean}}: 4\%$). Gute Aussichten auf höhere Werte für die diagnostische Treffsicherheit bestünden theoretisch für die Studie von Almudévar et al. (2000), bei der die MIB-1-Mittelwerte der follikulären Karzinome (2,90%, $n = 31$) ca. 8,5mal so hoch waren wie die der follikulären Adenome (0,34%, $n = 36$), jedoch fehlen hier selbst die Angaben für die Standardabweichung, so daß sich nur mutmaßen läßt.

Dies bedeutet, daß sich trotz der vollkommen unvergleichbaren Rohwerte, die im Vergleich zu den übrigen in Tabelle 9 dargestellten Datenverteilungen in der Mayo-Klinik unerklärlich hoch waren, in etwa noch ähnliche diagnostische Resultate herausgearbeitet werden können.

Insgesamt ist der Stand somit, daß mit der Analyse der MIB-1-Expression nur eine bedingte Aussage über die Dignität eines follikulären Schilddrüsens tumors getroffen werden kann. Die Tatsache allerdings, daß oberhalb eines Wertes von 2% fast keine Adenome mehr vorkamen, ist in unserem Kollektiv als möglicher Indikator dafür zu sehen, bei der Diagnose „Follikuläres Adenom“ für den Fall einer über 2% hinausgehenden MIB-1-Expression weiteres Material einzubetten und die histologische Begutachtung hinsichtlich Kapsel- und/oder Gefäßinvasion zu intensivieren.

Für PCNA ist die Datenlage vor Durchführung unserer Studie noch weitgehend unklar gewesen (Tabelle 10).

Tab. 10: Literaturübersicht zur PCNA-Expression von follikulären Schilddrüsentumoren im Vergleich zum normalen Parenchym; Mittelwerte und Standardabweichungen

Autoren	PCNA-Positivität [%]		
	Normales Parenchym	Follikuläres Adenom	Follikuläres Karzinom
eigene Arbeit 2004	0,05 +/- 0,1	0,42 +/- 0,51	1,49 +/-1,48
Shimizu et al. 1993	0,6 +/- 0,3	2,0 +/- 0,9	3,6 +/- 1,3
Czyz et al. 1994	keine Angaben	≤ 5 in 53% der Fälle (26/49) ≥ 5 in 47% der Fälle (23/49)	≤ 5 in 36% der Fälle (4/11) ≥ 5 in 64% der Fälle (7/11)

In der Arbeit von Shimizu et al. 1993 zeigte sich genau wie in den eigenen Ergebnissen eine Abstufung der PCNA_{mean}-Werte. Dabei fanden sich niedrige Werte für das normale Schilddrüsenparenchym (0,6% +/- 0,3), mittlere Werte für die follikulären Adenome (2,0% +/- 0,9) und höhere Werte für die follikulären Karzinome (3,6 +/- 1,3). Die eigenen Werte für PCNA_{mean} lagen für die verschiedenen Tumorarten jeweils unter den Ergebnissen dieser Arbeit: Wir verzeichneten eine Abstufung mit niedrigen PCNA_{mean}-Werten für normales Parenchym (0,05% +/- 0,10), mittleren Werten für die follikulären Adenome (0,42% +/- 0,51) und höheren Werten für die follikulären Karzinome (1,49% +/-1,48). In beiden Arbeiten waren die Unterschiede in der Datenverteilung für PCNA_{mean} signifikant. Eine klinische Relevanz aus den Daten von Shimizu et al. 1993 abzuleiten ist schwierig, da zum einen mit sehr niedrigen Fallzahlen (7 follikuläre Adenome und 3 follikuläre Karzinome) gearbeitet wurde, des weiteren wurden keine diagnostischen Grenzwerte zur genaueren Differenzierung eines follikulären Adenoms

von einem follikulären Karzinom angegeben. Anhand der eigenen Daten konnte bei einem Grenzwert von 0,9% ein Karzinom von einem Adenom mit einer Sensitivität von 50% (14/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 90,5% (18/21) unterschieden werden. Da bei den follikulären Adenomen nur ein $PCNA_{mean}$ -Wert mit 2,28% über der 1%-Grenze lag, könnten $PCNA_{mean}$ -Werte $> 1\%$ ein weiteres Indiz für Malignität sein. Somit sollte daraufhin weiteres Material des Tumors hinsichtlich Kapsel- und/oder Gefäßinvasion untersucht werden.

Die Arbeit von Czyz et al. (1994) gibt bei insgesamt geringer Zahl follikulärer Karzinome ($n = 11$) nur partiell nutzbare Daten an, nämlich nur Ergebnisse einer diagnostischen Vier-Felder-Tafel für einen willkürlich gewählten Grenzwert von einer PCNA-Expression von 5%. Aus dieser läßt sich eine Sensitivität von 63,6% (7/11) bei einer Spezifität von 53,1% (26/49) ablesen - insgesamt somit nicht diagnostisch nutzbaren Daten entsprechend. Verglichen mit den eigenen Ergebnissen, wo bei einem $PCNA_{mean}$ -Grenzwert von 0,5% zur Differenzierung eines Karzinoms gegenüber eines Adenoms eine Sensitivität von 64,3% (18/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 71,4% (15/21) erzielt wurde, sind die Daten von Czyz et al. (1994) somit weniger aussagekräftig. Allerdings wurde dort auch die Färbenintensität der PCNA-Färbung mit beurteilt; die PCNA-Färbeintensität wurde in drei Stufen unterteilt, wobei bei einem Grenzwert der Färbeintensität 2 eine Sensitivität zur Erkennung eines Karzinoms in Abgrenzung zu einem Adenom von 73% (8/11) und eine adenombezogene Spezifität von 94% (46/49) erzielt wurde. Eigene vergleichende Daten sind nicht anzugeben, da in unserer Studie auf eine Auswertung der Färbeintensität verzichtet wurde.

