



## *Edition*

---

Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 41

# **Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom**

Wissenschaftlicher Bericht über das Experten-Symposium an der Universität Bremen  
vom 12.5.05

Schwäbisch Gmünd

Januar 2006



## *Edition*

---

Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 41

### **Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom**

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

**Gmünder ErsatzKasse:**

Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom / [Hrsg.: GEK, Gmünder ErsatzKasse].

Autoren: Dr. Walter Samsel, Zentrum für Sozialpolitik, Universität Bremen, Prof. Alfred Böcking, Institut für Cytopathologie der Universität Düsseldorf]. - Sankt Augustin: Asgard-Verl. Hippe. 2005.

(GEK-Edition; Bd. 41)

ISBN 3-537-44041-3

Herausgeber:

GEK – Gmünder ErsatzKasse  
Bereich Gesundheitsanalyse  
Gottlieb-Daimler-Straße 19  
73529 Schwäbisch Gmünd  
Telefon (07171) 801-0  
<http://www.gek.de>

Autoren:

Dr. Walter Samsel, Zentrum für Sozialpolitik, Universität Bremen

Prof. Dr. Alfred Böcking, Institut für Cytopathologie  
der Universität Düsseldorf

Verlag

Asgard-Verlag, Einsteinstraße 10, 53757 St. Augustin

# Inhalt

<b>0</b>	<b>D. Hebel: Geleitwort</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>W. Samsel, A. Böcking: Vorwort</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>W. Samsel: Zur Vorgeschichte dieses Symposiums</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>P. Duesberg: Ist Krebs eine genetische oder eine chromosomale Krankheit?</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>A. Böcking: DNA-Bildzytometrie - Methode zur Früherkennung und Malignitäts-Gradierung bösartiger Tumoren</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>H. Al-Abadi: Zytomorphologie und DNA-Zytometrie beim Prostata-Carcinom und ihre prognostische Bedeutung. Eine klinische prospektive Studie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom. Zytomorphologie und DNA-Zytophotometrie beim Prostatakarzinom und ihre prognostische Bedeutung</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>B. Tribukait: klinische Bedeutung der DNA-Durchfluss-Zytometrie beim Prostatakarzinom</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>H. Bonkhoff: Prognosefaktoren des Prostata-Carcinoms</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>B. Aeikens: das Prostatakarzinom, eine Herausforderung für den niedergelassenen Urologen?</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>K.H. Bichler: Bedeutung der DNA-Bildzytometrie für die Therapieplanung beim Prostatakarzinom</b>	<b>163</b>
<b>10</b>	<b>A. Böcking: DNA-Grading der Malignität von Prostatakarzinomen in der Weltliteratur</b>	<b>184</b>
<b>11</b>	<b>Zusammenfassung der Diskussionen im Verlauf des Symposiums</b>	<b>204</b>
<b>12</b>	<b>Konsensus Statements der Teilnehmer des Symposiums zum DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms am 12.05.2005</b>	<b>207</b>
<b>13</b>	<b>Autorenverzeichnis</b>	<b>209</b>

# 0

## D. Hebel

### Geleitwort

Dem wissenschaftlichen Symposium zur Diagnostik des Prostatakarzinoms mit besonderer Berücksichtigung bildzytometrischer Verfahren, das im Mai 2005 unterstützt von der GEK in Bremen stattgefunden hat, sind lange Gespräche vorausgegangen, die zwischen der GEK und den Initiatoren des Symposiums seit Mitte 2004 geführt wurden.

Und wir haben ehrlich gesagt zu Beginn Zweifel gehabt, ob wir der Darstellung trauen können, die uns gegeben wurde. Den Medizinern, die sich mit bildzytometrischen Verfahren beschäftigten und die uns sagten, sie könnten mit ihren Methoden bessere oder genauere Aussagen zur jeweiligen Bösartigkeit des Prostatakrebses machen, haben wir zunächst nicht geglaubt. Wenn diese Methode einfach zu lernen ist und für die Wahl der Therapieoptionen beim Patienten zusätzliche wertvolle Hinweise gibt, warum wird sie dann nach unseren Recherchen bei den etwa 3.000 niedergelassenen Urologen wie auch im Krankenhaus vergleichsweise selten angewandt? Aber je länger wir uns Beleg um Beleg aus der internationalen Literatur vorlegen und erklären ließen, desto sicherer sind wir geworden, dass hier ein Schatz zugunsten einer qualitativ besseren Patientenversorgung zuheben ist. Darin haben uns auch die Urologen bestärkt, denen wir das Material vorgelegt haben.

In der Konsequenz haben wir das Bremer Symposium zu diesem Thema im Mai 2005 unterstützt. Nun liegt es in Form eines Buches vor, das die Referate zusammenfasst und sich an Interessierte vor allem aus der Wissenschaft richtet. Wir wünschen uns, dass die hierin angestoßene Diskussion weiter geht und dass nicht zuletzt auch GEK-Versicherte daraus Nutzen ziehen.

Der Wunsch, Ärzte und Patienten in übersichtlicher Form zu diesem Thema zu informieren, hat uns im zweiten Halbjahr 2005 die Broschüre "Prostatakrebs: Diagnose und Prognose" auflegen lassen. Dieses Heft ist kostenlos in den bundesweit etwa 180 GEK-Standorten oder im Internet als PDF-Datei ([www.gek.de](http://www.gek.de), Bereich Service – Broschüren – Therapie Broschüren) erhältlich.

Dieter Hebel

Vorstandsvorsitzender der GEK Gmünder ErsatzKasse

## W. Samsel, A. Böcking

### Vorwort

Am 12.5.05 fand im Zentrum für Sozialpolitik der Universität Bremen mit finanzieller Unterstützung der „Gmünder ErsatzKasse (GEK)“ ein Experten-Symposium zum Thema Prostatakrebs statt. Der Prostata-Krebs ist der häufigste bösartige Tumor des Mannes. Das Robert-Koch-Institut in Berlin berichtet von 40.670 Neuerkrankungen an Prostatakarzinomen bei Männern in Deutschland im Jahre 2000. Damit steht das Prostatakarzinom an erster Stelle unter den Neuerkrankungen an Krebs bei Männern (20,3 Prozent), noch vor Dickdarmkrebs (16,2 Prozent) und dem Lungenkrebs (15,9 Prozent). Während das Prostatakarzinom bis zum 50. Lebensjahr als ärztliche Diagnose nur sehr selten vorkommt, haben von den 70-jährigen Männern schon mehr als 50 Prozent und von den 80-jährigen mehr als 90 Prozent diesen Krebs („Suchet so werdet ihr finden“). Die meisten dieser Tumore bleiben aber so klein, dass sie keine Beschwerden machen und deshalb nur durch Zufall diagnostiziert werden. Aus der Differenz von Inzidenz (darunter versteht man die Neuerkrankungsrate pro 100.000 Männer pro Jahr), die beim Prostatakrebs 101,4 beträgt und der Mortalität (darunter versteht man den Anteil der an Prostatakrebs gestorbenen Männer an allen gestorbenen Männer eines Jahres), die in Deutschland leider auf einer recht unsicheren Grundlage mit 27,7 errechnet wurde, leitet sich eine relativ niedrige scheinbare Letalität (darunter versteht man den Anteil der Männer, der an Prostatakrebs erkrankt ist und auch daran stirbt) von 27,3 %. Eine genaue Ermittlung der Sterberate ist allerdings äußerst schwierig, weil ca. 30 Prozent aller auf Todesbescheinigungen vermerkten Todesursachen nach neueren Studien falsch sind. Berücksichtigt man diesen Umstand, so beträgt die Sterblichkeit an Prostatakrebs in Deutschland 19,4 Prozent.

Das bedeutet: Vier von fünf Männern sterben nicht an, sondern mit ihrem Prostatakarzinom (Hölzel et al., 2002). Zusätzlich kann hier noch angemerkt werden, dass in anderen Ländern andere und zwar meist deutlich niedrigere Sterberaten beim Prostatakrebs genannt werden. In den USA geht man davon aus, dass im Jahr 2005 nur etwa 10% der an Prostatakrebs Erkrankten an ihrem Tumor sterben werden. Fakt ist: Die meisten Prostatakarzinome sind harmlose „Haustierkrebse“. Die beim ersten Blick auf die Statistik scheinbar relativ ungünstigen Überlebensraten von Patienten mit Prostatakarzinom ergeben sich nicht aus der Aggressivität (=Malignitätsgrad) des Tumors, sondern aus dem hohen mittleren Erkrankungsalter der Patienten von durchschnittlich 72 Jahren. Die Patienten sind also oft in einem Alter, in dem auch viele andere Todesursachen nahe sind.

Wichtig ist also zunächst zum Zeitpunkt der Diagnose die genaue Feststellung, von welcher Art der Krebs ist - ob „Haustier“ (geringer Malignitätsgrad) oder „Raubtier“ (hoher Malignitätsgrad), um einerseits (nebenwirkungsreiche und Lebensqualität min-

dernde) Übertherapien möglichst zu vermeiden und andererseits eine exakte Therapieplanung zu ermöglichen.

Die Themenstellung des Symposiums „Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom“ orientierte sich genau an diesem Punkt und setzte dort an. Es ging dabei vor allem um ein in diesem Kontext wichtiges und unverzichtbares Diagnoseverfahren – die DNA-Zytometrie. Bei diesem Diagnoseverfahren handelt es sich -kurz gesagt- um ein bewährtes, standardisiertes, objektives Messverfahren, das mit der optischen Mengenmessung der Erbsubstanz (DNA) von Krebszellen eine genaue Bewertung des Tumors in dieser Richtung zulässt. Die unterschiedliche Malignität des Tumors ergibt sich über die sich verändernde Erbsubstanzmenge in den Krebszellen, wie sie sich mit der Zeit bei der Entwicklung des Tumors findet.

Das Symposium war nach Meinung des veranstaltenden Zentrums für Sozialpolitik der Universität Bremen zu diesem Zeitpunkt deshalb von hoher Bedeutung, weil leider dieses wichtige und aussagekräftige Verfahren in Deutschland wenig bekannt und verbreitet ist, obwohl es eine reguläre Leistung der gesetzlichen Krankenkassen und überdies sehr kostengünstig ist. So sollte die Veranstaltung dreierlei leisten:

1. Es sollte den aktuellen Stand der Wissenschaft zu den möglichen Diagnoseverfahren beim Prostatakrebs und besonders der DNA-Zytometrie zusammenfassen und darstellen.
2. Es sollte einen Beitrag leisten zur Diskussion und zur wissenschaftlichen Auseinandersetzung von Experten aus verschiedenen Arbeitsbereichen im Bereich Diagnostik bei Prostatakrebs – „Theoretiker“ und „Praktiker“, Grundlagenforscher und Kliniker.
3. Es sollte zur (weiteren) Publizität der in diesem Kontext wichtigen Methode der DNA-Zytometrie beitragen, um betroffenen Männern und ihren Angehörigen sowie den beratenden Ärzten unverzichtbare Entscheidungshilfen in einem schwierigen Lebensabschnitt zu geben.

Bei den Teilnehmern des Symposiums im Zentrum für Sozialpolitik handelte es sich um eine Mischung von wissenschaftlichen Experten auf dem Gebiet der Grundlagenforschung und der klinischen Forschung des Prostatakrebses aus Deutschland, den USA und Schweden, die sich größtenteils durch langjährige wissenschaftliche Arbeit vorzugsweise auf dem Gebiet der DNA-Zytometrie aber auch durch wissenschaftliche und praktische Erfahrungen mit anderen Diagnoseverfahren (wie z.B. Gleason-Score) ausweisen, sowie klinisch und im ambulanten Bereich tätigen erfahrenen Ärzten.

Grundlagenreferate zum Mechanismus der Entwicklung des Malignitätsgrades des Prostatakrebses wurden ebenso auf der Veranstaltung diskutiert wie methodische Fragen und epidemiologische Daten zu der Erkrankung selbst, die über mittlerweile 20 und mehr Jahre vorliegen.

- P.Duesberg beschreibt und begründet in seinem Text die molekularbiologischen Grundlagen der Krebsentstehung und liefert gleichzeitig so die Begrün-

dung für die klinischen Erfahrungen mit der DNA-Zytometrie im Kontext Prostatakrebs.

- A.Böcking stellt die DNA-Zytometrie als Diagnoseverfahren ausführlich vor und zeigt, dass diese Methode auf gesicherten Beinen steht und exakte und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zusätzlich steuerte er eine umfassende Sichtung der Literatur im Kontext DNA-Zytometrie bei.
- H.Al-Abadi beweist mit seinen Ausführungen, dass die DNA-Zytometrie auch in Deutschland an bestimmten Einrichtungen einen hohen Stellenwert hat.
- B.Tribukait blickt auf mittlerweile 25-jährige epidemiologische Erfahrungen mit der DNA-Zytometrie zurück und fördert in seiner Arbeit wesentliche, neue Erfahrungen zur Bedeutung dieser Methode zutage, die eine weitreichende Konsequenz in Prognose und Therapie haben.
- H.Bonkhoff stellt als Vertreter der histopathologischen Sichtweise in seinem Text weitere Prognoseverfahren vor und versucht eine vergleichende Wertung der unterschiedlichen Ansätze aus seiner Sicht.
- B.Aekens zeigt systematisiert Sichtweisen und Fragestellungen auf, wie sie ein niedergelasser und in der Patientenberatung aktiver Arzt täglich erfährt.
- K.H. Bichler berichtet über eine jahrzehntelange Erfahrung als Chef einer urologischen Universitätsklinik mit dem Prostatakrebs und der DNA-Zytometrie

So fügen sich die in diesem Buch veröffentlichten Referate, die ihn ähnlicher Form auf dem Symposium von den verschiedenen Experten gehalten wurden, nahezu zu einer Art Enzyklopädie der Diagnose und Prognose des Prostatakrebses zusammen:

Die Diskussionen nach den einzelnen Referaten waren sehr lebhaft und engagiert, z.T. auch kontrovers. Bei wenigen unterschiedlichen Positionen in Detailfragen, ziemlich einhellig war die Meinung aller Teilnehmer in einem entscheidenden Punkt: nicht nur zur Diagnose und zur Therapieplanung beim Prostatakrebs sollte die DNA-Zytometrie nach Meinung der Experten unbedingt durchgeführt werden sondern auch bei Kontrolluntersuchungen liefert sie wertvolle Hinweise über die Entwicklung des Tumors und/oder über den (Miss-)Erfolg bei einer bestimmten Therapie.

Die Veranstaltung schloss mit einem Konsensuspapier der Wissenschaftler, in dem in insgesamt 15 Punkten die Bedeutung der DNA-Zytometrie bei der Diagnostik des Prostatakrebses und seiner Verlaufskontrolle mit oder ohne Therapie dokumentiert wurde. Darin finden sich Aussagen zu den Grundlagen der Methode und seiner Durchführung sowie ihres hohen Aussagewertes bei der Diagnose, Therapieplanung und ihrer Bedeutung bei der Verlaufskontrolle. Es wurde ausdrücklich betont, dass die DNA-Zytometrie beim Prostatakrebs zusätzlich zu den in Deutschland üblichen Diagnoseverfahren unbedingt wichtige Zusatzinformationen liefert, um belastende Übertherapien oder Fehltherapien (z.B. Hormontherapie in bestimmten Fällen) zu vermeiden.

Die auf dem Symposium „Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom“ gehaltenen Referate sind im Folgenden in der von den einzelnen Autoren autorisierten Originalversion abgedruckt. Man kann durchaus feststellen, dass das so entstandene Buch die derzeit umfassendste Dokumentation zum Thema DNA-Zytometrie und Prostatakrebs darstellt. Es dokumentiert den aktuellen Stand der Wissenschaft zum Zeitpunkt der Herausgabe und stellt somit auch ein Nachschlagewerk für interessierte Ärzte und betroffene Patienten mit besonders hohem Interesse an diesem Thema in diesem Zusammenhang dar. Die Reihe „GEK-Edition“ und damit auch dieser Band ist sehr preiswert im Buchhandel verfügbar. Außerdem ist dieses Buch in den GEK-Betreuungsstellen zu erhalten. So besteht die Möglichkeit, dass die wichtigen Inhalte des Symposiums in Bremen vom Mai 2005 die ihr angemessene Bedeutung und Verbreitung vor allem in urologischen Fachkreisen erfahren. Die Herausgeber bedanken sich an der Stelle (auch im Namen der Autoren) ausdrücklich für diese großzügige Hilfe bei der GEK.

November 2005

Dr. Walter Samsel, Bremen

Prof. Alfred Böcking, Düsseldorf



Die Teilnehmer des Bremer Experten-Symposiums (v. l. Müller\*, Al-Abadi, Böcking, Duesberg, Tribukait, Aeikens, Bichler, Bonkhoff, Samsel)

---

\* Prof.R.Müller ist geschäftsführender Direktor des Zentrum für Sozialpolitik der Universität Bremen und war Gastgeber des Symposiums

## W. Samsel

# Zur Vorgeschichte dieses Symposiums oder: was nützt den von Prostatakrebs betroffenen Männern die DNA-Zytometrie?

Ein wissenschaftlich wichtiges Thema auf die aktuelle Tagesordnung zu setzen hat nicht nur eine wissenschaftliche, objektiv-rational orientierte Seite sondern häufig auch eine subjektiv-emotionale. Bei dem hier vom Zentrum für Sozialpolitik der Universität Bremen organisierten Experten-Symposium zum Thema Prostata-Ca-Diagnostik und DNA-Zytometrie sind diese beiden Seiten recht klar nachzuvollziehen. Denn ich selbst als organisierender Veranstalter dieses Symposiums bin vom Prostata-Ca betroffen. Der Zugang zu diesem Thema war deshalb zunächst für mich ein rein emotionaler und deshalb als eigentlicher Grund dafür anzusehen, dass dieses Symposium, zumindest in dieser Form, überhaupt zustande kam.

Mit der Diagnose Prostatakrebs konfrontiert zu werden, ist für jeden Mann hart. Dabei spielt es keine Rolle, ob diese von einem befreundeten Urologen kommt (wie es in meinem Falle war) und jemandem wie mir mitgeteilt wird, der als Arzt und Gesundheitswissenschaftler an der Universität mit wissenschaftlicher Forschung zum Thema Gesundheit im medizinischen Versorgungssystem sein Brot verdient oder ob sie von einem bis dahin unbekannten Urologen kommt und jemanden trifft, der einen ganz anderen Job und Lebensinhalt wie ich hat.

Die in den danach folgenden medizinisch-ärztlichen Erörterungen zu den weiteren möglichen therapeutischen Schritten und zu meiner Prognose sowie die von mir zusätzlich zunächst über unterschiedliche Patienteninformationssysteme eingeholten weiteren Informationen zur Therapie schienen mir angesichts meiner beruflichen Vorbelastung allerdings doch recht wenig fundiert. Vor allem vermisste ich ein sicheres Diagnosesystem, auf dessen Grundlage mein Karzinom hinsichtlich seines Wachstumsverhaltens für mich plausibel so eingestuft werden konnte, dass daraus auch sinnvoll die weiteren Therapieschritte ableitbar waren. Dass die numerische Höhe des PSA-Wertes im Blut dafür nicht verwendet werden kann und auch der Gleason-Score, der in Deutschland als Bewertungsgrundlage fast ausschließlich verwendet wird, keine hohe Reproduzierbarkeit und damit seine Schwierigkeiten hat, war mir bekannt. Jedoch sah ich allerdings zunächst auch keine Alternative. Weder die von mir zu Rate gezogenen wissenschaftlichen Datenbanken gaben mir im ersten Anlauf eine befriedigende Auskunft, noch das viele gedruckte Papier „schulmedizinischer“ und alternativer Art (meist mit dem Logo von Pharma-Firmen), das ich in den Tagen nach der Diagnoseübermittlung verschlang, befriedigte meine Bedürfnisse in dieser Richtung. So wühlte ich zusätzlich in Anträgen

zu laufenden Forschungsvorhaben. Ich war erstaunt, wie wenig es an neueren und grundlegenden Arbeiten gab, wo doch der Prostata-Krebs der häufigste männliche maligne Tumor ist und viele Fragen immer noch offen sind. Hielt man dieses Feld in der Urologie für weitgehend „abgegrast“?

In einem Forschungsantrag aus der Charité in Berlin (an sich zu einem Thema, das mich zu diesem Zeitpunkt wenig interessierte) tauchte das Wort „DNA-Zytometrie“ auf. Da fiel es mir wie Schuppen von den Augen: DNA-Zytometrie! Diese Methode (früher Zytophotometrie genannt) kannte ich. Mit dieser Methode habe ich 10 Jahre lang als junger Wissenschaftler in meiner Zeit in der Krebsforschung an der Universität Freiburg und im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg in den 60er und 70er Jahren gearbeitet. Diese Methode war mir vertraut und ich wusste, was sie leisten kann. Der Rest der Recherche auf dieser methodischen Spur war dann einfach, stolperte ich auch gleich über den Namen eines alten Bekannten und Freundes, Prof. Böcking, Chef des Institut für Cytopathologie der Universität Düsseldorf, der hier am Tisch sitzt. Große Teile seiner wissenschaftlichen Lebenstätigkeit hatte er dem Thema DNA-Zytometrie und Prostatakrebs gewidmet und ist ein international ausgewiesener Experte auf diesem Feld geworden. Ich stolperte also so zu sagen eher zufällig als bewusst über meine eigenen wissenschaftlichen Wurzeln und über einen Freund aus alten Tagen. Nun hatte ich gefunden, was ich so lange gesucht hatte.

Warum ist diese Methode für uns als Prostatakrebs-Betroffene schon bei der Diagnosestellung so wichtig?

Prostatakrebse, das ist ein ziemlich „alter Hut“ und ich sage da nichts Neues, zeigen ein völlig unterschiedliches Wachstumsverhalten und sind für die davon betroffenen Männer deshalb von ebenso völlig unterschiedlicher Bedeutung:

- Zum einen gibt es langsam wachsende Krebse, die seinen (meist ja älteren) Träger kaum beeinträchtigen und so dessen Lebenserwartung und Lebensqualität wenig oder überhaupt nicht berühren.
- Zum anderen gibt es aber auch recht „wilde“ Tumoren, die das Leben eines Betroffenen trotz Therapie drastisch verkürzen können und für den Träger u. U. sehr schmerhaft sind.
- Zum dritten sind die unterschiedlichen Prostatakrebse auch hinsichtlich der verschiedenen Therapieverfahren nicht gleich zugänglich.

Was wollte ich also als Betroffener wissen?

Ich wollte natürlich wissen, mit welcher Art von Tumor ich es zu tun habe, um eine sinnvolle therapeutische Strategie ableiten zu können und (das schien mir natürlich insgesamt für alle weiteren Überlegungen zu meinem restlichen Leben besonders wichtig) wollte ich natürlich wissen, wie mein Tumor prognostisch hinsichtlich meiner weiteren Lebenserwartung und meines weiteren Lebensverlaufs zu beurteilen ist.

Die Sichtung der mir zugänglichen Literatur war aus dieser Perspektive gesehen von völlig unterschiedlichem Nutzen und Qualität. Besonders hilfreich waren mir aber

Aussagen, die methodisch auf der DNA-Zytometrie fußten. Die in diesem Kontext methodisch sauber erarbeitete und fundierte wissenschaftliche Literatur unterschiedlicher Autoren machte mir dann auch deutlich, dass die Beurteilung der Tumorwachstumseigenschaften, also das „Malignitäts-Grading“ des Karzinoms, für mein Leben wichtiger ist als die schwierige und methodisch bedingt recht unsichere Suche nach eventuellen Metastasen in anderen Organen oder in den Lymphknoten des kleinen Beckens. Es wurde mir im Verlauf des Literaturstudiums immer klarer: ohne eine DNA-zytometrische Beurteilung meines Karzinoms werde ich keine weiteren Schritte in der Therapie oder auch im weiteren Sinne in meinem Leben festlegen. Was mich medizinisch insbesondere interessierte, und darauf gab mir die Literatur im Kontext der DNA-Zytometrie eine Antwort, war:

Ist mein Tumor von der Art (= prognostisch so günstig), dass ich die Methode „wait and see“ wählen kann, also kontrolliert zuwarten kann?

Wenn nicht, ist eine Operation, Strahlentherapie und/oder Hormontherapie sinnvoll oder muss ich die eine oder andere Option bedingt durch die Art des Tumors ausschließen?

Ich veranlasste also zunächst eine DNA-zytometrische Begutachtung bei Prof. Böcking. Wenige Tage später hatte ich das Ergebnis und entschloss mich auf dieser Grundlage zu einer Strahlentherapie. Die mir (zusätzlich) von meinem behandelnden Urologen empfohlene Hormontherapie zeigte sich bei meiner Tumorart nicht angebracht. Denn folgt man den sehr sauber durchgeföhrten langjährigen Studien von Tribukait (Universität Stockholm) dann hätte eine solche Behandlung mein Leben unter Umständen sogar verkürzt.

Warum halte ich diese Methode für uns als Prostatakrebs-Betroffene auch für den weiteren Verlauf bei unserer Krankheit wichtig?

Jetzt habe ich die Strahlen-Therapie, die mich äußerst belastet hat, etwas mehr als ein Jahr hinter mir. Die DNA-Zytometrie bietet sich nun für mich als ein Verfahren an, mit dem sich der Therapieerfolg oder –misserfolg messen lässt und mit der eine weitere exakte Verlaufskontrolle der Krankheit durchgeführt werden kann. Mit deren Hilfe kann ich auch etwas darüber erfahren, welche gesundheitliche Entwicklung oder welche Lebensentwicklungen ich in diesem Zusammenhang zu erwarten habe (ich gehöre zu den Menschen, die dies gerne wissen wollen).

Um zu einer weiteren DNA-zytometrischen Probe zu kommen, werde ich in naher Zukunft von einem entsprechend erfahrenen Urologen eine Feinnadelaspirationsbiopsie machen lassen. Das Verfahren ist repräsentativer, wesentlich nebenwirkungsärmer und längst nicht so unangenehm für mich als Patienten als die doch recht großen Prostata-Stanzen, mit denen vergleichsweise voluminöse Gewebepartikel entnommen werden und das aus nur wenigen Organbereichen.

Ich will es abschließend hier deutlich sagen: Mir ist mit zunehmender Beschäftigung mit der Materie immer unverständlicher geworden, und ich will dies hier quasi als eine Arbeitshypothese für unser Thema und unser Symposium formulieren, wie man ohne Samsel: Zur Vorgeschichte des Symposiums

die DNA-Zytometrie als Diagnosegrundlage eigentlich überhaupt eine sinnvolle Therapiestrategie beim Prostata-Ca im Einzelfall planen und festlegen will sowie den weiteren Verlauf sinnvoll kontrollieren kann.

Ich hoffe, dass unser wissenschaftlicher Austausch zu diesem Thema dazu beiträgt, dass möglichst viele Betroffene von Ihnen als Experten und Ihrer Arbeit profitieren können. Ich hoffe und wünsche, dass wir dieses Ziel erreichen werden.

Ich möchte mich an dieser Stelle schon bei Ihnen als Referenten und Experten für Ihr Kommen und Ihre Bereitschaft zum wissenschaftlichen Gedankenaustausch recht herzlich bedanken. In diesen Dank einschließen möchte ich unbedingt auch die Gmünder Ersatzkasse (GEK) und ihren Vorstandsvorsitzenden Herrn Hebel sowie Herrn Dudey, die diese Veranstaltung durch ihre finanzielle und ideelle Unterstützung erst möglich gemacht haben. Ein aufrichtiges Dankeschön auch an Prof. Rainer Müller, der als geschäftsführender Direktor des Zentrums für Sozialpolitik der Universität Bremen uns die Räume zur Verfügung gestellt hat. Last but not least möchte ich an dieser Stelle mich ganz besonders bei meinem Freund Alfred Böcking bedanken, der maßgeblich an der Planung, Vorbereitung und Durchführung des Symposiums beteiligt war und ist. Mit seinen hervorragenden Kenntnissen sowie seinen internationalen Kontakten hat er das eigentliche Fundament dieser wissenschaftlichen Veranstaltung geschaffen.

# Ist Krebs eine genetische oder eine chromosomale Krankheit?\*

Englischer Titel: Is cancer a genetic or a chromosomal disease?

## Koautoren:

Ruhong Li (Dept. Mol. and Cell Biol., Donner Laboratory, UC Berkeley, Berkeley, CA 94720)

Alice Fabarius and Ruediger Hehlmann (III. Medizinische Klinik Mannheim of the University of Heidelberg at Mannheim, Wiesbadener Str.7-11, 68305 Mannheim, Germany

## Zusammenfassung:

Konventionelle Gentheorien haben bisher nicht erklaeren koennen, warum Krebs (1) in Neugeborenen nicht auftritt und nicht erblich ist; (2) von nicht-mutagenen Karzinogenen verursacht wird; (3) sich erst Jahrzehnte, nachdem er durch Karzinogene initiiert wurde, entwickelt; (4) sowohl chromosomal als auch phaenotypisch “unstabil” ist; (5) spezifische chromosomale Fehlverteilungen oder Aneuploidien enthaelt; (6) viel komplexere Phaenotypen hervorbringt als gewoehnliche Mutationen, z.B. “multidrug resistance”; (7) nicht-selektive Phaenotypen herausbildet, z.B. Metastasierung oder Affinitaet zu nicht nativen Organen und “Immortalitaet”, die keine Voraussetzung fuer Tumorgenese ist; (8) keine krebserzeugenden Mutationen enthaelt. Deshalb schlagen wir vor, dass Krebs keine genetische sondern eine chromosomale Krankheit ist. Nach dieser Theorie wird Karzinogenese durch unspezifische Aneuploidien ausgelöst, die entweder spontan oder durch Karzinogene entstanden sind. Aneuploidie verdirt Teams von Proteinen, die Chromosomen bei der Zellteilung verteilen, synthetisieren und reparieren. Aneuploidie ist somit eine staendige Quelle fuer chromosomale Veraenderungen.

---

\* with English and German titles and abstract. Based on a talk delivered at a symposium “Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom”, University of Bremen, Bremen, Germany, May 12, 2005.

gen, von denen, in klassisch darwinistischer Manier, Selektion die Entwicklung und dann Weiterentwicklung von boesartigen Krebszellen beguenstigt. Diese chromosomalen Evolutionen konvergieren bei biologisch maximalen Entropien von  $\sim 3n$ . Die chromosomale Veraenderungsrate ist proportional zum Grad der Aneuploidie und kann konventionelle Mutation um 4-7 Groessenordnungen uebertreffen. Deshalb handelt es sich bei Krebszellen um neue Zell-“Arten” mit spezifischen Aneuploidien aber instabilen Karyotypen, statt um Mutationen von normalen Zellen. Krebsspezifische Aneuploidien erzeugen komplexe, maligne Phaenotypen ueber die chromosomal veraenderte Dosis von Tausenden von Genen – genauso wie Trisomie 21 Down Syndrom hervorruft. Die Chromosomen-Theorie erklaert, (1) dass Neugeborene krebsfrei sind, weil Aneuploidie nicht erblich ist; (2) nicht-mutagene Karzinogene als Aneuploidogene; (3) die lange, “neoplastische Latenzzeit” mit der geringen Wahrscheinlichkeit, dass sich neue, konkurrenzfaehige Arten entwickeln; (4) nicht-selektive Phaenotypen durch Gene, die Mitlaeufer von selektiven Chromosomen sind; (5) Immortalitaet, weil chromosomal Veraenderungen negative Mutationen neutralisieren und sich unguenstigen Bedingungen viel schneller anpassen als konventionelle Mutationen.

## **Abstract:**

Conventional genetic theories have failed to explain why cancer 1) is not found in newborns and thus not heritable; 2) is caused by non-mutagenic carcinogens; 3) develops only years to decades after initiation by carcinogens; 4) is chromosomally and phenotypically “unstable”; 5) carries specific chromosomal imbalances or aneuploidies; 6) evolves much more complex phenotypes than conventional mutation such as polymorphisms and multidrug resistance, 7) carries nonselective phenotypes such as affinity for non-native sites or metastasis and “immortality” that is not necessary for tumorigenesis; 8) does not contain carcinogenic mutations. We propose instead that cancer is a chromosomal disease. Accordingly random aneuploidies caused by carcinogens or spontaneously initiate carcinogenesis. Since aneuploidy corrupts teams of proteins that segregate, synthesize and repair chromosomes, it is a steady source of chromosomal variations from which, in classical Darwinian terms, selection encourages the evolution and subsequent malignant progressions of cancer cells. These chromosomal evolutions converge at biologically maximal entropies of  $\sim 3n$ . The rates of these chromosomal variations are proportional to the degrees of aneuploidy, and can exceed conventional mutation by 4-7 orders of magnitude. Thus cancer cells are new cell “species” with specific, but unstable karyotypes, rather than mutants of chromosomally normal cells. Cancer-specific aneuploidies generate complex, malignant phenotypes through the abnormal dosages of thousands of genes, just as trisomy 21 generates Down syndrome. The chromosomal theory explains, 1) no cancer in newborns because aneuploidy is not heritable, 2) non-mutagenic carcinogens as aneuploidogens, 3) long neoplastic latencies by the low probability of evolving competitive new species, 4) nonselective phenotypes via genes hitchhiking on selective chromosomes, and 5) immortality, because chromosomal variations neutralize negative mutations and adapt to inhibitory conditions much faster than conventional mutation.

## 1. Cause of cancer still a matter of debate

Despite over 100 years of cancer research the cause of cancer is still a matter of debate [1-28]. We propose here that the cancer problem is still unsolved, because this debate has been monopolized by conventional genetic theories, which hold that cancer is a “genetic disease” [29-38].

These gene-based cancer theories postulate that cancer is caused by clonal expansion of one single cell that has accumulated about 4-7 complementary mutations during the lifetime of a patient [2, 13, 37, 39-41]. In addition, these theories postulate that, once evolved, cancer cells continue to progress within “clonal” cancers independently via further mutations, to form ever-more malignant and heterogeneous cancers – while normal cells of the same patient remain un-mutated [2, 31-33, 35-39, 41-44]. But these conventional genetic theories cannot explain the following critical properties of carcinogenesis.

### The Achilles heels of the mutation-cancer theory

The currently prevailing cancer theory postulates that cancer is caused by clonal expansion of one single cell that has accumulated about 4-7 complementary mutations during the lifetime of a patient [2, 13, 37, 39-41]. However, the mutation theory is hard to reconcile with the following list of facts.

- 1 **Non-mutagenic carcinogens.** Contrary to the mutation hypothesis, many carcinogens are not mutagens, including some of the most potent ones. Examples are asbestos, tar, mineral oils, naphthalene, polycyclic aromatic hydrocarbons, butter yellow, urethane, dioxin, hormones, metal ions such as Ni, Cd, Cr, As, spindle blockers such as vincristine and colcemid, extra-nuclear radiation and solid plastic or metal implants [48-56].
- 2 **No transforming genes.** Despite years of efforts no genes or combinations of genes from cancers have been shown to transform normal cells to cancer cells [5, 6, 154] or mice carrying such genes in their germ lines into polyclonal tumors [2, 26, 67, 226-228]. Accordingly, many, presumably cancer-specific mutations are not detectably expressed in cancer cells [9, 134, 152, 153].
- 3 **Dependence of cancer on unrealistically high rates of mutation.** The mutation hypothesis explains the exponential increase of the cancer risk with age (see *sect. 2.1*) by the low probability of 4-7 specific mutations [2, 40, 41, 207]. However, in order to maintain the integrity of the genome, spontaneous mutation rates in all species are naturally restricted to about  $10^{-7}$  per dominant gene and to about  $10^{-14}$  per recessive gene per cell generation [7, 59, 66, 68, 82](*sect. 2.4*). Thus, based on these conserved mutation rates cancer via 4-7 mutations would not even exist [11]. For example, based on just 4 specific dominant mutations cancer would occur only once in  $10^{12}$  human lifetimes. This is calculated as follows: Since the spontaneous mutation rate per specific, dominant gene is about  $10^{-7}$ , it takes  $10^{28}$  cells to generate one human cell with 4 specific mutations. The expected cancer rate per

human lifetime of 1 in  $10^{12}$  is then obtained by dividing  $10^{28}$  by  $10^{16}$ .  $10^{16}$  is the number of cells that correspond to an average human lifetime [11, 39]. Thus, in order to explain the current cancer risk of Americans and Europeans of about 1 in 3 lifetimes [47] (Fig. 1) in terms of 4 mutations, the mutation hypothesis has to assume mutation rates, which are about  $10^3$  times higher than in conventional mutation. In other words the mutation rate of 4 mutations would have to about  $10^{12}$  times higher and that of a single mutation about  $10^3$  times higher [ $(10^3)^4 = 10^{12}$ ] than they are, to generate the known cancer risks.

- 4 **No explanation for “neoplastic latency” in carcinogenesis induced by a critical dose of carcinogen.** The mutation hypothesis has no answer to the question why, after a critical dose of carcinogen, carcinogenesis would only occur after exceedingly long “neoplastic latencies” of years to decades (sect. 2.3) [2].
- 5 **Dependence of phenotype alterations in cancers on unrealistically high rates of mutation.** The mutation hypothesis has to assume mutation rates of up to  $10^{-3}$  per cell generation to explain the frequent, spontaneous variation of phenotypes in highly aneuploid cancer cells. Examples are the “high rates”, compared to mutation, at which some cancers generate metastatic cells [72, 73], or generate drug-resistant variants [67, 69-71]. But the mutation rates of most cancers are not higher than those of normal cells [7, 21, 22, 49, 51, 59, 79, 84-86].
- 6 **Heritable mutations of cancer cells, but no heritable cancer.** The 4-7-gene mutation hypothesis predicts that subsets of cancer causing mutations should be heritable. Indeed, proponents of the mutation hypothesis have demonstrated that several of the 6 mutations thought to cause colon cancer [2] can be introduced into the germ line of mice without breaching the viability of these animals (sect. 2.8). According to one study animals with one of these mutations, namely *ras*, were found “without detectable phenotypic abnormalities” [228], and according to another study, “Surprisingly, homozygosity for the Apc1638T mutation [another hypothetical colon cancer gene] is compatible with postnatal life” [227]. Thus subsets of colon cancer genes are heritable. Therefore, colon cancer should be common in newborns, which are clonal for inherited subsets of these 6 mutations (like transgenic mice). But there is no colon cancer in newborns [39, 47] (Fig. 1).

Box 1

## **2. Discrepancies between conventional genetic theories and cancer**

### **2.1 Cancer is not heritable**

The best news about cancer is that we and other animals are all born cancer-free and typically acquire cancer, if at all, only at advanced age [37, 39, 45-48]. This bias of cancer for old age is exponential, increasing the cancer risk 300-fold with age, from near-zero rates in newborns and adolescents to rates of 1 in 3 in the last third of a human or animal life span (Fig. 1). Thus cancer is not a heritable disease but must be somatically generated.

In view of the prevailing gene-based cancer theories, however, this age bias is paradoxical. If these theories were correct, cancer should be common in newborns. For example, a baby, which inherits 3 colon cancer mutations from his mother and 2 from his father, out of the about 6 that are thought to cause colon cancer [2, 28, 37], should develop cancer at a very young age from just one more spontaneous mutation in any one of the billions of its colon cells. Indeed many hypothetical cancer-causing mutations, including those thought to cause colon cancer, are heritable in transgenic mice [9, 49] and also in humans [32, 35] (see, Achilles heels of mutation-theory, Box 1, and sect. 2.8). According to Vogelstein and Kinzler, “one of the cardinal principles of modern cancer research is that the same genes cause both inherited and sporadic (noninherited) forms of the same tumors” [32]. But, there is no colon cancer in newborns (Fig. 1).

### **2.2 Non-mutagenic carcinogens cause cancer**

Both mutagenic and non-mutagenic carcinogens cause cancer. Examples of non-mutagenic carcinogens are asbestos, tar, mineral oils, naphthalene, polycyclic aromatic hydrocarbons, butter yellow, urethane, dioxin, hormones, metal ions such as Ni, Cd, Cr, As, spindle blockers such as vincristine and colcemid, extra-nuclear radiation and solid plastic or metal implants [48-56] (see also, Box 1).

Conventional genetic theories, however, fail to explain carcinogenesis by non-mutagenic carcinogens.

### **2.3 Long neoplastic latencies**

“Initiation” of carcinogenesis by mutagenic or non-mutagenic carcinogens demonstrates that cancer is a very late consequence of the actions of carcinogens [2, 11, 39, 48, 50, 57]. Even the most potent carcinogens generate cancer only after “neoplastic latencies” [48, 57] of many months to years in carcinogen-treated rodents and of decades in accidentally exposed humans [48, 57-60].

Take, for example, (i) the solid cancers, which developed in human survivors only 20 years after the explosion of atomic bombs in Japan in 1945 [39]; (ii) the breast cancers, which developed only 15 years after treatments of tuberculosis with x-rays in the US in the 1950s [61]; and (iii) the lung cancers, which developed in workers of a mustard gas factory only 30 years after it was closed in Japan in 1945 [62]. The exponential increase of the spontaneous cancer risk of humans with age even implies neoplastic latencies of up to 50 years from a near zero-risk at birth to a 1 in 3-risk in the last 3 decades of a human lifespan of about 80 years (Fig. 1). Thus the initiated cell evolves only gradually to a visible cancer cell, much like a submarine volcano that eventually becomes a visible island.

Experimental or accidental carcinogenesis also demonstrates that, once initiated, the evolution of cancer cells is an autonomous, if slow, process that is independent of further exogenous influences (although it can be accelerated by further carcinogens) [39, 48, 57, 63, 64]. Accordingly the primary cancer cells that appear after the lengthy pre-neoplastic evolutions continue to progress independently within individual cancers to form evermore “polymorphic” [65] and malignant cancers with evermore exotic karyotypes and phenotypes [57]. See for example the karyotype of a human breast cancer cell compared to that of a normal cell shown in Fig. 2. Thus “initiation” confers on cells a lifelong variability that can generate new phenotypes and karyotypes many cell generations or decades after it was established.

By contrast, the evolution of new phenotypes many cell generations or decades after mutagenesis is incompatible with the immediate effects of conventional mutation [3, 33, 38, 66]. It is for this reason that Cairns wrote in *Cancer: science and society*, “The conspicuous feature of most forms of carcinogenesis is the long period that elapses between initial application of the carcinogen and the time the first cancers appear. Clearly, we cannot claim to know what turns a cell into a cancer cell until we understand why the time course of carcinogenesis is almost always so extraordinarily long.” [39].

## **2.4 Karyotypic-phenotypic variations of cancer cells at rates that are orders higher than conventional mutation**

During the neoplastic phase of carcinogenesis, cancer cells gain or lose chromosomes or segments of chromosomes and acquire new phenotypes at rates that far exceed those at which genotypes and phenotypes are changed by conventional mutation – including those of the normal cells of cancer patients. For example, highly aneuploid cancer cells become drug resistant at rates of up to  $10^{-3}$  per cell generation [67-71], or become metastatic at “high rates” [72, 73], or “lose heterozygosity” at rates of  $10^{-5}$  per generation [32]. As a result of this inherent chromosomal instability of cancer cells, most cancers are “enormously” heterogeneous populations of non-clonal and partially clonal, or sub-clonal cells [14, 74]. Thus individual cells of the same cancers differ from each other in “bewildering” phenotypic and chromosomal variations [75] – even though

most cancers are derived from a common, primary cancer cell and thus have clonal origins [39, 56, 57, 65, 67, 74, 76-81].

By contrast, the non-cancerous cells of cancer patients remain homogeneous, drug-sensitive and static, and retain their native zygosity. In general, the karyotypes of normal cells are stable even during normal, developmental phenotypic variations [33, 37, 66, 82]. And phenotypic variation of normal cells by conventional gene mutation is limited to  $10^{-7}$  per cell generation for dominant genes and to  $10^{-14}$  for pairs of recessive genes in all species [7, 59, 66, 68, 82, 83]. Even the gene mutation rates of most cancer cells are not higher than those of normal cells [7, 21, 22, 49, 51, 59, 79, 84-87].

Following others [7, 32, 83], we have used here an average mutation rate of  $10^{-7}$  per human/mammalian genetic locus per cell generation. These averages reflect mutation rates that range between  $10^{-5}$  and  $10^{-9}$  [88] and  $10^{-5}$  to  $10^{-7}$  [82] depending on the respective human phenotypes. Lower rates of phenotype variation of  $10^{-8}$  to  $10^{-10}$  are observed in bacteria and yeast [38, 66]. The higher mutation rates in humans/mammals probably reflect (a) the higher genetic complexity of the respective loci compared to those of bacteria and yeast, and (b) the fact that “the rates in humans are calculated per gamete and several cell divisions are required to produce a gamete” [38]. Take for example the numerous mutant genes and clotting factors that can cause hemophilia [82]. Indeed, the mutation rates per unit x-irradiated genetic DNA are the same in all species [89].

In sum, phenotypic variation in cancer cells can be 4 to 11 orders faster than conventional mutation.

## 2.5 Cancer-specific aneuploidies

Despite the karyotypic instability and heterogeneity of cancer cells, partially specific or “nonrandom” aneuploidies have been found in cancers since in the late 1960s [74, 75, 90-102]. The majority of these nonrandom aneuploidies have been detected in cancers since the 1990s by the use of comparative genomic hybridization, rather than by identifying specific aneusomies cytogenetically [74, 103-112]. The term aneusomy is used for a specific, aneuploid chromosome. Specific aneuploidies have even been linked with specific stages of carcinogenesis and with specific phenotypes of cancers such as: (i) Distinct stages of neoplastic transformation in human [75, 105, 111-117] and in animal carcinogenesis [98], (ii) invasiveness [113, 114, 118], (iii) metastasis [119-124], (iv) drug-resistance [71, 83, 125], (v) transplantability to foreign hosts [126], (vi) distinct cellular morphologies [127], (vii) abnormal metabolism [75, 128] and (viii) cancer-specific receptors for viruses [75, 127].

Cancer-specific or “nonrandom” aneuploidies, however, are inconsistent with the conventional mutational theories of cancer. In fact they are a direct challenge of the mutation theory, because specific aneusomies have the potential to generate cancer-specific functions. The Down syndrome-specific functions of trisomy 21 are a confirmed model [129-132].

## **2.6 Cancers have much more complex phenotypes than conventional mutations**

The complexity of most cancer-specific phenotypes far exceeds that of phenotypes generated by conventional mutation. For example, the gross polymorphisms in size and shape of individual cells within individual cancers must be polygenic [57, 63, 65]. Moreover, the kind of drug-resistance that is acquired by most cancer cells exposed to a single cytotoxic drug is much more complex than just resistance against the drug used to induce it. It protects not only against the toxicity of the challenging drug, but also against many other chemically unrelated drugs. Therefore, this phenotype has been termed “multidrug resistance” [67, 70, 133]. Thus drug resistance must also be polygenic. The same is likely for other cancer-specific phenotypes such as grossly altered metabolism, invasiveness, metastasis and immortality [48, 57], because all of these phenotypes correlate with altered expressions of thousands of genes [37, 102, 134-136] and with highly abnormal concentrations of thousands of normal proteins [18, 48, 65, 137]. Moreover, in highly aneuploid cancer cells the number of centrosomes is increased up to five-fold (from a normal of 2 to around 10); at the same time their structures are often altered [138-141].

The complexities of most cancer-specific phenotypes, however, could not be achieved by accumulations of the necessarily huge numbers of conventional gene mutations that would have to be generated at conventional rates during the limited live spans of humans and animals (see sect. 2.4 and Box 1). For example, it is virtually impossible that the up to five-fold increased numbers of centrosomes, which are observed in highly aneuploid cancer cells [19, 138, 139, 142], would be the result of mutations that increase the numbers of the 350 different proteins that make up centrosomes [143].

## **2.7 Non-selective phenotypes that do not help cancer cells to compete with other cells for growth**

Cancer-specific phenotypes can be divided into two classes: Those, which are selective, because they advance carcinogenesis by conferring growth advantages to cancer cells such as invasiveness, grossly altered metabolism and high adaptability via high genomic variability [48, 57], and those, which are not selective for growth [49, 144]. The non-selective phenotypes of cancer cells include metastasis, multidrug resistance and “immortality”. Metastasis is the ability to grow at a site away from the primary tumor. Therefore, it is not selective at the site of its origin [144]. Likewise, multidrug-resistance is not a selective advantage for natural carcinogenesis in the absence of chemotherapy. Yet, a high percentage of cancers is *a priori* or “intrinsically” multidrug-resistant [145, 146]. Moreover, acquired multidrug resistance protects against many drugs that the cancer was previously never exposed to [69, 70, 133]. Even “immortality” is not a selective advantage for carcinogenesis, because many types of human cells can grow over 50 generations according to the Hayflick limit [147], and thus many more generations than are necessary to generate a lethal cancer. Consider, that fifty cell

generations produce from one single cell a cellular mass equivalent of 10 humans with  $10^{14}$  cells each [11].

Non-selective phenotypes, however, are entirely inconsistent with conventional gene mutation-selection mechanisms.

## 2.8 No cancer-causing genes in cancer

Numerous gene mutations have been found in cancer cells since the 1980s [2, 31, 41, 43, 44, 148, 149], which are postulated to cause cancer by the prevailing genetic theories [31, 32, 36, 37, 41] (sect. 1).

But none of the mutations found in cancers are cancer-specific [2, 150]. In cases where this information is available, many perhaps most mutations are non-clonal [9, 150, 151] and are not detectably expressed in human cancer cells [9, 134, 152, 153]. Above all, no mutant gene and no combination of mutant genes from cancer cells has been found that converts diploid human or animal cells into cancer cells, despite enormous efforts in the last 25 years [5, 6, 13, 14, 26, 49, 154] (J. Michael Bishop, Berkeley, September 16, 2005 at his seminar, “Mouse models of human cancer”). Moreover, mouse strains with artificially implanted, hypothetical cancer genes, or with artificially deleted tumor suppressor genes have survived many generations in laboratories with either the same or slightly higher cancer-risks than other lab mice [9, 26, 49] (see, Achilles heels of the mutation-cancer theory, Box 1).

In view of this, Vogelstein and Kinzler closed a very influential review of the mutation theory in 1993 as follows, “The genetics of cancer forces us to re-examine our simple notions of causality, such as those embodied in Koch’s postulates: how does one come to grips with words like ‘necessary’ and ‘sufficient’ when more than one mutation is required to produce a phenotype and when that phenotype can be produced by different mutant genes in various combinations?” [2].

These and other inconsistencies between carcinogenesis and established genetic theories are the reasons why it is still debated, whether mutations or aneuploidies or epigenetic alterations cause cancer [2, 4-9, 11-15, 17-24, 26-28, 34, 41].

## 3. A new, chromosomal theory of cancer

In an effort to resolve the many discrepancies between carcinogenesis and conventional genetic theories listed above, we present here a new, chromosomal theory of cancer. The following data have been either generated by us recently or collected from the literature to test and validate this theory:

- 1) *Exact correlations between aneuploidy and cancer.* Exact correlations between aneuploidy and cancer have been reported since 1890 [74, 75, 78, 92,

- 155, 156]. These correlations are, however, not even mentioned in the cancer chapters of the leading textbooks of biology [37, 66, 157].
- 2) *Both mutagenic and non-mutagenic carcinogens induce aneuploidy.* Evidence that mutagenic and non-mutagenic carcinogens cause aneuploidy has been generated by us recently to test the chromosomal theory [98, 158]. For the same reason we have summarized data from others, who have, however, not succeeded to establish chromosomal theories of cancer [11, 49, 53]. Likewise, we have summarized independent studies, which have searched for genetic targets of carcinogens, but have unexpectedly obtained targets over >1000x larger than a gene, and thus equivalent to the size of chromosomes [49].
  - 3) *Our findings that chromosomes and phenotypes of cancer cells vary at rates that are proportional to the degrees of aneuploidy* [69, 71, 153, 159, 160]. Several labs have recently also found that chromosomal variability of cancer cells is proportional to the degree of aneuploidy [81, 161-163]. Moreover, we have found that the rates of these chromosomal variations can go 4-7 orders higher than those of conventional gene mutations [49, 71, 160] (sect. 2.4).
  - 4) *An earlier chromosomal theory of cancer proposed by Boveri and von Hansemann over 100 years ago* [155, 164, 165]. This theory, however, was abandoned in the 1950s and 1960s in favor of gene mutation, because karyotypic heterogeneity was found in most cancers by the methods developed at that time instead of the expected cancer-specific aneuploidy [75, 166, 167] (apparently prematurely, see next). Ever since, “aneuploidy and other forms of chromosomal abnormality” of cancer cells [67] are generally interpreted as “secondary” events [26, 67, 74, 75, 168] – secondary to hypothetical primary mutations [16, 26, 28, 35, 77, 87, 169-174].
  - 5) *Cancer-specific aneuploidies discovered since the late 1960s.* Many labs including ours [98] have found cancer-specific or “nonrandom” aneuploidies in cancers (see sect. 2.5). But the potential relevance of these discoveries is not generally appreciated, because of the currently prevailing, genetic theories of cancer.

In an effort to integrate these data into a coherent theory, which would also explain the above-listed discrepancies between carcinogenesis and conventional genetic cancer theories, we arrived at a new chromosomal theory of carcinogenesis. According to this theory, summarized in Fig. 3, carcinogenesis is the result of the following chain of events:

- Carcinogens and spontaneous mitotic errors induce unspecific aneuploidies.
- Aneuploidy corrupts teams of proteins that segregate, synthesize and repair chromosomes. Aneuploidy is thus a steady source of karyotypic-phenotypic variations from which, in classical Darwinian terms, selection of specific aneuploidies encourages the evolution and spontaneous progressions of neoplastic cells. These chromosomal evolutions converge at biologically maximal en-

tropies of  $\sim 3n$ . The rates of these variations are proportional to the degrees of aneuploidy.

- According to the chromosomal mechanism cancer cells are new, inherently unstable cell “species” with specific aneuploidies, but unstable karyotypes, rather than mutants of chromosomally normal cells. Owing to this inherent chromosomal instability, cancers are uncertain combinations of relatively specific or “nonrandom” and of random aneuploidies. This aneuploidy-based, chromosomal uncertainty principle had become the nemesis of the Boveri-von Hansemann theory in the 1950s and 1960s.
- The cancer-specific aneuploidies generate complex, malignant phenotypes via abnormal dosages of thousands of genes. Down syndrome is a model for how aneuploidy generates complex, abnormal phenotypes.

Below, we offer a brief explanation of how aneuploidy generates new phenotypes, independent of mutation. According to this mechanism variations of the balance of chromosomes or segments of chromosomes (see Fig. 2), and thus of the stoichiometry of thousands of genes, have the same effects on the phenotypes of cells as variations of the assembly lines of a car factory on the phenotypes of an automobile. If balanced changes are made, new, competitive car models are generated. Indeed, motor companies change their assembly lines to create a new car model. Likewise phylogenesis generates new species by changing the numbers and structures of the chromosomes of existing species [175].

If unbalanced, i.e. aneuploid, changes are made, abnormal and defective products must be expected. The human trisomy 21, which causes Down syndrome, is a classic non-neoplastic example [131, 132]. Although trisomy 21 is only a tiny aneuploidy compared to that of most cancers [78] (see Fig. 2), it generates 71(!) new, Down-specific phenotypes [129, 130]. Likewise, experimentally induced, congenital aneuploidies generate numerous abnormal phenotypes in drosophila, plants and mice, independent of gene mutation [176-178]. Indeed, according to Vogelstein there is no “normal [animal] cell with an abnormal karyotype” [7]. Thus the complex aneuploidies of cancer cells can be expected to generate numerous new phenotypes.

By contrast, the power of changing the phenotypes of the cell by gene mutation is comparable to employing a few defective or overactive workers on the assembly lines of a car factory. Neither of these variables will generate a new car model, except possibly to produce either a defective car or no car at all, if an assembly line comes to a stop [53]. For example, none of the 1.42 million gene mutations that distinguish any two humans [179] have generated a new human species, nor have they even been sufficient to cause cancer in newborns.

Instead of being controlled by hypothetical oncogenes or tumor suppressor genes, alias “gate keepers and caretakers” [87, 180], or being de-controlled by the corresponding mutations, most phenotypes of normal and cancer cells are controlled “democratically” by hundreds of kinetically linked proteins [181]. Such cooperative assembly lines of gene products are buffered against mutations of single genes by the assembly line principle [181, 182]. According to this principle, unchanging supplies and demands of

numerous un-mutated genes from upstream and downstream of biochemical assembly lines buffer mutations in two ways. They automatically raise substrate concentrations upstream of slow-working, mutationally compromised genes and restrict substrates to mutationally activated genes [181-183]. This is indeed the principle that buffers cells of all multi-cellular organisms against all but the null- or knock out-mutations that occur during their long lifetimes.

The following analogy illuminates the differences between mutation and aneuploidy from a slightly different perspective: Consider the cell as a book, the genes as words, and the chromosomes as sentences, paragraphs or chapters. Then most of us would be able to read Hamlet despite hundreds of typos, but the idea of Hamlet would be lost very fast if sentences, paragraphs and chapters were rearranged, lost and duplicated.

Thus aneuploidization, upsetting the stoichiometry of thousands of normal gene products, rather than mutation of a few genes, is necessary to generate the complex and dominant phenotypes of cancer cells.

In sum, the chromosomal evolution theory provides a coherent explanation of carcinogenesis that is independent of mutation. In the following we show that the chromosomal theory can explain each of the many idiosyncratic features of carcinogenesis that are paradoxical in view of the mutation theory.

## **4. Proof of principle: The explanatory value of the chromosomal theory of cancer**

The acid test of any theory is its ability to predict and explain a scientific problem. In the following we apply this test to the chromosomal theory of cancer. Table 1 briefly summarizes, how the chromosomal theory explains each of the 8 idiosyncratic features of carcinogenesis that are paradoxical in terms of conventional genetic theories (sect. 2). Further commentary is offered on all items (numbered as in Table 1) that are not sufficiently explained by our theory and by the antecedent background information.

### **4.1 Cancer not heritable**

The chromosomal theory predicts no cancer in newborns (sect. 2.1), because aneuploidy is not heritable as originally shown by Boveri [164]. Aneuploidies are not heritable, because they corrupt embryonic developmental programs [131, 132], which is usually fatal [178, 184]. Only some very minor congenital aneuploidies, such as Down syndrome and syndromes based on abnormal numbers of sex chromosomes, are sometimes viable, but only at the cost of severe physiological abnormalities and of no or very low fertility [33, 64, 78, 82]. Thus ontogenesis is nature's checkpoint for normal karyotypes. The exponential increase of the cancer risk with age would then reflect the gradual accumulation of non- or preneoplastic aneuploidy with age, multiplied by

the relatively slow, non-selective replication of aneuploid, preneoplastic cells (see next, sect. 4.3).

## 4.2 Long neoplastic latencies

The chromosomal theory predicts that the non-neoplastic chromosomal evolutions during pre-carcinogenesis are slow, compared to neoplastic evolutions, because non-neoplastic aneuploidies are typically minor, i.e. are near-diploid, and have no growth advantages compared to normal cells (sect. 2.3 and Fig. 3). Therefore, non-neoplastic cells would not form large clonal populations that would increase the probability of further evolutions. The non-clonality of the non-neoplastic aneuploidies also hides any abnormal phenotypes, because phenotypes of single cells are hard to recognize. By contrast, neoplastic “progression” of established cancer cells is predicted to be faster than evolutions during the preneoplastic phase for two reasons: (i) Neoplastic cells, through their selective phenotypes, will generate large “clonal” populations with high probabilities of further variations. (ii) The generally high degrees of most cancer-specific aneuploidies catalyze much higher rates of chromosomal variations than those of non-neoplastic cells (sect. 3, Fig. 3).

The chromosomal theory also predicts a certain endpoint of chromosomal evolutions in carcinogenesis (Fig. 3). This endpoint would be an equilibrium of aneuploidizations, which is reached once a cancer has maximized cellular variability and adaptability and “optimized its genome” [185] for essential metabolic functions [17, 49, 186, 187]. According to the chromosomal theory maximal chromosomal variability would correspond to near or above triploid chromosome numbers ( $> 3n$ ) [14, 49, 153]. Near triploid aneuploidy offers an optimal average redundancy of one spare for each normal chromosome pair, and thus sufficient redundancy to compensate for any losses or genetic mutations of a given chromosome [49]. Therefore, chromosomal evolutions would eventually converge at biologically maximal entropies of  $\sim 3n$ . Indeed, the karyotype of most malignant cancer cells is near  $3n$  [11, 49, 53, 75, 78, 168, 188, 189].

However, it is as yet unclear, why after initiating doses of carcinogens the neoplastic latencies are very species-dependent, namely much shorter in rodents than in humans [2, 58, 59, 190-192] (see also sect. 2.3). It is also unclear, why the age bias of cancer is proportional to the lifespan of an animal, i.e. grants cancer-free decades to humans (Fig. 1), but only about a year to rodents, [39, 59]. Likewise, we have recently observed that rodent cancer cells are chromosomally much more unstable than equally aneuploid human cancer cells [69-71, 160, 193]. At the same time the rates of conventional mutations are highly conserved in all species [66, 82], and the growth rates of human and rodent cells are about the same. It follows that spontaneous mutation and growth rates cannot explain the huge differences in the cellular cancer risks between humans and rodents. In view of this Holliday proposed that the genetic control of chromosomal stability in humans is at least two times more redundant than in rodents [59].

### **4.3 “Immortality” via high rates of karyotypic-phenotypic variations**

The chromosomal theory explains the “immortality” of cancer cells as the collective phenotype of inevitably heterogeneous cancer cell-populations. Owing to the inherent instability of aneuploidy, populations of cancer cells are indeed “polyphyletic” [128] zoos of chromosomally distinct species (species are defined by karyotypes, see sect. 3). Thus, populations of cancer cells are immortal, because they typically include subspecies that can survive conditions that are lethal to the majority of the cells of a cancer, as for example cytotoxic drugs. An early description of the process of “immortalization” by the cytogeneticist Koller fits this mechanism exactly, “It seems that malignant growth is composed of competing clones of cells with different and continuously changing genotypes, conferring the tumor with an adaptable plasticity against the environment. The bewildering karyotypic patterns reveal the multi-potentiality of the neoplastic cell; while normal cells and tissues age and die, through their inherent variability, tumor cells proliferate and survive.” [75].

### **4.4 Cancer-specific aneuploidies**

The presence of specific or “nonrandom” aneuploidies in cancer is correlative proof for the chromosomal theory in terms of Koch’s first postulate (compare sect. 2.5). Functional proof that cancer-specific aneuploidy generates malignancy in terms of Koch’s third postulate could be derived from evidence that the degree of malignancy is proportional to the degree of aneuploidy. Indeed, numerous correlations have confirmed the principle that the degree of malignancy of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy since 1930 [11, 49, 57, 75-77, 81, 95, 99, 101, 113, 116, 117, 194-202].

Moreover, studies listed in section 4.3 have shown that maximal malignancy coincides indeed with maximally stable, near-triploid or hyper-triploid aneuploidy [78, 188, 189, 203, 204]. Thus the evolution of malignancy can be seen as a consequence of the autonomous chromosomal evolutions that reach biologically maximal entropy at a near 3n-aneuploidy [17, 81] (see sect. 3, Fig. 3). The parallel evolutions of aneuploidy and malignancy in cancer cells are then functional proof for the chromosomal evolution theory of cancer in terms of Koch’s third postulate.

### **4.5 Complex phenotypes**

Conventional genetic theories cannot explain the generation of the polygenic phenotypes of cancer – such as polymorphisms in size and shape, multidrug resistance, metastasis to non-native sites, and transplantability to heterologous species [126] (sect. 2.6) – based on conventional rates of mutation and selection in the lifespan of a human or animal. By contrast, the chromosomal theory of cancer explains the complexity of cancer-specific phenotypes by the complexity of the genetic units that are varied, namely chromosomes with thousands of genes. Accordingly, the complex phenotypes of cancer cells have recently been shown to correlate with over-and under-expressions of thousands of genes [37, 102, 134-136, 152]. This in turn confirms the long-known

over- and under-productions of thousands of normal proteins by cancer cells [18, 48, 65, 137]. Likewise it explains, why the overproductions of centrosomes by cancer cells are also proportional to the degrees of aneuploidy [139, 141].

#### 4.6 Non-selective phenotypes

Conventional genetic theories explain the evolution of cancer cells by cancer-specific mutations and Darwinian selections. But this mechanism cannot explain the non-selective phenotypes of cancer cells, such as metastasis, multidrug resistance and “immortality”. By contrast, the chromosomal theory of carcinogenesis attributes non-selective phenotypes such as metastasis and intrinsic multidrug-resistance to non-selective genes hitchhiking with selective, cancer-causing aneusomies, because they are all located on the same chromosomes. The same would be true for those resistances of acquired multidrug-resistance that are not directed against drugs to which the respective cancer was never exposed. The non-selective phenotype “immortality” has been explained above (sect. 4.4).

