

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss)

Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Rothmund)

Kernmorphometrie und AgNOR-Analyse
bei der
Follikulären Neoplasie der Schilddrüse

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ina Buschendorf
aus
Bad Harzburg

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität-Marburg am
02.9.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Herr Professor Dr. med. B. Maisch

Referent: Herr Privatdozent Dr. med. A. Zielke

Korreferent: Herr Professor Dr. med. R. Moll

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Schilddrüsenknoten.....	1
1.2	Epidemiologie.....	3
1.3	Differenzierte Schilddrüsenkarzinome.....	4
1.4	Follikuläres Adenom versus follikuläres Karzinom	6
1.5	Diagnostik	6
1.6	Chirurgische Therapie.....	8
1.7	Neue diagnostische Ansätze.....	9
1.7.1	Grundlagen der Kernmorphometrie	9
1.7.2	Definition - Grundlagen der AgNOR-Analyse.....	11
1.8	Fragestellung	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Untersuchungsgut.....	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	AgNOR-Färbung	16
2.2.2	Bildanalyse.....	17
2.2.2.1	Hardware und Software.....	17
2.2.2.2	Einstellung des Gerätes	17
2.2.2.3	Kalibrierung	18
2.2.2.4	Auswahl der Parameter.....	18
2.2.3	Messverfahren	18
2.2.3.1	Aufsuchen des zu vermessenden Tumorausschnittes	18
2.2.3.2	Selektionsprinzip	19
2.2.3.3	Kernmorphometrie.....	19
2.2.3.4	Analyse.....	20
2.2.3.5	Ermittlung der Kernparameter	20
2.2.4	AgNOR-Analyse.....	22
2.2.5	Datenanalyse	23
2.2.6	Statistik und Evaluation der Vorhersagemodelle.....	23

3	Ergebnisse.....	28
3.1	Patientenkollektiv	28
3.2	Messergebnisse	28
3.2.1	Kern-Morphometrie	28
3.2.1.1	Kernfläche (Area)	29
3.2.1.2	Varianz der Kernfläche (Perimeter)	29
3.2.1.3	Durchschnittlicher Feret-Durchmesser (AVG – FER)	30
3.2.1.4	Rundungsfaktor I (Shape Factor)	30
3.2.1.5	Rundungsfaktor II (Aspect Ratio)	31
3.2.2	AgNOR-Analyse.....	32
3.2.2.1	NZC (Mittlere AgNOR Zahl/ Zellkern)	33
3.2.2.2	NEAC (Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR)....	33
3.2.2.3	NGA (Gesamtversilberbare AgNOR-Fläche/ Zellkern)	34
3.2.2.4	NQC (AgNOR-Quotient/ Zelle, inverses Verhältnis von Anzahl zur Fläche in einem Kern)	34
3.2.2.5	NGAKA (Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche).....	35
3.3	Ergebnisse der Vorhersagemodelle	36
4	Diskussion	41
5	Zusammenfassung	54
	Literaturverzeichnis	56
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	76
	LEBENS LAUF	77
	Ehrenwörtliche Erklärung	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der zwei wichtigsten Feret-Durchmesser	21
Abb. 2: Darstellung des Martin-Radius	22
Abb. 3: Gut differenziertes follikuläres Schilddrüsenkarzinom, HE-Färbung (100-fache Vergrößerung).....	28
Abb. 4: Follikuläres Schilddrüsenadenom, AgNOR-Färbung (100-fache Vergrößerung).....	32
Abb. 5: Darstellung der Ergebnisse der Logistischen Regression der Kombination beider Methoden als ROC-Kurve	38
Abb. 6: Darstellung der Ergebnisse des Bayes Theorems der Kombination beider Methoden als ROC-Kurve	39

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Staging der Tumoren.....	15
Tab. 2: Kernfläche (Area).....	29
Tab. 3: Varianz der Kernfläche (Perimeter).....	30
Tab. 4: Durchschnittlicher Feret-Durchmesser (AVG-FER).....	30
Tab. 5: Rundungsfaktor (Shape Factor).....	31
Tab. 6: Rundungsfaktor II (Aspect Ratio).....	32
Tab. 7: NZC (Mittlere AgNOR Zahl/ Zellkern).....	33
Tab. 8: NEAC (Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR).....	34
Tab. 9: NGA (Gesamtversilberbare AgNOR-Fläche/ Zellkern).....	34
Tab.10: NQC (AgNOR-Quotient/Zelle).....	35
Tab.11: NGAKA (Produkt der ges. versilberbaren Fläche mit der Kernfläche). 35	
Tab. 12: Übersicht der Ergebnisse der Vorhersagemodelle.....	40

Abkürzungsverzeichnis

AgNOR.....	Versilberbare Nucleolus Organisierende Regionen
AVG-FER.....	Durchschnittlicher Feret-Durchmesser
DFC.....	Dense Fibrillar Component
FC.....	Fibrillar Centers
FNA.....	Feinnadelaspirationsbiopsie
GC.....	Granular Component
MEN.....	Multiple Endokrine Neoplasien
NEAC.....	Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR
NGA.....	Gesamt-versilberbare AgNOR-Fläche/Zellkern
NGAKA.....	Produkt der ges. versilberbaren Fläche mit der Kernfläche
NORAPS.....	AgNOR-assoziierte Proteine
NQC.....	AgNOR-Quotient pro Zelle
NZC.....	Mittlere AgNOR Zahl/Zellkern
OF.....	Objektfläche
ROC.....	Receiver Operating Characteristics
SAS.....	Statistical Analysis System

1 Einleitung

1.1 Schilddrüsenknoten

Die noduläre Schilddrüsenhyperplasie ist eine häufige Erkrankung. Das Risiko, einen Schilddrüsenknoten zu entwickeln, wird im deutschsprachigen Raum bei deutlicher Nord-Süd-Zunahme auf etwa 5 bis 20% geschätzt (Schmid et al. 1997a). Die Prävalenz von Schilddrüsenknoten im Allgemeinen steigt linear mit zunehmendem Alter. Das spontane Auftreten von Schilddrüsenknoten ereignet sich mit einer Rate von 0.08% pro Jahr vom frühen Kindesalter bis zum achtzigsten Lebensjahrzehnt. Die Geschlechtsverteilung von männlich: weiblich verhält sich 1:2 (Rojeski et al. 1985).

Da ein Knoten eine maligne Neoplasie repräsentieren kann, ist die zentrale Frage, ob ein neuauftretener Knoten gutartig oder bösartig ist. Viele gutartige Schilddrüsenveränderungen können sich klinisch als Knoten manifestieren. Hierzu zählen u. a. Strumaknoten, Adenome und Zysten. Im klinischen Verlauf sind über Jahre bestehende Knoten ohne Wachstumstendenz ebenso wie plötzlich entstandene Knoten meist gutartig. Letztere entsprechen nahezu ausnahmslos benignen Pseudozysten oder eingebluteten Knoten. Karzinome manifestieren sich dagegen in einem Zeitraum von Wochen bis Monaten. Besonders verdächtig ist das rasche Wachstum eines Knotens unter Schilddrüsenhormonmedikation (Schmid et al. 1997a).

Schilddrüsenknoten können solitär oder multipel auftreten, sonographisch zystisch oder solide erscheinen und szintigrafisch hypofunktionell ("kalt"), funktionell aktiv ("warm") oder hyperfunktionell ("heiß" oder "toxisch") imponieren. Von besonderem Interesse sind dabei kalte Knoten, da sich in ihnen ein Karzinom verbergen kann (Rojeski et al. 1985; Schmid et al. 1997a). Aber auch stark regressiv veränderte Strumaknoten und Zysten imponieren szintigrafisch als kalte Knoten. Die Angaben über die Häufigkeit von Zysten, die durch Feinnadelpunktion allein aufgedeckt werden, liegen zwischen 16 und 35% (Droese et al. 1976). Die meisten Adenome stellen sich ebenfalls szintigrafisch als hypofunktionelle Knoten dar: im Operationsmaterial sind "kalte" Knoten in 15 - 40% Adenome. Nur eine kleine Anzahl follikulärer Adenome ist hyperfunktionell ("toxische Adenome"). Bei diesen hyperfunktionellen Adenomen ist

differentialdiagnostisch von besonderer Bedeutung, dass oft deutliche Kapselinfiltrationen (ohne Kapseldurchbruch) sowie Tumorprotrusionen in Kapselblutgefäße vorkommen. Die Kenntnis der hormonellen Überfunktion ist daher unerlässlich, um ein autonomes Adenom von einem minimal invasiven Karzinom zu unterscheiden, wobei zu berücksichtigen ist, dass diese selten auch szintigrafisch heiße Knoten Karzinome repräsentieren können (Schmid et al. 1997b).

Schilddrüsenadenome sind gekapselte, gutartige Tumoren, die sich vom Follikel­epithel ableiten und sich strukturell vom angrenzenden Schilddrüsengewebe unterscheiden. Teilweise können sie auch zu einer Kompression des angrenzenden Gewebes führen. Mikroskopisch lassen sich nach dem Differenzierungsgrad trabekuläre, mikrofollikuläre, normo- und makrofollikuläre Adenome unterscheiden. Regressive Veränderungen (Nekrosen, Vernarbungen, Einblutungen, Verkalkungen) sind häufig und können bei Parenchymeinschlüssen in die Adenomkapsel eine Invasion vortäuschen. Solche Grenzfälle wurden bisher als “atypische Adenome” bezeichnet (Böcker et al. 1984). Diese speziellen Adenome fallen zytologisch nach Feinnadelpunktion durch hohen Zellgehalt und durch eine starke Zell- und Kernpolymorphie auf, wobei das follikuläre Strukturbild vermisst wird; diese Befunde werden als karzinomverdächtig gewertet (Droese et al. 1979).

Von den malignen Erkrankungen der Schilddrüse werden ca. 40% anhand des Leitbefundes eines Solitärknotens entdeckt, 25% verbergen sich in einer multinodösen Struma (Rothmund et al. 1991). Maligne Schilddrüsenveränderungen umfassen neben Metastasen anderer Tumoren vor allem Tumoren der Thyreozyten. Histologisch können hierbei das papilläre, das follikuläre und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom unterschieden werden. Die differenzierten Karzinome, zu denen nur das papilläre und das follikuläre Karzinom gehören, stellen 70 – 80% aller malignen Schilddrüsen-Tumoren (Böcker et al. 1984). Klinisch sind die meisten Karzinompatienten euthyreot oder bereits hypothyreot, da ein zumindest partieller Organausfall besteht (Mackenroth et al. 1992), lediglich in 17% der Fälle findet sich eine Hyperthyreose (Schröder et al. 1996). Rasch wachsende, szintigrafisch kalte primäre oder sekundäre Tumoren in der Schilddrüse können durch exzessive Freisetzung von Schilddrüsenhormonen aus zerstörten Follikeln ebenso die Ursache einer Hyperthyreose sein wie ausgedehnte Fernmetastasen von (primär nicht hyperthyreoten) Schilddrüsenkarzinomen. Ein

Karzinom kann neben einem autonomen Adenom oder in einer Struma mit diffuser Autonomie oder selten auch bei einem Morbus Basedow vorkommen. Vereinzelt finden sich auch Karzinome bei hypothyreoten Patienten mit Autoimmunthyreoiditis (Schmid et al. 1997a).

1.2 Epidemiologie

Der Anteil der Schilddrüsenkarzinome an allen Krebserkrankungen beträgt etwa 1% (Zedenius et al. 1992). Durchschnittlich treten 1-2 Neuerkrankungen/100000 Einwohner im Jahr auf (Rojeski et al 1985), die Mortalität liegt bei 0,6/100000 Einwohner und Jahr (Böcker et al. 1984). Mit einer etwa zehnfach höheren Inzidenz ist jedoch zu rechnen, da – wie durch Sektionsstatistiken belegt – eine große Zahl von bösartigen Schilddrüsenenerkrankungen in vivo unerkannt bleibt und sich okkult manifestiert. Die Inzidenz der multinodösen Struma ist hierbei genauso hoch wie die der uninodösen Struma (Rojeski et al. 1985; Belfiore et al. 1992). Die Prävalenz maligner Veränderungen in Schilddrüsenknoten ist regional starken Schwankungen unterworfen (Mackenroth et al. 1992); sie bilden weltweit einen Anteil von 5-30% (Ashcraft et al. 1981). In Jodmangelgebieten liegt der Anteil okkult maligner Schilddrüsenveränderungen im Operationsgut zwischen 1 und 9%. Schilddrüsenknoten treten hier zwar häufiger auf, sind aber prozentual seltener maligne (unter 5%) als die vergleichsweise selteneren Schilddrüsenknoten im Nicht-Endemiegebiet (Belfiore et al. 1992).

Das Geschlecht hat ganz offensichtlich einen Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit: Frauen sind von Schilddrüsenkarzinomen bis zu dreimal häufiger betroffen als Männer (Mackenroth et al. 1992). Die Frequenz maligner Läsionen ist in szintigraphisch kalten Knoten bei Männern jedoch etwa doppelt so hoch wie bei Frauen (Belfiore et al. 1992). Das Alter des Patienten spielt ebenfalls eine wichtige Rolle: maligne Tumoren wurden am häufigsten bei Patienten gefunden, die jünger als 30 Jahre oder älter als 60 Jahre waren; den kleinsten Anteil hatten Patienten in der vierten Dekade (Belfiore et al. 1992). Einzig gesicherte Ursache von malignen Schilddrüsenveränderungen ist bisher die Exposition ionisierender Strahlen im Kindesalter, z. B. im Rahmen therapeutischer Maßnahmen bei z.B. Akuter

Lymphatischer Leukämie, Morbus Hodgkin, Thymus-Tumoren oder diversen Hauttumoren (Mackenroth et al. 1992), sowie bei rezidivierender Tonsillitis und Lymphadenitis (Schmid et al. 1997a). Eine erhöhte Inzidenz an malignen Schilddrüsentumoren nach Bestrahlung der Halsweichteile konnte in Abhängigkeit von der applizierten Dosis nach einer Latenzzeit von 6 – 30 Jahren beobachtet werden (Franceschi et al. 1993, Grobholz et al. 1997). Besonders in der Kindheit vorbestrahlte Schilddrüsen verändern sich mit einer Latenz von 5 bis 30 Jahren in 10 bis 40% der Fälle zu einer Knotenstruma. Lag die Dosis über 200 Gy, so entwickeln mindestens 7 bis 30% dieser Strumen in einer Latenzzeit von 10 bis 20 Jahren ein Karzinom. Nach Strahlenexposition treten fast immer papilläre Karzinome auf. Diese wurden auch bei nukleären Zwischenfällen, wie Reaktorunfällen oder Atombombenexplosion, beobachtet (Schmid et al. 1997a; Nikiforov et al. 1994). Ein erhöhtes Malignitätsrisiko besteht bei bestimmten Vorerkrankungen wie der Hashimoto-Thyreoiditis, der multiplen endokrinen Neoplasie Typ II oder dem Gardner-Syndrom. Entwickeln Patienten mit einer Hashimoto-Thyreoiditis einen kalten Knoten, so besteht eine Malignomrate von bis zu 30% (Boeckl et al. 1990). Eine Erhöhung des endogenen TSH über eine längere Zeit scheint eine maligne Entartung nicht zu fördern (Mackenroth et al. 1992).

1.3 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Das papilläre Karzinom ist mit 50-70 % der häufigste maligne Schilddrüsentumor in Nicht-Struma-Endemiegebieten. Im Struma-Endemiegebieten ist das papilläre Karzinom hingegen mit 30-40 % in etwa gleich häufig wie das follikuläre Karzinom (Schmid et al. 1997b). Mikroskopisch enthalten alle papillären Karzinome in wechselndem Ausmaß follikuläre und papilläre Anteile. Die papillären Strukturen bestehen aus fibrovaskulären, manchmal hyalin-verquollenen baumartigen Verästelungen, die von kubischen bis zylindrischen Zellen ausgekleidet werden. Besonders charakteristisch sind die großen hellen, milchglasartigen Kerne, die teilweise dachziegelartig übereinanderliegen. Nukleoli sind, wenn vorhanden, klein. In 50% lassen sich im Stroma konzentrisch geschichtete etwa 70 µm durchmessende Psammomkörper nachweisen. Mitosen sind selten. Follikuläre Anteile bestehen aus

unreifen trabekulären Formationen oder aus hochdifferenzierten neoplastischen Follikeln, die häufig den Aspekt von Kolloidfollikeln mit flachem Epithel und reichlich Kolloid aufweisen. Die Metastasierung des papillären Karzinoms erfolgt vor allem lokal lymphogen (Böcker et al. 1984). Die 5- bis 10- Jahres-Überlebensrate beträgt 80 bis 90% (Pfannenstiel et al. 1991).

Das follikuläre Karzinom ist insgesamt betrachtet der zweithäufigste maligne Tumor der Schilddrüse (20-50% aller Schilddrüsenkarzinome, Mackenroth et al. 1992). In der Regel erscheint es unifokal (Emerick et al. 1993) und ist häufig assoziiert mit einer benignen multinodösen Struma (Donohue et al. 1984). Eine Metastasierung erfolgt bevorzugt hämatogen in Lunge und Skelett, die 5- bis 10- Jahres-Überlebensrate beträgt 60 bis 70% (Pfannenstiel et al. 1991).

Nach makroskopischem Bild und biologischem Verhalten lassen sich zwei Subtypen unterscheiden:

1. Gekapseltes angioinvasives Karzinom:

Es macht 37-50% der follikulären Karzinome aus. Makroskopisch ist der Tumor von einer Kapsel begrenzt, zentrale Narbenbildung und Einblutung sind häufig.

2. Grob-invasives follikuläres Karzinom:

Makroskopisch stellt es sich als grau-weißer, knotiger Tumor mit unregelmäßiger Begrenzung dar. Mikroskopisch reicht das Spektrum vom hochdifferenzierten follikelbildenden bis zum soliden trabekulär aufgebauten Strukturmuster. Zellulär und strukturell ist die hochdifferenzierte Tumorform nicht vom follikulären Adenom zu unterscheiden (Droese et al. 1984). Malignitätskriterien sind Gefäßinvasion und/oder Kapseldurchbruch (Schmid et al. 1997b).

Die Blutgefäßinvasion gehört zur Regel beim follikulären Karzinom und stellt beim gekapselten Karzinom eines der alternativen Mindestkriterien für die Malignitätsdiagnose zur Abgrenzung vom Adenom dar. Eine lymphangische Tumorprogration ist eher selten (Böcker et al. 1984).

1.4 Follikuläres Adenom versus follikuläres Karzinom

Die exakte Differenzierung zwischen benignen und malignen follikulären Neoplasien der Schilddrüse bereitet seit jeher Schwierigkeiten. Da sie zytologisch nicht eindeutig voneinander getrennt werden können, gelten als zuverlässige Kriterien für Malignität allein Gefäßeinbrüche oder Kapseldurchbrüche. Um diese sicher zu belegen, sind histologische Untersuchungen an zahlreichen Schnitten des Operationspräparates notwendig (Droese et al. 1979). Die derzeit zur Verfügung stehende präoperative Diagnostik kann die Dignität einer follikulären Neoplasie in den meisten Fällen feststellen, jedoch verbleibt eine Anzahl von unklaren Befunden.

1.5 Diagnostik

Zu der Standard-Diagnostik eines unklaren Schilddrüsenknotens gehören neben der klinischen Untersuchung die Sonografie, die Szintigrafie, die Feinnadel-Biopsie (FNA) und zusätzlich die laborchemische Untersuchung der Schilddrüsenhormone und des TSH zur Beurteilung der endokrinen Aktivität.