Insgesamt ist somit durch eine PCNA-Markierung kein weiterführender entscheidender Aufschluß über die biologische Dignität follikulärer Schilddrüsentumoren zu erwarten.

Mit der Darstellung argyrophiler Proteine in der Umgebung der Nukleolusorganisierender Regionen (AgNOR) haben wir uns in dieser Studie nicht näher befassen können, da im Institut für Pathologie der RWTH Aachen ein entsprechender Meßplatz nicht etabliert ist. Die vorliegenden Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sind allerdings nur spärlich. Als AgNOR-Zahl wurde für follikuläre Adenome ($n = 22$) $3,5 \pm 0,3$ und für follikuläre Karzinome ($n = 17$) $5,0 \pm 0,7$ ermittelt (Rüschoff et al. 1993), die mittlere AgNOR-Summenfläche belief sich für follikuläre Adenome ($n = 20$) auf $1,81\text{--}2,85 \mu\text{m}^2$ und für follikuläre Karzinome auf $3,01\text{--}3,97 \mu\text{m}^2$ (Slowencka-Klencka et al. 2003). Die Ergebnisse sind erfahrungsgemäß in beiden Arbeiten statistisch signifikant; entsprechende Werte in den Publikationen fehlen aber. Interessant wäre, eine Untersuchung zur AgNOR-Ausstattung MIB-1-positiver Zellpopulationen vorzunehmen und somit die sogenannte Brugal-Hypothese zur Tumorphilisation, die in Zusammenarbeit mit der Charité in Berlin bereits einmal prognostisch an Mammakarzinomen überprüft wurde (Biesterfeld et al. 2001), an Schilddrüsenpräparaten auf diagnostische Wertigkeit zu testen. Dagegen, daß dieses sinnvoll sein könnte, spricht auch nicht die Tatsache, daß in einer Vorarbeit eine gewisse Korrelation zwischen AgNOR-Darstellung und MIB-1-Expression nachgewiesen wurde (Lewy-Trenda und Bienkiewicz 1999).

Zum „Gegenspieler“ der Proliferation, zur Apoptose, ist ebenfalls in Bezug auf ihre diagnostische Wertigkeit bei follikulären Schilddrüsentumoren wenig bekannt. Bisher wurde hier vorwiegend mit der TUNEL-Methode gearbeitet, die allerdings nur Teilaspekte des sehr komplexen Systems der Apoptose und ihrer Regulation beurteilen läßt. Für sich allein betrachtet eröffnet sie in der Differentialdiagnose follikulärer Schilddrüsenerkrankungen keine neuen Perspektiven. Die Datenverteilung zeigt in der allerdings noch spärlichen Literatur übereinstimmend eine große Überschneidung zwischen den mit der TUNEL-Methode ermittelten Apoptosewerten von follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen; an unserem Patien-

tenkollektiv, dessen Apoptosefärbungen nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, betrugen die Mittelwerte und Standardabweichungen 0,31% +/- 0,49% bzw. 0,49% +/- 0,66% (Biesterfeld et al. 2003), so daß sich zwar ein Trend, aber keine diagnostisch nutzbare Erkenntnis ziehen läßt. Eine andere Arbeitsgruppe berichtete für follikuläre Adenome Werte von 0,5% +/- 0,4% im Vergleich zu differenzierten, allerdings vorwiegend papillären Karzinomen 0,4% +/- 0,3% (Yoshida et al. 1999).

Die oben genannten Arbeiten zur Apoptose wurden mit der MIB-1-Expression verglichen bzw. in Beziehung gesetzt. So entwickelte z.B. die Arbeitsgruppe um Yoshida einen Quotienten aus MIB-1-Expression und Apoptoserate, um über den auf diese Weise erzeugten Faktor etwas über eventuellen Netto-Zugewinn oder Netto-Verlust an Zellen aussagen zu können. Dieser Faktor erwies sich in der Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe unter biologischen Gesichtspunkten insofern als sinnvoll, als im Vergleich zu normalem Schilddrüsenparenchym (Faktor 3,6 +/- 6,1) erhöhte Werte für Tumoren, darunter auch für follikuläre Adenome (12,1 +/- 23,7) und für follikuläre Karzinome (14,7 +/- 21,1) gefunden wurden, wohingegen die beiden gewebst destruktiven Thyreoiditiden, nämlich die Hashimoto-Thyreoiditis (1,7 +/- 3,1) und die de Quervain-Thyreoiditis (0,7 +/- 0,5), erniedrigte Werte aufwiesen. Zwischen den beiden follikulären Tumorentitäten allerdings waren die Datenverteilung nicht signifikant unterschiedlich (Biesterfeld et al. 2003).

Auch andere Publikationen, die oben im Hinblick auf ihre Aussagefähigkeit zur Proliferation ausgewertet wurden, nahmen zum Teil andere Methoden mit auf, stellten sie jedoch nur gegenüber. So wurden z.B. in einer Arbeit parallel zur MIB-1-Bestimmung auch Antikörper gegen p53, bcl-2 und p21 eingesetzt; die Ergebnisse wurden aber lediglich tabellarisch dargestellt, ohne gedanklich aufeinander bezogen zu werden (Almudévar et al. 2000). Ähnlich verhält es sich in einer anderen Studie, in der neben MIB-1 auch Cyclin D1 und E2F-1 eingesetzt worden waren (Saiz et al. 2002), oder in

Arbeiten, die zusätzlich zu MIB-1 auch den Marker p27 untersuchten (Erickson et al. 1998, Resnick et al. 1998); hier fand sich übrigens zur diagnostischen Relevanz von p27 diametral unterschiedliche Ergebnisse. In der Arbeit von Czyz et al. (1994) schließlich wurde die Bestimmung der PCNA-Expression mit DNA-Durchflußzytometrie und p53-Bestimmung kombiniert, wobei sich bei follikulären Karzinomen im Vergleich zu follikulären Adenomen höhere Aneuploidieraten und eine häufigere p53-Positivität zeigten.