#### 4.7 Is carcinogenesis dependent on mutation?

Cancer coincides with aneuploidy as well as with mutations [7, 8, 11, 14, 26]. In the words of a recent review in *Science*, “Cancer cells are chock-full of mutations and chromosomal abnormalities” [7].

Therefore, it can be argued that

1. Chromosomal variations are sufficient for carcinogenesis, as we have proposed here.
2. Cancers are caused by mutations only, as the prevailing genetic theories propose (sect. 1). But this argument must await functional proof for as yet hypothetical, cellular cancer genes (sect. 2.8, Box 1) and confirmed evidence for diploid cancers, which are not available now [11, 49, 53].
3. The initial aneuploidization and its subsequent preneoplastic and neoplastic evolution (sect. 3) depend on somatic mutations, as others have proposed recently [14, 15, 28, 171-174, 189].

In view of the challenge that aneuploidization depends on mutation, we adduce here 4 arguments, which indicate that carcinogenesis (of normal cells in normal organisms) is independent of somatic mutation. In fact we propose that cancer cells, via their specific aneuploidy, are even protected against the negative effects of mutation.

4.7.1 *Initiation of carcinogenesis by direct aneuploidization much more probable than by mutation.* Initiation of carcinogenesis by aneuploidy generated with DNA damaging, mutagenic carcinogens that fragment or eliminate chromosomes, is about 35,000 times more likely than by generating “aneuploidy-” [7] or “chromosomal instability genes” via mutations [28]. This is because mammals contain about 35,000 genes, and thus only

1 in 35,000 specific mutations would generate a chromosomal instability gene [27, 175, 205]. By contrast, a genotoxic carcinogen can cause aneuploidy by breakage, rearrangement or loss of the DNA of any one chromosome [27]. Moreover, non-mutagenic carcinogens cannot even generate cancer-initiating aneuploidy, because they are not “genotoxic”. Yet non-mutagenic carcinogens include some of the most efficient carcinogens known, e.g., polycyclic hydrocarbons that cause aneuploidy by corrupting the spindle apparatus (sect. 3). Thus initiation of carcinogenesis is independent of somatic mutation.

*4.7.2 Generation of the complex phenotypes of cancer by chromosomal variation much more probable than by mutation.* Generating the complex phenotypes of cancer by chromosomal variation is about 1500-times more efficient than by mutation. This follows, because mammals including us, contain about 35,000 genes and thus about 1,500 per average chromosome in humans (35,000/23)[175, 205]. Indeed, it would be almost impossible to generate the complex, polygenic phenotypes of cancer cells in a lifetime of a cancer patient by mutating the many genes that make up the complexity of cancer-specific phenotypes at the low rates of spontaneous mutation in normal and most cancer cells (see 2.6 and Achilles heels of the mutation-cancer theory, Box 1). By contrast, chromosomal variation is a mechanism that automatically alters the dosages and expressions of thousands of genes. Therefore, aneuploidization is infinitely more efficient in generating the complex phenotypes of cancer cells than mutation. Thus carcinogenesis does not depend on somatic mutation in generating complex, cancer-specific phenotypes.

*4.7.3 High rates of karyotypic-phenotypic variations of cancer cells are incompatible with the low rates of conventional mutation.* New, cancer-specific phenotypes appear or old ones disappear in highly aneuploid cancer cells at rates of up to  $10^{-3}$  per cell generation, which is 4 to 11 orders faster than conventional gene mutation (sect. 2.4). Thus phenotype variation in cancer cells is independent of mutation.

*4.7.4 Relevance of somatic mutations for carcinogenesis is uncertain.* Cancer-specific aneuploidy can generate gene mutations by the same mechanism that varies the structures of chromosomes (sect. 3). In addition aneuploidy renders DNA synthesis error-prone by unbalancing nucleotide pools [206]. Thus, the simplest explanation of the many mutations of cancer cells would be that these mutations are consequences of aneuploidy and thus not necessary for carcinogenesis. This hypothesis explains, why the mutations found in cancer cells are frequently non-clonal in cancers [9, 151, 207], and why they do not transform normal cells to cancer cells and do not breach the livelihood of transgenic mice (sect. 2.8 and Achilles heels of the mutation-cancer theory, Box 1). Indeed cancer cells are “immortal”, because frequent, aneuploidy-catalyzed karyotypic variations allow adaptations to adverse conditions and neutralize all potentially negative mutations at much higher rates than they can be generated (sect. 4.4).

We conclude that carcinogenesis is independent of somatic mutation, because aneuploidy is much more likely to be generated and varied at the chromosomal level than by mutation. In response to this conclusion, it may be argued that cancers associated with heritable cancer-disposition syndromes prove that carcinogenesis is dependent on

mutation. However, we show below that even these heritable mutations lead to cancers only via aneuploidy.

**4.7.5 Heritable cancer-disposition syndromes generate random aneuploidies at high rates.** The classical retinoblastoma-, xeroderma-, Bloom-, and mosaic variegated aneuploidy syndromes are examples of heritable cancer-disposition genes that lead to cancers via aneuploidy [34, 35, 37, 208-210]. Instead of causing cancers directly these heritable (rather than somatic) mutations cause polyclonal aneuploidies at much higher rates than aneuploidy would occur in normal cells by spontaneous or by carcinogen-induced aneuploidization [34, 209-211].

According to the chromosomal theory these heritable mutations are genetic equivalents of carcinogens that induce random aneuploidy at high rates. This view is supported by the presence of aneuploidy in such patients prior to carcinogenesis, as for example in mosaic variegated aneuploidy patients [210, 212], retinoblastoma and other chromosomal eye syndromes [213-215], Bloom patients [211] and xeroderma patients [34, 216, 217]. Moreover, the chromosomal theory predicts that the cancers of patients with aneuploidy syndromes are aneuploid, as has been confirmed for cancers associated with retinoblastoma [218-223], mosaic variegated aneuploidy [210, 212], xeroderma [216, 224] and Bloom syndrome [211]. We conclude that the abnormally high rates of carcinogenesis in heritable cancer disposition syndromes are dependent on the abnormally high rates of aneuploidizations that are generated by these heritable genes. Thus heritable aneuploidy syndromes confirm and extend the chromosomal theory of carcinogenesis. Even the high individual, but the extremely low cellular cancer risk of classical cancer-disposition syndromes (even “heritable cancers” are clonal) is explained by the dependence of carcinogenesis on specific aneuploidizations.

## Conclusions

We conclude that the new chromosomal cancer theory provides a coherent explanation of carcinogenesis and can resolve all features of carcinogenesis that are paradoxical in terms of the competing genetic theories of cancer. Thus cancer is a chromosomal rather than a genetic disease. The chromosomal theory stands out for making new, clinically testable predictions, as for example the prediction that cancer could be detected prior to malignancy via preneoplastic aneuploidy [24, 225]. The exact predictions of the cancer risks based on photcytometric evidence for aneuploidy and the corresponding therapeutic results reported at this symposium by Alfred Boecking (University of Duesseldorf, Germany) and Bernhard Tribukait (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden) are proof of principle. Moreover, chemotherapy could be based on the presence or absence of resistance-specific aneusomies. If confirmed, the chromosomal theory could greatly improve cancer research and therapy.

## Acknowledgments

We thank Walter Samsel (University of Bremen) and Alfred Boecking (Heinrich Heine University of Duesseldorf) for the invitation to and hospitality at the symposium. Further, we thank Tom Bethell (Washington, DC), Harvey Bialy (Institute of Biotechnology, Autonomous National University of Mexico, Cuernavaca, Mexico), Alecia DuCharme (UC Berkeley), Siggi Duesberg, George Miklos (Secure Genetics Pty Limited, Sydney, Australia), and Rainer K. Sachs (Departments of Mathematics and of Physics, UC Berkeley) for critical and constructive reviews of the manuscript. R.S. is particularly acknowledged for the preparation of Fig. 1. We also thank David Rasnick (Pretoria, South Africa) and Thomas Ried (National Cancer Institute, Bethesda MD) for valuable information and advise. We are especially grateful to Robert Leppo (philanthropist, San Francisco) for support and for the fluorescence microscope used for karyotyping of human cancer cells, and the Abraham J. and Phyllis Katz Foundation (New York), an American foundation that prefers to be anonymous, other private sources, and the Forschungsfonds der Fakultaet fuer Klinische Medizin Mannheim for steady support. This presentation is based on a manuscript that has been invited by and was recently submitted to *Cellular Oncology*.

## Tables and figures

Genetic paradox	Chromosomal solution
1 Cancer not heritable	Aneuploidy is not heritable
2 Non-mutagenic carcinogens	Carcinogens function as aneuploidogens
3 Long neoplastic latencies	Autocatalyzed evolution of cancer-specific aneusomies
4 High rates of karyotypic-phenotypic variations and the origin of “immortality”	Aneuploidy catalyzes karyotypic-phenotypic variations, including resistance to otherwise lethal conditions, at high rates
5 Cancer-specific aneuploidies	Cancer-specific aneuploidies generate cancer phenotypes
6 Complex phenotypes	Cancer-specific aneuploidies alter dosages and functions of thousands of genes
7 Non-selective phenotypes	Non-selective genes hitchhiking with selective, cancer-specific aneusomies
8 Is carcinogenesis dependent on mutation?	Carcinogenesis depends on aneuploidization that is achieved much more effectively by direct chromosomal alteration than by mutation, even in heritable cancer syndromes

Table 1: Features of carcinogenesis, which are paradoxical according to genetic theories but consistent with the chromosomal theory of cancer

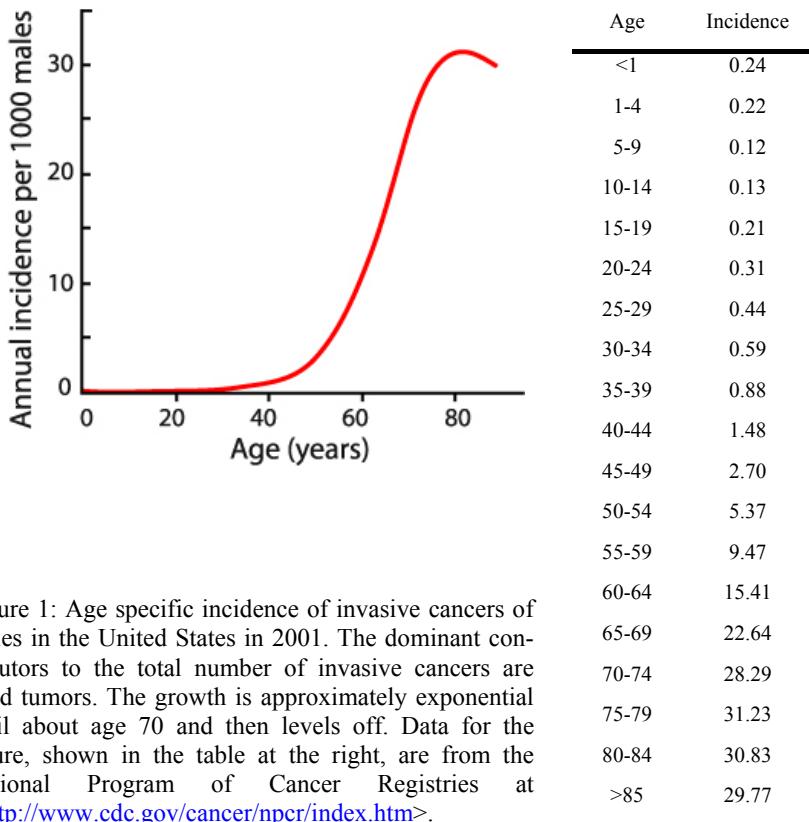
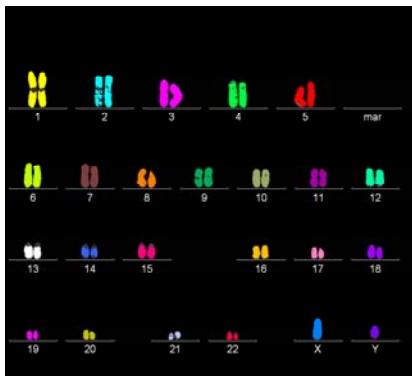


Figure 1: Age specific incidence of invasive cancers of males in the United States in 2001. The dominant contributors to the total number of invasive cancers are solid tumors. The growth is approximately exponential until about age 70 and then levels off. Data for the figure, shown in the table at the right, are from the National Program of Cancer Registries at <<http://www.cdc.gov/cancer/npcr/index.htm>>.

Karyotype of a normal, male  
human cell



Karyotype of a human breast  
cancer cell line, MDA 231

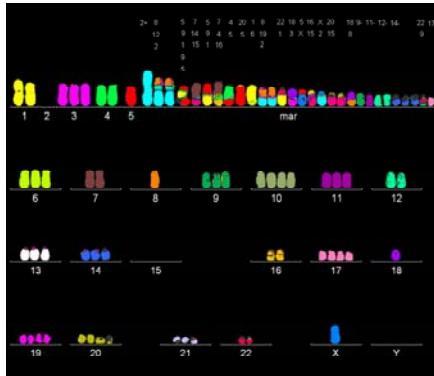


Figure 2: Metaphase chromosomes of a normal human cell and of a human breast cancer cell line, MDA 231. The normal human cell is a culture of foreskin cells obtained from Promo Cell (Heidelberg, Germany) and we have described the human breast cancer cell line, MDA 231, recently [71]. The metaphases were prepared and hybridized *in situ* with color-coded, chromosome-specific DNA probes from MetaSystems, Inc. (Boston, MA) following published procedures [71]. The numbers identify normal chromosomes. The group labeled “mar” (for marker chromosome) shows structurally abnormal chromosomes, which are either rearranged intra-chromosomally or inter-chromosomally to form various hybrid chromosomes. Such chromosomes are collectively called “marker chromosomes”, because they can be used as cytogenetic definitions of a cancer. The numbers above these marker chromosomes identify the chromosomal origins of hybrid chromosomes in their relative order or signal intra-chromosomal alterations. A comparison of the two karyotypes shows that the cancer cells differ from the normal cell in numerous numerical and structural chromosomal alterations or aneusomies.

## Carcinogenesis via Chromosomal Evolutions

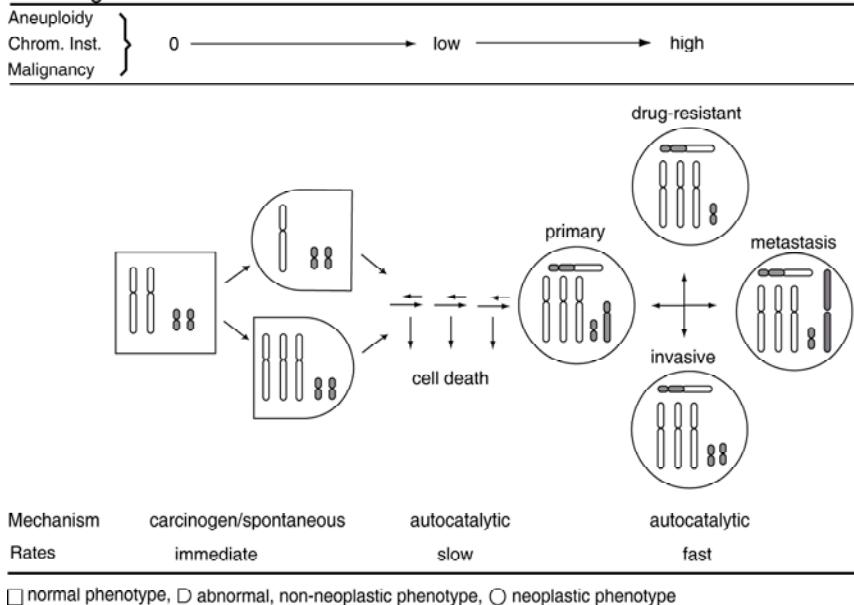


Figure 3: Carcinogenesis via chromosomal evolutions. According to this mechanism carcinogenesis is initiated by unspecific aneuploidies induced either by carcinogens or spontaneously. Aneuploidy then alters the karyotype automatically at rates that are proportional to the degree of aneuploidy, because it corrupts teams of proteins that segregate, synthesize and repair chromosomes. Aneuploidy is thus a steady source of chromosomal variations from which, in classical Darwinian terms, selection would encourage the evolution and subsequent progressions of neoplastic cell “species” with cancer-specific aneusomies. This evolution would be slow in the preneoplastic phase, because preneoplastic cells have no growth advantages over normal cells and because the degree of preneoplastic aneuploidy is typically low. By comparison the rate of karyotype variations of most cancer cells would be fast, because cancer cells form large cell populations by outgrowing normal cells and because the degrees of cancer-specific aneuploidy are typically high. Any kind of cancer could have as many specific aneusomies as there are chromosomes involved in the differentiation of its precursor cell in addition to random aneusomies. Thus cancer-specific phenotypes, such as invasiveness, metastasis and drug-resistance, are generated by the abnormal dosages of thousands of normal genes. Since aneuploidy is inherently unstable, cancer-specific phenotypes, such as drug-resistance, can be reversible or convertible to other phenotypes at the same rates at which they are generated. The chromosomal theory predicts the heterogeneous phenotypes and karyotypes of cancer cells as consequences of inde-

pendent evolutions of the inherently unstable cells of cancers. Since aneuploidy causes dedifferentiation, the model further predicts that the degrees of malignancy of cancer cells are proportional to the degrees of aneuploidy.

## Literature:

### References

- [1] Iversen OH: Theories of carcinogenesis. Washington, Hemisphere Publishing Corporation/Harper & Row Publishers, Inc., 1988.
- [2] Vogelstein B, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993;9:138-141.
- [3] Fujimura J: Crafting science; a sociohistory of the quest for the genetics of cancer. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1996.
- [4] Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* (London) 1999;400:464-468.
- [5] Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D, Duesberg P: Aneuploidy versus gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation, but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3236-3241.
- [6] Li R, Rasnick D, Duesberg P: Correspondence re: D. Zimonjic et al., Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *Cancer Res.*, 61: 8838-8844, 2001. *Cancer Res* 2002;62:6345-6348; discussion 6348-6349.
- [7] Marx J: Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 2002;297:544-546.
- [8] Gibbs WW: Untangling the roots of cancer. *Sci Am* 2003;289:56-65.
- [9] Duesberg PH: Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy? *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143:89-91.
- [10] Thilly WG: Have environmental mutagens caused oncomutations in people? *Nat Genet* 2003;34:255-259.
- [11] Duesberg P, Li R: Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2003;2:202-210.
- [12] Steinberg D: Appraising aneuploidy as a cancer cause. *The Scientist* 2004;18:26-27.
- [13] Radford IR: Chromosomal rearrangement as the basis for human tumorigenesis. *Int J Radiat Biol* 2004;80:543-557.
- [14] Schneider BL, Kulesz-Martin M: Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004;25:2033-2044.
- [15] Pihan G, Doxsey SJ: Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* 2003;4:89-94.
- [16] Zimonjic D, Brooks MW, Popescu N, Weinberg RA, Hahn WC: Correspondence re: D. Zimonjic et al., Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *Cancer Res* 2002;62:6348-6349.
- [17] Stock RP, Bialy H: The sigmoidal curve of cancer. *Nat Biotechnol* 2003;21:13-14.
- [18] Miklos GLG: The human cancer genome project – one more misstep in the war on cancer. *Nature Biotechnology* 2005;23:535-537.
- [19] Brinkley BR, Goepfert TM: Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998;41:281-288.
- [20] Dey P: Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol* 2004;57:1245-1249.
- [21] Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF: The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14800-14803.

- [22] Sieber OM, Heinemann K, Tomlinson IP: Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 2003;3:701-708.
- [23] Sen S: Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:82-88.
- [24] Duesberg P, Li R, Rasnick D: Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: highlights from a conference held in Oakland in January 2004. *Cell Cycle* 2004;3:823-828.
- [25] Soto AM, Sonnenschein C: The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays* 2004;26:1097-1107.
- [26] Harris H: A long view of fashions in cancer research. *Bioessays* 2005;27:833-838.
- [27] Duesberg P: Does aneuploidy or mutation start cancer? *Science* 2005;307:41.
- [28] Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA: Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 2005;15:484-493.
- [29] Varmus HT: Retroviruses and oncogenes, I – Nobel Lecture, Dec. 8, 1989. *Bioscience Reports* 1990;10:413-430.
- [30] Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin J-P, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al.: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993;260:810-812.
- [31] Bishop JM: Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes & Development* 1995;9:1300-1315.
- [32] Vogelstein B, Kinzler KW: Preface. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill, 1998. p. xv-xix.
- [33] Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM: An introduction to genetic analysis. 7 ed. New York, W H Freeman, 2000.
- [34] Vessey CJ, Norbury CJ, Hickson ID: Genetic disorders associated with cancer predisposition and genomic instability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000;63:189-221.
- [35] Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157-162.
- [36] Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-799.
- [37] Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J: *Molecular Cell Biology*. Fifth ed. New York and Basingstoke UK, W. H. Freeman & Co., 2004.
- [38] Pierce BA: Genetics, a conceptual approach. 2 ed. New York, W H Freeman & Co, 2005.
- [39] Cairns J: *Cancer: Science and Society*. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1978.
- [40] Renan MJ: How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
- [41] Hahn WC, Weinberg RA: Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:331-341.
- [42] Cairns J, Logan J: Step by step into carcinogenesis. *Nature* 1983;304:582-583.
- [43] Varmus HE: The Molecular Genetics of Cellular Oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984;18:533-612.
- [44] Bishop JM: The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235:305-311.
- [45] Nordling CO: A new theory on the cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 1953;7:68-72.
- [46] Armitage P, Doll R: The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954;8:1-12.
- [47] Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.
- [48] Pitot HC: *Fundamentals of Oncology*. Fourth ed. New York, Marcel Dekker, Inc., 2002.
- [49] Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R: Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* 2004;56:65-81.
- [50] Berenblum I, Shubik P: An experimental study of the initiating stage of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. *Br J Cancer* 1949;3:109-118.
- [51] Oshimura M, Barrett JC: Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen* 1986;8:129-159.

- [52] Lijinsky W: A view of the relation between carcinogenesis and mutagenesis. *Env Mol Mutagenesis* 1989;14:78-84.
- [53] Duesberg P, Rasnick D: Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;47:81-107.
- [54] Burdette WJ: The significance of mutation in relation to origin of tumors. *Cancer Res* 1955;15:201-226.
- [55] Zaridze DG, Arkadieva MA, Day NE, Duffy SW: Risk of leukaemia after chemotherapy in a case-control study in Moscow. *Br J Cancer* 1993;67:347-350.
- [56] Little JB: Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:397-404.
- [57] Foulds L: *Neoplastic Development*. London, New York, San Francisco, Academic Press, 1975.
- [58] Kuroki T, Huh NH: Why are human cells resistant to malignant cell transformation in vitro? *Jpn J Cancer Res* 1993;84:1091-1100.
- [59] Holliday R: Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. In: Lindhal T, Tooze J, editors. *Genetic instability in cancer*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab Press, 1996. p. 103-115.
- [60] Rhim JS, Dritschilo A: editors. *Neoplastic transformation in human cell culture: mechanisms of carcinogenesis*. Totowa, NJ, Humana Press, 1991.
- [61] Boice JD, Jr., Monson RR: Breast cancer in women after repeated fluoroscopic examinations of the chest. *J Natl Cancer Inst* 1977;59:823-832.
- [62] Doi M, Yukutake M, Tamura K, Watanabe K, Kondo K, Isobe T, Awaya T, Shigenobu T, Oda Y, Yamakido K, et al. A retrospective cohort study on respiratory tract cancers in the workers of the Japanese army poison-gas-factory operated from 1929 to 1945. In: 38th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; 2002 May 18-21; Orlando, FL; 2002. p. 439a, Abstract 1754.
- [63] Bauer KH: *Das Krebsproblem*. Berlin, Goettingen, Heidelberg, Springer, 1949.
- [64] Bauer KH: *Das Krebsproblem*. 2d ed. Berlin, Goettingen, Heidelberg, Springer Verlag, 1963.
- [65] Caspersson T: Chemical variability in tumor cell populations. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1964;20:1275-1279.
- [66] Lewin B: *Genes VI*. Oxford, Oxford University Press, 1997.
- [67] Harris H: *The cells of the body; a history of somatic cell genetics*. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Lab Press, 1995.
- [68] Iltis TD: Genomic instability and its role in neoplasia. In: Kastan MB, editor. *Genetic Instability and Tumorigenesis*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997. p. 37-46.
- [69] Duesberg P, Stindl R, Hehlmann R: Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14295-14300.
- [70] Duesberg P, Stindl R, Hehlmann R: Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: Chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11283-11288.
- [71] Li R, Hehlmann R, Sachs R, Duesberg P: Aneuploidy is the primary cause of the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2005:in press.
- [72] Harris JF, Chambers AF, Hill RP, Ling V: Metastatic variants are generated spontaneously at a high rate in mouse KHT tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5547-5551.
- [73] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983-3988.
- [74] Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetics*. Second ed. New York, Wiley-Liss, 1995.
- [75] Koller PC: *The Role of Chromosomes in Cancer Biology*. New York, Springer-Verlag, 1972.
- [76] Hauschka TS: The chromosomes in ontogeny and oncogeny. *Cancer Res* 1961;21:957-981.
- [77] Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28.

- [78] Sandberg AA: The chromosomes in human cancer and leukemia. Second ed. New York, Elsevier Science Publishing, 1990.
- [79] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-649.
- [80] Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G: Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002;360:683-689.
- [81] Castro MA, Onsten TT, de Almeida RM, Moreira JC: Profiling cytogenetic diversity with entropy-based karyotypic analysis. *J Theor Biol* 2005;234:487-495.
- [82] Vogel F, Motulsky AG: Human genetics: problems and approaches. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, Springer Verlag, 1986.
- [83] Tlsty TD: Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3132-3136.
- [84] Strauss BS: The origin of point mutations in human tumor cells. *Cancer Res* 1992;52:249-253.
- [85] Harris CC: Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspective for the 1990s. *Cancer Res* 1991;51:5023s-5044s.
- [86] Wang TL, Rago C, Silliman N, Ptak J, Markowitz S, Willson JK, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: Prevalence of somatic alterations in the colorectal cancer cell genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3076-3080.
- [87] Tomlinson I, Bodmer W: Selection, the mutation rate and cancer: insuring that the tale does not wag the dog. *Nature Medicine* 1999;5:11-12.
- [88] Jablonka E, Lamb MJ: Epigenetic inheritance and evolution. Oxford, Oxford University Press, 1995.
- [89] Abrahamson S, Bender MA, Conger AD, Wolff S: Uniformity of radiation-induced mutation rates among different species. *Nature* 1973;245:460-462.
- [90] Zang KD, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 1967;216:84-85.
- [91] Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;6:249-274.
- [92] Atkin NB, Baker MC: Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: evidence from marker chromosomes. *J Natl Cancer Inst* 1966;36:539-557.
- [93] Yamamoto T, Rabinowitz Z, Sachs L: Identification of the chromosomes that control malignancy. *Nat New Biol* 1973;243:247-250.
- [94] Oshimura M, Hesterberg TW, Barrett JC: An early, nonrandom karyotypic change in immortal Syrian hamster cell lines transformed by asbestos: trisomy of chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;22:225-237.
- [95] Balaban GB, Herlyn M, Clark WH, Jr., Nowell PC: Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;19:113-122.
- [96] Atkin NB: Chromosome 1 aberrations in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;21:279-285.
- [97] Atkin NB: Non-random chromosomal changes in human neoplasia. In: Sobti R, Obe G, editors. *Eukaryotic chromosomes: Structural and functional aspects*. New Dehli: Narosa Publishing House, 1991. p. 153-164.
- [98] Fabarius A, Willer A, Yerganian G, Hehlmann R, Duesberg P: Specific aneusomies in Chinese hamster cells at different stages of neoplastic transformation, initiated by nitroso-methylurea. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6778-6783.
- [99] Pejovic T, Heim S, Orndal C, Jin YS, Mandahl N, Willen H, Mitelman F: Simple numerical chromosome aberrations in well-differentiated malignant epithelial tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;49:95-101.
- [100] Pejovic T, Heim S, Mandahl N, Elmforss B, Floderus UM, Furyik S, Helm G, Willen H, Mitelman F: Trisomy 12 is a consistent chromosomal aberration in benign ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;2:48-52.

- [101] Johansson B, Bardi G, Pandis N, Gorunova L, Backman PL, Mandahl N, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Heim S, Mitelman F: Karyotypic pattern of pancreatic adenocarcinomas correlates with survival and tumour grade. *Int J Cancer* 1994;58:8-13.
- [102] Virtanen K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de La Chapelle A, Krahe R: Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1124-1129.
- [103] Heselmeyer K, Macville M, Schrock E, Blegen H, Hellstrom AC, Shah K, Auer G, Ried T: Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:233-240.
- [104] Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M: Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 1997;75:79-86.
- [105] Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G: Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:195-204.
- [106] Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H: Chromosomal Imbalances in Papillary Renal Cell Carcinoma: Genetic Differences between Histological Subtypes. *Am J Pathol* 1998;153:1467-1473.
- [107] Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G: Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998;153:1615-1621.
- [108] Nuppenen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T: Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 1998;153:141-148.
- [109] Weber RG, Scheer M, Born IA, Joos S, Cobbers JM, Hofele C, Reifenberger G, Zoller JE, Lichter P: Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1998;153:295-303.
- [110] Gebhart E, Liehr T: Patterns of genomic imbalances in human solid tumors. *Int J Oncol* 2000;16:383-399.
- [111] Dellas A, Torhorst J, Jiang F, Proffitt J, Schultheiss E, Holzgreve W, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H: Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1999;59:3475-3479.
- [112] Patel AS, Hawkins AL, Griffin CA: Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:62-67.
- [113] Wilkens L, Flemming P, Gebel M, Bleck J, Terkamp C, Wingen L, Kreipe H, Schlegelberger B: Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1309-1314.
- [114] Hoglund M, Sall T, Heim S, Mitelman F, Mandahl N, Fadl-Elmula I: Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:8241-8246.
- [115] Heselmeyer-Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Wang ZY, Auer G, Steinberg W, Ried T: Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol* 2005;166:1229-1238.
- [116] Katsura K, Sugihara H, Nakai S, Fujita S: Alteration of numerical chromosomal aberrations during progression of colorectal tumors revealed by a combined fluorescence in situ hybridization and DNA ploidy analysis of intratumoral heterogeneity. *Cancer Genet Cytohistochem* 1996;90:146-153.
- [117] Fujimaki E, Sasaki K, Nakano O, Chiba S, Tazawa H, Yamashiki H, Orii S, Sugai T: DNA ploidy heterogeneity in early and advanced gastric cancers. *Cytometry* 1996;26:131-136.

- [118] Meijer GA, Hermsen MA, Baak JP, van Diest PJ, Meuwissen SG, Belien JA, Hoovers JM, Joenje H, Snijders PJ, Walboomers JM: Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol* 1998;51:901-909.
- [119] Aragane H, Sakakura C, Nakanishi M, Yasuoka R, Fujita Y, Taniguchi H, Hagiwara A, Yamaguchi T, Abe T, Inazawa J, et al.: Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 2001;94:623-629.
- [120] Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, Yoshizawa H, Tsunoda A, Kusano M, Kurose A, Makita T, Sasaki K: Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy. *Cancer* 2001;91:721-726.
- [121] Al-Mulla F, Keith WN, Pickford IR, Going JJ, Birnie GD: Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:306-314.
- [122] Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Scutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, et al.: Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002;123:1109-1119.
- [123] Knosel T, Schluns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I: Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* 2004;6:23-28.
- [124] Petersen I, Petersen S: Towards a genetic-based classification of human lung cancer. *Anal Cell Pathol* 2001;22:111-121.
- [125] Schimke RT: Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Cancer Research* 1984;44:1735-1742.
- [126] Hauschka TS, Levan A: Inverse relationship between chromosome ploidy and host-specificity of sixteen transplantable tumors. *Exp Cell Res* 1953;4:457-467.
- [127] Vogt M: A study of the relationship between karyotype and phenotype in cloned lines of strain HeLa. *Genetics* 1959;44:1257-1270.
- [128] Hauschka T, Levan A: Cytologic and functional characterization of single cell clones isolated from the Krebs-2 and Ehrlich ascites tumors. *J Natl Cancer Inst* 1958;21:77-111.
- [129] Reeves RH: Recounting a genetic story. *Nature* 2000;405:283-284.
- [130] Mao R, Zielke CL, Zielke HR, Pevsner J: Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing Down syndrome brain. *Genomics* 2003;81:457-467.
- [131] Shapiro BL: Down syndrome - a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* 1983;14:241-269.
- [132] Epstein C: The consequences of chromosome imbalance: principles, mechanisms, and models. Cambridge, London, New York, Cambridge University Press, 1986.
- [133] Schoenlein PV: Molecular cytogenetics of multiple drug resistance. *Cytotechnology* 1993;12:63-89.
- [134] Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12963-12968.
- [135] Furge KA, Lucas KA, Takahashi M, Sugimura J, Kort EJ, Kanayama HO, Kagawa S, Hoekstra P, Curry J, Yang XJ, et al.: Robust classification of renal cell carcinoma based on gene expression data and predicted cytogenetic profiles. *Cancer Res* 2004;64:4117-4121.
- [136] Aggarwal A, Leong SH, Lee C, Kon OL, Tan P: Wavelet transformations of tumor expression profiles reveals a pervasive genome-wide imprinting of aneuploidy on the cancer transcriptome. *Cancer Res* 2005;65:186-194.
- [137] Caspersson T, Foley GE, Killander D, Lomakka G: Cytochemical differences between mammalian cell lines of normal and neoplastic origins: correlation with heterotransplantability in Syrian hamsters. *Exp Cell Res* 1963;32:553-565.

- [138] Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ: Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 1998;58:3974-3985.
- [139] Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL: Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1978-1983.
- [140] Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ: Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:1398-1404.
- [141] Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schrock E, Neumann T, Jauho A, Auer G, Ried T: Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:183-190.
- [142] Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL: Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2950-2955.
- [143] Doxsey S, Zimmerman W, Mikule K: Centrosome control of the cell cycle. *Trends in Cell Biology--Aneuploidy series*:in press.
- [144] Bernards R, Weinberg RA: A progression puzzle. *Nature* 2002;418:823.
- [145] Goldie JH: Drug resistance in cancer: a perspective. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20:63-68.
- [146] Doubre H, Cesari D, Mairovitz A, Benac C, Chantot-Bastaraud S, Dagnon K, Antoine M, Daniel C, Bernaudin JF, Fleury-Feith J: Multidrug resistance-associated protein (MRP1) is overexpressed in DNA aneuploid carcinomatous cells in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Cancer* 2005;113:568-574.
- [147] Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.
- [148] Bishop JM: Enemies within: genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 1981;23:5-6.
- [149] Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300:143-149.
- [150] Boland CR, Ricciardello L: How many mutations does it take to make a tumor? *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14675-14677.
- [151] Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW: ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5321-5325.
- [152] Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997;276:1268-1272.
- [153] Rasnick D, Duesberg P: How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochem J* 1999;340:621-630.
- [154] Akagi T, Sasai K, Hanafusa H: Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13567-13572.
- [155] Hansemann D: Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch Pathol Anat* 1890;119:299-326.
- [156] Atkin NB, Baker MC: Are human cancers ever diploid—or often trisomic? Conflicting evidence from direct preparations and cultures. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:58-60.
- [157] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing, Inc., 1994.
- [158] Duesberg P, Li R, Rasnick D, Rausch C, Willer A, Kraemer A, Yerganian G, Hehlmann R: Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119:83-93.
- [159] Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R: Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13692-13697.

- [160] Fabarius A, Hehlmann R, Duesberg PH: Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143:59-72.
- [161] Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, McTyre N, Bussey KJ, Lababidi S, Scudiero DA, Weinstein JN, Kirsch IR: Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res* 2003;63:8634-8647.
- [162] Kost-Alimova M, Fedorova L, Yang Y, Klein G, Imreh S: Microcell-mediated chromosome transfer provides evidence that polysomy promotes structural instability in tumor cell chromosomes through asynchronous replication and breakage within late-replicating regions. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:316-324.
- [163] Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egoscue J, Peinado MA, Miro R: Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J* 2005;19:828-830.
- [164] Boveri T: On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus. In: Willier BH, Oppenheimer JM, editors. *Foundations of Experimental Embryology*: Prentice Hall, 1902/1964. p. 74-97.
- [165] Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena, Germany, Gustav Fischer Verlag, 1914.
- [166] Darlington CD: Plasmogene theory and cancer genesis. In: *Genetics and Cancer; A collection of papers presented at the thirteenth annual symposium on fundamental cancer research*, 1959. Austin: University of Texas, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, 1959. p. 9-24.
- [167] Rous P: Surmise and fact on the nature of cancer. *Nature* 1959;183:1357-1361.
- [168] Johansson B, Mertens F, Mitelman F: Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities – balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155-163.
- [169] Levan A, Levan G, Mitelman F: Chromosomes and cancer. *Hereditas* 1977;86:15-30.
- [170] Pennisi E: Trigger for centrosome replication found. *Science* 1999;283:770-771.
- [171] Lengauer C, Wang Z: From spindle checkpoint to cancer. *Nat Genet* 2004;36:1144-1145.
- [172] Rajagopalan H, Lengauer C: Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004;432:338-341.
- [173] Hede K: Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:87-89.
- [174] Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004;428:77-81.
- [175] O'Brien S, Menotti-Raymond M, Murphy W, Nash W, Wirnberg J, Stanyon R, Copeland N, Jenkins N, Womack J, Marshall Graves J: The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 1999;286:458-481.
- [176] Lindsley DL, Sandler L, Baker BS, Carpenter ATC, Denell RE, Hall JC, Jacobs PA, Gabor Miklos GL, Davis BK, Gethmann RC, et al.: Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. *Genetics* 1972;71:157-184.
- [177] Matzke MA, Mittelsten-Scheid O, Matzke AJM: Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *BioEssays* 1999;21:761-767.
- [178] Hernandez D, Fisher EM: Mouse autosomal trisomy: two's company, three's a crowd. *Trends Genet* 1999;15:241-247.
- [179] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, et al.: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-933.
- [180] Kinzler KW, Vogelstein B: Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-762.
- [181] Kacser H, Burns JA: Molecular democracy: who shares the controls? *Biochemical Society Transactions* 1979;7:1149-1160.
- [182] Hartman JL, Garvik B, Hartwell L: Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 2001;291:1001-1004.

- [183] Cornish-Bowden A: Metabolic control analysis in biotechnology and medicine. *Nature Biotechnology* 1999;17:641-643.
- [184] Hassold TJ: Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genet* 1986;2:105-110.
- [185] Roschke AV, Stover K, Tonon G, Schaffer AA, Kirsch IR: Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* 2002;4:19-31.
- [186] Chiba S, Okuda M, Mussman JG, Fukasawa K: Genomic convergence and suppression of centrosome hyperamplification in primary p53<sup>-/-</sup> cells in prolonged culture. *Exp Cell Res* 2000;258:310-321.
- [187] Oikawa T, Staubach A, Okuda M, Fukasawa K: Centrosome amplification, chromosome instability, and karyotype convergence. *Cell Oncol* 2004;26:220-222.
- [188] Atkin NB: Nuclear size in premalignant conditions of the cervix uteri. *Nature* 1964;202:201.
- [189] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-627.
- [190] Fusenig NE, Boukamp P: Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 1998;23:144-158.
- [191] Urano K, Katakai Y, Tokuda Y, Ueyama Y, Nomura T, Yamamoto S: Failure of genotoxic carcinogens to produce tumors in human skin xenografts transplanted to SCID mice. *Carcinogenesis* 1995;16:2223-2226.
- [192] Soballe PW, Montone KT, Satyamoorthy K, Nesbit M, Herlyn M: Carcinogenesis in human skin grafted to SCID mice. *Cancer Res* 1996;56:757-764.
- [193] Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R: Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contr Microbiol* 2006;13:in press.
- [194] Winge O: Zytologische Untersuchungen ueber die Natur maligner Tumoren. II. Teerkarzinome bei Maeusen. *Zeitschrift fuer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 1930;10:683-735.
- [195] Spriggs AI: Cytogenetics of cancer and precancerous states of the cervix uteri. In: German J, editor. *Chromosomes and cancer*. New York: John Wiley; 1974. p. 423.
- [196] Nasiell M, Kato H, Auer G, Zetterberg A, Roger V, Karlen L: Cytomorphological grading and Feulgen DNA-analysis of metaplastic and neoplastic bronchial cells. *Cancer* 1978;41:1511-1521.
- [197] Frankfurt OS, Chin JL, Englander LS, Greco WR, Pontes JE, Rustum YM: Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res* 1985;45:1418-1423.
- [198] Bocking A, Chatelain R: Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecologic cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1989;11:177-186.
- [199] Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F: Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:1-8.
- [200] Choma D, Daures JP, Quatrin X, Pujol JL: Aneuploidy and prognosis of non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of published data. *Br J Cancer* 2001;85:14-22.
- [201] Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, et al.: Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 2001;112:118-126.
- [202] Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH: The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98:1312-1320.
- [203] Giaretti W: A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. *Lab Invest* 1994;71:904-910.

- [204] Shackney SE, Berg G, Simon SR, Cohen J, Amina S, Pommersheim W, Yakulis R, Wang S, Uhl M, Smith CA, et al.: Origins and clinical implications of aneuploidy in early bladder cancer. *Cytometry* 1995;22:307-316.
- [205] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- [206] Das SK, Kunkel TA, Loeb LA: Effects of altered nucleotide concentrations on the fidelity of DNA replication. *Basic Life Sci* 1985;31:117-126.
- [207] Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:776-781.
- [208] Knudson AG: Chasing the cancer demon. *Annual Review of Genetics* 2000;34:1-19.
- [209] Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366-374.
- [210] Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Mehes K, Nash R, Robin N, et al.: Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* 2004;36:1159-1161.
- [211] German J: Bloom's syndrome. II. The prototype of genetic disorders predisposing to chromosome instability and cancer. In: German J, editor. *Chromosomes and Cancer*. New York: John Wiley & Sons, 1974. p. 601-617.
- [212] Kajii T, Kawai T, Takumi T, Misu H, Mabuchi O, Takahashi Y, Tachino M, Nihei F, Ikeuchi T: Mosaic variegated aneuploidy with multiple congenital abnormalities: homozygosity for total premature chromatid separation trait. *Am J Med Genet* 1998;78:245-249.
- [213] Howard RO: Classification of chromosomal eye syndromes. *Int Ophthalmol* 1981;4:77-91.
- [214] Chaum E, Ellsworth RM, Abramson DH, Haik BG, Kitchin FD, Chaganti RS: Cytogenetic analysis of retinoblastoma: evidence for multifocal origin and in vivo gene amplification. *Cytogenet Cell Genet* 1984;38:82-91.
- [215] Squire J, Gallie BL, Phillips RA: A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet* 1985;70:291-301.
- [216] Lanza A, Lagomarsini P, Casati A, Ghetti P, Stefanini M: Chromosomal fragility in the cancer-prone disease xeroderma pigmentosum preferentially involves bands relevant for cutaneous carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997;74:654-663.
- [217] Chi H, Kawachi Y, Otsuka F: Xeroderma pigmentosum variant: DNA ploidy analysis of various skin tumors and normal-appearing skin in a patient. *Int J Dermatol* 1994;33:775-778.
- [218] Benedict WF, Banerjee A, Mark C, Murphree AL: Non-random retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Cancer Genet Cytogenet* 1983;10:311-333.
- [219] Hamel PA, Phillips RA, Muncaster M, Gallie BL: Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. *FASEB J* 1993;7:846-854.
- [220] Amare Kadam PS, Ghule P, Jose J, Bamne M, Kurkure P, Banavali S, Sarin R, Advani S: Constitutional genomic instability, chromosome aberrations in tumor cells and retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150:33-43.
- [221] Gardner HA, Gallie BL, Knight LA, Phillips RA: Multiple karyotypic changes in retinoblastoma tumor cells: presence of normal chromosome No. 13 in most tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;6:201-211.
- [222] Potluri VR, Nelson L, Ellsworth RM, Reid T, Gilbert F: Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma. A review. *Cancer* 1986;58:663-671.
- [223] Pogosian HE, Kuznetsova LE: Nonrandom chromosomal changes in retinoblastomas. *Arch Geschwulstforsch* 1986;56:135-143.
- [224] Worsham MJ, Carey TE, Benninger MS, Gasser KM, Kelker W, Zarbo RJ, Van Dyke DL: Clonal cytogenetic evolution in a squamous cell carcinoma of the skin from a xeroderma pigmentosum patient. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;7:158-164.
- [225] Reith A, Editor and Participant: Abstracts of the 1st Conference on Aneuploidy and Cancer. *Cell Oncol* 2004;26:167-269.

- [226] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-221.
- [227] Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, Hofland N, van Dijk J, White R, Edelmann W, et al.: Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999;13:1309-1321.
- [228] Kim SH, Roth KA, Moser AR, Gordon JI: Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia. *J Cell Biol* 1993;123:877-893.

# DNA-Bildzytometrie - Methode zur Früherkennung und Malignitäts-Gradierung bösartiger Tumoren

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

### 2. Biologische Grundlagen

- 2.1. Chromosomale Aneuploidie
- 2.2. Proliferation
- 2.3. Euploide Polyploidisierung

### 3. Pathologische Grundlagen

### 4. Geräte und Messtechnik

- 4.1. Messgeräte
- 4.2. Messtechnik
- 4.3. Kalibrierung
- 4.4. Messstrategie
- 4.5. Messpräzision
  - 4.5.1. Densitometrische Linearität
  - 4.5.2. Streulicht
  - 4.5.3. Beugung
  - 4.5.4. Segmentierung

### 5. Indikationen

- 5.1. Früherkennung von Krebs
- 5.2. Malignitätsgrading
- 5.3. Therapiemonitoring

### 6. Untersuchungsmaterialien und Bearbeitung

- 6.1. Feinnadelaspirationsbiopsien
- 6.2. Stanzbiopsien
- 6.3. Operationspräparate
- 6.4. Feulgenfärbung

### 7. Qualitätssicherung und Kontrolle

- 7.1. Für jedes Präparationsprotokoll
- 7.2. Für jede Färbung
- 7.3. Für jede Messung

### 8. Diagnostische Interpretationen

- 8.1. Dignitätsbestimmung

### **8.1.1. Systematik der diagnostischen Interpretation von DNA-Histogrammen**

- 8.2. Malignitätsgrading**
- 8.2.1. Algorithmen zum Malignitätsgrading**
- 8.3. Therapiemonitoring**
- 8.4. Histogramm-Systematik**

## **9. Diagnostische Berichte**

- 9.1. Dignitätsdiagnostik**
- 9.2. Malignitätsgrading**

## **10. Vergütung**

- 10.1. Feinnadelspirationsbiopsien**
- 10.2. Stanzbiopsien und Operationsmaterial**
- 10.3. Gesetzliche Krankenkassen**
- 10.4. Private Krankenkassen**
- 10.5. Patient**

## **11. Verantwortlichkeiten**

### **12. Glossar**

### **13. Anbietende Institute**

### **14. Terminologie: Zytogenetik / DNA-Zytometrie**

## **1. Einleitung**

Die DNA-Bildzytometrie ist eine Methode der mikroskopischen Krebsdiagnostik. Sie wird zu drei verschiedenen Zwecken in der Zytopathologie angewendet:

1. Zur Früherkennung von Krebs an mikroskopisch darauf verdächtigen Zellen (Dysplasien)
2. Zur Bestimmung des Grades der Bösartigkeit eines Tumors (Malignitätsgrading)
3. Zur Beurteilung des Ansprechens eines Tumors auf seine Behandlung (Therapie-Monitoring).

Bei der DNA-Bildzytometrie wird die Menge an Erbsubstanz (DNA) pro Zellkern computerunterstützt im Mikroskop gemessen. Weicht der DNA-Gehalt in einer bestimmten Anzahl von Zellen (z. B. 300) von der Norm ab (DNA-Aneuploidie), beweist dies in der Regel, dass der Patient einen Tumor hat. Derartige Abweichungen beruhen auf einem Verlust oder Gewinn einzelner Chromosomen (chromosomale Aneuploidie), wie sie nur bei Tumoren vorkommen. Je bösartiger der Krebs ist, umso ausgeprägter sind die Störungen des normalen Chromosomensatzes einer Tumorzelle. Ändert sich unter Therapie die DNA-Verteilung des Tumors zum Normalen hin, so kann dies als Erfolg der Behandlung gewertet werden.

Die Messung erfolgt mittels geeigneter computerisierter Verfahren unter der Kontrolle eines erfahrenen Pathologen (Abb.16). Dazu stehen die DNA-Flusszytometrie und die DNA-Bildzytometrie zur Verfügung. Bei letzterer wird die Erbsubstanz DNA in den Zellkernen des Tumorgewebes spezifisch (mit den Farbstoffen Pararosanilin oder Thionin) angefärbt (sog. *Feulgen*-Färbung, benannt nach dem Giessener Biochemiker *Robert Feulgen*, 1924; Abb 21). Mit einem TV-Bildanalysesystem wird in mehreren hundert Zellkernen im Mikroskop die Farbstoffmenge pro Zellkern gemessen (Abb.17). Ein individueller Referenzwert (d.h. ein normaler zweifacher bzw. diploider DNA-Gehalt) wird in derselben Weise an etwa 30 normalen Zellen (z. B. Lymphozyten, Bindegewebszellen oder Zellen der Schleimhaut) in derselben Probe bestimmt und der Messung der zu analysierenden Zellen zugrunde gelegt (interne Kalibrierung). Die erhaltenen DNA-Gehalte pro Zellkern werden in einem sog. „DNA-Histogramm“ grafisch dargestellt (Abb 6 - 13). Daraus kann man den am häufigsten vorkommenden DNA-Gehalt der Tumorprobe ersehen. Diesen nennt man „Tumorstammlinie“ (Abb 9). Deren DNA-Gehalt wird in der Dimension c (=content) angegeben. 1c entspricht dem DNA-Gehalt des Kernes einer Zelle mit einfachem (haploiden) Chromosomensatz. Stammlinien außerhalb der normalen Werte von 2c und 4c und sehr hohe DNA-Gehalte einzelner Zellen sprechen für das Vorliegen eines Tumors. Eine DNA-Stammlinie im Bereich von 1,80c und 2,20c wird als peridiploid bezeichnet (d.h. „um den zweifachen Chromosomensatz“, Abb 10), zwischen 3,6c und 4,4c als peritetraploid (d.h. „um den vierfachen Chromosomensatz, Abb. 11“), außerhalb dieser Bereiche als x-ploid (d.h. „um den x-fachen Chromosomensatz, Abb 12“). Liegen mehrere DNA-Stammlinien vor, spricht man von multiploid (Abb 13).

## 2. Biologische Grundlagen

Die biologischen Grundlagen der diagnostischen DNA-Bildzytometrie liefern die Phänomene der chromosomal Aneuploidie, der Vermehrung von Zellen (Proliferation) und der euploiden Polyploidisierung.

### 2.1. Chromosomale Aneuploidie

Normale, nicht maligne Zellen des Menschen haben (mit Ausnahme der Samen- und Eizellen) einen zweifachen Satz von 23 Chromosomen (je einen Satz vom Vater und einen von der Mutter), also insgesamt 46 (Abb 1). Zellen eines beginnenden Gebärmutterhals- oder Prostatakarzinoms z. B. zeigen bereits Abweichungen davon, also ein Fehlen von Chromosomen (bzw. -Bruchstücken) oder einen Gewinn derselben. Dies nennt man chromosomal Aneuploidie (*Duesberg et al.*, 2004; Abb 2-5).

Die dadurch entstehenden Abweichungen des DNA-Gehaltes von der Norm kann man mit der DNA-Zytometrie messen. Übersteigen die gemessenen Werte einzelner Zellen

den systembedingten Messfehler des Verfahrens ( $\pm 10\%$ ), so liegt DNA-Aneuploidie vor (Haroske et al., 2002; Abb. 8, 9). Der Nachweis einer chromosomalen Aneuploidie oder der mit ihr verbundenen Mengenveränderung der DNA (analog: DNA-Aneuploidie genannt), gilt international als Marker für das Vorliegen von Tumorzellen. Weist man z. B. in Prostatazellen also DNA-Aneuploidie nach, dann liegt zweifelsfrei ein Prostatakarzinom vor (Baretton et al., 1993). In manchen Organen, wie dem Mund oder dem Muttermund konnte durch Nachweis von DNA-Aneuploidie in Abstrichen Krebs gut zwei Jahre früher als mit der histologischen Untersuchung von Biopsien nachgewiesen werden (Remmerbach et al., 2001, 2003; Maraki et al., 2004, 2005 a, b, Grote et al., 2003).

Der amerikanische Molekularbiologe Peter Duesberg beschreibt die Entstehung einer Tumorzelle als Kettenreaktion mehrfacher Aneuploidisierungen (Duesberg et al., 2004). Dementsprechend beginnen die meisten Tumoren mit relativ geringen Chromosomen-Veränderungen, die dann im Lauf der Jahre zunehmen können. Dies in dem Maße, wie die Bösartigkeit des Karzinoms (= maligne Potenz) zunimmt ("chain-reaction of multiple aneuploidizations"). Das heißt, je bösartiger ein Krebs ist, umso ausgeprägter sind die in seinen Zellen vorkommenden Chromosomenstörungen (an Zahl und Art) und umso unterschiedlicher (variabler) sind sie von Zelle zu Zelle. Die DNA-Zytometrie misst beides, das Ausmaß der chromosomalen Aneuploidie und ihre Unterschiedlichkeit (Variabilität). Ein vergleichsweise wenig bösartiger Krebs („Haustier-Krebs“) zeigt demnach in fast allen Zellen noch relativ normale DNA-Gehalte. Man nennt dies „peridiploid“, weil der normale Chromosomensatz diploid ist (Abb. 10). Ein sehr aggressives Prostatakarzinom zeigt dagegen sehr hohe DNA-Gehalte (bis zum 10-fachen der Norm) und starke Schwankungen. Der Pathologe spricht von einer „multiploiden“ DNA-Verteilung (Abb. 13). Dazwischen gibt es noch die „peritraploide“ DNA-Verteilung (Abb. 11), der z.B. beim Prostatakarzinom immer noch eine relativ guten Prognose entspricht und die „x-ploide“ Verteilung (Abb. 12). Zwischen „peridiploider“ (= Grad I), „peritraploider“ (= Grad II), „x-ploider“ (= Grad III) und „multiploider“ (= Grad IV) DNA-Verteilung gibt es fließende Übergänge (Tribukait, 1991). Mit der Zeit kann es im Rahmen der sog. „zytogenetischen“ Tumorprogression“ spontan zu einem Anstieg des DNA-Malignitätsgrades, d. h. des Ausmaßes chromosomaler - und dementsprechend von DNA-Aneuploidie kommen (Böcking et al., 1985). Zudem können sich in verschiedenen Teilen des Tumors unterschiedliche DNA-Verteilungsmuster finden. Daher muss man, vor allem bei größeren Tumoren (T2, T3, T4), mehrere (bis zu fünf) verschiedene Proben für die DNA-Zytometrie untersuchen (Wang et al., 2000).

Folgende Ursachen kommen für die Entstehung von chromosomaler Aneuploidie infrage: Chromosomen-Brüchigkeits-Syndrome, ionisierende Strahlen (z. B. Röntgen), mechanische Kräfte (z. B. Asbestfasern), Virus-Infekte (z. B. HPV), chemische Agentien (z. B. Nitrosamine) und Mutationen bestimmter Gene (z. B. APC). Bekannte Mechanismen der Entstehung einer chromosomalen Aneuploidie sind: Dysfunktionen von Zentromeren, Zentriolen, Zentrosomen, Telomeren und Spindelfasern. Alle diese Organelle sind an einer ordnungsgemäßen Aufteilung des verdoppelten Chromosomensatz-

zes auf die beiden Tochterzellen beteiligt. Neben numerischen chromosomalen Aberrationen unterscheidet man strukturelle, balanceierte und unbalanceierte. Mögliche Effekte chromosomaler Aneuploidie sind: Zelltod, Immortalisierung, Stop der Zellteilung, neoplastische bzw. maligne Transformation und Chemotherapie-Resistenz. In der Zytogenetik und der DNA-Zytometrie werden identische Begriffe oft mit unterschiedlicher Bedeutung verwendet. Tabelle 1 stellt die für beide Methoden gebräuchlichen Definitionen einander gegenüber.

## 2.2. Proliferation

Für die Beurteilung des Grades der Bösartigkeit von Tumorzellen ist auch ihre Wachstumsrate (resp. ihre Wachstumsgeschwindigkeit) von Bedeutung. Diese kann meist ebenfalls mit der DNA-Zytometrie bestimmt werden (sofern eine genügende Anzahl von Tumorzellen gemessen wurde). Je schneller ein Krebs wächst, umso bösartiger ist er. Teilen sich dagegen die Tumorzellen nur langsam, etwa wie gesunde Zellen, dann ist der Tumor in der Regel wenig aggressiv. Als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit wird in der Pathologie oft der Anteil in Teilung befindlicher Zellen verwendet, die sog. „Proliferationsfraktion“. Ist diese klein und beträgt z. B. bei einem (peridiploiden) Prostatakarzinom weniger als 5 %, so liegt die Wahrscheinlichkeit 73-jähriger Männer, in den folgenden 15 Jahren an ihren Tumor zu sterben bei nur ca. 10 % (*Åhlgren et al., 1997, Tribukait, 2005*). Die Wahrscheinlichkeit von gleich alten Männern in Deutschland nach zehn Jahren an etwas anderem zu sterben beträgt dagegen über 20 %.

## 2.3. Euploide Polyploidisierung

Unter besonderer funktioneller Beanspruchung, wie z. B. erhöhter Pumpleistung des Herzens, können Zellen ihren Chromosomensatz wiederholt regelhaft verdoppeln. Daraus entstehen vierfache, achtfache, sechzehnfache oder zweiunddreißigfache Chromosomenausstattungen eines Zellkernes ohne dass dies krankhaft ist. Infekte mit bestimmten Viren (z. B. HPV), Behandlung mit Strahlen oder Zytostatika, wie auch eine vermehrte Regeneration von Zellen gehen mit dieser euploiden Polyploidisierung einher (*Biesterfeld et al., 1994; Abb. 7*). Bei der Interpretation von DNA-Stammlinien oder einzelner besonders hoher Werte ist dieses Phänomen zu bedenken, um nicht fälschlicherweise Polyploidie mit Aneuploidie zu verwechseln. Samenblasen-Epithelien zeigen eine ausgeprägte Polyploidisierung, was zytologisch früher gelegentlich zu ihrer Verwechslung mit Zellen eines Prostata-Karzinoms führte.

