

## Klinische Bedeutung der Zytologie und DNS-Zytometrie in der Therapie des Prostatakarzinoms\* Clinical relevance of cytology and DNA-cytometry in the therapy of patients with prostatic carcinoma

H. AL-ABADI, R. NAGEL

Urologische Klinik und Poliklinik, Klinikum Rudolf Virchow, Freie Universität Berlin

### 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 12 Jahre.

Von den 271 Patienten haben 198 Patienten (73,7%) einen T3 N0 M0-Tumor, während bei 73 Patienten (26,3%) ein Stadium T3/T4 N+ M1 vorlag. 11,8% der Patienten wiesen den zytologischen Malignitätsgrade 1, 64,3% der Patienten den Malignitätsgrad 2 auf und 23,8% der Patienten hatten den Grad-3-Karzinom. Die Einzelzell-DNS-Zytophotometrie ergab bei den höheren Malignitätsgraden 2 und 3 eine Aneuploidie-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 12 Jahren keine Metastasierung und keine lokale Tumörprogression, während Patienten mit aneuploiden Tumorzellkernen eine Metastasierung und eine lokale Tumörprogression 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 Tumorleiden.

### Summary

Single-cell DNA cytophotometry was employed to analyze the tumors of 271 patients with locally advanced prostatic carcinoma as to DNA ploidy and heterogeneity and the distribution of the phases of the cell cycle before and during therapy, with the intention of establishing prognostic factors apart from those already known (stage, grade). Follow-up periods ranged from 1 to 12 years.

198 (73%) of the 271 patients had carcinoma stage T3 N0 M0, and 73 (27%) of them had carcinoma stage T3/T4 N+ M1. The tumors were evaluated cytologically to establish the grades of malignancy. 11.8% were grade-1-carcinomas, 64.3% were grade-2 and 23.8% were grade-3-carcinomas. Single-cell DNA cytophotometry demonstrated aneuploidy rates of up to 73% and diploidy rates of up to 23.8% for the higher grades of malignancy, whereas the diploidy rate established for grade-1-carcinoma was 71% and the respective aneuploidy rate was 15.2%. These differences are significant ( $p < 0.001$ ).

There was a significant correlation between the results of DNA cytophotometry and the clinical course of the disease. Patients with diploid tumor-cell nuclei developed no metastases and no local tumor progression during the follow-up period of 12 years, whereas patients with aneuploid tumor-cell nuclei showed metastases and no local tumor progression within 8-22 months, despite changes in therapy. These patients died of carcinoma after an average of 21 months following primary diagnosis.

\* Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. med. H.-A. MÜLLER gewidmet.

## 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 einem detailliertem morphologischem Grading die Bestimmung von Hormonrezeptoren, histochemischen und immunologischen sowie molekulargenetischen Untersuchungen zusätzliche Malignitätskriterien außer der Histomorphologie etabliert werden. Die Ploidie und Proliferationsaktivität 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 eine Tumorzellpopulation im Sinne der Aneuploidie (12). Die DNS-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, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 25).

In einer experimentellen Studie in der Zeit von 1980 bis 1992 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 Prostatakarzinoms vor und während der Therapie.

## Patientengut und Methodik

Von Januar 1980 bis Dezember 1992 wurden bei 271 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom Untersuchungen mit der Einzelzell-DNS-Absorptionszytometrie durchge-