5.3 Resumée

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, daß immunhistochemische Untersuchungen mit MIB-1 und PCNA zwar in der Lage sind, weiterführende biologische Erkenntnisse über das Verhalten follikulärer Schilddrüsenumoren zu erhalten, sich aber das eigentliche diagnostische Problem auf diese Weise nicht abschließend lösen läßt. Die Hinzunahme von Erkenntnissen mit anderen Methoden belegt darüber hinaus, daß derzeit überhaupt noch keine die histomorphologische Untersuchung ergänzende Methode in einem Maße etabliert ist, daß sie als routinemäßig hinzuzunehmender Standard gelten könnte. Lediglich mit Galectin-3 (s.o.) sind etwas überzeugendere Resultate erreicht worden; der Marker wird aber bislang noch nicht in der Routine eingesetzt. Abschließend bleibt somit die diagnostische Pathologie weiterhin auf die korrekte makroskopische und histologische Aufarbeitung der Schilddrüsenresektate angewiesen, wobei eine variablere Zahl von angefertigten Paraffinblöcken abhängig vom makroskopischen Bild auch außerhalb universitärer Institute wünschenswert wäre. Für die Zukunft wären Studien denkbar, die molekulare und morphologische Methoden nicht nur parallel anwenden, sondern auch inhaltlich aufeinander beziehen. Außerdem wären wissenschaftliche Ansätze sinnvoll, bei denen im Vergleich zum im originalen Adenom verbliebenen Zellen gezielt Eigenschaften derjenigen Zellverbände untersucht wür-

den, die bei mikroinvasiven follikulären Karzinomen die Invasion eines Blutgefäßes oder der Kapsel realisiert haben. Derartige Untersuchungen sind mit laser-gestützter Mikrodissektion im Prinzip bereits heute möglich.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Problem der Differentialdiagnostik follikulärer Schilddrüsenadenome und minimal invasiver follikulärer Schilddrüsenkarzinome. Weder das makroskopische noch das zelluläre Erscheinungsbild, die Feinnadelaspirationszytologie, oder die DNA-Zytometrie ermöglichen eine eindeutige Dignitätszuordnung der follikulären Schilddrüsentumore. Die einzigen bislang anerkannten Malignitätskriterien sind Invasion des Tumors in die Organkapsel und/oder in umliegende Gefäße. Da in der Routinediagnostik aufgrund des hohen Arbeitsaufwands nicht der gesamte Kapselbereich beurteilt werden kann, besteht der Bedarf an zusätzlichen diagnostischen Kriterien. Zu diesem Zweck wurde die diagnostische Wertigkeit der Proliferationsmarker MIB-1 und PCNA zur Differenzierung benigner follikulärer Adenome und maligner follikulärer Karzinome überprüft.

Die mittlere MIB-1-Positivität ($\text{MIB-1}_{\text{mean}}$) war in follikulären Karzinomen (2,52%) höher als in follikulären Adenomen (0,69%) und als in normalem Schilddrüsenparenchym (0,14%). Die Verteilung der Einzelwerte für die follikulären Adenome unterschied sich signifikant von den follikulären Karzinomen auf einem p-Niveau von 0,0012. Es wurden Vier-Felder-Tafeln mit unterschiedlichen Grenzwerten berechnet. Bei einem Grenzwert von 0,8% konnte ein follikuläres Karzinom mit einer Sensitivität von 82,1% (23/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 76,2% (16/21) erfaßt werden. Wurde eine Spezifität von über 90 % gefordert konnte ein Karzinom mit einer Sensitivität von 64,3% (18/28) und einer Spezifität von 90,5 (19/21) abgegrenzt werden. Der entsprechende $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ -Grenzwert betrug 1,3%. Zusätzlich muß erwähnt werden, daß nur 1 von 21 Adenomen einen $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ -Wert $> 2\%$ aufwies. Die Trennschärfe follikulärer Adenome und Karzinome bei einem $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ -Wert $< 2\%$ war gering, da 16 von 28 Karzinomen (42,9%) $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ -Werte $< 2\%$ aufwiesen.

Für die maximale MIB-1-Positivität fand sich keine statistische Signifikanz in der Datenverteilung zwischen follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen und konnte somit in der Differentialdiagnostik dieser Tumore keine weiteren Erkenntnisse liefern.

Mit Hilfe der PCNA-Expression fand sich eine höhere mittlere PCNA Positivität ($PCNA_{mean}$) in follikulären Karzinomen (1,49%) als in follikulären Adenomen (0,42%) oder als in normalem Schilddrüsenparenchym (0,05%). Im t-Test unterschieden sich die Daten der follikulären Adenome signifikant von den follikulären Karzinomen auf einem p-Niveau von 0,0027. Bei einem Grenzwert für $PCNA_{mean}$ von 0,5% wurde ein follikuläres Karzinom mit einer Sensitivität von 64,3% bei einer adenombezogenen Spezifität von 71,4% (15/21) erfaßt. Um eine Spezifität über 90% zu erreichen wurde bei einem Grenzwert von 0,9% ein Karzinom mit einer Sensitivität von 50% (14/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 90,5% (18/21) erfaßt. Nur ein Wert der follikulären Adenome lag über 1%. 14 von den 28 Karzinomen (50%) wiesen einen $PCNA_{mean}$ -Wert $> 1\%$ auf.