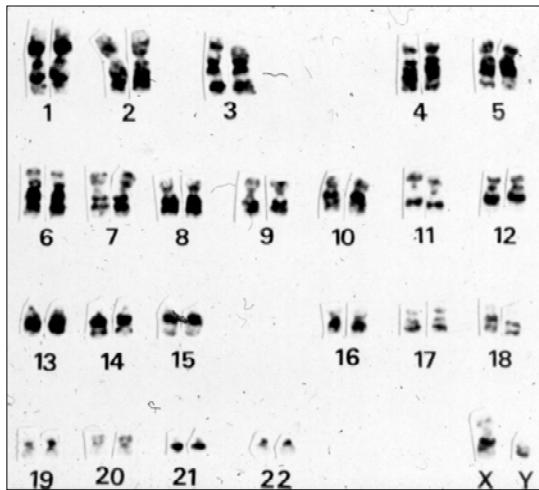


Abb.1: Karyogramm einer normalen menschlichen Körperzelle mit doppeltem Chromosomensatz ( $2 \times 23$ )

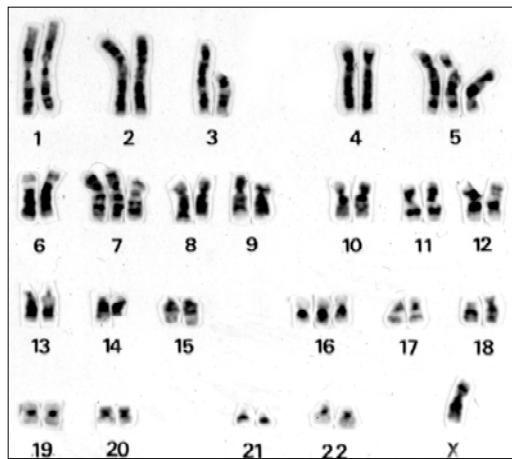


Abb.2: Karyogramm einer Krebszelle des Malignitätsgrades 1 mit geringen numerischen und strukturellen Abweichungen vom normalen Chromosomensatz (= chromosomal Aneuploidie)

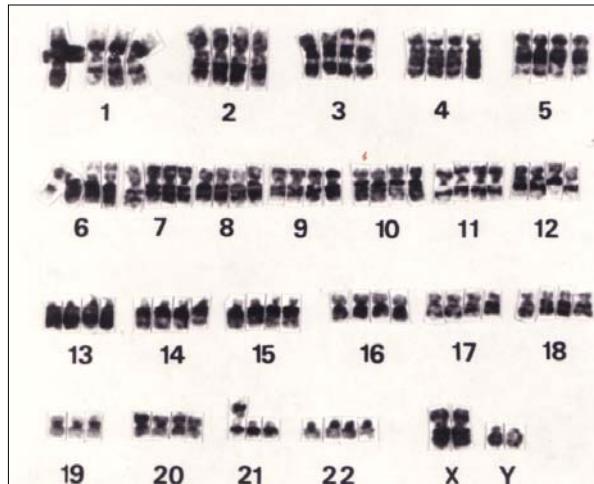


Abb.3: Karyogramm einer Krebszelle des Malignitätsgrades 2 mit mittelgradigen Abweichungen vom normalen Chromosomensatz

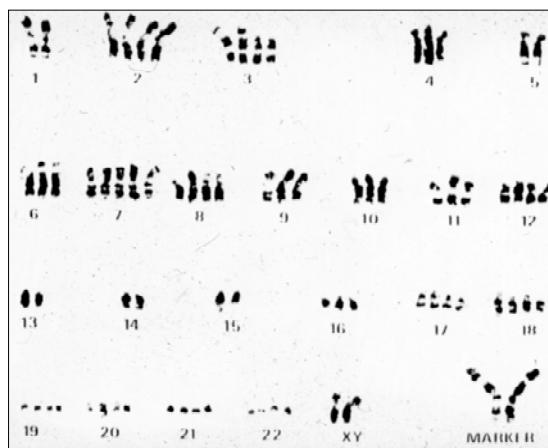


Abb.4: Karyogramm einer Krebszelle des Malignitätsgrades 3 mit starken Abweichungen vom normalen Chromosomensatz

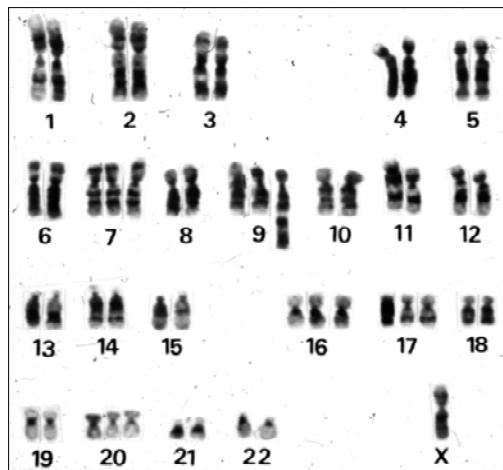


Abb.5: Kryogramm einer Krebszelle des Malignitätsgrades 4 mit sehr starken Abweichungen vom normalen Chromosomensatz

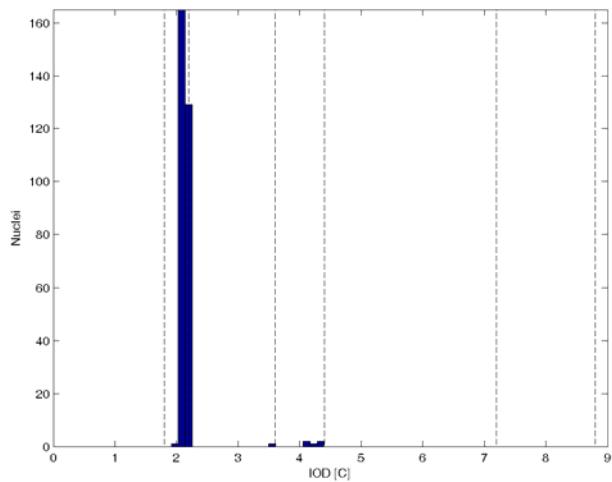


Abb.6: Normale (euploide), diploide DNA-Verteilung in gesunden Zellen eines Gebärmutterhals-Abstriches

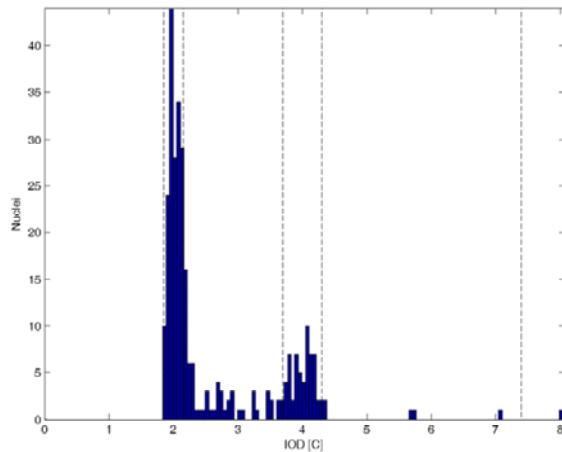


Abb.7: Normale (euploide), polyplioide DNA-Verteilung in mit HPV-Viren infizierten Zellen eines Gebärmutterhals-Abstriches

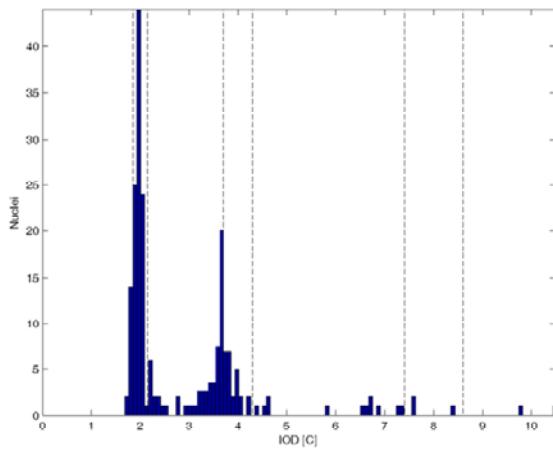


Abb.8: Abnormale (aneuploide), auf Krebs hinweisende DNA-Verteilung in Zellen eines Gebärmutterhals-Abstriches mit wenigen Messwerten Größe 9c

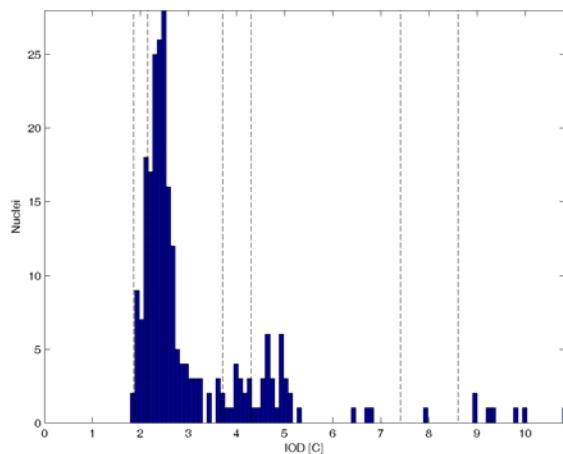


Abb.9: Abnormale (aneuploide), auf Krebs hinweisende DNA-Verteilung in Zellen eines Gebärmutterhals-Abstriches mit sog. DNA-Stammlinie bei 3c

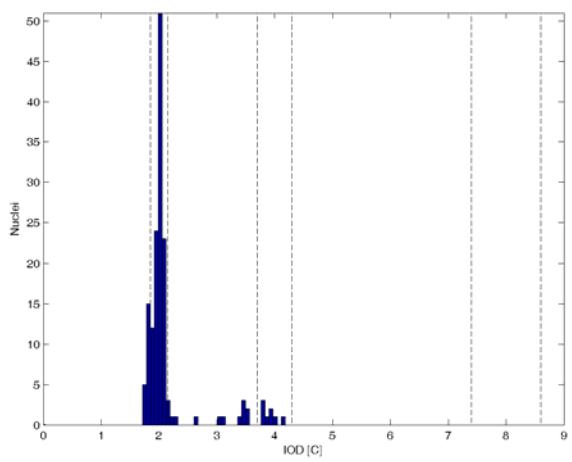


Abb.10: Peridiploide DNA-Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA-Grad 1)

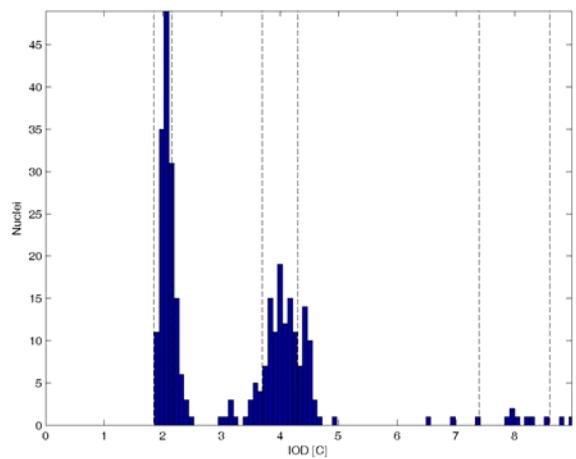


Abb.11: Peritetraploide DNA-Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA-Grad 2)

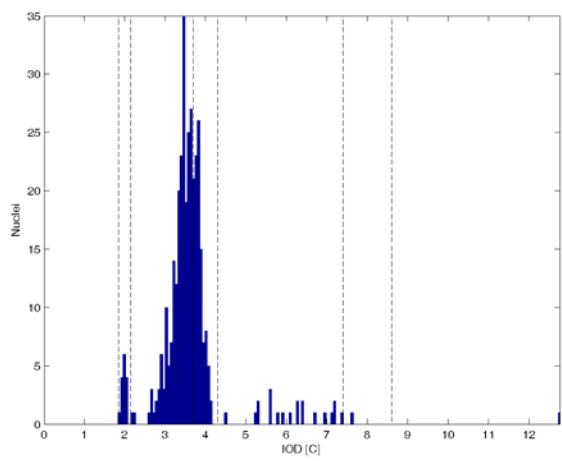


Abb.12: X-ploide DNA-Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA-Grad 3)

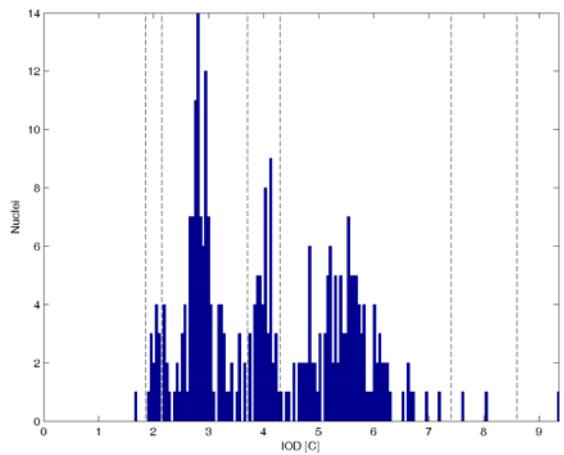


Abb.13: Multiploide DNA-Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA-Grad 4)

### 3. Pathologische Grundlagen

Krebs-verdächtige Herde werden entweder vom Patienten selbst bemerkt oder von Ärzten durch Inspektion, Palpation oder mit bildgebenden Verfahren zunächst nur vermutet, definitiv aber ausschließlich von Pathologen mikroskopisch an Zellen oder Geweben diagnostiziert. Der Tumor-Histologie-Schlüssel der Internationalen Klassifizierung der Krankheiten (ICD-O-M) führt etwa 2.200 mikroskopisch unterscheidbare Neubildungen auf (*Grundmann et al., 1997*).

Dimensionen der mikroskopischen Krebsdiagnostik sind:

- die qualitative Diagnose eines Tumors (liegt überhaupt ein solcher vor?)
- seine Dignitätsbestimmung (ist er gutartig oder bösartig?)
- seine histogenetische Klassifikation (von welchem Gewebe stammt er ab?)
- sein Malignitätsgrading (wie bösartig ist er?) und
- das Tumor- Staging (wie ausgebreitet ist er im Körper?).

Bei der mikroskopischen Entscheidung, ob die vorliegenden Zellen oder Gewebe von einem Tumor stammen oder nicht, tauchen gelegentlich Probleme auf. Der Pathologe bezeichnet auf Krebs verdächtige, dafür aber nicht beweisende Zell- oder Gewebsveränderungen auch als Dysplasien. In der Prostata spricht man von prostatischen intraepithelialen Neoplasien (PIN), wenn man sich mikroskopisch nicht sicher ist, ob die verdächtigen Zellen bereits einem invasiven Karzinom entsprechen oder nicht. In diesen Fällen hilft die DNA-Zytometrie weiter. Stellt man beispielsweise in einer prostatischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) DNA-Aneuploidie fest, dann kann man davon ausgehen, dass es sich bereits um ein sehr frühes Stadium (*in situ*) eines Prostatakarzinoms handelt (Baretton et al., 1993). Auch bei der Unterscheidung zwischen Gutartigkeit und Bösartigkeit von Tumoren (Dignitätsbestimmung) kann die DNA-Zytometrie hilfreich sein, da sich beide in der Regel durch das Ausmaß der zugrunde liegenden Aneuploidie unterscheiden (z. B. sog. Borderline-Tumoren des Ovar).

Während die DNA-Zytometrie zur histogenetischen Klassifikation und zum Tumorstaging keinen Beitrag leistet, ist sie in der Regel bei der Gradierung der Malignität vieler Tumoren, wie z. B. des Prostatakarzinoms, sehr hilfreich. Das liegt daran, dass diese Tumoren umso bösartiger sind, je stärker chromosomale Aneuploidie in ihren Zellen ausgeprägt ist.

## 4. Geräte und Messtechnik

### 4.1. Messgeräte

Um auf den DNA-Gehalt von Zellkernen zu schließen, wird deren Erbsubstanz spezifisch durch die sog. Feulgen-Färbung mit den Farbstoffen Pararosanilin (violett; Abb. 14, 15) oder Thionin (blau) angefärbt. Die pro Zellkern gebundene Farbstoffmenge wird mikrodensitometrisch gemessen. In den 60er und 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts verwendete man dafür sog. Mikroskopphotometer (z. B. ZEISS UMSP). Seit den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts aber benutzt man Videokameras und PC-gestützte Bildanalysesysteme (z. B. CAS von BECTON AND DICKINSON, USA; SAMBA von ALCATEL, Frankreich; TAS von LEICA, Wetzlar; IBAS von ZEISS, OBERKOCHEM; CM1 VON HUND, WETZLAR; AUTOCY-E-QUIC-DNA von Zeiss, Jena).

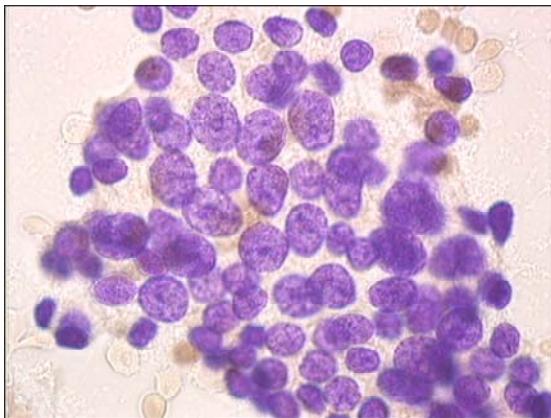


Abb.14: Nach Feulgen spezifisch für DNA-gefärbte Zellen eines Prostatakarzinoms Grad 1 aus einem Feinnadelpunktat

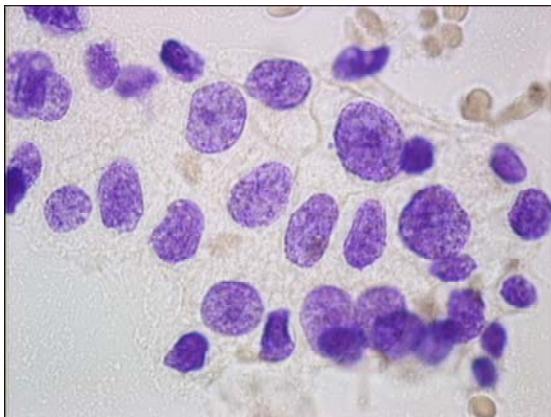


Abb.15: Nach Feulgen spezifisch für DNA-gefärbte Zellen eines Grad 3 Prostatakarzinoms

## 4.2. Messtechnik

Messprinzip ist die Bestimmung der integrierten optischen Dichte pro Zellkern. D. h. dass die Grauwerte aller Pixel des Zellkernbildes aufsummiert und als integrierte optische Dichten (IOD's) angegeben werden (Abb. 17, 18). Die IOD's von etwa 30 normalen, gesunden Zellen mit diploidem Chromosomensatz werden als interne Referenz verwendet. Der Mittelwert ihrer IOD's wird als 2c gesetzt. 1c entspricht dem DNA-Gehalt eines gesunden, haploiden Zellkernes. IOD-Werte gemessener Analysezellen werden also in Bezug zu denen der internen Referenzzellen gesetzt.

Für die Messung muss vom Bildanalysesystem zunächst eine sog. „Messmaske“ generiert werden, welche das Bild des Zellkerns exakt abdeckt und in welcher die IOD gemessen werden soll. Zur Bestimmung des Leerwertes ( $I_0$ ) bzw. des mittleren Grauwertes des Hintergrundes muss eine zweite Messmaske generiert werden, die der Kernmaske eng anliegt, aber seiner Form und Größe exakt angepasst werden muss. Da das sog. Streulicht (englisch glare) ebenso wie Lichtbeugung am Rande des Zellkernes zu Messfehlern führt, müssen diese unbedingt durch entsprechende Software-Prozeduren korrigiert werden (*Kindermann und Hilgers, 1994*). Streulicht führt dazu, dass vor allem kleine und besonders dunkle Zellkerne fälschlicherweise zu geringe IOD-Werte ergeben. Lichtbeugung führt dazu, dass die Ränder der Zellkerne zu hell erscheinen. Fehlende Glare- und Beugungskorrekturen resultieren in einer Verbreiterung von Messwertpeaks und einer artifiziellen Rechtsverschiebung von DNA-Histogrammen. Damit besteht die Gefahr von falsch-positiven DNA-Aneuploidie-Diagnosen.

Bei einer Verwendung von Schwarzweiss-Videokameras muss ein Interferenzfilter mit geringer Halbwertbreite ( $\pm 10$  nm) verwendet werden, der dem Absorptionsmaximum des verwendeten DNA-spezifischen Farbstoffes entspricht (560 nm bei Pararosanilin, 590 nm bei Thionin). Bei Farbvideokameras (Abb. 16) benutzt man für die Densimetrie den Grünkanal oder eine Mischung aus diesem und Anteilen anderer Farbkanäle. Auf jeden Fall muss eine Linearität zwischen physikalisch definierten und gemessenen Grauwerten garantiert sein (*Sanchez et al., 1990*). Diese Voraussetzungen können mit dem PRESS PRO 21-slide gemäß dem III. ESACP-Consensus-Report überprüft werden (*Giroud et al., 1998*).



Abb. 16: Pathologin bei der DNA-Messung (AUTOCYTE-QUIC-DNA, Zeiss, Jena)

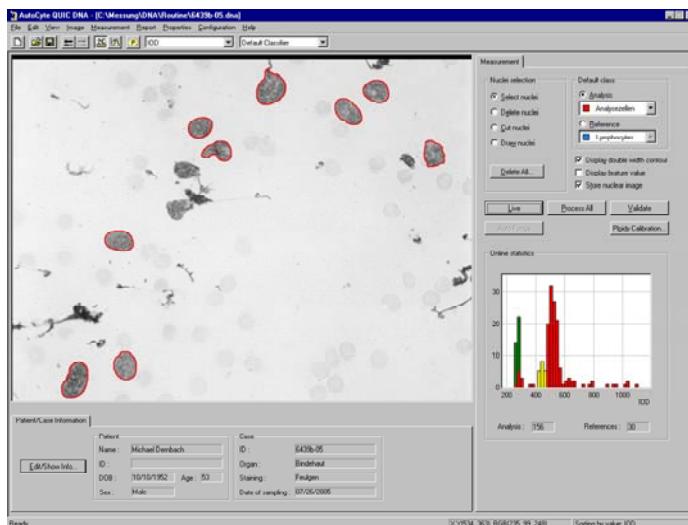


Abb.17: Messmonitor der DNA-Bildzytometrie. Links: zur Messung ausgewählte Zellkerne mit ihrem jeweiligen DNA-Gehalt. Rechts: Das DNA-Histogramm zeigt die Verteilung der Messwerte an

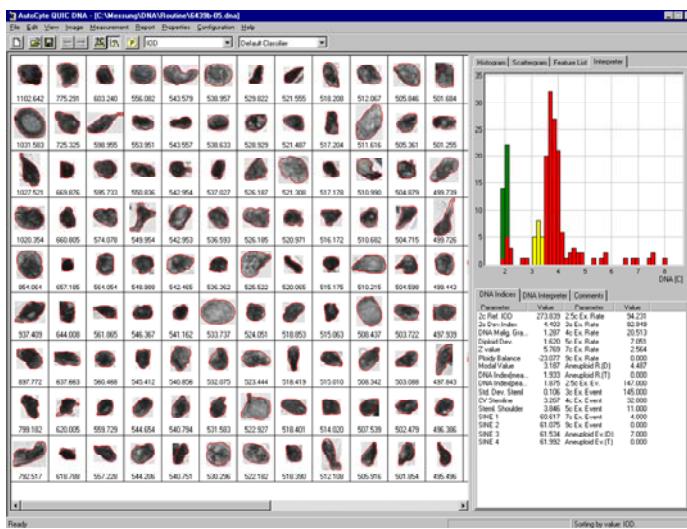


Abb.18: Messmonitor der DNA-Bildzytometrie: Links: Bildgalerie vermessener Zellkerne eines Karzinoms. Rechts: Zugehöriges DNA-Histogramm

### 4.3. Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Histogramme in der Einheit des DNA-Gehaltes c (Abb. 6 - 13) empfiehlt sich unbedingt die Verwendung interner Referenzzellen im selben Präparat und nicht etwa externer aus anderen. Da Details von Lagerung, Präparation und Fixation der Zellen einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der Feulgen-Färbung haben, ist es unbedingt notwendig, Referenzzellen nicht nur im selben zytologischen Präparat, sondern möglichst auch in unmittelbarer Umgebung der jeweiligen Analysezellen zu messen.

Je nach Materialtyp kommen verschiedene Referenzzellen zur internen Kalibrierung infrage, z. B.

- Organpunktate: morphologisch normale Parenchymzellen
- Schleimhautabstriche: morphologisch normale Epithelien
- Körperhöhlenergüsse: morphologisch normale Mesothelzellen
- Urin: morphologisch normale Urothelzellen
- Liquor: normale Lymphozyten
- Enzymatische Zellvereinzelungen: Fibroblasten oder normale Epithelzellen
- Bronchialsekrete: morphologisch normale Zylinderepithelien.

Falls keine organspezifischen Referenzzellen vorhanden sind, eignen sich auch Lymphozyten aus dem Blut, von denen nur möglichst solche verwendet werden dürfen, deren Kernfläche größer als  $25 \mu\text{m}^2$  ist. Granulozyten sollten nicht als Referenzzellen verwendet werden, da ihre Kernsegmente nicht nur zu klein, sondern in der Regel auch zu dunkel (pyknotisch) sind, um trotz Software-Korrektur von Streulicht- und Beugungsfehlern korrekte Messwerte zu liefern (die IOD's werden falsch zu gering angegeben).

Es sollten mindestens 30 interne Referenzzellen gemessen werden, deren Mittelwert als  $2c$  gesetzt wird.

Ein Maß für die Güte der Referenzzellmessung ist zum einen der Variationskoeffizient der IOD's (CV) der  $< 5\%$  sein muss. Alternativ soll der Standardfehler des Mittelwerts ( $rSEM$ )  $< 1,5\%$  betragen. Zum anderen darf keine Abhängigkeit der IOD bzw. DNA-Gehalte normaler Referenzzellen von der Fläche der Zellkerne bestehen. D. h., dass der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Variablen idealerweise 0 betragen sollte. Werte bis  $r < 0,4$  werden aber nach internationalem Konsens noch akzeptiert (Haroske et al., 2001). Eine Möglichkeit der subjektiven Kontrolle des Vorliegens einer Korrelation zwischen IOD und Fläche der Referenzzellen ergibt sich durch die Inspektion des entsprechenden Punktediagramms. Weichen die IOD-Werte von kleinen Kernen  $< 25 \mu\text{m}^2$  zu niedrigen Werten hin ab, ist es erlaubt, diese „Ausreißer“ aufgrund der Messung pyknotischer Kerne im Datensatz zu löschen. Gelingt es nicht durch Lösung zu kleiner Referenzzellen oder Hinnahme weiterer Zellenmessungen dem CV unter 5 % und den Korrelationskoeffizienten  $r < 0,4$  zu senken, dann darf die Referenzzellmessung nicht zur Kalibrierung eines DNA-Histogramms zu diagnostischen Zwecken verwendet werden.

Die Referenzzellmessung stellt den kritischsten Schritt der diagnostischen DNA-Bildzytometrie dar. Nachlässigkeiten in diesem Procedere können zur falsch-positiven Annahme von DNA-Aneuploidie und damit eines malignen Tumors führen.

#### 4.4. Messstrategien

In der DNA-Bildzytometrie werden in der Regel nur diejenigen Zellen gemessen, die diagnostisch relevant sind. Das sind die mikroskopisch malignitätsverdächtigen (dysplastischen), sofern die Messung dem Zweck dient, die Dignität dieser Zellen zu klären. Alle unverdächtigen, mikroskopisch normal erscheinenden Zellen werden nicht gemessen. Innerhalb der Population der dysplastischen Zellen darf allerdings nicht selektiert werden. Das heißt, dass z. B. nicht nur die besonders großen oder dunklen Zellkerne zur Messung ausgewählt werden dürfen. Im Prinzip muss jede dysplastische Zelle also in die Messung einbezogen werden. Liegt am Ende einer solchen Zufallsmessung dysplastischer Zellen DNA-Aneuploidie nicht vor, dann darf in einem zweiten Akt im gesamten Präparat nach besonders großen oder sonst morphologisch auffälligen Zellen gesucht werden, um sog. „rare events“ zu finden, also einzelne Zellen mit einem

besonders hohen, pathologischen DNA-Gehalt. Gelegentlich lässt sich damit doch noch DNA-Einzelzell-Aneuploidie feststellen, nachdem Stammlinien-Aneuploidie nicht gefunden worden ist. In diesem Fall sollte man aber der Diagnose den Hinweis hinzufügen, dass Einzelzell-Aneuploidie nur nach Aufsuchen des gesamten Präparates festgestellt werden können.

Wenn die Fragestellung dagegen die Bestimmung des DNA-Malignitätsgrades ist, dann müssen alle Tumorzellen nach Zufallsprinzipien gemessen werden. Auch hierbei ist es nicht erlaubt, morphologisch besonders auffällig Zellkerne bevorzugt zu messen, da dies das Ergebnis in dem Sinne beeinflussen würde, dass der Malignitätsgrad zu hoch erscheint. Auch hierbei ist es erlaubt, in einem zweiten Akt einzelne Zellen mit besonders hohem DNA-Gehalt zur Messung aufzusuchen, wenn dies besonders vermerkt wird.

Was die subjektive bzw. objektive Auswahl der Zellen zur Messung betrifft gibt es in der diagnostischen Bildzytometrie vier verschiedene Modi:

1. Der User klickt jeden zu messenden Zellkern auf den Monitor mit der Maus einzeln an und wählt ihn damit bewusst für die Messung aus. Nur für diesen ermittelt die Bildanalyse-Software dann eine seiner Form und Größe exakt angepasste Messmaske (positive subjektive Selektion; Abb. 17).
2. Die Bildanalyse-Software detektiert alle Zellkerne gleichzeitig und der User eliminiert per Mausklick nur die nicht infrage kommenden Kerne, samt Artefakten (negative subjektive Selektion).
3. Die Bildanalyse-Software detektiert nicht nur alle Zellkerne automatisch und eliminiert dabei auch Artefakte, sie macht auch automatisch Vorschläge zur Klassifikation aller Kerne als zu Referenzzellen oder Analysezellen gehörig. Der User kann aber für jede einzelne Zelle am Monitor die Klassifikation ändern (automatische Selektion und Klassifikation mit subjektiver Korrektur am Monitor).
4. Die Bildanalyse-Software detektiert und klassifiziert alle Zellkerne automatisch ohne Möglichkeit der Korrektur am einzelnen Monitorbild (automatische Selektion und Klassifikation ohne subjektive Korrektur am Monitor).

Für diese vier Mess-Modi muss die Möglichkeit gegeben sein, alle Zellkerne samt Detektionsmasken getrennt nach Referenzzellen und Analysezellen als sog. „Bildgalerie“ auf dem Monitor vorgeführt bekommen und noch einzelne Elemente zu eliminieren (z. B. wenn sie sich als Artefakte, unscharfe oder autolytische Kerne darstellen) oder sie neu zu klassifizieren. Dies sollte auch noch an einem Punktediagramm möglich sein, welches jeden Zellkern mit seinem DNA-Gehalt und seiner Fläche darstellt (dot plot). Darin erkannte Ausreißer müssen nicht nur bildlich dargestellt damit beurteilt werden, sondern auch im Datensatz gelöscht werden können.

## **4.5. Messpräzision**

Es versteht sich von selbst, dass die Sicherheit diagnostischer Aussagen der DNA-Zytometrie erheblich von der Messpräzision abhängt. So kann eine geringe Abweichung des DNA-Gehaltes von der Norm, welche für einen malignen Tumor beweisend sein kann, nicht erkannt werden, wenn der Messfehler zu groß ist. Dies kann sich in einer zu großen Streuung der Messwerte z. B. diploider Zellen äußern oder in einer artifiziellen Verschiebung des gesamten DNA-Histogramms. Fehler, welche die Genauigkeit der DNA-Messungen in Zellkernen beeinflussen, treten auf verschiedenen Ebenen auf:

1. Densiometrische Linearität
2. Streulicht
3. Beugung
4. Segmentierung

### **4.5.1. Densiometrische Linearität**

Es muss durch Kontrollmessungen sicher gestellt werden, dass über den gesamten vorkommenden Grauwertbereich (Transmissionen von 0-1, Extinktionen von 0- $\infty$ ) eine Linearität zwischen den physikalisch vorgegebenen und den gemessenen Grauwerten gegeben ist. Dies lässt sich mit dem sog. PRESS PRO 21 Slide testen, auf welchem Testobjekte unterschiedlicher Transmissionen in Form und Größe menschlicher Zellkerne aufgebracht sind. Da viele Videokameras eine genügende densitometrische Linearität nicht an sich bieten, muss diese ggf. durch softwaremäßige Korrektur der Kennlinien der Kamera korrigiert werden (*Giroud et al., 1998, Sanchez et al., 1990*).

### **4.5.2. Streulicht**

Streulicht entsteht im Mikroskop durch Beugung des Lichtes an Grenzflächen, wie von Linsen und Blenden. Es bewirkt, dass im mikroskopischen Bild schwarze Partikel, wie z. B. Aktivkohleteilchen, grau erscheinen, bzw. statt eine Transmission von 0 z. B. eine von 0,1 aufweisen (*Jarvis, 1986l., Kindermann und Hilgers, 1994*). Bei der DNA-Bildzytometrie führt dieser Effekt dazu, dass vor allem bei sehr kleinen (< 25  $\mu\text{m}^2$ ) und sehr dunklen (pyknotischen) Zellkernen, wie von degenerativ veränderten Lymphozyten, zu geringe IOD-Werte gemessen werden. Das Ergebnis sind verfälschte Histogramme mit zu breiten und verschobenen Peaks. Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie ohne softwaremäßige Korrektur des Streulichtfehlers sind daher mit größter Vorsicht zu interpretieren. Heutzutage sollten nur Geräte mit einer funktionierenden softwaremäßigen Streulicht- und Beugungskorrektur angeboten und gekauft werden. Bei ersterer wird der Grauwert jedes Pixels um den zuvor ermittelten Streulichtwert der jeweiligen Mikroskopeinstellung korrigiert. Neuere Mess-Systeme verfü-

gen über eine vollautomatische Korrektur des Streulichtfehlers, basierend auf dem jeweils aktuellen Streulicht der Mikroskopeinstellung.

#### **4.5.3. Beugung**

Im Lichtmikroskop kommt es am Rande eines Partikels im Strahlengang zu einer Beugung von Lichtstrahlen in dessen Inneres. Dies führt zu einem sog. „Beugungsssaum“, der ebenfalls eine präzise Messung der integrierten optischen Dichte beeinträchtigt. Neuere Systeme zur DNA-Bildzytometrie verfügen daher über eine softwaremäßige Korrektur des sog. „Beugungsfehlers“.

#### **4.5.4. Segmentierung**

Eine exakte Bestimmung der integrierten optischen Dichte (IOD) eines Zellkerns kann nur erfolgen, wenn dieser zunächst passgenau segmentiert worden ist. Das bedeutet, dass das Bildanalysesystem eine der Größe des Kerns ideal angepasste Maske generieren muss. Fehlen darin Teile des Zellkernes, wird eine zu geringe IOD angegeben. Ist die Maske dagegen zu groß, kann die IOD unter Umständen zu hoch gemessen werden. Der Käufer eines Bildanalysesystems zur diagnostischen DNA-Bildzytometrie sollte sich daher zunächst anhand eigener Präparate von der hohen Qualität der Segmentierung zu messender Zellkerne überzeugen. Darüber hinaus sollte vor jeder Akzeptierung der Messwerte ausgewählter Kerne die Präzision der Messmasken am Monitor überprüft werden.

### **5. Indikationen**

#### **5.1. Früherkennung von Krebs**

Oft liegen entweder nicht genügend Zellen für eine sichere mikroskopische Krebsdiagnose vor oder die Zellmorphologie lässt diese noch nicht zu. Kann man in diesen Fällen aber DNA-Aneuploidie nachweisen, so lässt sich ein Tumor (meist ein Karzinom) oft um mehrere Jahre früher sichern, als dies mit bloßem Auge am Mikroskop machbar ist (Abb. 8, 9). So deutet ein krankhaft erhöhter Gehalt an Erbsubstanz (beispielsweise in der Mund-, der Bronchial-, der Gebärmutterhals- oder der Kehlkopf-Schleimhaut) etwa drei Jahre früher auf einen beginnenden Krebs hin als dies die feingewebliche (histologische) oder zelluläre (zytologische) Diagnose ermöglicht (Böcking et al., 1985, 1986; Auffermann und Böcking, 1985; Remmerbach et al., 2003; Maraki et al., 2005; Sudbø et al., 2001). Der Nachweis von DNA-Aneuploidie in Zellen einer prostatischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) qualifiziert diese daher als sehr frühe Form eines Prostatakarzinoms (Baretton et al., 1993).

Da unter Umständen der Nachweis einer einzigen Zelle mit einem stark erhöhten DNA-Gehalt (z. B. größer 9c) oder von etwa 100 Zellen mit gering erhöhtem DNA-Gehalt (z. B. 2,25c) ausreicht um eine sichere Krebsdiagnose zu stellen, erlaubt die DNA-Bildzytometrie eine Krebsdiagnostik nicht nur sehr früh sondern gelegentlich auch an sehr wenigen Zellen (Remmerbach et al., 2001, 2003; Maraki et al., 2004, 2005).

## 5.2. Malignitätsgrading

Je ausgeprägter und unterschiedlicher die Störungen der Chromosomenart und Zahl in einem Tumor sind (bedingt durch sogenannte genetische bzw. chromosomal Instabilität), umso bösartiger ist er (Abb. 2 - 5, 10 - 13). Man spricht dann von einem hohen Grad an chromosomaler Aneuploidie (Tribukait et al., 2004). Bei der Messung des DNA-Gehaltes von Tumorzellen schlägt sich dies als hohe und stark schwankende Werte nieder (ausgeprägte DNA-Aneuploidie) (Böcking et al., 1995).

Karzinome mit guter Prognose (Malignitätsgrad 1) zeigen meist Zellkern-DNA-Gehalte entsprechend dem normalen zweifachen Chromosomensatz (*peridiploid*; Abb 10).

Karzinome mit mäßiger Prognose (Malignitätsgrad 2) zeigen oft DNA-Werte entsprechend einem vierfachen Chromosomensatz (*peritetraploid*; Abb. 11)

Karzinome mit ungünstiger Prognose (Malignitätsgrad 2) weisen in der Regel in allen Zellen falsche Chromosomensätze auf (*aneuploid*; Abb. 12)

Karzinome mit sehr schlechter Prognose (Malignitätsgrad 4) haben dagegen meist hohe und stark schwankende DNA-Zellkern-Gehalte (*multiploid*; Abb. 13).

Für folgende Tumoren sind wissenschaftlich erprobte und prognostisch bedeutsame Malignitätsgradierungen durch Messungen des DNA-Gehaltes beschrieben worden:

- Mundkrebs (Schimming et al., 1998)
- Brustkrebs (Fallenius et al., 1988)
- Gebärmutterhalskrebs (Grote et al., 2001)
- Eierstockkrebs (Kristensen et. al., 2003))
- Karzinoide des Dünndarms (Raatz et al., 2004)
- Prostatakrebs (Tribukait, 1993)

Die DNA-Zytometrie dient beim Prostatakarzinom in erster Linie der Bestimmung seiner Aggressivität (seines Malignitätsgrades). Je bösartiger ein Krebs ist, je eher beeinträchtigt er die Lebenserwartung seines Trägers und umso wahrscheinlicher setzt er Tochtergeschwülste (= Metastasen) oder taucht nach stattgefundener Behandlung erneut auf (= Rezidiv). Je geringer der Malignitätsgrad eines Tumors ist, umso weniger gefährlich ist er. So gibt es Prostatakarzinome, deren Malignitätsgrad so gering ist, dass

die davon betroffenen Männer aller Voraussicht nach daran nicht sterben werden (und das sind mehr als 50 % aller Prostatakarzinome, *Tribukait*, 1993).

Man spricht dann von „insignifikanten Karzinomen“, die auch keiner Behandlung bedürfen (solange sie nicht im Laufe der Jahre aggressiver geworden sind, *Mikuz*, 1997). Dabei handelt es sich vor allem um Prostatakarzinome niedriger aber vereinzelt auch mittlerer Malignitätsgrade (Gleason-Scores 2 - 6), welche noch einen weitgehend normalen Gehalt an Erbsubstanz (peridiploid) zeigen. (Abb. 19, 20). Haben sie zudem eine niedrige Wachstumsrate unter 5 %, so gilt dies umso mehr (*Ahlgren* et al., 1997; *Tribukait*, 2005).

Eine exakte Bestimmung des Ausmaßes der Malignität (sog. „Malignitätsgrading“) des Prostatakarzinoms ist notwendig, um über eine geeignete und angemessene Therapie entscheiden zu können. Da das Ausmaß der Bösartigkeit bei kaum einem anderen Krebs so stark schwankt, wie beim Prostatakarzinom (von „Haustierkrebs“ bis „Raubtierkrebs“ der Laiensprache), kommt es bei ihm auch leicht zu einer „Übertherapie“. Wenn ein Tumor aller Voraussicht nach seinem Träger auch ohne Therapie nicht lebensgefährlich wird, dann kann man solange auf eine Therapie verzichten, wie er so harmlos bleibt (z. B. peridiploid; *Tribukait*, 1993).

Wenn es andererseits Prostatakarzinome gibt, von denen man weiß, dass sie auf bestimmte Behandlungen, wie z. B. eine Hormontherapie, sogar mit einer Wachstumsbeschleunigung antworten, dann muss man diese meiden. Dies trifft für DNA-peritetraploide Prostatakarzinome zu (Abb. 21) *Tribukait*, 1993; *Pollak* et al., 2003).

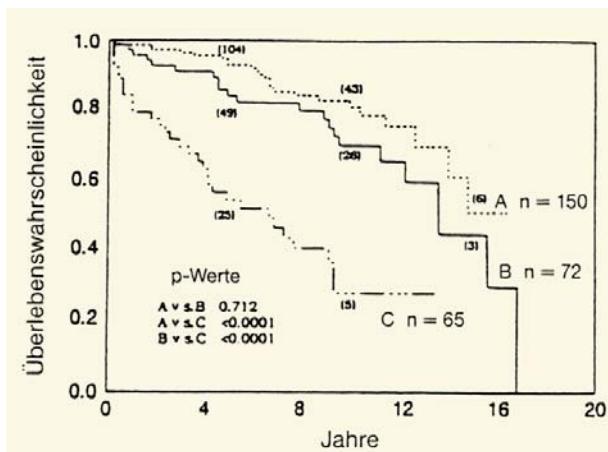


Abb.19: Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit unbehandeltem Prostatakarzinom in Abhängigkeit von ihrer DNA-Verteilung: A = peridiploid, B = peritetraploid, C = x- oder multiploid (*Tribukait*, 1993)

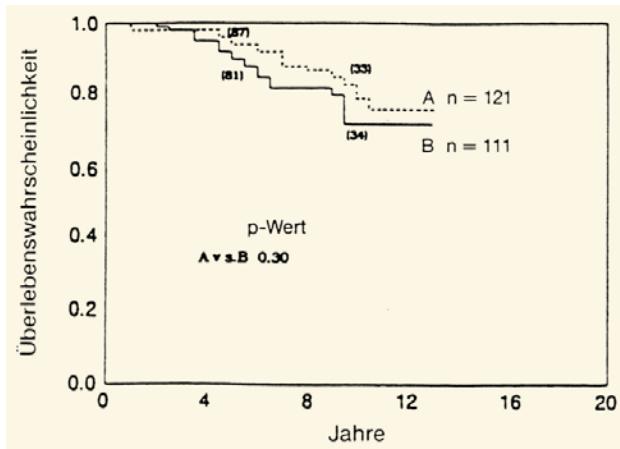


Abb.20: Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit unbehandeltem (A) und hormonell behandeltem (B) Prostatakarzinom peridiploider DNA-Verteilung (Tribukait, 1993)

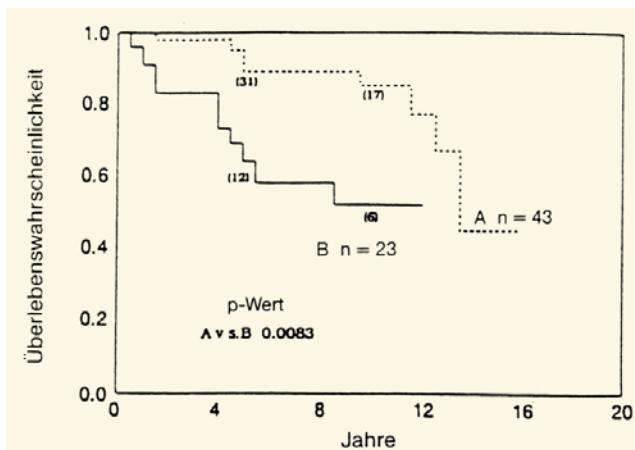


Abb.21: Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit unbehandeltem (A) und hormonell behandeltem (B) Prostatakarzinom peritetraploide DNA-Verteilung (Tribukait, 1993)

### **5.3. Therapie-Monitoring**

Oft ist es für Arzt und Patient von Interesse, schon während einer spezifischen Behandlung eines Tumors, zum Beispiel mit Hormonen, Strahlen oder Zytostatika, zu erfahren, ob dieser darauf anspricht oder nicht. Tut er dies nicht, so sollte ggf. die Therapie geändert werden. In der DNA-Zytometrie zeigt sich ein Ansprechen auf die Behandlung frühzeitig durch eine relative "Normalisierung" der DNA-Verteilung der Tumorzellen. Sinkt unter Therapie der DNA-Malignitätgrad ab oder finden sich weitgehend wieder normale (peridiploide) Werte, darf dies als Behandlungserfolg gewertet werden. Ein derartiges Therapie-Monitoring wurde zum Beispiel für das Prostatakarzinom von folgenden Autoren belegt: *Böcking et al.*, 1985, *Leistenschneider*, 1982; *Al-Abadi und Nagel*, 1995 und für den Bindegaukrebs belegt (*Cartsburg et al.*, 2001).

## **6. Untersuchungsmaterialien und Bearbeitung**

Die DNA-Bildzytometrie kann an folgenden Untersuchungsmaterialien durchgeführt werden:

- Feinnadelaspirationsbiopsien (FNAB's)
- Stanzbiopsien
- Operationspräparaten.

### **6.1. Feinnadelaspirationsbiopsien**

Am einfachsten, genauesten und preiswertesten kann eine DNA-Bildzytometrie an bereits konventionell gefärbten Ausstrichen (auf Glasobjektträgern) z. B. von FNAB's der Prostata durchgeführt werden (Abb. 14, 15).

### **6.2. Stanzbiopsien**

Die mit speziellen Hohlnadeln (z. B. TruCut) gewonnenen, bleistiftminendicken Gewebszylinder von Stanzbiopsien werden in 10 %igem Formalin dauerhaft fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, um davon etwa 4 µm dünne, gefärbte Schnitte anzufertigen. Diese begutachtet der Pathologe im Mikroskop. Nachdem er auf den auf Glasplättchen aufgezogenen Schnitten die Tumor-Regionen mit einem Filzschreiber markiert hat, welche Krebs enthalten, können diese gezielt aus dem Paraffinblock herausgelöst werden (Mikromanipulation; Abb. 22). Sie werden dann mit Enzymen (Pepsin) bis auf die Zellkerne aufgelöst (Abb. 23). Diese werden durch Zentrifugieren auf einem Glasobjektträger angereichert und anschließend zur DNA-Messung spezifisch nach Robert Feulgen (1924) gefärbt.



Abb.22: Tumorgewebe wird aus in einem Paraffinblock eingegossenem Gewebe für die enzymatische Zellvereinzelung isoliert



Abb.23: Zur Isolierung von Tumor-Zellkernen wird der Gewebsschnitt in einen Gazebeutel gesteckt

### 6.3. Operationspräparate

Operativ entfernte Organe oder deren Teile, wie z.B. der Prostata werden ebenfalls in 10 %igem Formalin fixiert und vom Pathologen in kleinere Teile zerschnitten. Diese werden dann in flüssiges, heißes Paraffin eingelegt. Nach dem Erkalten fertigt man davon gefärbte, 4 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) dünne Schnitte an, und begutachtet sie unter dem Mikroskop. Die so festgestellten Krebsherde werden, wie bei „Stanzbiopsien“ beschrieben, aus den Paraffinböcken herausgelöst und ebenso gemessen.

### 6.4. Feulgenfärbung

Der Zweck dieser Färbung ist eine spezifische, stöchiometrische Färbung der Erbsubstanz DNA für ihre zytometrische Mengenbestimmung (Abb. 24).

Die Feulgen-Färbung weist DNA cytochemisch nach. Das Prinzip der Reaktion beruht darauf, dass fuchsinschweflige Säure mit mindestens je zwei Aldehydgruppen eine rot gefärbte Verbindung eingeht.

Durch saure Hydrolyse werden die Purinbasen Adenin und Guanin aus den DNA-Molekülen entfernt, wobei als Folge der helikalen Struktur der DNA eine "Treppe" aus freien Aldehydgruppen entsteht. An die purinfreie Treppe lagert sich die fuchsinschweflige Säure an. Mit Ribonukleinsäuren (RNA) fällt die Reaktion dagegen negativ aus, da der Abstand der einzelnen "Treppenstufen" nicht 10 Ångström beträgt und die Aldehydgruppen räumlich eine Verbindung mit dem Fuchsin nicht ermöglichen.



Abb.24: Automat für die Temperatur-kontrollierte Feulgen-Färbung

## **7. Qualitätssicherung und Kontrolle**

Die Methode der diagnostischen DNA-Bildzytometrie ist in allen Details international standardisiert (vier Konsensus-Reports der European Society for Analytical Cellular Pathology, ESACP; *Böcking et al.*, 1995; *Haroske et al.*, 1997, 2001; *Giroud et al.*, 1998). Dies betrifft die einheitliche Definition und Verwendung von Begriffen, erforderliche Methodik und Messpräzision, interne Kalibrierung, Fehlerkorrekturen, diagnostische Interpretationen der Messergebnisse sowie Maßnahmen zur Qualitätskontrolle. Unter der Qualitätssicherungs-Initiative (QUIP) der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Berufsverbandes Deutscher Pathologen finden Ringversuche zur Qualitäts-Kontrolle der diagnostischen DNA-Bildzytometrie statt, an denen sich jedes Institut für Pathologie oder Zytopathologie beteiligen kann.

Gemäß den Empfehlungen der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) sollten in Abhängigkeit von der diagnostischen Situation folgende Maßnahmen der Qualitätssicherung und -Kontrolle ergriffen werden:

### **7.1. Für jedes neue, Gewebe-spezifische Präparationsprotokoll**

Dafür sollte eine sog. Hydrolysekurve (Auftragung der IOD der Zellkerne über die Hydrolysezeit) zur Ermittlung der optimalen Dauer der salzauren Hydrolyse je nach Zelltyp, Fixation und Präparation angelegt werden, sowie ein PRESS-PRO4-Test durchgeführt werden

Dies ist ein Standardtest zu Kontrolle der Qualität der gesamten Methodik, von der DNA-Färbung bis zu den IOD-Messungen an einzelnen Zellkernen, bestehend aus der Messung von Epithelzellen und Lymphozyten in Rattenleber-Tupfpräparaten. Das sog. „PRESS-PRO4-Slide“ ist ein Glasobjekträger, auf welchem vier Luft-getrocknete Abtupfpräparate von der Schnittfläche einer Rattenleber aufgebracht sind. Dieses wurde im Rahmen des sog. „PRESS-Projektes“ der EG (Prototype Reference Standard Slides) entwickelt und von der European Society for Analytical Cellular Pathology, (ESACP) als Standard-Testpräparat für die diagnostische DNA-Bildzytometrie empfohlen (*Giroud et al.*, 1998). Davon sollten vier im selben Färbebad nach Feulgen fixiert und gefärbt werden. Mindestens 50 Zellen jedes Typs sollten in jedem Tupfareal gemessen werden (d. h. 50, diploide, 50 tetraploide und 50 octoploide Hepatozyten und 50 Lymphozyten). Dies sollte mindestens einmal im Jahr für jede Messeinrichtung geschehen und immer dann, wenn irgendeine Änderung am Präparations-, Färbe- oder Messprotokoll vorgenommen wurde. Die Messergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die Qualität der Präparation, Fixation, Färbung und Messpräzision. Folgende Maßzahlen müssen dabei unterschritten werden:

Variationskoeffizient (CV) der IOD jedes Peaks eines Zelltyps in jedem der vier Tupf-areale < 5%

Korrelationskoeffizient r der Kernfläche versus der IOD für jeden Peak < 0,4

Variationskoeffizient (CV) der mittleren IOD's für denselben Zelltyp (Referenzzellen, 2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen Tupfarealen < 3 %

Variationskoeffizient (CV) der Verhältnisse der Peaks von Referenz- zu Analysezellen zwischen allen Tupfarealen < 2 %

Variationskoeffizient der Verhältnisse der Mittelwerte der Peaks von diploiden und tetraploiden Hepatozyten zwischen allen Tupfarealen < 1 %.

Sofern einer der Schwellwerte überschritten wird, muss das Protokoll der Präparation, Färbung und Messung überprüft werden.

## 7.2. Für jede neue Färbung

In jedem Färbegang sollte ein Zellpräparat mitgeführt werden, welches nicht dem Schiffsschen Reagenz ausgesetzt wird (Negativ-Kontrolle).

Die integrierten optischen Dichten (IOD's) der Referenzzellen sollten nicht mehr als 10 % Abweichung vom Mittelwert der vorherigen Messungen zeigen Färbestandard).

## 7.3. Für jede neue Messung

- Die Justierung des Mikroskops nach dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip muss gewährleistet sein
- Ein Schwarzabgleich des TV-Kamera-Framegrabber-Systems ist durchführen (bei Farbkameras zumindest für den Grünkanal)
- Der Variationskoeffizient (CV) der Referenzzellen sollte unter 5 % betragen
- Der relative Fehler des Mittelwertes (REM) der Referenzzellen sollte kleiner als 1,5 % sein
- Es sollten nicht weniger als 30 Referenzzellen zur internen Kalibrierung im selben Präparat gemessen worden sein
- Die mittlere integrierte optische Dichte (IOD) der Referenzzellen darf nicht mehr als 10 % Abweichung vom Mittelwert der vorherigen Messungen betragen
- Der Korrelationskoeffizient  $r$  der Kernfläche vs. die IODs der Referenzzellen sollte <0.4 betragen
- Es sollte keine Drift der IOD Werte während der Messung feststellbar sein.
- Bei wiederholten Überschreitungen von Schwellwerten in Einzelmessungen muss das Präparationsprotokoll und das Meßsystem überprüft werden ("PRO-4 Test", Giroud et al., 1998).

## **8. Diagnostische Interpretationen**

### **8.1. Dignitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Dignität einer Läsion geschieht durch den qualitativen Nachweis von DNA-Aneuploidie über die

#### Identifizierung abnormer Stammlinien

Dazu wird die Lage eines unbekannten Peaks mit den Lagen normaler Peaks verglichen (Stammlinien-Interpretation von DNA-Aneuploidie; Abb 9, 11, 12),

oder die

#### Identifizierung von abnorm hohen Einzelwerten (Exceeding Events)

Dazu wird der DNA-Gehalt einzelner Zellen auf Zugehörigkeit zu Zellzyklusphasen pathologischer Zellpopulationen getestet (Einzelzell-Interpretation von DNA-Aneuploidie; Abb. 8).

Definitionen relevanter Termini:

#### Der DNA-Index (DI) eines Histogramm-Peaks

ist der Modalwert eines Peaks geteilt durch den Modalwert des (diploiden) Referenzzellpeaks.

#### Die DNA-Stammlinienploidie

ist der Modalwert einer Stammlinie in Einheiten von "c", d.h.  $DI \times 2c$  (c steht für DNA-content).

#### Unter Abnormalität einer DNA-Stammlinie (Stammlinien-Aneuploidie)

versteht man eine STL, deren Modalwert außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls der Modalwerte von G0/1-Phasen nichtpathologischer Zellpopulationen liegt (gemessen unter gleichen methodischen Bedingungen). D.h. eine STL ist abnormal, wenn sie außerhalb der Bereiche um  $2c$ ,  $4c$ , oder  $8c$  (multipliziert mit dem Korrekturfaktor,  $+/- 2 \times SD$  dieses Faktors) liegt. In der Praxis wird meist mit einer 10 %igen Unter- oder Überschreitung von  $2c$ ,  $4c$  oder  $8c$  gearbeitet.

#### Eine Polyploidisierung

liegt vor, wenn der Modalwert eines Peaks nicht außerhalb des 95 % Konfidenzintervalls der Verdopplungspositionen nichtpathologischer, polyploidisierender Zellpopulationen liegt (gemessen unter gleichen methodischen Bedingungen).

#### Die Irrtumswahrscheinlichkeit p

der Zugehörigkeit des Modalwertes eines Peaks zur Grundgesamtheit aller nichtpathologischen Peaks berechnet sich wie folgt:

$$p(t) = 2 * \frac{1}{\sqrt{2 * \pi}} * \int_t^{\infty} e^{-\frac{x^2}{2}} * dx$$

$$t = \frac{1 - \frac{M_A}{M_R * cf}}{\sqrt{\frac{cv_R^2}{n_R} + \frac{cv_A^2}{n_A} + cv_{cf}^2}}$$

wobei die Testgröße t sich ergibt aus:

cf    Korrekturfaktor

MA ... Modalwert des Analysezellpeaks

MR ... Modalwert des Referenzzellpeaks

cvA ...cv des Analysezellpeaks

cvR ...cv des Referenzzellpeaks

n<sub>A</sub> ... Anzahl der Analysezellen im Peak

n<sub>R</sub> ... Anzahl der Referenzzellen im Peak

cv<sub>cf</sub> ... cv des Korrekturfaktors

(Haroske et al., 2000)

Zellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt (sog. Einzelzell-Aneuploidie):

sind Zellen mit einem DNA-Gehalt, der über der Verdopplungs- oder Vervierfachungsregion einer nichtpathologischen G0/1-Phasenpopulation liegt, d.h., der nicht zu einer G2/M-Phase gehört (z. B. 5cEE oder 9cEE) werden als aneuploide Einzelzellen bezeichnet.

Diese abnormalen Zellen können als Absolutzahl (exceeding events „EE“) oder als Häufigkeit (exceeding rate „ER“) angegeben werden (Chatelain et al., 1989).

Die Schwelle, über der Zellen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % nicht mehr zu einer G2/M-Phase gehören, berechnet sich aus:

$$M_{A(d)} * (1 + 3 * cv_{A(d)}) * cf_{poly} * (1 + 2 * cv_{cfpoly})$$

wobei gilt:

M<sub>A(d)</sub>    Modalwert des als diploid klassifizierten Analysezellpeaks (s.o),

cv<sub>A(d)</sub>    Variationskoeffizient des (diploiden) Analysezellpeaks,

cf<sub>poly</sub>    Verdopplungsfaktor polyploidisierender Populationen, d.h.  
M<sub>A(4c)</sub>/M<sub>A(2c)</sub>,

cv<sub>cfpoly</sub>    Variationskoeffizient dieses Verdopplungsfaktors.

(Haroske et al., 2000)

Die Wahl der Verdopplung oder Vervierfachung hängt ab vom Auftreten einer physiologischen euploiden Polyploidisierung in dem zu untersuchenden Gewebe. (Biesterfeld

et al. 1994). 5c oder 9c sind nur hinreichend sichere Schwellen für diese Feststellung, wenn Messfehler ausgeschlossen werden können.

Mithilfe der genannten Algorithmen erfolgt die Klassifizierung eines DNA-Histogramms in euploid, polyploid oder aneuploid. Diese Histogrammklassen sind von einem Grading des Histogramms zu prognostischen Zwecken zu unterscheiden (siehe dort).

### **8.1.1. Diagnostisch und prognostisch relevante Prinzipien der Interpretation von DNA-Histogrammen sind:**

- Nachweis einer diploider Stammlinie (2c +- 10%) (Abb 6)
- Nachweis euploid-polyploider Stammlinien (4c, 8c, 16c +- 10%) (Abb. 7)
- Nachweis aneuploider Einzelzellen (9cEE) (Abb. 8)
- Nachweis einer aneuploiden Stammlinie (>< 2c, 4, 8c, 16c +-10%) (Abb. 9)
- Nachweis mehrerer aneuploider Stammlinien (>< 2c, 4c, 8c, 16c +- 10%) mit Polyploidisierung
- Nachweis mehrerer aneuploider Stammlinien ohne Polyploidisierung (>< 2c, 4c, 8c, 16c +- 10%) (Abb. 13)
- Nachweis der Kombination von 3. mit 4, 5 oder 6
- Die Bestimmung der Dignität einer Läsion geschieht über den qualitativen Nachweis von DNA-Aneuploidie (Abb. 8, 9, 12, 13)
- Die Bestimmung des Malignitätsgrades bzw. des Progressionsrisikos einer Läsion geschieht über die Quantifizierung von DNA-Aneuploidie (Abb. 10 - 13)
- Die Bestimmung des Therapieerfolges einer Läsion geschieht über die Beurteilung einer prognostisch relevanten Änderung des DNA-Histogramms über die Zeit
- Die Histogrammtypen peridiploid bis multiploid (Abb. 10 - 13) geben eine mit der Tumorprogression zunehmende maligne Potenz wieder

### **8.2. Malignitätsgrading**

Die Bestimmung des Malignitätsgrades bzw. des Progressionsrisikos einer Läsion geschieht über die Quantifizierung von DNA-Aneuploidie durch

- die Identifizierung von Stammlinien als abnorm (aneuploid)
- die Bestimmung der Lage von Stammlinien
- die Bestimmung der Zahl abnormer Stammlinien (siehe 8.1)

- die Ermittlung „komplexer Variablen“
- die Identifizierung abnorm hoher Einzelwerte (Exceeding Events)
- im (visuellen) Kontext des Histogramms und nach den problemspezifischen Entscheidungsschwellen.

### **8.2.1. Algorithmen zum Malignitätsgrading**

Die Malignitätsgradierung aufgrund der DNA-Verteilung in Histogrammen geschieht nach folgenden Prinzipien:

- Das Prognose-relevante Ausmaß an DNA-Aneuploidie wird Tumortyp-spezifisch quantifiziert (z.B. unterschiedlich für Prostatakarzinome oder chronisch-lymphatische Leukämie)
- Die biologische Grundlage dafür stellt die zytogenetische Tumorprogression dar, welche für histogenetisch verschiedene Tumoren unterschiedlich sein kann
- Die Terminologie der DNA-Zytometrie zum Malignitätsgrading unterscheidet sich von derjenigen zur diagnostischen Interpretation
- Für jedes DNA-Histogramm sollte zusätzlich zur prognostischen DNA-Ploidiegradierung Zahl und exakte Lage der DNA-Stammlinie(n) angegeben werden.

Für einige solide Tumoren (Mamma-, Prostata-, Urothel-, Nierenkarzinome) hat sich eine durch die jeweilige zytogenetischen Tumorprogression begründete (Böcking et al. 1994; Böcking A, 1995; Füzesi, 1993) Einteilung in vier DNA-Ploidiegrade bewährt (Haroske et al. 2002), welche auf Zahl und Lage von DNA-Stammlinien beruht: peridiploid, peritetratploid, x-ploid, multiploid. Zwischen diesen vier DNA-Malignitätsgraden gibt es fließende Übergänge.

Für andere solide Tumoren (Kehlkopf-, Magen-, Colon-, Ovarial-, Cervix-uteri-Karzinome) hat sich die einfache Unterscheidung in DNA-peridiploide (DNA-STL  $>1.80c <2.20c$ ) und DNA-Aneuploide (übrige DNA-STL-Lagen) bewährt.

Für spezifische Tumoren wird in der Literatur darüber hinaus über die prognostische-Relevanz spezieller Indices der DNA-Verteilung berichtet:

- Riesenzelltumoren des Knochens: 2c Deviation-Index, 2cDI (Sun et al., 1992)
- Chronisch-myeloische Leukämie: Stammlinien-Schulter-Fraktion: SSF, Proliferations-Fraktion: PRF (Kropff et al., 1991)
- Karzinoide: diploid mitgeringer und hoher Proliferationsfraktion, tetraploid (Raatz et al., 2003)

### **8.3. Therapie-Monitoring**

Um das Ansprechen einer konservativen Tumorthерапie an Änderungen der DNA-Verteilung frühzeitig zu erkennen, ist auf Folgendes zu achten:

- Ist es zu einem Absinken eines prognostisch validen Index oder von Histogramm-Typen im Vergleich zum zytometrischen Vorbefund gekommen (z. B. DNA-MG, 2cDI, Typen nach *Tribukait 1993*)?
- Wenn Ja, um welchen Betrag und in welcher Zeit?
- Ggf. Angabe des DNA-Regressionsindexes als  $\Delta\text{-DNA-MG} : \Delta t$  (Monaten) = RI (*Böcking, 1985*)
- Ein prognostisch ungünstiges "DNA-Upgrading" liegt vor, wenn es im spontanen Verlauf oder unter Therapie zu einer Erhöhung des DNA-Ploidiegrades bzw. zum Auftreten zusätzlicher aneuploider DNA-Stammlinien kommt.
- Ein prognostisch günstiges "DNA-Downgrading" liegt vor, wenn es unter Therapie zu einer Erniedrigung des DNA-Ploidiegrades bzw. zum Verlust von aneuploiden DNA-Stammlinien kommt. Spontan kommt dies nicht vor (*Böcking et al., 1985*).

### **8.4. Histogramm-Systematik**

Die Benennung von Zellkern-DNA-Verteilungen erfolgt in Abhängigkeit vom Vorkommen abnorm hoher DNA-Gehalte in einzelnen Zellen (rare events)- sowie von Lage und Zahl nachgewiesener DNA-Stammlinien (Tabelle 2). Der Nachweis von Aneuploidie aufgrund einzelner, abnorm hoher Zellkern-DNA-Gehalte ist abhängig vom Vorkommen von Polyploidisierung im untersuchten Zelltyp (beim Vorkommen von tetraploider Polyploidie im vermessenen Zelltyp gilt die 9c-Schwelle).

		Rare events				Neoplasie morphologisch nachgewiesen
		5cEE = 0	5cEE > 0	9cEE = 0	9cEE > 0	
Stammlinien-Lage	1 STL: 2c $\pm 10\%$	<i>euploid/</i> <i>diploid</i>	aneuploid/ peridiploid	<i>euploid/</i> <i>diploid</i>	aneuploid/ peridiploid	peridiploid
	1 STL: 4c $\pm 10\%$		aneuploid/ peritraploid	<i>euploid/</i> polyplloid	aneuploid/ peritraploid	peritraploid
	1 STL: $><$ 2c/4c $\pm 10\%$	aneuploid/ x-ploid	aneuploid/ x-ploid	aneuploid/ x-ploid	aneuploid/ x-ploid	aneuploid/ x-ploid
	$> 1$ STL: $><2c/4c$ $\pm 10\%$	aneuploid/ multiploid	aneuploid/ multiploid	aneuploid/ multiploid	aneuploid/ multiploid	aneuploid/ multiploid

Tabelle 2: Benennung von DNA-Histogrammen in Abhängigkeit vom Vorkommen einzelner Zellen mit abnorm hohem DNA-Gehalt ( $>5c$ ,  $>9c$ ) und der Lage der DNA-Stammlinien Kursiv: DNA-Verteilung entspricht keiner Neoplasie. Nicht kursiv: DNA-Gehalt entspricht einer Neoplasie

## 9. Diagnostische Berichte

Vier sog. „Consensus Reports“ der Europäischen Gesellschaft für analytische zelluläre Pathologie (ESACP) haben alle methodischen Details der diagnostischen DNA-Bildzytometrie festgelegt und veröffentlicht (Böcking et al., 1995; Giroud et al., 1998; Haroske et al., 1998, 2001). Dazu gehören auch Standards der diagnostischen Interpretation der Messergebnisse. Böcking und Nguyen haben diese im Jahre 2004 in Auszügen wiederholt.

Empfehlungen für eine standardisierte Befunderstellung in der diagnostischen DNA-Zytometrie.

## **9.1. Dignitätsdiagnostik**

Ein Bericht der diagnostischen DNA-Zytometrie sollte folgende Aspekte berücksichtigen:

- Wiederholung der vorangegangenen histologischen/zytologischen Diagnose
- Angabe des Zwecks der DNA-Zytometrie
- Verwendetes Untersuchungsmaterial (Typ)
- Typ und Anzahl gemessener Referenzzellen
- Typ und Zahl gemessener Analysezellen
- Kurze Deskription der DNA-Verteilung
- Interpretation der DNA-Verteilung betreffend des Vorliegens von DNA-Aneuploidie
- Zusammenfassende morphologisch-zytometrische Diagnose
- Anlagen: DNA-Histogramm(e) und relevante Indices der DNA-Verteilung
- Verwendete diagnostische Algorithmen

Nachträgliche Änderungen der Diagnosen in eindimensionalen, unspezifischen, nur die Dignität betreffende Nomenklaturen sind erlaubt (z. B. zweifelhaft, dringender Verdacht, sicher positiv). Nachträgliche Änderungen der Diagnosen in mehrdimensionalen, spezifischen Nomenklaturen wie z. B. der Münchener II- oder Bethesda-Nomenklatur (HPV-Infekt, verschiedene Dysplasiegrade, Dignität, Staging) sind nicht sinnvoll.

## **9.2. Malignitätsgrading**

- Wiederholung einer vorangegangenen histologischen oder zytologischen Diagnose
- Zweck der DNA-Zytometrie
- Typ des Untersuchungsmaterials
- Typ und Zahl der Referenzzellen
- Typ und Zahl der Analysezellen
- Kurze Deskription der DNA-Verteilung
- Prognostische Interpretation der DNA-Verteilung
- Zusammenfassende morphologisch-zytometrische Diagnose

- Anlagen: DNA-Histogramm(e), relevante Indices und verwendete diagnostische Algorithmen) werden beigelegt.

Es gilt das Prinzip, dass spezifische morphologische Diagnosen erhalten bleiben und durch abweichende DNA-zytometrische Befunde nicht nachträglich geändert werden. Die biologische Bewertung dagegen (die Dignität von Zellen oder maligne Potenz von Tumorzellen) darf dagegen nachträglich in der Zusammenschau morphologischer und zytometrischer Befunde geändert werden.