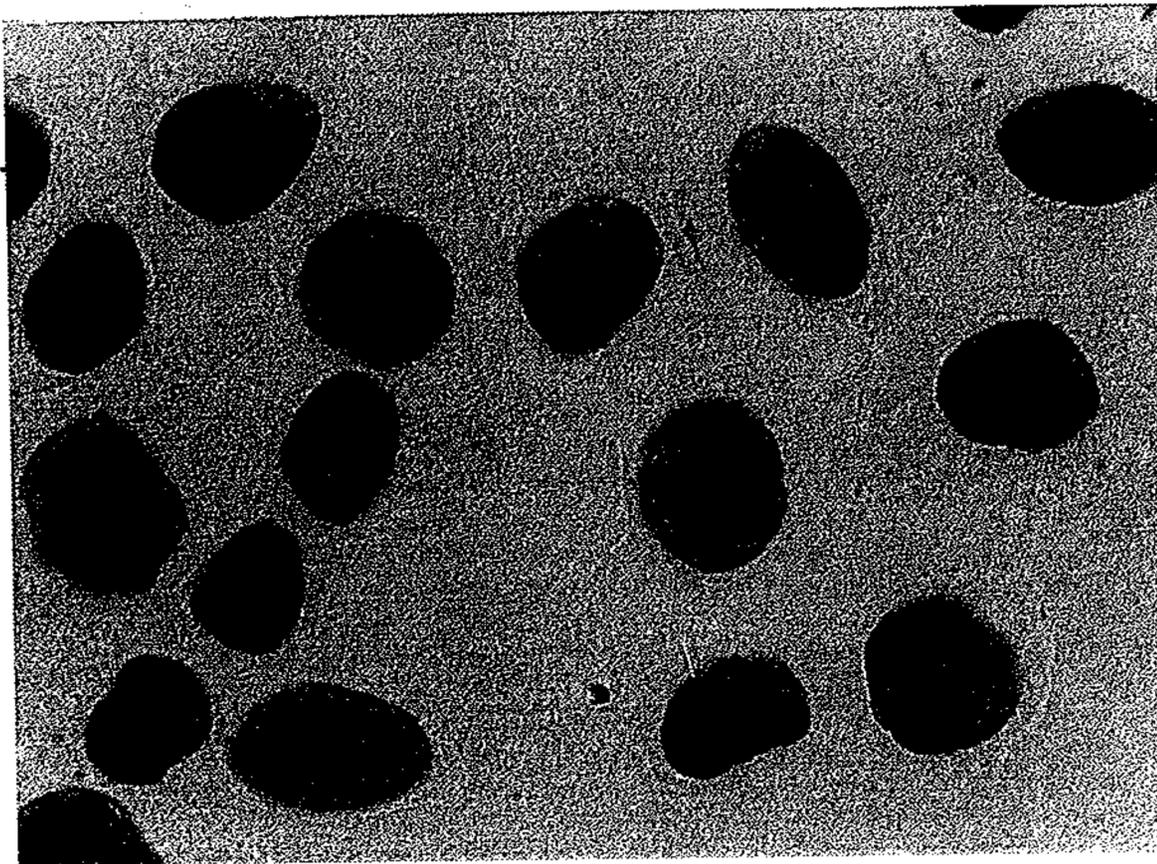


Abb. 1: Feulgensche Nuklearreaktion: Isoliert liegend, gut kontrastierte Zellkerne ohne Überlagerung und Artefakte (100 × Obj.)

führt und der klinischen Verlaufsbeobachtung über Jahre (42-88 Jahre) durch Feinnadelaspiration gefärbt und von der Empfehlung (17). Nach Bestimmung anschließend mit 300 Tumorzellen Einzelzellabsorption wurden zusätzlich mit der Hilfenahme des DNS-Konsens der DNA polyploid, wenn entsprechend der euploiden und per ca. 300 Zellkerne. Der DNS-Gehalt mit «n» angegeben entsteht das Hist

## Statistische Auswertung

Für die 3 Maligkeitsuntersuchung wurde ein statistischer Test statistisch getestete Limit-Methode, und des Long-rank-T-

## Ergebnisse

### Tumorstadium

Die Stadieneinteilung des TNM-System eingeteilt Stadium T3 No (Tab. 1). Im gesamten Patientengut mit 11,8% (Tab.

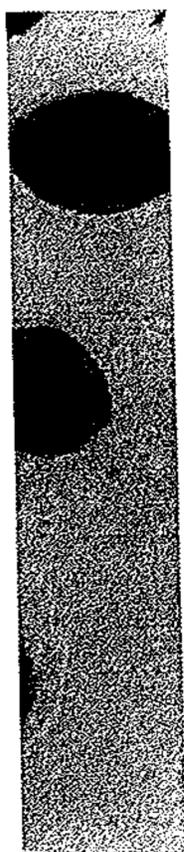
Tabelle 1: Häufigkeit bei 271 Patienten mit

det heute noch  
erogener Tumor  
klinischen Ver-  
laß neben einem  
toren, histoche-  
gen zusätzliche  
e Ploidie und  
n Faktoren dar-

Gewebe ist ein  
NS-Heterogeni-  
n letzten Jahren  
roßes klinisches

urch Feinnadel-  
rigen prognosti-  
ie untersuchten  
ät des Prostata-

ortgeschrittenem  
metrie durchge-



ohne Überlagerung

führt und der klinische Verlauf der entsprechenden Patienten dokumentiert. Der Zeitraum der Verlaufsbeobachtung betrug 1–13 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 (17). Nach Bestimmung des Malignitätsgrades wurden die Tumorkomplexe markiert und anschließend mit der Feulgenschen Kernfärbung umgefärbt (Abb. 1). Gemessen wurden etwa 300 Tumorzellkerne, gelegentlich auch mehr. Der DNS-Gehalt dieser Kerne wurde mittels Einzelzellabsorptionszytometrie ermittelt. Die gemessenen Werte der jeweiligen Totalex-tinktion wurden zusammen mit Mittelwertstandard, Abweichungsvarianz und Variationskoeffizient mit der Hilfe der statistischen Analyse ausgerechnet. Entsprechend dem internationalen Konsens der DNS-Zytometrie bezeichnen wir den Zellkern-DNS-Gehalt als euploid oder polyploid, wenn er im Bereich des Mittelwertes der diploiden Eichpopulation  $\pm 25\%$  liegt. Entsprechend dem Variationskoeffizienten der Eichpopulation werden 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 «AU» (arbitrary units), die Zahl der gemessenen Tumorzellkerne mit «n» angegeben (durch Eintragung der gewonnenen Werte auf der Abszisse und Ordinate entsteht das Histogramm).