Für die Ergebnisse der maximalen PCNA-Positivität zeigte sich ebenfalls eine Abstufung mit den höchsten Werten für die follikulären Karzinome, mittleren Werten für die follikulären Adenome und niedrigsten Werten für das normale Schilddrüsenparenchym. Die Ergebnisse stehen jedoch hinter der Aussagekraft der MIB-1 $_{mean}$ - und $PCNA_{mean}$ -Werte, da trotz statistischer Signifikanz der Daten ($p = 0,0110$) bei einem Grenzwert von 4% ein Karzinom lediglich mit einer Sensitivität von weniger als 50% (13/28) bei einer adenombezogenen Spezifität von 90,48% erfaßt wurde.

Zusammenfassend sei gesagt, daß aufgrund starker Überschneidungen der Einzelwerte für MIB-1 $_{mean}$ und $PCNA_{mean}$ bei follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen eine zweifelfreie Diagnose bezüglich der Dignität eines follikulären Schilddrüsentumors nicht gestellt werden konnte. Jedoch könnte die Immunhistometrie anhand der eigenen Daten in schwierigen Grenzfällen follikulärer Schilddrüsentumore einen Beitrag leisten: MIB-1 $_{mean}$ -Werte $> 2\%$ und $PCNA_{mean}$ -Werte $> 1\%$ sollten Anlaß dazu geben zusätzliches Material einzubetten und weitere Schnitte hinsichtlich der histologischen Malignitätskriterien des Kapsel- und/oder Gefäßdurchbruchs genauer zu untersuchen. Letztlich muß festgestellt werden, daß weder MIB-1 $_{mean}$, noch $PCNA_{mean}$ eine eindeutige Diagnose in Grenzfällen follikulärer Schilddrüsentumore liefern können und die Diagnosesicherung weiterhin vornehmlich auf der Tumorphistologie basieren muß.

7. Anhang

Im folgenden werden die Rohdaten zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fällen dokumentiert (Tab. 11, Tab. 12).

Tab. 11: Rohdaten PCNA

Patient	PCNA-mean	PCNA-max	PCNA-areamean	PCNA-areamax	Diagnose
1	0,04	0,43	0,06	0,61	Ad
2	0,19	3,92	0,27	5,45	Ad
3	0,24	1,18	0,28	1,83	Ad
4	0,90	2,98	0,99	4,09	Ad
5	0,05	0,57	0,05	9,72	Ad
6	0,28	1,99	0,30	2,92	Ad
7	0,63	2,16	0,64	2,46	Ad
8	0,91	3,23	1,24	4,32	Ad
9	2,29	7,69	3,06	10,67	Ad
10	0,34	1,10	0,38	1,28	Ad
11	0,24	1,38	0,39	2,48	Ad
12	0,41	3,47	0,58	5,62	Ad
13	0	0	0	0	Ad
14	0,23	1,59	0,23	1,51	Ad
15	0,36	2,17	0,50	2,94	Ad
16	0,03	0,61	0,05	0,97	Ad
17	0,12	0,12	0,21	1,26	Ad
18	0,81	2,44	1,02	2,73	Ad
19	0,03	1,57	0,04	0,78	Ad
20	0,58	4,35	0,87	7,43	Ad
21	0,29	2,44	0,31	2,31	Ad
22	3,29	8,04	4,54	11,29	Ca
23	1,48	7,43	1,38	8,02	Ca
24	0,38	1,43	0,63	2,39	Ca
25	0,85	2,58	1,04	3,83	Ca
26	0,05	0,53	0,07	0,73	Ca
27	2,53	9,49	2,82	10,86	Ca
28	0	0	0	0	Ca
29	3,45	8,50	4,83	13,90	Ca
30	0,83	4,35	1,10	5,95	Ca
31	1,16	2,84	1,53	3,29	Ca
32	2,12	9,75	2,91	9,77	Ca

Tab. 11 (Fortsetzung): Rohdaten PCNA

Patient	PCNA- mean	PCNA- max	PCNA- areamean	PCNA- areamax	Diagnose
33	0,24	1,12	0,29	1,25	Ca
34	0,26	2,17	0,36	3,15	Ca
35	0,33	2	0,50	3,20	Ca
36	0	0	0	0	Ca
37	4,34	15,21	6,08	22,04	Ca
38	2,75	7,14	5,64	10,69	Ca
39	2,77	5,49	2,62	5,29	Ca
40	0,30	2,08	0,31	1,38	Ca
41	0,51	2,04	0,78	4,07	Ca
42	1,23	3,04	1,50	4,11	Ca
43	1,97	4,52	2,72	7,48	Ca
44	0,49	2,04	0,72	3,30	Ca
45	0,62	3,03	0,80	3,13	Ca
46	2,30	4,79	3,77	7,63	Ca
47	1,56	4,95	3,03	6,23	Ca
48	0,16	0,25	0,10	0,73	Ca
49	5,89	11,64	6,64	12,55	Ca
50	0,09	0,57	0,13	0,79	n.P.
51	0	0	0	0	n.P.
52	0,28	1,548	0,32	2,36	n.P.
53	0,06	1,12	0,04	0,89	n.P.
54	0,08	1,12	0,08	0,96	n.P.
55	0	0	0	0	n.P.
56	0	0	0	0	n.P.
57	0	0	0	0	n.P.
58	0	0	0	0	n.P.
59	0	0	0	0	n.P.
60	0	0	0	0	n.P.
61	0	0	0	0	n.P.
62	0	0	0	0	n.P.
63	0	0	0	0	n.P.
64	0	0	0	0	n.P.