## 10. Vergütung

Die diagnostische DNA-Bildzytometrie ist seit 1994 als Ziffer 4965 im Einheitlichen Bewertungs-Maßstab (EBM) der Krankenkassen als Kassenleistung enthalten. Sie kostete dort etwa 43 €. Im neuen EBM plus 2000 ist sie als Ziffer 19330 vertreten und wird nur noch mit etwa 37 € vergütet. Da dieser Betrag nicht kostendeckend ist, wird die Methode von Pathologen meist nur ungern angeboten. Die Bezahlung durch die privaten Krankenkassen mit ca. 112 € pro DNA-Zytometrie ist schon eher kostendeckend.

### 10.1 An Feinnadelaspirationsbiopsien

pro Material für

- Kassenpatienten ca. 37,00 € (EBM 2000plus: Ziffer 19330).

Sofern ein Überweisungsschein vorliegt, zahlt die gesetzliche Krankenkasse.

- Kassenpatienten 61,08 €, Ziffer 4852 + 4865 (GOÄ analog: 2 x 4815 + 4852) plus Porto 2,20 €.

Sofern kein Überweisungsschein vorliegt, zahlt der Patient selbst (IGeL-Leistung).

- Privatpatienten 145,60 €, Ziffer 4852 + 4865 (GOÄ analog: 2 x 4815 + 4852) plus Porto 2,20 €.

Sofern der Urologe die Untersuchung befürwortet, zahlt die private Krankenkasse, sonst der Patient selbst.

### 10.2 An Stanzbiopsien und Operationsmaterial

für:

- *Kassenpatienten* 61,57 € (EBM 2000plus: Ziffer 19310 + 19312 + 19330).

Sofern ein Überweisungsschein vorliegt, zahlt die gesetzliche Krankenkasse.

- *Kassenpatienten* 113,54 €, Ziffer 3920 + 4852 + 4865 (GOÄ analog: 2 x 4815 + 4852) plus Porto 2,20 €

Sofern kein Überweisungsschein vorliegt, zahlt der Patient selbst (IGeL-Leistung).

- *Privatpatienten* 276,75 €, Ziffer 3920 + 4852 + 4865 (GOÄ analog: 2 x 4815 + 4852) plus Porto 2,20 €

Sofern der behandelnde Arzt die Untersuchung befürwortet, zahlt die private Krankenversicherung, sonst der Patient selbst.

### **10.3 Die gesetzlichen Krankenkassen**

übernehmen bei GKV-Versicherten nach Ausstellung eines Überweisungsscheines durch den behandelnden Arzt an den Pathologen, der die DNA-Zytometrie durchführen soll, die Kosten in voller Höhe. Der Rechnungsbetrag belastet nicht das Praxis-Budget des Urologen, sondern das insgesamt „gedeckelte“ Budget der Pathologen.

### **10.4 Die Privaten Krankenversicherungen**

übernehmen bei für ihre Versicherten in der Regel (manchmal auch nur nach Indikationsstellung durch den behandelnden Urologen) ebenfalls die Kosten in voller Höhe. Die Beauftragung des Pathologen erfolgt in der Regel schriftlich durch den Patienten oder dessen Arzt.

### **10.5 Der Patient**

muss die Kosten selbst tragen, wenn sich bei Kassenpatienten der behandelnde Arzt weigert, einen Überweisungsschein an den Pathologen auszustellen, der das Gewebe DNA-zytometrisch untersuchen soll. Manchmal ist jedoch in solchen Fällen eine Anfrage bei der jeweiligen Krankenkasse sinnvoll, ob die Kosten nicht trotzdem übernommen werden.

Ähnliches gilt auch bei Privatpatienten. Der Patient müsste die Kosten selbst tragen, wenn sich der behandelnde Arzt, eine entsprechende Untersuchung zu befürworten. Die Rechnung des Pathologen sollte aber dennoch der Krankenversicherung zur Erstattung vorgelegt werden, da diese Untersuchung oft auch von den privaten Versicherungen übernommen wird.

## 11. Verantwortlichkeiten

- Der *behandelnde Facharzt* (z. B. Urologe) oder Hausarzt sollte eine Überweisung für die Durchführung einer DNA-Zytometrie an einen Pathologen ausstellen.
- Die Gewebe- oder Zellproben des Karzinoms (z.B. der Prostata) müssen an ein *Institut* versandt werden, welches in der Lage ist, eine diagnostische DNA-Bildzytometrie und ggf eine enzymatische Zellvereinzelung durchzuführen. Eine Auswahl dieser findet sich im Internet unter [www.Sanfte-Krebsdiagnostik.de](http://www.Sanfte-Krebsdiagnostik.de) im Kapitel 3.5: „Wie finde ich qualifizierte Zytopathologen?“.
- Wenn die Untersuchung von einer gesetzlichen Krankenkasse bezahlt werden soll, muss ein vom *vorbehandelnden Arzt* ausgestellter Überweisungsschein beigefügt sein. Wenn die Untersuchung privat bezahlt werden soll (Gebühren siehe oben), so muss dem betreffenden Pathologen ein schriftlicher Auftrag zur Durchführung einer „diagnostischen DNA-Bildzytometrie“ beigefügt werden („ggf. nach enzymatischer Zellvereinzelung“).
- Der primär diagnostizierende *Pathologe* (welcher die histologische Diagnose eines Prostatakarzinoms in der Regel aus der Stanzbiopsie gestellt hat) muss - am besten vom behandelnden Arzt – wenn dieser dazu nicht bereit ist vom Patienten selbst - gebeten werden, das Untersuchungsmaterial an das die DNA-Zytometrie durchführende Institut zu schicken. Für Portokosten muss der Patient ggf. selbst aufkommen.
- Das Untersuchungsmaterial (Gewebe in Paraffin und gefärbte Schnitte) sind juristisch Eigentum des Patienten. Der *Pathologe* hat für beides eine Aufbewahrungspflicht von zehn Jahren. Er hat kein Recht, die Herausgabe dieser Materialien an den Patienten (gegen Quittung) zu verweigern.
- Das die DNA-Zytometrie durchführende *Institut* schickt seinen Befund an den behandelnden Urologen, nachrichtlich an den ihm das Gewebe überlassenen Pathologen. Bei Wunsch des Patienten erhält auch dieser eine Befundkopie. Die Materialien werden anschließend an das primär befundene Institut für Pathologie zurück geschickt. Während der gefärbte Gewebsschnitt unverändert bleibt, wird von dem Gewebe in Paraffin ein 70 µm dünner Schnitt abgenommen. Das die DNA-Zytometrie durchführende Institut kommentiert oder korrigiert den ursprünglichen histologischen Befund nicht.

## **12. Glossar**

### **Zytologie**

Ist die Lehre von den Zellen (cyt, griechisch, die Höhlung, Zelle; logos griechisch, das Wort, die Rede).

### **Zytopathologie**

im Allgemeinen ist die Lehre von den Krankheiten der Zellen. Rudolf Virchow, Pathologe von 1821 – 1902 in Berlin, war der Begründer der Zellularpathologie. Zytopathologie im Engeren ist die mikroskopische Diagnostik von Krankheiten, im Wesentlichen von Krebs an Zellen, die dem menschlichen Körper unblutig entnommen wurden.

### **Diploide DNA-Euploidie**

DNA-Stammlinien mit Modalwerten zwischen 1,8 c und 2,2c, ohne dass in der Probe Zellen mit Werten von über 5c vorhanden sind. Es handelt sich dabei im Falle von Krebszellen um solche mit sehr niedrigen Malignitätsgrad.

### **DNA**

Desoxyribonukleinsäure. Die sog. „Erbsubstanz“. Ein schraubenförmig gewundenes, sehr langes Riesenmolekül, auf welchem in einem molekularen Code alle Erbinformationen der Lebewesen gespeichert sind.

### **DNA-Histogramm**

Ein DNA-Histogramm zeigt graphisch die Häufigkeitsverteilung des DNA-Gehaltes von Zellen einer Probe (aufgezeichnet als sog. IOD-Werte = integrierte optische Dichte), die durch Messung mit quantitativen DNA-Farbstoffen gefärbter Zellkernen (nach Feulgen-Färbung) erhalten wurden. Der Messung der Probe liegt meist mit internen Referenzzellen (z. B. Bindegewebszellen) (in c-Einheiten angegeben) zu Grunde. Eine c-Einheit entspricht dem halben (= einfachen oder haploiden) DNA-Gehalt einer normalen Zelle. Diploide Zellen entsprechen somit einem 2c-Wert, peridiploide Zellen weisen sich durch einen DNA-Gehalt zwischen 1,8c und 2,2c aus.

### **DNA-Histogramm– Peak**

Ein statistisch signifikantes und graphisch deutliches, scharfbandiges Maximum in einem DNA-Histogramm.

## **DNA-Stammlinie**

Die G0 / G1-Phase-Fraktion einer proliferierenden Zellpopulation (mit einem ersten, sowie einem zweiten Häufigkeitsgipfel in seiner Verdopplungsregion). G0/G1-Phasezellen sind Zellen, die sich in Ruhe oder in Differenzierung zu ihrer spezifischen Funktion (z. B. Drüsenzelle) befinden und sich in dieser Phase des Zellzyklus nicht teilen.

## **DNA-Stammlinien-Ploidie**

Der häufigste (=modale) Wert eines DNA-Histogramm-Gipfels, d.h. der Mittelwert derjenigen Gruppe von Zellen im Histogramm, die die höchste Zahl an Zellkernen mit gleichem DNA-Gehalt aufweist.

## **DNA-Euploidie**

Diejenige DNA-Verteilung, die nicht von der einer normalen Zellpopulation (ruhender, proliferierender oder polyploider Zellen) unterschieden werden kann. Sie findet sich ausschließlich in gutartigen Zell- oder Gewebsproben.

## **DNA-Aneuploidie**

Diejenigen DNA-Verteilungen, die sich statistisch signifikant von normalen (ruhenden, proliferierenden oder polyploidisierenden) Zellpopulationen unterscheiden. DNA-Aneuploidie kann als Stammlinien-Aneuploidie und / oder als Einzelzell-Aneuploidie (rare events) auftreten.

## **DNA-Stammlinien-Aneuploidie**

DNA-Stammlinien, die weder diploid noch polyploid sind, mit Modalwerten außerhalb der Messwertbereiche 1,8c bis 2,2c und 3,6c bis 4,4c. Es handelt sich dabei im Falle von Krebszellen um solche mit einem höheren Malignitätsgrad.

## **DNA-Einzelzell-Aneuploidie**

Es handelt sich um abnorme Zellen, die auch „rare-events“ oder 5c- bzw. 9c-Exceeding-Events (5cEE, 9cEE) genannt werden. Deren DNA-Gehalte sind höher, als das Zweifache oder Vierfache einer normalen G0 / G1-Phase-Population plus einem einzurechnenden Messfehlerbereich. Die DNA-Werte sind also höher, als in Zellen kurz vor oder während der Zellteilung. Es handelt sich um Tumorzellen mit abnormen, hoch aneuploiden Chromosomensätzen.

## **DNA-euploide Polyploidisierung**

Das Vorkommen von Häufungen in den Verdopplungsregionen eines euploiden Peaks bei 2c (4c, 8c, 16c, 32c, 64c).

## **DNA-aneuploide Polyploidisierung**

Das Vorkommen von Häufungen in Verdopplungsregionen aneuploider Stammlinien (z. B. 2,5c, 5c, 10c).

## **DNA-peridiploid**

Eine DNA-Stammlinie mit einem Modalwert zwischen 1,8c und 2,2 c.

## **DNA-peritraploid**

Eine DNA-Stammlinie zusätzlich zur peridiploiden mit einem Modalwert zwischen 3,6c und 4,4c.

## **DNA-x-ploid**

Eine DNA-Stammlinie mit einem Modalwert außerhalb der oben erwähnten Schwellwerte (1,8c – 2,2c oder 3,6c – 4,4c). Für x- kann der gemessene Ploidiewert der DNA-Stammlinie eingesetzt werden. (Z. B. peritriploid, hyperdiploid , hyperpentaploid. Es handelt sich dabei im Falle von Krebszellen um solche mit höherem Malignitätsgrad.

## **DNA-multiploid**

Vorkommen von mehr als einer abnormen, d. h. mehrerer aneuploiden Stammlinien (auch als „Manhattan-skyline“ bezeichnet).

## **DNA-Bildzytometrie**

Bestimmung der DNA-Gehalte von spezifisch angefärbten Zellkernen auf Objektträgern an Bildern von Fernseh- oder Digitalkameras durch Messung der integrierten optischen Dichte.

## **DNA-Flusszytometrie**

Bestimmung des DNA-Gehaltes von spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbten Zellkernen in Flüssigkeiten durch Messung des Fluoreszenzlichtes nach Anregung mit Laser- oder UV-Licht.

## **Euploid – Diploid**

Damit werden Zellen benannt, die in der Messung Werte zwischen 1,8c und 2,2c (sog. peridiploide Zellen) ergeben. Wenn es sich dabei um Krebszellen handelt, dann um solche mit einem sehr niedrigen Malignitätsgrad.

## **Histopathologie**

Im engeren Sinne die mikroskopische Diagnostik von Krankheiten, im wesentlichen von Krebs, an Geweben, die dem Menschen durch Operationen oder Biopsien mit Skalpellen, Nadeln oder Zangen entnommen worden sind.

## **Modalwert eines DNA-Histogramms**

Der häufigste (modale) Wert eines DNA-Histogramm-Peaks, d.h. der Mittelwert derjenigen Histogramm-Klasse, die die höchste Zahl an Zellkernen aufweist. Dieser Wert ist gleich oder ähnlich dem Mittelwert einer angepassten Gauss-Kurve.

## **Stammlinie**

Unter einer Stammlinie versteht man eine proliferenden Population zytogenetisch einheitlicher Zellen. Unter einer DNA-Stammlinie dementsprechend einen Häufigkeitsgipfel (Peak), zu dem ein zweiter beim doppelten DNA-Gehalt nachweisbar ist (entsprechend der G2/M-Phase des Zellzyklus) oder zumindest Werte oberhalb des der G0/1-Phase entsprechenden Peaks.

## **13 . DNA-Bildzytometrie anbietende Institute in Deutschland**

**(Stand: November 2005)**

Name	Adresse	Telefon
Priv.-Doz. Dr. med. H. Al-Abadi Chirurgische Klinik und Poliklinik	Klinikum Rudolf Virchow	Tel: (030) 45050

	Humboldt-Universität Augustenburger Platz 1 13353 Berlin	
Prof. Dr. med. U. Bleyl Pathologisches Institut	Kliniken der Stadt Mannheim Theodor-Kutzer-Ufer 1- 3 68167 Mannheim	Tel: (0621) 383-2275 Fax: (0621) 383- 2705
Prof. Dr. med. M.-H. Bohrer Institut für Pathologie	Kliniken der Stadt Ludwigshafen GmbH Bremserstraße 79 67062 Ludwigshafen	Tel: (0621) 5030
Dr. med. Reinhard Bollmann, Frau Dr. med. M Varnai- Bollmann Frau Dr. med. Magdalna Varnai- Bollmann Institut für Pathologie	Heilsbachstraße 15 53123 Bonn	Tel: (0228) 986550 Fax: (0228) 9865555
Dr. med. U. Bonk Institut für Pathologie	Zentralkrankenhaus Bremen-Nord Hammersbecker Straße 228 28755 Bremen	Tel: (0421) 6606- 1472 Fax: 0421) 6606- 1594
Dr. med. U. Bosse Praxis für Pathologie und Cyto- pathologie	Carl-Stolcke-Straße 4 49090 Osnabrück	Tel: (0541) 124051
Prof. Dr. med. A. Böcking Institut für Cytopathologie	Universitätsklinikum der HHU Düsseldorf Moorenstraße 5 40225 Düsseldorf	Tel: (0211) 81-18346 Fax: (0211) 81- 18402 Boecking@uni- duesseldorf.de
Priv.-Doz. Dr. med. M. Brock- mann Pathologisches Institut	Krankenhaus Köln- Merheim Ostmerheimerstraße 200 51109 Köln	Tel: (0221) 89070
Prof. Dr. med. K.-F. Bürrig Prof. Dr. med. F. Huth Institut für Pathologie	Städt. Krankenhaus Weinberg 1 31134 Hildesheim	Tel: (05121) 894314 Fax: (05121) 894780
Prof. Dr. med. Günter Delling Institut für Pathologie Universität Hamburg Abteilung Osteopathologie	Universität Hamburg Martinistraße 52 20246 Hamburg	Tel (040) 4717-2171 Fax: (040) 4717- 2164

Prof. Dr. med. Konrad Donhuijsen Institut für Pathologie	Städt. Krankenanstalten Celler Straße 38 38114 Braunschweig	Tel. (0531) 595-3310 Fax: (0531) 595-3449
Dr. med. J.-U. Dröszus Institut für Pathologie	Wilhelmshöher Allee 287 34117 Kassel	Tel: (0561) 3165504
Dr. med. Hans Otto Frey Institut für Laboratoriumsmedizin	Max-Lang-Straße 58 70771 Leinfelden	Tel.: (0711) 9033-166 Fax: (0711) 9033-164 frey@synlab.de
Prof. Dr. med. Johannes Friemann Institut für Pathologie	Märkische Klinik GmbH Paulmannshöher Straße 14 58515 Lüdenscheid	Tel.: (0235) 462660
Prof. Dr. med. Ursula Geißler Klinisch-Morphologische Laborato- rien Klinik und Poliklinik für Frauen- heilkunde und Geburtshilfe	Technische Universität Dresden Fetscher Straße 74 01307 Dresden	Tel: (0351) 458-2764
Dr. med. Martin Geppert Institut für Pathologie	Fürststraße 131 72072 Tübingen	
Dr. med. W. Hammans Institut für Pathologie	Evangelisches Kran- kenhaus Virchowstraße 20 46047 Oberhausen	Tel: (0208) 88100
Priv.-Doz. Dr. med. G. Haroske Institut für Pathologie	Krankenhaus Dresden- Friedrichstadt "Georg Schmorl" Friedrichstraße 41 01067 Dresden	Tel: (0351) 480-3799 Fax: (0351) 480-3799
Priv.-Doz. Dr. med. Michael Heine Gemeinschaftspraxis für Patholo- gie	Postbrookstraße 101 27574 Bremerhaven	Tel.: (0471) 92989- 40 Fax: (0471) 92989- 40
Prof. Dr. med. Dietl Institut für Pathologie der Charité	Rudolf-Virchow-Haus Schumannstraße 20 / 21 10117 Berlin	Tel: (030) 45053- 6002 Fax: (030) 45053- 6900

Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann Institut für Pathologie	Klinikum der Medizinischen Fakultät Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg Magdeburger Str. 14 06097 Halle (Saale)	Tel.: (0345) 557-1281 Fax: (0345) 557-1295
Priv.-Doz. Dr. med. Herbert Höffken Arzt für Frauenheilkunde	Markt 10 / Betenstraße 1 44137 Dortmund	Tel: (0231) 529747 Fax: (0231) 5860186
Dr. med. B. Jordan & Partner Zentrum für Zytodiagnostik	Feldblumenweg 24 50858 Köln	
Priv.-Doz. Dr. med. R. Kast Zytologie	Hannoversche Straße 24 31848 Bad Münder	Tel: (05042) 940300
Dr. med. Werner Mohren, R. Babic, M. Rotter Pathologisches Institut	Hauptrankenhaus Perlasberger Straße 41 94469 Deggendorf	Tel: (0991) 30041 Fax: (0991) 31874
Priv.-Doz. Dr. med. H. Motherby Herr Priv.-Doz. Dr. med. S. Falk Gemeinschaftspraxis	Ginnheimer Landstraße 94 60487 Frankfurt	Tel: (069) 951447-0 Fax: (069) 951447-50
Dr. med. W.-P. Oellig, Dr. med. Nemesszeghy Gemeinschaftspraxis für Pathologie	Heidestraße 75 45476 Mülheim	Tel: (0208) 992780 Fax: (0208) 9927830
Dr. med. Ingelinde Poche-Blohm, Frau Dr. med. Friederike Poche-de Vos Gemeinschaftspraxis für Pathologie	Voltmannstraße 279a 33613 Bielefeld	Tel: (0521) 880666 Fax: (0521) 886808
Prof. Dr. med. Klaus Richter Institut für Pathologie	Berliner Allee 48 30175 Hannover	Tel: (0511) 307777 Fax: (0511) 323041
Dr. med. Dieter Stephan Schmidt Institut für Pathologie	Cuno-Niggel-Straße 3 83278 Traunstein	Tel: (0861) 5250 Fax: (0861) 13604
Prof. Dr. med. habil. D. Stiller Gemeinschaftspraxis für Pathologie	Gesundheitszentrum Silberhöhe e. V. Weingarten 50 06110 Halle	Tel: (0345) 77480
Prof. Dr. med. G. Taubert Institut für Pathologie	Elsastraße 1 04315 Leipzig	Tel: (0341) 64941-0 Fax: (0341) 64941-
Dr. med. Th. Topalidis Zytologisches Institut	Dörbruch 62 30559 Hannover	Tel: (0511) 9524711 / 9524738

		Fax: (0511) 9524769
Dr. med. C. Vogel Institut für Pathologie	Weyertal 76 50931 Köln	Tel.: (0221) 4309270
Prof. Dr. med. Christian Wittekind Institut für Pathologie	Universität Leipzig Liebigstraße 26 04103 Leipzig	Tel: (0341) 97-15000 Fax: (0341)97-15009
Chefarzt Dr. med. G. Wittstock Frau Dr. med. U. Saretzki Pathologisches Institut	Klinikum Schwerin Werderstraße 30 19055 Schwerin	Tel: (0385) 5204311 Fax: (0385) 5204313
Dr. med. J. Konrad Dr. med. G. Harenberg Frauenärzte	Eisenbahnstraße 52 66424 Homburg/Saar	Tel.: (06841) 993252 Fax: (06841) 993253
Dr. med. F. Krampf Frauenarzt	Borwiesenstraße 11 54411 Hermeskeil	Tel.: (06503) 99294
Dr. med. Jens-Uwe Thiesen Dr. med. Zytologisches Labor Zytologisches Labor	Schenumer Straße 1 26441 Jever	Tel.: (04461) 901785 Fax: (04461) 700384 <a href="mailto:zytolog.jever@t-online.de">zytolog.jever@t-online.de</a>
Priv.-Doz. Dr. med. Walter Mellin Frau Dr. med. Christine Vogel Institut für Pathologie und Zytologie	Weyertal 76 50931 Köln	Tel.: (0221) 4309270 Fax: (0221) 424321 <a href="http://www.patho-zyto-koeln.de">www.patho-zyto-koeln.de</a>
Dr. med. F. Brinkmann-Smetanay Dr. med. Hinrichs Dr. med. Jan-Carlos Fleege Institut für Pathologie und Zytodiagnostik	Emil-Hoffmann-Straße 7a 50996 Köln	Tel.: (02236) 962050 Fax: (02236)68579 <a href="mailto:rodenkirchen@t-online.de">rodenkirchen@t-online.de</a>
Dr. med. Martin Schlenker Dr. med. Frank-Detlef Krampf Labor für Gynäkologie und Zytodiagnostik	Sankt-Josef-Straße 7 54411 Hermeskeil	Tel.: (06503) 99294 Fax: (06503) 99295 <a href="mailto:zytologie-hermeskeil@dgn.de">zytologie-hermeskeil@dgn.de</a>
Priv.-Doz. Dr. med. habil. Werner Behrendt DNA-Zytometrie-Zentrum Zytologisches Labor Hanau	Kastanien Allee 5 63454 Hanau-Kesselstadt	Tel.: (06181) 254001 Fax: (06181) 254033

## 14. Terminologie: Cytogenetik / DNA-Cytometrie

Tabelle 1: Definitionen den Chromosomensatz bzw. die DNA-Cytometrie betreffender Begriffe

Definition	Chromosomal Ebene (Giemsa)	DNA-Ebene (FCM/ICM)
<b>Euploidie</b>	Normale chromosomal Ausstattung einer Zelle mit einem doppelten Chromosomensatz oder einem seiner ganzzahligen Potenzen	DNA-Verteilung, die nicht von der normaler (ruhender, proliferierender oder polyploidisierender) Zellen unterschieden werden kann
<b>Diploidie</b>	Normale Chromosomen-Ausstattung einer Zelle mit zwei vollständigen Sätzen, einem vom Vater und einen von der Mutter	Typ eines euploiden DNA-Histogramms, welches das zytometrische Äquivalent einer ruhenden oder proliferierenden Zellpopulation mit doppeltem Chromosomensatz ist. Größter Häufigkeitsgipfel bei 2c, kleinerer bei 4c
<b>Pseudodiploidie</b>	Normale Anzahl aber abnorme Zusammensetzung von Chromosomen (nur strukturelle Aberrationen)	Kann zytometrisch nicht von DNA-Diploidie unterschieden werden
<b>Polyploidie, einschließlich: tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octoploidie u.s.w.</b>	Chromosomen-Ausstattung einer Zelle, die aus wiederholten ganzzahligen Vervielfachungen eines normalen haploiden Satzes entstehen	Vorkommen von Häufigkeitsgipfeln bei den ganzzahligen Vervielfachungen ( $x3$ , $x4$ , $x5$ , $x6$ , $x7$ , $x8$ ...) haploid DNA-Stammlinien
<b>Euploide Po- lyploidie</b>	Chromosomenausstattung einer Zelle, die aus wiederholten Verdopplungen eines normalen diploiden Satzes entsteht	Vorkommen von Häufigkeitsgipfeln in den (wiederholten) Verdoppellungs-Regionen einer normalen diploiden DNA-Stammlinie ( $x2$ , $x4$ , $x8$ , $x16$ ...). In menschlichen Geweben liegt der höchste Gipfel bei 2c.
<b>Chromosomale Stabilität</b>	Identische Chromosomen-Ausstattung von Zellen nach wiederholten Zellteilungen	Kein Äquivalent
<b>Genomische Stabilität</b>	Identische genomische Ausstattung nach wiederholten Zellteilungen	Kein Äquivalent

<b>Aneuploidie</b> <b>Die Nomenklatur basiert auf der Zahl der Kopien eines bestimmten Chromosoms</b>	Numerische und/oder strukturelle chromosomal Aberrationen Oder: Verlust oder Verdoppelung von Chromosomen oder chromosomal Segmente Oder: alle Chromosomen, die von Euploidie abweichen sind aneuploid	Quantitatives zytometrisches Äquivalent chromosomaler Aneuploidie, die in einer abnormalen DNA-Verteilung resultiert, welche sich statistisch signifikant von denjenigen normaler, proliferierender oder polyploidisierender Zellpopulationen unterscheidet
<b>Segmentale Aneuploidie</b>	Verlust oder Gewinn mikroskopisch sichtbarer Fragmente von Chromosomen	Kein Äquivalent
<b>Klonale A-neuploidie</b>	A-	Identische chromosomal Aneuploidie in einer ganzen Zellpopulation Kann in einer abnormalen DNA-Stammlinie resultieren, wenn die quantitativen Veränderungen groß genug sind um zytometrisch nachweisbar zu sein.
<b>Aneuploide Polploidie</b>	Abnorme chromosomal Ausstattung einer Zelle, die aus (wiederholten) Verdoppelungen abnormaler Chromosomensätze resultiert	Aneuploide Polyploidisierung bedeutet das Vorkommen abnormaler Häufigkeitsgipfel in der Verdoppelungs oder Vervierfachungsregion aneuploider DNA-Stammlinien
<b>Stammlinien-Aneuploidie</b>	Proliferierende Zellpopulation, welche identische Chromosomenaberrationen aufweist	Abnorme Modalwerte von DNA-Stammlinien, die sich statistisch signifikant von denen normaler Stammlinien unterscheiden
<b>Peri-x-Ploidie</b>	Abnorme chromosomal Ausstattung einer Zelle, bestehend aus mehr oder weniger chromosomal Material als dem x-fachen eines haploiden Chromosomensatzes entspricht	Abnorme DNA-Verteilung mit einer Stammlinie, deren Modalwert +/-10% des genannten Wertes beträgt
<b>Hyper-x-Ploidie</b>	Abnormaler Chromosomensatz einer Zelle, der aus mehr als dem x-fachen eines haploiden Satzes besteht	Abnorme DNA-Stammlinien-Position oder abnormaler Einzelzell-DNA-Gehalt (sog. Exceeding Events), die mehr als dem x-fachen eines haploiden DNA-Gehaltes einer Zelle entsprechen
<b>Genomische Instabilität</b>	Vorkommen chromosomaler Aberrationen während der zellulären Replikation	Abnorme Variation von Einzelzell-DNA-Werten in einem Histogramm
<b>Mutation</b>	Änderung der genomischen Sequenz (von Basen oder Chromosomen)	Kein Äquivalent
<b>Monosomie</b>	Vorkommen von nur einem statt zwei bestimmten Chromosomen eines bestimmten Typs pro Zelle. Verluste eines Chromosomes in einer diploiden Zelle	Kein Äquivalent
<b>Trisomie</b>	Vorkommen von drei statt zwei Kopien eines bestimmten Chromosoms in einer ansonsten diploiden	Kein Äquivalent

<b>Polysomie</b>	Vorkommen von mehr als zwei Chromosomen eines bestimmten Typs pro Zelle	Resultiert nur in abnormalen Zellkern-DNA-Gehalten, wenn die quantitativen Veränderungen pro Zelle größer als der Meßfehler der zytometrischen Methode ist
<b>Aneusomie</b>	Abnormaler Chromosomensatz, der von dem einer normalen haploiden, diploiden oder polyploiden Zelle abweicht	Resultiert nur in abnormalen DNA-Gehalten, wenn die Abweichungen quantitativ groß genug sind, um zytometrisch detektierbar zu sein
<b>Marker Chromosome</b>	Ein Chromosom, welches lichtmikroskopisch nachweisbare Abweichungen von der Norm aufweist	Kein Äquivalent
<b>Stammlinie</b>	Proliferierende Zellpopulation mit einheitlicher Chromosomen-Ausstattung	G0/1-Phase Fraktion einer proliferierenden Zellpopulation mit einem ersten Häufigkeitsgipfel sowie einem zweiten, kleineren oder einzelne Zellen in seiner Verdoppelungsregion

## Literatur

1. Ahlgren G, Lindholm K, Falkmer U, Abrahamsson PA: A DNA-cytometric proliferation index improves the value of the DNA-ploidy pattern as a prognosticating tool in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 50, 379-384 (1997)
2. Al-Abadi H, Nagel R: Zytomorphologie und DNS-Zytophotometrie beim Prostatakarzinom und ihre prognostische Bedeutung. *Notabene medici* 3, 74-79 (1995)
3. Auffermann W, Böcking A: Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA-image-cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol* 3, 218-226 (1985)
4. Baretton G, Vogt T, Valina C, Schneiderbanger K: Prostata-Karzinom und potentielle Präkanzerosen: DNA-zytometrische Untersuchungen und Interphasenzytogenetik. *Verh Dtsch Ges Path* 77, 86-92 (1993)
5. Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A: Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* 47, 38-42 (1994)
6. Böcking A, Auffermann W, Jocham D, Contractor H, Wohltmann D: DNA grading of malignancy and tumor regression in prostatic carcinoma under hormone therapy. *Appl Pathol* 3, 206-214 (1985)
7. Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Goebbel R: Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 56, 1600-1604 (1985)
8. Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, von Kalkreuth G: DNA-cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 30, 608-615 (1986)
9. Böcking A, Füzesi L, Striepecke E: Indikationen und tumorzytogenetische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie. *Verh Dtsch Ges Zyt* 18, 70-82 (1993)
10. Böcking A: Progress in diagnostic pathology by quantification. Guest editorial. *Anal Cell Path* 6, 1-2 (1994)
11. Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA-image cytometry. *Anal Cell Pathol* 8, 67-74 (1995)
12. Böcking A: Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. In: *Fortschritt und Fortbildung in der Medizin*, Band 21. Deutscher Ärzte-verlag: 21-49 (1997)

13. Böcking A: Die Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie bei Dysplasien des Plattenepithels. In: Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, Band 21. Deutscher Ärzteverlag: 41-50 (1997)
14. Cartsburg O, Kersten A, Sundmacher R, Nadjari B, Pomjanski N, Böcking A: Behandlung von plattenepithelialen Carcinomata *in situ* der Bindehaut (CIN) mit Mitomycin C Augentropfen unter zytologischer und DNA-bildzytometrischer Kontrolle. Klin. Monatsblätter für Augenheilkunde 218, 429-434 (2001)
15. Chatelain R, Willms A, Auffermann W, Böcking A: Automated Feulgen staining with a temperature controlled staining machine. Analyt Quant Cytol Histol 11, 211-217 (1989)
16. Duesberg P, Ruhong L, Rasnick D: Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer. Cell Cycle 306, 823-828 (2004)
17. Fallenius AG, Franzén SA, Auer GU: Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. Cancer 62, 521-530 (1988)
18. Feulgen R, Rossenbeck H: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 135, 203-248 (1924)
19. Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. Anal Cell Pathol 17, 201-208 (1998)
20. Grote HJ, Friedrichs N, Pomjanski N, Guhde HF, Reich O, Böcking A: Prognostic significance of DNA-cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO stage IB and II. Anal Cell Pathol 23, 97-105 (2001)
21. Grundmann E, Hermaenck P, Wagner G: Tumorhistologieschlüssel - Empfehlungen zur aktuellen Klassifikation und Kodierung der Neoplasien auf der Grundlage der ICD-O. 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg (1997)
22. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. Anal Cell Pathol 17, 189-200 (1998)
23. Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Anal Cell Pathol 23, 89-95 (2001)
24. Jarvis JR: A microcomputer system for video image analysis and diagnostic microdensitometry. Analyt Quant Cytol Histol 8, 201-209 (1986)
25. Kindermann D, Hilgers C: Glare correction in DNA-imagry-cytometry. Anal Cell Pathol 6, 165-180 (1994)
26. Kristensen GB, Kildal W, Abeler VM, Kaern J, Vergote I, Tropé C, Danielsen HE: Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage 1 ovarian cancer. Ann of Oncol 14, 1494-1500 (2003)
27. Kropff M, Chatelain R, Muller CP, Wagner A, Wenzler T, Böhmer H, Böcking A: Monitoring DNA cytometric parameters during the course of chronic myelogenous leukaemia. Analyt Quant Cytol Histol 13 (6), 433-439 (1991)
28. Leistenschneider W: Nucleic acid determination as therapy monitoring of prostate cancer. In: Prostate Cancer, Vol. 3, International perspectives in urology. Edts.: Jacobi GH, Hohenfellner R, Williams and Wilkins, Baltimore, London 473-485 (1982)
29. Leistenschneider W, Nagel R: Einzelzellzytphotometrische Zellkern-DNS-Analysen beim behandelten, entdifferenzierten Prostatakarzinom und ihre klinische Bedeutung. Urologe A 22, 157 (1983)
30. Maraki D, Becker J, Böcking A: Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J Oral Pathol 33, 1-7 (2004)
31. Maraki D, Hengge UR, Becker J, Böcking A: Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of *in situ* carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. J Oral Pathol Med 34, 1-3 (2005)

32. Maraki D, Megahed M, Böcking A, Becker J: Aktuelle Verfahren zur Früherkennung von Mundkrebs und zur Diagnostik von blasenbildenden Mundschleimhauterkrankungen. Hessisches Zahnärzte Magazin 9, 44-53 (2005)
33. Mikuz G: Pathology of prostate cancer. Old problems and new facts. Adv Clin Pathol 1, 21-34 (1997)
34. Nguyen VQH, Grote HJ, Pomjanski N, Knops K, Böcking A: Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. Cell Oncol 26, 143-150 (2004)
35. Pollak Grignon DJ, Heydon KH, Hammond EH, Lawton CA, Mesic JB, FU KK; Porter AT, Abrams RA, Shipley WU: Prostate cancer DNA ploidy and response to salvage hormone therapy after radiotherapy with or without short-term total androgen blockade: an analysis of RTOG 8610. J Clin Oncol 21 (7), 1238-1248 (2003)
36. Raatz H, Böcking A, Hauptmann S: Prognostic impact of DNA-image-cytometry in neuro-endocrine (carcinoid) tumours. Cell Oncol 26, 81-88 (2004)
37. Remmerbach T, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A: Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. Anal Cell Pathol 22, 211-221 (2001)
38. Remmerbach T, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A: Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image cytometry: Report on four cases. Anal Cell Pathol 25, 159-166 (2003)
39. Sanchez L, Regh M, Biesterfeld S, Chatelain R, Böcking A: Performance of a tv image analysis system as a microdensitometer. Analyt Quant Cytol Histol 12, 279-284 (1990)
40. Schimming R, Hlawitschka M, Haroske G, Eckelt U: Prognostic relevance of DNA-image-cytometry in oral cavity carcinomas. Analyt Quant Cytol Histol 20 (1), 43-51 (1998)
41. Sudbø J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A: DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. N Engl J Med 344, 1270-1278 (2001)
42. Sun D, Biesterfeld S, Adler CP, Böcking A: Prediction of recurrence in giant cell tumors of the bone by DNA cytometry. Analyt Quant Cytol Histol 14, 341-346 (1992)
43. Tribukait B: DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. Acta Oncol 30, 187-192 (1991)
44. Tribukait B: Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patient with prostate carcinomas: Clinical research and application. Eur Urol 23 (suppl 2), 64-76 (1993)
45. Wang N, Wilkin C, Böcking A, Tribukait B: Evaluation of tumor heterogeneity of prostate carcinoma by flow- and image DNA cytometry and histopathological grading.. Anal Cell Pathol 20, 49-62 (2000)

## H. Al-Abadi:

# Zytomorphologie und DNA-Zytometrie beim Prostata-Carcinom und ihre prognostische Bedeutung

Eine klinische prospektive Studie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom. Zytomorphologie und DNS-Zytophotometrie beim Prostatakarzinom und ihre prognostische Bedeutung

### **Zusammenfassung**

Bei 271 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom wurden mittels der Einzelzell-DNS-Zytophotometrie die Ploidie, die DNS-Heterogenität und die Anteile der Zellzyklusphasen der Tumoren vor und während der Therapie untersucht, um neben den bisherigen prognostischen Faktoren (Stadium, Grad) weitere prognostische Parameter zu finden. Der Zeitraum der Verlaufsbeobachtung betrug 1 bis 14 Jahre.

Von den 271 Patienten haben 198 Patienten (73,7%) einen T3 N0 Mo-Tumor, während bei 73 Patienten (26,3%) ein Stadium T3/T4 N+ M1 vorlag. 11,8% der Patienten wiesen den zytologischen Malignitätsgrad 1, 64,3% den Malignitätsgrad 2 auf und 23,8% der Patienten hatten ein Grad-3-Karzinom. Die Einzelzell-DNS-Zytophotometrie ergab bei den höheren Malignitätsgraden 2 und 3 eine Aneuploide-Rate bis zu 71% und eine Diploidie-Rate bis zu 23,8%. Bei dem Malignitätsgrad 1 dagegen lag die Diploidie-Rate bei 71% und die Aneuploidie-Rate bei 15,2%. Diese Unterschiede sind signifikant ( $p < 0,001$ ).

Zwischen den Ergebnissen der DNS-Zytophotometrie und dem klinischen Verlauf bestand eine signifikante Korrelation. Patienten mit diploiden Tumorzellkernen entwickelten innerhalb einer Beobachtungszeit von 14 Jahren keine Metastasierung und keine lokale Tumorprogression, während Patienten mit aneuploiden Tumorzellkernen eine Metastasierung und eine lokale Tumorprogression trotz Therapieumstellung innerhalb von 8 bis 22 Monaten aufwiesen. Die Patienten in der aneuploiden Gruppe starben durchschnittlich 21 Monate nach dem Zeitpunkt der Primärdiagnose an ihrem Tumoleiden.

## **Einleitung**

Die pathomorphologische Begutachtung maligner Prostatatumoren bereitet heute noch häufig Schwierigkeiten. Das Prostatakarzinom ist morphologisch ein sehr heterogener Tumor mit überlappender Histologie, unterschiedlichem biologischen Verhalten und klinischen Verlauf. Eine Verbesserung der Behandlung könnte dadurch erreicht werden, dass neben detailliertem morphologischen Grading durch die Bestimmung von Hormonrezeptoren bei histochemischen und immunologischen sowie molekulargenetischen Untersuchungen zusätzliche Malignitätskriterien außerhalb der Histomorphologie gebildet werden. Die Ploidie und Proliferationaktivität der einzelnen Tumoren können solche differenzierenden Faktoren darstellen(1-5,7,9).

Eine Abweichung des DNS-Gehaltes der Tumorkerne von dem normalen Gewebe ist ein Hinweis auf Tumorzellpopulation im Sinne der Aneuploidie(12). Die DNA-Heterogenität der Tumorzellkerne bei malignen Tumoren verschiedener Organe hat in den letzten Jahren wegen der Beziehung des Tumorverhaltens vor und während der Therapie großes klinisches Interesse erlangt(1-5,6,10,13,15,18,20,22,24).

In einer experimentiellen Studie in der Zeit von 1980 bis 1994 haben wir durch Feinnadelbiopsie gewonnenes Tumormaterial mit dem Ziel untersucht, neben den bisherigen prognostischen Faktoren weitere zu finden. Mit Hilfe der Absorptionszytometrie untersuchten wir die Ploidie, die intratumorale Heterogenität und die proliferative Aktivität des Prostatakrzinoms vor und während der Therapie.

## **Patientengut und Methodik**

Von Januar 1980 bis Dezember 1994 wurden bei 271 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom Untersuchungen mit der Einzelzell-DNS-Absorptionszytometrie durchgeführt und der klinische Verlauf der entsprechenden Patienten dokumentiert. Der Zeitraum der Verlaufsbeobachtung betrug 1-14 Jahre, das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 68,9 Jahre (42-88 Jahre). Die Materialgewinnung für die DNS-Analyse erfolgte mit der transrektaLEN Feinnadelaspirationsbiopsie. Die Ausstrichpräparate wurden erst nach Papanicolaou gefärbt und von uns zytologisch für die Tumordiagnostik und Differenzierung entsprechend der Empfehlung des pathologisch-urologischen Arbeitskreises Prostatakarzinom beurteilt (16). Nach Bestimmung des Malignitätsgrades wurden die Tumorkomplexe markiert und anschließend mit der Feulgen-schen Kernfärbung umgefärbt. (Abb.1). Gemessen wurden etwa 300Tumorzellen, gelegentlich auch mehr. Der DNS-Gehalt dieser Kerne wurde mittels Einzelzellabsorptionszytometrie ermittelt. Die gemessenen Werte der jeweiligen Totalextinktion wurden zusammen mit Mittelwertstandard, Abweichungsvarianz und Variationskoeffizienz mit Hilfe der statistischen Analyse ausgerechnet. Entsprechend dem internationalen Konsens der DNS-Zytometrie bezeichnen wir den Zellkern-DNS-Gehalt (Abb.1a) als euploid oder polyploid, wenn er im Bereich des Mittelwertes der diploiden Eichpopulation +/- 25% liegt. Entsprechend dem Variationskoeffizienten der Eichpopulation wer-

den alle außerhalb des euploiden und polyploiden Bereiches liegenden Zellkerne als aneuploid bezeichnet. Der von ca. 300 Zellkernen erfasste DNS-Gehalt wird in einem DNS-Histogramm zusammengefasst. Der DNS-Gehalt wird in der „AU“ (arbitrary units), die Zahl der gemessenen Tumorzellkerne mit „n“ angegeben(durch Eintragung der gewonnenen Werte auf der Abszisse und Ordinate entsteht das Histogramm).

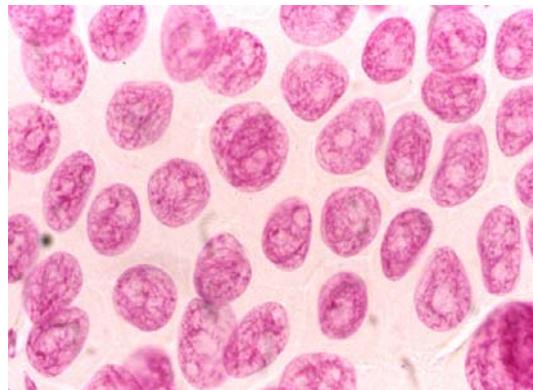


Abb.1: Feulgensche Nuklearreaktion. Isoliert liegende, gut kontrastierte Zellkerne ohne Überlagerung und Artefakte (100x).

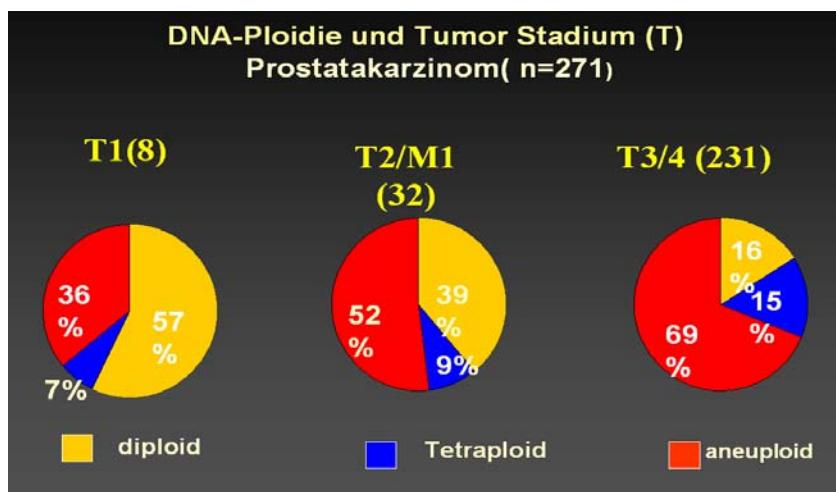


Diagramm 1: DNS-Gehalt (Grad 1-3)

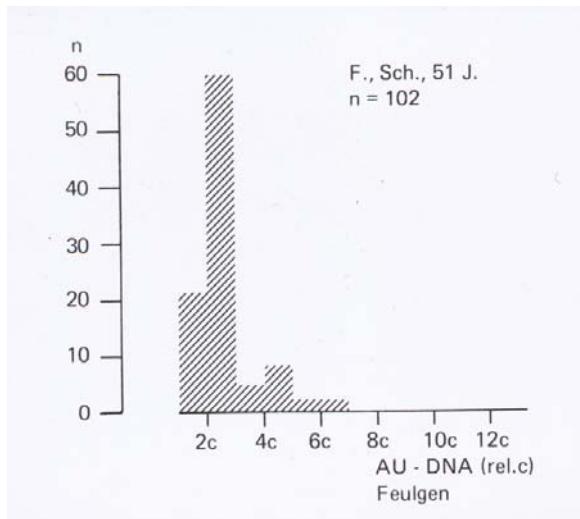


Abb. 2a: Diploides Histogramm eines Grad 1 Karzinoms

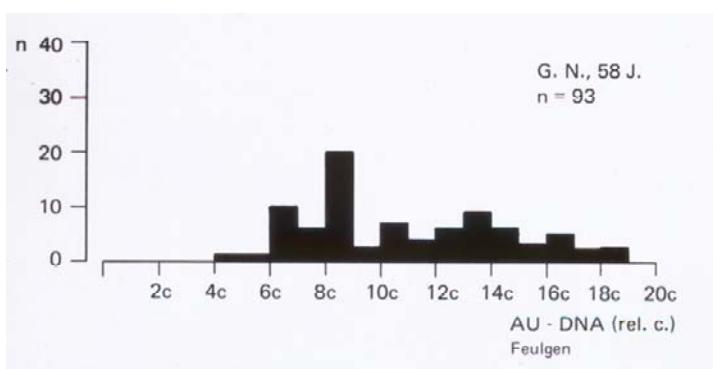


Abb. 3a: Heterogenes DNA Histogramm mit Streuung von 4c bis 19c eines Grad 2 Karzinom

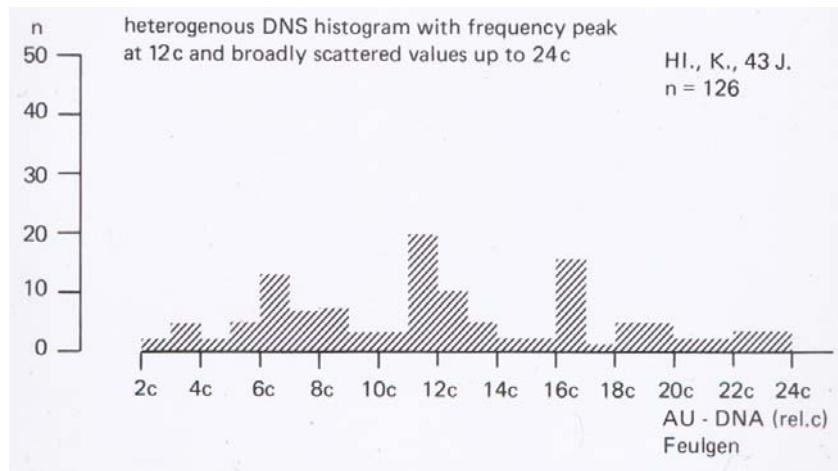


Abb. 4a: DNA Histogramm eines Grad 3 Karzinoms mit mehreren aneuploiden Stammlinien

## Statistische Analyse

Für die 3 Malignitätsgrade wurde die Homogenität der Ploidiegrade nach dem Chi-Square-Test statistisch geprüft. Die Überlebenskurven erhält man durch die Kaplan-Meier-Product-Limit-Methode, und der statistische Vergleich wurde zwischen 2 Überlebenskurven mit Hilfe des Long-rank-Tests erstellt (14,17,19).

## Ergebnisse

### Tumorstadium und Häufigkeit der Malignitätsgrad

Die Stadieneinteilung wurde entsprechend der Empfehlung der UICC nach dem TNM-System eingeteilt (23). Bei der Diagnosestellung befanden sich 198 (73%) der Patienten im Stadium T3 N0 M0, während bei 73 Patienten (27%) das Stadium T3/T4 N+M1 vorlag (Tab.1.). Im gesamten Untersuchungsgut war der zytologische Malignitätsgrad 2 mit 64,3% der Patienten am häufigsten, gefolgt von Malignitätsgrad 3 mit 23,9% und Malignitätsgrad 1 mit 11,8% (Tab. 1; Abb.2,3 u. 4).

Stadium	n	%
T3 N0 M0	198	73
T3/4 Nx M1	73	27
Malignitätsgrade		
1	32	11,8
2	174	64,3
3	65	23,9

Tab.1 Häufigkeitsverteilung der klinischen Stadien und der pathomorphologischen Malignitätsgrade bei 271 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose

### Zytologie und die Response-Kriterien

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, unterscheidet sich unser Krankengut deutlich von dem anderer Kliniken, da lediglich 27% Metastasen hatten, während 73% mit T3-Karzinom aber keine Metastasen aufwiesen. Dies erklärt sich daraus, dass wir an unserer Klinik seit über 23 Jahren mit der Zytologie und auch DNS- Zytophotometrie inzwischen mit mehr als 35000 Aspirationsbiopsien über eine Kontrollmöglichkeit verfügen, durch die wir die Therapiewirkung bzw. das Therapieversagen direkt am Primärtumor nachweisen können. Die Aspirationsbiopsie ist für den Patienten nicht belastend und darüber hinaus komplikationsarm. Diese beiden Methoden- wie auch die morphologische Untersuchung einer Stanzbiopsie- sind derzeit die einzigen objektiven Parameter zur Therapiebeurteilung beim lokal fortgeschrittenen, noch nicht metastasierten Karzinom der Prostata.

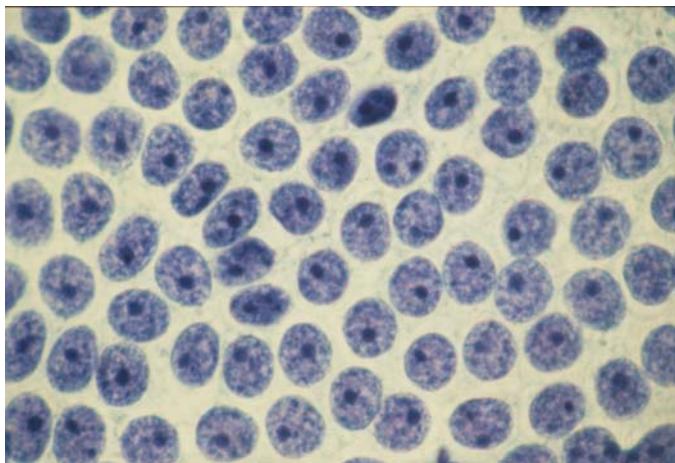


Abb.2 Zytologisches-Ausstrichpräparat eines Grad 1 (Score 10) Karzinoms: geringe Kernpolymorphie, prominente Nukleolen, intakte Zellgrenzen.( Pap., 100x)

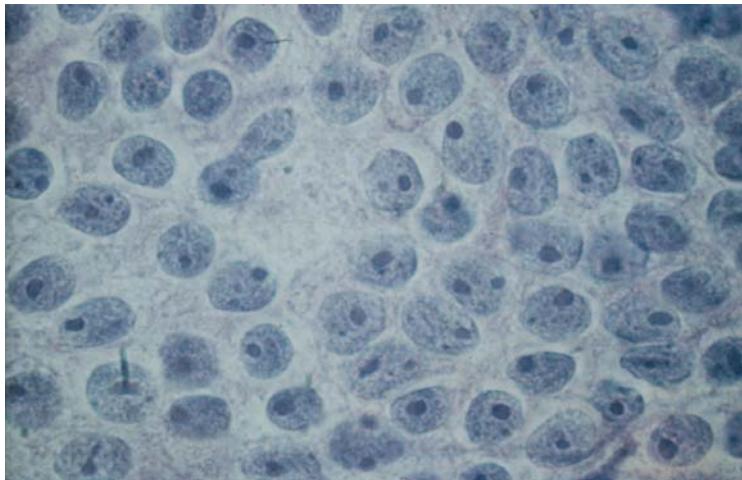


Abb. 3 Zytologisches Ausstrichpräparat eines Grad 2 Karzinoms der Prostata (Score 14): mäßige Hyperchromasie und Polymorphie der Kerne , prominente , entrundete und an Zahl vermehrte Nukleolen, gestörte Kernordnung ,( Pap., 100x)

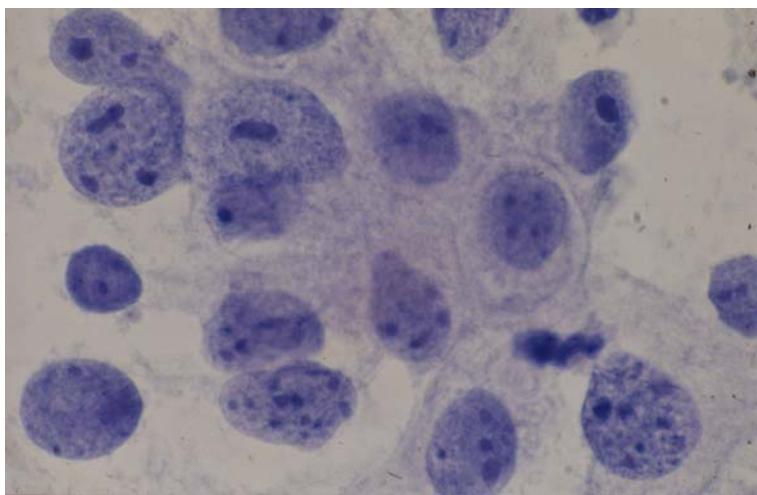


Abb. 4 Zytologisches Ausstrichpräparat eines Grad 3.(Score17) Karzinoms , deutliche Polymorphie und Hyperchromasie der Kerne, Polymorphie der Nukleolen, starke Kerndissoziation, (Pap, .100x)

## Zytomorphologische Veränderung unter der Therapie

Die Regressionszeichen sind unabhängig von der jeweiligen Therapie, wie wir an über 900 Patienten mit 6 verschiedenen Therapieformen bereits früher nachgewiesen haben (1,13). Darüber hinaus ist der Zeitpunkt, zu dem eine schlechte oder fehlende Wirkung am Tumor selbst definitiv festgelegt werden kann, für die verschiedenen Therapieformen eindeutig gesichert. So kann nach antiandrogenen Maßnahmen wie Orchiktomie, LH-RH-Analoga oder Antiandrogenen bei einem schlechten oder fehlenden Regressionskriterium 6 Monate nach Therapiebeginn kaum noch mit einem Tumorresponse gerechnet werden, während nach Estracyt und Cyclophosphamid bereits nach 3 Monaten der Therapieeffekt zuverlässig beurteilt werden kann. Die wichtigsten Zeichen der Regression finden sich am Kern und an den Nukleolen: Kernpyknose, Abnahme der Kerngröße, Kernrarefizierung, Desintegration von Kernchromatin, Nukleolen: Größenabnahme bis zum Verschwinden (Abb. 2a,3a,4a). Die zytologischen Kriterien der Regression korrespondieren mit denen der Histologie bei Beurteilung einer Stanzbiopsie und entsprechen der Klassifikation der Deutschen Uropathologischen Arbeitsgruppe „Prostatakarzinom“ (1,16,18,20).

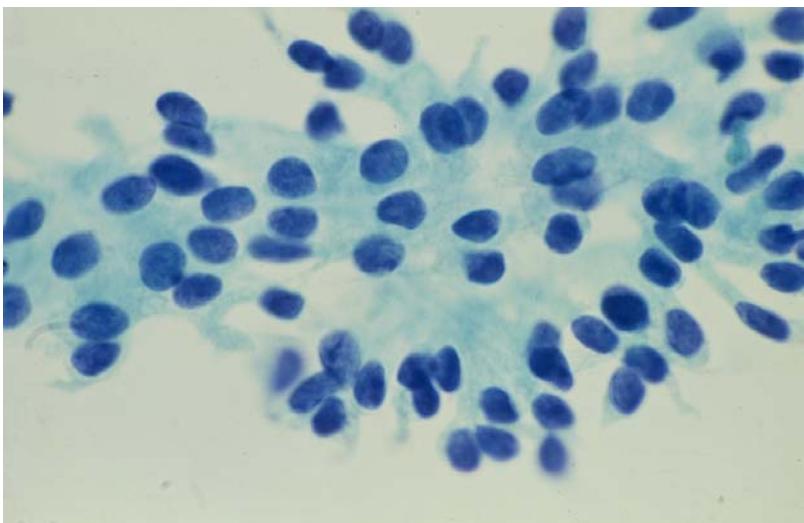


Abb.2a Zytologisches Ausstrichpräparat eines behandelten Prostata- Karzinoms: die Kerne sind überwiegend klein, kaum Nukleolen vorhanden, Regressionsgrad 1(guter Therapieeffekt)

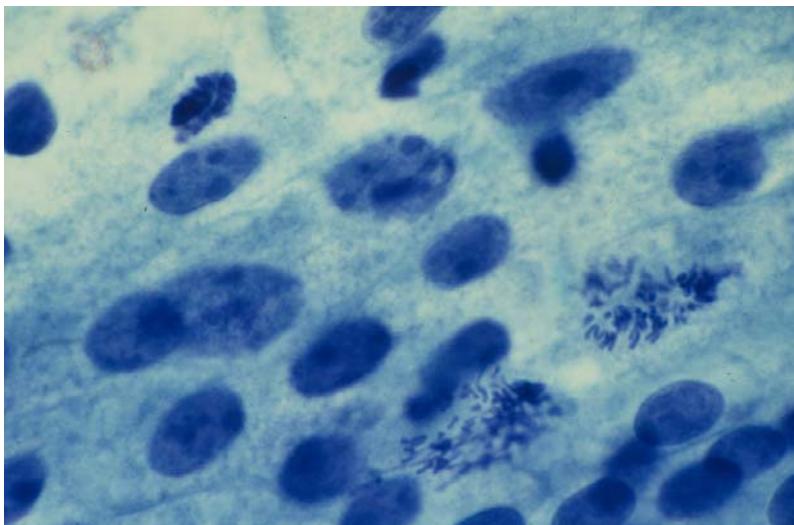


Abb. 4a Zytologisches Ausstrichpräparat eines fehlenden Therapieerfolges : weiterhin eine deutliche Kernpolymorphie und Hyperchromasie mit Mitosen, Regressionsgrad X .(Pap, .100 x)

### DNS-Ploidie versus Malignitätsgrad

Der Ploidiegrad des Prostatakarzinoms erreichte DNS-Werte von 2c (diploid) bis zu 19c. Die häufigsten Ploidie werte der DNS-Stammlinien lagen im 5c-,6c-,9c,10c- und 12c Bereich. Die DNS-Werte von 32 Patienten mit Malignitätsgrad-1- Karzinom wurden mit 71% der gemessenen Tumorzellkerne im diploiden Bereich 2c, 13,8% im polyploiden (4c) und 15,2% im aneuploiden Bereich (3c und 5c) ermittelt. Die 174 Patienten mit Malignitätsgrad-2-Karzinomen zeigen eine sehr heterogene DNS-Verteilung, obwohl die Karzinome eine einheitliche zytomorphologische Differenzierung aufwiesen. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ließen sich DNS-Meßwerte in 23% im diploiden (2c), 25,2% im polyploiden (4c) und 51% der gemessenen Tumorzellkerne im aneuploiden (3c,5c) Bereich ermitteln. Bei den 65 Patienten mit Grad-3-Karzinomen fand sich eine diploide Verteilung in nur 4,2% der gemessenen Ploidie, während 24,8% einen polyploiden und 71% einen aneuploiden DNS-Gehalt aufwiesen mit mehr als 2 DNS-Stammlinien und Streuung der Ploidie- Werte bis zu 19c.

## Klinisches Stadium versus DNS-Ploidie

Bei 198 Patienten mit klinischem Stadium T3 fanden wir bei der DNS-Analyse 38% der gemessenen Tumorzellkerne im diploiden Bereich, 9% im tetraploiden und 53% im aneuploiden Bereich. Die DNS-Ploidieverteilung bei den Patienten im klinischen Stadium T4 wurde mit 67% im aneuploiden Bereich, 11% im tetraploiden und 22% im diploiden Bereich ermittelt (Tab. 3).

## Veränderungen der DNS-Ploidie unter der Therapie

Während die Pathohistologie und Zytomorphologie eher ein morphologisch qualitatives Bild über den Therapieeffekt geben, erlaubt die DNS-Zytophotometrie durch detaillierte Analyse des Zellkern-DNS-Gehaltes eine quantitative Beurteilung des biologischen Verhaltens, d.h. des Malignitätspotentials des Prostatakarzinoms vor und während der Behandlung mit allen bisher bekannten Therapieformen. Wir haben bei Prostatakarzinomen nicht nur sequentielle Analysen des DNS-Gehaltes der Tumorzellkerne durchgeführt, sondern vor allem auch bei verschiedenen therapeutischen Maßnahmen. Es ist eine gesicherte Erkenntnis, dass sich der DNS-Gehalt des therapieresistenten Prostatakarzinoms signifikant von den Karzinomen unterscheidet, die günstig auf die Therapie reagieren. Ist die Behandlung des Prostatakarzinoms erfolgreich, findet sich in der DNS-Zytophotometrie ein signifikanter Abfall des Ploidiegrades von der Aneuploidie in Richtung Diploidie, d.h. eine Linksverschiebung. Bleibt die Aneuploidie dagegen unter der Therapie unverändert, kann ein schlechter klinischer Verlauf vorausgesagt werden, unabhängig von der jeweils angewandten Therapie, wie aus dem DNS-Histogramm der Fälle 1 bis 3 zu ersehen ist.

Grad (n)	diploid %	polyploid %	aneuploid %
1 (32)	71	13,8	15,2
2 (174)	23,8	25,2	51
3 (65)	2,3	28,8	72,9

Tab. 2 Korrelation von Malignitätsgrad und DNS-Gehalt der Tumorzellen bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

Stadium (n)	diploid %	polyploid %	aneuploid %
T3 N0 Mo ( 198 )	38	9	53
T4 N+M1 ( 73 )	22	11	67

Tab. 3 Korrelation von klinischen Stadien und DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

**Fall 1:** 63 jähriger Patient im Stadium T3 M0, zytologischer Malignitätsgrad 2 (Score 11) (Abb. 2 und 2a):

Vor der Therapie zeigte das Histogramm einen breiten 2-gipfligen 8c- bis 10c-Bereich mit Werten bis zu 12c. 6 Monate nach der Therapie fand sich eine klare Linksverschiebung mit einem statistisch signifikanten Gipfel im diploiden 2c-Bereich, der auch 5 ½ Jahre nach Therapie unverändert nachzuweisen war. Dieser günstige Befund des Zytophotogramms korrespondiert sehr gut mit dem klinischen Befund, denn der Patient ist inzwischen 11 Jahre und 4 Monate ohne Progression (Abb. 5).