Bei der körperlichen Untersuchung gefundene harte, schmerzlose, nichtverschiebliche Knoten erwecken den Verdacht einer malignen Veränderung (Emerick et al. 1993). Harte Schilddrüsenherde können aber nicht nur Karzinomen, sondern auch verkalkten Strumaknoten entsprechen. Weiche Knoten schließen ein Karzinom nicht aus (Schmid et al. 1997). Die Betrachtung der allgemeinen körperlichen Klinik allerdings trägt kaum etwas zur Differentialdiagnose der follikulären Neoplasie bei, da die klinischen Symptome der Schilddrüsenkarzinome im Allgemeinen eher uncharakteristisch sind. Oft machen sie sich erst durch Spätsymptome oder Metastasen bemerkbar. Spätsymptome sind meist Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorwachstums und präsentieren sich als Schmerzen (oft mit Ausstrahlung: z. B. retroaurikulär, auch als Hinterkopfschmerz), Heiserkeit infolge einer Recurrensparese, Horner'scher Symptomenkomplex, lokale Exulceration, obere Einflußstauung, Zeichen der Fernmetastasierung (Lunge, Leber, Knochen usw.), sowie allgemeine Tumorzeichen: Gewichtsverlust, Anämie, Adynamie, Kachexie usw. (Emerick et al. 1993). Nicht selten sind beim follikulären Schilddrüsenkarzinom Fernmetastasen der einzige Malignitätsbeweis (Mackenroth et al. 1992). Bei der Erstdiagnose weisen bereits 3-33%

der Patienten Fernmetastasen auf (Hirabayashi et al. 1961).

Die Sonografie ermöglicht die Differenzierung zwischen zystischen und soliden Prozessen und erlaubt durch die Beurteilung der Echogenität und der Randbegrenzung auch eine nähere Einordnung des Herdbefundes. Mit Hilfe der Schilddrüsenszintigrafie kann die Stoffwechselaktivität eines Knotens beurteilt und damit z. B. ein funktionell "kalter" Knoten nachgewiesen werden.

Generell besteht ein erhöhtes Malignitätsrisiko für Schilddrüsenknoten bei Erfüllung einer oder mehrerer der folgenden Kriterien (Pffannenstiel et al. 1991, Rojeski et al. 1985; Schmid et al. 1997a):

- Alter jünger als 20 Jahre oder älter als 60 Jahre
- Männliches Geschlecht
- Hashimoto Thyreoiditis
- Angehörigkeit zu einer MEN-Familie
- solitäre (selten multiple) Knoten, insbesondere bei Größenzunahme innerhalb kurzer Zeit
- szintigrafisch aktivitätsarme Knoten (Karzinomhäufigkeit 3-15%)
- sonografisch echoarme Knoten (Karzinomhäufigkeit 3-5%) besonders bei gleichzeitig unscharfer Randbegrenzung (Karzinomhäufigkeit 10-20%)
- Anamnestisch Hochvolt-Bestrahlung der Halsregion (z. B. im Rahmen der Behandlung eines Morbus Hodgkin)

Ergibt sich nach diesen Kriterien ein Malignitätsverdacht, ist eine Punktion mittels Feinnadelaspirationsbiopsie (FNA) indiziert. Die Feinnadelaspirationsbiopsie ist eine risikoarme diagnostische Methode und gehört heute insbesondere im Strumaendemiegebiet zum diagnostischen Standardrepertoire bei der präoperativen Evaluation von Schilddrüsenknoten. Die ultraschallgesteuerte Punktion erlaubt die gezielte Feinnadelaspirationsbiopsie ab 1,5 cm durchmessenden Knoten. Der klinische Nutzen liegt darin, die Operationshäufigkeit bei benignen Läsionen zu senken, Malignome bereits präoperativ zu erkennen oder klinisch okkulte Karzinome zu entdecken (Schmid et al. 1997a). Nach großen Untersuchungen ist in 5-6% der Fälle mit

einem tumorverdächtigen oder tumorpositiven zytologischen Befund zu rechnen (Droese et al. 1976). Für papilläre, medulläre und anaplastische Karzinome hat sich die Feinnadelaspirationsbiopsie als die genaueste und kosteneffektivste Methode zur Diagnosefindung erwiesen (Emerick et al. 1993).

Die Dignitätsbestimmung der follikulären Neoplasie in der Aspirationszytologie ist allerdings außerordentlich schwierig. Falsche Verdachtsbefunde sind unvermeidbar, weil zytologisch eine Unterscheidung zwischen follikulärem Adenom und follikulärem Karzinom nach üblichen Kriterien nicht möglich ist (Droese et al. 1979; Rout et al. 1998). Auch die Bestimmung des DNA-Gehaltes, die Anwendung der Kernmorphometrie oder der AgNOR-Analyse jeweils einzeln liefern keine sicheren Unterscheidungskriterien (Schmid et al. 1997a). Es kann nur eine Gruppendiagnose "follikuläre Neoplasie" erstellt werden (Droese et al. 1979, Löwenhagen et al. 1974). Dieser Befund hat in der Regel eine operative Aufklärung zur Folge. Insgesamt betrachtet sind etwa 20 % aller mittels Feinnadel-Aspirationszytologie untersuchten Schilddrüsenknoten follikuläre Neoplasien; davon wiederum erweisen sich in der postoperativen histopathologischen Aufarbeitung etwa 20 % als Karzinom (Gharib et al. 1984).

1.6 Chirurgische Therapie

Die Lobektomie wird heute als Verfahren der Wahl bei der präoperativen Diagnose "follikuläre Neoplasie" angesehen. Die komplette Lobektomie verringert das Risiko einer höheren Komplikationsrate (Recurrensparese, Hypoparathyreoidismus) durch einen ipsilateralen Zweiteingriff. Da die intraoperative Schnellschnittdiagnostik Schwierigkeiten bereiten und in bis zu 20% falsch-negative Befunde ergeben kann (Kingston et al. 1992), ist eine komplette histopathologische Befundung des Resektates notwendig.

Ergibt die Histologie postoperativ einen Malignomnachweis, wird die totale Thyreoidektomie vervollständigt, die je nach histologischem Typ und makroskopischen Lymphknotenbefund von der zentralen (paratrachealen) und lateralen (jugulären) Lymphknotendissektion ergänzt wird (Rothmund et al. 1990).

1.7 Neue diagnostische Ansätze

Für die Abklärung der follikulären Schilddrüsenneoplasie ergibt sich anhand der dargestellten Problematik der Bedarf einer verbesserten pathomorphologischen Diagnostik. In den letzten Jahren haben in der Tumordiagnostik Verfahren, die das Wachstumspotential und die biologischen Eigenschaften eines Tumors berücksichtigen, an Bedeutung gewonnen. Dazu zählen: die Untersuchung des DNA-Gehaltes der Zelle, die immunhistochemische Analyse der Zellproliferation, die morphometrische Zellanalyse und die Bestimmung der Proteinsynthese auf der Kern- bzw. Nukleolusebene, wie z. B. die "AgNOR-Analyse" (argyrophillic staining of nucleolar organizer regions = AgNORs) als Marker für Zellproliferation (Derenzini et al. 1989). Im Kontext mit den genannten Verfahren stellt sich hier speziell die Frage, in welchem Zusammenhang NORs mit neoplastischem Wachstum stehen und inwieweit damit die AgNOR-Analyse als diagnostisches Werkzeug in der Tumorpathologie einsetzbar ist.

1.7.1 Grundlagen der Kernmorphometrie

"Morphometrie" bedeutet die quantitative Beschreibung der geometrischen Figuren einer Struktur mit einer beliebigen Größe. Alle Techniken, die Messungen an Strukturen ermöglichen, können unter dem Begriff "Morphometrie" zusammengefasst werden. Hier wurden die geometrische Morphometrie und die digitale Bildanalyse verwendet.

Die Messungen einer Struktur können auf der zweidimensionalen (Planimetrie) oder dreidimensionalen Ebene durchgeführt werden. Die Morphometrie ist objektiv und reproduzierbar, und gerade hier liegen die Vorteile dieser Methode gegenüber der subjektiven Beurteilung, insbesondere in der Zytopathologie, wo eine quantitative Erfassung von Zell- oder Kernveränderungen von Bedeutung ist. So können z. B. Flächengrößenschwankungen, Veränderung der Kernfläche, Veränderung der Formfaktoren, sowie Änderung der Kern-/Zytoplasma-Ratio objektiv erfasst werden (Weibel et al. 1979). Die geometrische Morphometrie ermöglicht die Messung von Strecken, Flächen, Umfängen oder Koordinaten; sie wird häufig in der Zytomorphometrie eingesetzt.

Die digitale Bildanalyse auf der Grundlage von Verfahren der Mustererkennung

ermöglicht die Extraktion weiterer Informationen aus Bildern morphologischer Strukturen, wie z.B. Zellen oder Zellkernen. Bei der digitalen Bildanalyse werden Bilder in Rasterpunkte oder homogene Bildelemente aufgelöst. Dadurch werden Bilder in eine computergerechte Form gebracht, mit der Möglichkeit, diese zu speichern. Die Raster- oder Bildpunkte werden als "Pixel" bezeichnet. Die einzelnen Pixel weisen unterschiedliche "Grautöne" oder Grauwerte entsprechend der Bildvorlage auf. Damit ist die Möglichkeit zur Unterscheidung morphologischer Strukturen im eingelesenen Computerbild gegeben. Die bildanalytische Bewertung klinischer Präparate aus der Zytologie oder Histologie ist vor allem dann von Interesse, wenn die vorliegenden pathologischen Zell- oder Strukturveränderungen nicht eindeutig durch eine rein visuelle qualitative Begutachtung zu erkennen sind. Die Morphometrie bietet hier die Möglichkeit, die Befunde in Zahlen zu fassen und damit objektivierbar zu machen.

Eines der Hauptanwendungsgebiete der morphometrischen Zellanalyse liegt in der Differentialdiagnose von Läsionen, die histomorphologisch nur geringe oder gar keine fassbaren Unterschiede aufweisen. Ein spezieller Vorteil der Methode ist auch, dass sie sich auch dort erfolgreich anwenden lässt, wo nur kleinste Partikel eines Gewebes zur Verfügung stehen, und zum Beispiel das Hauptmerkmal der Karzinome, nämlich das infiltrierende Wachstum, nicht ohne weiteres verifiziert werden kann (Bittinger 1996).

Untersuchungen auf dem Gebiet der pigmentierten Hautläsionen ermöglichten mittels der Kernmorphometrie, signifikante Unterschiede zwischen dem malignen Melanoma in situ und der biologisch benignen melanozytischen Hyperplasie lichtgeschädigter Hautpartien, die einander histologisch extrem ähneln, herauszuarbeiten (Weyers et al. 1996). Andere Autoren beschreiben ebenfalls die zuverlässige Trennung morphologisch ähnlicher, biologisch jedoch völlig unterschiedlicher Läsionen wie z.B. benignen und malignen kartilaginären Tumoren. Es wurden morphometrische Parameter - die relative Volumendichte und die Fläche der Zellkerne - von Enchondromen und Chondrosarkomen vermessen. Eine signifikante Trennbarkeit der beiden Gruppen anhand der relativen Volumendichte der Zellkerne war hier möglich ($p=0,001$). Als nicht geeigneter Parameter erwies sich hier die Kernfläche (Böhm et al. 1992).

Schwierig ist jedoch die differentialdiagnostische Aussagekraft der Kernmorphometrie in der Gruppe der Präkanzerosen. Diese ist offensichtlich organabhängig (Bittinger

1996). Während zum Beispiel die Epitheldysplasie der Magenschleimhaut deutliche Kerngrößenunterschiede zum Karzinom aufweist (Bearzi et al. 1992), zeigt eine Reklassifizierung von Dickdarmkarzinomen - bezogen auf die Kernfläche - eine Richtigkeit von nur 48% (Ranaldi et al. 1992), während die Kerne der Adenome mit schwerer Dysplasie keine signifikanten Unterschiede zum Karzinom erkennen lassen.

Die morphometrische Diagnose basiert meist nicht auf einem einzigen Kriterium bzw. Messparameter. Zwar hat die Kernfläche – als Primärparameter isoliert betrachtet – in allen durchgeführten Untersuchungen eine größere Bedeutung gezeigt als z.B. die Varianz der Kernfläche oder andere Parameter – ist aber allein meistens nicht in der Lage, für eine statistisch signifikante – und somit diagnostisch wirksame Trennung zwischen den untersuchten Läsionen zu sorgen. Erst unter Hinzuziehen weiterer Parameter gelingt es, zwei morphologisch ähnliche Tumoren deutlich voneinander zu trennen (Bittinger 1996).

1.7.2 Definition - Grundlagen der AgNOR-Analyse

Als NORs werden Chromosomenabschnitte bezeichnet, auf denen die ribosomalen Gene (rDNA) gelegen sind. Es handelt sich dabei um 200-300 hintereinandergeschaltete repetitive Gene, die sich während der Zellteilung auf den kurzarmigen Chromosomen (Gruppe D13-15, Gruppe G 21,22) befinden. In der Interphase liegen sie dagegen im Nukleolus. Das Transkriptionsprodukt von NORs ist ribosomale RNA, welche als Baustein der Ribosomen fungiert. Die NORs sind damit direkt an der Ribosomenproduktion der Zelle beteiligt und somit zentrale Schaltstellen der gesamten zellulären Proteinbiosynthese (Fakan et al. 1986). Da die meisten Lebensäußerungen einer Zelle (Wachstum, Differenzierung, Zellerneuerung, endokrine Aktivität etc.) über den Proteinstoffwechsel ablaufen, sind sie unmittelbar vom Beitrag der NORs abhängig (Waterfield et al. 1986; Mainwaring et al. 1986).

Ort der RNA-Synthese ist der Nukleolus. Er ist ultrastrukturell aus netzartig angeordnetem granulärem und fibrillärem Material aufgebaut. Dieses weist im

Wesentlichen drei Strukturelemente auf:

1. ein aus sehr dicht gepackten 3-5 nm dicken Fibrillen aufgebautes “dense fibrillar component” (DFC),
2. aufgelockerte und rundlich angeordnete, aus 4-8 nm dicken Fasern bestehende “fibrillar centers” (FC) und
3. ein meist peripher gelegenes, aus 15 nm großen Fibrillen zusammengesetztes “granular component” (GC).

DFC und FC gelten als die eigentlichen Äquivalente der Metaphasen –NORs, an denen die aktive Transkription von rDNA stattfindet. Das primär gebildet Transkript (45S-rRNA) reift im GC zu den eigentlichen Ribosomenuntereinheiten.

Bei der Silberfärbung bindet sich das Silber nicht direkt an die rDNA, sondern an spezifisch mit der rDNA verbundene Non-Histonproteine, genannt “NOR – assoziierte Proteine” (“NORAPs”) (Schwarzacher et al. 1978; Howell et al. 1977; Busch et al.1982), das Nucleolin und das Protein B23 (Roussel et al. 1992).

Mit Hilfe der Versilberungstechnik, die erstmalig von Goodpasture und Bloom 1975 eingeführt und von Ploton et al. 1986 vereinfacht und standardisiert wurde, konnte die Lokalisation der NOR assoziierten Proteine und damit der rDNA selbst bestimmt werden (Goodpasture und Bloom 1975; Ploton et al.1986). In allen Untersuchungen fand sich eine selektive Agyrophilie des Nukleolus im Bereich der FC, relativ elektronen-durchlässiger Strukturen, sowie, je nach Fixierung variierend, im unmittelbar umgebenden DFC. FC und DFC des Interphasekerns entsprechen somit den NORs der Metaphasechromosomen. In ihnen sind die mit der rDNA assoziierten Proteine (NORAPs) und die NORs selbst gelegen (Fakan et al.1986; Moreno et al. 1988).

Die AgNOR-Analyse bietet damit die Möglichkeit, die Aktivität der Gene selbst darzustellen und damit in der morphologischen Tumordiagnostik zu erfassen (Rüschoff et al. 1990). Die besondere Bedeutung dieser Technik liegt in der durch zahlreiche Studien gesicherten Korrelation von Silberreaktion und Genaktivität (Miller et al. 1976; Engel et al. 1977; Busch et al. 1979) und der damit verbundenen Zellproliferation

(Reevers et al. 1984; Derenzini et al. 1989). Demnach sind genau die NORAPs argyrophil, die sich im Bereich aktivierter rDNA befinden. Nachweislich sind nahezu ausschließlich entspiralisierte, zur Transskription vorbereitete, "aktive" NOR-Gene von der positiven Silberreaktion der umgebenden Proteine betroffen (Ferraro et al. 1988).

Bei schnell wachsenden Zellen gibt es nur eine kurze G1-Phase, so dass möglicherweise die Zeit fehlt, das rDNA-Material in Form eines einzelnen Nukleolus zu sammeln bzw. zu "organisieren": Das AgNOR-Verhalten humaner Lymphozyten unter Wachstumsstimulation wurde in Zellkulturen untersucht. Ruhende, kleine Lymphozyten zeigten dabei einen, allenfalls zwei Silberniederschläge im Kern. Dagegen vergrößerten sich die Silberniederschläge bei Blastentransformation unter Phytohämagglutinineinfluss erheblich. Nach der ersten Zellteilung wiesen die nachfolgenden Generationen ein feindisperses Verteilungsmuster auf (Field et al. 1984). Offenbar scheint unter beschleunigten Wachstumsbedingungen – wie bei künstlicher Stimulation, bzw. analog in der Karzinogenese – die Reproduktion der rDNA in dieser feinverteilten Form an mehreren Stellen im Chromatin gleichzeitig stattzufinden.

Bei der chemisch induzierten Karzinogenese konnte ein signifikanter Zuwachs des AgNOR-Gehaltes der betroffenen Zellen beobachtet werden: Das AgNOR-Verhalten in der chemisch mit Diäthylnitrosamin provozierten Karzinogenese wurde an Rattenleberzellen untersucht. Die Silberfärbung wurde densitometrisch in relativer Dichte evaluiert. Bereits sechs Tage nach Karzinogen -Applikation zeigte sich eine Zunahme des AgNOR-Gehaltes der Leberzellen, nach zwei Monaten hatte sich der rDNA-Gehalt ungefähr verdoppelt ($p < 0.005$) (Deleener et al. 1987). Es wurde außerdem versucht, Colon-Adenome (20 Fälle) von -Karzinomen (20 Fälle) mittels kategorisierter AgNORs zu trennen: kleine, große und die Gesamtzahl der AgNORs wurden bestimmt. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen adenomatösen und karzinomatösen Läsionen konnte mit AgNOR-Größe und AgNOR-Zahl festgestellt werden (Muscara et al. 1991). Mittels der AgNOR-Analyse wurden aktive (36 Fälle) und inaktive (25 Fälle) Formen der Colitis ulcerosa mit Adenokarzinomen des Colons (32 Fälle) verglichen und man fand, dass von normaler Mucosa über inaktive, aktive Colitis bis zum Adenokarzinom ein Anstieg der AgNOR-Zahl zu vermerken war. Allerdings konnte nicht signifikant per AgNOR-Count zwischen aktiver Colitis und Adenokarzinom unterschieden werden (Tuccari et al. 1993). Niedrigmaligne und hochmaligne Non-

Hodgkin Lymphome wiesen einen signifikanten Unterschied in AgNOR-Anzahl und dem maximalen AgNOR-Durchmesser auf (Crocker et al. 1988).