Tab. 12: Rohdaten MIB-1

Patient	MIB-1 mean	MIB-1 max	MIB-1 areamean	MIB-1 areamax	Diagnose
1	0,40	0,203	0,38	1,41	Ad
2	0,08	2,13	0,08	2,13	Ad
3	0,08	1,35	0,06	1,18	Ad
4	0,06	0,88	0,06	1,08	Ad
5	0,17	4,10	0,28	7,10	Ad
6	0,69	4,96	0,68	4,71	Ad
7	0,13	1,22	0,17	1,51	Ad
8	0,20	1,04	0,19	1,24	Ad
9	0,47	5,13	0,50	5,36	Ad
10	0,51	4,26	0,55	4,64	Ad
11	0,56	1,87	0,51	1,64	Ad
12	1,98	10,88	1,81	15,30	Ad
13	0,24	2,13	0,13	2,64	Ad
14	1,09	3,57	0,94	3,77	Ad
15	0,44	2,11	0,64	2,80	Ad
16	0,55	4,00	0,54	3,06	Ad
17	1,01	5,26	1,14	7,22	Ad
18	1,24	3,46	1,39	4,31	Ad
19	0,27	4,55	0,22	3,43	Ad
20	0,75	84,62	2,70	90,17	Ad
21	3,70	39,24	1,96	50,76	Ad
22	2,33	8,13	2,95	10,15	Ca
23	1,39	8,33	1,80	9,85	Ca
24	1,23	3,17	1,38	3,48	Ca
25	0,91	3,32	1,10	3,83	Ca
26	1,37	5,68	1,40	6,63	Ca
27	3,92	6,53	4,96	8,06	Ca
28	0,19	1,75	0,26	2,26	Ca
29	4,42	10,91	6,33	15,41	Ca
30	1,57	6,25	1,92	7,50	Ca
31	2,67	6,98	3,03	8,16	Ca
32	5,30	10,95	6,36	14,75	Ca

Tab. 12 (Fortsetzung): Rohdaten MIB-1

Patient	MIB-1 mean	MIB-1 max	MIB-1 areamean	MIB-1 areamax	Diagnose
33	1,38	3,70	1,96	6,31	Ca
34	1,52	4,67	1,57	5,80	Ca
35	0,21	0,95	0,09	0,58	Ca
36	0,03	0,63	0,03	0,86	Ca
37	0,47	7,47	0,55	9,89	Ca
38	8,50	28,78	11,13	37,27	Ca
39	1,17	9,01	1,64	12,11	Ca
40	1,53	6,45	1,67	7,24	Ca
41	0,80	3,55	0,93	3,81	Ca
42	2,40	7,02	2,76	10,00	Ca
43	6,00	20,93	7,37	25,31	Ca
44	1,17	3,70	1,51	4,92	Ca
45	2,56	8,73	2,99	12,54	Ca
46	8,53	15,81	10,81	19,38	Ca
47	0,98	3,10	1,66	5,51	Ca
48	4,68	7,43	5,29	9,36	Ca
49	3,37	8,61	4,01	10,04	Ca
50	0,08	0,79	0,07	1,07	n.P.
51	0,25	1,68	0,20	1,43	n.P.
52	0,12	1,103	0,09	1,13	n.P.
53	0,21	1,45	0,13	1,20	n.P.
54	0,11	1,83	0,12	2,44	n.P.
55	0,06	1,10	0,05	0,99	n.P.
56	0,21	1,35	0,25	1,74	n.P.
57	0,07	0,79	0,06	0,66	n.P.
58	0,24	1,79	0,29	2,76	n.P.
59	0,04	0,69	0,06	1,16	n.P.
60	0,27	1,55	0,16	0,92	n.P.
61	0,08	1,01	0,03	0,47	n.P.
62	0,12	0,95	0,18	1,34	n.P.
63	0,17	1,39	0,10	0,96	n.P.
64	0,04	0,64	0,01	0,16	n.P.

8. Literaturverzeichnis

Almudévar E, Puras A, de Miguel C, Urbiola E, López A, Menéndez E, García de Jalón J, Romeo E:

Aplicación de las oncoproteínas p21RAS, p53, bcl-2 y del factor de proliferación celular Ki-67 (MIB-1) en el diagnóstico y pronóstico de tumores tiroideos.

An Sist Sanit Navar 23: 247-255, 2000

Anwar F, Emond MJ, Schmidt RA, Hwang HC, Bronner MP:

Retinoblastoma expression in thyroid neoplasms.

Mod Pathol 13: 562-569, 2000

Biesterfeld S, Farokhzad F, Klüppel D, Schneider S, Hufnagl P:

Improvement of breast cancer prognostication by cell kinetic based Ag-NOR quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment.

Virchows Arch 438: 478-484, 2001

Biesterfeld S, Rickert D, Eichler S, Fürste K, Mrusek S, Alfer J:

TV-image analysis based quantification of the proliferative activity and the apoptotic rate in thyroid tumors and thyroiditis.

Anticancer Res 23: 4269-4276, 2003

Biesterfeld S: Persönliche Mitteilung, 2004

Block MA, Dailey GE, Robb JA:

Thyroid nodules indeterminate by needle biopsy.

Am J Surg 146: 72-78, 1983

Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE:

Identification of a nuclear and a cytoplasmatic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation.