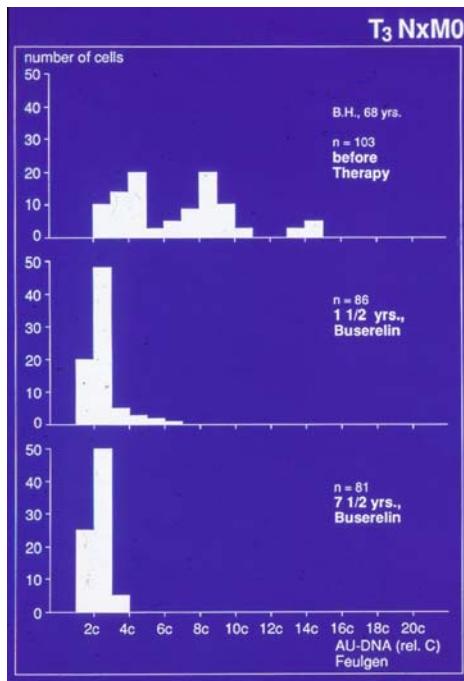


Abb. 5 Fall 1: Wie hier deutlich zu erkennen ist, Patienten mit DNA diploiden Tumoren haben in 88% die 10 jährige Überlebensrate erreicht, wo bei Patienten mit DNA aneuploiden Tumor nur in 2% die 5 jährige Überlebensrate erreicht.

**Fall 2:** 70 jähriger Patient mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom T3, zyto- und histologischem Malignitätsgrad 2 (Score 14) (Abb. 3 und 3a):

Vor Beginn der Therapie ein breiter Gipfel im 6- und 7c-Bereich mit Streuung der DNS-Werte bis zu 12c. 6 Monate nach Therapie mit LH-RH-Analoga (Buserelin) fand

sich eher eine Rechtsverschiebung über 12c. Da sich zytologisch nach 6 Monaten ebenfalls keine Regressionszeichen nachweisen ließen, haben wir den Patienten auf Estramustinphosphat (Estracyt) umgestellt. 4 ½ Jahre nach Estracyt-Therapie zeigte sich nun eine gute Regression mit statistisch signifikantem Häufigkeitsgipfel im 2- und 4c-Bereich bei klinisch stabilem Zustand. Nach 8 ½ Jahren ist der Status weiterhin ohne Nachweis von Metastasen (Abb.6).

**Fall 3:** 43 jähriger Patient mit Prostatakarzinom T3 Nx M1, histologischer und zytologischer Malignitätsgrad 3 (Score 17) (Abb. 4 und 4a):

Dies ist ein Beispiel für eine primäre Resistenz gegen LH-RH-Analoga sowie eine Resistenz gegen die sekundäre Estracyt-Therapie. Vor der Buserelin-Therapie fand sich ein Häufigkeitsgipfel im 5-, 7-, 9-, sowie im 13c Bereich mit Streuung der Messwerte bis zu 19c. Ein diploider Anteil war hier nicht nachzuweisen. 6 Monate nach Buserelin-Behandlung fand sich noch ein definitiver Häufigkeitsgipfel im 6- bis 8c-Bereich mit Streuung der Messwerte bis zu 16c. Da dieses DNS-Verteilungsmuster als ausgesprochen schlechtes Therapieergebnis angesehen werden musste, wurde der Patient auf Estramustinphosphat umgestellt. Wie nach sekundärer Estracyt-Therapie erwies sich der Tumor, wie die DNS-Verteilung über den 16c-Bereich zeigte, also auch gegen Estracyt resistent. Es zeigte sich eine persistierende Aneuploidie (Abb. 7). Dieser Befund korrespondiert klinisch mit einem nachweisbaren Tumoreinbruch in der Blase, deshalb wurde die Therapie auf Cyclophosphamid als tertitäre Therapie umgestellt mit der Hoffnung auf eine gewisse Hemmung der Tumorproliferation. Trotz dieser Therapieumstellung starb der Patient 8 Wochen nach der Cyclophosphamid-Behandlung an einer ausgedehnten Metastasierung.

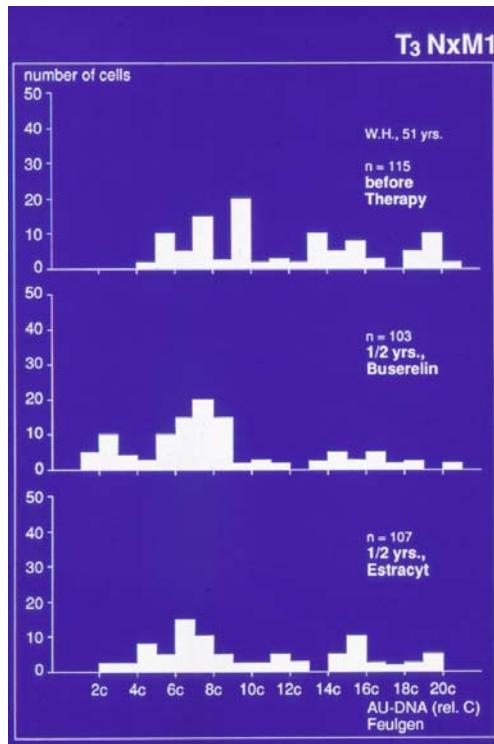


Abb. 7: Fall 3, Wie hier deutlich zu erkennen ist, Patienten mit DNA diploiden Tumoren haben in 88% die 10 jährige Überlebensrate erreicht, wo bei Patienten mit DANN aneuploiden Tumor nur in 2% die 5 jährige Überlebensrate erreicht.

### Prognostische Relevanz der DNS-Ploidie

In der Beobachtungszeit bis zu 12 Jahren konnten bei 67 Patienten (24%) mit einem Häufigkeitsgipfel im diploiden DNS-Bereich (2c) keine Metastasierung und keine lokale Tumorprogredienz nachgewiesen werden. Von 141 Patienten (52%) mit zwei oder mehreren DNS-Stammlinien bzw. breiter aneuploider DNS-Verteilung hatten 65 Patienten bereits bei der Diagnosestellung Fernmetastasen und verstarben innerhalb der ersten 22 Monate an dem Tumorleiden. Bei den übrigen 76 Patienten trat nach 8 bis 36 Monaten nach der Diagnosestellung bei 73 Patienten eine Skelettmetasierung auf. Von diesen 73 Patienten starben 67 in der Beobachtungszeit an ihrem Tumorleiden. Aus der aneuploiden Gruppe mit 141 Patienten sind bis zu 4 Jahren der Beobachtungsperiode 3 Patienten klinisch in einem stabilen Zustand. Von den 63 Patienten in der Gruppe der polyplöiden, nahen diploiden DNS-Verteilung hatten 33 Patienten eine

Fernmetastasierung und verstarben trotz Therapieumstellung an ihrem Tumorleiden, weiterhin verstarben 6 Patienten an einem Herzkreislaufversagen. 24 Patienten aus dieser Gruppe sind klinisch stabil (Tab. 4, 6, Abb. 8a, 8b).

	<b>DNS-Ploidie</b>		<b>M1</b>		<b>stabil</b>		<b>gestorben</b>	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
diploid	67	(24)	-	-	46	(69)	21*	(31)
polyploid	63	(23)	33	(52)	24	(38)	33	(52)
					6*	(9)		
aneuploid	141	(52)	138	(98)	3	(2)	137	(97)

\* Herzkreislauf-Erkrankungen

Tab. 4 Klinischer Verlauf versus DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

<b>DNS</b>	<b>3 Jahre (%)</b>	<b>5 Jahre (%)</b>	<b>9 Jahre (%)</b>
<b>diploid</b>	99	97	88
<b>polyploid</b>	71	51	38
<b>aneuploid</b>	34	2	-

entsprechend Kaplan-Meyer  $p > 0,001$

Tab. 6 Überlebensrate versus DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

## Survival times of 271 patients with Prostatacarcinoma according to DNA-ploidy (Kaplan-Meier)

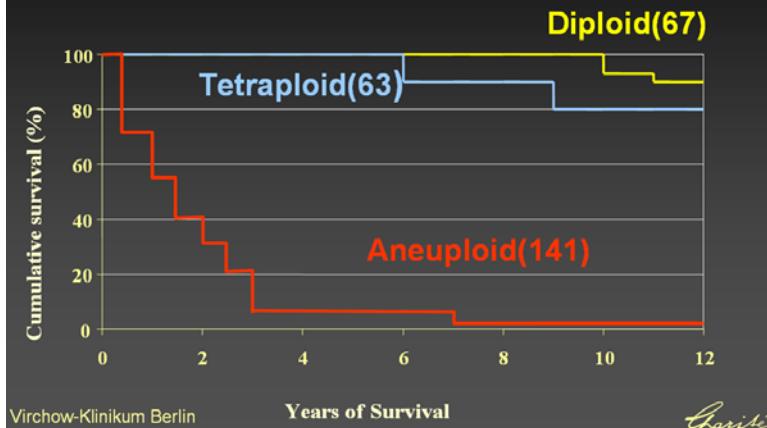


Abb.8a Wie aus dem Kaplan-Meier Diagramm zu ersehen ist, haben Patienten mit DNA- diploiden und DNA-tetraploiden Tumor, weitgehend bessere Prognosen, als Patienten mit DNA- aneuploiden Tumor.

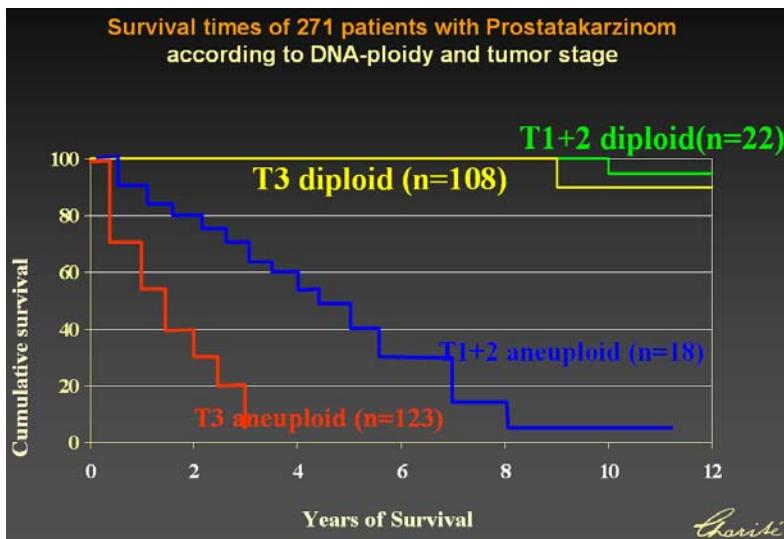


Abb.8b Wie aus der Überlebenskurve zu erkennen ist, haben Patienten mit verschiedenen Tumorstadien eine bessere Prognose, wenn die DNA-Ploidy diploid ist.

## Malignitätsgrade und Anteile der Zellzyklusphasen

Durch Zellzyklusanalyse mittels Einzelzellzytometrie kann der Anteil der Tumorzellen in G0/G1-Phase, in S-Phase und in G2/M-Phase bestimmt werden. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, zeigt sich bei Grad-1-Karzinom ein Anteil von 8% proliferierender Tumorzellen, während bei den Grad 2 und 3 Tumoren dieser Anteil auf 51 bzw. 71% ansteigt. Patienten mit einem hohen aneuploiden Anteil (und mehreren aneuploiden Stammlinien) wurden früher klinisch progradient und starben früher als Patienten mit einem geringen aneuploiden Anteil und einer niedrigen Proliferationstendenz (S,G2,M<8%), (Tab. 5).

<b>Grad</b>	<b>(n)</b>	<b>Aneuploidie (%)</b>
<b>1</b>	32	8-15
<b>2</b>	174	51-68
<b>3</b>	65	73

Tab. 5 Zellproliferation-Anteile der Aneuploidie-versus pathohistologischem Malignitätsgrad (n=271)

## Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse der DNS Untersuchungen deuten auf ein unterschiedliches Wachstumsverhalten des Prostatakarzinoms und damit auf seine Heterogenität hin. Die wenigen bisher vorliegenden Untersuchungen an Prostatakarzinomen mittels der Eizelz-DNS-Zytometrie als auch mittels Durchflußzytometrie zeigen unterschiedliche Ergebnisse und berichten über hohe DNS-Werte, besonders bei entdifferenzierten Karzinomen. In unserer Studie fanden wir eine Aneuploidierate von 8% bei hochdifferenzierten Tumoren und von 71% bei schlecht differenzierten Grad-3-Tumoren (1,6,7,11,13,18). Mit Hilfe der Einzelzellzytophotometrie können exakte DNS-Analysen durchgeführt werden, da nur diese Methode eine zuvor visuell diagnostizierte Tumorzelle misst. Die Einzelzellphotometrie ist ein zeitaufwendiges Verfahren, weil jede Zelle von dem Untersucher in das photometrische Messfeld eingefahren werden muß. Dem Nachteil des Zeitaufwandes steht der Vorteil gegenüber, Zellmorphologie und Zellkern-DNS-Gehalt an identischem Material bestimmen und einander zuordnen zu können. Die Position einer Zelle auf dem Objektträger kann für Nachuntersuchungen festgehalten werden (1,-5,7,18,20,21). Bei der Durchflusssphotometrie werden die Zellen in Suspension gebracht und in einem schmalen, am Strahlengang des Mikroskops orientierten Flüssigkeitsstrom der DNS-Bestimmung zugeführt. Die kontinuierliche Messung der Zellen im Flüssigkeitsstrom bedingt eine hohe Messgeschwindigkeit, allerdings fehlt jegliche Zuordnung des gemessenen DNS-Gehaltes zur Morphologie der Zelle. Jeder fluoreszierende Partikel einer Suspension wird ge-

messen und geht in die Häufigkeitsverteilung ein, unabhängig davon, ob es sich um einen beschädigten Zellkern, um unvollständig getrennte oder fluoreszierende Verunreinigungen handelt (1,21). Eine Verschlechterung der Prognose im individuellen Fall lässt sich aus einer breiten Streuung der DNS-Meßwerte erkennen. Eine ähnliche Aussage kann auch aus dem Verhältnis diploider zu aneuploiden Zellen abgeleitet werden(1-7,9,11,13,15,18).

Dieses Verhältnis hat besonders eine Bedeutung bei der Malignitätsgrad-2-Gruppe, die morphologisch einheitlich, aber bezüglich der Malignitätspotentiale heterogen ist. Beträgt der Anteil der diploiden Zellen ( $G_0/G_1$ -Phase)>60%, so ist die Prognose der Patienten günstiger als bei einem Anteil<60%. Dabei bedeutet ein hoher Anteil von  $G_0/G_1$ -Zellen in der Regel ein geringes Wachstum der Tumoren. Diese Unterschiede in den Überlebenszeiten sind auch innerhalb der Patienten der Malignitätsgrade 2 und 3 mit einer Abnahme der diploiden und einer Zunahme der proliferierenden aneuploiden Zellen zu erkennen.

## Schlussfolgerungen

- Die DNA-Plloidie ist ein objektiver, reproduzierbarer, diagnostischer und prognostischer Parameter.
- DNA-Zytophotometrie korreliert signifikant mit dem klinischen Verlauf
- Patienten mit diploiden und tetraploiden Tumoren entwickelten innerhalb einer Beobachtungszeit von 14 Jahren keine Metastasierung und keine lokale Tumorprogression
- Patienten mit aneuploiden Tumoren zeigten trotz Therapieumstellung eine Metastasierung und lokale Tumorprogression und hatten eine höhere Mortalität (Mediane Überlebenszeit 21 Monate).

# 6

## B. Tribukait

### Klinische Bedeutung der DNA-Durchfluss-Zytometrie beim Prostata Karzinom

#### 1. Einleitung

Während auf vielen Gebieten der Grundlagenforschung neue Technologie zu einer explosionsartigen Zunahme biomedizinischer Erkenntnisse geführt hat, haben neue Techniken vielfach nur zögernd Eingang in die bettnahe Medizin gefunden. Das gilt auch beim Prostata-Karzinom, dessen prognostische Beurteilung sich im Allgemeinen fast ausschließlich auf die konventionelle Histopathologie und den Gleason-Score stützt. Gründe dafür sind neben der vielfach größeren Komplexität neuerer Methoden gegenüber älteren die Notwendigkeit, über eine längere Zeit zunächst Erfahrung zu sammeln, um den Wert dieser Methoden zu belegen. Bei Tumorerkrankungen sind Verlaufskontrollen ein wichtiges Instrument, den prognostischen Wert einer diagnostischen Methode beurteilen zu können. Besonders beim Prostata-Karzinom mit protrahiertem Verlauf sind daher Beobachtungen über lange Zeitphasen notwendig.

Einige aktuellen Fragen beim Prostata-Karzinom, die dringend Antwort suchen, sind:

1. Wie kann beim lokalisierten Prostata Karzinom unterschieden werden zwischen a) klinisch insignifikanten Tumoren, bei denen eine die Lebensqualität vielfach beeinträchtigende Therapie wie die radikale Prostatektomie unnötig ist und b) solchen, die ohne radikale Therapie innerhalb einer übersehbaren Zeitspanne zu Fernmetastasen führen. Dieses Problem steht in engem Zusammenhang mit dem „natürlichen“ Verlauf des Prostata- Karzinoms und der Frage:
2. Befindet sich das klinisch neu entdeckte Prostata-Karzinom bereits im Endzustand einer Entwicklung oder ist eine sukzessive Weiterentwicklung zu erwarten?
3. Welche Merkmale haben lokalisierte Tumoren, bei denen bereits Mikrometastasen vorhanden sind, und eine lokale radikale operative Therapie nur die Lebensqualität beeinträchtigt ohne den durch die Metastasierung bestimmten Krankheitsverlauf beeinflussen zu können? Gleches gilt für die radikale Strahlentherapie von Kapsel überschreitenden Tumoren mit bereits vorhandenen Mikrometastasen.

Im folgenden wird über Erfahrungen bei der Anwendung einer neueren Methode, der DNA-Zytometrie im Durchflussverfahren, berichtet, die auf Messung der DNA-Menge mittels Fluoreszenz eines an die DNA spezifisch gebundenen Farbstoffes beruht. Diese ermöglicht die rasche und genaue Bestimmung des sog. Ploidiegrades (=Gesamtmenge von DNA resp. Chromosomen) einzelner Tumorzellen nach Zellvereinzelung. Dank der hohen Genauigkeit, mit welcher der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen so gemessen werden kann und dank der großen Zahl gemessener Zellkerne, lässt sich gleichzeitig

der Anteil der Tumorzellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus mit großer statistischer Genauigkeit feststellen. Es soll hier im Folgenden der prognostische Wert routinemäßig erhaltener DNA-Ploidie-Ergebnisse und der Zellzyklus-Analysen diskutiert werden.

Fig. 1 zeigt Beispiele von zwei diploiden (Fig. 1a,b) und zwei aneuploiden (Fig. 1c,d) Tumoren. Die beiden diploiden (DNA-Index 1,0) unterscheiden sich voneinander durch ihren unterschiedlichen Anteil von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (=DNA-Reduplikationsphase). Der eine, aneuploide Tumor weist eine abweichende Zelllinie im triploiden Bereich auf (DNA Index 1,4), der andere im nahe diploiden Bereich (DNA Index 0,9).

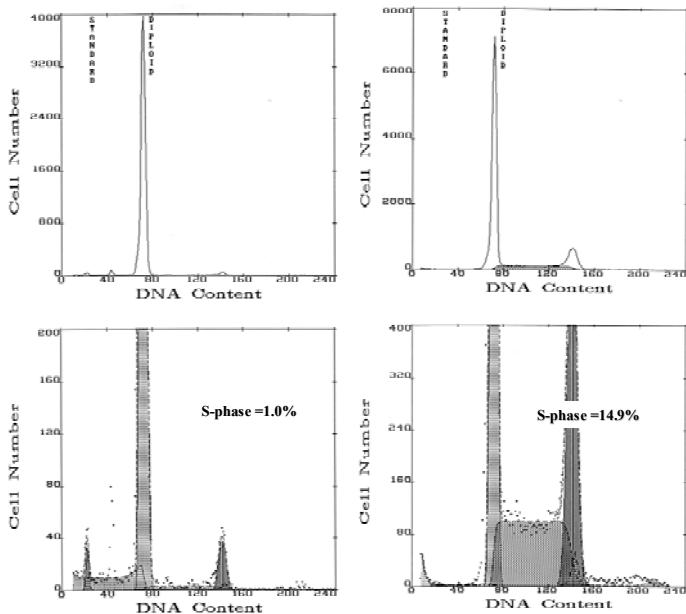


Fig. 1a+b: Beispiele typischer DNA-Histogramme von Prostata-Karzinomen. a) diploid (DNA-Index 1,0) mit niedriger S-Phase Fraktion; b) diploid mit hoher S-Phase Fraktion. 20-fache Vergrößerung der Y-Achsen unteren Teil der unteren Figuren

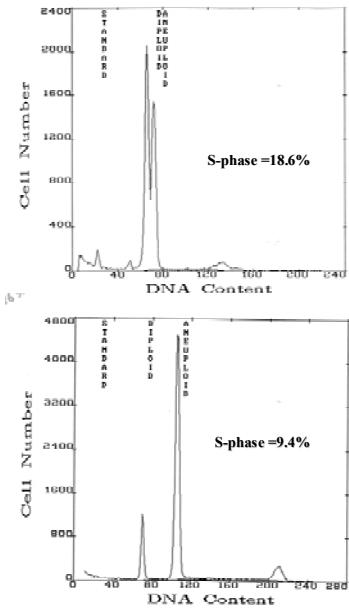


Fig. 1 c+d: Beispiele typischer DNA-Histogramme von Prostata-Karzinomen. c) nahe-diploid aneuploid (DNA-Index 0,9); d) aneuploid (DNA-Index 1,4).

## 2. Tumor-spezifisches und Gesamtüberleben

In diesem Abschnitt soll zunächst das Überleben eines Gesamtkollektivs von 880 Patienten mit Prostatakarzinom besprochen werden. Diese waren 38-93 Jahre alt (median 69 Jahre). Die Tumoren umfassten alle Stadien und zytologischen Grade und dürften repräsentativ sein für Prostatakarzinome im Untersuchungszeitraum 1978-1989. Die Hälfte dieser Patienten (ca.440) erhielten primäre Hormonbehandlung, 1/3 verblieb zunächst unbehandelt unter aktiver Überwachung (=“watchfull waiting”) und der Rest erhielt radikale Strahlentherapie (64-70 Gy). Eine geringere Anzahl radikal prostatektomierter Patienten wurde hierbei ausgeschlossen.

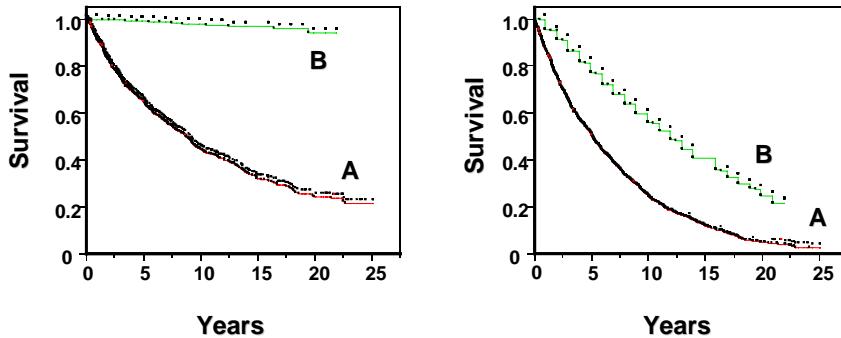


Fig. 2: Tumor spezifische Überlebensraten (links) und Gesamt-Überlebensraten (rechts) von (A) Patienten mit Prostata-Karzinom und (B) einer Gesamt-Population schwedischer Männer gleicher Altersverteilung. Die Daten von (B) wurden aus den schwedischen Registern über die Tumorinzidenz respektive Todesfälleinzidenz berechnet.

Fig. 2 zeigt links das Tumor-spezifische Überleben und rechts das Gesamt-Überleben dieser Patienten. Bei einer mittleren Beobachtungszeit von 5,3 (0,1-25,2) Jahren verstarben 53% der Patienten am Prostata-Karzinom, 44% an Prostata-Karzinom unabhängigen Ursachen (=interkurrent), und 3% lebten noch zum Zeitpunkt des Endes der Untersuchung. Die akkumulierte tumorspezifische Todesrate nach 25 Jahren betrug etwa 70% (Gruppe A), die mit einer akkumulierten tumorspezifischen Todesrate von 5% einer Kontrollgruppe schwedischer Männer gleichen Alters und im gleichen Zeitraum (Gruppe B) verglichen wurde. Überlebenskurven lassen sich durch den Zeitpunkt charakterisieren, zu dem die Hälfte der Patienten verstorben ist, dem Medianwert. Für das Gesamtüberleben der Prostata Karzinom Patienten beträgt der Medianwert 5,2 Jahre und ist deutlich geringer als derjenige der Kontrollgruppe mit einem Medianwert von 12 Jahren. Der Medianwert für das Tumor-spezifische Überleben beträgt 8,8 Jahre.

Zusammenfassend verdeutlichen Langzeituntersuchungen den stark verzögerten Verlauf des Prostatakarzinoms, dessen Ende selbst Verlaufskontrollen von 10 Jahren nur ungenügend wiedergeben. Bei längeren Verlaufskontrollen gewinnt jedoch die steigende Zahl von Prostatakarzinom unabhängigen Todesursachen immer mehr an Bedeutung für das Gesamtüberleben.

Die Bedeutung Prostatakarzinom unabhängiger Todesursachen für die Interpretation des altersabhängigen tumorspezifischen Überlebens sei deshalb hier erwähnt. Es verstarben im vorliegenden Patientengut mehr als 2/3 der unter 60-jährigen Patienten an Karzinomen, aber nur die Hälfte der 70-jährigen und 1/3 der über 80-jährigen Patienten. Daraus zu folgern, dass jüngere Patienten mehr aggressive Tumoren haben als ältere ist jedoch nicht richtig. Das wird deutlich, wenn man das tumorspezifische Überleben mit dem Tod durch Prostatakarzinom unabhängige Todesursachen in Abhängig-

keit vom Alter vergleicht (Fig.3). Der Medianwert der Überlebenskurven für diese interkurrenten Todesursachen betrug für unter 55 Jahre alte Männer 23 Jahre, für 65-70 Jahre alte Männer 13 Jahre und für über 80 Jahre alte Männer 5 Jahre. Diese Linksverschiebung der Überlebenskurven mit zunehmendem Alter erfolgt linear um durchschnittlich 0,6 Jahre/Lebensjahr. Das tumorspezifische Überleben verblieb mit einem Medianwert von durchschnittlich 8,8 Jahren unverändert für Patienten aller Altersgruppen. Die prozentual hohe Tumor-Todesrate der jungen Patienten erklärt sich somit ganz durch die niedrige Prostatakarzinom unabhängige Todesrate. In Übereinstimmung damit fanden sich in dem vorliegenden Patientenkollektiv keine altersabhängigen Veränderungen weder vom Tumor Stadium und Grad noch von der DNA-Ploidie und S-Phase Fraktion.

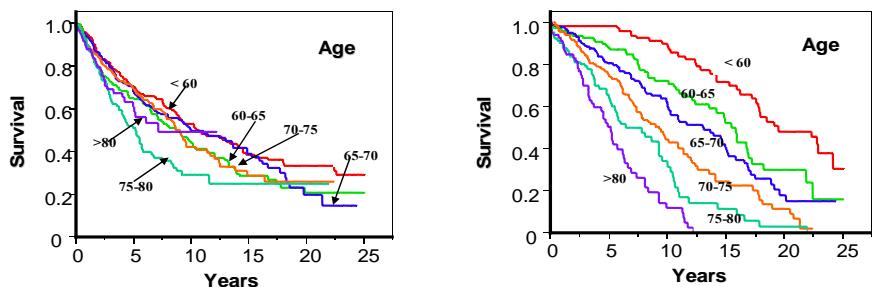


Fig. 3 Tumor spezifischer Tod (links) und Tod durch Tumor unabhängige Erkrankung (rechts) bei Patienten mit Prostata Karzinom in Abhängigkeit vom Alter.

### 3.1. DNA-Klassifikation des Prostata-Karzinoms.

Die hier vorgenommene DNA-Klassifikation stützt sich auf Verlaufskontrollen von 520 Patienten mit neu entdeckten Tumoren über eine Zeitdauer bis zu 25 Jahren und dem durch den Tumor bedingten Tod als Endpunkt. Bei den in Fig. 4 dargestellten Überlebenskurven wurden zunächst die Fälle mit diploiden Tumoren (DNA-Index 1), die rund die Hälfte aller Tumoren umfasst, von den nicht-diploiden abgegrenzt. Letztere wurden in 3 Gruppen von jeweils 15%- 20% der Gesamtfälle unterteilt, eine tetraploide (DNA-Index 2,0), eine weitere mit DNA-Indices 1,9+1,8 und schließlich eine mit DNA-Indices <1,0;1,1-1,7>2,0. Bei Vorkommen von mehreren aneuploiden Zellpopulationen in ein und derselben Biopsie war eine dieser in der Regel letzterer Gruppe zugehörig. Die Überlebensdauer, ausgedrückt durch die Medianwerte der Kurven, fiel von 13,3 Jahren für diploide Tumoren auf 10,4 Jahre für tetraploide Tumoren, auf 5,7 Jahren für Tumoren mit DNA-Indices 1,9 + 1,8 und auf 2,3 Jahre für Tumoren mit DNA-Indices <1,0;1,1-1,7>2,0. Die Prognose in letztergenannter Gruppe war gleich schlecht unabhängig vom DNA Index. Alle drei aneuploiden Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander. Eine andere Aufteilung als die hier gezeigte ist ebenso

möglich. Beispielsweise unterscheiden sich bereits die relativ große Anzahl von Tumoren mit dem DNA-Index 1,9 signifikant von den tetraploiden Tumoren, oder Tumoren mit den Indices 1,8 und 1,7 von denen mit Index 1,6 und weniger.

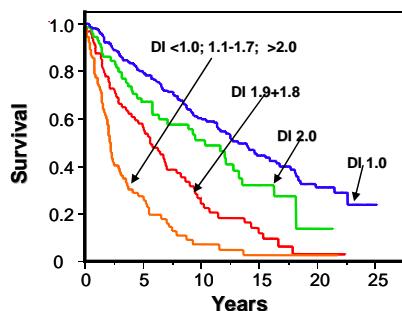


Fig. 4 Tumor spezifisches Überleben in Abhängigkeit vom DNA-Index von 520 Patienten mit neu diagnostizierten Prostata-Karzinomen.

Der prognostische Wert einer derartigen DNA-Klassifikation behält seine Gültigkeit auch für Tumoren, die zu einem späteren Zeitpunkt als zum Diagnosezeitpunkt untersucht wurden, und somit zeitlichen Veränderungen, Selektionsprozessen und therapeutischen Einflüssen ausgesetzt waren. Dieses geht aus dem in Fig. 5 dargestellten Vergleich zwischen neu entdeckten Tumoren und durchschnittlich 3,8 (0,1-35) Jahre nach der Diagnose untersuchten Tumoren hervor.

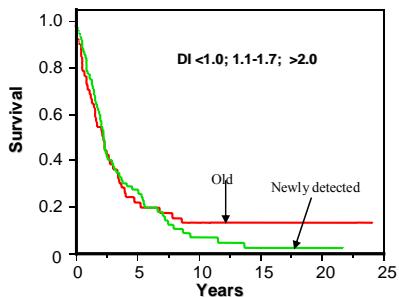
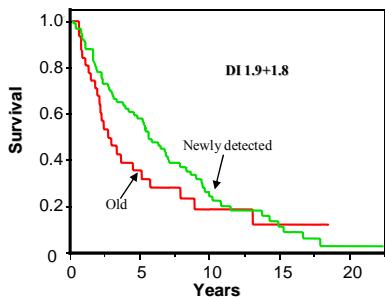
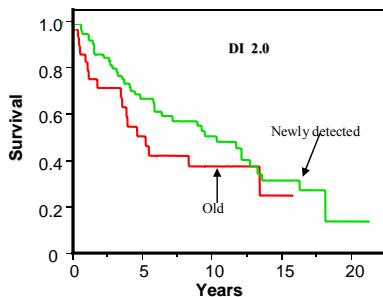
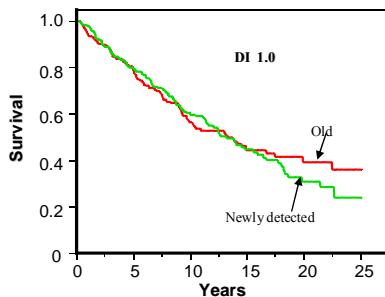


Fig.5 Tumor spezifisches Überlebens von 520 Patienten, untersucht bei Diagnosestellung des Prostata-Karzinoms, verglichen mit 355 Patienten, die erst im Verlauf der Erkrankung zur Untersuchung kamen, in Abhängigkeit vom DNA-Index. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede.

Die steigende Tumor-Aggressivität mit einem nur geringfügigen Abfall der Chromosomen Menge ist ein für die Tumorbiologie interessanter Fragekomplex, der beim Prostata-Karzinom neben Fragen der Bedeutung vom Verlust von Suppressor-Genen die Frage der Entwicklung zur Androgen-Unabhängigkeit umfasst. Mit fallendem DNA-Index ist ein Anstieg des Anteils von S-Phase-Zellen verbunden. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf die mögliche Bedeutung der Zellproliferation bei der Selektion von Zellpopulationen mit höherem Malignitätspotential. Für die Praxis der DNA-Zytometrie ist es ein nachdrücklicher Hinweis auf die Bedeutung größter Genauigkeit bei der Bestimmung der DNA-Indices.

### 3.2. S-Phase Fraktion und Tumor-spezifisches Überleben

Die bei 749 Tumoren berechnete S-Phase Fraktion mit einem Medianwert von 5,2% liegt in einem weiten Bereich von < 1% und 30%. Die Abhängigkeit des tumorspezifi-

schen Überlebens von der Zellproliferation zeigt Fig. 6, in der die S-Phase-Werte der Tumoren unabhängig von sonstigen Eigenschaften wie Grad, Stadium und DNA-Ploidie und etwaigen therapeutischen Einflüssen in drei Gruppen mit niedrigen Werten <5,1%, mit Werten 5,1-<7,8% und mit Werten =>7,8% aufgeteilt sind.

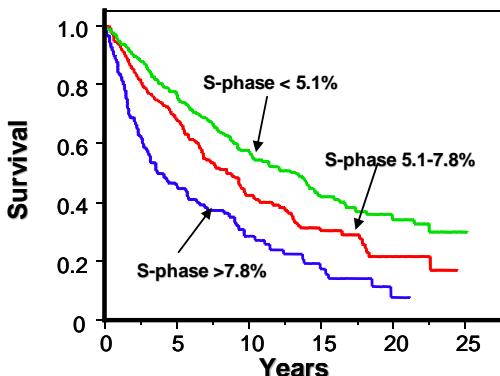


Fig.6 Tumor spezifisches Überleben von 749 Patienten mit Prostata Karzinom in Abhängigkeit von der S-Phasen-Fraktion.

### 3.3. DNA-Ploidie des Primärtumors und Skelettmetastasen

Wie bei den meisten soliden Tumoren sind es auch beim Prostata-Karzinom die Fernmetastasen, die den Ausgang der Tumorerkrankung bestimmen. Das Vorkommen von Skelettmetastasen in Abhängigkeit vom DNA-Index des Primärtumors ist in Tab.1 zusammengefasst. Skelettmetastasen wurden durch Skelettszintigraphie zusammen mit Röntgenuntersuchungen nachgewiesen. Um eventuelle therapeutische Einflüsse auf den Primärtumor oder Metastasen auszuschließen, wurden die Befunde nur von Patienten mit neu diagnostizierten, unbehandelten Tumoren gewählt. Die Daten zeigen, dass bereits bei diploiden Tumoren Skelettmetastasen in 10% vorliegen, die bei tetraploiden Tumoren auf etwa 20% steigen und schließlich in 50% von Patienten mit nahe-diploiden und hypertetraploiden Tumoren zu finden sind. Erwartungsgemäß steigt mit dem Tumorstadium und -grad die Metastasenhäufigkeit. In der kleinen Gruppe von Patienten im Stadium 4 finden sich Metastasen in mehr als der Hälfte der Fälle. Es kann festgehalten werden, dass in 10% von klinisch lokalisierten T1/T2 Tumoren Metastasen vorliegen, und in 20% der relativ großen Gruppe von mittelhoch differenzier-ten Tumoren. Mit Anstieg der S-Phase von <5% auf >7,8% ist ein Anstieg der Metasta-senhäufigkeit von 10% auf 30% verbunden.

	Skelett-metastasen %	Anzahl Patienten
<b>DNA-Index</b>		
<b>1,0</b>	<b>10</b>	<b>204</b>
<b>2,0</b>	<b>21</b>	<b>61</b>
<b>1,8+1,9</b>	<b>26</b>	<b>68</b>
<b>&lt; 1,0; 1,1-1,7; &gt; 2,0</b>	<b>48</b>	<b>60</b>
<b>S-Phase Fraktion %</b>		
<b>&lt; 5,1</b>	<b>12</b>	<b>144</b>
<b>5,1 - &lt; 7,8</b>	<b>17</b>	<b>115</b>
<b>≥ 7,8</b>	<b>30</b>	<b>79</b>
<b>Stadium</b>		
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>10</b>	<b>136</b>
<b>3</b>	<b>27</b>	<b>207</b>
<b>4</b>	<b>55</b>	<b>20</b>
<b>Grad</b>		
<b>1</b>	<b>6</b>	<b>128</b>
<b>2</b>	<b>20</b>	<b>160</b>
<b>3</b>	<b>39</b>	<b>105</b>

Tab. 1: Skelettmastasen ( % ) bei 393 Patienten mit neu-diagnostizierten Prostata-Karzinomen in Relation zu DNA-Ploidie, S-Phase Fraktion, Stadium und Grad

Das Vorkommen von Skelettmastasen ist mit einer relativ kurzen Überlebensdauer verbunden. Der Medianwert der in Fig. 7 gezeigten tumorspezifischen Überlebenskurve von 105 Patienten mit nachgewiesenen Skelettmastasen beträgt 2,3 Jahre gegenüber einem Medianwert von 10 Jahren für 510 Patienten aller Stadien und Grade ohne nachgewiesene Skelettmastasen. Diese Kurve zeigt jedoch auch, dass etwa 20% der Patienten mit Skelettmastasen 5 Jahre oder länger überleben können. Dabei spielt offensichtlich die Zellproliferation eine Rolle. Das wird deutlich bei der in Fig. 8 vorgenommenen Aufteilung der Patienten mit Metastasen in zwei Gruppen in Abhängigkeit von der S-Phasenfraktion der Primärtumoren, solche mit S-Phase Werten  $< 5,1$  und  $> 5,1\%$ . Die Ergebnisse zeigen ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit niedrigerer Proliferationsrate des Primärtumors. Es lassen sich also Zusammenhänge zwischen Eigenschaften von Metastasen und Primärtumoren nachweisen, die genutzt werden können, klinisch wichtige prognostische Information über Eigenschaften von Fernmetastasen zu erhalten.

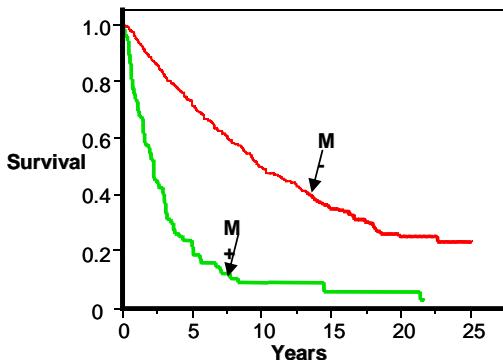


Fig.7 Tumor spezifisches Überleben von 105 Patienten mit Skelettmastasen verglichen mit 510 Patienten ohne nachweisbare Skelettmastasen.

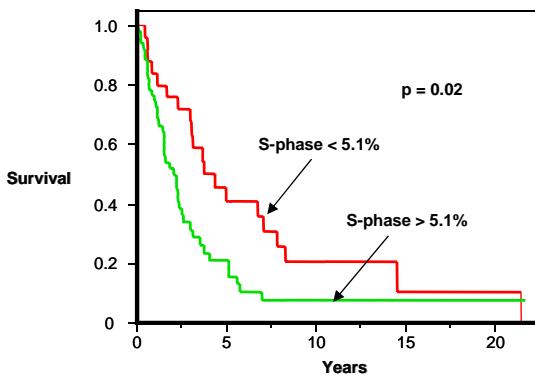


Fig.8 Tumor spezifisches Überleben von 78 Patienten mit Skelettmastasen in Abhängigkeit von der Größe der S-Phasen-Fraktion des Primär-Tumors.

Zu den eingangs erwähnten wichtigen Fragen gehört, Tumoreigenschaften zu erkennen die gleichbedeutend mit Vorkommen von Fernmetastasen sind, obwohl solche klinisch nicht nachweisbar sind.

Vergleicht man das tumorspezifische Überleben von Patienten mit Skelettmastasen mit demjenigen einer durch den DNA-Index charakterisierten Hoch-Risiko-Gruppe (DNA-Index  $<1.0$ ;  $1.1-1.7$ ;  $>2.0$ ) ohne nachweisbare Skelettmastasen, findet sich kein Unterschied. Dieses zeigen Fig. 4 und 7.. Chromosomal gesehen, ist diese Gruppe durchaus inhomogen und repräsentiert möglicherweise verschiedene Entwicklungswege des Prostata-Karzinoms:

- Der eine mit nahe-diploiden Tumoren. Ein Beispiel davon wird in Fig. 1c gezeigt. Zu diesen Tumoren gehören offensichtlich auch die hypertetraploiden, die durch Polyploidisierung nahe-diploider Tumoren erklärt werden können.
- Eine andere Gruppe von Tumoren mit DNA-Indices zwischen 1,7-1,4 mit einem in Fig. 1d gezeigtem Beispiel schließen sich am ehesten der großen Gruppe von aneuploiden Tumoren mit DNA-Indices = $<2,0$  an, bei welchen steigender Verlust von Chromosomen mit erhöhter Aggressivität verbunden ist. Dem Entwicklungsweg dieser Gruppe liegt als erster Schritt ein Polyploidisierungs-Prozess von diploid zu tetraploid zugrunde, gefolgt von zufälligem Chromosomenverlust und vereint mit steigendem Verlust von Suppressorgen-Eigenschaften je mehr sich diese Tumoren dem triploiden Bereich (DNA-Index 1,5) nähern.

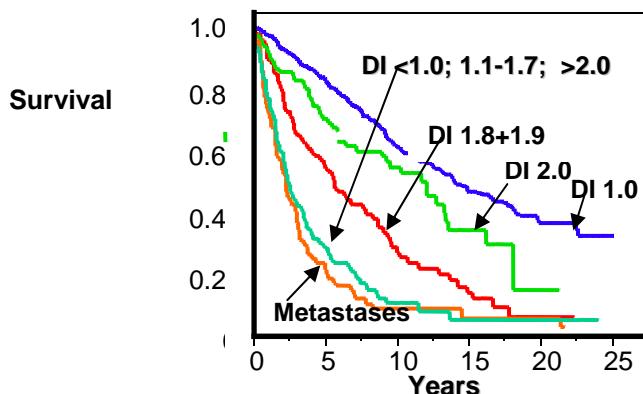


Fig .9 Tumor spezifisches Überleben von 105 Patienten mit Skelettmastasen verglichen mit dem Tumor spezifischen Überleben von 510 Patienten, aufgeteilt entsprechend der DNA-Klassifikation und ohne nachweisbare Skelettmastasen. Kein Unterschied zwischen Patienten mit Metastasen und Patienten ohne nachweisbare Metastasen mit DNA-Indices  $>1,0; 1,1-1,7; >2,0$ .

Die Sonderstellung, die diese chromosomalen Veränderungen für die Metastasierung einnimmt, wird besonders deutlich bei der Betrachtung anderer Tumor-Eigenschaften, die allgemein mit einem niedrigen Risiko für Metastasierung verbunden sind: in einem Gesamtmaterial von 900 unbehandelten und behandelten Patienten aller Stadien fanden sich 20% dieser Veränderungen bei den T1/T2 Tumoren, > 50% dieser Veränderungen bei Grad 1+2 Tumoren und 25% dieser Veränderungen bei Tumoren mit einer S-Phase Fraktion <5,1%.

### **3.4. DNA-Ploidie der Metastasen**

Wie oben besprochen, sind es vor allem aneuploide Tumoren, die zu einer Generalisierung und zum Tumor bedingten Tod führen. Es ist deshalb zu erwarten, dass Metastasen ebenfalls weitgehend aneuploid sind. Das scheinen DNA-Ploidie-Messungen von im Zusammenhang mit Autopsien untersuchten Metastasen zu bestätigen: Skelettmetas-  
tasen (n=37), Organmetastasen (n=36) und Lymphknotenmetastasen (n=83) waren zu 97%, 94% und 88% aneuploid.

Zellmaterial, das von Skelettmetas-  
tasen im Zusammenhang mit chirurgischer Intervention von pathologischen Frakturen analysiert wurde (n=105), zeigte jedoch in nur 80% Aneuploidie, und Lymphknotenmetastasen, die bei radikaler Prostatektomie entdeckt wurden (n=105) in nur 40%. Diploide Metastasen (20% respektive 60%) finden sich also bei diesen Patientengruppen in signifikant höherer Frequenz als bei Autopsieunter-  
suchungen.

Diese Diskrepanz lässt sich aus Unterschieden in der Vorbehandlung der Patienten erklären, wenn man annimmt, dass diploide und aneuploide Tumorzellpopulationen unterschiedlich auf Hormontherapie ansprechen. Alle Patienten der post mortem untersuchten Metastasen waren hormonbehandelt, ebenso wie der größte Teil der Patienten mit pathologischen Frakturen. Bei den wenigen unbehandelten letzteren Patienten, wurden gehäuft diploide Skelettmetas-  
tasen gefunden. Im Gegensatz dazu, waren die Patienten, bei denen Lymphknotenmetastasen im Zusammenhang mit radikaler Prostatektomie entdeckt wurden, im Wesentlichen unbehandelt. Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass diploide Metastasen durch Androgenentzug die Basis für das Wachstum verlieren und zugrunde gehen, während aneuploide Metastasen entweder primär androgen-unabhängig sind oder über Mechanismen verfügen, Androgen-  
Unabhängigkeit zu entwickeln und somit den Androgenentzug zu überleben.

Auf die mögliche Bedeutung unterschiedlicher Hormonempfindlichkeit, und Selektion aneuploider Zellpopulationen durch Androgenentzug, bei Koexistenz diploider und aneuploider Zellpopulationen beim Prostatakarzinom ist schon früher mehrmals hingewiesen worden. Die DNA-Zytometrie mag deshalb auch in Zusammenhang mit Therapie wertvolle klinische Information vermitteln.

## **4. Änderungen von Tumoreigenschaften**

In den Diskussionen zum natürlichen, unbeeinflussten Verlauf des Prostatakarzinoms haben DNA-Messungen den Fokus auf die Bedeutung chromosomal Veränderungen gerichtet und deren Zusammenhänge mit der Entwicklung zu höherer Malignität. Die hier vorliegenden Ergebnisse wiederholter Biopsien bei unbehandelten Patienten zeigen das Vorliegen von Veränderungen und bilden einen Beitrag zum Verlauf des Prostatakarzinoms. Die kontroverse Frage, ob non-tetraploide, aneuploide Tumoren das Resultat einer schrittweisen Entwicklung ist, die von Diploidie über Polyploidisierung zu Tetraploidie und durch nachfolgenden Chromosomenverlust zur Aneuploidie führt oder ob bei ursprünglich multifokalem Vorkommen diploider und aneuploider Veränderun-

gen letztere durch Wachstumsvorteil dominieren, kann dadurch jedoch nicht beantwortet werden und wird hier nicht erörtert.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse wiederholter Biopsien, die durchschnittlich rund 2 Jahre nach der ersten vorgenommen wurden, zusammengefasst. Bei 1/3 der Patienten änderten sich die intrakapsulären Tumoren T1/T2 zu extrakapsulären T3 Tumoren und die DNA-Ploidie von diploid zu tetraploid- aneuploid /non-tetraploid aneuploid. Es ist bemerkenswert, dass auch die S-Phasen-Fraktion der 86 untersuchten diploiden Tumoren signifikant anstieg (paarweiser t-Test); diese blieb bei den aneuploiden Tumoren unverändert. Diese Veränderungen von Stadium, Ploidie und S-Phasen-Fraktion stehen im Gegensatz zu Änderungen des Tumorgrades von G1+G2 zu G3, welche nur bei < 10% der Patienten vorlagen.

<b>Stadium</b>	1 + 2 → 3	31/86	36 %
<b>Grad</b>	1 + 2 → 3	9/117	8 %
<b>Diploid → Aneuploid</b>		27/101	27 %
<b>S-Phase</b>			
<b>Diploid, n=86</b>	5,1 % → 6,1 % ( p= 0,009 )		
<b>Aneuploid, n=26</b>	6,3 % → 6,5 % ( n. s. )		

Tab. 2: Änderung von Tumoreigenschaften bei wiederholter Biopsie unbehandelter Patienten mit Prostata Karzinomen

Die vorliegenden Daten zeigen, dass das Prostata Karzinom bei seiner klinischen Manifestation nicht das Produkt einer abgeschlossenen Entwicklung ist sondern ein sich weiter entwickelnder Tumor. Dabei handelt es sich nicht nur um einen Größenzuwachs mit Erreichen eines höheren Stadiums, sondern auch um umfassende, durch DNA-Zytometrie nachweisbare chromosomale Veränderungen, sowie um solche innerhalb der Regulation der Zellproliferation bei diploiden Tumoren ohne Veränderung von Ploidie. Die Vielseitigkeit dieser, mit sehr groben Methoden und innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums nachweisbaren Veränderungen sowie die Tatsache, dass diese bei unbehandelten Patienten unter aktiver Überwachung mit einem zu erwartendem gutartigen Verlauf gefunden worden sind, ist eine Herausforderung, die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Progresse zu klären und prädiktive Methoden zu finden, diese vorauszusagen. Mit dem Erkennen der einem Tumorprogress zugrunde liegenden Mechanismen eröffnen sich gleichzeitig neue Möglichkeiten, spezifisch in diese Mechanismen einzutreten - ein aus therapeutischer Sicht wichtiger Gesichtspunkt.

### **5.1. Zusammenhänge zwischen DNA-Ploidie / S-Phase Fraktion und Tumor Stadium/Grad**

Die Zusammenhänge zwischen DNA-Ploidie und Tumor-Stadium, -Grad und S-Phase Fraktion und die damit verbundene zusätzliche Information bei 533 neu entdeckten

Prostata-Karzinomen sind aus Tab. 3 ersichtlich. Bei der oben besprochenen Aufteilung der DNA-Ploidie in vier Untergruppen verschiebt sich mit steigendem Stadium und Grad sowie steigender S-Phase Fraktion die DNA-Ploidie von einem diploiden zu einem zunehmend aggressiven aneuploiden Verteilungsbild. Etwa 1/3 der diploiden Tumoren sind jedoch auch extrakapsulär, sind als Grad 3 eingestuft und sind hoch proliferativ mit S-Phase Werten >7,8%. Umgekehrt finden sich unter den lokalisierten T1/T2 sowie Grad 1 Tumoren bereits eine gewisse Anzahl hoch aggressiver aneuploider Tumoren.

	DNA-Index					Anzahl
Stadium	1,0 %	2,0 %	1,8 + 1,9 %	< 1,0; 1,1 – 1,7; >2,0 %		
1	81	6	8	5		37
2	71	11	12	6		196
3	38	16	24	22		275
4	12	24	28	36		25
Grad						
1	81	8	4	7		171
2	47	17	23	13		238
3	22	14	32	32		124
S-Phase Fraktion %						
< 5,1	70	16	10	4		199
5,1 - < 7,8	59	14	17	10		143
≥ 7,8	34	15	32	19		112

Tab. 3: DNA-Ploidie von 533 Patienten mit neu-diagnostizierten Prostata Karzinomen in Relation zu Stadium, Grad und S-Phase Fraktion

Für die in Tab. 4 gezeigten Zusammenhänge zwischen S-Phase Fraktion, Stadium und Grad findet sich eine ähnliche Verschiebung zu höherer Proliferation beim Übergang von Stadium 2 auf Stadium 3 und Grad 2 auf Grad 3. Aus dem ebenfalls gezeigten Zusammenhang zwischen S-Phasen-Fraktion und Ploidie geht hervor, dass diese Verschiebung nur teilweise mit einem größeren Anteil höher proliferativer, aneuploider Tumoren zu erklären ist (Medianwert der S-Phase diploider und aneuploider Tumoren 5,0% respektive 6,7%).

	S-Phase in %			Anzahl
Stadium	< 5,1	5,1 - < 7,8	≥ 7,8	
1	50	33	17	30
2	55	31	14	173
3	37	31	32	227
4	17	37	46	24
Grad				
1	50	34	16	155
2	50	31	19	197
3	24	28	48	102
DNA-Index				
1,0	53	32	15	263
2,0	46	29	25	68
1,8 + 1,9	25	30	45	80
< 1,0; 1,1-1,7; >2,0	19	32	49	43

Tab.4: S-Phase Fraktion von 454 Patienten mit neu diagnostizierten Prostata Karzinomen in Relation zu Stadium, Grad und DNA-Ploidie.

## 5.2. Prognostische Zusatz-Information der DNA-Zytometrie zur mikroskopischen Morphologie des Prostata Karzinoms

Lokales Tumor-Stadium, Status lokaler Lymphknoten und Nachweis von Fernmetastasen sowie die histopathologische/zytologische Tumormorphologie bilden die Basis, auf der sich Diagnose und Prognose des Prostatakarzinoms stützen. Die prognostische Bedeutung der zytologischen Gradierung und der klinischen Stadieneinteilung zeigen die in Abb. 10 dargestellten tumorspezifischen Überlebenskurven von 533 Patienten mit neu diagnostizierten Tumoren. Die Aufteilung in drei Grade von Malignität findet ihre Begründung in einer guten Separation der Überlebensraten. Dabei ist zu verzeichnen, dass auch Patienten mit Grad 1 Tumoren 15 Jahre nach dieser Diagnose in nahezu unverändertem Umfang an ihrem Karzinom versterben und, ausgehend von der Metastasierung als Todesursache, dass die Unterschiede zwischen Grad 1, Grad 2 und Grad 3 Tumoren im Wesentlichen auf Unterschieden in der Geschwindigkeit beruht, mit der es zu manifesten Metastasen kommt. Stadium 1 und 2 Tumoren unterscheiden

sich nicht voneinander. Abgesehen von den wenigen Patienten mit Tumoren im Stadium 4 mit bekannt schlechter Prognose findet sich ein wesentlicher Unterschied zwischen lokalisierten und nicht lokalisierten Tumoren.

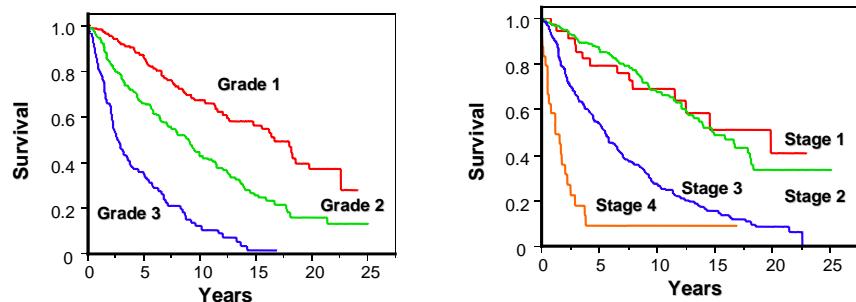


Fig.10: Tumor spezifisches Überleben von 487 Patienten mit neu diagnostizierten Prostata-Karzinomen in Abhängigkeit von Tumorgrad (links) und Tumorstadium (rechts).

Am Beispiel von Tumorgrad und -stadium wird hier gezeigt, welche prognostische Zusatz-Information durch DNA-Analysen erwartet werden kann. Von möglichen therapeutischen und anderen Einflüssen ist hier abgesehen. In Fig.11 sind die Tumoren entsprechend ihren Graden und Stadien in 3 respektive 2 Untergruppen aufgeteilt. In allen Untergruppen ermöglichen die in 4 Gruppen aufgeteilte DNA-Ploidie eine Abgrenzung von Patienten mit unterschiedlichem Risiko mit statistisch hoher Signifikanz. In der klinischen Praxis hat diese Information für die größte und gleichzeitig meist heterogene Gruppe von Grad 2 Tumoren eine relativ stärkere Bedeutung als für Grad 1 Tumoren mit überwiegend diploiden Tumoren und für Grad 3 Tumoren mit einem hohen Anteil aneuploider Tumoren. Die oben im Zusammenhang mit der Metastasierung ausführlicher besprochenen Gruppe aneuploider Tumoren mit DNA-Indizes  $<1.0$ ;  $1.1-1.7$ ;  $>2.0$  hat eine ausgesprochen schlechte Prognose unabhängig von Grad und Stadium. Hingegen spielt bei diploiden Tumoren der Tumorgrad eine bedeutsame Rolle mit einer zunehmenden Verkürzung der Überlebenszeit mit steigendem Grad beziehungsweise beim Übergang vom lokalisierten zum extrakapsulären Tumor .

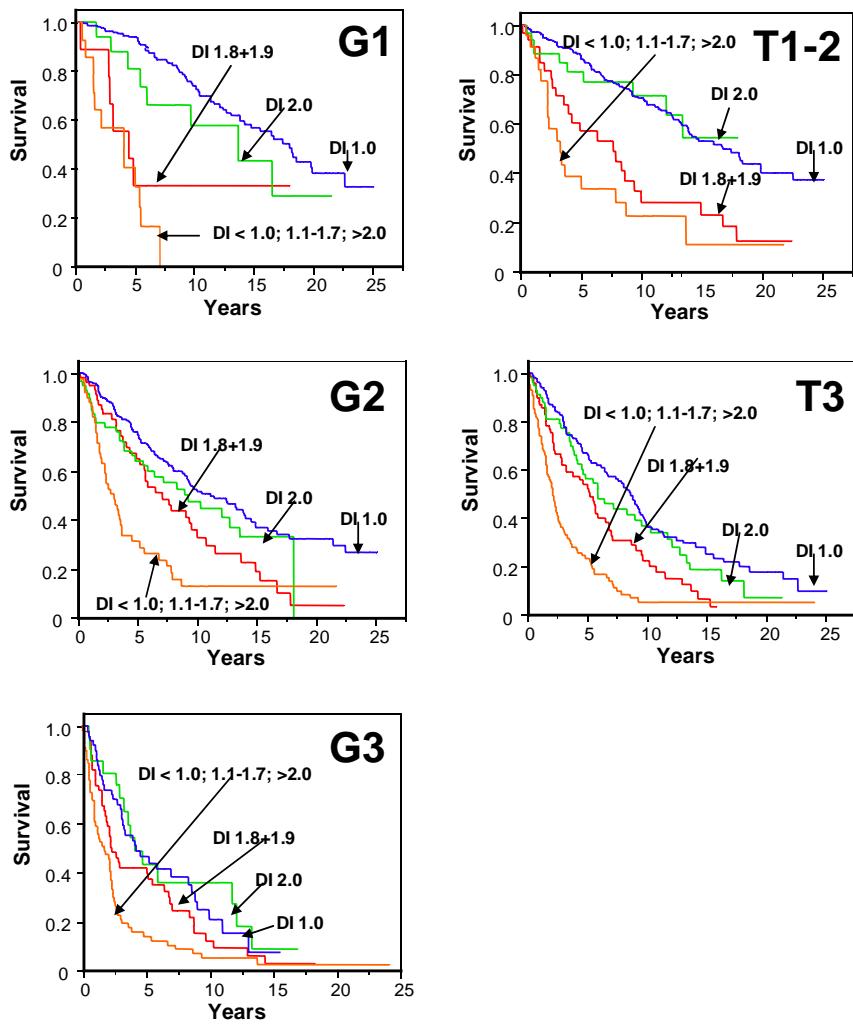


Fig. 11: Bedeutung des DNA-Index für das Tumor-spezifische Überleben von Untergruppen von Patienten mit Prostata Karzinomen. Links Grad 1-3, rechts Stadium T1/2, T3.

Auch die Größe der S-Phasenfraktion vermittelt eine zusätzliche prognostische Information. Dieses ist am Beispiel der relativ großen Untergruppen von T1-2 G2 und T3 G3 Tumoren in Abb. 12 gezeigt, mit einem signifikant schlechteren Überleben bei erhöhter Proliferation.

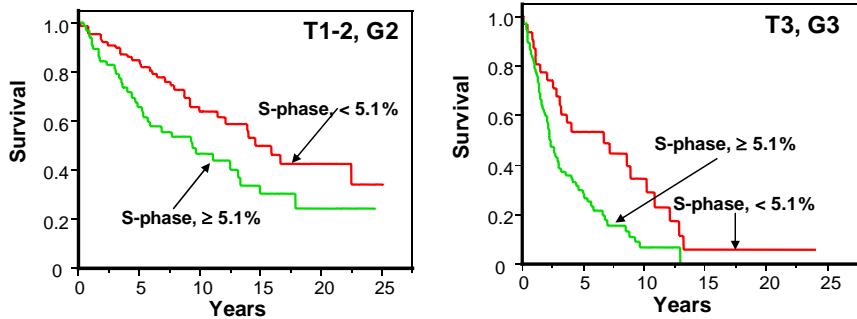


Fig. 12: Beispiele für die Bedeutung der S-Phase Fraktion für das Tumor-spezifische Überleben in Untergruppen von Patienten mit intrakapsulären und extrakapsulären Prostata Karzinomen.

Das Fazit dieser vergleichenden Betrachtung ist, dass die Prognose von den unterschiedlichsten Tumoreigenschaften bestimmt wird, die in mehr oder minder hohem Grade unabhängig voneinander sind. Das wird deutlich bei einer multivariaten Analyse unter Einschluss von Grad, Stadium, DNA-Ploidie und S-Phase Fraktion, die alle hochsignifikant mit unabhängiger prognostischer Information beitragen. Als Einzelfaktor zeigen Tumoren mit DNA-Indices  $<1,0; 1,1-1,7; >2,0$  eine bemerkenswert hohe Unabhängigkeit.

## 6. Schlusswort

Eingangs sind einige für die Behandlung des Prostata-Karzinoms wichtigen Fragen genannt worden, die sich durch die konventionelle histologische Beurteilungsverfahren des Primärtumors nicht beantworten lassen. Welchen Beitrag kann die DNA-Durchfluss-Zytometrie zu deren Lösung leisten?

Es konnte hier gezeigt werden, dass bestimmte DNA-Konfigurationen des Primärtumors ohne nachweisbare Fernmetastasen mit einem sehr ungünstigen Krankheitsverlauf kombiniert sind, der sonst nur bei nachgewiesenen Fernmetastasen zu beobachten ist und nur durch das Vorliegen von bereits vorhandenen Mikrometastasen zu erklären ist. Lokale radikale, mit erhöhter Morbidität verbundene Therapie ist bei solchen Tumoren deshalb nicht angezeigt.

Langzeituntersuchungen machen deutlich, dass der Begriff eines klinisch insignifikanten Tumors nur unter Berücksichtigung einer Zeitangabe sinnvoll ist. Patienten mit lokalisierten diploiden Grad 1 Tumoren haben zwar eine 5-jährige Tumor-spezifische Überlebenserwartung von mehr als 95%, die jedoch nach 10 Jahren auf 75% abgesunken ist. Wiederholte Biopsien bestätigen eine zeitlich fortlaufende Differenzierung des Tumors.

DNA-Ploidie- und S-Phasenbestimmungen ersetzen nicht eine morphologische Gradierung und können nur begrenzt zu deren Standardisierung verwendet werden. Ihr Vorteil ist deren Unabhängigkeit von subjektiven Einflüssen, verlangen jedoch eine Repräsentativitäts-Kontrolle des zu untersuchenden Zellmaterials.

## **7. Methodologische Bemerkungen**

Zellmaterial von Primärtumoren wurde zwischen 1978-1989 mit der von Franzén 1960 beschriebenen transrektalen Feinnadel-Aspirationsbiopsie-Technik gewonnen. Alle Patienten kamen aus Stockholm, die Mehrzahl aus der Urologischen Klinik sowie der Onkologischen Klinik/Radiumhemmet, Karolinska Universitäts Krankenhaus. DNA-Analysen und cytologische Beurteilung wurden unabhängig voneinander und in verschiedenen Institutionen durchgeführt. Die von Esposti 1971 beschriebene und hier benutzte zytologische Klassifikation stimmt weitgehend mit dem 2002 beschriebenen WHO Grading System des Prostatakrebses überein. Die verwendeten Tumor Stadien entsprechen der TNM Klassifikation von 1978. Technische Fragen zur DNA-Durchfluss Zytometrie werden gerne auf Anforderung beantwortet.