In Bezug auf das Tumorwachstum besteht eine Korrelation zwischen mittlerer AgNOR-Zahl und/oder mittlerer AgNOR-Gesamtfläche und der Wachstumsrate, wie an Untersuchungen mit Neuroblastomzelllinie demonstriert werden konnte (Derenzini et al. 1989). Somit stellt die Silberfärbung selektiv die Regulatorproteine der ribosomalen DNA (rDNA) dar und korreliert daher eng mit dem Proliferationsstatus einer Zelle (Bittinger 1996, Derenzini et al. 1989). Die Prognose bei malignen Tumoren wird durch deren lokale Wachstumseigenschaften und Fernwirkungen, insbesondere aber durch ihr metastatisches Potential, bestimmt. Die Bewertung der Tumorzellkinetik ist wegen ihrer engen Beziehung zur Fähigkeit der Tumorzellen, lokal aggressiv zu wachsen und zu metastasieren, zu einer wichtigen Größe bei der histopathologischen Diagnosestellung geworden.

1.8 Fragestellung

Die oben genannten Untersuchungen sind – einzeln angewandt – leider oft nicht aussagekräftig genug (Bittinger 1996). In der folgenden Arbeit wurde deshalb zunächst untersucht, ob mit der Kernmorphometrie in Verbindung mit der AgNOR-Analyse in histologischen Präparaten retrospektiv eine sichere Differenzierung zwischen follikulären Schilddrüsenadenomen und –karzinomen gelingt. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Gibt es in der Betrachtung mit Kernmorphometrie und AgNOR-Analyse Unterschiede zwischen follikulären Schilddrüsen-Adenomen und –Karzinomen?
2. Erlauben die Methoden eine für den klinischen Alltag hinreichend sichere Unterscheidung zwischen follikulärem Adenom und Karzinom?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Das betrachtete Patientengut schloss alle zwischen 1984 und 1996 in der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg unter der Verdachtsdiagnose "follikuläre Neoplasie" operierten und in dem Medizinischen Zentrum für Pathologie der Universität Marburg histopathologisch befundeten Fällen ein. Ausgewertet wurden die Fälle, bei denen der vollständige Datensatz vorhanden war.

Patienten:

Untersucht wurden insgesamt 60 OP-Präparate von Patienten, die sich zwischen 1984 und 1996 einer Schilddrüsen-Operation wegen einer follikulären Neoplasie in der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg unterzogen hatten.

Das Staging der Tumoren wurde gemäß der TNM-Klassifikation maligner Tumoren (UICC, 5. Auflage 1997) durchgeführt

	Unter 45 J.	über 45 J.
Stadium I	jedes T, jedes N, M0	T1 N0 M0
Stadium II	jedes T, jedes N, M1	T2 N0 M0
		T3 N0 M0
Stadium III		jedes T N0 M0
		T, N1 M0
Stadium IV		jedes T, jedes N, M1

Tab. 1: Staging der Tumoren

Präparate:

Das Tumormaterial wurde in 4%igem gepuffertem Formalin fixiert und in Paraplast eingebettet. Aus diesem Material wurden mit einem Mikrotom 1208 (Leitz, Wetzlar, D) Schnittpräparate in der Stärke von 3 µm angefertigt. Die histologische Diagnosestellung erfolgt am konventionell gefärbten HE-Schnittpräparat. Untersucht wurden 29 follikuläre Adenome und 31 follikuläre Karzinome.

2.2 Methoden

2.2.1 AgNOR-Färbung

Die AgNOR-Färbung der Präparate erfolgte nach der für Paraffineinbettungen standardisierten Methode der feuchten Autoklavierung (Melag Autoklav 23, Nr.:3012854, Melag Ag, Berlin): dazu wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung für 20 Minuten bei 120°C in Natrium-Citrat-Puffer (0,01 M Natrium-Citrat-Puffer, pH=6) behandelt (Öfner et al.1994).

AgNOR-Färbemethode:

AgNOR-Lösung

Gelatine (0.02g), in 1%ger Ameisensäure (1 ml), bei 60°C, 5 Minuten lösen und mit Silbernitrat (1g) in deionisiertem Aqua dest. (2ml) vermischen.

(Gelatine, Artikelnummer 4078; Ameisensäure, Artikelnummer 246; Silbernitrat, Artikelnummer 1512; alle Präparate: Merck KG aA, Darmstadt, D)

Gewebevorbereitung

3µm dicke Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert.

Nach kurzer Spülung in Aqua bidest (1-2 ml) wurden die Schnitte mit der AgNOR-Lösung (in 1% Ameisensäure gelöste Gelatine und Silbernitratlösung im Verhältnis 1:2) für 27 min in einer feuchten Kammer bei Raumluft inkubiert. Nach Abspülen des Schnittes erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol.

Als Eindeckmedium wurde Cargille Oil verwendet (Cargille Oil, Cargille Laboratories, NJ 07009, USA).

2.2.2 Bildanalyse

Die Analyse der Präparate, sowohl im Hinblick auf die Kernmorphometrie als auch auf die AgNOR-Analyse, wurde mittels automatischer Bildanalyse durchgeführt.

Ein Bildanalyse-System bildet eine Einheit, die es ermöglicht, mit Hilfe von besonders für diesen Zweck entwickelten Komponenten über verschiedene Eingangs-Geräte (Videokamera, Mikroskop, Photoaufnahmen, Makro-Objektive) Bilder zu speichern und zu analysieren.

2.2.2.1 Hardware und Software

Sämtliche Untersuchungen wurden mit Hilfe eines interaktiven, PC-gesteuerten semiautomatisierten Bildanalyse-Systems (Olympus Optical Co., Hamburg, D) und entsprechender Software (Cue 3, v.4.5; Galai Production Ltd., TelAviv, Israel) durchgeführt.

Als Zentraleinheit diente ein IBM Personal Computer 386 DX 40Mhz mit integriertem mathematischen Koprozessor, an den ein Olympus Binokularmikroskop (BH-2 Firma Olympus Optical Corporation, Hamburg, D) über eine 1-Chip RGB-Sync-Kamera (Charge-Coupled-Display 978CX; Panasonic, Tokyo, Japan) angeschlossen war. Zwischen der Kamera und dem Mikroskop befand sich ein Verlängerungstubus mit integriertem Zwischenokkular.

Die am Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1000 x (Ölimmersionsobjektiv 100x) eingestellten Bilder wurden mittels der oben erwähnten Aufsatzeinrichtung auf den für die Bildanalyse notwendigen Bildschirm (Sony, Tokyo, Japan) übertragen und bei einer Endvergrößerung von 2500 x vermessen.

2.2.2.2 Einstellung des Gerätes

Das System musste vor dem Messverfahren vorbereitet werden. Dabei wurden die "ab Werk" gespeicherten Werte den jeweiligen Bedürfnissen des Benutzers angepasst. Die

neuen Werte wurden in eine Set-Parameter-Datei gespeichert. Bei der Einstellung waren vor allem zwei Faktoren zu beachten: die Kalibrierung des Systems und die Auswahl der Messparameter.

2.2.2.3 Kalibrierung

Mit der Kalibrierung wurde die Längenausdehnung eines Punktes (Pixel) der Bildschirmfläche in den momentan gültigen Maßeinheiten angezeigt und berechnet. Dafür wurde auf dem Monitor ein Gitter erzeugt und mit Hilfe der Maus eine Linie über das Gitter gezeichnet. Danach wurde die Länge der gezeichneten Linie in den für die zukünftigen Messungen gültigen Maßeinheiten eingegeben und abgespeichert. Diese Prozedur wurde getrennt für die Abszisse und für die Ordinate wiederholt. Die Daten wurden gespeichert, so dass diese Art der Einstellung nur einmal notwendig war.

2.2.2.4 Auswahl der Parameter

Hier wird dem Benutzer die Möglichkeit gegeben, sämtliche zur Verfügung stehenden Parameter für die statistische Auswertung zu benutzen oder - je nach Fragestellung - die dafür geeigneten auszuwählen.

Die Parameter wurden mit Hilfe der Maus ausgewählt und in einer Set-Parameter-Datei gespeichert.

2.2.3 Messverfahren

2.2.3.1 Aufsuchen des zu vermessenden Tumorausschnittes

Um eine subjektive Beeinflussung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden die histologischen Präparate aller Tumoren – der Adenome sowie der Karzinome – in einem gemeinsamen Pool verblindet zusammengestellt.

Die Auswahl der zu vermessenden Zone wurde stets am routinemäßig angefertigten, HE-gefärbten, Paraffinschnitt (3 μm) durchgeführt. Auf diese Weise wurden mögliche Unterschiede zwischen den routinemäßigen Vordiagnosen und den bildanalytischen Ergebnissen verhindert. Areale, die für bestimmte Tumoren nicht repräsentativ genug waren sowie regressiv verändertes Gewebe, Nekrosezonen, Kernpyknose, Karyorrhesis

und andere histologische oder zytologische Artefakte (z.B. "nackte", d.h. vom restlichen Gewebe isolierte Kerne), wurden von der Messung ausgeschlossen.

2.2.3.2 Selektionsprinzip

Die zu messenden Zellkerne wurden im zuvor eingestellten Messareal nach dem zonalen Prinzip ausgewählt:

Nach Einstellung eines zufällig ausgewählten Areals wurden alle scharf abgebildeten Zellkerne gemessen. Die Bildschirmfläche wurde als "Messzone" festgelegt und mäanderförmig ohne Änderung der Messebene (d.h. ohne Betätigung der Mikrometerschraube) abgefahren und alle auf einer imaginären Linie liegenden Zellkerne wurden vermessen. Das Verfahren wurde so lange wiederholt bis 30 Messungen (Rompanen et al. 1982) erreicht wurden.

Bei sämtlichen Messungen wurde eine sogenannte "Einzelzellmessung" durchgeführt: jeder ausgewählte Kern wurde in einem ersten Vorgang mit Hilfe einer optischen Maus umfahren und so vom restlichen Areal "ausgeschnitten" (Crocker et al. 1988). Anschließend wurde automatisch pro Präparat ein Mittelwert erfasst.

2.2.3.3 Kernmorphometrie

Die Vermessung der Kerne erfolgte durch die Analyse der Farb- und der Grauwerte.

Grundlage der Farb- bzw. der Grauwertanalyse ist das sogenannte Histogramm, in dem die Pixel mit gleichem Wert als Säule zusammengefasst werden.

Entsprechend dem Arbeitsprinzip eines Bildanalyse-Systems wurde das eingestellte zuvor eingekreiste Bild in 860x640 Pixel (Messpunkte) zerlegt.

In einem zweiten Vorgang wurde der Hintergrund des eingestellten Feldes für die Messung gelöscht, mit dem Ziel, mögliche Störfaktoren auszuschalten.

Die Grau- und Farbwerte von jedem Punkt wurden automatisch ermittelt. Auf dieser Basis wurden jeweils die Grenzen für die Grauwert- und Farbanalyse gesetzt, die für die richtige Erkennung der Kernfiguren notwendig waren. Dabei wurden diese Erkennungsgrenzen stets höher gesetzt als die des jeweiligen Kernes, um Farbeunterschiede des Kernchromatins auszugleichen.

2.2.3.4 Analyse

Für die automatische Computeranalyse lagen nur Objekte zugrunde, deren Werte gleichwertig mit der voreingestellten Farb- und Grauwertschwelle waren bzw. unterhalb dieser lagen.

2.2.3.5 Ermittlung der Kernparameter

Die Weiterverarbeitung der in ASCII Format gespeicherten Kerndaten erfolgte mit Hilfe eines in dBASE IV eigens erstellten Programms (Bittinger 1996). Von den Computer-ermittelten Objektparametern wurden als Ausgangsdaten verwendet:

die Objektfläche

der Rundungsfaktor I

die Feret-Durchmesser

der Rundungsfaktor II

die Martin-Radien

Zusätzlich wurde die vom Computer für jeden untersuchten Fall ermittelte **Varianz der Objektfläche (Perimeter)** in die Auswertung mit einbezogen.

Die **Objektfläche (OF oder Area)** ist definiert als das Produkt der Messpunktzahl (Pixelzahl) und der Pixelfläche.

Formel: $OF = \text{Pixelzahl} \times (\text{Pixelwert} \times \text{Kamerafaktor})$

Die Pixelfläche wird wiederum definiert als der Wert des Messpunktes multipliziert mit dem Kamerafaktor.

Beide, sowohl der Pixelwert als auch der Kamerafaktor wurden in der System-Konfiguration voreingestellt und gespeichert.

Der **Rundungsfaktor I (Formfaktor/ Shape Factor)** ist ein Maß für die "Glätte" der Oberfläche und wird gemäß folgender Formel ermittelt:

$\text{Rundungsfaktor I} = \text{Objektfläche} / \text{Objektumfang} \times 4\pi$

Die **Feret-Durchmesser** sind Projektionen eines Objektes, gemessen in verschiedenen Messwinkeln.

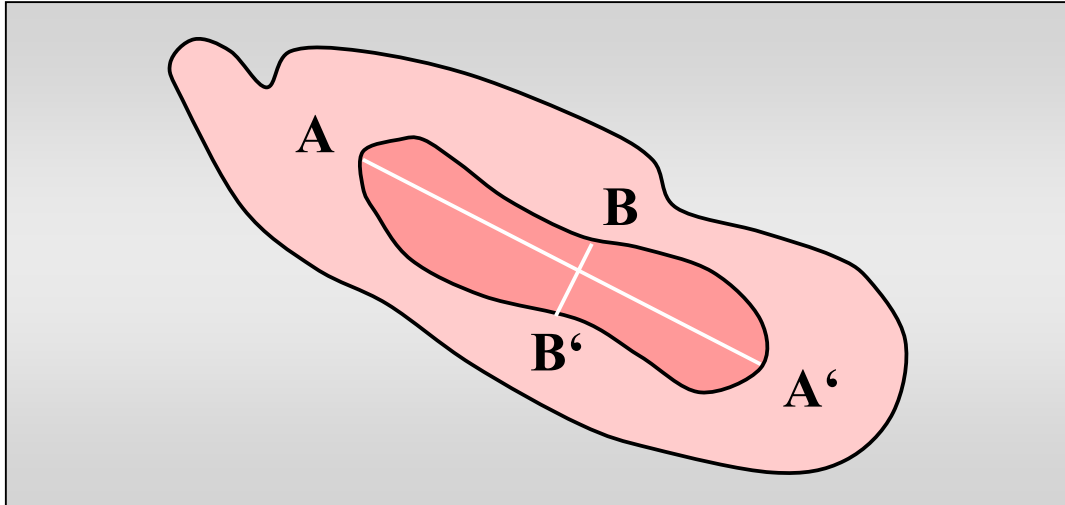


Abb. 1: Darstellung der zwei wichtigsten Feret-Durchmesser

Die Strecke AA' entspricht dem maximalen, die Strecke BB' dem minimalen Objektdurchmesser.

Die Zahl der Feret-Durchmesser - und gleichzeitig die Winkel, bei denen Messungen durchgeführt werden – kann variieren zwischen 4 und 24. Bei unseren Untersuchungen wurden vier Winkel vermessen (F0, F45, F90, F135).

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Winkeln wurden bei der Messung der Feret-Durchmesser folgende Werte ermittelt:

Maximaler Winkel: entspricht dem längsten Feret-Durchmesser.

Minimaler Winkel: entspricht dem kürzesten Feret-Durchmesser.

Maximaler Durchmesser: stellt die Länge des längsten Feret-Durchmessers dar.

Minimaler Durchmesser: stellt die Länge des kürzesten Feret-Durchmessers dar.

Durchmesser-Mittelwert (Average-Feret-Diameter): ermittelt den Mittelwert sämtlicher Feret-Durchmesser und entspricht gleichzeitig der "Größe" des gesamten Objektes.

Die **Martin-Radien** stellen den Abstand vom Schwerpunkt des Objektes zum Objektrand dar. Diese Radien werden unter acht vorgegebenen Winkeln gemessen: 45° , 90° , 135° , 180° , 225° , 270° , 315° und 360° .

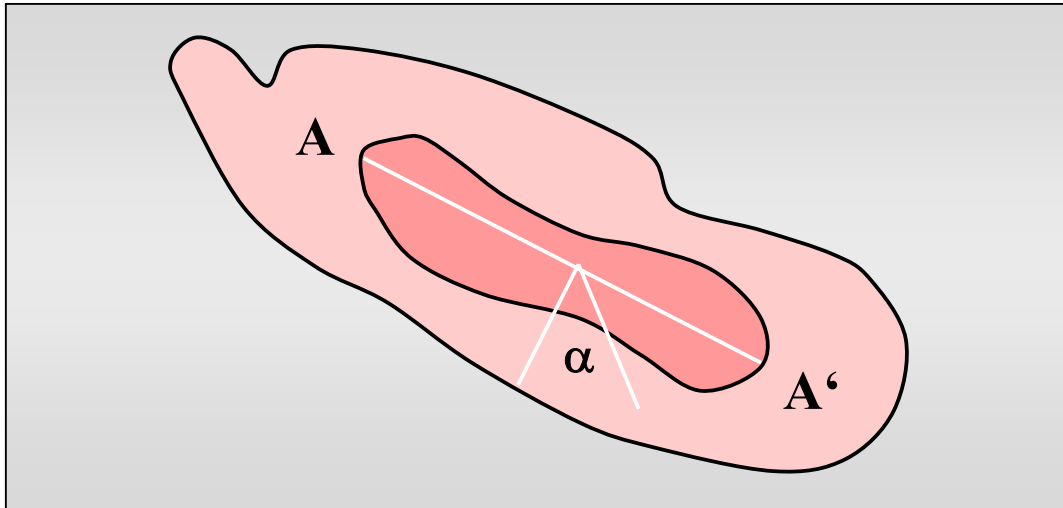


Abb. 2: Darstellung des Martin-Radius

Die Strecke AA' entspricht dem maximalen Radius. Aus dem Schwerpunkt werden Radien gezogen, deren α -Winkel gemessen werden.

Der **Rundungsfaktor II (Aspect Ratio)** wird entsprechend der folgenden Formel aus dem maximalen und dem minimalen Feret-Durchmesser abgeleitet: Rundungsfaktor II = Minimaler Feret-Durchmesser / Maximaler Feret-Durchmesser

Ein Wert von "1" stellt einen perfekten Kreis, ein Wert von "0" stellt eine gerade Linie dar.

2.2.4 AgNOR-Analyse

Die Vermessung der versilberbaren NOR-Partikel wurde mit Hilfe eines PC-gesteuerten Bildanalysegerätes durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich, verschiedene Messparameter zu berücksichtigen.

Aus den vom Bildanalysegerät ermittelten Werten wurden folgende Parameter ermittelt:

- Mittlere AgNOR Zahl/Zellkern (**NZC**)
- Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR (**NEAC**)
- Gesamt-versilberbare AgNOR-Fläche/Zellkern (**NGA**)

Aus diesen, in Anlehnung an die Kernmorphometrie "Primärparameter" genannt, ergaben sich zwei weitere Parameter, die ebenfalls in der späteren Statistik - je nach Bedarf - Anwendung fanden:

- der AgNOR-Quotient pro Zelle (**NQC**), definiert als das inverse Verhältnis der AgNOR-Zahl und AgNOR-Fläche innerhalb eines Kernes, und
- das Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche (**NGAKA**).

2.2.5 Datenanalyse

Die Ermittlung der Primärdaten aus den Einzelmethoden erfolgte mit Hilfe der oben genannten Hard- und Software. Die Weiterverarbeitung der Primärmessdaten erfolgte mittels eigens im Institut für Pathologie der Universität Marburg entwickelten Software, die kombiniert mit dBase III plus als Datenbanksystem und Turbo Pascal 5.0 (Borland Corporation) als Rechenprogramm erstellt wurde. Datenaufbereitung und -vervollständigung sowie Datenverarbeitung und Ergebnispräsentation konnte so integriert in einem Rechnersystem vorgenommen werden.

2.2.6 Statistik und Evaluation der Vorhersagemodelle

Die Auswertung der an der morphometrischen Einheit erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistical Analysis System (SAS, release 6.03 PC Version; Firma SAS, Institute Incorporation, Cary, USA).