Exp Cell Res 136: 311-319, 1981

Bravo R, Fey S, Bellatin J, Larsen M, Celis JE:

Identification of a nuclear polypeptide (cyclin) whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and to transformation.

Prog Clin Biol Res 85: 235-248, 1982

Bravo R, MacDonald-Bravo H:

Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during cell cycle: association with DNA replication sites.

J Cell Biol 105: 1549-1554, 1987

Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H:
Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-Delta.
Nature 326: 515-517, 1987

Brennan MD, Bergstrahl EJ, Van Heerden JA, McConahey WM:
Follicular thyroid cancer treated at the Mayo Clinic 1946 through 1970:
Initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome.
Mayo Clin Proc 66: 11-22, 1991

Brown CL:
The solitary thyroid nodule.
Anthony PP, MacSween RNM (eds) Recent advances in histopathology;
Churchill Livingstone, Edinburgh, 203-212, 1981

Cady B, Rossi R, Silverman M, Wool M:
Further evidence of the validity of risk group definition in differentiated thyroid carcinoma.
Surgery 98: 1171-1178, 1985

Campbell WL, Santiago HE, Perzin KH, Johnson PM:
The autonomous thyroid nodule. Correlation of scan appearance and histopathology.
Radiology 107: 133-138, 1973

Cattoretti G, Becker MHG, Key G et al.:
Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cell in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.
J Pathol 168: 357-363, 1992

Celis JE, Bravo R:
A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells.
J. Cell Biology. 84: 795-802, 1980

Celis JE, Celis A:
Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S-phase.
Proc. Natl. Acad. Sci. UA 82: 3262-3266, 1985

Celis JE, Madsen P, Celis A, Nielsen HV, Gesser B:
Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase-Delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division.
FEBS Letters 220: 1-7, 1987

Chen KT, Lin JD, Chao TC, Hsueh C, Chang CA, Weng HF, Chan EC:
Identifying differentially expressed genes associated with metastasis of
follicular thyroid cancer by cDNA expression array.
Thyroid 11: 41-46, 2001

Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL:
Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma.
Mod Pathol 14: 338-342, 2001

Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG:
Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular
thyroid carcinomas and adenomas.
J Clin Endocrinol Metab 88: 354-357, 2003

Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G:
Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed
in thyroid nodules with cytological atypia.
Histopathology 40: 80-87, 2000

Czyz W, Joensuu H, Pylkkänen L, Klemi PJ:
p53 protein, PCNA staining, and DNA content in follicular neoplasms of
the thyroid gland.
J Pathol 174: 267-274, 1994

Dal Cin P, Sneyers W, Aly MS, Segers A, Ostijn F, van Damme B,
van den Berghe H:
Involvement of 19q13 in follicular thyroid adenoma.
Cancer Genet Cytogenet 60: 99-101, 1992

Delorme S, Hoffner S: Diagnostik der Schilddrüse. Schilddrüsenknoten,
Diagnostik und Therapie des Schilddrüsenkarzinoms.
Radiologe 43: 179-195, 2003.

Deutsche Krebsgesellschaft: Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen
Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:
Maligne Schilddrüsentumoren.
Auflage 2002

Doniach I:
The thyroid gland.
Symmers WStC (ed) Systemic pathology, 2nd edn. Churchill Livingstone,
Edinburgh 4: 1976-2037, 1978

Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV:
Expression of p27^{kip1} and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors.
Mod Pathol 11: 169-174, 1998

Evans HL:
Follicular neoplasms of the thyroid. A study of 44 cases followed for a minimum of 10 years with emphasis on differential diagnosis.
Cancer 54: 535-540, 1984

Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, Sanjuan X, Cardesa A, Liu FT, Sobel ME:
Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue.
J Pathol 181: 80-86, 1997

Franssila KO, Ackermann LV, Brown CL, Hedinger CE:
Follicular carcinoma.
Semin Diagn Pathol 2: 101-122, 1985

Fronatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlueter C, Gerdes J:
Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter
Genomics 11: 476-477, 1991

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H:
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.
Int J Cancer 31: 13-20, 1983

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H:
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.
J Immunol 133: 1710-1715, 1984

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD:
Immunochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.
Am J Pathol 138: 876-873, 1991

Gharib H, Goellner JR, Zinsmeister AR et al.:
Fine needle aspiration biopsy of the thyroid. The problem of suspicious cytologic findings.
Ann Intern Med 101: 25-28, 1984

Grant CS, Hay I, Ryan JJ, Bergstrahl EJ, Rainwater LM, Goellner JR:
Diagnostic and prognostic utility of flow cytometric DNA measurement in
follicular thyroid tumors.

World J. Surg 14: 283-290, 1990

Gritzmann N, Koischwitz D, Rettenbacher T:
Sonography of the thyroid and parathyroid glands.

Radiologic clinics of North America 38: 1131-1145, 2000

Hayes FJ, Sheahan K, Heffernan A et al.:

Aggressive thyroid cancer associated with toxic nodular goiter.

Eur J Endocrinol 134: 366-370, 1996

Hedinger C, Williams ED, Sobin LH:

Histological typing of thyroid tumours.

In: WHO (Hrsg.): International histological classification of tumours
(Reihe). 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1988

Hoang-Vu C, Boltze C, Gimm O, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B,
Kohrle J, Rath FW, Dralle H:

Expression of telomerase genes in thyroid carcinoma.

Int J Oncol 21: 265-272, 2002

Hölzel D, Klamert A, Schmidt M:

Krebs: Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse.

Zuckschwerdt Verlag München-Bern-Wien-New York, S. 433, 1996

Hoving J, Pier DA, Vermey A, Oosterhuis JW:

Carcinoma in hyperfunctioning thyroid nodule in recurrent hyperthyroidism.