## Prognosefaktoren des Prostata-Karzinoms

### Zusammenfassung

Bei den verschiedenen therapeutischen Optionen, die heute bei klinisch organbegrenzten Prostatakarzinomen zur Verfügung stehen, spielen histopathologische Selektionskriterien eine zunehmende Rolle. Es geht beim Prostatakarzinom nicht nur um die Diagnose, sondern auch um prognostische Informationen für eine Stadien- gerechte Therapieentscheidung. Neben den klassischen Prognosefaktoren (PSA- Wert, TNM, Gleason Grad, R- Status), gibt es eine Reihe von neueren Prognosefaktoren (Tumorvolumen, Anteil der Gleason Grade 4 und 5, zystische Nervenscheideninvasionen, intraduktale Tumorausbreitung) und molekulare Marker, die heute beachtet werden sollten. Die vorliegende Übersicht befasst sich mit den etablierten und neuen Prognosefaktoren und den aktuellen Standards der Aufarbeitung und Befundung in der histopathologischen Prostatadiagnostik.

### Einleitung

Das Prostatakarzinom ist eine sehr heterogene Tumorerkrankung reichend von den klinisch unbedeutenden bis hin zu den aggressiven und tödlich Verlaufsformen. Neben der Früherkennung und der Diagnose stehen daher die Faktoren im Vordergrund, die den individuellen Verlauf prognostizieren.

Das College of American Pathologists (CAP) hat im Jahr 1999 die bis dahin bekannten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms gewichtet und in drei Kategorien eingeteilt (3).

**Kategorie I** umfasst alle die Faktoren, deren prognostische Bedeutung universal anerkannt wird und die routinemäßig bestimmt werden sollen. Dazu gehören:

**klinische und pathologische Tumorstadium (TNM)**

**Malignitätsgrad (Gleason Grad)**

**Absetzungsränder (Marginstatus)**

**PSA Wert**

**Kategorie II** umfasst die Faktoren, deren prognostische Bedeutung zwar bekannt ist, die jedoch bislang statistisch nicht hinreichend belegt werden konnte. Dazu gehören:

**DNA Ploidie**

**histologischer Typ**

**Tumorvolumen in Stanzbiopsien**

**Tumorvolumen in Prostatektomiepräparaten**

**Kategorie III** umfasst die Faktoren, deren prognostische Bedeutung nicht hinreichend gesichert ist, so dass ihre Bestimmung in der Routinediagnostik bislang nicht empfohlen werden konnte. Dazu gehören:

**Nervenscheideninvasionen**

**Lymph- und Blutgefäßeinbrüche**

**neuroendokrine Differenzierung**

**Angiogense (microvessel density)**

**Kernmorphometrie**

**Proliferationsmarker und andere Zellzyklusmarker**

**genetische Marker**

Seit 1999 sind freilich neue Prognosefaktoren hinzugekommen. In uni- und multivariablen Analysen haben sich die folgenden pathologischen Faktoren als unabhängige Marker für das PSA Rezidiv nach radikaler Prostatektomie heraus gestellt (11):

**der Anteil der primären Gleason Grade 4 und 5 (multivariabel )**

**der Anteil der intraduktalen Tumorausbreitung (multivariabel)**

**die Tiefe und Breite der Kapselinfiltration**

**der Durchmessermesser der Nervenscheideninvasion**

Die prognostische Aussagekraft der aufgelisteten Faktoren ist im Einzelfall natürlich abhängig von der Art wie das Material entnommen, aufgearbeitet und befundet wird (4, 11). Die vorliegende Übersicht beschäftigt sich mit alten und neuen Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms und den aktuellen Standards der Aufarbeitung und Befundung.

## Prätherapeutisches Staging

Für das klinisch organbegrenzte Prostatakarzinom gibt es heute mehrere therapeutische Optionen. Dazu gehören neben „watchfull waiting“, die radikale oder nervschonende Prostatektomie (mit oder ohne Lymphadenektomie), externe Bestrahlung, Brachytherapie und die verschiedene Formen der Hormontherapie. Der Stanzbefund ist dabei entscheidend für die Wahl der Therapie (8).

Das klinische Staging des Prostatakarzinoms ist ungenau und kann durch konkurrierende Prostataerkrankungen verfälscht werden. Es gibt eine Reihe von benignen Stanzbefunden bzw. Veränderungen, die einen erhöhten PSA-Wert oder einen suspekten rektalen Tastbefund hervorrufen bzw. erklären können. Im Vordergrund stehen hier die häufigen entzündlichen Veränderungen der Prostata, die je nach Ausdehnung und Intensität erhebliche PSA- Erhöhungen verursachen können, unabhängig davon ob ein Prostatakarzinom vorliegt oder nicht. PSA relevant sind alle die Formen der Prostatitis, die das Prostataepithel zerstören. Nicht selten sind Fälle mit stark erhöhten PSA Werten ( $> 10\text{ng/ml}$ ), ausgedehnter Prostatitis und nur randständig erfassten Karzinomausläufer. Hier dürfte der PSA Wert eher Ausdruck der Entzündung und weniger des kleinen Karzinomauslängers sein. Ähnlich verhält es sich mit dem suspekten Tastbefund. Eine Reihe von benignen Prostataveränderungen kann bei der rektalen Untersuchung einen malignen Befund vortäuschen. An erster Stelle ist hier, neben der granulomatösen Prostatitis, die postatrophische Hyperplasie zu nennen. Diese Läsion entsteht typischerweise in den kapselnahen Abschnitten der peripheren Zone und ist bei entsprechender Ausdehnung von einem Karzinom palpatorisch nicht zu unterscheiden. Wenn größere Herde einer postatrophischen Hyperplasie in Stanzbiopsien erfasst werden, dann ist dies durchaus ein adäquates Korrelat für einen suspekten Tastbefund. Eine PSA-Erhöhung erklärt diese Läsion jedoch nicht.

Gerade auch in positiven Stanzbiopsien ist es wichtig die benignen Prostataveränderungen mitzuteilen und zu kommentieren, die das klinische Staging (PSA Wert, Tastbefund) verfälschen können.

Im Befundbericht einer Prostatastanzbiopsie sollten die folgenden Angaben gemacht werden (8,6):

- primäre , sekundäre und ggf. tertiären Gleason- Grad und Gleason Score pro Stanzbiopsie
- prozentuelle Anteil der primären Gleason Grade 4 und 5
- Tumorausdehnung in mm und % pro Stanze, rechts, links und gesamt
- Tumorlokalisation
- Nachweis von Nervenscheideninvasionen ( Lokalisation und Ausdehnung)
- Hinweise auf eine extraprostatische Tumorausdehnung
- Aufführung aller benignen Prostataläsionen, die zu einer PSA Erhöhung oder einem suspekten Tastbefund führen oder beitragen können

## Gleason Grad

Der Gleason Grad ist der wichtigste Prognosefaktor des Prostatakarzinoms und korreliert u.a. mit (8,9):

- dem PSA- Wert
- dem pT- Stadium und Tumorvolumen
- dem Lymphknotenstatus
- anderen Prognosefaktoren, z.B. Ploidiestatus, Angiogenese, ect.
- der Rezidiv- und Überlebensrate

Gleason unterscheidet fünf verschiedene Grade von 1 bis 5. Der Gleason Score (Gleason Summe) ergibt sich aus der Addition der zwei häufigsten Gleason Grade, die in einem Tumor vertreten sind, und reicht von 2 (1+1) bis 10 (5+5). Die Aggressivität eines Prostatakarzinoms ist bei einem Gleason Grad 1 und 2 sehr gering, bei Gleason Grad 3 intermediär und bei Gleason Grad 4 und 5 als hoch einzustufen.

In Prostatastanzbiopsien sind neben dem erfassten Tumorvolumen der prozentuelle Anteil der primären Gleason Grade 4 und 5 die wichtigsten Prognosefaktoren überhaupt. Dies gilt natürlich nur unter der Voraussetzung, dass der angegebene Gleason Grad auch stimmt.

Ein großes Problem beim Gleason Grading ist die Reproduzierbarkeit, d.h., dass ein und derselbe Tumor von verschiedenen Pathologen unterschiedlich bewertet wird. Die exakte Reproduzierbarkeit des Gleason Score ist im internationalen Vergleich unbefriedigend und liegt je nach Studie zwischen 36% und 78% (9). Eine Verbesserung dieser Situation lässt sich nur durch eine gezielte Fortbildung erwarten. Entsprechende Schulungsprogramme sind im Internet frei zugänglich ([www.prostapath.de](http://www.prostapath.de) ; [www.pathology.jhu.edu/prostate](http://www.pathology.jhu.edu/prostate)) und können für die ärztliche Fortbildung genutzt werden.

Die Verlässlichkeit und prognostische Aussagekraft des Gleason Grading ist wesentlich abhängig von der persönlichen Erfahrung des untersuchenden Pathologen. Der häufigste und schwerwiegendste Gradingfehler ist die Untergraduierung in Stanzbiopsien (6, 8, 9). Herdförmig erfasste Tumorausläufer werden häufig als Gleason Grad 1 oder 2 fehl interpretiert. Der Gleason Grad 3 bzw. der Gleason Score 3+3=6 ist der niedrigste Grad oder Score, den man verlässlich in Stanzbiopsien diagnostizieren kann (6, 8). Ein weiteres Problem ist, dass die prognostische Bedeutung der Drüsenfusion (Gleason Grad 4) nicht erkannt wird. Die daraus resultierende Untergraduierung kann zu einer nicht stadiengerechten Therapieentscheidung führen. Gerade von den Betroffenen und Selbsthilfegruppen wird die Einholung einer Zweitmeinung gefordert, wenn der Gleason Grad maßgeblich die Wahl der Therapie entscheidet. Bei einem Gleason Score  $\leq 6$  in Stanzbiopsien besteht, in Abhängigkeit vom Alter des Patienten, seiner Lebenserwartung, der Tumorausdehnung und der PSA- Diagnostik (PSA- Verdopplungszeit, PSA-Dichte), eine watchfull waiting Option. Eine Brachytherapie ist in der Regel nur bei einem Gleason Score  $\leq 6$  indiziert. Bei einem Gleason Score 7 entscheidet der prozentuelle Anteil des primären Gleason Grades 4, ob eine Potenz- erhaltende

Prostatektomie aus onkologischer Sicht vertretbar ist oder nicht. Bei einem Gleason Score > 7 wird heute zunehmend der externen Bestrahlung den Vorzug gegeben.

### **Tumorausdehnung**

Neben dem Gleason Grad ist das in den Stanzbiopsien erfasste Tumorvolumen der an zweiter Stelle stehende Parameter für die Prognose und die Therapieentscheidung im Rahmen des prätherapeutischen Staging (8). Ob eine Stanzbiopsie zu 2%, 40% oder 80% von Tumor befallen ist, hat für die Wahl der Therapie eine wichtige Bedeutung. Bei einer qualitativ guten und standardisierten Biopsieentnahme mit mindestens sechs oder acht Stanzen ist die Tumor- infiltrierte Stanzfläche ein wichtiges Maß für die Tumorlast in der gesamten Prostata.

### **Tumorlokalisation**

Die Lokalisation eines positiven Stanzbefundes kann im Einzelfall die Wahl der Therapie entscheiden (8). Zeigt z.B. die Stanzbiopsie aus der Apexregion eine hohe Tumorlast, dann kann dieser Befund dazu führen, dass wegen dem erhöhten Risiko von positiven Schnittändern bei der radikalen Prostatektomie der primären Strahlentherapie den Vorzug gegeben wird. Eine hohe Tumorlast in der Stanzbiopsie der zentralen Zone erhöht das Risiko einer Beteiligung der benachbarten Samenblasen.

### **Nervenscheideninvasionen**

Das Prostatakarzinom nutzt die Nervenscheiden der in die Prostata von außen einstrahlenden Nerven, um die Prostatakapsel zu durchbrechen. Das Risiko einer extraprostatischen Tumorausbreitung besteht somit vor allem an den Stellen, wo die Nervendichte am größten ist; d.h. im Bereich der neurovaskulären Bündel basisnahe und an der Prostataapex.

Der Nachweis von Nervenscheideninvasionen hat in Stanzbiopsien offensichtlich nicht den Stellenwert eines unabhängigen Prognosefaktors, korreliert jedoch mit dem Risiko einer extraprostatischen Tumorausdehnung nach radikaler Prostatektomie und einem höheren Rezidivrisiko nach externer Bestrahlung (11).

### **Extraprostatische Tumorausdehnung**

Eine extraprostatische Tumorausdehnung (T3a) kann in Stanzbiopsien nur dann verlässlich diagnostiziert werden, wenn das Fettgewebe infiltriert wird. Eine Tumorinfiltation zwischen größeren Gefäße und Nervenganglien ist zumindest dringend verdächtig auf eine extraprostatische Tumorausdehnung (4). Die Tumorinfiltation zwischen quergestreifter Muskulatur ist dagegen kein verlässliches Kriterium. Da die Samenblasen und die Ducti ejaculatorii histologisch das gleiche Epithel besitzen, ist es schwierig in Stanzbiopsien zwischen beiden Strukturen zu unterscheiden. Eine Tumorinfiltation

der Samenblase (T3b) lässt sich in Stanzbiopsien nur dann diagnostizieren, wenn eine gezielte Biopsie aus der Samenblase vorliegt (4)

## Individuelle Risikoabschätzung vor der Therapie

Die Partin Tabellen sind Nomogramme, die im Internet frei zur Verfügung stehen ([http://prostate.urol.jhu.edu/Partin\\_tables/](http://prostate.urol.jhu.edu/Partin_tables/)). Sie ermitteln das Risiko einer extraprostatischen Tumorerkrankung und Metastasierung (pT3a, pT3b, pN1). Die Variablen sind der Gleason Grad in der Biopsie, der PSA-Wert und das klinische Stadium (T- Kategorie). Die Daten der Partin Tabellen beruhen auf Gleason Grade, die von namhaften Prostatopathologen ermittelt wurden und somit als verlässlich eingestuft werden können (9, 11). **Wenn der Gleason Grad nicht stimmt, verlieren die Partin Tabellen ihren Wert und liefern falsche Prognosen.**

## Wann ist ein Prostatakarzinom klinisch unbedeutend?

Diese Frage lässt sich prinzipiell erst dann beantworten, wenn die gesamte Prostata zur histologischen Untersuchung zur Verfügung steht. Unter einem klinisch insignifikanten Prostatakarzinom versteht man einen strikt organbegrenzten Tumor (pT2) mit einem Tumovolumen < 0.5 ccm und einem Gleason Score ≤ 6.

Kann man einen derartigen unbedeutenden Tumor auch in der Stanzbiopsie diagnostizieren? Epstein zeigt, dass bei nur einer befallenen Stanzbiopsie mit einer Tumorausdehnung < 1mm und einer PSA- Dichte (PSA/ Prostatavolumen) ≤ 0.15 ccm in 83% der Fälle ein klinisch insignifikantes Prostatakarzinom in der radikalen Prostatektomie vorliegt (6,8). Bei einer solchen Befundkonstellation wäre, in Abhängigkeit des Alters des Patienten, eine abwartende Haltung (watchfull waiting) zu vertreten. Dies gilt freilich nur für die Fälle mit einer standardisierten Biopsieentnahme und einem validierten Gleason Grad.

## Stellenwert der zytologischen Prostataagnostik

Die Feinnadelaspiraton (FNA) der Prostata gilt zwar als nebenwirkungsärmer als die Stanzbiopsie, ist jedoch in ihrer diagnostischen Aussagekraft der histologischen Untersuchung von Stanzbiopsien unterlegen. Der zytologische Befund ist z.B. nicht in der Lage zwischen einem Vorläufer des Prostatakarzinoms (prostatische intraepitheliale Neoplasie, high grade oder kurz HGPIN) und einem Prostatakarzinom zu unterscheiden (13). Da HGPIN auch in tumorfreien Prostata relativ häufig vorkommt, ist die FNA alleine schon aus diesem Grund gegenüber der Stanzbiopsie nicht mehr zeitgemäß und obsolet. Darüber hinaus können wichtige prognostische Parameter (Gleason Grad, Tumorausdehnung, Tumorlokalisation, extraprostatische Tumorausdehnung, zystische Nervenscheideninvasionen, intraduktale Tumorausdehnung, Lymph- und Blutgefäßinvasionen) nicht abgestellt werden.

vasionen) durch den zytologischen Befund naturgemäß nicht ermittelt werden. Die zytologische Prostataadiagnostik konnte sich deshalb, auch wenn sie mit der Ploidiebestimmung kombiniert wird, international nicht durchsetzen. Zytometrische Untersuchungen zur Bestimmung der DNA-Ploidie können prinzipiell auch in Stanzbiopsien durchgeführt werden.

## Postoperatives Staging

### Standardisierte Aufarbeitung der Prostatektomie

Die sachgerechte Aufarbeitung der Prostata nach ihrer operativen Entfernung (Prostatektomie) liefert dem behandelnden Urologen und seinem Patienten die Faktoren, die fortan die Prognose der Erkrankung entscheidend bestimmen (4). Das sind das pT-Stadium, der definitive Gleason Grad und der Marginstatus (d.h.; sind die mit Tusche markierten Absetzungsränder tumorfrei oder nicht?). Dabei muss auf folgendes geachtet werden. Das Prostatakarzinom ist bei der makroskopische Begutachtung der Prostata in seiner Größe und Ausdehnung meist nicht erkennbar. Werden für die histologische Untersuchung nur ein Teil des Organs eingebettet, dann besteht die Gefahr, dass relevante Teile des Tumors für das Grading und Staging nicht berücksichtigt werden (4). Die vollständige Einbettung des Operationspräparates ist deshalb der partiellen Einbettung prinzipiell vorzuziehen, auch wenn der erhebliche Zeit- und Materialaufwand von den gesetzlichen Kassen nicht adäquat vergütet wird. Ebenso wichtig für ein verlässliches Staging ist eine standardisierte Zuschneidetechnik (4). Auf diese Problematik kann hier nicht näher eingegangen werden. Entsprechende Informationen finden sich unter [www.prostapath.de](http://www.prostapath.de).

### Pathologisches Staging (pT-Stadium)

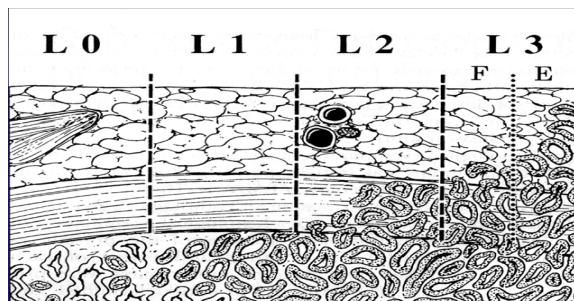
#### Organbegrenztes Tumorwachstum (pT2a,2b)

Das Metastasierungs- bzw. Rezidivrisiko des Prostatakarzinoms hängt u.a. von seinem Bezug zur Organkapsel ab. Prinzipiell lassen sich für das organbegrenzte Prostatakarzinom drei Level unterscheiden (11):

- L0: der Tumor reicht nicht über das normale Drüsengebiet hinaus
- L1: der Tumor reicht über das normale Drüsengebiet hinaus, erreicht aber nicht die Organkapsel
- L2: der Tumor infiltriert die Organkapsel ohne diese zu durchbrechen oder reicht an die Organgrenzen an den Stellen, wo eine Kapsel fehlt (Apex, anteriore Stromalager, Blasenausgang)

Diese Kriterien werden in der aktuellen TNM-Klassifikation nicht berücksichtigt, haben aber dennoch eine prognostische Bedeutung. Im Stadium L0 und L1 treten selbst bei großen (bis 6.26 ccm) und gering differenzierte Tumoren (Gleason-Score 7 und 8) keine Lymphknotenmetastasen oder PSA-Rezidive auf, während im Stadium L2 in

immerhin 3% Lymphknotenmetastasen nachweisbar und PSA- Rezidive innerhalb von fünf Jahren in ca. 15% der Fälle zu erwarten sind (11).



Bezug des Prostatakarzinoms zur Organkapsel und prognostische Gruppen.

### Kapselüberschreitendes Tumorwachstum (pT3a)

Nicht die Kapselinfiltration, sondern erst der Nachweis von kapselüberschreitendem Tumorwachstum definiert das pT3a - Stadium. Beweisend für ein pT3a - Stadium ist die Identifizierung von Tumorzellen zwischen Fettgewebszellen. Epstein und andere Autoren haben gezeigt, dass die Quantifizierung der extraprostatischen Tumorausdehnung eine prognostische Bedeutung hat. Unter fokaler Kapselpenetration (FCP) versteht man, wenn einzelne Tumordrüsen die Organgrenzen überschritten haben und sich parallel (horizontal) zur Organkapsel im extraprostatischen Weichgewebe ausdehnen. Alles was über diesen Befund hinausgeht wird als eindeutige (established) oder ausgedehnte Kapselpenetration (ECP) bezeichnet. Tumoren mit FCP verhalten sich prognostisch eher wie organbegrenzte Tumoren (pT2) im Level L2 (11). Die eindeutige oder ausgedehnte Kapselpenetration (ECP) ist dagegen prognostisch als deutlich schlechter zu werten (11).

**Samenblaseninfiltration (pT3b)** ist definiert durch die Tumorinfiltration der muskulären Samenblasenwand und ist der wichtigste Risikofaktor für Lymphknoten- und Knochenmetastasen, PSA- Rezidive und die Tumorprogression (11). Über 85% der Patienten im Stadium pT3b erleiden ein PSA- Rezidiv innerhalb der ersten fünf Jahre nach der Operation (6). Die Infiltration der Samenblase erfolgt meistens im Rahmen einer eindeutigen extraprostatischen Tumorausdehnung (ECP), kann aber auch intraprostatisch über den Ductus ejaculatorius erfolgen. Patienten mit einer Tumorinfiltration der intraprostatischen Samenblasenanteile ohne nachweisbare extraprostatische Tumorausdehnung haben die gleiche Prognose wie die Patienten im Stadium pT2 (11).

**Blasenhalsinfiltration (pT4)** liegt vor, wenn histologisch eine eindeutige Tumorinfiltration im Bereich der typischen Detrusormuskulatur nachweisbar ist. Die Bedeutung dieses Befundes als unabhängiger prognostischer Faktor ist allerdings umstritten. Die Prognose der Patienten mit Blasenhalsinfiltration wird eher bestimmt durch andere Faktoren (pT3a, pT3b, pN1). Wenn diese definitiv nicht zutreffen (pT2, pN0), sollte man die Diagnose eines pT4-Tumors vermeiden oder seine prognostische Bedeutung epikritisch relativieren (11). Wir sprechen von einer pT4 Situation erst dann, wenn die Detrusormuskulatur im Harnblasenabsetzungsrand ausgedehnt Tumor- infiltriert ist.

### Absetzungsränder (Margins)

Positive Margins liegen vor, wenn Tumorverbände die tuschemarkierten Ränder erreichen. Dieser Befund ist allerdings nicht gleichbedeutend oder beweisend für ein kapselüberschreitendes Tumorwachstum bzw. für ein pT3a - Stadium! Dies gilt insbesondere an den Stellen, wo die Prostatakapsel histologisch nicht eindeutig definiert ist (z.B. Apex, anteriore Stromalager, neurovaskuläre Bündel) (4).

Der Marginstatus hat bei Patienten mit einer eindeutigen extraprostatischen Tumorausdehnung (ECP) bezüglich des PSA- Rezidives eine signifikante prognostische Bedeutung(11). Es gibt allerdings zurzeit keinen Konsens über die Notwendigkeit einer postoperativen Strahlentherapie im Stadium pT2 bei positiven Margins. Dies muss noch in prospektiven randomisierten Studien ermittelt werden. Solange dies noch nicht abschließend geklärt ist, sollte man gerade bei organbegrenzten Prostatakarzinomen (pT2) mit dem Begriff R-1 Resektion vorsichtig umgehen, weil dieser Befund u. U. therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen kann. Viele organbegrenzte Prostatakarzinome zeigen fokal positive Margins und bedürfen nicht unbedingt einer adjuvanten Therapie in Form einer Bestrahlung. Ob eine echte R-1 Situation vorliegt muss im Einzelfall sehr kritisch geprüft werden. Fokal positive Margins in einem organbegrenzten, Gleason-Score 6 Tumor sind prognostisch ganz anders zu werten als ausgedehnt positive Margins in einem high grade Karzinom mit einem Gleason Score  $\geq 7$ . Im ersten Fall würden wir unkommentiert nie von einer R-1 Resektion sprechen, weil dieser Tumor keiner adjuvanten Bestrahlung bedarf. Im zweiten Fall liegt jedoch sicher eine R-1 Resektion vor, die eine adjuvante Therapie nötig macht. Anderseits gibt es Prostatakarzinome, die auch bei einer R-0 Resektion ein erhöhtes Rezidivrisiko besitzen, z.B. wenn unmittelbar am Margin mehrere Nervenscheideninvasionen nachweisbar sind.

Im Befundbericht sollte prinzipiell der Marginstatus ausführlich dokumentiert und kommentiert werden. Dazu gehören:

- die Ausdehnung des Befundes (fokal oder ausgedehnt, ggf. Größenangabe)
- die Lokalisation (Apex, Basis, etc.)
- pT- Stadium (pT2, pT3a, pT3b) am Margin
- primäre Gleason Grad am Margin
- Nervenscheideninvasionen am Margin

Eine epikritische Wertung bezüglich des R-Status und des individuellen Progressionsrisikos hilft dem Urologen bei seiner Entscheidung über eine eventuelle adjuvante Strahlentherapie.

### Gleason Grad

Die häufigsten Malignitätsgrade in Prostatektomien bewegen sich heute zwischen dem Gleason Score 5, 6 und 7, wobei bei einem Gleason Score 7 zwischen den Gruppen 3+4 und 4+3 Unterschieden werden sollte. Der prozentuelle Anteil der primären Gleason Grade 4 und 5 ist ein unabhängiger Risikofaktor für das PSA-Rezidiv nach radikaler Prostatektomie (9).

### Nervenscheideninvasionen (NSI)

Das Prostatakarzinom nutzt die Perineuralscheiden, um die Organkapsel zu durchbrechen. In multivariablen Analysen liefert die NSI gegenüber dem Gleason Grad, pT-Stadium und dem Tumorkörper Volumen keine unabhängige prognostische Information (11). Im Einzelfall kann jedoch der Nachweis einer NSI im oder am Margin von prognostischer Bedeutung sein. Prognostisch ungünstig sind NSI mit großem Umfang. Selbst in organbegrenzten Tumoren ist der Durchmesser der NSI ein wichtiger prognostischer Faktor für die Tumorprogression (11).

### Tumorkörper Volumen

Das Tumorkörper Volumen ist ein anerkannter prognostischer Faktor nach radikaler Prostatektomie. Eine exakte Bestimmung des Tumorkörper Volumens erfordert allerdings eine vollständige Aufarbeitung des Prostatektomiepräparates und eine morphometrische, computer-gestützte Analyse. Derartige Untersuchungen erscheinen jedoch für die Routinediagnostik zu aufwendig und letztlich nicht praktikabel. Das Tumorkörper Volumen lässt sich approximativ wie folgt bestimmen (11).

- Abschätzung des prozentualen Anteils an Tumorgewebe umgerechnet auf das bekannte Organvolumen (ml oder cm<sup>3</sup>).
- Ausmessen des Tumors am Schnitt mit der Formel: Tumolänge x Breite x (Schnittdicke x Anzahl der tumorinfiltrierten Schnitte), jeweils in cm x dem Faktor 0.4

Diese Volumenbestimmung ist approximativ, aber in jedem Fall besser als gar keine.

## **Intraduktale Tumorausbreitung**

Intraduktale Prostatakarzinome (IDPCa) werden nach Bostwick unter den Begriff HGPIN subsumiert und werden somit nicht als diagnostische Entität aufgeführt. Die Untersuchungen von McNeal zeigen aber, dass sich Prostatakarzinome in Abhängigkeit vom Tumorvolumen in 15% bis 47% der Fälle intraduktal ausbreiten. Dabei korreliert das Ausmaß der intraduktalen Tumorausdehnung signifikant mit einer Reihe von prognostischen Faktoren (z.B. Gleason Grad, Tumorvolumen, positive Margins, Samenblaseninfiltration) und stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das PSA- Rezidiv dar. LOH- Analysen zeigen, dass sich IDPCa signifikant von HGPIN unterscheiden und genetisch eher in die Gruppe der Gleason Grad 4 Tumoren gehören (7, 10). Wegen der prognostischen Bedeutung dieses Befundes sollte das IDPCa in die pathologische Diagnose aufgenommen und ihr prozentueller Anteil approximativ angegeben werden.

## **Zonale Gliederung des Prostatakarzinoms**

Antero- zentrale Prostatakarzinome haben generell eine bessere Prognose als die Prostatakarzinome der peripheren Zone (11). Dieser prognostische Unterschied beruht nicht nur darauf, dass antero- zentrale Karzinome weniger häufig Gleason Grad 4 und 5 Anteile oder eine extraprostatische Tumorausdehnung aufweisen als die peripheren Prostatakarzinome, sondern auch unterschiedliche Ausbreitungswege nutzen. Periphere Karzinome entstehen oft in kapselnahen Abschnitten der Prostata und infiltrieren in Abhängigkeit vom Tumorvolumen die zentrale Zone und haben dann freien Zugang zu den Samenblasen. Antero- zentrale Prostatakarzinome werden von der peripheren Zone durch eine bindegewebige Pseudokapsel abgegrenzt und erreichen deshalb nur selten die zentrale Zone und die Samenblasen. Dementsprechend ist das Metastasierungsrisiko bei antero- zentralen Prostatakarzinomen gering (11). Die Prädilektionsstellen für eine extraprostatische Tumorausdehnung bei antero- zentralen Prostatakarzinomen sind die Apexregion, das anteriore Stromalager und der Blasenausgang. Selbst bei nachgewiesener extraprostatischen Tumorausdehnung verhält sich das antero- zentrale Prostatakarzinom prognostisch deutlich besser als die Karzinome der peripheren Zone. In einem Kollektiv von 129 Patienten mit antero- zentralen Prostatakarzinomen kam es nur in 4% der Fälle zu einem PSA Rezidiv innerhalb der ersten fünf Jahre nach Prostatektomie (11).

## **Prognostische Marker und molekulares Staging des Prostatakarzinoms**

Das klinische Spektrum des Prostatakarzinoms umfasst eine breite Palette reichend von den unbedeutenden Tumoren, die keiner Therapie bedürfen, bis hin zu den aggressiven und letalen Verlaufsformen. Trotz der gut etablierten klinischen und pathologischen Parameter besteht nach wie vor ein großer Bedarf nach neuen Prognosefaktoren, die den individuellen Krankheitsverlauf besser vorhersehen. Dazu gehört eine Reihe von Marker, die in Abhängigkeit von der klinischen Konstellation, des pathologischen

Befundes und den therapeutischen Optionen zusätzliche Informationen liefern können (5, 12):

- **MIB-1** (Proliferationsmarker): cut-off 7% oder 10% positive Zellen
- **P 27** (Zellzyklusinhibitor): cut-off 50% positive Zellen
- **Bcl-2** (Apoptosensuppressor): cut-off Foci mit >20% positive Zellen
- **P53:** (Oncogen): cut-off positiv oder negativ
- **Chromogranin A** (neuroendokrine Differenzierung):
  - cut-off Foci mit >20% positive Zellen
- **MUC1/ AZGP1**
- **EZH2/ E- cadherin**
- **Östrogenrezeptoren**
- **Progesteronrezeptoren**
- **Ploidiestatus:** peridiploid, peritetraploid, aneuploid (x-ploid und multiploid)

**Zellzyklus- und Apoptosen- Regulatoren** und andere Marker. Neben den klassischen Prognosefaktoren (Gleason Grad, Tumorvolumen, pT- Stadium, Marginstatus und PSA-Wert) gewinnen zunehmend immunhistochemische Marker an Bedeutung, die zur individuellen Abschätzung der Prognose oder des Ansprechens auf eine bestimmte Therapie herangezogen werden. Dem Einsatz dieser Marker in Stanzbiopsien oder Prostatektomiepräparaten unterliegen unterschiedliche Fragestellungen:

In **Prostatastanzbiopsien** geht es im Wesentlichen um die Präzisierung des prätherapeutischen Staging im Hinblick auf die Wahl der Therapie. Hohe MIB-1 Indices sind unabhängige Marker für das Überleben nach Prostatektomie, externer Bestrahlung und im Rahmen einer Watchfull Waiting Strategie (12). Mehrere Studien belegen, dass der MIB-1-Index (>7 %), BCL-2 und P53 neben den klassischen Prognosefaktoren unabhängige prognostische Marker für das PSA- Rezidiv, das Auftreten von Metastasen und das Tumor- spezifische Überleben nach externer Bestrahlung darstellen (5, 12). Bei Unstimmigkeiten im Grading oder echten Grenzfällen (z.B. Gleason Grad 3 versus 4) kann der MIB-1-Index hilfreich sein, um festzulegen, ob ein intermediärer Malignitätsgrad oder ein high grade Tumor vorliegt. Der Nachweis einer neuroendokrinen Differenzierung mit Chromogranin A empfiehlt sich dann, wenn die Option auf eine primäre Bestrahlung oder eine Hormontherapie besteht (1). Falls sich mit Chromogranin A eine multifokale oder bedeutende neuroendokrine Differenzierung nachweisen lässt, sollte Chromogranin A mit in das Panel der Serummarker aufgenommen, um den Verlauf bzw. den Erfolg der Therapie zu objektivieren (1). Das gleiche gilt für die Prostatakarzinome mit relativ niedrigen PSA Werten, bei denen zwischen dem erfassten Tumorvolumen und dem Gleason Grad einerseits und der Höhe des PSA Wertes andererseits eine auffällige Diskrepanz besteht. Bei gering differenzierten Prostatakarzinomen mit niedrigen PSA Werten ist PSA kein verlässlicher Marker für die Prognose und den Verlauf der Erkrankung.

In der **Prostatektomie** geht es mehr um die Abschätzung des PSA- Rezidivrisikos im Hinblick auf die Dringlichkeit einer adjuvanten Therapie. Dabei können die folgenden Marker zum Einsatz kommen (5,12): Der Zyklin- abhängiger Kinaseinhibitor P27, der den Eintritt von Zellen in den Zellzyklus verhindert, ist bei einer verminderten Expression (<50%) ein unabhängiger Marker für das PSA- Rezidiv und das Überleben nach radikaler Prostatektomie (RP). Hohe Expressionsraten von MIB-1 (>10%) sind vor allem bei Überexpression von BCL-2 ein unabhängiger Marker für ein PSA- Rezidiv und das Überleben nach RP. Niedrige MIB-1-Indices (<10%) sind bei fehlender Expression von BCL-2 prognostisch eher günstig. Bei Prostatakarzinomen mit einem hohen Rezidiv- und Progressionsrisiko (pT3b, Gleason >7) sollte geprüft werden, ob eine signifikante neuroendokrine Differenzierung vorliegt (siehe unten).

Mit Hilfe der neuen Microarray Technologie wurden unter Tausenden von Genen charakteristische Genexpressionsmuster im Prostatakarzinom entdeckt, die mit den verschiedenen klinischen Krankheitsverläufen korrelieren. Die Überexpression von MUC1 z.B. ist charakteristisch für den aggressiven Tumortyp, während die Expression von AZPG1 mit einer deutlich besseren Prognose einhergeht. Der MUC1- und AZPG1- Status im Tumorgewebe des Patienten ist, unabhängig von den klassischen Prognosefaktoren (Gleason Grad, Tumorstadium und präoperative PSA- Wert), ein aussagekräftiger Risikofaktor für das Tumorrezidiv. Nach radikaler Prostatektomie lassen sich nach ersten Untersuchungen durch die Kombination beider Marker drei klinische Verläufe mit einem geringen, intermediären und hohen Rezidivrisiko beschreiben. Eine ähnlich prognostische Bedeutung hat das Markerpaar EZH2/E-cadherin. Patienten mit hohen Expressionsraten des Transkriptionsfaktors EZH2 haben bei gleichzeitigem Verlust von E-cadherin ein hohes Rezidivrisiko (5, 12).

### **Marker der Androgenresistenz**

Eines der größten Probleme in der Klinik des Prostatakarzinoms ist nach wie vor die Entstehung der Androgenresistenz. Dies ist ein multifaktorieller Krankheitsprozess, in dem der Androgenrezeptor im Vordergrund steht. In etwa 30% der Androgen- insensitiven Prostatakarzinome liegt das Androgenrezeptorgen in mehrfacher Kopie vor. Diese Genamplifikation führt zur Ausbildung eines hypersensitiven AR, der unter Androgenentzug residuelle Androgene für das Tumorwachstum nutzen kann. Patienten, bei denen mit der FISH Technik derartige AR Amplifikationen im Tumorgewebe nachweisbar sind, profitieren von einer totalen Androgenblockade (6). Ein anderer Marker für die Androgenresistenz ist die neuroendokrine Differenzierung, die man mit Chromogranin A (ChrA) im Serum und im Tumorgewebe nachweisen kann. Den ChrA positiven Prostatakarzinomzellen fehlt konstitutionell der Androgenrezeptor (1). Diese Tumorzellen sind somit in allen Stadien der Erkrankung Androgen-insensitiv. Anuploide Prostatakarzinome sind Androgen- und Strahlen- resistent und haben eine deutlich schlechtere Prognose als peritetrapiode und peridiploide Tumoren. Prostatakarzinome mit einem peritetrapioden DNA- Befund entwickeln schneller eine Androgenresistenz als peridiploide Tumoren (13). Der Ploidiestatus korreliert oft, aber nicht immer mit dem Gleason Grad und liefert deshalb im Einzelfall zusätzliche prognostische Informationen.

sche Informationen. Weitere Marker, die typischerweise erst im Androgen-insensitiven Tumorstadium überexprimiert werden sind P53, Bcl-2, EGF-R1 und EGF-R2 (HER2/neu). HER2/neu z.B. ist in der Lage den Androgenrezeptor auch in Abwesenheit von Androgenen zu transaktivieren (5, 12). Der Nachweis einer starken Expression von HER2/neu in einem Prostatakarzinom spricht somit dafür, dass dem Tumor Mittel zur Verfügung stehen, die ihm erlauben auch unter Androgenentzug den Androgenrezeptor weiterhin für sein Wachstum zu nutzen. Die Untersuchung dieser Marker in primären Prostatakarzinomen liefert somit zusätzliche Informationen über die Aggressivität und eine eventuelle Androgenresistenz eines bestimmten Tumors. Entsprechende monoklonale Antikörper gegen diese Substanzen wie z.B. Cetuximab (EGF-R1), Herceptin (HER2/neu), Bevacizumab (VEGF-R) sind zurzeit Gegenstand gentherapeutischer Studien in der klinischen Erprobung.

Es gibt auch Hinweise, dass Östrogene und ihre Rezeptoren an der Entstehung der Androgenresistenz beteiligt sind (2). Im Gegensatz zum Mammakarzinom und anderer Östrogen-abhängiger Tumoren ist die Expression des klassischen Östrogenrezeptors α (ERα) im Prostatakarzinom ein spätes Ereignis in der Tumorprogression und ist in der Regel erst in Metastasen und Androgen-insensitiven Prostatakarzinomen nachweisbar. Wenn dieser neu entdeckte Rezeptor im fortgeschrittenen Prostatakarzinom funktionell aktiv und therapeutisch beeinflussbar ist, dann müsste man erwarten, dass in diesen Tumoren auch ERα – regulierte Gene exprimiert werden. Ein solches Gen ist der Progesteronrezeptor (PR), eines der wichtigsten Marker für das Ansprechen des Mammakarzinoms auf eine Antiöstrogentherapie. In den metastasierten und Androgen-insensitiven Prostatakarzinomen ist eine signifikante Expression des PR in ca. 30% der Fälle nachweisbar, was dafür spricht, dass diese Tumoren Östrogene und Progesterone (Gestagene) für ihr Wachstum nutzen. Experimentelle Studien belegen bereits die Effizienz von Antiöstrogenen und Antigestagenen in Androgen-insensitiven Prostatakarzinomzelllinien. Klinische Studien für diesen neuen therapeutischen Ansatz stehen jedoch noch aus (2).

### **Stellenwert der DNA- Ploidie**

Peridiploide Prostatakarzinome haben zweifelsohne eine bessere Prognose als peritetrapiode und aneuploide Karzinome (13). Den peridiploiden DNA- Befund jedoch mit einem geringen Progressionsrisiko oder einem sog. Haustierkrebs gleichsetzen zu wollen, ist unzulässig. Ob bei einem Prostatakarzinompatient eine abwartende Haltung (watchful waiting) aus onkologischer Sicht vertretbar ist, hängt vielmehr vom Gleason Grad, von dem in den Stanzbiopsien erfassten Tumorvolumen, der PSA-Kinetik (PSA-Verdopplungszeit, PSA-Dichte), dem Alter und der persönlichen Lebenserwartung (z.B. kardiovaskuläres Risiko) ab.

Auch bei einem aneuploiden DNA- Befund, der für den Patienten wegen der schlechten Prognose enorme Auswirkung auf die Therapieentscheidung haben kann, ist Vorsicht angesagt: Prämaligne Prostataveränderungen vom Typ HGPIN, die bei Männern über 50 Jahren mit oder ohne Karzinom häufig vorkommen, sind oftmals aneuploid. Da die zytologische Prostatadiagnostik nach Feinnadelaspiration nicht in der Lage ist,

zwischen HGPIN und einem Prostatakarzinom zu unterscheiden, kann man prinzipiell nie ausschließen, dass HGPin und nicht das Karzinom für den aneuploiden DNA-Befund verantwortlich sind. DNA-Messungen sollten deshalb stets an Stanzbiopsien durchgeführt werden, die im Hinblick auf HGPin überprüft wurden, um HGPin-assoziierte (falsch-positive) aneuploide Befunde zu vermeiden.

Die Beobachtung, dass bei einem peritetraploiden DNA-Befund ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der Androgenresistenz besteht, basiert überwiegend auf Studien aus den 80er und 90er Jahren, wobei damals die beidseitige Orchiekтомie als Standard der Androgenentzugstherapie galt. Über die prognostische Bedeutung des peritetraploiden DNA-Befundes im Rahmen der modernen, zeitlich limitierten, dreifachen Androgenblockade gibt es bislang überhaupt keine Daten. Einem Patienten auf Grund eines peritetraploiden Histogrammes generell von der Hormontherapie abzuraten, ist daher nicht zulässig. Ob ein Prostatakarzinom auf eine Androgenentzugstherapie anspricht oder nicht, hängt letztlich davon ab, ob innerhalb eines Jahres der PSA-Nadir von 0.05 ng/ml erreicht wird oder nicht. Dagegen sind Verlaufskontrollen, die an Hand von sukzessiven DNA-Bestimmungen am aspirierten Material den Therapieerfolg zu ermitteln versuchen, im Zeitalter der modernen PSA-Diagnostik obsolet.

Die verlässlichsten Aussagen über die DNA-Ploidie erhält man in der Prostatektomie, bei der der ganze Tumor zur Untersuchung zur Verfügung steht. Der prognostische Wert der DNA-Analyse in der Stanzbiopsie ist dagegen umstritten, da der biologisch relevante Tumorherd nicht unbedingt in der Stanzbiopsie erfasst sein muss. In der letzten Ausgabe „Tumors of the Prostate Gland“ (2000) des Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), ein weltweit anerkanntes Zentrum für Tumorphäopathologie, wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die prognostische Aussagekraft der DNA-Ploidie in der Stanzbiopsie wegen des Sampling Errors fraglich ist. Ähnlich kritisch äußert sich auch Epstein in einem kürzlich im Lancet erschienenen Beitrag, wonach die Ploidiebestimmung in der Stanzbiopsie keine zusätzlichen prognostischen Informationen für das pathologische Staging liefert, wenn der Gleason Grad korrekt ermittelt wurde (6).

## Fazit

Der histopathologische Prostatabefund liefert für das prätherapeutische und postoperative Staging wichtige prognostische Informationen, die in einem zunehmenden Maße direkten Einfluss auch auf die Therapieentscheidung ausüben. Unabdingbare Voraussetzung dafür ist die konsequente Nutzung aller anerkannten Prognosefaktoren und eine sachgerechte Aufarbeitung und verlässliche Befundung. Die Einführung neuer Marker eröffnet darüber hinaus neue Möglichkeiten für die Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufs, bedürfen jedoch noch einer weiteren Validierung bevor ihr routinemäßiger Einsatz in der Prostatadiagnostik empfohlen werden kann.

## Glossar

- Apoptose: programmierte Zelltod
- Apikal: Spitze, dem Beckenboden zugewandte Seite der Prostata
- Basal: Basis, der Harnblase zugewandte Seite der Prostata
- Dignität: Gutartigkeit (benigne) oder Bösartigkeit (maligne) eines Tumors
- Extraprostaticisch: außerhalb der Organgrenze der Prostata
- FISH (Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung): Methode zum Nachweis eines bestimmten Gens in einer Zelle
- Genamplifikation: ein Gen liegt in mehrfacher Kopie vor
- HGPIN (high grade prostatic intraepithelial neoplasia) ist ein Vorläufer des Prostatakarzinoms
- Immunhistochemie: Darstellung eines Proteins im Gewebe oder Zelle mit einem spezifischen Antikörper
- Intraduktale Prostatakarzinome: breiten sich vorzugsweise im Gangsystem der Prostata aus
- Margin: mit Tusche markierte Absetzungsränder des Operationspräparates
- Neuroendokrin: Eigenschaft von Zellen Hormone zu bilden, die lokal oder systemisch wirken können
- Nervenscheideninvasion: in die Prostata strahlen von außen zahlreiche Nerven ein. Das Prostatakarzinom nutzt diese Nervenäste als Leitschiene, um die Organgrenze zu durchbrechen
- Ploidie: ist ein Maß für den DNA- Gehalt von Zellen und wird durch die optische Dichte der Zellkerne gemessen. Normale Zellen haben einen doppelten Chromosomensatz und werden als diploid (2c) bezeichnet. Peridiploide oder peritetraploide (4c) Tumorzellen haben somit den gleichen oder den doppelten (4c) DNA- Gehalt im Vergleich zu normalen Referenzzellen. Aneuploide Tumorzellen zeigen gegenüber normalen Referenzzellen eine ungerade Zunahme des DNA- Gehaltes. Aneuploide Verteilungsmuster können in einer (x-ploid) oder mehreren Stammlinien (multiploid) auftreten.
- Präkanzerose/ prämaligine: maligne Transformation des Prostataepithels, Vorläufer des Prostatakarzinoms (HPGIN)
- Rebiopsie: erneute stanzbiotische Abklärung
- Radiatio: Bestrahlung
- Staging: Feststellung des Tumorstadiums durch TNM

- TNM: Lokale Tumorausdehnung (T), Lymphknotenstatus (N), Fernmetastasen (M)
- Watchfull waiting: abwartende, kontrollierte Haltung im Hinblick auf die Therapie

## Literatur

(Berücksichtigt wurden aktuelle Übersichtsarbeiten zu diesem Thema; eine umfassende Literaturübersicht findet sich in den zitierten Übersichtsarbeiten)

1. Bonkhoff H, Fixemer T (2004). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. An unrecognized and therapy-resistant phenotype. *Urologe* 43(7):836-42
2. Bonkhoff H, Motherby H, Fixemer T (2003) New insights into the role of estogens and their receptors in prostate cancer. *Urologe* 42(12):1594-601.
3. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbro JW (2000) Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124(7):995-1000.
4. Bostwick DG, Montironi R: (1997) Evaluating radical prostatectomy specimens: therapeutic and prognostic significance. *Virchows Arch* 430:1-6.
5. Chakravarti A, Zhai GG (2003) Molecular and genetic prognostic factors of prostate cancer. *World J Urol*. 21(4):265-74.
6. De Marzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI (2003) Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 15;361(9361):955-64.
7. Dawkins H, Sellner L, Turbett G, Thompson C, Redmond S, McNeal J, Cohen R: (2000) Distinction between intraductal carcinoma of the prostate (IDC-P), high grade dysplasia (PIN), and invasive prostatic adenocarcinoma, using molecular markers of cancer progression. *Prostate* 44(4), 265-270
8. Epstein JI (2004) Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol*. 17(3):307-15.
9. Humphrey PA (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 17(3):292-306.
10. McNeal JE (2001). The role of intraductal carcinoma in the natural history of prostatic adenocarcinoma. *Eur Urol*. 39 Suppl 4:4
11. Ohori M, Kattan M, Scardino PT, Wheeler TM (2004) Radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 17(3):349-59.
12. Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL (2005) Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer*. 41(6):858-87.
13. Schroeder F, Tribukait B, Bocking A, DeVere White R, Koss L, Lieber M, Stenkvist B, Zetterberg A (1994) Clinical utility of cellular DNA measurements in prostate carcinoma. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. Stockholm, Sweden, May 12-13, 1993. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 162:51-63;

## B. Aeikens

### Das Prostatakarzinom, eine Herausforderung für den niedergelassenen Urologen?

Das Prostatakarzinom ist inzwischen der häufigste Tumor beim Mann. Für 2004 werden in Europa 238.000 Neuerkrankungen angenommen, mit einer jährlichen Todesrate von 11.900, das entspricht 5 %. Die Anzahl von Neuerkrankungen in den USA für 2005 wird mit 232.090 angegeben, davon versterben 12 %, insgesamt 30.350 Männer. In Deutschland werden nach Angaben der BDU und der DGU - in einem offenen Brief vom 01.03.2005 an die Gesundheitsministerin gewandt - gegenwärtig 40.000 Neuerkrankungen, von denen jährlich 12.000 sterben, registriert, das einer Todesrate von 33 % entspricht. Über die unterschiedlichen Todesraten kann man nur spekulieren, so dass die Frage erlaubt sei, ob in Deutschland nicht mehr Männer mit als an einem Prostatakarzinom sterben (Abb. 2,3,4).

### **Prostatakarzinomerkrankungen**

<b>2005:</b>	<b>USA</b>	<b>232.090</b>	<b>Todesrate 30.350</b>	<b>12 %</b>
<b>2004:</b>	<b>Europa</b>	<b>238.000</b>	<b>Todesrate 11.900</b>	<b>5 %</b>
<b>2004:</b>	<b>BRD</b>	<b>40.000</b>	<b>Todesrate 12.000</b>	<b>33 %</b>

Quellen: American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2005 last modified 02/01/2005  
Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004 Ann Oncol. 2005 (16) 481-8  
2 Schalkhäuser K BDU-Präsident, Stöckle M, DGU : Offener Brief an Gesundheitsministerin  
Ulla Schmidt wg. PSA-Test (01.03.2005)

Abb. 2

## **Offener Brief der BDU und DGU vom 01.03.2005 an die Gesundheitsministerin:**

**“Bei 40.000 Männern wird jährlich in der BRD  
durch die PSA -Bestimmung Prostatakrebs  
aufgedeckt, 12.000 sterben jährlich daran”**

3

Schalkhäuser K, BDU-Präsident, Stöckle M, DGU:  
Offener Brief an Gesundheitsministerin Ulla Schmidt  
Wegen PSA-Test (01.03.2005)

Abb. 3

### **Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Todesraten**

**USA : 12 %** häufige PSA-Bestimmungen ?  
bessere Vorsorgeuntersuchung ?  
bessere Ärzte ?

**Europa : 5 %** wenige PSA-Bestimmungen ?  
schlechtere Vorsorge ?  
sterben unwissend mit aber nicht an  
PCA?

**BRD : 33 %** signifikant aggressivere PCA? PSA?

4

Abb. 4

Zu den angeblich anerkannten Verfahren der Früherkennungs-Diagnostik gehören die digito-rectale Untersuchung und die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA). Die immer wieder gestellte Frage, inwieweit eine PSA-Bestimmung zur Früherkennung eines Prostatakarzinoms beitragen kann, wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Nicht anders sind die anhaltenden Kritiken zum PSA zu werten. Die Fernsehsendung FRONTAL im ZDF vom 07.12.2004 hat in der Bevölkerung erhebliches Aufsehen erregt (Abb.5).

## **PSA testen um jeden Preis, falsche Diagnosen beim Prostatakrebs?**

ZDF Frontal, 07.12.2004

**Prof Schönhöfer, Bremen:**

„.....PSA positiv signalisiert Prostatakrebs...tödliche Erkrankung, ....diese Schlussfolgerung stimmt nicht...“

**Prof Becker, Heidelberger Krebsforschungszentrum:**

**„Patienten mit schlafenden harmlosen Krebszellen werden durch den Test zu Kranken gemacht“**

Dr Jürgen Simon BDU:

**„Wir haben ein gewisses Overtreatment in der Angst, das wir sonst den Patienten zu spät helfen könnten.“**

5 Vielleicht wäre eine Operation nicht nötig“

Abb. 5

Ausgewiesene Wissenschaftler haben in dieser Fernsehsendung offen Kritik an einer PSA-Bestimmung im Rahmen einer Vorsorge geübt; die Argumentation der BDU und DGU dagegen – „keine Reaktion ist eine Reaktion ... derzeit können wir noch nicht auf abgesicherte und unangreifbare Studien hinweisen, was im übrigen von den bekannten Kritikern stets argumentativ ausgeschlachtet wird“ - ist wenig überzeugend (Abb. 6).

## **Was sagen BDU und DGU zu den PSA-kritischen Medienberichten:**

”Keine Reaktion ist eine Reaktion”

Dr. K. Schalkhäuser, PD Dr. M. Fisch

„Derzeit können wir noch nicht auf abgesicherte und unangreifbare Studien hinweisen, was im übrigen von den bekannten Kritikern stets argumentativ ausgeschlachtet wird“

6

Abb. 6

Ist der PSA-Test wirklich in der Lage, Leben zu retten? Maßnahmen zur Früherkennung von Krebskrankungen genießen in der Bevölkerung eine hohe Wertschätzung, die in den öffentlichen Medien oft vorteilhaft und werbewirksam dargestellt werden. Mögliche Nachteile, ggf. mit hohem Schadenspotential, werden dabei häufig übersehen bzw. nicht wahrgenommen. Nach einhelliger wissenschaftlicher Auffassung fehlt ge-

genwärtig immer noch der Beweis, dass die PSA-Bestimmung im Rahmen einer Vorsorge den betroffenen Männern ein verlängertes Leben garantiert. Jüngere Daten aus den USA und Skandinavien deuten seit einigen Jahren auf einen Rückgang der Mortalität hin. Ob sich dieser jedoch auf die PSA-Messungen zurückführen lässt, ist sehr umstritten, da sich in einer Reihe von Studien gezeigt hat, dass auch in weniger screening-intensiven Regionen keine unterschiedlichen Sterberaten nachweisbar sind. Wie unsicher die gegenwärtige Datenlage ist, belegen die Aussagen der DGU und BGU. Innerhalb eines Jahres verstirbt angeblich in Deutschland jeder 3. Patient an seinem neu entdeckten Prostatakarzinom! Da gegenwärtig weniger als 20 % aller vorsorgeberechtigten Männer in Deutschland diese in Anspruch nehmen, kann bei flächendeckender PSA-Vorsorge nur erahnt werden, welche medizinischen Ressourcen zusätzlich geschaffen werden müssten.

Es ist unbestritten, dass die PSA-Bestimmung frühzeitig und ggf. rechtzeitig auf ein Prostatakarzinomleiden hinweisen kann, das noch kurativ zu behandeln ist. Aus medizin-ethischer Sicht ist es deshalb unverantwortlich, diesen Männern die PSA-Bestimmung vorzuenthalten. Hieran gemessen sind die Argumentationen der Kritiker und u. a. die des ZDF abschreckend. Statt mit einer sachlich angemessenen Aufklärung wird oft mit medizinisch nicht haltbaren Thematisierungen und ungerechtfertigen Schuldzuweisungen ein Klima der Angst und totalen Verunsicherung der Patienten erzeugt.

Im Februar 2004 hat die Stiftung Warentest 20 Berliner Urologen nach der Bedeutung der PSA-Bestimmung befragt, nach deren Ansicht mit unbefriedigenden Ergebnissen. Ist es Unwissenheit, wie an den Auswertungen zu vermuten ist oder handelt es sich um eine Verunsicherung der niedergelassenen Urologen angesichts der offiziellen öffentlichen Stellungnahmen der DGU und BDU zur PSA-Bestimmung? (Abb. 7).

**Stiftung Warentest: (Februar 2004)**  
**Berliner Urologen schnitten beim PSA-Praxistest**  
**schlecht ab:**

**Von 20 Berliner Urologen waren informiert:**

**2 gut**

**4 befriedigend**

**14 ausreichend oder mangelhaft**

7

Abb.7

Mittlerweile ist das prostataspezifische Antigen (PSA) zu einem wichtigen Marker in der Urologie geworden, es handelt sich um einen organspezifischen und nicht um einen reinen Tumormarker. Entsprechend problematisch ist die Definition des Grenzwertes, um zwischen gut- und bösartigen Veränderungen der Prostata zu unterscheiden. Der Grenzwert von 4 ng/ml hat sich etabliert in der Unterscheidung des Tumorwachstums, wobei der Wert unterhalb 4 ng/ml jedoch keinesfalls sicher ein Prostatakarzinom ausschließt, so dass ein beträchtlicher Anteil von pT2-Tumoren übersehen wird. Problematisch sind die Tumoren T1c, die weder tastbar noch mit den gegenwärtig verfügbaren bildgebenden Verfahren: transrectale Sonographie, Computertomographie, MRT sichtbar sind. Die endgültige Sicherung der Diagnose kann nur durch eine Gewebsprobe erfolgen. Nach wie vor kontrovers diskutiert wird die Frage, wie viele Biopsien hierzu notwendig sind (Abb. 8,9).

## Wieviel Stanzbiopsien?

Stanzbiopsien von 1.327 Patienten 2001-2002 ergaben in 71 Fällen (5,3 %)  
„High-Grade-PIN“, 25 wurden davon radikal prostatektomiert, Ergebnis:

PSA-Werte 8,8 (5,6 – 19,6)	
bT2a	in 9 Patienten
bT2b	in 8 Patienten
bT2c	in 6 Patienten
pT3a	in 1 Patient
pT4	in 1 Patient
Gleason 2-6	in 21 Patienten
Gleason 7	in 2 Patienten
Gleason 8	in 2 Patienten
davon pT4N1G3	in 1 Patient

Brausi M, Castagnetti G, Dotti A, de Luca A, Olmi R, Cesinaro AM  
Immediate radical prostatectomy in patients with atypical small acinar proliferation. Over treatment?  
J Urol 2004; 172 (908-9)

8

Abb. 8

## Entnahme einer größeren Anzahl von Stanzen?

Gleason score: Übereinstimmung Stanze/Op-Präparat ?

6-8 Stanzen n = 89 Patienten	übereinstimmend	44 von 89 (49%)
	untergraduiert	35 von 89 (39%)
	übergraduiert	10 von 89 (11%)
12 Stanzen n = 46 Patienten	übereinstimmend	32 von 46 (70%)
	untergraduiert	11 von 46 (24%)
	übergraduiert	3 von 46 ( 6%)

Folgerung: höhere Biopsiezahl verbessert Gleason score

Emiliozzi P, Maymone S, Paterno A, Scarpone P, Amini M, Projetti G, Cordahi M, Pansadoro V.  
Increased accuracy of biopsy Gleason score obtained by extended needle biopsy  
J Urol 2004; 172 (2224-6)

9

Abb. 9

Neben der Stanzbiopsie ist prinzipiell die Feinnadelbiopsie möglich. Die Aspirationszytologie, bei der fächerförmig mit einer sehr dünnen Nadel Zellen aus dem Prostatagewebe „abgesaugt“ werden, ist für den Patienten kaum belastend, sehr risikoarm und kann öfters - ggf. zur Therapieüberwachung - wiederholt werden. Das Risiko einer Tumoreinschwemmung über die Blutbahn und die Gefahr einer systemischen Ausbreitung ist im Gegensatz zu Stanzbiopsie als sehr gering einzuschätzen.

Die wesentlichen Kriterien zur Beurteilung der Therapie des Prostatakarzinoms sind:

- Tumorgrad
- Tumorstadium
- Erkrankungsalter

(Abb. 10)

### Die wesentlichen Kriterien zur Beurteilung der Therapie des Prostatakarzinoms sind:

- Tumorgrad
- Tumorstadium
- Erkrankungsalter

10

Abb.10

Die Tumograduierung nach der Einteilung von Gleason basiert auf die Bewertung der Wachstumsmuster des Karzinoms unter Berücksichtigung unterschiedlicher Karzinomarchitekturen. Die Graduierung erfolgt aber nach subjektiven Kriterien des Pathologen und ist messtechnisch nicht objektivierbar. Zytologische Malignitätskriterien finden bei dieser Graduierung keine Anwendung. Im Gegensatz dazu basiert die Auswertung der Saugbiopsie fast ausschließlich auf zytologische Kriterien. Aufgrund der andersartigen Präparateaufbereitung bleiben feinste aussagefähige zytologische Strukturen der Zelle erhalten, die sonst bei der Paraffineinbettung verloren gehen. Eine Quantifizierung und damit Objektivierung des DNS-Gehaltes des Zellkerns mit Hilfe mikroskopphotometrischer Messverfahren ist somit möglich, so dass die Ploidy-Rate bestimmbar und damit eine bessere Beurteilung der Malignität möglich ist. Bisher hat dieses vor mehr als 30

Jahren in Schweden entwickelte Untersuchungsverfahren jedoch kaum Anwendung gefunden, da die zytologische Beurteilung eines sehr erfahrenen Zytologen bedarf, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Historisch gesehen wurde die Zytopathologie im deutschsprachigen Raum eher stiefmütterlich behandelt, dies mag eine Erklärung dafür sein, dass diese Methode bisher nicht den ihr zustehenden Stellenwert in der Diagnostik erlangt hat. Das Tumorwachstum ist durch eine enge Korrelation zwischen Tumorgrad und Tumorstadium gekennzeichnet, so dass eine rechtzeitige eingreifende Therapie die einzige Chance ist, ein Prostatakarzinom kurativ zu heilen. Dieses setzt jedoch, insbesondere unter der Option „watchful-waiting“ eine sehr sorgfältige Diagnostik voraus, wobei gegenwärtig der PSA-Bestimmung aufgrund ihrer geringen Sensitivität als Überwachungskriterium oft eine zu hohe Bedeutung beigemessen wird, mit möglichen fatalen Folgen für den Patienten. Nur durch die gemeinsame Bewertung von histologischen, zytologischen und morphometrischen Parametern, gekoppelt mit den heute zur Verfügung stehenden makroskopischen bildgebenden Verfahren, gibt Anlaß zur Hoffnung, vorsichtig prognostische Aussagen über das Malignitätsverhalten des Prostatakarzinoms zu machen. Bisher ist aber kein klinisch bildgebendes Verfahren in der Lage, die T- und die N-Kategorien, d. h. die intrakapsulären heilbaren Tumoren von den nichtkurativen Tumoren, sicher zu unterscheiden (Abb. 11,12).

## Untersuchungen zum prätherapeutischen Staging

Leitlinien der DGU

1. **T-Kategorie Primärtumor:** DRU,  
TRUS
2. **N-Kategorie regionäre  
Lymphknotenmetastasen:** CT,  
TRUS,
3. **M-Kategorie Fernmetastasen:**  
Skelettzintigramm Röntgen  
Thorax
4. **Mikroskopische Analyse der  
Biopsien**
5. **MRI**

11

Abb. 11

# Problematik des prätherapeutischen Stagings

Leitlinien der DGU 18.11.2004

**Kein klinisch bildgebendes Verfahren ist derzeit in der Lage, die T- und die N-Kategorien mit ausreichender Sicherheit zu bestimmen**

**Erst die histopathologische Diagnostik an operativ entfernten Geweben gibt die größtmögliche Sicherheit**

12

Abb. 12

In den Leitlinien zur Therapie des „klinisch“ lokal begrenzten Prostatakarzinoms (T1-2) wird bei einer Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren als kurative Maßnahme an erster Stelle die radikale Prostatavesikuloektomie mit partieller Lymphadenektomie empfohlen, eine Therapie, die dem Patienten das Bewusstsein vermittelt, durch die Operation vollständig vom Krebsleiden geheilt zu sein. Dies ist jedoch ein Trugschluß, in ca. 30 bis 60 % kann der Tumor nicht radikal entfernt werden (Abb. 13).