Beschreibende Statistik:

Die beschreibende Statistik erfolgte mit den Angaben von Mittelwerten und Standardabweichungen.

Signifikanzprüfung:

Die Verteilung der erhobenen Parameter folgt näherungsweise der Normalverteilung. Die aufgestellte Nullhypothese, dass die Variablen gleich sind, wurde mittels eines t-Testes überprüft.

Wilcoxon-Test:

Der Wilcoxon-Test ist ein parameterfreier Test, anwendbar ohne Voraussetzung an die zugrundeliegende Verteilung. Getestet werden unverbundene Stichproben. Sofern sich hierbei ein p-Wert $\leq 0,05$ ergibt, wird der Unterschied als statistisch signifikant angesehen.

Vorhersagemodelle/Variablensuche:

Gemäß der Zielsetzung mit den oben genannten Methoden einzelne oder eine Kombination von Messparametern zu ermitteln, mit denen man möglichst sicher zwischen follikulären Adenomen und Karzinomen der Schilddrüse unterscheiden kann, testeten wir zwei Vorhersagemodelle: die stufenweise Logistische Regression und das BAYES-Theorem. Zusätzlich zu den Messparametern wurde das Alter der Patienten miteinbezogen.

Logistische Regression:

Die Logistische Regression ist ein Verfahren, bei dem die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Ergebnisses, unter der Bedingung einer gegebenen Variablenkombination, mittels einer Exponentialfunktion der unabhängigen Variablen dargestellt wird. Solche Modelle sind sinnvoll, wenn die abhängige Variable (z.B.: Krebserkrankung) binär (Ja-Nein-Variable) dargestellt ist (Anderson et al. 1992).

Im logistischen Regressionsmodell wird die Wahrscheinlichkeit "p" für das Auftreten eines Karzinoms bei einer vorliegenden Symptomenkombination x_1, \dots, x_n wie folgt berechnet:

$$p = \frac{1}{1 + e^{a_0 + a_1 x_1 + \dots + a_n x_n}}$$

Dabei sind a_0, a_1, \dots, a_n die zu schätzenden Regressionskoeffizienten

Für das logistische Modell wurde in dieser Untersuchung als abhängige Variable die binäre Variable "Karzinom" eingesetzt.

Variablenselektion:

Um die zur Berechnung der Wahrscheinlichkeiten signifikant beitragenden Variablen zu ermitteln, wird das Verfahren der stufenweisen Variablenselektion (stufenweise Logistische Regression) angewendet.

Bei der Erstellung eines logistischen Regressionsmodells mit Hilfe der stufenweisen Variablenselektion wertet man mit Hilfe von X^2 -Tests zunächst diejenige unabhängige Variable aus, die die gesuchte Wahrscheinlichkeit am besten approximiert. Im zweiten Schritt wählt man die nächste Variable aus, die gemeinsam mit der zuerst bestimmten Variablen die beste Vorhersage leistet. Hat man eine gewisse Anzahl von Variablen in das Modell aufgenommen, so wird bei jedem Schritt auch überprüft, ob bei Eliminierung einer Variablen die Gesamtheit der restlichen Symptome ein besseres Vorhersagemodell darstellt. Auf jeder Stufe der Variablenauswahl können also Variablen sowohl eingeschlossen als auch ausgeschlossen werden. Dieses demonstriert den multivariaten Charakter des logistischen Regressionsmodells.

Die Berechnung für diese Analysen wurden mit der Statistiksoftware SAS durchgeführt, dabei wurden die Signifikanzniveaus für den Einschluss einer neuen Variable und für das Verbleiben im Modell mit 0,15 festgelegt.

Die Zugehörigkeit zu einer der beiden Diagnosegruppen (Ja-Nein-Entscheidung) wurde mittels eines Schwellenwertes (Cut-Off-Point) entschieden. Für jeden einzelnen Patienten wurden die signifikanten Variablen in das entsprechende Vorhersagemodell eingesetzt; lag der sich hieraus errechnete Wert ober- bzw. unterhalb dieses Schwellenwertes, fiel der entsprechende Patient der einen oder der anderen Diagnosegruppe zu.

Mit weiteren statistischen Tests (X-Test) überprüft man die Güte der Anpassung des erstellten Modelles an die Daten (goodness of fit). Das auf diese Weise erstellte Modell wird dann mit Hilfe eines Datensatzes evaluiert (Reklassifikation) (Sauerbrei et al. 1992).

BAYES-Theorem:

Wir interessieren uns für die Wahrscheinlichkeit der Diagnose D_i , $P(D_i/S)$, wobei D_1, \dots, D_n die Menge der möglichen Diagnosen und $S=(S_1, \dots, S_m)$ die Symptome eines bestimmten Patienten darstellt. Dabei bezeichnet $P(D_i/S)$ die Wahrscheinlichkeit, mit der bei Vorliegen der Symptomkombination S bei einem Patienten die Diagnose D_i auftritt (Sitter et al.1994; Krack et al. 1999).

Das BAYES-Theorem besagt

$$P(D_i|S) = \frac{P(S|D_i)P(D_i)}{\sum_{k=1}^m P(S|D_k)P(D_k)}$$

falls die Diagnosen D_1, \dots, D_m sich gegenseitig ausschließen und alle möglichen Diagnosen darstellen.

Sind die Symptome zusätzlich bedingt unabhängig voneinander, so gilt

$$P(S|D_i) = P(S_1|D_i) \cdot P(S_2|D_i) \cdot \dots \cdot P(S_n|D_i)$$

Einsetzen in die obige Formel ergibt für den Fall zweier Diagnosen D und \bar{D}

$$P(D|S) = \frac{P(S|D) \cdot P(D)}{P(S|D)P(D) + P(S|\bar{D})P(\bar{D})}$$

In unserer Untersuchung steht D für Karzinom und \bar{D} für Adenom und S für die Kombination der histomorphologischen Parameter eines Patienten.

Zur Evaluation wurden die Reklassifikation und die ROC-Kurve angewendet.

Reklassifikation:

Die Reklassifikation ist eine Evaluierungsmethode, bei der das Modell an den gleichen Daten getestet wird, die für die Erstellung des Modells benutzt wurden. In diesem Fall heißt das, dass nach Einsatz in das Vorhersagemodell (Logistische Regression) die Richtigkeit der Vorhersage der Diagnose für jeden einzelnen Patienten im Nachhinein anhand der histopathologisch ermittelten Diagnose überprüft wurde.

ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristics):

Um die Leistungsfähigkeit eines Vorhersagemodelles zu überprüfen, berechnet man eine ROC-Kurve und bestimmt die Fläche unter dem Kurvenzug. Die Kurve wird in einem Koordinatensystem, in dem auf der Y-Achse die Sensitivität und auf der X-Achse 1-Spezifität eines Cut-Off-Points dargestellt werden, aufgezeichnet.

Dabei entspricht eine Fläche von "0,5" der reinen Zufallsverteilung und ein Wert von "1" einer Treffsicherheit von 100%. Man geht davon aus, dass Werte zwischen "0,8" und "1" einen guten Test charakterisieren (Hanley et al. 1982).

In unserem Fall wurden für die Kombination beider Methoden die Logistische Regression anhand einer Reklassifikation und einer ROC-Kurve und das BAYES-Theorem mittels einer ROC-Kurve überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Bei den Adenomen handelt es sich um 12 männliche und 17 weibliche Patienten. Der Altersbereich erstreckt sich bei den männlichen Patienten von 39 bis 81 Jahren (Mittelwert: 69 Jahre), bei den weiblichen Patienten von 24 bis 81 Jahren (Mittelwert: 57 Jahre).

Bei den Karzinomen finden sich 15 männliche und 16 weibliche Patienten. Das Alter bei Diagnosestellung lag bei den männlichen Patienten zwischen 20 und 81 Jahren (Mittelwert: 61 Jahre), und bei den weiblichen Patienten zwischen 20 und 87 Jahren (Mittelwert: 62 Jahre).

Von den männlichen Patienten konnten vier dem Stadium 1 zugeordnet werden, acht dem Stadium 2, drei dem Stadium 3.

Im weiblichen Patientenkollektiv fanden sich zwei Fälle im Stadium 1, sechs im Stadium 2, sechs im Stadium 3 und zwei im Stadium 4.

3.2 Messergebnisse

3.2.1 Kern-Morphometrie

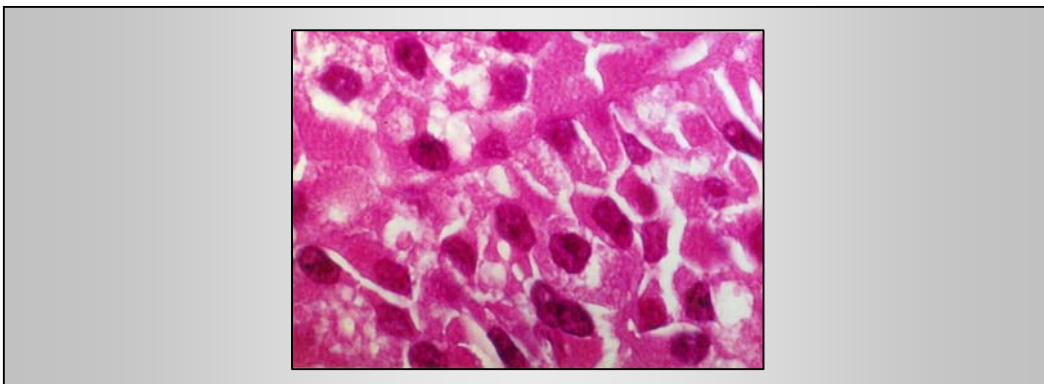


Abb. 3: Gut differenziertes follikuläres Schilddrüsenkarzinom, HE-Färbung
(100-fache Vergrößerung)

Für die Methode Kernmorphometrie konnten unter Berücksichtigung der folgenden Parameter signifikante Unterschiede gemäß dem Wilcoxon-Test ($p < 0,01$) zwischen den beiden untersuchten Gruppen gefunden werden: Kernfläche (Area), Varianz der Kernfläche (Perimeter), Mittelwert des Feret-Durchmessers (Average-Feret-Diameter), der Rundungsfaktor I (Shape-Factor) und der Rundungsfaktor II (Aspect-Ratio).

3.2.1.1 Kernfläche (Area)

Insgesamt betrachtet waren die Kerne der Adenome deutlich kleiner als die der Karzinome ($p < 0,01$). Es fand sich bei den Adenomen ($n=29$) eine mittlere Kernfläche von $31,5 (\pm 6,7) \mu\text{m}^2$ (minimale Kernfläche: $22,1 \mu\text{m}$, maximale Kernfläche: $47,8 \mu\text{m}$). Im Vergleich dazu betrug die mittlere Kernfläche der Karzinome ($n=31$) $40,1 (\pm 11,7) \mu\text{m}^2$ (minimale Kernfläche: $25,0 \mu\text{m}$, maximale Kernfläche: $73,1 \mu\text{m}$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	$31,5 \mu\text{m}^2$	$40,1 \mu\text{m}^2$
Standardabweichung	$\pm 6,7 \mu\text{m}^2$	$\pm 11,7 \mu\text{m}^2$
Minimum	$22,06 \mu\text{m}^2$	$25,10 \mu\text{m}^2$
Maximum	$47,76 \mu\text{m}^2$	$73,14 \mu\text{m}^2$

Tab. 2: Kernfläche (Area)

3.2.1.2 Varianz der Kernfläche (Perimeter)

Die Varianz der Kernfläche (Perimeter) der Adenome hatte einen Mittelwert von $20,5 (\pm 2,2) \mu\text{m}^2$ mit einer (minimaler Wert: $17,0 \mu\text{m}^2$, maximaler Wert: $25,6 \mu\text{m}^2$). Bei den Karzinomen fand sich ein mittlerer Umfang von $23,4 (\pm 3,3) \mu\text{m}^2$ (minimaler Umfang: $18,8 \mu\text{m}^2$, maximaler Umfang: $32,2 \mu\text{m}^2$). Damit war der Perimeter der Karzinome deutlich größer ($p < 0,01$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	20,5 μm^2	23,4 μm^2
Standardabweichung	$\pm 2,2 \mu\text{m}^2$	$\pm 3,3 \mu\text{m}^2$
Minimum	17,00 μm^2	18,77 μm^2
Maximum	25,60 μm^2	32,33 μm^2

Tab. 3: Varianz der Kernfläche (Perimeter)

3.2.1.3 Durchschnittlicher Feret-Durchmesser (AVG – FER)

Der durchschnittliche Feret-Durchmesser betrug bei den Adenomen 6,4 ($\pm 0,7$) μm (minimaler AVG-FER: 5,3 μm , maximaler AVG-FER: 7,9 μm). Für die Karzinome wurde ein Mittelwert von 7,2 μm ermittelt ($\pm 1,0 \mu\text{m}$) (minimaler AVG-FER: 5,8 μm , maximaler AVG-FER: 10,0 μm). Es ergab sich demnach ein größerer Feret-Durchmesser für die Karzinome ($p < 0,01$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	6,4 μm	7,2 μm
Standardabweichung	$\pm 0,7 \mu\text{m}$	$\pm 1,0 \mu\text{m}$
Minimum	5,30 μm	5,84 μm
Maximum	7,94 μm	9,95 μm

Tab. 4: Durchschnittlicher Feret-Durchmesser (AVG-FER)

3.2.1.4 Rundungsfaktor I (Shape Factor)

Mit dem Rundungsfaktor I – oder Shape Factor – wird die Unebenheit der Kernoberfläche bestimmt; ein Wert von “1” bedeutet “glatte Oberfläche”, ein Wert von “0” bedeutet “unebene Oberfläche”.

Die ermittelten Werte unterschieden sich bei Adenomen und Karzinomen nur wenig.

Der Rundungsfaktor I (Shape-Factor) hatte bei den Adenomen einen Mittelwert von 0,9 ($\pm 0,01$) μm (minimaler Wert: 0,87 μm , maximaler Wert: 0,92 μm). Bei den Karzinomen fand sich ein Mittelwert von 0,89 ($\pm 0,02$) μm (minimaler Wert: 0,86 μm , maximaler Wert: 0,91 μm).

Insgesamt wiesen die Adenome also eine „glattere“ Oberfläche als die Karzinome auf ($p < 0,01$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	0,91 μm	0,89 μm
Standardabweichung	$\pm 0,01$ μm	$\pm 0,2$ μm
Minimum	0,88 μm	0,86 μm
Maximum	0,923 μm	0,919 μm

Tab. 5: Rundungsfaktor (Shape Factor)

3.2.1.5 Rundungsfaktor II (Aspect Ratio)

Der Rundungsfaktor II – oder Aspect Ratio – bestimmt die zweidimensionale Erscheinungsform eines Objektes im vermessenen histologischen Präparat; ein Wert von “1” bedeutet “perfekter Kreis”, ein Wert von “0” heißt “gerade Linie”.

Der Rundungsfaktor II (Aspect Ratio) ergab für die Adenome einen Mittelwert von 0,87 μm ($\pm 0,03$ μm) (minimaler Wert: 0,81 μm , maximaler Wert: 0,91 μm). Die Karzinome hatten einen Mittelwert von 0,83 μm ($\pm 0,03$ μm) (minimaler Wert: 0,78 μm , maximaler Wert: 0,88 μm).

Es ergaben sich also auch hier signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	0,87 μm	0,83 μm
Standardabweichung	$\pm 0,03 \mu\text{m}$	$\pm 0,03 \mu\text{m}$
Minimum	0,80 μm	0,78 μm
Maximum	0,91 μm	0,88 μm

Tab. 6: Rundungsfaktor II (Aspect Ratio)

3.2.2 AgNOR-Analyse

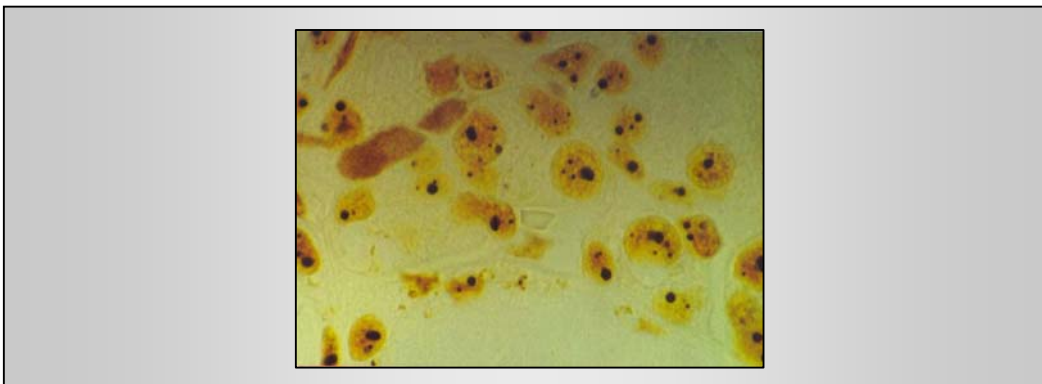


Abb. 4: Follikuläres Schilddrüsenadenom, AgNOR-Färbung (100-fache Vergrößerung)

Bei der AgNOR-Analyse konnte bei der Vermessung der oben genannten Präparate signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen den beiden Gruppen anhand des Wilcoxon-Testes für die folgenden Parameter gefunden werden:

NEAC (mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR), NGA (Gesamtversilberbare AgNOR-Fläche/Zellkern), NQC (AgNOR-Quotient/ Zelle, inverses Verhältnis von Anzahl zur Fläche in einem Kern) und NGAKA (Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche).

Nicht signifikant unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich des Parameters NZC (mittlere AgNOR-Zahl/ Zellkern)

3.2.2.1 NZC (Mittlere AgNOR Zahl/ Zellkern)

In Bezug auf die mittlere AgNOR-Zahl pro Zellkern (NZC) fand sich bei den Adenomen ein Mittelwert von 2,641 ($\pm 0,54$), bei den Karzinomen ergab sich ein Mittelwert von 2,638 ($\pm 0,62$).

Damit enthielten die Adenome im Mittel eine geringfügig höhere AgNOR-Zahl pro Zellkern als die Karzinome. Der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant.

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	2,641	2,638
Standardabweichung	$\pm 0,54$	$\pm 0,62$
Minimum	1,70	1,7
Maximum	3,90	4,2

Tab. 7: NZC (Mittlere AgNOR Zahl/ Zellkern)

3.2.2.2 NEAC (Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR)

Die mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR (NEAC) betrug für die Adenome im Mittelwert $0,72 \mu\text{m}^2$ ($\pm 0,3 \mu\text{m}^2$). Für die Karzinome wurde ein Mittelwert von $0,82 \mu\text{m}^2$ ($\pm 1,33 \mu\text{m}^2$) ermittelt.

Es fand sich also insgesamt bei den Karzinomen eine größere mittlere AgNOR-Fläche ($p < 0,01$, gemäß Wilcoxon-Test).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	0,72 μm^2	0,82 μm^2
Standardabweichung	$\pm 0,3 \mu\text{m}^2$	$\pm 1,33 \mu\text{m}^2$
Minimum	0,28 μm^2	0,15 μm^2
Maximum	2,00 μm^2	5,85 μm^2

Tab. 8: NEAC (Mittlere Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR)

3.2.2.3 NGA (Gesamtversilberbare AgNOR-Fläche/ Zellkern)

Für die gesamtversilberbare Fläche der AgNOR pro Zellkern (NGA) wurde bei den Adenomen ein Mittelwert von 1,86 μm^2 ($\pm 0,74 \mu\text{m}^2$), gemessen, bei den Karzinomen ein Mittelwert von 1,92 μm^2 ($\pm 2,7 \mu\text{m}^2$).