Eur J Nucl Med 6: 131-132, 1981

Iida F:

Surgical significance of capsule invasion of adenoma of the thyroid.

Surg Gynecol Obstet 144: 710-712, 1977

Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S,
Sawada T, Raz A, Kubo T:

Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker
differentiating benign from malignant thyroid neoplasms.

Cancer 85: 2475-2484, 1999

Kamoshida S, Ogane N, Yasuda M, Muramatsu T, Bessho T, Kajiwara H,
Osamura RY:

Immunohistochemical study of type-1 blood antigen expressions in thyroid
tumors: the significance for papillary carcinomas.

Mod Pathol 13: 736-741, 2000

Kaserer K, Knezevic V, Pichlhofer B, Scheuba C, Passler C, Worth J, Niederle B, Krizman D:

Construction of cDNA libraries from microdissected benign and malignant thyroid tissue.

Lab Invest 82: 1707-1714, 2002

Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, Hemmi A, Kawaoi A, Oyama T, Sugai T, Sasou S:

Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1.

Hum Pathol 26: 139-146, 1995;

Katoh R, Kawaoi A, Miyagi E, Li X, Suzuki K, Nakamura Y, Kakudo K:

Thyroid Transcription Factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization.

Modern Pathology 13: 570-576, 2000

Kawasaki F, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Ikeda K, Sugano S, Kato Y, Chung KH:

Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in differentiated thyroid carcinoma as an indicator for disease recurrence.

Oncol Rep 7: 853-857, 2000

Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM:

Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin during cell cycle.

Exp Cell Res 166: 209-219, 1986

Landberg G, Tan E, Roos G:

Flow cytometric multiparameter analysis of proliferation cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67: a new view of the cell cycle.

Exp. Cell Research 187: 111-118, 1990

Lang W, Georgii A, Stauch G et al.:

The differentiation of atypical adenomas and encapsulated follicular carcinomas in the thyroid gland.

Virchows Arch (A) 385: 125-141, 1980

Lang W, Choritz H, Hundshagen H: Risk factors in follicular thyroid carcinomas. A retrospective follow-up study covering a 14-year period with emphasis on morphological findings.

Am J Surg Pathol 10: 246-255, 1986

Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS et al.:
High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis.
Oncogene 4: 159-164, 1989

Lewy-Trenda I, Bienkiewicz M:
Evaluation of MIB -1 immunoreactivity and Nuclear Organizer Regions in non-neoplastic and neoplastic thyroid regions.
Pol J Pathol 50: 129-138, 1999

Li Volsi VA:
Surgical pathology of the thyroid. Major problems in pathology.
vol.22. Saunders, Philadelphia. 1990

Mathews MB, Bernstein RM, Franza R, Garrels JE:
The identity of "proliferating cell nuclear antigen" and "cyclin".
Nature 309: 374-376, 1984

Mehrotra A, Agarwal PK, Chandra T:
Cytopathology and AgNOR counts in fine-needle aspiration cytology smears of thyroid lesions.
Diagn Cytopathol 19: 238-243, 1998

Miettinen M, Virtanen I:
Expression of laminin in thyroid gland and thyroid tumors. An immunohistochemical study.
Int J Cancer 34: 27-30, 1984

Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM:
Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.
Journal of immunology 121: 2228-2234, 1978

Morris GF, Mathews MB: Regulation of proliferating cell nuclear antigen during cell cycle.
J Biol Chem 264: 13856-13864, 1989

Namba H, Matsuo K, Fragin JA:
Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors.
J Clin Invest 86: 120-125, 1990

Namba H, Rubin SA, Fagin JA.:
Point mutations of ras oncogenes are an early event in the human thyroid tumorigenesis.
Mol Endocrinol 4: 1474-1479, 1990

Okayasu I, Osakabe T, Onozawa M, Mikami T, Fujiwara M.:
p53 and p21^{WAF1} expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors.
Clin Immunol and Immunopathol 88:183-191,1998.

Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S,
de Giuli P, Angeli A:
Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma.
Cancer Res 58: 3015-3020, 1998

Prelich G , Kostura M, Marshak DR, Mathews MB, Stillman B.:
The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for
SV40 DNA replication in vitro.
Nature 326: 471-475, 1987

Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman
B:
Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA poly-
merase-Delta auxiliary protein.
Nature 326: 517-550, 1987

Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O:
Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carci-
noma.
Mod Pathol 11: 735-739, 1998

Riccabona G:
Thyroid cancer.
Springer Verlag, Heidelberg , New York Tokyo.1987

Rojeski MT, Gharis H:
Nodular thyroid disease: Evaluation and managemant.
N. Engl J Med 313: 428-436, 1985

Roque L, Rodrigues R, Pinto A, Moura-Nunes V, Soares J:
Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison
between follicular adenomas and carcinomas.
Genes Chromosomes Cancer 36: 292-302, 2003

Rosai J, Carcangiu ML:
Pathology of thyroid tumors: Some recent and old questions.
Hum Pathol 15: 1008-1012, 1984

Rosai J, Carcangiu ML, De Lellis RA:
Tumors of the thyroid gland.
Atlas of tumor pathology. AFIP, 3rd series, vol 5, Washington D.C. 1992