## Leitlinien zur Therapie des Prostatakarzinoms

Leitlinien der DGU vom 18.11.2004

**Kurativ, d. h. lokal begrenzt (T1-2):**

### 1. Operative Therapie (radikale Prostatektomie)

Postoperative Mortalität 0 – 1,5 %

Anastomoseninsuffizienz 1,2 – 4 %

Inkontinenz Grad III nach einem Jahr 7,7 %

Erektile Dysfunktion in > 90 %

**Die Hälfte der als T1-T2 klassifizierten werden histologisch als pT3 Tumore eingestuft und weisen in ca. 60 % einen lokalen oder systemischen Progress auf**

13

Abb. 13

# Folgerung aus den Leitlinien zur operativen Therapie des Prostatakarzinoms

Leitlinien der DGU vom 18.11.2004

- 1. Der Urologe kann keine Tumorfreiheit garantieren**
- 2. Der Urologe kann keine Kontinenzerhaltung garantieren**

14

Abb. 14

Der Operateur kann keine Tumorfreiheit, ebenso wenig eine Kontinenz- und Potenzerhaltung garantieren. Durch die heute noch unzureichende präoperative Diagnostik sind hier deutliche Grenzen gesetzt (Abb. 14). In den frühen Tumorstadien gewinnt neben der radikalen Prostatektomie die alleinige primäre Strahlentherapie in den unterschiedlichen Modalitäten immer mehr an Bedeutung, ist sie doch mit dem Bewusstsein verbunden, das Schadenspotential deutlich zu verringern (Abb. 15).

## Radikale Prostatektomie oder Strahlentherapie als kurative Massnahme?

PSA < oder = 10, Gleason score <oder = 6,  
PSA- Kontrolle 7 Jahre

N 382 gesamte Patienten

N 157 radikale Prostatektomie

N 225 externe Strahlentherapie

Ergebnisse: Op/Strahlen 67 vs 69 % n.s.  
Überlebenszeit: Op/Strahlen 99 vs 97 % n.s.

Martinez AA, Gonzalez JA, Chung AK, Kestin LL, ...  
A comparison of external beam radiation therapy versus radical  
prostatectomy for patients with low risk prostate carcinoma  
Cancer 2000, 15 (425-32)

15

Abb. 15

Als 3. Option sehen die Leitlinien ein watchful-waiting, d. h. eine abwartendes Verhalten vor, das jedoch konsequenterweise keine eigentliche Therapie darstellt. In Untersuchungen u. a. von Chodak und Mitarbeitern wurde anhand von mehr als 800 Patienten festgestellt, dass der Malignitätgrad eine entscheidende Rolle für die Prognose darstellt. Die 10-Jahres-Überlebensdaten werden bei G I- mit 81 %, bei G II- mit 58 % und

bei GIII-Tumoren mit 26 % angegeben. Die watchful-waiting Strategie gewinnt in den letzten Jahren eine zunehmende Anwendung. In den USA beträgt der Anteil derartig behandelter Patienten inzwischen ca. 30 %, wobei es sich vorwiegend um ältere Patienten mit niedrigen PSA-Werten < 10 ng/ml und günstigem Gleason-score von 2 bis 6 handelt (Abb. 16).

## Die Kriterien mit und nicht an einem PCA zu sterben sind abhängig von:

- Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose
- Tumorstadium: intra-oder extrakapsulär (T1-2 oder T3)
- Tumorgrad (Gleason score) bestimmt zeitabhängig die Tumorausdehnung

$$_{16} \text{d. h. Alter + Tumorgrad + Tumorstadium = Prognose}$$

Abb. 16

Die Wertigkeit der watchful-waiting Strategie ist umstritten, bisherige Ergebnisse können nur Rahmenbedingungen darstellen, wobei unzweifelhaft das Risiko eines möglichen hohen Schadenspotentials durch die Operation umgangen wird und dadurch a priori eine bessere Lebensqualität gegeben ist. Da gegenwärtig aufgrund der unzureichenden Datenlage, Diagnostik und Prognoseparameter nicht exakt der Zeitpunkt bestimmt werden kann, wann der Tumor von einem kurablen in einen inkurablen Zustand übertritt, ist diese Strategie mit einem hohen Risiko für den Patienten behaftet und bedarf einer großen Erfahrung des behandelnden Arztes (Abb. 17). Das Prostatakarzinom ist ein Tumor des höheren Lebensalters, damit steigt das Risiko weiterer tumorunabhängiger Erkrankungen, die ggf. zum Tode führen können, so dass eine Strategie des „verzögerten“ Tumorwachstums, unterstützt durch eine interindividuelle Hormontherapie gerechtfertigt erscheint (Abb. 18,19).

## **Watchful-waiting, welche Kriterien müssen sorgfältig beachtet werden?**

**Intrakapsulär lokalisierter Tumor!**

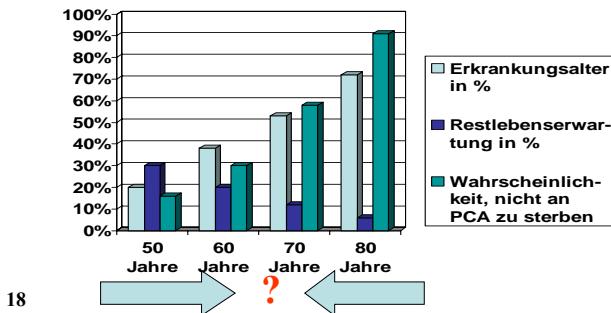
**Sorgfältige Kontrollen, um einen Tumorprogress rechtzeitig zu erkennen!**

**Cave! Das therapeutische Fenster ist sehr eng!**

17

Abb. 17

**Erkrankungsalter des PCA in %, Restlebenserwartung in Jahren und Wahrscheinlichkeit in %, nicht am PCA zu sterben:**



18

Abb. 18

## **“Watchful-waiting”, wie geht es weiter?**

**Die große Herausforderung liegt darin, durch einen optimalen Therapiebeginn den höchstmöglichen Benefit zu erreichen. Dazu braucht man neue Marker, da das PSA hierfür nicht geeignet ist, weil es erst in einem späten Stadium der Pathogenese ansteigt**

19

Abb. 19

## Bedeutung der DNA-Bildzytometrie für die Therapieplanung beim Prostatakarzinom (PCa)

Willet Whitmore hat vor über 20 Jahren zur Problematik der Behandlung des Prostatakarzinoms geäußert:

„ Wenn die Behandlung des Prostatakarzinoms möglich ist, ist sie notwendig, und wenn die Behandlung notwendig, ist sie möglich?“

Wir können feststellen, dass diese Aussage noch genau so relevant ist für die Behandlung des PCAs wie vor 2 Jahrzehnten. Vielleicht noch bedeutender, da wir mit besseren diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten eine wesentlich differenziertere Behandlung durchführen können und eine subtile Entscheidung beim einzelnen Patienten gefordert ist. Dabei ist zu bedenken, dass noch vor ca. 30 Jahren die Behandlung des PCAs gleichzusetzen war mit einer hormonellen Therapie.

Die heute mögliche und zu fordern Diagnostik bei PCa stellt sich wie folgt dar (Abb. 1):

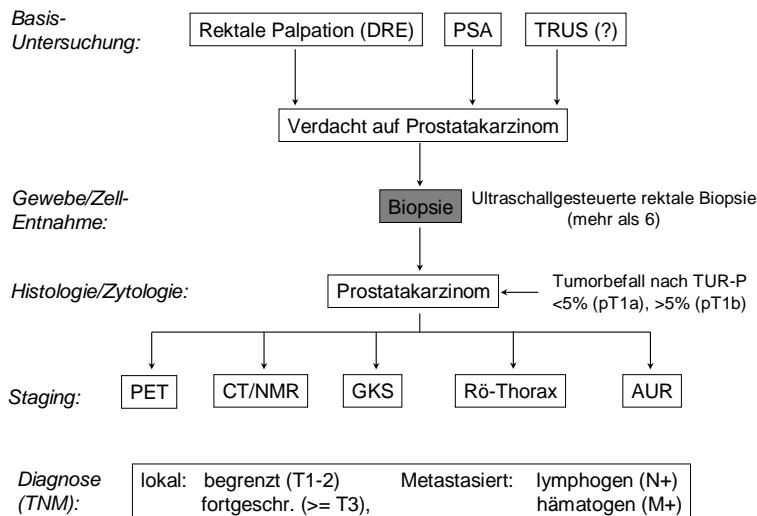


Abb. 1 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die Diagnostik bei Verdacht auf ein Karzinom der Prostata wird getragen von der digitalen, rektalen Palpation (DRP) (Abb. 2) und der Bestimmung des Prostata spezifischen Antigens - PSA (seit 1979) (Tab. 1).

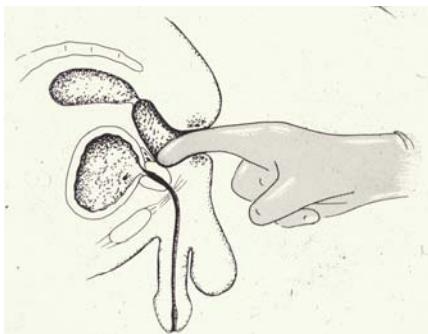


Abb. 2 Rektal-digitale Untersuchung der Prostata

- Beurteilung: Größe + Konsistenz
- Detektion 70% der PC's (periphere Zone)
- 30% (Transitionalzone) nicht tastbar
- hohe Sensitivität bei Screening
- Erfahrung des Untersuchers
- (Lernkurve > 500 Untersuchungen)

Unter Berücksichtigung des langsamen Verlaufes beim älteren Mann gelten heute altersabhängige PSA-Referenzwerte (Tab. 1).

Glykoprotein-Serin-Protease (MG. 34,000)
In Drüsenzellen der Prostata (erstmalig isoliert von Wang 1979)
Verflüssigung des Ejakulats
PSA-Werte sind altersabhängig: 2,5 (<50J.) – 6,5 (<80J.)
PSA-Werte nur mit gleichen Test-Kit vergleichbar
Falsch positiv erhöht bei: - Prostatitis (bis zu 80ng/ml) - DRU, Prostatamassage, Ejakulation - nach Biopsie/TUR-P (2,6 bis 57fach) - Halbwertszeit 1,5 Tage

Tab. 1 Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

Bei einem auffälligen rektalen Tastbefund oder PSA über dem Referenzwerte ist eine Prostata-Biopsie erforderlich (Stanz-, Saugbiopsie Abb. 3, 4). Die transrektale, ultraschallgesteuerte Prostatabiopsie ist heute der Standard in der Diagnostik. Der transrektale Ultraschall (TRUS) wird dabei für die Stanze, aber auch für die Saugbiopsie (Fran-

zennadel) verwendet (Abb. 5). Bei der Sextantenbiopsie werden je 3 Biopsien aus jedem Prostatalappen (peripher, zentral und apikal) zuzüglich eine Biopsie aus dem palpablen Tumor entnommen. Das Biopsat dient zur histologischen bzw. zytologischen Untersuchung, der Bestimmung des Gleason-Scores und der DNA-Zytometrie. Eine möglichst große Zahl von Biopsien ist mit Hinsicht auf die Heterogenität des PCa von Bedeutung (siehe dort) [11]. Der Vorteil der Saugbiopsie ist die fächerförmige Entnahme (Abb. 4)

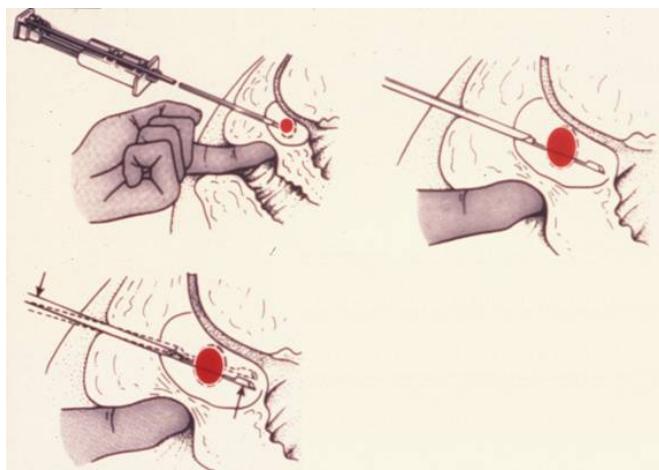
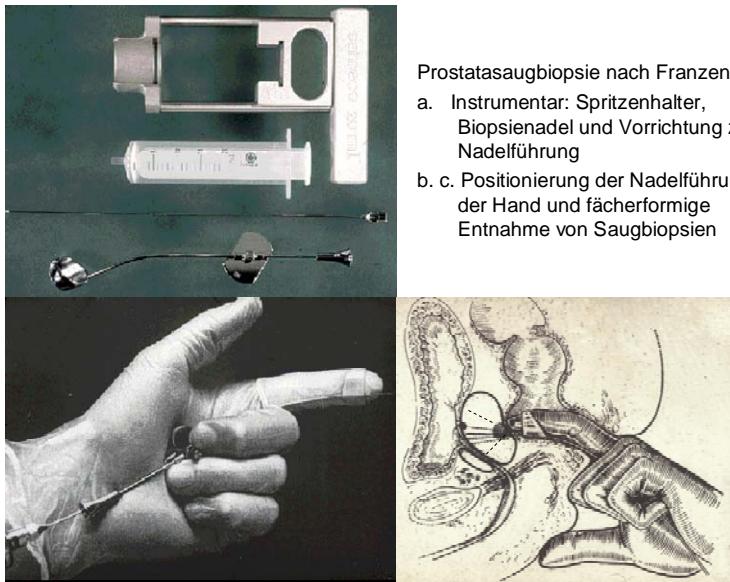


Abb. 3 Prostata Stanz-Biopsie (Digital geführt, direkt aus Tumorknoten, mit TruCut Nadel, Biopsy Gun)



mod. n. Faul

Abb. 4

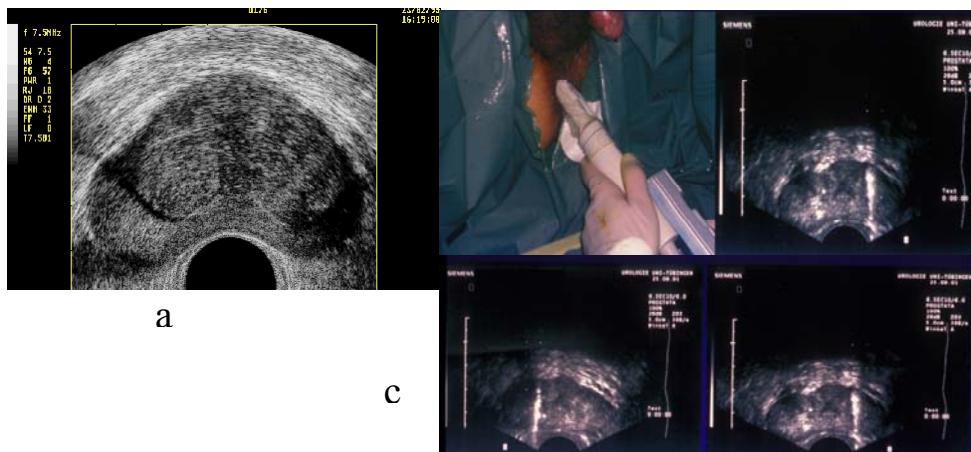


Abb. 5 Ultraschallgesteuerte transrektale Prostatabiopsie. a. Prostata im rektalen Ultraschallbild; b. TRUS-gesteuerte Prostatabiopsie; c. Biopsie aus dem linken und rechten Lappen

Zur Erfassung der Metastasierung und der Ausdehnung des lokalen Tumors dienen die Knochenszintigraphie, das Computer bzw. Magnetresonanz Tomogramm (CT, NMR) und in neuerer Zeit die Positronen-Emissions-Tomographie – PET (C-11-Cholin).

Blicken wir auf die Behandlungsmöglichkeiten so sind deutliche Fortschritte in der **operativen Technik der radikalen Prostatektomie**, zumindest im letzten Jahrzehnt zu verzeichnen. Dieser Eingriff kann heute retropubisch, perineal oder von einem laparoskopischen Zugang aus durchgeführt werden (Abb. 6, 7). Die Präparationstechniken haben den Blutverlust gesenkt, sie ermöglichen den Erhalt wichtiger Nervenstrukturen (Erektion) und der Kontinenz.

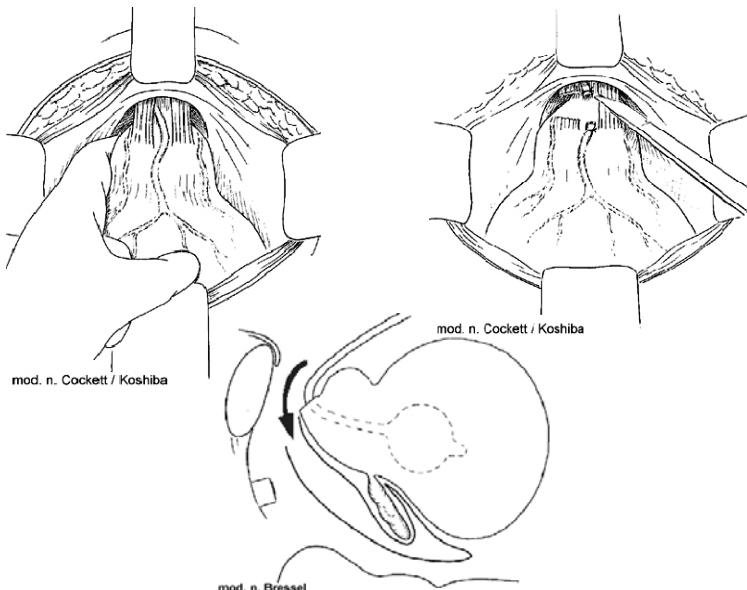


Abb. 6 Prostatektomie, retropubisch

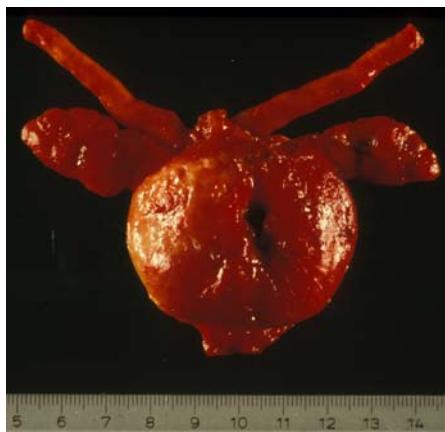


Abb. 7 Entfernte Prostata mit Samenblasen und Samenleiteranteilen

Die **Strahlentherapie** des PCa verfügt ebenfalls über verbesserte Verfahren (3D conformal radiotherapy - 3DCRT bzw. Intensity-Modulated Radiation Therapy - IMRT) [6]. Die drei dimensionalen Behandlungssysteme erlauben eine sicherere Zielführung der Einstrahlung und Begrenzung des Strahlenfeldes. Beim lokalfortgeschrittenen PCa hat sich eine Kombination von Hormonbehandlung (GnRH-Analoga) mit externer Bestrahlung bewährt [6].

Hier ist auch die **Brachytherapie** zu erwähnen, die gemeinsam von Urologen und Radiologen durchgeführt wird. Dabei werden von transperinealer radioaktive „Seeds“ (Iod-125) unter rektaler Sonographie Kontrolle implantiert (Abb. 8).

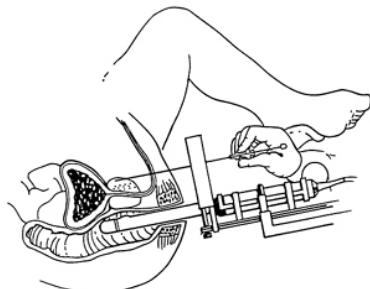
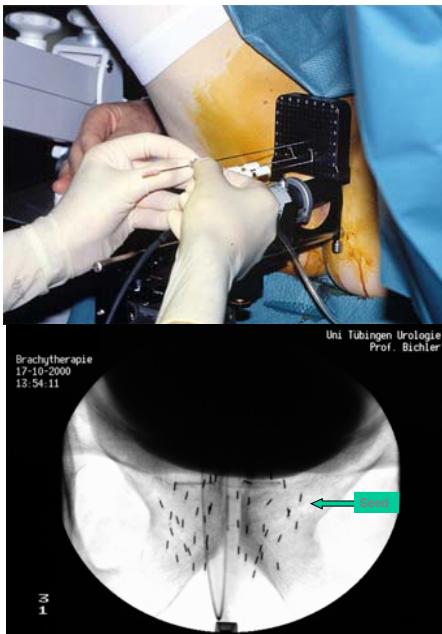


Abb. 8 Brachytherapie bei PCA:  
Transperineale Seedapplikation  
(Iod-125) bei T1b-c, T2,  
Gleason < 6, PSA < 10ng/ml,  
Tumorvolumen < 50cm<sup>3</sup>

Abb.8

Das Verfahren stellt eine Bereicherung unseres therapeutischen Armentariums dar.

Mit diesen radiotherapeutischen Verfahren stehen durchaus konkurrenzfähige Verfahren zu den operativen Methoden zur Verfügung.

Die **Hormontherapie** kann in Form der chirurgischen Kastration bzw. der medikamentösen mit GnRH-Analoga (z.B. Buserelin) (Abb. 9), Antiandrogenen (z.B. Cyproteronacetat) und Oestrogen durchgeführt werden und zwar bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen und Beschwerden [1].

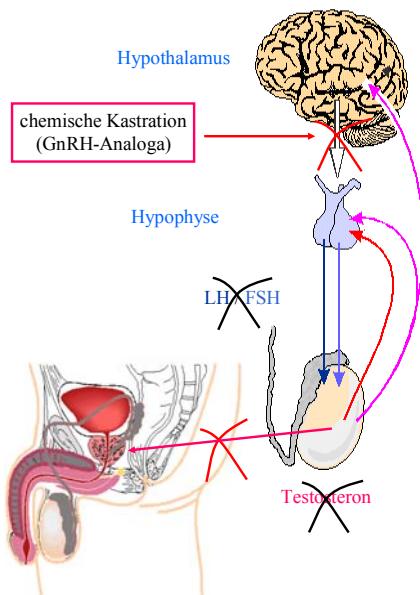


Abb. 9 Hormontherapie mit GnRH-Analoga

Insgesamt haben wir damit ein reichliches Bouquet bzw. Optionen („Optionalismus“) zur Therapie an der Hand. Die Abb. 10 zeigt in Zusammenfassung das stadienadaptierte Therapieschema beim PCa. Insbesondere die deutlich verbesserten operativen bzw. radiologischen Methoden führen in der Behandlung der Frühstadien des PCa zu guten Ergebnisse [6, 16].

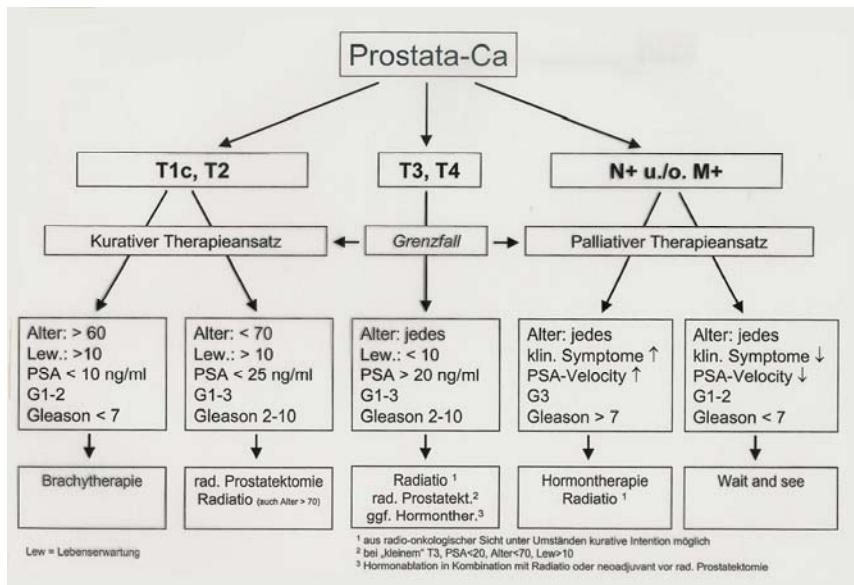


Abb. 10 Therapieschema Prostatakarzinom

Die moderne Diagnostik birgt aber die Gefahr der „Überbehandlung“ (over-treatment). So verleiten die größere Zahl an im Frühstadium erfassten PCas und die deutlich verbesserten Behandlungsmöglichkeiten dazu häufiger die radikalchirurgischen bzw. curativ radiologische Methoden anzuwenden.

Die unkritische Applikation der curativen Behandlungsverfahren, insbesondere bei älteren Patienten mit eingeschränkter Lebenserwartung kann zur „Überbehandlung“ führen. So macht das gleiche Tumorstadium abhängig vom Lebensalter und gesundheitlicher Belastung (speziell cardiovaskulär) unterschiedliche Therapiekonzepte erforderlich (siehe Kasuistik Abb. 14).

Die **Adäquanz des Behandlungsverfahrens** ist in der modernen Behandlung des PCA eine dringende Forderung.

Die zunehmend frühzeitige Entdeckung von lokal begrenzten kleinen Karzinomen der Prostata hat zu einer sich entwickelnden Diskussion über die Indikation radikaler Therapie, insbesondere bei „low-risk“ Tumoren geführt [4, 10]. Kriterien zur Erfassung der malignen Potenz des Karzinoms erhalten daher Bedeutung.

Es ist zu bedenken, dass der Erfolg der Behandlung nicht nur von den deutlich verbesserten Methoden der Diagnostik (Stadium, Grading) und Therapie beeinflusst wird, sondern auch von den spezifischen Eigenschaften des PCas. Daraus ist zu folgern, dass wir nach Methoden suchen müssen, die uns Informationen darüber geben.

**Was kann demnach die therapeutische Entscheidung bei Patienten mit PCa nach Erfassen des Stadiums und Gradings beeinflussen?**

- Das maligne Potential des Tumors
- Die langsame Progression des Tumors
- Das Alter bzw. Allgemeinzustand des Patienten (Begleiterkrankungen, z.B. cardiovaskulär)
- Die Lebenserwartung
- Die Wünsche des Patienten (Lebensqualität)

**Über welche Möglichkeiten verfügen wir das maligne Potential des Tumors zu erfassen (Vorhersagefaktoren)?**

- Gleason-Score
- Molekulare Prognose Marker
  - DNA-Ploidie [5]
  - Onkogene [7]
  - Tumorsuppressorgene (TSGs) [9]
  - Mikrogefäßdichte (MVD) [9, 16, 8]

In dieser Arbeit steht die Bedeutung der DNA-Zytometrie für das PCa im Mittelpunkt.

Der Grund für diese Fokussierung ist nicht die Vernachlässigung anderer Faktoren sondern liegt in unserer speziellen Beschäftigung mit der Ploidie des PCa [2, 12].

**Die Bedeutung der DNA-Zytometrie beim PCa:**

Verschiedene Punkte sind hier von Interesse:

1. Es handelt sich um ein unabhängiges Kriterium zur Dignitätsdiagnostik neben der Erfassung des Stadiums und des Malignitätsgrades („Staging“ and „Grading“).
2. Sie erfasst Chromosomen-Veränderungen des Tumorgeschehens = DNA-Ploidie.
3. DNA-Zytometrie ermöglicht biologische Bewertung der Tumorprogression beim PCa (Abb. 11): diploid → tetraploid → aneuploid und sich daraus ergebende therapeutische Ansätze.
4. Hinweise auf die Hormonsensibilität.
5. Heterogenität des PCa und DNA-Zytometrie.

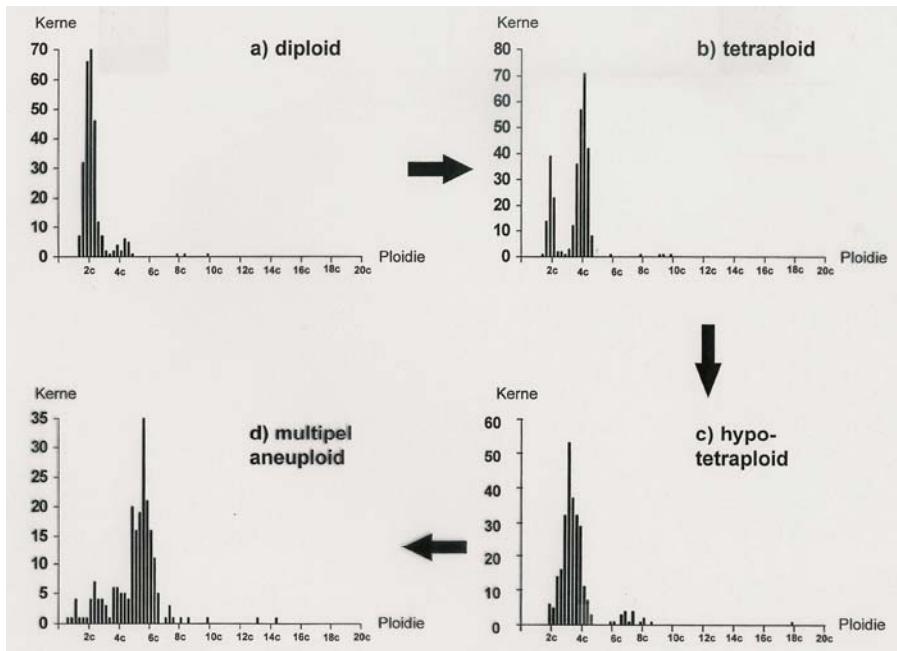


Abb. 11 Tumorprogression beim Prostatakarzinom (DNA Histogramme)

Verschiedene Studien wurden zur Bedeutung der DNA-Zytometrie durchgeführt:

- Tavares (1973)  
Lebenserwartung hormonbehandelter Patienten vs. Gesunder (Abb. 12) [20]
- Tribukait (1991, 1993)  
Überlebenswahrscheinlichkeit unbehandelter Patienten mit PCa in Abhängigkeit von DNA Verteilungsmuster (Abb. 13) [21, 5]
- Böcking (1994, 1996)  
DNA-Ploidie und Tumorentwicklung [5, 19]

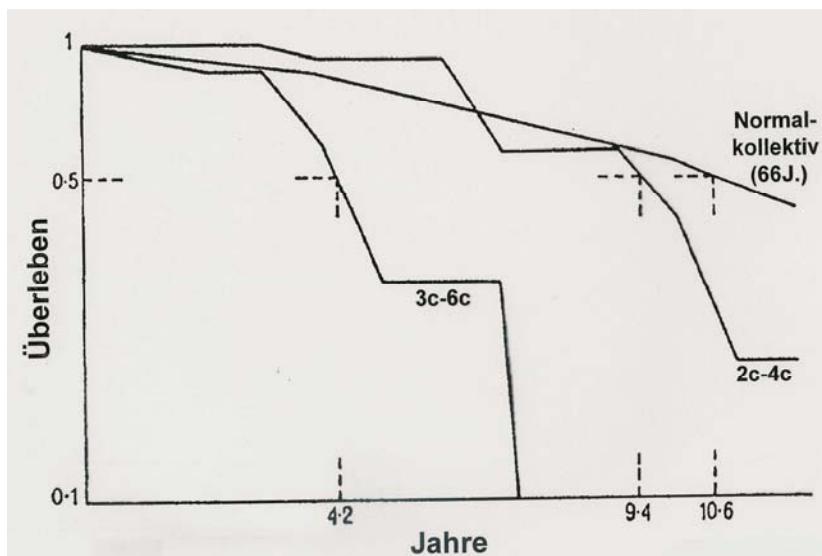


Abb. 12 Lebenserwartung hormonbehandelter Patienten vs. Gesunder

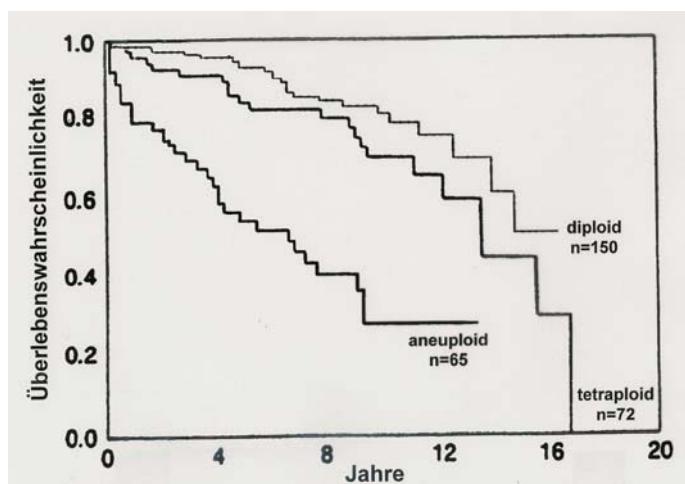


Abb. 13 Überlebenswahrscheinlichkeit unbehandelter Patienten mit PCa in Abhängigkeit von DNA Verteilungsmuster

So zeigten die Studien von **Tavares** zur Lebenserwartung hormonbehandelter Patienten mit PCa im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Männern, dass Patienten mit diploiden Tumoren im Vergleich zum Normalkollektiv gleiche Lebenserwartung haben, während Patienten mit aneuploiden Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose aufwiesen.

Untersuchungen von **Tribukait** haben gezeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit PCa abhängig vom DNA Verteilungsmuster ist. So zeigen die Patienten mit diploiden Tumoren eine deutlich bessere Prognose als die mit aneuploiden Karzinomen.

Von **Böcking** u.a. wurden Therapieempfehlungen für das lokale PCa gegeben, die auf einem WHO-Konsensus-Meeting in den 90iger Jahren abgefasst wurden und zwar empfahl die Konferenz:

Reine diploide und tetraploide Karzinome im Lokalstadium zunächst abwartend zu behandeln (wait-and-see), während aneuploide Tumoren wegen ihrer schlechten Prognose einer radikalen Prostatektomie oder Strahlenbehandlung zugeführt werden sollen.

**Das Konsensus-Meeting hat damals schon dringend klinische Studien zur Absicherung dieser Empfehlung vorgeschlagen!**

Die Kasuistik eines 80 Jahre alten Patienten mit PCa zeigt beispielhaft den Einfluss verschiedener Faktoren (Alter, Ploidie) auf die Therapieentscheidung (Abb. 14).

R. H. 80J

**Befunde:** Zustand n. TURP

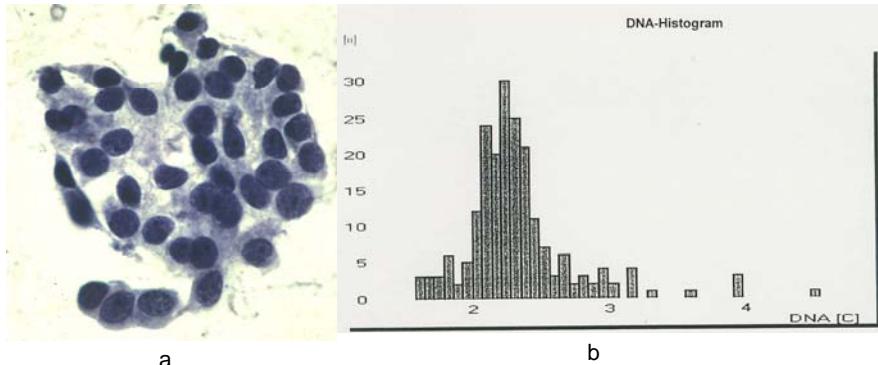
DRP: re. Restlappen derb

PSA: 26ng/ml

TRUS-Biopsie (n = 6) —> Histol. T1b, N0 MX G2

Zyto. G1 – G2 (a)

DNA-Zytometrie diploid (b)



**Therapie:** wait-and-see

(Begründung: Alter, beschwerdefrei, diploid, PSA-konstant)

Abb. 14: Kasuistik: PCa T1b, Befunde und Therapie

Neben der Aussage zur Dignität ermöglicht die DNA-Zytometrie aufgrund der Untersuchungen von Tribukait und Tavares fernerhin Hinweise auf das bekannte Phänomen der **Hormonsensibilität** („Hormontaubheit“) des PCa [20, 21]. Festzuhalten ist, dass die Androgendeprivation häufig einen raschen Erfolg zeitigt, die Karzinome aber im weiteren Verlauf eine geringere Hormonsensibilität aufweisen:

- Primär sind etwa 20% der PCa „hormontaub“.
- Unter der Hormontherapie kommt es bei 50% der Patienten nach 18 Monaten zur nachlassenden Sensibilität.
- Und nach 3 Jahren bei 70%.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit diesem Phänomen: Mutation der Androgenrezeptoren (?), Überexpression von Onkogenen (?), dem Verlust von Tumorsuppressorgenen bzw. Resultat einer Selektion von Zelllinien, die unabhängig von einer Androgenstimulation „gedeihen“ [16].

Nach Isaacs, Tribukait und Böcking ist anzunehmen, dass es unter der Hormontherapie zur Selektion aggressiver, aneuploider Zellen und zur Ausschaltung des diploiden An-

teils kommen kann – Klon-Selektionsmodell (Abb. 15) [5, 13, 14, 21]. Wobei die aneuploiden PCa-Zellen als „hormontaub“ anzusehen sind.

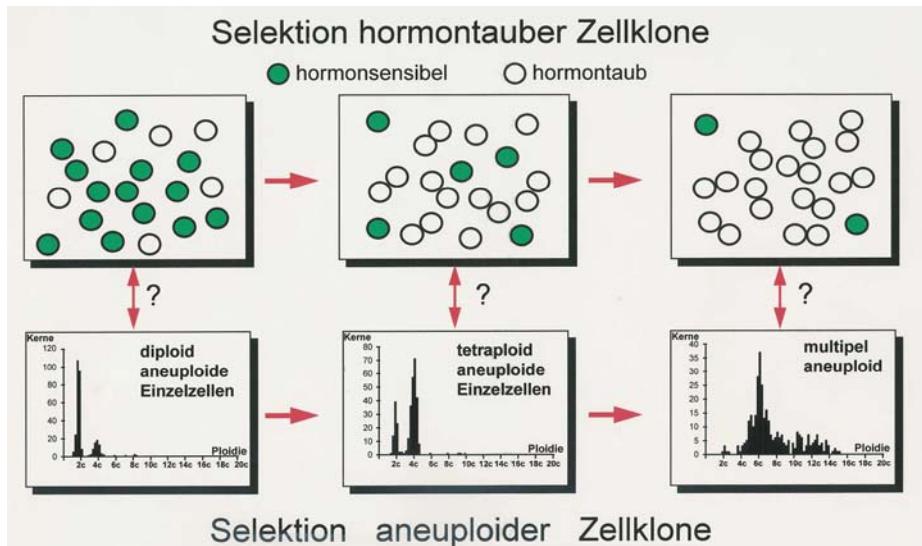


Abb. 15 Selektion hormontauber (aneuploider) Zellklone bei hormontherapierten Patienten mit Prostatakarzinom. Verknüpfung der Theorie von Isaacs mit den Untersuchungen von Tribukait und Böcking [13, 14, 5, 21]

Tribukait zieht daraus den Schluss, dass eine Hormontherapie nur bei rein diploiden PCas sinnvoll ist.

Hierzu als **Kasuistik** ein im Verlauf heterogen aneuploides PCa (Stadium 3) unter Hormontherapie bei einem 63 Jahre alten Patienten (Abb. 16). Das obere Bild zeigt den Zeitpunkt der Biopsien mit DNA-Analysen sowie den Verlauf der PSA-Bestimmung. Der anfänglich weitgehend diploide Tumor mit einigen aneuploiden Zellen ändert im Verlauf weniger Wochen, bis zu drei Monaten über hypotetraploid zu multipel aneuploid und damit zu einer schlechten Prognose.

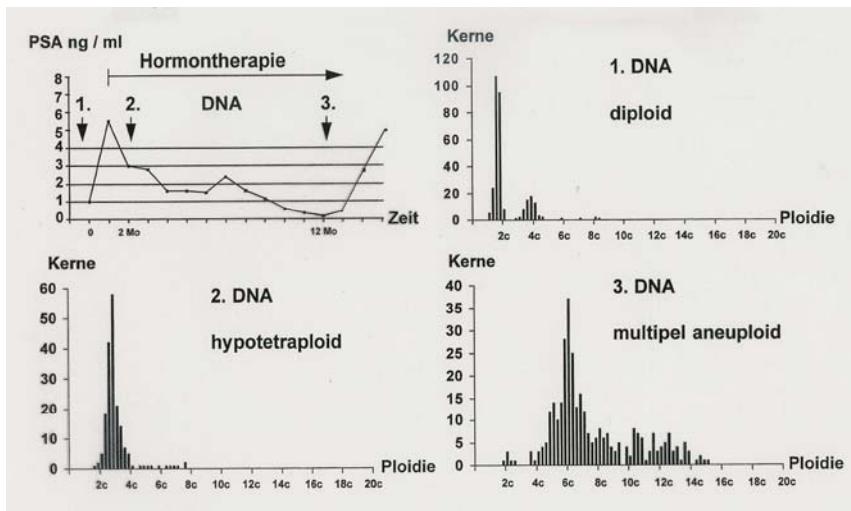


Abb. 16 Kasuistik (63 Jahre) eines im Verlauf heterogen aneuploiden Prostatakarzins unter Hormontherapie mit schlechter Prognose

In einer anderen Kauistik war bei einem 66 Jahre alten Mann mit einem T2 Prostatakarzinom Jahre vor unserer Behandlung eine Brachytherapie durchgeführt worden (Abb. 17). Die Ausgangs-DNA (1) ergab einen periploiden Status, der sich über 5 Jahre erhielt. Im weiteren Verlauf kam es zu einer peridiploiden Verteilung mit erhöhter Proliferationsfraktion, die auch im dritten Histogramm auftritt, so dass sich hier eine beginnende tetraploide Stammlinie abzeichnet. Im Histogramm 4 bestätigt sich dann diese Interpretation.

Die Diskrepanz zu den Thesen von Tribukait könnte sich darin begründen, dass es sich hier nur um wenige peritetraploide Zellen gehandelt hat, unter denen möglicherweise noch keine hormoninsensitiven waren.

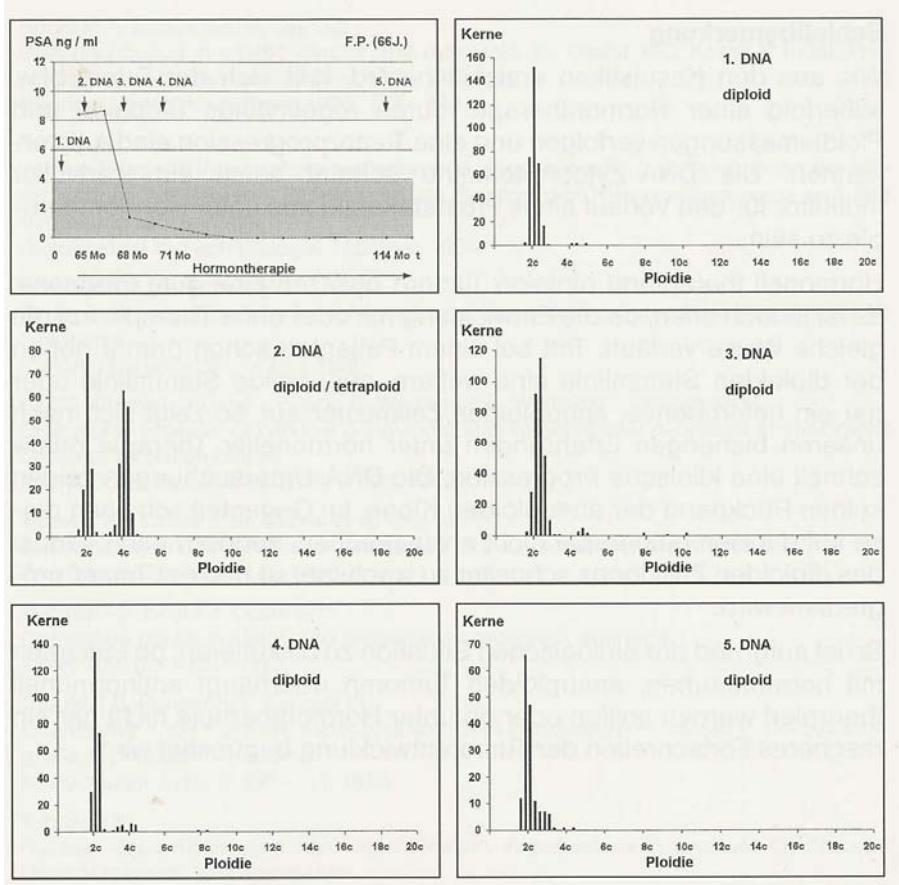


Abb. 17 Kasuistik (66 Jahre) eines im Verlauf diploiden Prostatakarzinoms unter Hormontherapie mit guter Prognose

Wie auch bei anderen diagnostischen Methoden, die biotisches Material zur Grundlage haben, ist für die Aussagefähigkeit der DNA-Zytometrie die **Heterogenität** des PCA zu bedenken. Das PCA besitzt eine ausgeprägte Heterogenität im Vergleich zu anderen Malignomen, erkennbar an der Expression von Molekularen Markern [9, 15]. Hier kommt der Gewebsentnahme eine besondere Bedeutung zu (Abb. 5). So kann die Erfassung der Heterogenität durch die Zunahme der Zahl von TRUS-gesteuerten Biopsien verbessert werden.

Mit Rücksicht auf diese Gegebenheit wird heute eine größere Zahl von Stanzten preferiert (10, 12, 15 evtl. 18! oder eine Wiederholung der Sextantenbiopsie) [11]. Wieder-

holung der Biopsie ergibt in 10 bis 20% Treffer während eine dritte oder vierte nur noch ca. 5% aufweist.

Wir haben zum Problem der Heterogenität bei 19 lokal begrenzten Prostatakarzinomen nach totaler Prostatektomie den jeweiligen Tumor zytologisch untersucht bzw. eine DNA-Zytometrie durchgeführt [17]:

Zur Methodik siehe Tab. 2 und Abb. 18.

### Heterogenität des Prostatakarzinoms Methodik

- Organpräparat → 2-6 Gewebescheiben
- Untersuchungen:
  - Zytologie
  - Histologie
  - DNA-Zytometrie
- DNA-Auswertemodus
  - konventionelle Stammlinien-  
Auswertung (< 2,2c)
  - Modus nach FU
- DNA-Diagnose
  - homogen diploid
  - diploid mit aneuploiden Kernen
  - homogen aneuploid

Tab. 2 Methodik unserer Untersuchungen zur Heterogenität des PCa nach Radikaloperation (n = 19)

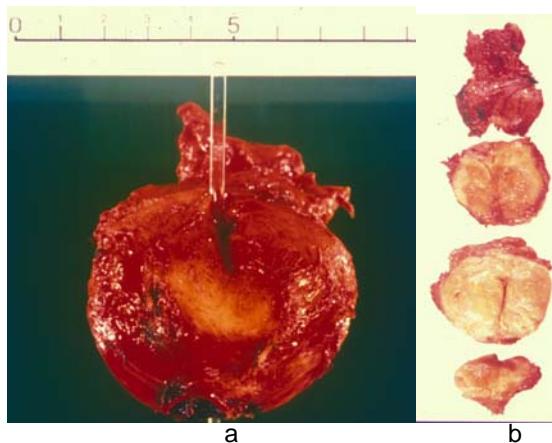


Abb. 18 Organpräparat nach Radikaloperation der Prostata (a) und zerteilt in 4 Ge-  
websscheiben (b)

Untersucht wurden 19 Organpräparate von Patienten, bei denen wegen eines lokoregionären Prostatakarzinoms eine Radikaloperation durchgeführt wurde.

Tab. 3 zeigt die Ergebnisse der Stammlinienauswertung der 19 Organpräparate.

Die Interpretation der Histogramme erfolgte entsprechend der Stammlinienauswertung nach BÖCKING. Hierbei werden als peridiploide Stammlinie Modalwerte zwischen 1,8c – 2,2c angesehen.

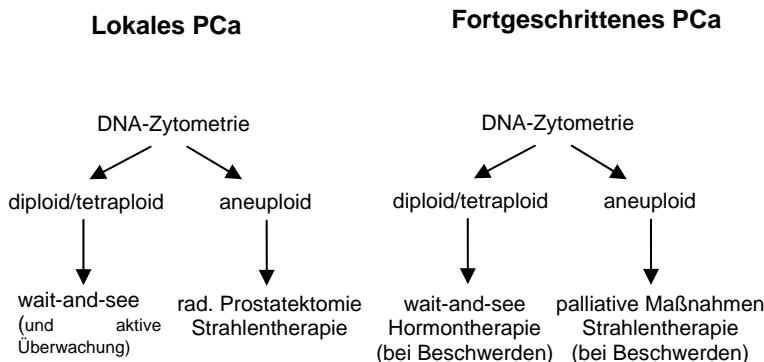
Unsere Untersuchungen lassen die Heterogenität der PCa erkennen. Ähnliche Befunde ergaben auch die Untersuchungen von O’Malley u.a. [18].

	diploid homogen	diploid mit aneupl. Kernen	aneuploid homogen
G <sub>1</sub>	1	2	-
G <sub>2</sub>	8	7	-
G <sub>3</sub>	1	-	-
	10/19	9/19	0/0

Tab. 3

Daraus leitet sich die Forderung nach einer möglichst großen Zahl von Biopsien zur Erfassung repräsentativen Materials des gesamten Tumors (Erfassung aller Areale) ab [11].

Ausgehend von der Ploidiebestimmung ergibt sich folgender Vorschlag zur Einbeziehung der DNA-Zytometrie in die Therapieentscheidung bei Patienten mit PCa:



## Zusammenfassung

Die zunehmend frühzeitige Entdeckung von lokal begrenzten kleinen Karzinomen der Prostata hat zu einer sich entwickelnden Diskussion über die Indikation radikaler Therapie, insbesondere bei „low-risk“ Tumoren geführt [10].

Die DNA-Zytometrie ist ausgehend von der Bestimmung des Tumorstadiums und Gradings, dem Alter des Patienten, der Lebenserwartung und seinen Wünschen ein wichtiger Therapieentscheidungsparameter zur malignen Potenz des Tumors [21, 5]. Wobei die Heterogenität des PCa einen limitierenden Aussagefaktor darstellt. Die Steigerung der Zahl von Stanzbiopsien (12 - 18) bzw. die Anwendung der Saugbiopsie (beide Methoden ultraschallgesteuert - TRUS) ist deshalb zwingend notwendig.

Anknüpfend an die Vorschläge des Konsensus-Meetings in Stockholm 1993 erhebt sich die Forderung nach kontrollierten klinischen Studien zur Bewertung der DNA-Zytometrie für die Therapie des PCa [19].

## Literatur:

1. Anderson, J.: Treatment of Prostate Cancer – The Role of Primary Hormonal Therapy. EAU Updates Series 1 (2003) 32-39.
2. Bichler, K.H., Feil, G., Krause, F.St., Nelde, H.J., Mittermüller, B.: Die Bedeutung der statistischen DNA-Zytometrie in der Diagnostik und Therapie von Prostata- und Harnblasenkarzinomen. In: Fortschritt und Fortbildung in der Medizin. Band 21 (1997/98). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1998.
3. Bichler, K.H., Wechsel, H.W., Mattauch, W.: Prostatakarzinom. pmi, Frankfurt, 1996.
4. Bill-Axelson, A., Holmberg, L., et al: Radical Prostatectomy versus Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. The New England Journal of Medicine (2005) Volume 352 (19): 1977-84.
5. Böcking, A.: Kriterien zur Aggressivität des Prostatakarzinoms. In: Bichler, K.H. u.a., Prostatakarzinom. pmi, Frankfurt, 1996.
6. Bolla, M.: Treatment of Localized or Locally Advanced Prostate Cancer: The Clinical Use of Radiotherapy. EAU Update Series 1 (2003): 23-31.
7. Bostwick, D.G.: Pathology of Prostate Cancer. In: Ernstoff, M.S. u.a.: Prostate Cancer. Blackwell, Oxford (UK), 1998.
8. Bostwick, D.G., Wheeler, T.M., Blute, M. et al: Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. Urology 1996; 48(1): 47-57.
9. Brawer, M.K. und Meyer, G.E.: Prostate Cancer: Staging and Prognostic Markers. In: Belldegrun, A., Kirby, R.S. und Newling, D.W.W.: New Perspectives in Prostate Cancer. ISIS, Oxford (UK), 2000.
10. Carroll, P.R., Cooperberg, M.R.: Evolving Indications for Active Surveillance in Low-Risk Localized Prostate Cancer. European Urology Supplements 2 (2003) 7-13.
11. Djavan, B., Remzi, M., Ghawidel, K., Marberger, M.: Diagnosis of Prostate Cancer: The Clinical Use of Transrectal Ultrasound and Biopsy. EAU Update Series 1 (2005): 9-15.
12. Feil, G., Mittermüller, B., Nelde, H.J., Wunderer, A., Wechsel, H.W., Bichler, K.H.: DNA-Bildzytometrie beim Prostatakarzinom. In: Bichler, K.H., Wechsel, H.W., Mattauch, W.: Prostatakarzinom. pmi, Frankfurt, 1996.
13. Isaacs, J.T.: Prostate 5: 1-17, 1984.
14. Isaacs, J.T., Coffey, D.S.: Adaption vs. selection as mechanism responsible for the relaps of prostatic cancer to androgen ablation as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. Cancer Res. 41: 5070, 1981.

15. Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., Bostwick, D.G.: Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1997; 53(3): 524-31.
16. Kirby, R.S., Christmas, T., Brawer, M.K.: *Prostate Cancer*. Mobsy, London, 2001.
17. Nelde, H.J., Bichler, K.H.: Untersuchungen zur DNA-Heterogenität bei Patienten mit loko-regionärem Prostatakarzinom.  
Arbeitstagung: DNA-Zytophotometrie bei Urologischen Tumoren. Urologische Klinik Tübingen, 29. Januar 1999.
18. O'Malley, F.P., Grignon, D.J., Keeney, M. et al: DNA heterogeneity in prostatic adenocarcinoma: A DNA flow cytometric mapping study with whole organ section of prostate. *Cancer* 1993; 71(9): 2797.
19. Schröder, F., Böcking, A., de Vere White, R., Koss, L., Lieber, M., Stenkvist, B., Zetterberg, A.: Clinical utility of cellular DNA measurements in prostate carcinoma. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 162: 51-64, 1994.
20. Tavares, A., Costa, J., de Carvalho, A., Reis, M.: Tumor ploidy and prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 109: 676-679, 1973.
21. Tribukait, B.: Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: Clinical research and application. *Eur Urol* 23 (suppl 2): 64-76, 1993.

# DNA-Grading der Malignität von Prostatakarzinomen in der Weltliteratur

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Zytogenetische Grundlagen

- 1.1 Vorstadien des Prostatakarzinoms
- 1.2 Klinisch manifestes Prostatakarzinom
- 1.3 Progression des Prostatakarzinoms

### 2. Methodische Grundlagen

- 2.1 DNA-Fluss- oder -Bildzytometrie
- 2.2 Diagnostische Algorithmen der DNA-Zytometrie
- 2.3 DNA-Aneuploidie als früher Marker für Malignität
- 2.4 Reproduzierbarkeit der DNA-Zytometrie
- 2.5 Repräsentativität der DNA-Zytometrie
- 2.6 Häufigkeiten verschiedener DNA-Verteilungen
- 2.7 Änderungen der DNA-Verteilungen über die Zeit

### 3. Korrelation mit anderen prognostischen Variablen

- 3.1 Tumorstadium
- 3.2 Histologischer Malignitätsgrad (Gleason-Score)
- 3.3 Zytologischer Malignitätsgrad

### 4. Bei fortgeschrittenen Tumoren

- 4.1 Lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom
- 4.2 Lymphknoten-Metastasen
- 4.3 Fernmetastasen

### 5. Zur Prädiktion

- 5.1 Von Metastasen
- 5.2 Von Tumor-Progression
- 5.3 Der Überlebenswahrscheinlichkeit
- 5.4 Ohne Therapie
- 5.5 Zum Monitoring
- 5.6 Nach Strahlentherapie
- 5.7 Nach Hormontherapie
- 5.8 Nach Strahlen- und Hormontherapie
- 5.9 Nach radikaler Prostatektomie

### 6. Referenzen

# **1. Zytogenetische Grundlagen**

## **1.1 Vorstadien des Prostatakarzinoms**

Die prostatichen intraepithelialen Neoplasien (PIN), die sich zu Krebs weiterentwickeln, sind chromosomal aneuploid.

- Alle intraepithelialen prostatichen Neoplasien (PIN) in der Umgebung manifester Prostatakarzinome wiesen in einer Studie von Baretton et al. (1993) Deletionen des Chromosoms 10 und 1p-Verluste auf.

## **1.2 Klinisch manifestes Prostatakarzinom**

Alle Prostatakarzinome sind chromosomal aneuploid.

- Für das Prostatakarzinom spezifische Chromosomenaberrationen wurden bisher nicht entdeckt. Das deutet darauf hin, dass als frühestes kausales genetisches Ereignis bei diesem Tumor ein für genetische Stabilität verantwortliches Gen, wie z.B. p53 mutiert oder deletiert ist. Dies lässt sich bei 17 % der Prostatakarzinome nachweisen (Al-Maghribi et al., 2001).
- 94 % der Prostatakarzinome zeigten in einer Untersuchung von Baretton et al. (1993) chromosomale Aneuploidien mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Verluste betrafen die Chromosomen 1, 8, 10 und 18, Gewinne das X-Chromosom, Gewinne und Verluste zusammen die Chromosomen 7, 17, und Y. Fast immer handelte es sich um Deletionen von Chromosom 10 und 1p-Verluste.
- Die häufigsten, mit zentromerischen Sonden und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gefundenen Aberrationen sind Deletionen der Chromosomen Nr. 12, 18, 19, 21, 22 und Y. Die häufigsten Gewinne betreffen Chromosomen Nr. 19 (Verdorfer et al., 2001; Matsuura et al., 1996).
- Mittels CGH wurden häufige Verluste von 8p, 6q, 10q und 13q sowie Zugewinne von 8q, 7q und xq gefunden (Verluste von 8p21 bis p22 zählen zu den häufigsten chromosomal Verlusten beim Prostatakarzinom (bis zu 86 %). Als eine ungünstige Prognose anzeigenches Gen kommt dort das Sppressorgen NKX 3.1 in Frage(Bubendorf, 2004).
- In 100 % der Metastasen von Prostatakarzinomen sind chromosomale Aneuploidien gefunden worden (Alcaraz et al., 2004; Qian et al., 1995).
- Die Tatsache, dass mittels konventioneller Methaphasen-Zytogenetik nur in 65 % (Verdorfer et al., 2001) und mit Interphasen-Zytogenetik nur in 41 % (Celep et al., 2003), 69 %, (Huang et al., 1996), 73 % (Erbersdobler et al., 1996), 76 % (Barranco et al., 1998), 84 % (Gburek et al., 1997) oder 89 % (Alcaraz et al., 2004) Chromosomenaberrationen nachweisbar waren, lässt

nicht schlussfolgern, dass die restlichen Karzinome euploid sind. Dies hat folgende methodische Gründe:

- Die Metaphasen-Zytogenetik kann nur über diejenigen Tumorzellen Auskunft geben, die auch in einer Zellkultur anwachsen. Chromosomale Aberrationen in nicht in vitro wachsenden Zellen entgehen der Detektion.
  - Mit der Interphase-Zytogenetik werden nur diejenigen Chromosomen-Anomalien erkannt, für die man spezifische DNA-Sonden eingesetzt hat. Bisher unbekannte Aberrationen können damit also nicht gefunden werden.
  - Auch die comparative genomische Hybridisierung (CGH) lässt Gewinne oder Verluste von Chromosomenabschnitten nur dann erkennen, wenn sie in einer Vielzahl von Tumorzellen vorkommen. Seltene Ereignisse entgehen auch dieser Analyse, mit der sich in 65 % der Prostatakarzinome chromosomal Aberrationen finden lassen (Verdorfer et al., 2001).
  - Mit allen drei Untersuchungsmethoden werden nicht nur unterschiedliche Chromosomenaberrationen gefunden, sondern auch in unterschiedlichen Häufigkeiten (Van Dekken et al., 2000).
- Dass DNA-durchfluszytometrisch diploide Prostatakarzinome (33 %) mittels Interphase-Zytogenetik zumeist aneuploid sind (76 %), zeigten (Barranco et al., 1998).

### 1.3 Progression des Prostatakarzinoms

Bei einem Teil der Prostatakarzinome ändert sich das Ausmaß chromosomaler Aneuploidie im Sinne einer kontinuierlichen, schrittweisen Zunahme.

- Die Frequenz chromosomaler Aberrationen nimmt mit dem Malignitätsgrad des Prostatakarzinoms zu (Baretton et al., 1993; n=70).
- Multiple Chromosomenaberrationen (Hypertetrasomien) wurden mittels FISH vor allem in Prostatakarzinomen mit besonders schlechter Prognose gefunden, dagegen selten bei Tumoren mit langen Überlebenszeiten. Vor allem Aberrationen der Chromosomen 4, 7 und 18 waren mit einer besonders schlechten Prognose verbunden (Alcaraz et al., 1994).
- Deletionen des Chromosomenabschnitts 8p22 sind hochsignifikant mit einer Progression von Prostatakarzinomen zum Stadium pT3 assoziiert (Matsuyama et al., 2003).
- Bubendorf (2004) notierte, dass die organbegrenzten Prostatakarzinome sich durch eine geringe Zahl chromosomaler Abberationen auszeichneten, die weiter fortgeschrittenen mit Samenblasenbefall dagegen eine signifikant höhere An-

zahl von Zugewinnen, vor allem von Chromosom 8q und Verluste von 18 q zeigten.

- Eine Deletion von 10q ist eine weitere häufige Veränderung beim Prostatakarzinom. Dort ist das Suppressorogen PTEM auf 10q 23.3 lokalisiert. Das Gen ist in 60 % der fortgeschrittenen Prostatakarzinome mutiert oder deletiert (Bubendorf, 2004).
- Die häufigste Amplifikation beim Prostatakarzinom liegt auf Xq 11.2 –12. Sie findet sich in 20 – 30 % der hormonrefraktärer Tumoren und wurde bisher in keinem anderen Tumortyp gefunden. Dort liegt wahrscheinlich das Androgen-Rezeptor-Gen (Bubendorf, 2004).
- Zugewinne von DNS-Abschnitten auf Chromosom 8q gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom. MYC gilt als wichtiges Zielgen der Amplifikation auf 8q24. Es ist vor allem in Metastasen amplifiziert (Bubendorf, 2004).
- Ein wiederholt nachgewiesener Zugewinn von DNA-Sequenzen wurde außerdem auf 8q21 nachgewiesen, wo das Tumorprotein D 52 (TPD52) als Zielgen postuliert wird (Bubendorf, 2004).
- Man nimmt an, dass es für die Tumorprogression des Prostatakarzinoms nicht um ein einziges amplifiziertes Gen geht, sondern eher um eine gemeinsame Überexpression mehrerer Gene, die zu einem Wachstumsvorteil für Tumorzellen führt (Bubendorf, 2004).

## 2. Methodische Grundlagen

### 2.1 DNA-Fluss- oder -Bildzytometrie

Die Ergebnisse beider Methoden stimmen nicht immer überein.

- Berner et al. (1993) beobachteten in 30 % Diskrepanzen (diploid vs. aneuploid) zwischen den Ergebnissen beider Messtechniken an zellvereinzelter Paraffinmaterial.
- Ahlgren et al. (1999) berichten über 31 % bzw. 43 % Diskrepanzen zwischen beiden Messverfahren bei Messungen an Stanz- bzw. Feinnadelaspirationsbiopsien.
- Wang et al. (2000) beschreiben dagegen eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen beider DNA-Meßmethoden an 165 Proben, wenn sie am selben Material durchgeführt wurden.

## **2.2 Diagnostische Algorithmen**

Man unterscheidet vier prognostisch relevante Muster der DNA-Verteilung: peridiploid, peritetratploid, x-ploid und multiploid. Die letzteren beiden werden auch oft als DNA-aneuploid zusammengefasst.