Demnach war die gesamtversilberbare Fläche der Karzinome größer als die der Adenome ($p < 0,01$, gemäß Wilcoxon-Test).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	1,86 μm^2	1,92 μm^2
Standardabweichung	$\pm 0,74 \mu\text{m}^2$	$\pm 2,7 \mu\text{m}^2$
Minimum	0,68 μm^2	0,52 μm^2
Maximum	4,52 μm^2	12,19 μm^2

Tab. 9: NGA (Gesamtversilberbare AgNOR-Fläche/ Zellkern)

3.2.2.4 NQC (AgNOR-Quotient/ Zelle, inverses Verhältnis von Anzahl zur Fläche in einem Kern)

Der AgNOR-Quotient pro Zelle (NQC: inverses Verhältnis von Zahl zu Fläche der AgNORs in einem Kern) ergab im Mittel für die Adenome 4,31/ μm^2 ($\pm 2,11/\mu\text{m}^2$), für

die Karzinome $6,90/\mu\text{m}^2$ ($\pm 5,69/\mu\text{m}^2$). Damit hatten die Karzinome einen signifikant höheren AgNOR-Quotienten ($p < 0,01$, Wilcoxon-Test).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	$4,31/\mu\text{m}^2$	$6,9/\mu\text{m}^2$
Standardabweichung	$\pm 2,11/\mu\text{m}^2$	$\pm 5,69/\mu\text{m}^2$
Minimum	$1,13/\mu\text{m}^2$	$0,34/\mu\text{m}^2$
Maximum	$9,93/\mu\text{m}^2$	$27,92/\mu\text{m}^2$

Tab.10: NQC (AgNOR-Quotient/Zelle)

3.2.2.5 NGAKA (Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche)

Das Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche (NGAKA) betrug für die Adenome im Mittel $5,90 \mu\text{m}^4$ ($\pm 1,72 \mu\text{m}^4$). Für die Karzinome fand sich ein Mittelwert von $5,84 \mu\text{m}^4$ ($\pm 8,43 \mu\text{m}^4$). Nach dem Wilcoxon-Test war NGAKA damit bei den Adenomen signifikant größer ($p < 0,01$).

	Adenome	Karzinome
N	29	31
Mittelwert	$5,9 \mu\text{m}^4$	$5,84 \mu\text{m}^4$
Standardabweichung	$\pm 1,72 \mu\text{m}^4$	$\pm 8,43 \mu\text{m}^4$
Minimum	$1,75 \mu\text{m}^4$	$1,36 \mu\text{m}^4$
Maximum	$9,36 \mu\text{m}^4$	$43,5 \mu\text{m}^4$

Tab.11: NGAKA (Produkt der ges. versilberbaren Fläche mit der Kernfläche)

3.3 Ergebnisse der Vorhersagemodelle

A) Die einzelnen diagnostischen Methoden

Es wurden zunächst alle aus der jeweiligen Methode erhobenen Variablen (Messparameter) im Vorhersagemodell getestet, und dann die verwertbaren Variablen selektiert.

Logistische Regression:

es ergaben sich hier die folgenden Parameter:

für die AgNOR-Analyse: NQC, NZC, NEAC

für die Kernmorphometrie: AVG-Fer, ASP-Rat

Bei der Vorhersage der Karzinomrate anhand der Logistischen Regression erhält man die höchsten Werte für die Gesamtrichtigkeit unter Verwendung der oben genannten Parameter bei einem Schwellenwert (Cut-Off-Point) von 0,52 bei der Methode AgNOR-Analyse und von 0,66 bei der Methode Kernmorphometrie.

Reklassifikation der Patienten:

Bei der Reklassifikation wird die Richtigkeit der Diagnosezuordnung nach Anwendung der Vorhersagemodelle anhand der vorab histopathologisch gestellten Diagnose der Patienten überprüft.

Dabei ergibt sich für die Methode der AgNOR-Analyse eine Richtigkeit von 67,8 % (bei einer Sensitivität von 72,4 % und einer Spezifität von 63,3 %) für die Methode Kernmorphometrie eine Richtigkeit von 74,6 % (bei einer Sensitivität von 58,9 % und einer Spezifität von 90,0 %).

BAYES-Theorem:

Für das BAYES-Theorem ergaben die Einzelmethoden keine brauchbaren Ergebnisse.

B) Beide Methoden in Kombination

Auch hier wurden zunächst alle 27 aus beiden Methoden erhobenen Variablen (Messparameter) im Vorhersagemodell getestet, und dann die verwertbaren Variablen ermittelt; für beide Methoden in Kombination ergab sich eine Auswahl der folgenden Parameter:

1. Bei der stufenweisen Logistischen Regression:

- für die AgNOR-Analyse: NZC, NQC
- für die Kernmorphometrie: Area, Asp-Rat, M135
- für die Anamnese: Age

2. Bei dem BAYES-Theorem:

- für die AgNOR-Analyse: NGAKA

Logistische Regression:

Bei der Betrachtung beider Methoden in Kombination unter Berücksichtigung der oben genannten Messparameter erhält man bei einem Cut-Off-Point von 0,64 die höchsten Werte für die Gesamtrichtigkeit für das Modell der Logistischen Regression.

Reklassifikation der Patienten:

Für die Logistische Regression beider Methoden ergibt sich hiermit eine Richtigkeit der Vorhersage von 86,4 % (bei einer Sensitivität von 75,9 % u. Spezifität von 96,7 %).

Darstellung als ROC-Kurve:

Bei der Richtigkeitsüberprüfung der Vorhersage der Logistischen Regression nach Einsatz einer Kombination der Messparameter beider Methoden mittels einer ROC-Kurve ergibt sich eine Fläche unter der ROC-Kurve von 0,91 und damit ein als gut zu wertendes Testergebnis.

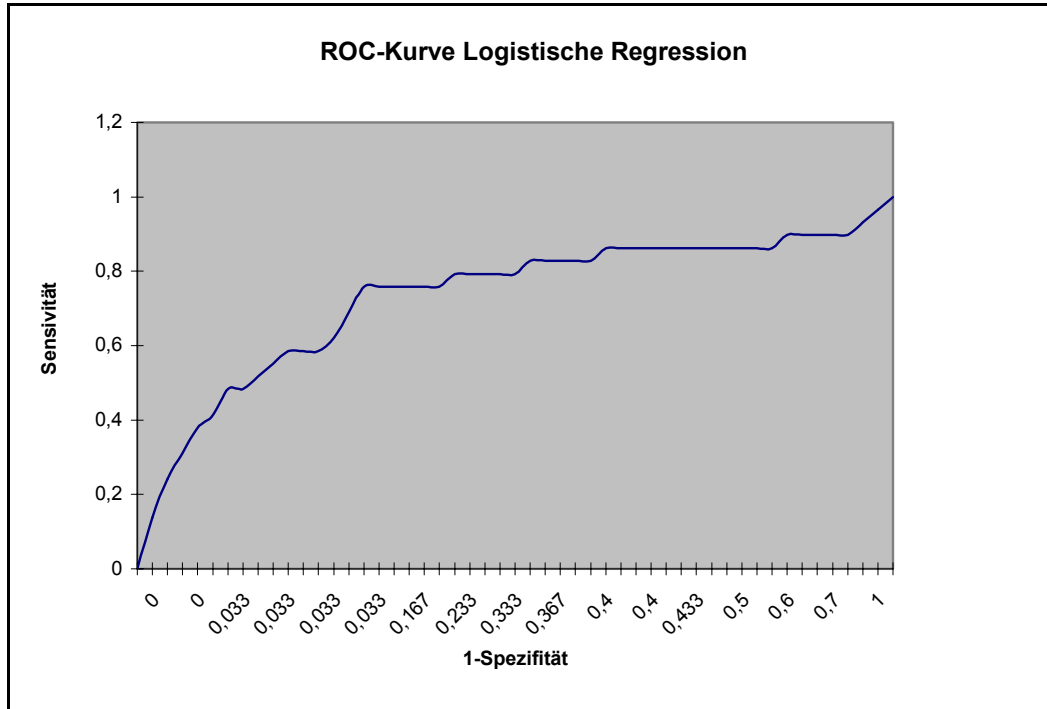


Abb. 5: Darstellung der Ergebnisse der Logistischen Regression der Kombination beider Methoden als ROC-Kurve

BAYES-Theorem:

Unter Verwendung des BAYES-Theorems erwies sich der Parameter NGAKA als am aussagekräftigsten.

Darstellung als ROC-Kurve:

Bei der Richtigkeitsüberprüfung der Vorhersage des BAYES-Theorems nach Einsatz einer Kombination der Messparameter beider Methoden mittels einer ROC-Kurve ergibt sich eine Fläche unter der ROC-Kurve von 0,74 und damit ein als ausreichend gut zu wertendes Testergebnis.

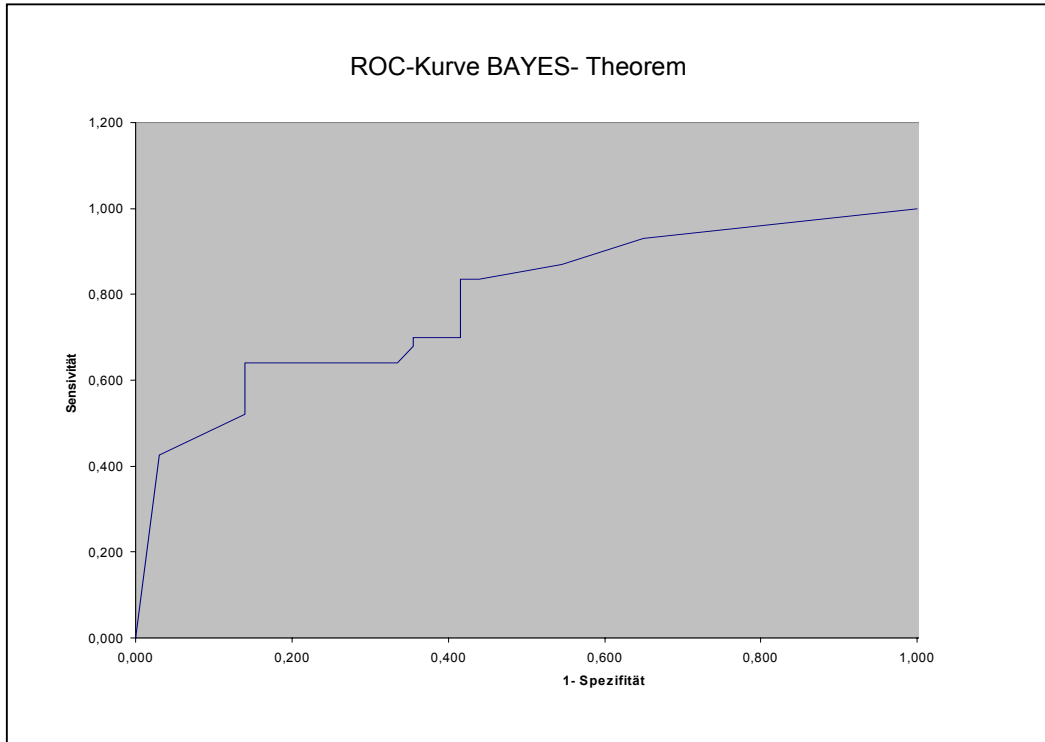


Abb. 6: Darstellung der Ergebnisse des Bayes Theorems der Kombination beider Methoden als ROC-Kurve

Vorhersage- modelle	Messmethode	Reklassifikationsergebnis (Gesamtrichtigkeit)	Fläche unter der ROC-Kurve
Logistische Regression	AgNOR-Analyse (NQC, NZC, NEAC)	(Cut-Off-Point: 0,52) 67,8%	-
	Kernmorphometrie (AVG-Fer, Asp-Rat)	(Cut-Off-Point: 0,66) 74,6%	-
	Beide Methoden in Kombination (Area, Asp-Rat, M135, AGE, NZC, NQC)	(Cut-Off-Point: 0,64) 86,4%	0,91
BAYES- Theorem	Beide Methoden in Kombination (NGAKA)	-	0,74

Tab. 12: Übersicht der Ergebnisse der Vorhersagemodelle

Ingesamt betrachtet ergab sich die beste Vorhersage mit dem Modell der Logistischen Regression. Nach Überprüfung der Parameter aus beiden Einzelmethoden resultierte hier das beste Reklassifikationsergebnis mit 86,4 % (Sensitivität 75,9 % / Spezifität 97 %) und mit 0,91 errechnete sich das beste Ergebnis für die ROC-Kurve.

4 Diskussion

Es ist seit langem bekannt, dass Krebszellen morphologische Veränderungen aufweisen. Meist sind die Zellkerne größer und unregelmäßiger geformt als die gutartigen Zellen (Koller et al. 1963). Das morphologische Erscheinungsbild kann hierbei das biologische Verhalten der Tumoren widerspiegeln. So ist z.B. die Anaplasie das wichtigste zytopathologische Merkmal für Malignität und Ausdruck der gestörten Zellbiologie (Bittinger 1996). Da diese Auffälligkeiten lange Zeit nicht objektiv erfassbar waren, hatten sie in der Tumordiagnostik einen unterschiedlichen Einfluss. Mit der Entwicklung der Zytomorphometrie konnten Zellstrukturen erstmals reproduzierbar vermessen werden. Es gelang mittels der Kernmorphometrie histologisch schwer voneinander abgrenzbare Läsionen eindeutig zu trennen, so zum Beispiel bei pigmentierten Hauttumoren wie dem malignen Melanoma in situ und der melanozytischen Hyperplasie (Weyers et al. 1996), bei der chronischen Pankreatitis und dem hochdifferenzierten Adenokarzinom (Weger et al. 1992), dem tubulären ductalen Mammakarzinom und den sklerosierenden Adenosen (O'Leary et al. 1992) oder benignen und malignen kartilaginären Tumoren (Böhm et al. 1992).

Dennoch verblieb eine Anzahl von diagnostischen Grenzfällen bei histologisch ähnlichen, prognostisch jedoch völlig unterschiedlichen Tumoren. Aus der Tatsache, dass mit immer weiter fortschreitender Technisierung der Medizin immer kleiner werdende Gewebeproben zu beurteilen waren, entwickelte sich zusätzlich der Bedarf, eine eindeutige Zuordnung zu benigne oder maligne auf Ebene der Zelle zu ermöglichen. Mit der Etablierung der AgNOR-Analyse als Marker für Zellproliferation wurde die biologische Aktivität der Zelle darstellbar (Derenzini et al. 1989). Eine Reihe von Tumoren waren anhand der AgNOR-Zahl einzuordnen, so zum Beispiel Speicheldrüsentumoren (Matsumara et al. 1989), Nasopharynxkarzinome (Egan et al. 1988a), Zervixkarzinome (Egan et al. 1988b) und Weichteiltumore (Egan et al. 1988c). Doch blieb die diagnostische Abgrenzung einiger präneoplastischer Gewebsveränderungen schwierig. Es zeigte sich, dass erst nach der Berücksichtigung weiterer AgNOR-Parameter wie zum Beispiel der AgNOR-Fläche eine genauere Trennbarkeit erreichbar

war wie u. a. bei hoch- und niedrigmalignen Non Hodgkin Lymphomen (Crocker et al. 1988), bei tumorähnlichen Mammaveränderungen und Mammakarzinomen (Giri et al. 1989) und bei unterschiedlichen neoplastischen Veränderungen des Harnblasenepithels (Rüschoff et al. 1992).

Eine Kombination der AgNOR-Analyse mit der Kernmorphometrie erreichte in einigen differentialdiagnostischen Grenzfällen eine noch bessere Trennschärfe wie Untersuchungen am Prostatakarzinom (Bittinger 1996) und am Urothelkarzinom (Rüschoff 1990b) bewiesen. Zusätzlich ließ sich allgemein eine positive Relation zwischen AgNOR-Zahl und Kernfläche herausarbeiten, da bei den meisten Tumoren mit zunehmender Kerngröße die Zahl der AgNORs pro Zelle nahezu linear anstieg und der prozentuale Flächenanteil von AgNORs in einer Zelle mit zunehmendem Malignitätsgrad und zunehmender Kerngröße stetig abnahm (Bittinger 1996).

Die verbesserte und standardisierte zytologische Diagnostik der Kernmorphometrie und der AgNOR-Analyse in der computergestützten Form wie sie heute verwendet wird, bietet die Möglichkeit, objektive, genaue und jederzeit nachvollziehbare Daten eines zu untersuchenden Gewebes zu erfassen. Beide sind schnell in der Erlernbarkeit und Durchführung der Methode und außerdem kostengünstig umsetzbar (Matsumara et al. 1989; Öfner et al. 1996). Bevor im Jahr 1994 von den Mitgliedern des Komitees für AgNOR Quantifikation der Europäischen Gesellschaft für Pathologie Richtlinien für die AgNOR Erfassung aufgestellt wurde, gab es durch die Vielfältigkeit der Methoden keine Vergleichsmöglichkeit. Es wurden standardisierte Verfahrensanleitungen festgehalten, welche Gewebeproben unter welchen Bedingungen zu färben sind. Die computergestützte Kernmorphometrie zur Erfassung der Zellstrukturen wurde als Methode der Wahl empfohlen (Aubele et al. 1994).

Die Differentialdiagnose der follikulären Schilddrüsen-Neoplasie bereitet seit jeher Probleme. Ist sie selbst in der histopathologischen Diagnostik eine Herausforderung, so gestaltet sie sich aufgrund der großen morphologischen Ähnlichkeit mit anderen Schilddrüsenerkrankungen in der Auswertung zytologischer Präparate nach Feinnadel-

biopsie noch schwieriger (Bittinger et al. 1996). Aufgrund der Tatsache, dass es einige schwer zuzuordnende Gewebeveränderungen gibt, wurde der Begriff der „follikulären Neoplasie“ geprägt (Löwenhagen et al. 1974). Da diese Diagnose aber hinsichtlich der therapeutischen Konsequenz eine Spannweite von der konservativen, abwartenden Haltung bis zum operativen Eingriff eröffnet, ist es von Bedeutung, eine sichere diagnostische Zuordnung treffen zu können.

Um den Stellenwert der AgNOR-Analyse und der Kernmorphometrie für die Schilddrüsendiagnostik zu überprüfen, testeten wir zunächst beide Methoden an in Paraffin eingebetteten Präparaten jeweils einzeln, wobei wir eine bisher in diesem Umfang nicht untersuchte Vielzahl von Parametern bestimmten. Anschließend nahmen wir eine kombinierte Auswertung der aus den Einzelmethoden gewonnenen Parametern vor. Eine gute Trennbarkeit der beiden follikulären Neoplasien konnte so erreicht werden. Diese ermittelten wir, nachdem wir eine Auswahl der aus beiden Einzelmethoden gewonnen Parameter in ein diagnostisches Vorhersagemodell einsetzten: die Logistische Regression.

Eine Reihe von Tumoren, die Schwierigkeiten in der differentialdiagnostischen Zuordnung bereiten und die ein ähnliches biologisches Verhalten zeigen wie die follikulären Neoplasien der Schilddrüse, wurden ebenfalls anhand zytomorphometrischer Kriterien beurteilt.

Bei Organen, die ebenfalls unter hormonellen Stoffwechseleinflüssen stehen, wie zum Beispiel bei Endometriumveränderungen, unterteilte man mittels der naturgegebenen Proliferationsstadien des Gewebes sechs Gruppen und ihre AgNOR-Zahl; signifikant unterschieden sich dabei allein die intraendometrialen Neoplasien und die Adenokarzinome (Wilkinson et al. 1990). Man fand, dass in Veränderungen der Prostata, die ebenfalls wie die Schilddrüse hormonalen Wachstumseinflüssen unterliegen, die AgNORs je nach Dignität in unterschiedlichen Anordnungen auftraten. Intraepitheliale Neoplasien und Adenokarzinome zeigten viele und „körnige“ AgNORs, während Hyperplasien wenige und ohne erkennbaren Bezug zum Nucleolus angeordnete AgNORs aufwiesen (Hansen und Ostergard et al. 1990). Die AgNOR-Zahl und der

„AgNOR-Verteilungs-Score“ (Prozentsatz der Zellkerne, die mindestens fünf AgNORs pro Nucleolus in der entsprechenden focussierten Ebene aufweisen) wurden zum Beispiel für oxyphile Schilddrüsentumoren als signifikantes Trennungsmerkmal bestimmt (Augustynowicz et al. 2001).