- Rosai J:
Ackerman's Surgical Pathology, Mosby Verlag, St. Louis, Bd. 2, S. 2970,
9. Auflage, 2004
- Rüschoff J, Prasser C, Cortez T, Höhne HM, Hohenberger W, Hofstädter F.
Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features.
Am J Surg Pathol 17: 1281-1288, 1993
- Saiz, AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, Mc Courty A, Brynes RK:
Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions.
J Pathol 198: 157-162, 2002
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M:
The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression;
J. Cell Physiol 133: 579-584, 1987
- Schmid KW, Tötsch M, Öfner D, Böcker W, Ladurner D.:
Minimally invasive follicular thyroid carcinoma. A clinico-pathological study.
Thyroid pathology. Curr Topics Pathol 91: 37-43, 1996
- Schmid KW, Böcker W:
Pathologie
Remmele Springer Verlag 4:, 579-612, 1997
- Schröder S:
Pathologie und Klinik maligner Schilddrüsentumoren.
Fischer, Stuttgart, New York. 1988
- Sequeira MJ, Morgan JM, Fuhrer D, Wheeler MH, Jasani B, Ludgate M:
Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions.
Thyroid 11: 995-1001, 2001
- Shimizu T, Usuda N, Yamanda T, Sugeno A, Iida F:
Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies.
Cancer 71: 2807-2812, 1993
- Shivji MK, Kenny MK, Wood RD:
Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair.
Cell 69: 367-374, 1992

Slowencka-Klencka D, Klencki M, Popowicz B, Lewinski A:
AgNOR quantification in the diagnosis of follicular pattern thyroid pathology.

Anal Quant Cytol Histol 25: 347-352, 2003

Solbiati L, Volterrani L, Rizzato G et al.:

The thyroid gland with low uptake lesions: Evaluation by ultrasound. Radiology 155: 187-191, 1985

Takano T, Amino N:

Cancer-specific mRNAs in thyroid carcinomas: detection, use, and their implication in thyroid carcinogenesis.

Endocr J 49: 97-107, 2002

Takasaki Y, Deng JS, Tan EM:

A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation.

J Exp Med 154: 1899-1909, 1981

Tennvall J, Björklund A, Möller T, Ranstam J, Akerman M:

Prognostic factors of papillary, follicular and medullary carcinomas of the thyroid gland: retrospective multivariate analysis of 216 patients with a median follow-up of 11 years.

Acta Radiol (Oncol) 24: 17-24, 1985

Thiel G:

Differentialdiagnostik leiomyogener Tumoren des Uterus mit DNA-Bildzytometrie.

Med. Diss., RWTH Aachen, 2004 (in Vorbereitung)

Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B:

Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen.

Journal of biological chemistry 264: 7466-7472, 1989

Weber AL, Randolph G, Aksoy FG:

The thyroid and parathyroid glands: CT and MR imaging and correlation with pathology and clinical findings.

Radiologic clinics of North America 38: 1105-1128, 2000.

Woolner WB:

Thyroid carcinomas: Pathologic classification with data on prognosis. Semin Nucl Med 1: 481-502, 1971

Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R:
Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications.
Am J Pathol 147: 815-822, 1995

Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M:
Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors.
Surg Today 29: 204-208, 1999

Zeiger MA, Smallridge RC, Clark DP, Liang CK, Carty SE, Watson CG, Udelsman R, Saji M:
Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms.
Surgery 126: 1195-1198, 1999

Zuber M, Tan EM, Ryoji M:
Involvement of proliferating cell nuclear antigen (cyclin) in DNA replication in living cells.
Mol Cell Biol 9: 57-66, 1989

Danksagung

Besonders großer Dank richtet sich an Herrn Professor Dr.med. Stefan Biesterfeld für die Überlassung des Themas sowie die ausgezeichnete Betreuung und stets freundliche Unterstützung.

Des weiteren danke ich Herrn Professor Dr.med. Christian Mittermayer, der mir als ehemaliger Direktor des Instituts für Pathologie der RWTH – Aachen einen Teil der Präparate zur Verfügung stellte und mir die uneingeschränkte Nutzung des Labors und des Meßarbeitsplatzes ermöglichte.

Ein herzlicher Dank geht auch an das Institut für Pathologie vom Knappschafts-krankenhaus Bardenberg für die Überlassung einiger Fälle der follikulären Schilddrüsenkarzinome.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Frau I. Losen, medizinisch – technische Assistentin des pathologischen Instituts für die Einweisungen in die Labor- und Meßarbeiten.

Abschließend danke ich meinen Eltern Barbara und Manfred Eichler sowie meinem Ehemann Dr. med. Johannes Steinkamp für jegliche Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Silke Eichler
Geboren am:	11.02.1974
Geburtsort:	München
Familienstand:	verheiratet
Ehemann:	Dr.med. Johannes Steinkamp
Kinder:	Hanna Eichler
Eltern:	Manfred Eichler, Oberst a.D. Barbara Eichler, geb. Roloff Krankenschwester, Hausfrau

Schulbildung:

1980 -1984	Grundschule Feldkirchen/Neuwied
1984 -1985	Werner-Heisenberg- Gymnasium/Neuwied
1985 -1989	Konrad-Adenauer- Gymnasium/Meckenheim
1989 -1993	Deutsche Schule Brüssel

Studium:

1993 -1999	Studium der Humanmedizin, RWTH Aachen
1999 -2000	Praktisches Jahr, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn

Examina:

10/1995	Physikum
08/1996	I. Staatsexamen
03/1999	II. Staatsexamen
25.10.2000	II. Staatsexamen

Berufsweg:

	Ärztin im Praktikum
01.02.2001 - 31.01.2001	Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität Bonn
01.02.2002 - 31.07.2002	Radiologisches Zentralinstitut Klinikum Siegburg
seit 01.08.2002	Assistenzärztin Radiologisches Zentralinstitut Klinikum Siegburg
ab Dezember 2004	Elternzeit