- In der Regel wird zwischen peridiploiden, peritetratploiden und aneuploiden DNA-Verteilungen unterschieden. Bei den aneuploiden Verteilungen unterscheidet man noch solche mit einer (x-ploid) und mit mehreren Stammlinien (multiploid, Haroske et al., 2001).
- Manche Autoren schlagen eine Kombination der DNA-Stammlinien-Ploidie mit der Proliferationsfraktion (PF) zum Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms vor (Ahlgren et al., 1997). Z.B. Grad 1: diploid, PF < 5 %; Grad 2: peridiploid, PF > 5 % < 10 % oder peritetratploid, PF < 10 %; Grad 3: peridiploid, PF > 10 % oder peritetratploid, PF > 10 % oder alle aneuploiden.
- Diesem Vorgehen entspricht auch der Vorschlag von Tribukait (2005).

## **2.3 DNA-Aneuploidie als früher Marker von Malignität**

Der Nachweis von DNA-Aneuploidie in prostatischen intraepithelialen Neoplasien (PIN) weist diese als obligat präkanzerös aus. Aneuploide PINs sind die Vorläufer des invasiven Prostatakarzinoms.

- 70 % der DNA-aneuploiden PINs sind bereits mit einem invasiven Prostatakarzinom assoziiert (Baretton et al., 1994; n=72).

## **2.4 Reproduzierbarkeit der DNA-Zytometrie**

Die interindividuelle Reproduzierbarkeit der objektiven DNA-Zytometrie ist besser als die der subjektiven Gleason-Gradierung.

- Für die Bestimmung der interindividuellen Reproduzierbarkeit des DNA-Malignitätsgrades ermittelten Böcking et al. (1989) 82,2 %. Betreffend die Unterscheidung zwischen DNA-Euploidie versus -Aneuploidie in Gebärmutterhals-Abstrichen belegten Nguyen et al. (2004) eine Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Untersuchern von 94 %, Yalcinkaya et al. (2005) von 100 % an Mundschleimhaut-Abstrichen.

## **2.5 Repräsentativität der DNA-Zytometrie**

Bei Nachweis diploider DNA-Verteilungen in der Biopsie eines Prostatakarzinoms findet man in ca. 20 % in weiteren untersuchten Proben zusätzlich noch tetraploide Anteile, kaum je aber aneuploide.

- Nach Wang et al. (2000) müssen bei pT2/3-Prostatakarzinomen bis zu fünf Biopsien untersucht werden, um mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit einen hö-

her-malignen Anteil auszuschließen, wenn man vier verschiedene DNA-Verteilungen unterscheiden möchte.

- Vesalainen et al. (1994) beobachteten bei 54 % der Prostatakarzinome eine intratumorale Heterogenität bezüglich der DNA-Verteilung, Warzynski et al. (1995) in 40%.
- Ahlgren et al. (1999) fanden nur in 24 % der Fälle Unterschiede der DNA-Ploidie zwischen Stanzbiopsien und Prostatektomie-Präparaten.
- Geht es lediglich um die Unterscheidung zwischen peridiploiden und anderen DNA-Verteilungen, so ist die Verlässlichkeit an einer einzigen Biopsie mittels Bildzytometrie größer (79 % bei T2/T3-Tumoren). Nur 21 % der in einer einzigen Biopsie peridiploiden Prostatakarzinome wiesen in weiteren Proben noch andere DNA-Verteilungen auf, dann aber immer prognostisch noch günstige peritetratploide. Alle Tumoren mit aneuploiden DNA-Mustern zeigten dagegen keine peridiploiden Stammlinien mehr (Wang et al., 2000).
- Dementsprechend berichten Leung et al. (1994) und Ross et al (1994) über einen exzellenten Prädiktionswert der an Stanzbiopsien erhaltenen DNA-Verteilungen für den Tumor als Ganzes (92 % bzw. 98,7 %).

## 2.6 Häufigkeiten verschiedener DNA-Verteilungen

Je nach Tumorstadium, Messmethodik und diagnostischer Interpretation werden unterschiedliche Häufigkeiten des Vorkommens der wesentlichen drei DNA-Verteilungsmuster peridiploid, peritetratploid und aneuploid beschrieben: Im Mittel ist fast die Hälfte aller Prostatakarzinome peridiploid und je ein Viertel peritetratploid und aneuploid.

Autoren	diploid	tetraploid	aneuploid
Ronström et al., 1981	27,1 %	45,1 %	27,7 %
Montgomery et al., 1990	68,0 %	28,0 %	4,0 %
Yokogi et al., 1991	53,0 %	38,0 %	9,0 %
Miller et al., 1991	54,0 %	21,0 %	33,0 %
Tinari et al., 1992	55,5 %	16,0 %	28,5 %
Peters-Gee et al., 1992	65,0 %	2,0 %	35,0 %
Al-Abadi und Nagel., 1995	30,0 %	10,0 %	60,0 %
Forsslund et al., 1996	36,8 %	9,3 %	53,9 %
Ahlgren et al, 1997	27,0 %	9,0 %	16,0 %
Borre et al., 1998	75,0 %	9,0 %	16,0 %

Amling et al., 1999	25,0 %	64,0 %	11,0 %
Mora et al., 1999	64,0 %	25,0 %	11,0 %
<b>Mittelwerte</b>	<b>48,4 %</b>	<b>23,0 %</b>	<b>25,4 %</b>

## 2.7 Änderungen der DNA-Verteilungen über die Zeit

Entsprechend der zytogenetischen Tumorprogression bleibt auch die DNA-Verteilung innerhalb der Prostatakarzinome über die Jahre und mit fortschreitendem Stadium nicht unbedingt konstant, sondern kann sich zu höheren DNA-Malignitätsgraden hin verschieben, womit sich dann auch die Prognose verschlechtert.

- LeRiche (1989) berichtet, dass 100 % der Prostatakarzinome im Stadium A DNA-diploid waren, im Stadium D waren es nur noch 20 %.
- Tribukait (1991) beschreibt bei 500 unbehandelten Prostatakarzinomen eine exponentielle Abnahme diploider und Zunahme aneuploider Tumoren mit zunehmendem Stadium. Da tetraploide DNA-Verteilungen vor allem in mittleren Stadien vorkommen, schließt er daraus, dass es sich bei diesen Tumoren um eine kontinuierliche Entwicklung von anfänglich peridiploiden- über peritetraploide hin zu schlussendlich aneuploiden handelt.
- Derselbe Autor (Tribukait, 1993) beobachtete bei 87 Patienten, dass sich 32 % der DNA-diploiden Prostatakarzinome innerhalb von zwei Jahren weiter entwickelten, zwei Drittel zu tetraploiden und ein Drittel zu aneuploiden Mustern. Die mittlere jährliche Progressionsrate von diploiden zu non-diploiden Prostatakarzinomen beträgt also etwa 16 %.

## 3. Korrelation mit anderen prognostischen Variablen

### 3.1 Tumorstadium

Die DNA-Verteilung in Prostatakarzinomen zeigt eine enge Korrelation zum Volumen und Stadium des Tumors. Sie lässt ein organüberschreitendes Wachstum an Biopsien gut vorhersagen.

- Frankfurt (1985) belegten, dass alle (n=11) diploiden Prostatakarzinome im Stadium B noch auf das Organ begrenzt waren. Alle (18/18) aneuploiden Tumoren im Stadium B zeigten dagegen bereits ein Organ-Überschreitendes Wachstum. Zwei Drittel der Patienten mit aneuploiden DNA-Verteilungen wiesen Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf. Dies war aber nur bei 7,1 % der diploiden Karzinome mit niedrigen Gleason-Scores der Fall.

- In einer Untersuchung von Lee et al. (1988) an Stanzbiopsien von 88 Patienten mit Prostatakarzinom in den Stadien T1-T4 zeigten nur 18 % der diploiden Tumoren aber 63 % der aneuploiden nach Prostatektomie eine Infiltration der Samenblasen.
- Tribukait (1993) zeigte, dass 79 % der Prostatakarzinome im Stadium 1 diploid waren und 75 % im Stadium 4 aneuploid. Die Korrelation der DNA-Verteilung mit der Überlebenswahrscheinlichkeit war besser als die des Tumorstadions oder des zytologischen Malignitätsgrades nach Esposti.
- Greene et al. (1994) belegten eine statistisch hoch signifikante Korrelation der DNA-Verteilung des Prostatakarzinoms mit dem Tumorvolumen ( $p=0,0001$ ).
- Vesalainen et al. (1994) dokumentierten, dass 84 % der Prostatakarzinome im Stadium T1 diploid waren und 65 % im Stadium T4 aneuploid. 70 % der Fälle ohne Fernmetastasen waren diploid, 69 % mit Metastasen aber aneuploid.
- Bei Greene et al. (1994) waren 76 % der diploiden Prostatakarzinome auf das Organ begrenzt und 87 % der aneuploiden die Kapsel überschreitend. Die DNA-Verteilung korrelierte hochsignifikant mit dem Tumor-Volumen. Zusammen mit einem Rauminhalt  $<1\text{cm}^3$  lies sich bei diploiden Tumoren ein Organ-Überschreitendes Wachstum gänzlich ausschließen (0/61).
- Ross et al. (1994) beschrieben ein Organ-übergreifendes Wachstum bei 89 Prostatakarzinomen in den Stadien A2 und B2 doppelt so häufig bei aneuploider DNA-Verteilung in Stanzbiopsien. Aneuploide Tumoren zeigten auch signifikant häufiger Fernmetastasen im Vergleich zu diploiden.
- DNA-Ploidie und Tumorstadium waren in einer Untersuchung von Ahlgren et al. (1997) signifikant miteinander korreliert. Unabhängig davon erwiesen sich die drei DNA-Gruppen zusätzlich bei 96 Patienten mit Prostatakarzinom als prognostisch relevant, vor allem, wenn die Proliferationsfraktion mit berücksichtigt wurde.
- Lorenzato et al. (2004) berechneten einen positiven Prädiktionswert für organ-überschreitendes Wachstum von 84 % bei Vorliegen von DNA-Aneuploidie. 79,6 % der T1/T2 Prostatakarzinome waren diploid, aber 60 % der T3/T4-Tumoren aneuploid.

### **3.2 Histologischer Malignitätsgrad (Gleason-Score)**

In der Regel besteht eine enge Korrelation zwischen dem Gleason-Score und der DNA-Verteilung von Prostatakarzinomen. Meist fügt letztere aber noch weitere prognostische Information hinzu, so dass eine zusätzliche Bestimmung der DNA-Ploidie zum histologischen Malignitätsgrad meist sinnvoll ist.

- McIntire et al. (1988) berichteten, dass Prostatakarzinome mit einem niedrigen Gleason-Score alleine in 9 % progredient waren, zusammen mit einer

diploiden DNA-Verteilung aber 0%. 36 % der Karzinome mit hohem Gleason-Score alleine waren progredient, zusammen mit dem Nachweis von DNA-Aneuploidie aber 67 %.

- Montgomery et al. (1990) belegten für 349 Patienten mit Prostatakarzinom im Stadium B, dass die DNA-Ploidie eine Tumor-Progression und das Tumorspezifische Überleben besser vorhersagen konnte, als der Gleason-Score.
- In einer Untersuchung von Song et al. (1992) war die DNA-Verteilung bei 65 Patienten mit Prostatakarzinom im Stadium B oder C hinsichtlich der Vorhersage der Überlebenszeit und einer Progression dem Gleason-Score deutlich überlegen.
- In einer multivariaten Regressionsanalyse nach Cox, die Ross et al. (1994) für 89 Patienten mit Prostatakarzinomen in den Stadien A2 und B2 nach radikaler Prostatektomie durchführten, war die an Stanzbiopsien bestimmte DNA-Ploidie dem Gleason-Score vor allem zur Vorhersage einer extrakapsulären Ausbreitung des Tumors, dem Vorkommen von Metastasen und dem Auftreten von Rezidiven überlegen.
- Gleason-Score und DNA-Ploidie waren in einer Studie von Vesalainen et al. (1994) hoch-signifikant miteinander korreliert: 67 % der Gleason-Scores 2-4 waren diploid und 61 % der Scores 8-10 aneuploid.
- Ahlgren et al. (1999) wiesen bei 39 Fällen nach, dass bei Gleason-Scores 5-7 die DNA-Ploidie noch zusätzliche prognostische Information lieferte.
- Mora et al. (1999) belegten bei 55 Patienten mit Prostatakarzinomen im Stadium B eine hohe Korrelation zwischen Gleason-Score und DNA-Verteilung: Alle aneuploiden Karzinome wiesen Gleason-Scores 8-10 auf. Die zytometrisch bestimmte Proliferationsrate erhöhte aber die prognostische Relevanz der DNA-Ploidie.
- Deliveliotis et al. (2003) zeigte für 84 Patienten mit Prostatakarzinomen nach totaler Prostatektomie dass die DNA-Zytometrie Rezidive besser voraus sagen konnte, als der Gleason-Score oder das Tumor-Stadium.

### 3.3 Zytologischer Malignitätsgrad

Der zytologische Malignitätsgrad lässt auch bei unbehandelten Prostatakarzinom-Patienten drei Gruppen mit signifikant unterschiedlichen Überlebenszeiten unterscheiden. Die DNA-Zytometrie liefert aber zusätzlich relevante prognostische Informationen.

- Nach Tribukait (1993) ist bei zytologisch low-grade (Esposti) – low stage Prostatakarzinomen die DNA-Ploidie der prognostisch valideste Parameter, auch vor dem Staging. Wenn die Fälle mit zytologischem Grad 3 ausge-

schlossen wurden, lieferte die DNA-Verteilung zusätzliche prognostische Information ( $p=0,0003$ ).

## 4. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren

### 4.1 Lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom

Selbst bei diesen Tumoren behält die DNA-Zytometrie ihre prognostische Relevanz.

- Al-Abadi und Nagel (1995) konnten für 60 Prostatakarzinom-Patienten in den Stadien T3 und T4 ohne nachweisbare Fernmetastasierung zeigen, dass diese innerhalb eines Zeitraumes von 12 Jahren keine Metastasen entwickelten, wenn sie DNA-diploid waren.

### 4.2 Lymphknoten-Metastasen

Selbst bei Vorliegen von Lymphknoten-Metastasen leben Prostatakarzinom-Patienten mit DNA-diploiden Tumoren länger als solche mit -aneuploiden.

- Bei 82 Patienten mit Lymphknoten-Metastasen (und Radiojodimplantaten in der Prostata) zeigte die multivariate Regressionsanalyse nach Cox einen signifikanten Unterschied der Überlebenszeiten zwischen Patienten mit diploiden und aneuploiden Mustern der DNA-Verteilung ( $p=0,01$ ). Die Zehnjahresüberlebensrate betrug für erstere noch 40 %. Dagegen konnte dies weder die Zahl befallener Lymphknoten, noch der histologische Malignitätsgrad vorhersagen.

### 4.3 Fernmetastasen

Selbst beim Vorliegen von Fernmetastasen lässt die DNA-Zytometrie noch Patienten mit relativ guter Prognose identifizieren.

- Winkler et al. (1988) verzeichneten bei 38 Patienten mit DNA-diploiden Prostatakarzinomen im Stadium D1 nach radikaler Prostatektomie, Lymphadenektomie und Hormonbehandlung innerhalb von 20 Jahren keinen einzigen Todesfall am Tumor, wohingegen alle Patienten mit tetraploiden und aneuploiden Karzinomen nach diesem Zeitraum verstorben waren.
- Ahlgren et al. (1997) konnten bei 29 Patienten nachweisen, dass selbst bei Vorliegen von Metastasen die DNA-Verteilung noch hochsignifikant ( $p=0,0004$ ) zwei Patientengruppen mit unterschiedlichen Überlebenszeiten unterscheiden lässt.

## **5. Zur Prädiktion**

### **5.1 Von Metastasen**

Die DNA-Zytometrie kann das Ausbleiben bzw. Auftreten von Metastasen mit gewisser Wahrscheinlichkeit ausschließen bzw. vorhersagen:

- Tinari et al. (1993) konnten für 18 DNA-diploide T1/T2 Prostatakarzinome belegen, dass diese nur in 16,7 % im Krankheitsverlauf Metastasen entwickelten, während T3/T4 Tumoren, die aneuploid waren, dies in 82,3 % der Fälle taten.
- In einer Untersuchung von Ross et al. (1994) konnte nachgewiesen werden, dass Prostatakarzinome mit aneuploiden DNA-Verteilungsmustern in Stanzbiopsien signifikant häufiger Fernmetastasen setzten, als solche mit diploiden Muster (n=89).
- Al-Abadi und Nagel (1995) zeigten für 198 Patienten mit Prostatakarzinomen der Stadien T3 N0 M0, dass keiner mit DNA-diploidem Muster innerhalb von 12 Jahren Metastasen oder eine lokale Tumor-Progression entwickelte.
- Ahlgren et al. (1999) berichteten bei 59 Patienten über eine hohe Korrelation ( $p=0,009$ ) des DNA-Verteilungsmusters mit dem Vorliegen von Fernmetastasen.

### **5.2 Von Tumorprogression**

Die DNA-Zytometrie kann das Ausbleiben oder Vorkommen eines Tumorprogeses mit gewisser Wahrscheinlichkeit vorhersagen.

- In einer Arbeit von Adolfsson et al. (1990) betrug das mediane Intervall DNA-diploider, unbehandelter Prostatakarzinome bis zu einer Tumorprogression 58 Monate, das -aneuploider Tumoren dagegen 37 Monate ( $p=0,006$ ).
- Bei Montgomery et al. (1990) waren 100% aller aneuploiden Prostatakarzinome progredient. In eine multivariaten Regressionsanalyse nach Cox konnte nur die DNA-Zytometrie den Progress vorhersagen, nicht der Gleason Score.
- Im Patientenkollektiv von Al-Abadi und Nagel (1995) entwickelten von 271 Patienten im lokal fortgeschrittenen Stadium eines Prostatakarzinoms (T3 NO, T3/4 NX) alle 60 DNA-diploiden innerhalb von 12 Jahren keine lokale Tumorprogression. Dagegen stellte sich diese trotz Therapieumstellung bei allen DNA-aneuploiden Tumoren innerhalb von 8 - 22 Monaten ein.
- Ahlgren et al. (1999) belegten für 39 Patienten eine sehr hohe Korrelation des DNA-diploiden Verteilungsmusters mit niedriger Proliferationsfraktion mit dem Ausbleiben einer Tumorprogression, da alle diese Patienten unter verschiedenen Therapie-Regimen innerhalb von drei Jahren keine Progression erlitten.

- In einer Studie von Amling et al. (1999) erlitten unter 108 Prostatakarzinom-Patienten diejenigen mit diploidem DNA-Muster 10 Jahre nach Radiatio und Prostatektomie keine Todesfälle am Tumor und nur 10 % einen lokalen, systemischen oder biochemischen Progress.
- Fünf Jahre nach Prostatektomie wegen Karzinom (n=84) waren in einer Studie von Deliveliotis et al. (2003) 0 % der DNA-diploiden aber >40 % der -aneuploiden biochemisch progredient.

### **5.3 Der Überlebenswahrscheinlichkeit**

Die DNA-Zytometrie kann wie keine andere prognostische Variable statistisch valide Aussagen zur Überlebenswahrscheinlichkeit an einem bestimmten Prostatakarzinom machen.

- In einer Untersuchung Tinari et al. (1993) waren unter 81 Patienten mit Prostatakarzinom in den Stadien T1/T2 M0 nach Prostatektomie oder unter Hormontherapie nach sieben Jahren nur 3 % der mit diploider DNA-Verteilung aber 41 % der mit non-diploider Verteilung verstorben.
- Bei Forsslund et al. (1992) war nur einer von 154 Patienten mit diploidem Prostatakarzinom der Stadien T2-4 unter Hormontherapie innerhalb von sechs Jahren verstorben. Die meisten von Ihnen lebten noch nach 15-25 Jahren. Dagegen waren alle Patienten mit aneuploidem Muster nach sechs Jahren gestorben.
- Al-Abadi und Nagel (1995) belegten mit 271 Fällen von fortgeschrittenem Prostatakarzinom (T3 N0 M0), dass die Überlebensrate von Patienten mit diploidem Tumor (n=60) für neun Jahre 88 % betrug, für tetraploide Karzinome 38 % und für aneuploide 0%.
- Ahlgren et al. (1997) belegten für 96 Patienten mit Prostatakarzinom in den Stadien T2-4 und einer mittleren Beobachtungszeit von 14,5 Jahren eine hochsignifikante Korrelation der DNA-Verteilung im Tumor mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten vor allen anderen Variablen, wie Alter, zytologischem Malignitätsgrad, T-Stadium oder M-Status.

### **5.4 Ohne Therapie**

Bei untherapierten Prostatakarzinomen lassen sich mittels DNA-Zytometrie diejenigen Patienten erkennen, die keine verminderte Lebenserwartung haben.

- Für 287 unbehandelte Prostatakarzinome belegte Tribukait (1993) statistisch hochsignifikante Unterschiede der Überlebenszeit von Patienten mit diploider und aneuploider DNA-Verteilung ihres Tumors. Die Zehnjahres-Überlebensrate betrug für 150 Patienten mit diploiden Tumoren >80 % (bei

einem mittleren Alter von 69 Jahren). Diejenige gleichaltriger deutscher Männer beläuft sich aber gemäß Sterbetafel 2004 der Privaten Krankenversicherer auf <80 %. Das bedeutet, dass kein Unterschied zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patienten mit einem unbehandelten DNA-diploiden Prostatakarzinom und einer gleichaltrigen Vergleichspopulation besteht. Die Zehnjahres-Überlebensrate für Patienten mit DNA-tetraploiden Tumoren betrug noch 70%.

- Bei Tribukait (1993) lebten unbehandelte Prostatakarzinom-Patienten mit low-grade- low-stage Tumoren genauso lange, wie solche ohne Prostatakarzinom.

## 5.5 Zum Therapie-Monitoring

Änderungen des DNA-Verteilungsmusters unter konservativer Therapie lassen ein Ansprechen oder Nichtansprechen des Tumors frühzeitig vorhersagen.

- Leistenschneider und Nagel (1983) beschrieben für 20 Patienten eine signifikante Rückführung aneuploider DNA-Verteilungsmuster zu peridiploiden innerhalb der ersten 12 Wochen nach konservativer Behandlung, wenn die Tumoren auf die Medikation ansprachen, mit entsprechend guter Prognose. Dagegen deuteten weitere Aneuploidisierungen eine klinische Progression an. Gleichermaßen beschrieben Al-Abadi und Nagel (1995) für drei Fälle unter Estracyt- bzw. Buserelin-Therapie.
- Böcking et al (1985) beschrieben für 19 Patienten unter Hormontherapie eines Prostatakarzinoms eine Korrelation des von ihnen eingeführten DNA-Regressions-Index (Änderung des DNA-Malignitätsgrades über die Zeit in Monaten:  $\Delta\text{-DNA-MG} / \Delta t$ ) mit der Überlebenszeit.

## 5.6 Nach Strahlentherapie

- Song et al. (1992) konnten für 65 Patienten mit Prostatakarzinom in den Stadien B und C eine Non-Progressionsrate von 11% für 10 Jahre für DNA-low-grade- und von 64 % für DNA-high-grade-Tumoren belegen. Das Tumorspezifische Überleben für zehn Jahre betrug 73 % für DNA-low-grade- und 20 % für -high-grade Tumorpatienten. In der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox war die DNA-Ploidie vor dem Tumorstadium und dem histologischen Malignitätsgrad (Gleason-Score) die wichtigste prognostische Variable.

## 5.7 Nach Hormontherapie

- Tavares et al. (1973) belegten erstmals für hormonell behandelte, 70-jährige Patienten mit DNA-diploiden und -tetraploiden Prostatakarzinomen gegen-

über gleichalten, nicht an diesem Tumor erkrankten Männern identische Überlebensraten, wohingegen solche mit aneuploiden Prostatakarzinomen signifikant früher starben.

- Heaney et al. (1977) dokumentierten eine signifikant kürzere Überlebenszeit für Patienten mit hormonell- versus gar nicht behandelten Prostatakarzinomen.
- Ahlgren et al. (1997) zeigten, dass hormonell oder gar nicht behandelte Prostatakarzinom-Patienten (n=11) in den Stadien T2-4 mit diploider DNA-Verteilung und niedriger Proliferationsrate ein niedriges Risiko von nur 10 % haben, innerhalb von 16 Jahren an ihrem Tumor zu sterben.
- Von 154 Patienten mit DNA-diploiden oder tetraploiden Prostatakarzinomen in den Stadien T2-4 verstarb nach Forsslund et al. (1996) innerhalb von fünf Jahren unter Hormontherapie nur einer (0,6 %), während 174 von 180 Patienten mit aneuploiden Tumoren nach fünf Jahren an ihrem Tumor verstorben waren (97 %). Das bedeutet, dass man trotz einer Hormontheapie an DNA-aneuploiden Prostatakarzinomen wahrscheinlich innerhalb von fünf Jahren stirbt und mit einer solchen (oder auch ohne) in der Regel länger als fünf Jahre überlebt, wenn der Tumor diploid oder tetraploid ist.
- Pollak et al. (1997) beschrieben für 184 Prostatakarzinom-Kranke im regional fortgeschrittenen Stadium D1 mit Lymphknotenmetastasen ein vier-Jahre progressionsfreies Überleben von 48 % bei DNA-diploiden und von 14 % bei -aneuploiden Tumoren. Das Gesamtüberleben belief sich auf 100 % für diploide und 61 % für aneuploide Karzinome.
- Tribukait (1993) verglich die Überlebensraten zwischen allen unbehandelten (n=186) und allen hormonell behandelten (n=166) Prostatakarzinom-Patienten. Zwischen diesen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei Stadium 1- und 2-, Grad 1- und 2-Tumor-Patienten (bei gleicher Alterszusammensetzung in beiden Gruppen). Die Überlebensraten der nicht behandelten Patienten lagen sogar höher, als die der nicht Behandelten.
- Tribukait (1993) untersuchte auch die Überlebensraten aller hormonell behandelten (n=111) und unbehandelten Prostatakarzinom-Patienten (=121) mit diploider DNA-Verteilung und beobachtete keinen Unterschied der Überlebenszeiten. Unter den Patienten mit tetraploiden Prostatakarzinomen wiesen die Unbehandelten (n=43) dagegen signifikant längere Überlebenszeiten gegenüber den hormonell Behandelten (n=23) auf.
- Tribukait (1993) verglich auch die Überlebenszeiten von unbehandelten high-grade-high-stage-Prostatakarzinompatienten (n=22) mit derjenigen von hormonell Behandelten (n=32) und stellte ein signifikant ( $p=0,05$ ) längeres Überleben der unbehandelten Patienten fest.
- 97 % der hormonell behandelten 180 Patienten mit Prostatakarzinomen aneuploider DNA-Verteilung starben innerhalb von fünf Jahren, wohingegen

keiner der 123 Patienten mit diploiden und nur einer von 31 Patienten mit tetraploiden Tumoren innerhalb von fünf Jahren am Tumor verstarb.

## 5.8 Nach Strahlen- und Hormontherapie

Aneuploide Prostatakarzinome unter Bestrahlung profitieren nicht von zusätzlicher Hormontherapie.

- Pollak et al. (2003) fanden, dass bei 16 Patienten mit DNA-aneuploiden Prostatakarzinomen eine zur Bestrahlung zusätzliche Hormontherapie kontraproduktiv war, da die Patienten darunter früher starben, als nach Bestrahlung alleine (n=16).

## 5.9 Nach radikaler Prostatektomie

- Lee et al. (1988) berichteten, dass nach totaler Prostatektomie bei 37 Patienten mit diploidem Karzinom keines innerhalb von fünf Jahren rezidierte, wenn die Samenblasen unbeteiligt geblieben waren. Mit Beteiligung der Samenblasen taten dies 18 % der DNA-diploiden Karzinome.
- Bei Nativ et al. (1989) zeigte sich bei im Stadium C radikal operierten Prostatakarzinom-Patienten nur in 8 % nach zehn Jahren bei DNA-diploiden Tumoren ein Progress, aber in 43 % der -aneuploiden. Die Zehnjahres-Überlebensraten betrugen 90 % für diploide und 64 % für aneuploide Tumoren. Im Stadium D1 wurde bei diploiden Karzinomen innerhalb von 13 Jahren nach Operation kein Todesfall am Tumor beobachtet und nur in 15 % eine Progression in 20 Jahren.
- Peters-Gee et al. (1992) beschrieben für 51 Patienten mit radikal operierten Prostatakarzinomen in den Stadien D1 und D2, dass 76 % der DNA-aneuploiden Tumoren progredierten, aber nur 53 % der -diploiden.
- In den Stadien A2 und B2 konnten Ross et al. (1994) mittels DNA-Bildzytometrie an Stanzbiopsien das Vorkommen einer extraprostatischen Ausbreitung des Tumors (n=89), von Metastasen und von Rezidiven nach Prostatektomie besser vorhersagen, als mit dem Gleason-Score (in 15,7 % der DNA-diploiden Tumoren).
- Von 26 Patienten mit diploidem Prostatakarzinom, die eine Bestrahlung und Prostatektomie erhielten, verstarb innerhalb von zehn Jahren keiner an seinem Tumor (Amling et al. (1999)).
- Nach Mora et al. (1999) traten nach 55 Prostatektomien im Stadium B des Prostatakarzinoms innerhalb von zehn Jahren kein einziges Rezidiv auf, wenn der Tumor DNA-diploid war.

- Delivelitos et al. (2003) zeigten für 84 Patienten, dass nach Prostatektomie innerhalb von fünf Jahren 0 % der diploiden aber 40 % der aneuploiden Prostatakarzinome rezidivierten.

## 6. Referenzen

- Adolfsson J, Rönström L, Hedlund PO, Löwhagen T, Carstensen J, Tribukait B: The prognostic value of modal deoxyribonucleic acid in low grade, low stage untreated prostate cancer. *J Urol* 144, 1404-1407 (1990)
- Ahlgren G, Lindholm K, Falkmer U, Abrahamsson PA,: A DNA-cytometric proliferation-index improves the value of the DNA-ploidy pattern as a prognosticating tool in patients with carcinoma of the prostate.*Urology* 50, 379-384 (1997)
- Ahlgren G, Falkmer U, Gadaleanu V, Abrahamsson PA: Evaluation of DNA ploidy combined with a cytometric proliferation index of imprints from core needle biopsies in prostate cancer. *Eur Urol* 36, 314-319 (1999)
- Al-Abadi H, Nagel R: Zytomorphologie und DNS-Zytophotometrie beim Prostatakarzinom und ihre prognostische Bedeutung. *Notabene medici* 3, 74-79 (1995)
- Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA, Herath JF, Bergstrahl EJ, Larson-Keller JJ, Lieber MM, Jenkins RB: Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res* 54, 3998-4002 (1994)
- Alcaraz A, Corral JM, Ribal MJ, Mallofre C, Mengual L, Carrio A, Gil-Vernet Sedo JM, Villavicencio H: Fluorescence in situ hybridization analysis of matched primary tumor and lymph-node metastasis of D1 (pT2-3 pN1M0) prostate cancer. *BJU Int* 94 (3), 407-411 (2004)
- Al-Maghrabi J, Vorobyova L, Chapman W, Jewett M, Zielenska M, Squire JA: p53 alteration and chromosomal instability in prostatic high-grade intraepithelial neoplasia and concurrent carcinoma: analysis by immunocytochemistry, interphase in situ hybridization, and sequencing of laser-captured microdissected specimens. *Mod Pathol* 14 (12), 1252-1262 (2001)
- Amling CL, Lerner SE, Martin SK, Slezak JM, Blute ML, Zincke H: Deoxyribonucleic acid ploidy and serum prostate specific antigen predicts outcome following salvage prostatectomy for radiation refractory prostate cancer. *J Urol* 161 (3), 852-863 (1999)
- Baretton G, Vogt T, Valina C, Schneiderbanger K: Prostata-Karzinom und potentielle Präkanzerosen: DNA-zytometrische Untersuchungen und Interphasenzytogenetik. *Verh Dtsch Ges Path* 77, 86-92 (1993)

Baretton G, Vogt T, Blasenbreu S, Löhrs U: Comparison of DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in the prostate. *Hum Pathol* 25, 506-513 (1994)

Barranco MA, Alcaraz A, Corral JM, Sole M, Mallofre C, Llopis J, Rodriguez A, Ribal MJ, Alvarez-Vijande R, Carretero P: Numeric alterations in chromosomes 7 and 8 detected by fluorescent in situ hybridization correlate with high-grade localized prostatic cancer. *Eur Urol* 34 (5), 419-425 (1998)

Berner A, Danielsen HE, Juul NO, Juul MEH, Pettersen EO, Rweith A, Nesland JM, Fossa SD: Caveats in the estimation of DNA ploidy in paraffin embedded specimens of primary prostate cancer and lymph node metastases by flow and image cytometry. *Anal Cell Pathol* 339-352 (1993)

Böcking A, Auffermann W, Jocham D, Contractor H, Wohltmann D: DNA grading of malignancy and tumor regression in prostatic carcinoma under hormone therapy. *Appl Pathol* 3, 206-214 (1985)

Bubendorf L.: Molekularpathologie des Prostatakarzinoms. Akademische Spielwiese oder Wegweiser für Diagnose und Therapieplanung. *Verh Dtsch Ges Path* 88, 158-164 (2004)

Celep F, Karaguzel A, Ozgur GK, Yildiz K: Detection of chromosomal aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Eur Urol* 44 (6), 666-671 (2003)

Deliveliotis C, Skolarikos A, Karayannis A: The prognostic value of p53 and DNA ploidy following radical prostatectomy. *World J Urol* 21, 171-176 (2003)

Ebersdobler A, Gurses N, Henke RP: Numerical chromosomal changes in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and concomitant invasive carcinoma. *Pathol Res Pract* 192 (5), 418-427 (1996)

Forsslund G, Eposti P, Nilsson B, Zetterberg A: The prognostic significance of nuclear DNA content in prostatic carcinoma. *Cancer* 69 (6), 1432-1439 (1992)

Forsslund G, Nilsson B, Zetterberg A: Near tetraploid prostate carcinoma: Methodologic and prognostic aspects. *Cancer* 78 (8), 1748-1755 (1996)

Frankfurt OS, Chin JL, Englander LS, Greco WR, Pontes E, Rustum YM: Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res* 45, 1418-1423 (1985)

Gburek BM, Kollmorgen TA, Qian J, D'Souza-Gburek SM, Lieber MM, Jenkins RB: Chromosomal anomalies in stage D1 prostate adenocarcinoma primary tumors and lymph node metastases detected by fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 157 (1), 223-227 (1997)

Greene DR, Rogers E, Wessels EC, Wheeler TM, Taylor SR, Santucci RA, Thompson TC, Scardino PT: Some small prostate cancers are nondiploid by nuclear image analy-

sis: correlation of deoxyribonucleic acid ploidy status and pathological features. Am J Urol 151, 1301-1307 (1994)

Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Anal Cell Pathol 23, 89-95 (2001)

Heaney JA, Chang HC, Daly JJ, Prout JR: Prognosis of clinically undiagnosed prostatic carcinoma and the influence of endocrine therapy. J Urol 118, 283-287 (1977)

Huang SF, Xiao S, Renshaw AA, Loughlin KR, Hudson TJ, Fletcher JA: Fluorescence in situ hybridization evaluation of chromosome deletion patterns in prostate cancer. Am J Pathol 149 (5), 1563-1573 (1996)

Hutter RVP, Montie JE, Busch C et al.: Current prognostic factors and their relevance to staging. Cancer 78, 369-371 (1996)

Lee SE, Currin SM, Paulson DF, Walther PJ: Flow cytometric determination of ploidy in prostatic adenocarcinoma: a comparison with seminal vesicle involvement and histopathological grading as a predictor of clinical recurrence. J Urol 140, 769 (1988)

Le Riche JC, Bruchovsky N, Goldenberg SL, de Jong G: Flow cytometry in the cytological and clinical assessment of prostatic carcinoma. In: Karr JP, Coffey DS, Gardner W, Edit. Prognostic Cytometry and Cytopathology of prostate Cancer, Elsevier Publishing Co., Inc., Amsterdam (1989)

Leistenschneider W, Nagel R: Einzelzellzytometrische Zellkern-DNS-Analysen beim behandelten, entdifferenzierten Prostatakarzinom und ihre klinische Bedeutung. Urologe A 22, 157 (1983)

Leung CS, Zbieranowski I, Demers J, Murray D: DNA image cytometry of prostatic carcinoma: A comparison of needle core biopsy and subsequent prostatectomy specimens. Mod Pathol 7 (2), 195-199 (1994)

Lorenzato M, Rey D, Durlach A, Bouttens D, Birembaut P, Staerman F: DNA image cytometry on biopsies can help the detection of localized Gleason 3+3 prostate cancer. Urol 172, 1311-1313 (2004)

Matsuura H, Shiraishi T, Yatani R, Kawamura J: Interphase cytogenetics of prostate cancer: fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of Japanese cases. Br J Cancer 74 (11), 1699-1704 (1996)

Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P: The role of chromosome 8p22 deletion for predicting disease progression and pathological staging in prostate cancer. Aktuelle Urol 34 (4), 247-249 (2003)

McIntire TL, Murphy WM, Coon JS, Chandler RW, Schwartz D, Conway S, Weinstein RS: The prognostic value of DNA ploidy combined with histologic substaging for incidental carcinoma of the prostate gland. A J C P 89 (3), 370-373 (1988)

Mikuz G: Pathology of prostate cancer. Old problems and new facts. *Adv Clin Pathol* 1, 21-34 (1997)

Montgomery BT, Nativ O, Blute ML: Stage B prostate adenocarcinoma. Flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis. *Arch Surg* 125, 327-331 (1990)

Mora LB, Moscinski LC, Diaz JI, Blair P, Cantor AB, Pow-Sang JM: Stage B prostate cancer. Correlation of DNA ploidy analysis with histological and clinical parameters. *Cancer Control* 6 (6), 587-591 (1999)

Nativ O, Winkler HZ, Raz Y, Therneau TM, Farrow GM, Myers RP, Zincke H, Lieber MM: Stage C prostate adenocarcinoma: nuclear DNA ploidy analysis. *Mayo Clin Proc* 64, 911-919 (1989)

Nguyen VQH, Grote HJ, Pomjanski N, Knops K, Böcking A: Interobserver reproducibility of DNA-image-cytometry in ASCUS or higher cervical cytology. *Cell Oncol* 26, 143-150 (2004)

Peters-Gee JM, Miles BJ, Cerny JC, Gaba AR, Jacobsen G, Crissman JD: Prognostic significance of DNA quantitation in stage D1 prostate carcinoma with the use of image analysis. *Cancer* 70, 1159-1165 (1992)

Pollack A, Troncoso P, Zagers GK: The significance of DNA ploidy and S phase fraction in node positive (stage D1) prostate cancer treated with androgen ablation. *Prostate* 31, 21-28 (1997)

Pollak Grignon DJ, Heydon KH, Hammond EH, Lawton CA, Mesic JB, FU KK; Porter AT, Abrams RA, Shipley WU: Prostate cancer DNA ploidy and response to salvage hormone therapy after radiotherapy with or without short-term total androgen blockade: an analysis of RTOG 8610. *J Clin Oncol* 21 (7), 1238-1248 (2003)

Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Herath JF, Lieber MM, Jenkins RB: Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55 (22), 5408-5414 (1995)

Ross JS, Figge H, Bui HX, del Rosario AD, Jenning TA, Rifkin MD, Fisher HAG: Prediction of pathologic stage and prostatectomy disease recurrence by DNA ploidy analysis of initial needle biopsy specimens of prostate cancer. *Cancer* 74 (10), 2811-1818 (1994)

Song J, Cheng WS, Cupps RE, Earle JD, Farrow GM, Lieber MM: Nuclear deoxyribonucleic acid content measured by static cytometry: important prognostic association for patients with clinically localized prostate carcinoma treated by external beam radiotherapy. *J Urol* 147, 794-797 (1992)

Taveres A, Costa J, de Carvalho A, Reis M: Tumor ploidy and prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 109, 676-679 (1973)

- Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Tenaglia R, Fiorentino B, Stefano PD, Amatetti C, Zizza A, Nicolai M, Jacobelli S: DNA and s phase fraction analysis by flow cytometry in prostate cancer. *Cancer* 71 (4), 1289-1296 (1993)
- Tribukait B: DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology. *Acta Oncol* 30, 187-192 (1991)
- Tribukait B: Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patient with prostate carcinomas: Clinical research and application. *Eur Urol* 23 (suppl 2), 64-76 (1993)
- Van Dekken H, Krijtenburg PJ, Alers JC: DNA in situ hybridization (interphase cytogenetics) versus comparative genomic hybridization (CGH) in human cancer: detection of numerical and structural chromosome aberrations. *Acta Histochem* 102 (1), 85-94 (2000)
- Verdorfer I, Hobisch A, Culig Z, Hittmair A, Bartsch G, Erdel M, Duba HC, Utermann G: Combined study of prostatic carcinoma by classical cytogenetic analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 19 (6), 1263-1270 (2001)
- Vesalainen S, Nordling S, Lippinen P, Talja M, Syrjänen K: Progression and survival in prostatic adenocarcinoma: a comparison of clinical stage, Gleason grade, S-phase fraction and DNA ploidy. *Br J Cancer* 70 (309-314) (1994)
- Wang N, Wilkin C, Böcking A, Tribukait B: Evaluation of tumor heterogeneity of prostate carcinoma by flow- and image DNA cytometry and histopathological grading. *Anal Cell Pathol* 20, 49-62 (2000)
- Warzynski MJ, Soechting CE, Maatman TJ: DNA heterogeneity determined by flow cytometry in prostatic adenocarcinoma - necessitating multiple site analysis. *Prostate* 27, 329-335 (1995)
- Winkler HZ, Rainwater LM, Myers RP, Farrow GM, Therneau TM, Zincke H, Lieber MM: Stage D<sub>1</sub> prostatic adenocarcinomas: Significance of nuclear DNA ploidy patterns by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 63, 103-112 (1988)
- Yalcinkaya S, Pomjanski N, Maraki D, Becker J, Böcking A: Interobserver reproducibility of diagnostic DNA-image-cytometry on oral brush biopsies. Zur Publikation eingereicht bei *Cancer Cytopathology* (2005)
- Zincke H, Bergstrahl EJ, Larson-Keffer JJ et al.: Stage D<sub>1</sub> prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. *Cancer* 70, 311-323 (1992)  
Karolinska University Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden

## Zusammenfassung der Diskussionen im Verlauf des Symposiums

Der kleine Teilnehmerkreis bestehend aus den referierenden Experten und einigen wenigen Gästen ließ trotz des angesichts der Bedeutung des Themas engen Zeitrahmens Zeit für Fragen sowie Diskussionen, die auch in den Symposiumspausen im kleineren Kreis lebhaft weitergeführt wurden. Abgesehen von Fragen zum Verständnis einiger speziellerer Inhalte der unterschiedlichen Referate wurden besonders eingehend folgende Themenbereiche (zum Teil kontrovers) diskutiert:

1. Die molekularbiologischen Grundlagen der DNA-Zytometrie auf dem Hintergrund der Ausführungen von Prof.Duesberg
2. Die Gewebeentnahmetechniken Prostatastanze versus Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB)
3. Prognostische und diagnostische Aussagekraft Gleason-Score versus Zytologie und DNA-Zytometrie
4. Konsensus-Papier zur Bedeutung der DNA-Zytometrie am Schluss des Symposiums

### **1.: Die molekularbiologischen Grundlagen der DNA-Zytometrie auf dem Hintergrund der Ausführungen von Prof.Duesberg**

Abgesehen von Fragen aus dem Zuhörerkreis und darauf fußenden weiteren Ausführungen von Prof.Duesberg zum Verständnis molekularbiologischer Grundlagen wurde von den pathologisch und klinisch tätigen Experten übereinstimmend festgestellt, dass die von Prof. Duesberg vorgetragenen, neueren Erkenntnisse der Molekularbiologie sehr gut mit den klinisch-praktischen Erfahrungen auf Grundlage der DNA-Zytometrie korrelieren. So sind die Ergebnisse dieser jüngsten Grundlagenforschung aus den USA eine wichtige theoretische Stütze für die Bedeutung der DNA-Zytometrie in der Krebsdiagnostik.

### **2: Die Gewebeentnahmetechniken Prostatastanze versus Feinnadelbiopsie**

Hier wurde besonders von den anwesenden urologischen Symposiumteilnehmern die Bedeutung der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) als eine wichtige und sehr nebenwirkungsarme Biopsiemethode bei der Erstdiagnostik und für Kontrolluntersuchungen betont, obwohl dadurch (da lediglich eine zytologische und zytometrische Bewertung von Malignomen möglich ist) eine Bewertung des Prostatakrebses mit dem Gleason-Score als histologisches Verfahren ausgeschlossen ist. Gerade die anwesenden Urologen schätzten die FNAB deshalb besonders hoch ein, da durch sorgfältiges Arbeiten

mit dieser Methode abgesehen von der niedrigeren Nebenwirkungsrate die Treffsicherheit bei der Tumorsuche höher sei als bei der Stanzentechnik. Allein der Pathologe Prof. Bonkhoff (siehe Referat Bonkhoff) teilte diese Meinung auch in der Diskussion nicht, besonders weil dadurch die Gleason-Score Bewertung ausgeschlossen ist, die seiner Meinung nach bei der Diagnostik und vor allem hinsichtlich prognostischer Aussagen höher zu bewerten sei.

### **3.: Prognostische und diagnostische Aussagekraft Gleason-Score versus Zytologie und DNA-Zytometrie**

Breiten Raum in der Diskussion nahm die Frage ein, wie die unterschiedlichen diagnostischen Verfahren zur Malignitätsgradierung des Prostatakrebses zu bewerten sind. Diese z.T. heftig und kontrovers diskutierte Frage zeigte durchgehend unterschiedliche Lager, das eine repräsentiert von Prof.Bonkhoff, der die histologische Gradierung der Tumormalignität mittels Gleason-Score als international angewandtes Verfahren hinsichtlich seiner prognostischen Aussagefähigkeit als ausreichend und hoch aussagefähig hielt, das andere Lager repräsentiert von praktisch allen anderen Experten, die besonders die DNA-Zytometrie wegen ihrer in diesem Zusammenhang von keiner anderen Methode derzeit erreichten diagnostischen und prognostischen Aussagefähigkeit im Kontext Prostatakrebs dem Gleason-Score überlegen sahen. Zwar wurde auch in diesem „Mehrheitslager“ die Bedeutung und die Möglichkeiten des Gleason-Scores bei der Graduierung von Prostatakarzinomen nicht bestritten, jedoch übereinstimmend festgestellt, dass besonders hinsichtlich Objektivierbarkeit und Validität bei der Diagnostik sowie zur Festlegung von therapeutischen Überlegungen (vor allem hinsichtlich der Methode „Wait and See“) die DNA-Zytometrie überlegene Vorteile besitzt, die unverzichtbare weitere Informationen liefert. Prof. Bonkhoff sah die Problematik bei der Malignitätsgraduierung durch den Gleason-Score vor allem in seiner mangelnden Reproduzierbarkeit durch verschiedene Untersucher, die durch bessere Qualifizierung von Pathologen verbessert werden könnte. Die DNA-Zytometrie stufte er als weit geringer aussagekräftig ein. Demgegenüber bekräftigten praktisch alle anderen Referenten jeweils aus ihrer eigenen Erfahrungsperspektive unisono die prognostische Aussagekraft der DNA-Zytometrie. Diese Diskussion nahm einen zeitlich breiten Raum ein, wobei nicht unbedingt neue, in den Referaten von den einzelnen Referenten noch nicht genannte Argumente ausgetauscht wurden. Ein Konsens in dieser Frage konnte nicht erzielt werden.

### **4.: Konsensus-Papier zur Bedeutung der DNA-Zytometrie am Schluss des Symposiums**

Gegen Ende der Veranstaltung wurde von Prof.Böcking ein Vorschlag zu einem Konsensus-Papier als Resultat der Veranstaltung eingebracht. Die in diesem Papier dargestellten 15 Punkte wurden ausführlich diskutiert und nur an wenigen Stellen etwas geändert. Leider musste Prof.Bonkhoff im Laufe der Diskussion das Symposium aus zeitlichen Gründen verlassen, sodass die Abstimmung darüber ohne seine Mitwirkung

im Anschluss an die Diskussion zur Abstimmung gestellt wurde. Das Papier wurde von den Anwesenden einstimmig angenommen.

## Konsensus Statements der Teilnehmer des GEK-Symposiums zum DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms am 12.05.2005 in Bremen

1. Alle Prostatakarzinome sind chromosomal aneuploid und zeigen in Abhängigkeit vom Ausmaß ihrer Malignität unterschiedliche Aneuploidiegrade.
2. Chromosomal Aneuploidie kann sich bereits in obligat präkanzerösen Vorstadien des Prostatakarzinoms (PIN) finden.
3. DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie.
4. Chromosomal – und DNA-Aneuploidie des Prostatakarzinoms können im Verlauf der Tumorprogression mit der Zeit fortschreiten. Dies ist dann als Ausdruck einer Tumorprogression zu verstehen.
5. Je fortgeschritten die chromosomal - bzw. DNA-Aneuploidie des Prostatakarzinoms ist, umso maligner ist der Tumor.
6. Eine diagnostische DNA-Zytometrie ist sowohl an Ausstrichen von Feinnadelaspirationsbiopsien der Prostata, als auch an Gewebe aus Stanzbiopsien und Resektaten möglich, letztere nur nach enzymatischer Zellvereinzelung. Tupf- oder Schabpräparate von nativen Stanzbiopsien eignen sich ebenfalls.
7. Eine diagnostische DNA-Zytometrie ist an Gewebsschnitten aus methodischen Gründen nicht statthaft, da es dadurch zu fehlerhaften Messungen kommen kann.
8. Zytometrisch sind beim Prostatakarzinom folgende vier (aneuploide) Grundmuster der DNA-Verteilung zu unterscheiden, denen eine unterschiedliche Prognose entspricht: peridiploid, peritetrapiloid, x-ploid, multiploid. Letztere beiden werden oft als „aneuploid“ zusammengefasst. Diese entsprechenden Malignitätsgraden 1 – 4 (ESACP-Consensus Reports, Haroske et al., 2001).
9. Das Muster der DNA-Verteilung (DNA-Ploidie) korreliert im Wesentlichen mit dem histologischen Malignitätsgrad nach Gleason, fügt ihm in der Regel aber prognostisch relevante Informationen hinzu.
10. Die diagnostische DNA-Bildzytometrie ist eine objektive und reproduzierbare Methode, die nach den Standards der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) durchgeführt werden muss (Böcking et al., 1995; Haroske et al., 1997; 2001; Giroud et al., 1997).

11. Dasselbe gilt für die DNA-Flusszytometrie, welche nach den fachgesellschaftlich vereinbarten Standards durchgeführt werden muss.
12. Prostatakarzinome mit rein peridiploider DNA-Verteilung und niedriger Proliferationsfraktion sind in der Regel innerhalb von zehn Jahren nicht progressiv und lebensbedrohlich.
13. Patienten mit Prostatakarzinomen sollten nur Therapieoptionen angeboten werden, für die in wissenschaftlichen Studien unter Berücksichtigung des histologischen und DNA-zytometrischen Malignitätsgrades belegt ist, dass sie gegenüber einem Verzicht auf Therapie lebensverlängernd, schmerzlindernd oder symptomatisch erleichternd wirken.
14. Bei rein peridiploiden Prostatakarzinomen mit niedriger Proliferationsfraktion in den Stadien T1 / T2 und einer mittleren Lebenserwartung von < = 20 Jahren ist ein kontrolliertes Abwarten als Therapieoption mit den Betroffenen zu diskutieren.
15. Bei einer hormonellen Therapie eines Prostatakarzinoms muss sicher gestellt sein, dass es sich nicht um einen Tumortyp handelt, der nach wissenschaftlicher Erkenntnis durch diese Behandlung einen Wachstumsvorteil erhält (z.B. mit peritetraploider DNA-Verteilung) und es damit zu einer Progredienz des Tumors und seines Malignitätsgrades kommt.

## Autorenverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

PD Dr.med. H.Al-Abadi, Campus Virchow-Klinikum, Charite, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin

Prof. Dr.med. B. Aeikens, Aeskulap-Klinik, Gersauer Str. 8,  
CH-6440 Brunnen/Schweiz

Prof. em. Dr.med.K.H. Bichler, ehem. Direktor der Urologischen Universitätsklinik Tübingen, Hoppe-Seylerstr.3, 72076 Tübingen

Prof. Dr.med. A. Böcking, Direktor des Instituts für Cytopathologie, Universitätsklinikum der HHU Düsseldorf , Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf

Prof. Dr.med. H. Bonkhoff, Praxis für Pathologie, Tietzenweg 129, 12203 Berlin

Prof. Dr. P. Duesberg Dept. Mol. and Cell Biol., Donner Laboratory, UC Berkeley, Berkeley, CA 94720

Dr.med. W.Samsel, Zentrum für Sozialpolitik der Universität Bremen c/o Lengstr.7, 27572 Bremerhaven

Prof. Dr. B.Tribukait, Em.Prof. und Chef des Instituts für Medizinische Radiobiologie, Karolinka Institutet; Co-Director, WHO Collaborating Center for Urologic Tumors, Karolinska University Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden

**In der GEK-Edition,**

**„Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse“**

**sind bisher erschienen:**

Bericht über die Belastungs- und Gesundheitssituation der Berufsgruppe ... (vergriffen)

- Nr. 1: *Werkzeugmechaniker (1994)*  
Nr. 2: *Edelmetallschmiede (1993)*  
Nr. 3: *Zahntechniker (1993)*  
Nr. 4: *Elektroniker und Monteure im Elektrobereich (1994)*  
Nr. 5: *Augenoptiker (1995)*  
Nr. 6: *Zerspanungsmechaniker (1996)*  
Nr. 7: *Industriemeister (1996)*  
Nr. 8: *Maschinenbautechniker (1996)*  
Nr. 9: *Techniker im Elektrofach (1996)*  
Nr. 10: *Industriemechaniker (1996)*

Band 1: *Müller, R. et al.: Auswirkungen von Krankengeld-Kürzungen. Materielle Bestrafung und soziale Diskriminierung chronisch erkrankter Erwerbstätiger. Ergebnisse einer Befragung von GKV-Mitgliedern. 1997*  
ISBN 3-930 784-02-5 Euro 9,90

Band 2: *Bitzer, E. M. et al.: Der Erfolg von Operationen aus Sicht der Patienten. – Eine retrospektive indikationsbezogene Patientenbefragung zum Outcome elektiver chirurgischer Leistungen in der stationären Versorgung – am Beispiel operativer Behandlungen von Krampfadern der unteren Extremitäten, von Nasenscheidewandverbiegungen sowie von arthroskopischen Meniskusbehandlungen. 1998*  
ISBN 3-980 6187-0-6 Euro 9,90

Band 3: *Grobe, T. G. et al.: GEK-Gesundheitsreport 1998.  
Auswertungen der GEK-Gesundheitsberichterstattung. 1998.*  
ISBN 3-537-44003 (vergriffen) Euro 7,90

*Gmünder ErsatzKasse GEK (Hrsg.): Bericht über die Belastungs- und Gesundheitssituation der Berufsgruppe ...*

*Ergebnisse von Beschäftigtenbefragungen,  
Analyse von Arbeitsunfähigkeitsdaten und Literaturrecherchen zu Zu-  
sammenhängen von Arbeitswelt und Erkrankungen.*

Band 4:	<i>Gesundheitsbericht 11 – Werkzeugmechaniker.</i> ISBN 3-537-44001	Euro 4,90
Band 5:	<i>Gesundheitsbericht 12 – Bürofachkräfte.</i> ISBN 3-537-44002	Euro 4,90
Band 6:	<i>Gesundheitsbericht 13 – Zerspanungsmechaniker.</i> ISBN 3-537-44006-5	Euro 4,90
Band 7:	<i>Gesundheitsbericht 14 – Industriemechaniker.</i> ISBN 3-537-44007-3	Euro 4,90
Band 8:	<i>Gesundheitsbericht 15 – Zahntechniker.</i> ISBN 3-537-44008-1	Euro 4,90
Band 9:	<i>Gesundheitsbericht 16 – Augenoptiker.</i> ISBN 3-537-44009-X	Euro 4,90
Band 10:	<i>Gesundheitsbericht 17 – Edelmetallschmiede.</i> ISBN 3-537-440010-3	Euro 4,90
Band 11:	<i>Gesundheitsbericht 18 – Elektroberufe.</i> ISBN 3-537-440011-1	Euro 4,90
Band 12:	<i>Grobe, T. G. et al.: GEK-Gesundheitsreport 1999. Auswertungen der GEK-Gesundheitsberichterstattung. Schwerpunkt: Arbeitslosigkeit und Gesundheit. 1999.</i> ISBN 3-537-44012-X	Euro 7,90
Band 13:	<i>Marstedt, G. et al.: Young is beautiful? Zukunftsperspektiven, Belastungen und Gesundheit im Jugendalter. Ergebnisbericht zu einer Studie über Belastungen und Probleme, Gesundheitsbeschwerden und Wertorientierungen 14-25jähriger GEK-Versicherter. 2000.</i> ISBN 3-537-44013-8	Euro 9,90
Band 14:	<i>Bitzer, E. M. et al.: Lebensqualität und Patientenzufriedenheit nach Leistenbruch- und Hüftgelenkoperationen. Eine retrospektive indikationsbezogene Patientenbefragung zum Outcome häufiger chirurgischer Eingriffe in der zweiten Lebenshälfte. 2000.</i> ISBN 3-537-44014-8	Euro 9,90

- Band 15: *Marstedt, G. et al. (Hrsg.): Jugend, Arbeit und Gesundheit. Dokumentation eines Workshops, veranstaltet vom Zentrum für Sozialpolitik (ZeS) der Universität Bremen und der Gmünder Ersatzkasse (GEK) am 20. Mai 1999 in Bremen.*  
*Mit einem Grafik- und Tabellen-Anhang „Materialien zur gesundheitlichen Lage Jugendlicher in Deutschland“. 2000.*  
ISBN 3-537-44015-4 (vergriffen)
- Band 16: *Große, T. G. et al.: GEK-Gesundheitsreport 2000. Auswertungen der GEK-Gesundheitsberichterstattung. Schwerpunkt: Erkrankungen des Rückens. 2000.*  
ISBN 3-537-44016-X (vergriffen)
- Band 17: *Braun, B.: Rationierung und Vertrauensverlust im Gesundheitswesen – Folgen eines fahrlässigen Umgangs mit budgetierten Mitteln. Ergebnisbericht einer Befragung von GEK-Versicherten. 2000.*  
ISBN 3-537-44017-4 Euro 9,90
- Band 18: *Große, T.G. et al.: GEK-Gesundheitsreport 2001. Auswertungen der GEK-Gesundheitsberichterstattung. Schwerpunkt: Psychische Störungen. 2001.*  
ISBN 3-537-44018-9 Euro 9,90
- Band 19: *Braun, B.: Die medizinische Versorgung des Diabetes mellitus Typ 2 – unter-, über- oder fehlversorgt? Befunde zur Versorgungsqualität einer chronischen Erkrankung aus Patientensicht. 2001.*  
ISBN 3-537-44019-7 Euro 9,90
- Band 20: *Glaeske, G.; Janhsen, K.: GEK-Arzneimittel-Report 2001. Auswertungsresultate der GEK-Arzneimitteldaten aus den Jahren 1999 - 2000. 2001.*  
ISBN 3-537-44020-0 Euro 9,90
- Band 21: *Braun, B., König, Chr., Georg, A.: Arbeit und Gesundheit der Berufsgruppe der Binnenschiffer.*  
ISBN 3-537-44021-9 Euro 9,90
- Band 22: *Große, T.G., Dörning, H., Schwartz, F.W.: GEK-Gesundheitsreport 2002. Schwerpunkt: "High Utilizer" – Potenziale für Disease Management. 2002.*  
ISBN 3-537-44022-7 Euro 9,90
- Band 23: *Glaeske, G., Janhsen, K.: GEK-Arzneimittel-Report 2002. Auswertungsergebnisse der GEK-Arzneimitteldaten aus den Jahren 2000 bis 2001.*

	2002.	
	ISBN 3-537-44023-5	Euro 9,90
Band 24:	<i>Grobe, T.G., Dörning, H., Schwartz, F.W.: GEK-Gesundheitsreport 2003. Schwerpunkt: Charakterisierung von Hochnutzern im Gesundheitssystem – präventive Potenziale? 2003.</i>	
	ISBN 3-537-44024-3	Euro 9,90
Band 25:	<i>Glaeske, G., Janhsen, K.: GEK-Arzneimittel-Report 2003. Auswertungsergebnisse der GEK-Arzneimitteldaten aus den Jahren 2001 bis 2002. 2003.</i>	
	ISBN 3-537-44025-1	Euro 9,90
Band 26:	<i>Braun, B., Müller, R.: Auswirkungen von Vergütungsformen auf die Qualität der stationären Versorgung. Ergebnisse einer Längsschnittanalyse von GKV-Routinedaten und einer Patientenbefragung. 2003</i>	
	ISBN 3-537-44026-X	Euro 9,90
Band 27:	<i>Schmidt, Th., Schwartz, F.W. und andere: Die GEK-Nasendusche. Forschungsergebnisse zu ihrer physiologischen Wirkung und zur gesundheitsökonomischen Bewertung. 2003</i>	
	ISBN 3-537-44027-8	Euro 7,90
Band 28:	<i>Jahn, I. (Hg.): wechseljahre multidisziplinär. was wollen Frauen – was brauchen Frauen. 2004</i>	
	ISBN 3-537-44028-6	Euro 9,90
Band 29:	<i>Glaeske, G., Janhsen, K.: GEK-Arzneimittel-Report 2004. Auswertungsergebnisse der GEK-Arzneimitteldaten aus den Jahren 2002 bis 2003. 2004.</i>	
	ISBN 3-537-44029-4	Euro 9,90
Band 30:	<i>Grobe, T.G., Dörning, H., Schwartz, F.W.: GEK-Gesundheitsreport 2004. Schwerpunkt: Gesundheitsstörungen durch Alkohol. 2004.</i>	
	ISBN 3-537-44030-8	Euro 9,90
Band 31:	<i>Scharnetzky, E., Deitermann, B., Michel, C., Glaeske, G.: GEK-Heil- und Hilfsmittel-Report 2004. Auswertungsergebnisse der GEK-Heil- und Hilfsmitteldaten aus dem Jahre 2003. 2004.</i>	
	ISBN 3-537-44031-6	Euro 9,90
Band 32:	<i>Braun, B., Müller, R., Timm, A.: Gesundheitliche Belastungen, Arbeitsbedingungen und Erwerbsbiographien von Pflegekräften im Krankenhaus. Eine Untersuchung vor dem Hintergrund der DRG-Einführung.</i>	

	2004.	
	ISBN 3-537-44032-4	Euro 9,90
Band 33:	<i>Glaeske, Gerd et al.: Memorandum zu Nutzen und Notwendigkeit Pharmakoepidemiologischer Datenbanken in Deutschland. 2004</i>	
	ISBN 3-537-44033-2	Euro 7,90
Band 34:	<i>Braun, B., Müller, R.: Belastungs- und Gesundheitssituation der Berufsgruppe Zahntechniker. 2005</i>	
	ISBN 3-537-44034-0	Euro 9,90
Band 35:	<i>Braun, B., Müller, R.: Belastungs- und Gesundheitssituation der Berufsgruppe Bürofachkräfte. 2005</i>	
	ISBN 3-537-44035-9	Euro 9,90
Band 36:	<i>Glaeske, G., Janhsen, K.: GEK-Arzneimittel-Report 2005. Auswertungsergebnisse der GEK-Arzneimitteldaten aus den Jahren 2003 bis 2004. 2005.</i>	
	ISBN 3-537-44036-7	Euro 14,90
Band 37:	<i>Bitzer, E.M., Grobe, T.G., Dörning, H., Schwartz, F.W.: GEK-Report akut-stationäre Versorgung 2005.</i>	
	ISBN 3-537-44037-5	Euro 9,90
Band 38:	<i>Scharnetzky, E., Deitermann, B., Hoffmann, F., Glaeske, G.: GEK-Heil- und Hilfsmittel-Report 2005. Auswertungsergebnisse der GEK-Heil- und Hilfsmitteldaten aus den Jahren 2003/2004. 2005</i>	
	ISBN 3-537-44038-3	Euro 14,90
Band 39:	<i>Samsel, W., Marstedt G., Möller H., Müller R.: Musiker-Gesundheit. Ergebnisse einer Befragung junger Musiker über Berufsperspektiven, Belastungen und Gesundheit. 2005</i>	
	ISBN 3-537-44039-1	Euro 9,90
Band 40:	<i>Grobe, T.G., Dörning, H., Schwartz, F.W.: GEK-Gesundheitsreport 2005. 2005</i>	
	ISBN 3-537-44040-5	Euro 9,90