Bei der Untersuchung anderer endokriner Organe erwiesen sich die Ergebnisse als organabhängig. Mittels des AgNOR-Counts alleine ließen sich Neoplasien der Nebenschilddrüse in benigne und maligne differenzieren (Kanematsu et al. 1997). Mit der alleinigen Bewertung der durchschnittlichen AgNOR-Gesamtfläche (hier als "NORA" bezeichnet) gelang dieses ebenso, wobei eine deutliche Zunahme der Fläche von der Hyperplasie zum Adenom bis hin zum Karzinom beobachtet wurde (Tuccari et al 2000). Jedoch wurden ebenfalls einige Überschneidungen zwischen den NORA-Werten der drei Gruppen – neben einer geringen Fallzahl - eingeräumt.

Bei den Tumoren der Hypophyse überschritten sich die AgNOR-Counts, so dass diese Methode hier als nicht hilfreich gewertet wurde (Uma et al. 1998; Szymas et al. 1999; Hucumenoglu et al. 2002). Auch für die Nebennierenrinde konnte keine signifikante Trennung mittels der AgNOR-Zahl zwischen Adenomen und Karzinomen erarbeitet werden (Rüschhoff et al. 1990b). Allerdings erreichten andere Autoren dieses mit der Auswertung einer Reihe von kernmorphometrischen Parametern: die Kerne der Karzinome waren eindeutig größer als die der Adenome (Scarpelli et al. 1999). Untersuchungen an endokrinen Pankreastumoren jedoch ergaben signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl und auch der Fläche der AgNORs. Zudem zeigte sich, dass 96% (26/27) der Tumore, die einen Anteil von mindestens 5% an Zellen mit mehr als sechs AgNORs pro Nucleolus in einer focussierten Ebene aufwiesen, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung - oder bis zu vier Jahre postoperativ - bereits metastasiert hatten (Rüschhoff et al. 1993b).

Signifikant getrennt werden konnten auch Neoplasien der Magenschleimhaut, wobei man u.a. chronische Ulcera ventriculi mit Karzinomen in situ und Adenokarzinomen der Magenschleimhaut verglich. Dabei unterschieden sich die einzelnen Gruppen eindeutig in der Höhe des jeweiligen AgNOR-Counts, wobei die Adenokarzinome die meisten

AgNORs aufwiesen. Hier wird zusätzlich ein mit fortgeschrittener Entdifferenzierung der Zellen korrespondierender Polymorphismus der AgNORs beschrieben, jedoch nicht quantitativ erfasst (Suarez et al. 1989). Bei Untersuchungen der Dickdarmschleimhaut, bei der eine Adenom-Karzinom-Sequenz als erwiesen gilt, die man für die follikuläre Neoplasie der Schilddrüse auch vermuten kann, fanden sich im Karzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant kleinere und zahlreichere AgNORs (Rüschoff et al. 1993a).

Bei den unterschiedlichen Dysplasiegraden der Harnblasenschleimhaut, die mit einer unterschiedlichen neoplastischen Potenz einhergehen (Mostofi et al. 1973), stellte sich eine grundsätzliche Korrelation zwischen den lichtmikroskopischen, histologischen Befunden und dem AgNOR-Gehalt heraus (Rüschoff et al. 1992). So bestand zwischen Dysplasiegrad I und Dysplasiegrad II ein hochsignifikanter Unterschied, und zwar hinsichtlich der AgNOR-Zahl als auch der Partikelgröße. Dies entspricht dem Übergang zur atypischen Hyperplasie ("atypical hyperplasia"), einem diagnostischen Begriff, der vor allem im angloamerikanischen Sprachraum Verwendung findet (Koss et al. 1975). Unter Berücksichtigung der morphologischen Definition der Präneoplasie (Dohm et al. 1979) tritt ein erhöhter AgNOR-Gehalt offenbar erst dann auf, wenn die Zelle bereits auch lichtmikroskopische Zeichen der Dysplasie erkennen lässt.

Bei der Betrachtung von follikulären Schilddrüsenneoplasien kamen mittels der AgNOR-Analyse verschiedene Autoren jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Übereinstimmend wurde dennoch wiederholt festgestellt, dass sich hierfür histologische sowie zytologische Präparate gleichermaßen eignen (Musiatowicz et al. 1998; Shechtman et al. 1997).

Nach Untersuchung des AgNOR-Counts sowie weiterer AgNOR-Parameter beschreiben einige Autoren die Beobachtung, dass generell gutartige oder niedrigmaligne Tumoren meist wenige große und hochmaligne Neubildungen viele kleine AgNORs aufweisen - (Rüschoff et al. 1990; Crocker und Egan 1988).

In unserer Messung wiesen die Schilddrüsenadenome bei der AgNOR-Analyse eine im Durchschnitt geringfügig höhere AgNOR-Zahl pro Zelle (NZC) auf als die Karzinome, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Dieses ist unter Umständen durch die

auch von anderen beobachteten Überschneidungen der AgNOR-Counts beider Neoplasien zu erklären. So fanden auch andere Autoren eine so große Überschneidung der AgNOR-Count-Messergebnisse für die folliculären Neoplasien, dass eine klare Unterscheidung zwischen Adenom und Karzinom nicht möglich war (Musiatowicz et al. 1998; Mehrotra et al. 1998). Folliculäre Schilddrüsenkarzinome wiesen im Mittel einen höheren AgNOR-Count als folliculäre Adenome auf, jedoch gab es für den Messbereich von 3,5 bis 4,0 eine Überschneidungszone, so dass keine eindeutige Trennlinie ermittelbar war (Mehrotra et al. 1998). Eine andere Gruppe erarbeitete bei folliculären Karzinomen eine durchschnittliche AgNOR-Zahl von 1,5-1,9, bei folliculären Adenomen 1,0-2,2 und damit auch keine signifikanten Unterschiede (Nairn et al. 1988). Wie bereits erwähnt, hängt die Qualität der AgNOR-Messung u.a. von der Färbequalität ab, und so wertet Rüschoff die auffallend niedrigen AgNOR-Counts dieser Studie als Ergebnis einer Überfärbung, die nicht die einzelnen AgNORs sondern den gesamten Nucleolus anfärbt und damit fälschlicherweise als solitäres AgNOR erscheinen lässt (Rüschoff et al. 1993a).

Andere ermittelten durchaus eine verwertbare Trennbarkeit anhand des AgNOR-Counts (Karmakar et al. 1995; Shechtman et al. 1997). Durchschnittliche AgNOR-Anzahl der Karzinome war bei Karmakar $7,52 \pm 1,88$, der Adenome $3,95 \pm 1,65$. Shechtman et al. maßen $3,86 \pm 0,94$ im Mittel für die Karzinome und $2,3 \pm 0,4$ für die Adenome. Damit konnten die folliculären Karzinome signifikant von den folliculären Adenomen unterschieden werden. Mit einer jedoch kleinen Fallzahl (11 Karzinome und 17 Adenome) gelang das auch Dzieciol ($p=0,02$). Hier wurden AgNOR-Zahlen von $4,9 \pm 1,4$ für die Karzinome und $3,2 \pm 1,3$ für die Adenome bestimmt (Dzieciol et al. 1996).

Im Vergleich dazu wurde in einer weiteren Untersuchung ebenfalls eine signifikant höhere mittlere AgNOR-Zahl bei folliculären Schilddrüsenkarzinomen als bei folliculären Adenomen gemessen. Doch auch hier gab es erhebliche Überschneidungen im Bereich von 3,0 bis 3,9. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vorgeschlagen, zusätzlich zum AgNOR-Count andere Parameter der AgNORs und der Zellkerne zu erheben, um eine deutlichere Unterscheidung zu ermöglichen (Musiatowicz et al. 1998). In einer Studie an Zytologien von 51 gutartigen Schilddrüsenerkrankungen (17 knotige

Hyperplasien mit und ohne Thyreoiditis, 10 mikrofollikuläre Adenome, sechs oxyphile Tumoren, ein atypisches Adenom) und 17 malignen Schilddrüsentumoren (11 papilläre Karzinome, fünf follikuläre Karzinome, ein anaplastisches Karzinom) fand sich ein signifikant größerer AgNOR-Count in der Karzinomgruppe im Vergleich zu den benignen Läsionen, jedoch gab es auch hier Überschneidungen. Zusätzlich fiel auf, dass die mittlere AgNOR-Fläche ($6,95 \pm 2,01 \mu\text{m}^2$) und die mittlere Kern-Fläche ($71,8 \pm 24,0 \mu\text{m}^2$) bei den Karzinomen signifikant größer waren als bei den benignen Tumoren ($3,07 \pm 1,47 \mu\text{m}^2$ und $35,0 \pm 13,5 \mu\text{m}^2$). Auffällig ist hier eine AgNOR-Färbezeit von 45 Minuten, die etwa doppelt so lang ist wie in der vorliegenden oder in anderen Untersuchungen. Zudem war die Fallzahl der follikulären Neoplasien hier klein (Solymosi et al. 1996).

Zur Differentialdiagnose von Schilddrüsen-Tumoren wurden auch andere zytomorphologische Kriterien herangezogen. Es wurden z. B. verschiedene Attribute der Nucleoli berücksichtigt. Neben Anzahl, Größe und Kontur wurde auch deren Position betrachtet. In gutartigen Läsionen sind Nucleoli nur einfach vorhanden, bei Karzinomen liegen sie jedoch immer in mehrfacher Ausführung vor. Das Auftreten von "marginierten" Nucleoli, d. h. Nucleoli, die in Kontakt zur Kernmembran stehen, ist dabei ein Anzeichen für eine gesteigerte Proteinsynthese in den Zellkernen. Anhand des Prozentsatzes der marginierten Nucleoli gelang es, follikuläre Adenome (Werte $< 16\%$) von follikulären Karzinomen (Werte $> 20\%$) zu unterscheiden, jedoch gab es auch hier Überschneidungen. Das untersuchte Material stammte hierbei ausschließlich von Feinnadel-Biopsien und die Ergebnisse ließen sich nicht an in Paraffin eingebetteten Proben reproduzieren (Montironi et al. 1991).

Beim Versuch, die beiden Neoplasien mittels der Kernmorphometrie alleine zu unterscheiden, erwies sich die Berücksichtigung eines einzelnen morphometrischen Kernparameters nicht als ausreichend. In multivariaten Kernanalysen jedoch wurden zum Teil gute Ergebnisse mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 94,7% erreicht (Tsybrovsky et al. 1998). Diese Autoren erhoben jedoch andere morphometrische Parameter als die, die in der vorliegenden Untersuchung vermessen wurden (unter anderem wurde Wert auf die optische Dichte verschiedener Parameter

gelegt). Außerdem lag auch hier eine kleine Fallzahl zugrunde: 19 Adenome, 12 minimal-invasive Karzinome und drei deutlich invasive Karzinome. Bei unserer Messung konnten wir mit der Kernmorphometrie anhand der ausgewählten Parameter in der Logistischen Regression nur eine Sensitivität von 58,9% und eine Spezifität von 90% bei einer korrekten Reklassifikation von 74,6% ermitteln. Andere Autoren entwickelten ebenfalls morphometrische Beurteilungssysteme, in denen eine Reihe von primären und zum Teil sekundären Parametern berücksichtigt wurden, und präsentierten gute Ergebnisse. Eine korrekte Reklassifikation follikulärer Schilddrüsenkarzinome von 87,5% erreichte die morphometrische Analyse von Parametern wie Chromosomensatz-Histogramm, Proliferations-Index, Kernflächen-Variations-Koeffizient und Anisocariosis-Ratio (Frasoldati et al. 2001). Unter Berücksichtigung der Kernfläche, deren Verteilung im Kerngrößen-Histogramm, des Kernumfanges, des längsten und des kürzesten Kerndurchmessers wurde mittels einer Beurteilungsformel eine Zuordnung von Schilddrüsenerkrankungen in benigne und maligne vorgenommen – aber auch hier gab es Überschneidungen der Messwerte (Kirillov et al. 2001).

In einer anderen Untersuchung (15 Adenome und 15 Karzinome) wurden Parameter der Durchflusszytometrie (DNA-Index, Prozentsatz der Zellen in der S-Phase, Prozentsatz der Zellen in der G2- und M-Phase und die durchschnittliche Profilfläche der Zellkerne) und stereologische Parameter (u. a. Kernfläche, Kernumfang, Verhältnis von Kernfläche zum Volumen etc.) betrachtet. Signifikante Unterschiede wurden bei der Kernfläche, dem Kernumfang und dem Verhältnis von Kernfläche zum Volumen beobachtet (Mattfeldt et al. 1987). Verschiedene andere Methoden der Zytomorphometrie, DNA-Image und DNA-Durchflusszytometrie wurden in der Differentialdiagnose der Schilddrüsenneoplasien nicht mit dem gewünschten Erfolg getestet (Carmargo et al. 1992; Ferrer-Roca et al. 1990; Livolsi et al. 1990; Nafe et al. 1992). Auch die immunhistochemische Analyse von Laminin der Basalmembran (Campo et al. 1992), Thyreoglobulin, Lactoferrin und Lactalbumin (Davila et al. 1988) oder zytogenetischen Methoden (Fenoglio-Preiser et al. 1991; Mizukami et al. 1991) waren z. T. nicht überzeugend, da die Expression von z.B. dem c-myc-Oncogen-Produkt und dem epidermalen Wachstumsfaktor keine signifikanten Unterschiede zeigte. Es wird vermutet, dass einige Oncogene wie c-myc, erbB-2 und c-fos an der Entartung von

Schilddrüsengewebe im Allgemeinen verantwortlich sind, und Mutationen des ras-Protooncogens scheinen am Fortschreiten des follikulären Schilddrüsen Karzinoms beteiligt zu sein (Lemoine et al. 1988). Zusammenhänge wurden bisher aber nicht erwiesen (Terrier et al. 1988; Mincione et al. 1993). Da in den letzten Jahren auffiel, dass eine Reihe von genetischen Veränderungen bei Schilddrüsentumoren vorliegt (Matsuo et al. 1993), wurde eine Reihe von zytogenetischen Proliferationsmarkern zur Problemlösung untersucht. Das Gen der Fokalen Adhäsions Kinase (FAK), das eine 125-kD Tyrosin Kinase encodiert, wies z. B. im Unterschied zu normalem Schilddrüsengewebe eine signifikant erhöhte Expression in follikulären Schilddrüsenkarzinomen auf ($p < 0,01$). Hierbei wurden sechs follikuläre Karzinome mit 13 Fällen von benignem Schilddrüsengewebe verglichen, zu denen auch vier follikuläre Adenome zählten (Owens et al. 1995). Ein weiterer Malignitätsmarker, die menschliche Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) wurde in Schilddrüsenveränderungen bestimmt. Dabei entdeckte man, dass die Expression in allen normalen Zellen unterdrückt wird, das Enzym aber in fast allen malignen Neoplasien reaktiviert war (Zeiger et al. 1999). Allerdings wurden insgesamt nur drei follikuläre Karzinome untersucht, wovon eines keine Expression zeigte. Der Verlust des Tumor-Suppressor-Gens FHIT konnte in benignen wie malignen Schilddrüsentumoren gleichermaßen nachgewiesen werden und trägt damit nicht zur Unterscheidung der Neoplasien bei (Zou et al. 1999). Die Expression der Proliferationsmarker Ki-67 und p27^{KIP1} (ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase), die in der Vergangenheit durch vermindertes Vorkommen bei Entdifferenzierung einiger Tumoren aufgefallen ist, wurde bei Schilddrüsen-Neoplasien (u.a. 16 follikuläre Adenome und 23 follikuläre Karzinome) durch immunhistochemische Methoden bestimmt. Dabei fiel auf, dass anhand p27^{KIP1} ($p=0,0056$) und Ki-67 ($p=0,006$) einzeln untersucht signifikant zwischen follikulären Adenomen und Karzinomen unterschieden werden konnte (Erickson et al. 1998). Die AgNOR-Methode ist im Vergleich zum Ki-67-Nachweis jedoch sensitiver, einfacher durchzuführen und kostengünstiger (Mehrothra et al. 2002).

Andere Autoren versuchten, die follikulären Neoplasien anhand ihres DNA-Gehaltes zu unterscheiden. Man verwendete hierfür die Methode der Zytofluometrie, nachdem die intraoperativ gewonnenen Biopsate nach der klassischen Feulgen-Methode angefärbt worden waren. Dabei wiesen die follikulären Karzinome (11 Fälle) einen deutlich

erhöhten DNA-Gehalt auf, der etwa bei 250% des normalen diploiden Levels lag. Die follikulären Adenome (22 Fälle) enthielten dagegen durchschnittlich nur etwa 130% des diploiden Levels. Unter den 22 Adenomen befanden sich jedoch zwei Fälle, deren DNA-Gehalt den Durchschnittswert deutlich übertraf; ursächlich wurde hier eine mögliche maligne Transformation vermutet. Es ergab sich jedoch keine statistisch verwertbare Trennbarkeit der beiden Gruppen (Lukacs et al. 1979). Insgesamt betrachtet zeigten diese Ansätze nur Teilaspekte der komplexen zellbiologischen Veränderungen, die nur Teilbausteine in der diagnostischen Unterscheidung von follikulären Adenomen und Karzinomen der Schilddrüse liefern.

Um aus der Vielzahl der bisher vermessenen zytomorphometrischen Parameter eine neue Auswahl derer zu treffen, die letztendlich eine möglichst sichere Unterscheidung der beiden Neoplasien zulässt, führten wir zunächst die AgNOR-Analyse und die Kernmorphometrie einzeln sowie im Anschluss beide Methoden in Kombination durch. Zusammengefasst stellten wir zunächst anhand der Methode Kernmorphometrie fest, dass die Kernfläche (Area), die Varianz der Kernfläche (Perimeter) und der Durchschnittliche Feret-Durchmesser (AVG-Feret) der Karzinome deutlich größer waren als die der Adenome. Die Adenome dagegen wiesen im Vergleich zu den Karzinomen einen signifikant größeren Rundungsfaktor I (Shape Factor) und Rundungsfaktor II (Aspect Ratio) auf, die Zellkerne waren damit insgesamt "runder" mit glatterer Oberfläche.

Diesem kombinierten diagnostischen Ansatz entsprechend untersuchten Rüschoff et al. die Merkmale der AgNORs in den Nucleoli der Zellen bei Schilddrüsen-Neoplasien anhand verschiedener Messgrößen sowie kernmorphometrische Parameter und stellten dabei eine gute Trennbarkeit der beiden Gruppen dar. In dieser Studie wurden u.a. 22 follikuläre Adenome, vier atypische Adenome und 17 follikuläre Karzinome beurteilt. Die Karzinome hatten im Vergleich zu den follikulären Adenomen die größeren Zellkerne: $45,3 \pm 10,3 \mu\text{m}^2$ vs $34,4 \pm 3,9 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$). Im Vergleich waren auch bei unserer Messung die Zellkerne der Karzinome größer ($40,1 \mu\text{m}^2 \pm 11,7 \mu\text{m}^2$) als die der Adenome ($31,5 \mu\text{m}^2 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$). Es fanden sich bei Rüschoff pro Gruppe eine durchschnittliche AgNOR-Anzahl und durchschnittliche AgNOR-Fläche einer jeden versilberbaren AgNOR wie folgt: follikuläre Adenome: $3,5 \pm 0,3$ und $0,14 \mu\text{m}^2$;

atypische Adenome: $4,5 \pm 1,0$ und $0,12 \mu\text{m}^2$; folliculäre Karzinome: $5,0 \pm 0,7$ und $0,12 \mu\text{m}^2$. Gleichzeitig wurde eine Spannweite der Fläche einer einzelnen AgNOR allgemein von $0,1 - 2 \mu\text{m}^2$ eingeräumt. Mittels dieser Parameter war wegen deutlicher Überschneidungen der Messwerte dennoch auch keine signifikante Unterscheidung möglich. Es wird hier die Erhebung des „AgNOR-Verteilungs-Scores“ empfohlen. Die vier danach beurteilten atypischen Adenome des Kollektivs wurden zu je 50% der benignen und der malignen Gruppe zugeordnet. Eine Angabe über Sensitivität und Spezifität erfolgt nicht (Rüschoff et al. 1993a). Es wurde jedoch an dem Verfahren kritisiert, dass die vermessenen Zellen nicht randomisiert ausgewählt wurden und die Ergebnisse damit als schwierig reproduzierbar erscheinen (Solymosi et al. 1996). In unserer Untersuchung waren bei größerer Fallzahl, identischer Färbemethode und Anfärzeit die AgNOR-Anzahl beider Diagnosegruppen geringer als bei Rüschoff (Karzinome: $2,638 \pm 0,62$; Adenome: $2,641 \pm 0,54$), der Unterschied zwischen beiden Gruppen jedoch nicht signifikant. Die mittlere Fläche einer jeden AgNOR war in unserem Kollektiv größer (Karzinome: $0,82 \mu\text{m}^2 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$; Adenome: $0,72 \mu\text{m}^2 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$) als bei Rüschoff. Im Vergleich fällt auf, dass dort zur Fixierung des Tumormaterials vorab zehnpromzentiges Formalin bei unserem Material jedoch nur vierpromzentiges Formalin verwendet wurde. Ein Vergleich von Kollektiven, die unterschiedlich fixiert wurden, ist grundsätzlich nicht möglich, da die Fixierung Form und Volumen der Gewebeproben beeinflusst und sich dabei in unterschiedlichem Ausmaß auf die einzelnen Zellkomponenten auswirkt (Kronqvist et al. 1995).

Aus den aus den Einzelmethoden erhobenen Parametern errechneten wir Sekundärparameter wie u. a. NQC (AgNOR-Quotient/ Zelle, inverses Verhältnis von Anzahl zur Fläche in einem Kern) und NGAKA (Produkt der gesamten versilberbaren Fläche mit der Kernfläche); beide fielen für die Karzinome signifikant höher aus als für die Adenome (jeweils: $p < 0,01$).

Mit unserer Untersuchung haben wir versucht festzustellen, ob mit den Messdaten der Kernmorphometrie und der AgNOR-Analyse - jeweils alleine sowie in der Kombination beider Methoden - die sichere Differenzierung der malignen von der benignen folliculären Schilddrüsen-Neoplasie gelingt. Letztendlich sollte ein statistisch verwertbares Vorhersagemodell gefunden werden, das nach Einsatz der ermittelten

statistisch signifikanten Parameter eine zuverlässige Unterscheidung der beiden Phänomene zulässt.

Eine weniger zuverlässige Abgrenzung gelang unter Verwendung beider Vorhersagemodelle nach separatem Einsatz der Messparameter aus beiden Einzelmethoden. Aus der AgNOR-Analyse waren NQC, NZC und NEAC verwertbar. Nach Reklassifikation der Ergebnisse der Logistischen Regression ergab sich eine Richtigkeit von 67,8 % (Sensitivität 72,4%; Spezifität 63,3%). Von der Kernmorphometrie ließen sich nur AVG-Fer und ASP-Rat verwenden. Hier wurde eine Richtigkeit der Diagnosezuordnung von 74,6 % (Sensitivität 58,9%; Spezifität 90%) erzielt.

Eine Kombination der Parameter aus beiden Einzelmethoden, mit denen dort die besten Reklassifikationsergebnisse ermittelt wurden, eingesetzt in das Vorhersagemodell der Logistischen Regression (Reklassifikation: 86,4% bei einer Sensitivität von 75,9% und einer Spezifität von 96,7) erreichte eine gute Trennbarkeit der Neoplasien. Erwähnt sei an diesem Punkt, dass die Reklassifikation anhand des Ausgangsdatensatzes erfolgte.

In der Auswertung der Ergebnisse der Logistischen Regression erwiesen sich aus der Anamnese der Parameter AGE (Alter), sowie für die Kernmorphometrie Area, ASP-RAT und M135 als relevant. Aus den Daten der AgNOR-Analyse waren nur NZC und NQC verwertbar. Für das BAYES-Theorem waren wiederum Area, Perimeter, F45, ASP-RAT, M135, NEAC und NQC einsetzbar.

Die Ergebnisse beider Vorhersagemodelle wurden außerdem anhand einer ROC-Kurve überprüft. Es ergab sich für die Kombination beider Methoden bei der Logistischen Regression eine Fläche von 0,91 unter der ROC-Kurve und damit ein gutes Testergebnis. Für das BAYES-Theorem der Kombination beider Methoden errechnete sich mit einer Fläche von 0,74 unter der ROC-Kurve ein ausreichend gutes Testergebnis.

In der Praxis bedeutet das, dass, um eine möglichst sichere Unterscheidung der beiden

Tumorarten zu erreichen, auch beide Einzelmethoden durchgeführt werden müssen. Zur Reproduktion unserer Methode müssten vorab histologische Präparate postoperativ gefertigt werden. Wird dann dabei die Diagnose "Karzinom" gestellt, muss sich der Patient einer erneuten Operation mit den entsprechenden Risiken unterziehen. Damit ergibt sich zunächst kein Vorteil zur klassischen histopathologischen Diagnosestellung. Mehrere Autoren stellten jedoch – wie bereits erwähnt - fest, dass sich bezüglich der Anzahl der AgNORs pro Zellkern - des sog. AgNOR-Counts - die Messergebnisse bei zytologischen und histologischen Präparaten gleichermaßen verwertbar sind (Musiatowicz et al. 1998; Shechtman et al. 1997). Hieraus könnte man ableiten, dass auch andere Parameter der AgNOR-Analyse in gleicher Qualität wie bei histologischen Präparaten aus zytologischem Material erhoben werden können. Dieses wäre dann unter Umständen unmittelbar nach FNA aus dem gewonnenen Punktat möglich. In diesem Fall wäre eine sichere präoperative Diagnosestellung möglich, die dem Patienten gegebenenfalls einen risikoreichen Zweiteingriff ersparen könnte.

5 Zusammenfassung

Die Differentialdiagnose zwischen benignen und malignen follikulären Neoplasien der Schilddrüse ist schwierig. Da zytologisch beide ein so ähnliches Bild liefern, kann nur die Gruppendiagnose einer „follikulären Neoplasie“ gestellt werden. Eine histopathologische Untersuchung der Neoplasie nach Hemithyreoidektomie ist bisher unabdingbar. Ein maligner Befund bedeutet dann für den Patienten einen weiteren operativen Eingriff, die Entfernung des verbliebenen Schilddrüsengewebes, und damit ein erhöhtes Risiko. Es ergibt sich der Bedarf einer verbesserten pathomorphologischen Diagnostik, die Dignität einer Neoplasie auf Ebene der Zelle zu bestimmen und damit die Diagnose bereits nach der Feinnadelbiopsie präoperativ festzulegen. In den letzten Jahren haben Methoden, die aus dem morphologischen Erscheinungsbild einer Zelle Rückschlüsse auf ihr biologisches Verhalten erlauben, an Bedeutung in der Tumorpathologie gewonnen und wurden z. T. mit Erfolg in der Differenzierung schwierig abgrenzbarer Läsionen eingesetzt: die AgNOR-Analyse, die die Proteinsynthese auf Nucleolusebene bestimmt und als Marker für Zellproliferation gilt, und die Kernmorphometrie, die quantitativ geometrische Zellparameter erfasst. Da beide Methoden einzeln angewandt oft als nicht aussagekräftig genug gelten, wurde hier untersucht, ob mit den Einzelmethode oder einer Kombination beider eine sichere Unterscheidung beider Neoplasien gelingt. Wir stellten mit der Kernmorphometrie fest, dass die Kernfläche, „Area“, „Perimeter“ und der „AVG-Feret“ der Karzinome deutlich größer waren als die der Adenome. Die Adenome dagegen wiesen einen signifikant größeren „Shape Factor“ und „Aspect Ratio“ auf, waren damit „runder“ mit glatterer Oberfläche als die Karzinome. In der AgNOR-Analyse zeigten die Adenome eine in Durchschnitt höhere AgNOR-Zahl pro Zelle, „NZC“, jedoch war der Unterschied hier nicht signifikant. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Parametern mittlere AgNOR-Fläche, „NEAC“, „NGA“ (gesamtversilberbare Fläche/Zellkern), NQC (AgNOR-Quotient/Zelle, inverses Verhältnis von Anzahl zur Fläche in einem Kern) und NGAKA (Produkt der der Gesamtversilberbaren Fläche mit der Kernfläche). Allerdings gab es bei allen Parametern aus den Einzelmethode deutliche Überschneidungen der Messwerte. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ein oder

mehrere statistisch annehmbare Vorhersagemodelle zu finden, die eine hinreichend zuverlässige Unterscheidung der beiden Neoplasien ermöglichen. Angewendet wurden hier die Logistische Regression und das BAYES-Theorem. Bei der Testung der Verwertbarkeit der Einzelparameter aus der AgNOR-Analyse in der Logistischen Regression, erwiesen sich nur „NQC“, „NZC“ und „NEAC“ als brauchbar. Es fand sich eine Richtigkeit der Vorhersage von 67,8% (Sensitivität: 72,4%/ Spezifität: 63,3%). Von den kernmorphometrischen Messparametern waren für die Logistische Regression nur „AVG-FER“ und „ASP-Rat“ anwendbar. Es zeigte sich eine Richtigkeit der Reklassifikation von 74,6% (Sensitivität: 58,9%/ Spezifität: 90,0%). Für das BAYES-Theorem ergaben die Einzelmethoden keine brauchbaren Ergebnisse. In der Testung aller Parameter aus beiden Methoden in Kombination mittels der Logistischen Regression waren von der AgNOR-Analyse „NZC“ und „NQC“, von der Kernmorphometrie „Area“, „ASP-RAT“ und „M135“ und aus der Anamnese „AGE“ (Alter) verwertbar. Richtigkeit der Vorhersage war in der Reklassifikation 86,4% (Sensitivität: 75,9%/ Spezifität: 96,7%), die Fläche unter der ROC-Kurve ergab 0,91 und damit ein gutes Testergebnis. Für das BAYES-Theorem ließ sich hier nur „NGAKA“ aus der AgNOR-Analyse verwerten. Die Fläche unter der ROC-Kurve betrug in der Überprüfung 0,74. In der Praxis können mit unserer Methode erst postoperativ nach Erstellung histopathologischer Präparate beide Methoden durchgeführt, die Einzelparameter in das Vorhersagemodell Logistische Regression eingesetzt und anschließend die diagnostische Zuordnung vorgenommen werden. Damit ergibt sich zunächst kein Vorteil zur klassischen histopathologischen Diagnosestellung. Andere Autoren stellten fest, dass bezüglich der AgNOR-Analyse die Messergebnisse bei zytologischen und histologischen Präparaten gleichermaßen verwertbar sind (Musiatowicz et al. 1998; Shechtman et al. 1997). Hieraus könnte man ableiten, dass auch andere Parameter der AgNOR-Analyse und Kernmorphometrie in gleicher Qualität wie bei histologischen Präparaten aus zytologischem Material erhoben werden können. Ob dieses dann unter Umständen unmittelbar nach FNA präoperativ möglich wäre und ein risikoreicher Zweiteingriff so umgangen werden könnte, wird in Zukunft zu prüfen sein.

Literaturverzeichnis

Anderson JA et al. (1982):

Logistic discrimination.

In: Krishnaiah PR (Hrsg.): Handbook of statistics. Vol. 2, Auflage 1982:169

Rotterdam, Niederlande

Ashcraft MW, Van Herle AJ et al. (1981):

Management of thyroid nodules.

Head and Neck Surgery 3:297-322

Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M et al. (1994):

Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology.

Zentralblatt für Pathologie 140(1):107-8

Augustynowicz A, Dzieciol J, Dadan J et al. (2001):

Proliferative activity of the thyroid oxyphilic tumor cells estimated by means of quantitative analysis of silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs).

Folia Histochemica Cytobiologica 39 Suppl. 2:203-4

Bearzi I, Ranaldi R, Santinelli A et al. (1992):

Epithelial dysplasia of the gastric mucosa. A morphometric and ploidy pattern study.

Pathology, Research and Practice 188:550-555

Belfiore A, LaRosa GL, LaPorta GA et al. (1992):

Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity.

The American Journal of Medicine 93:363-369

Bittinger A (1996):

Diagnostische und prognostische Bedeutung der Kernmorphometrie in der Tumorpathologie.

Habilitationsschrift, Marburg 1996

Böcker W (1984):

Schilddrüse.

In: Remmele W (Hrsg.): Pathologie. Band 3, Auflage 1984:415-439

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Boeckl O, Pimpl W, Galvan G (1990):

Wann Lappenteilresektion, wann Hemithyreoidektomie bei der OP des isolierten Schilddrüsenknotens?

Langenbecks Archiv Chirurgie 1990 375:318-323

Böhm G, Salzer D, Kutschik M, Lintner F et al. (1992):

Morphometric analysis of cartilaginous tumors.

Pathology, Research and Practice 188:570-575

Borland RN, Partin AW, Epstein JI et al. (1993):

The use of nuclear morphometry in predicting recurrence of transitional cell carcinoma.

Journal of Urology 14:474-482

Busch H, Lischwe MA, Michalik J et al. (1982):

Nucleolar proteins of special interest: Silver staining proteins B23 and C23 and antigens of human tumor nucleoli.

In: Jordan EG, Cullis CA (Hrsg.): The Nucleolus. Auflage 1982:43-72

Cambridge University Press, Cambridge

- Camargo RS, Scafuri AG, Castro de Tolosa EM et al. (1992):
DNA-image cytometric analysis of differentiated thyroid adenocarcinoma specimen.
The American Journal of Surgery 164:640-645
- Campo E, Perez M, Charonis AA et al. (1992):
Patterns of basement membrane laminin distribution in non-neoplastic and neoplastic
thyroid tissue.
Modern Pathology 5:540-546
- Crocker J, Egan MJ et al. (1988):
Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin`s lymphomas.
Journal of Pathology 156:233-239
- Davila R, Bedrossani M, Siverberg A et al. (1988):
Immunocytochemistry of the thyroid in surgical and cytologic specimen.
Archives of Pathology and Laboratory Medicine 112:51-56
- Deleener A, Castelain P, Preat V et al. (1987):
Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA-content during the first
steps of rat hepatocarcinogenesis.
Carcinogenesis 8:195-201
- Derenzini M, Pession A, Farabegoli F et al. (1989):
Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two
neuroblastoma cell lines.
American Journal of Pathology 134:925-932
- Dohm G (Hrsg.) (1979):
Präneoplasien.
In: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Bd. 63:95
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

Donohue JH, Goldfien SD, Miller TR et al. (1984):

Do the prognoses of papillary and follicular thyroid carcinomas differ?

American Journal of Surgery 148:168-173

Droese M, Kempken K (1976):

Die Feinnadelpunktion in der Schilddrüsendiagnostik.

Medizinische Klinik 71:229

Droese M (Hrsg.) (1979):

In: Aspirationszytologie der Schilddrüse. Auflage 1979:1-5

F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York

Dzieciol J, Musiatowicz B, Sulkowska M et al. (1996):

Usefulness of nucleolar organizer region staining (AgNORs) in the valuation of follicular tumors of the thyroid.

Folia Histochemica ET Cytobiologica 34, Suppl. 1:35-36

Egan M, Ramsden K, Crocker J et al. (1988a):

Diagnostic significance of mean numbers of nucleolar organizer regions in benign and malignant transitional tumors of the nose.

Histopathology 13:579-581

Egan M, Freeth M, Crocker J et al. (1988b):

Intraepithelial neoplasia, human papilloma virus infection and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium.

Histopathology 13:561-567

Egan M, Raafat F, Crocker J et al. (1988c):

Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma.

Journal of Clinical Pathology 41:31-33

Emerick GT, Duh QY, Siperstein AE et al. (1993):

Diagnosis, treatment, and outcome of follicular thyroid carcinoma.

Cancer 72/11:3287-3295

Engel W, Zenzes MT, Schmid M et al. (1977):

Activation of mouse ribosomal RNA genes at the 2-cell stage.

Human Genetics 38:57-63

Erickson L, Jin L, Mwoollan P et al. (1998):

Expression of p27^{KIP1} and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors.

Modern Pathology 11(2):169-174

Evans AT, Orrell JM, Grant A et al. (1991):

Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanotic lesions: a study with quantitation and pattern analysis.

Journal of Pathology 165:61-67

Fakan S, Hernandez Verdun T (1986):

The nucleolus and the nucleolar organizer regions.

Biology of the Cell 56:189-205

Fenoglio-Preiser CM, Listom MB, Longacre TA et al. (1991):

Oncogenes and tumor suppressor genes in solid tumors: lung, endocrine, skin, salivary gland, head and neck and soft tissue tumors.

In: Fenoglio-Preiser CM, Willmann CL (Hrsg.): Molecular diagnostics in pathology.

Auflage 1991:261, Williams&Wilkins, Baltimore, USA

Ferraro M, Prantera G et al. (1988):

Human NORs show correlation between transcriptional activity, DNA-se sensitivity, and hypomethylation.

Cytogenetics and Cell Genetics 47:58-61

- Ferrer-Roca O, Ballester-Guardia E, Martin-Rodriguez JA et al. (1985):
Morphometric, densitometric and flow cytometric criteria for the automated classification of thyroid lesions.
Analytical of Quantitative Cytology and Histology 12:48-55
- Field DH, Fitzgerald PH, Sin FY et al. (1984):
Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes.
Cytobios 41:23-33
- Franceschi S, Boyle P, Maisonneuve P et al. (1993):
The epidemiology of thyroid carcinoma.
Critical Reviews of Oncology 4:25-52
- Frasoldati A, Flora M, Pesenti M et al. (2001):
Computer-assisted cell morphometry and ploidy analysis in the assessment of thyroid follicular neoplasms.
Thyroid 11(10):941-6
- Gharib H, Goellner JR, Zinsmeister AR et al. (1984):
Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid.
Annals of Internal Medicine 101:25-28
- Gianni A, Urso C, Santucci M et al. (1988):
Benign melanocyte lesions. A morphometric analysis.
Pathology, Research and Practice 183:262-265
- Giri DD, Nottingham JF, Lawry J et al. (1989):
Silverbinding nucleoli and nucleolar organizer regions in the fine-needle aspiration cytology of the breast.
Acta Cytologica 33:173-175

Goodpasture C, Bloom SE et al. (1975):

Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.

Chromosoma 53:37-50

Greenebaum E, Koss LG, Silver CE et al. (1985):

The diagnostic value of flow-cytometric DNA-measurements in follicular tumors of the thyroid gland.

Cancer 56:2011-2016

Grobholz R, Bittinger A, Gerdes B et al. (1997):

Entwicklung eines Schilddrüsenkarzinoms nach Bestrahlung des Kopf-/Halsbereiches.

Deutsche Medizinische Wochenschrift 122:362-365

Hanley JA, McNeil BJ et al. (1982):

The meaning and use of the area under the Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve.

Radiology 143:26

Hansen AB, Ostergard B et al. (1990):

Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue.

Virchows Archiv (A) 417:9-13

Hirabayashi RN, Lindsay S et al. (1961):

Carcinoma of the thyroid: a statistical study of 390 patients.

Journal of Clinical Endocrinology 21:1596-1610

Howell WM, Black DA et al. (1980):

Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective-colloid developer: a one step method.

Experientia 36:1014-1017

Hucumenoglu S, Kaya H, Kotiloglu E et al. (2002):

AgNOR values are not helpful in the differential diagnosis of pituitary adenomas.

Clinical Neurology and Neurosurgery 104(4):293-9

International Union against Cancer (UICC): TNM Klassifikation maligner Tumoren.

Auflage 1997, S. 34

Springer Verlag Berlin, Heidelberg

Kamarkar T, Dey P et al. (1995):

Role of AgNOR in diagnosis of thyroid follicular neoplasms on fine-needle aspiration smears.

Diagnostic Cytopathology 12,2:148-151

Kanematsu E, Matsui H, Deguchi T et al. (1997):

Significance of AgNOR counts for distinguishing carcinoma from adenoma and hyperplasia in parathyroid gland.

Human Pathology 28(4):421-7

Kingston GW, Bugis SP, Davis N et al. (1992):

Role of frozen section and clinical parameters in distinguishing benign from malignant follicular neoplasms of the thyroid.

American Journal of Surgery 164:603-605

Kirillov VA, Yuschenko YP, Paplevka AA et al. (2001):

Thyroid carcinoma diagnosis based on a set of karyometric parameters of follicular cells.

Cancer 92(7):1818-27

Koller PC et al. (1963):

The nucleolus of cancer cells. A historical review.

Experimental Cell Research (Suppl.) 9:3-14

Koss LG et al. (1975):

Tumors of the urinary bladder.

Washington: Armed Forces Institute

Krack W, Nies C, Sitter H et al. (1999):

Prediction of perioperative changes of mediators in cholecystectomy - an application of BAYES-Theorem.

Inflammation Research 48 (Suppl. 1) 49-50

Kronqvist P, Collan Y, Kuopio T et al. (1995) :

Nucleolar morphometry in breast cancer: the influence of sampling rules and freezing of samples.

Modern Pathology 8:187-192

Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS et al. (1988):

Activated ras oncogenes in thyroid cancer.

Cancer Research 48:4459-4463

LiVolsi VA, Baloch ZW et al. (2002):

Predicting prognosis in thyroid carcinoma: can histology do it?

American Journal of Surgical Pathology 26(8):1007-1015

Löwenhagen T, Sprenger E et al. (1974)

Cytologic presentation of thyroid tumors in aspiration smear.

Acta Cytologica 18:192-197

Lukacs G, Balazs G, Zs.-Nagy I et al. (1979):

Cytofluometric measurements on the DNA-contents of tumor cells in the human thyroid gland.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 95:265-271

Mackenroth T, Scriba PC, Siegenthaler (Hrsg.):

Krankheiten der Schilddrüse.

In: Lehrbuch, Band I: Innere Medizin in Praxis und Klinik, Auflage 1992:4.61

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Mainwaring WIP et al. (1986):

Hormones and Cancer.

In: Franks LM, Teich NM (eds.): Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Auflage 1986:277-305

Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo

Matsumara T, Sasaki K, Tsuji T et al. (1989):

The nucleolar organizer regions associated protein (AgNORs) in salivary gland tumors.

International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1989:18:76-78

Matsuo K, Tang S, Zeki K et al. (1993):

Aberrant deoxyribonucleic acid methylation in human thyroid tumors.

Journal of Clinical Endocrinological Metabolism (5):67-72

Mattfeldt T, Schürmann G, Feichter G et al. (1987).

Stereology and flow-cytometry of well-differentiated follicular neoplasms of the thyroid gland.

Virchows Archives (A) 410:433-441

Mehrotra A, Agarwal P, Chandra T et al. (1998):

Cytopathology and AgNOR Counts in fine-needle aspiration cytology smears of thyroid lesions.

Diagnostic Cytopathology 19,4:238-243

Miller OJ, Miller DA et al. (1976):

Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids.

National Academy of Sciences 12:4531-4535

Mincione G, Cirafici AM, Lazzareschi D et al. (1993):

Loss of thyrotropin regulation and transforming growth factor and beta-induced growth arrest in erbB-2 overexpressing rat thyroid cells.

Cancer Research 53(22):5548-53

Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T et al. (1991):

Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissue.

Histopathology 18(1):11-18

Montironi R, Braccischi A, Scarpelli M et al. (1991):

Value of quantitative nucleolar features in the preoperative cytological diagnosis of follicular neoplasms of the thyroid.

Journal of Clinical Pathology 44:509-514

Moreno FJ, Villamarin A, Garcia Herdugo G et al. (1988):

Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in semithin lowicryl sections.

Stain Technology 63:27-31

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H et al. (1973):

Histopathological typing of urinary bladder tumors. Classification of tumors.

19 Geneva: WHO

- Motoi N, Sakamoto a, Yamochi T et al. (2000):
Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin.
Pathology, Research and Practice 196:1-7
- Muscara M, Giuffre G, Tuccari G et al. (1991):
Nucleolar organizer regions in dysplastic and neoplastic lesions of the large bowel.
European Journal of Basic Applied Histochemistry 35:401-408
- Musiatowicz B, Dzieciol J, Augustynowicz A et al. (1998):
Overexpression of the nucleolar organizer regions (NORs) in the thyroid follicular tumors.
Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku 43:186-193
- Nafe R, Fritsch RS, Soudah B et al. (1992):
Histomorphometry in paraffin sections of thyroid tumors.
Pathology, Research and Practice 188():1042-1048
- Nairn ER, Crocker J, McGovern J et al. (1988):
Limited value of AgNOR enumeration in assessment of thyroid neoplasms (letter).
Journal of Clinical Pathology 41:1136-1142
- Nikoforov Y, Gnepp DR et al. (1994):
Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster.
Pathomorphologic cases of 84 cases (1991-1992) from the republic of Belarus.
Cancer 74:748-766
- O'Leary TJ, MikelUV, Becker RL et al. (1992):
Computerassisted image interpretation: use of a neural network to differentiate tubular carcinoma from sclerosing adenosis.
Modern Pathology 5: 402-405

Öfner D, Bankfalvi A, Riechmann K et al. (1994):

Standartisierte AgNOR-Färbemethode für formalinfixiertes und paraffingebettetes Material.

Pathologie 15:226-231

Öfner D, Schmid KW et al. (1996):

Standardized AgNOR analysis: its usefulness in surgical oncology.

Histochemistry and Cell Biology 106:193-196

Owens L, Xu L, Dent G et al. (1995):

Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human cancer.

Annals of Surgical Oncology 3 (1):100-105

Pfannenstiel P (1991):

In: von Henning T (Hrsg.): Schilddrüsenkrankheiten - Diagnose und Therapie, 2. Auflage:262

Berlin Medizin Verlag

Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G et al. (1987):

Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level.

Histochemistry Journal 18:5-14

Ranaldi R, Bearzi I, Santinelli A et al. (1992):

Quantitative study of the precancerous and malignant lesions in colorectal adenomas.

Pathology, Research and Practice 188:561-564

Reevers BR, Casey G, Honeycombe JR et al. (1984):

Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizers in the promyelocytic leukemia cell line HL-60.

Cancer, Genetics and Cytogenetics 13:159-166

Riede UN (Hrsg.), Schaefer HE (Hrsg.) (1993):

Neoplastische Erkrankungen der Schilddrüse.

In: Allgemeine und spezielle Pathologie, Lehrbuch, 3. Auflage:998-1002

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Rojeski MT, Gharib H et al. (1985):

Nodular thyroid disease.

The New England Journal of Medicine 313:428-436

Romppanen T (Hrsg.), Collan Y (Hrsg.) (1982):

Morphometry in morphological diagnosis. Auflage 1982:43-65

Kuopio University Press, Finland

Roussel P, Belenger P, Almaric F et al. (1992):

Nucleolin is an AgNOR-Protein; This property is determined by its aminoterminal domain independence of its phosphorylation state.

Experimental Cell Research 203:259-269

Rout P, Shariff S et al. (1998):

Diagnostic value of qualitative and quantitative variables in thyroid lesions.

Cytopathology 10:171-179

Rothmund M (1990):

Wann Lappenteilresektion, wann Hemithyreoidektomie bei der Operation des isolierten Schilddrüsenknotens? (Diskussionsforum)

Langenbecks Archiv Chirurgie 375:318-323

Rothmund M, Zielke A (1991):

Der solitäre Schilddrüsenknoten - befundgerechte Operation.

Chirurg 62:162-168

Rüschhoff J, Plate KH, Contractor X et al. (1990a):

Evaluation of nucleolar organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization.

Journal of Pathology 161:113-118

Rüschhoff J (1990b):

Diagnostische und prognostische Relevanz der Nukleolus organisierenden Regionen (NOR) in der pathomorphologischen Tumordiagnostik.

Habilitationsschrift, Marburg

Rüschhoff J, Zimmermann R, Ulshöfer B et al. (1992):

Silver-stained nucleolar proteins in urothelial bladder lesions – a morphometric study.

Pathology, Research and Practice 188:593-598

Rüschhoff J, Prasser C, Cortez T et al. (1993a):

Diagnostic value of AgNOR staining in follicular cell neoplasms of the thyroid: comparison of evaluation methods and nucleolar features.

American Journal of Surgical Pathology 17(12):1281-1288

Rüschhoff J, Willemer S, Brunzel M et al. (1993b):

Nucleolar organizer regions and glycoprotein-hormone α -chain reaction as markers of malignancy in endocrine tumours of the pancreas.

Histopathology 22:51-57

Rowlands DC et al. (1988):

Nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia.

Journal of Clinical Pathology 41:1200-1202

Sauerbrei W (1992):

Variablenselektion in Regressionsmodellen unter besonderer Berücksichtigung medizinischer Fragestellung.

Dissertation, Universität Dortmund

Scarpelli M, Montironi R, Mazzucchelli R et al. (1999):

Distinguishing cortical adrenal gland adenomas from carcinomas by their quantitative nuclear features.

Anal of Quantitative Cytology and Histology 21(2):131-8

Schark C, Fulton N, Yashiro T et al. (1992):

The value of measurement of ras oncogenes and nuclear DNA analysis in the diagnosis of Hürthle cell tumors of the thyroid.

World Journal of Surgery 16:745-752

Schröder S, Marthaler B et al. (1996):

Autonomie und Malignität bei Schilddrüsentumoren.

Pathologie 17:349-357

Schürmann G, Mattfeldt T, Feichter G et al. (1990):

Probleme in der Differentialdiagnose follikulärer Neoplasien der Schilddrüse.

Langenbecks Archiv Chirurgie 375:95-101

Schmid KW et al. (1997a):

Knoten in der Schilddrüse.

Pathologie 18:301-312

Schmid KW und Böcker W (1997b):

Schilddrüse.

In: Pathologie, 4, 2. Auflage:27-29

Springer Verlag, Wien, New York

Schmid M, Müller HJ, Stasch S et al. (1983):

Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis.

Human Genetics 64:363-370

Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W et al. (1978):

The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis.

Cytogenetics and Cell Genetics 20(1-6):24-39

Shaha AR, DiMaio T, Webber C et al. (1990):

Intraoperative decision making during thyroid surgery based on the results of preoperative needle biopsy and frozen section.

Surgery 11/6: 964-971

Shechtman L, Koren R, Horowitz A et al. (1997):

Diagnostic value of AgNOR staining in thyroid cytology.

Analytical and Quantitative Cytology and Histology 20:187-191

Sitter H, Stinner B, Duda D et al. (1995):

Model building strategies for risk analysis of perioperative histaminerelevant cardiorespiratory disturbances.

Inflammatory Research 44, Supplement 1:82-83

Smetana K, Likovsky Z et al. (1984).

Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells.

Cell Tissue Research 237:367-370

Solymosi T, Toth V, Sapi Z et al. (1996):

Diagnostic value of AgNOR method in thyroid cytopathology: Correlation with morphometric measurements.

Diagnostic Cytopathology 142:140-144

Suarez V, Newman J, Hiley C et al. (1989):

The new value of AgNOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach.

Histopathology 14:61-66

Szymas J, Liebert W, Beil M et al. (1999):

The proliferative potential of human pituitary macroadenoma on the basis of morphometric analysis of nucleolus organizer regions.

Neurologia i Neurochirurgia Polska 33(5):1089-97

Terrier P, Sheng ZM, Schlumberger M et al. (1988):

Structure and expression of c-myc and c-fos proto-oncogenes in thyroid carcinomas.

British Journal of Cancer 57(1):43-47

Tsybrovsky O, Vassilenko I et al. (1998):

Multivariate karyometric approach in differential diagnosis of follicular thyroid neoplasms.

Virchows Archiv 433:135-143

Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P et al. (1985):

Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma.

Cancer 55:794-804

Tuccari G, Muscara M, Giuffrè G et al. (1993):

The value and significance of nucleolar organizer region (AgNOR) proteins in ulcerative colitis and adenocarcinomas of the large bowel.

Histopathology 22:587-588

Tuccari G, Abbona GC, Giuffrè G et al. (2000):

AgNOR quantity as a prognostic tool in hyperplastic and neoplastic parathyroid glands.

Virchows Archiv 437:298-303

Uma B, Chacko G, Chandy MJ et al. (1998):

Argyrophilic nucleolar organizer region proteins (AgNORs) as an index of clinical and radiological invasiveness in pituitary adenomas.

British Journal of Neurosurgery 12(6):582-4

Waterfield MD (1986):

The role of growth factors in cancer.

In: Franks LM, Teich NM, eds.: Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.

Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1986:251-276

Watne A, Starke J, McQuitty D et al. (1991):

Follicular carcinoma of the thyroid.

Seminars in Surgical Oncology 7:87-91

Weger AR, Lindholm JL et al. (1992):

Discrimination of pancreatic adenocarcinomas from chronic pancreatitis by morphometric analysis.

Pathology, Research and Practice 188(1-2):44-48

Weibel ER (1979):

Stereological methods.

In: Practical methods for biological morphometry. 1979:178-183

Academic Press, London, New York, Sydney, Toronto

Weyers W, Bittinger A, Bonczkowitz M et al. (1996):

Melanoma in situ versus melanocytic hyperplasia in sun-damaged skin. Assessment of the significance of histopathologic criteria for differential diagnosis.

American Journal of Dermatopathology 14:112-115

Wilkinson N, Buckley H, Chawner L et al. (1990):

Nucleolar organizer regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometria.

International Journal of Gynecological Pathology 9:55-59

Zedenius J, Auer G, Bäckdahl M et al. (1992):

Follicular tumors of the thyroid gland: diagnosis, clinical aspects and nuclear DNA analysis.

World Journal of Surgery 16:589-594

Zeiger M, Smallridge R, Clark D et al. (1999):

Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms.

Surgery 126:1195-1199

Zou M, Shi Y, Farid NR et al. (1999):

FHIT gene abnormalities in both benign and malignant thyroid tumors.

European Journal of Cancer 35:3:467-472

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adler, Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Basler, Bauer, Baum, Blankenburg, Brandis, Daume, Dombrowski, Drenckhahn, Egbring, Eschenbach, Friedrich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Geus, Golenhofen, Gotzen, Graul, Gressner, Griss, Havemann, Heß, Hildebrandt, Hufmann, Ihm, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Knoll, Koransky, Krause, Kretschmer, Kuni, Lange, Lauer, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mannheim, Mannherz, Maroske, Masserrat, Mennel, Netter, Neurath, Oepen, Pohlen, Remschmidt, Rieger, Rodeck, Rothmund, Rupec, Schachtschabel, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Schulz, Schwerk, Siegrist, Slenczka, Straub, Stempel, Sturm, Thomas, Unsicker, Wagner, Wesemann, v. Wichert, Willenbockel.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name :	Buschendorf
Vorname :	Ina
Geburtsdatum :	27.12.1969
Geburtsort:	Bad Harzburg
Familienstand :	ledig

SCHULBILDUNG

1976 - 1980	Grundschule, Goslar
1980 - 1982	Orientierungsstufe, Goslar
1982 - 1986	Ratsgymnasium, Goslar
1986 - 1987	Artesia - High - School, California, USA
1987 - 1990	Ratsgymnasium, Goslar

HOCHSCHULBILDUNG

1990 - 1996	Philipps - Universität, Marburg Studium der Humanmedizin
1992	Ärztliche Vorprüfung
1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1994	Erstes Amerikanisches Staatsexamen (USMLE, Step One)
1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

1996 – 1997 Städtische Kliniken, Kassel
(Wahlfach: Anästhesie)

KLINISCHE AUSBILDUNG

01.07.1997 bis Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesiologie,
31.12.1997 Intensivmedizin und Schmerztherapie der Berufsgenossen-
schaftlichen Kliniken Bergmannsheil unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. med. M. Zenz

01.01.1998 bis Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Allgemein Chirurgie
31.12.1998 der Städtischen Kliniken Dortmund unter der Leitung von Herrn
Professor Dr. med. D. Löhlein

01.02.1999 bis Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin des
31.07.1999 Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf unter der Leitung von
Herrn Privatdozenten Dr. med. H. Neuhaus

16.08.1999 bis Assistenzärztin in internistischer Weiterbildung in der
31.10.2000 Cecilienklinik Bad Lippspringe unter Leitung von Herrn
Privatdozenten Dr. med A. S. Lübbe

01.11.2000 bis Assistenzärztin in allgemeinmedizinischer Weiterbildung
31.10.2001 in der Praxis Dr. med. K. Rösing, Facharzt für
Allgemeinmedizin, Umweltmedizin

Seit 01.02.2002 Assistenzärztin in arbeitsmedizinischer Weiterbildung in der
Abteilung für Betriebsmedizin der Porsche AG Stuttgart unter
der Leitung von Herrn Dr. med. K. Großmann

Stuttgart, den 06.11.2003

Ina Buschendorf

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. med. A. Zielke, Geschäftsführender Oberarzt des Zentrums für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. M. Rothmund, für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung der Umsetzung.

Zudem dankbar bin ich dem 1997 verstorbenen Herrn Privatdozenten Dr. med. A. Bittinger (ehem. Oberarzt am Pathologischen Institut der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. C. Thomas) für die engagierte Einführung in die Thematik und die Einarbeitung in die Methodik.

Herrn Privatdozenten Dr. med. R. Grobholz, Pathologisches Institut des Klinikums Mannheim der Universität Heidelberg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. U. Bleyl, danke ich ganz besonders für die intensive Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Anregungen.

Dank aussprechen möchte ich außerdem Herrn Dr. H. Sitter, Institut für Theoretische Chirurgie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Lorenz, für die Unterstützung der statistischen Auswertung der Daten und seinen Rat bei der Interpretation der Ergebnisse.

Frau Combè, Pathologisches Institut der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. C. Thomas, danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Kernmorphometrie und AgNOR-Analyse bei der Follikulären Neoplasie der Schilddrüse“ in der Klinik für Visceral, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Privatdozenten Dr. med. A. Zielke, Herrn Privatdozenten Dr. R. Grobholz (Pathologisches Institut des Klinikums Mannheim der Universität Heidelbergs unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. U. Bleyl), Herrn Privatdozenten Dr. med. A. Bittinger (Pathologisches Institut der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. R. Moll) und Herrn Dr. H. Sitter (Institut für Theoretische Chirurgie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Lorenz) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Stuttgart, den 06.11.2003

(Ina Buschendorf)