### 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 (15, 18, 20).

### Ergebnisse

#### *Tumorstadium und Häufigkeit der Malignitätsgrade*

Die Stadieneinteilung wurde entsprechend der Empfehlung der UICC nach dem TNM-System eingeteilt (24). Bei der Diagnosestellung befanden sich 198 (73%) der Patienten im Stadium T3 No Mo, 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 Malignitätsgrade 1 mit 11,8% (Tab. 1, Abb. 2, 3 u. 4).

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

| Stadium          | n   | %    |
|------------------|-----|------|
| T3 NO MO         | 198 | 73   |
| T3/4 Nx M1       | 73  | 27   |
| Malignitätsgrade |     |      |
| 1                | 32  | 11,8 |
| 2                | 174 | 64,3 |
| 3                | 65  | 23,9 |

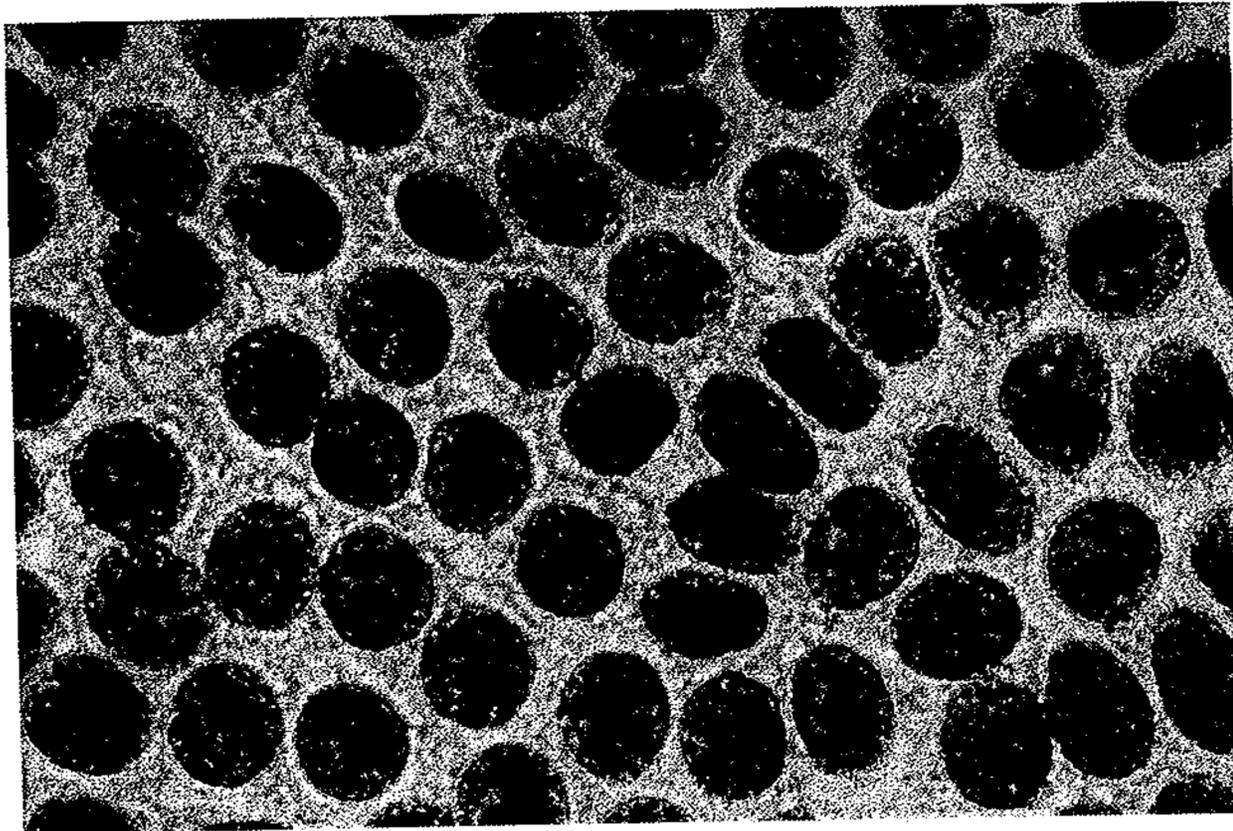


Abb. 2: Zytologisches Ausstrichpräparat: Leichte Kernpolymorphie, prominente, z.T. entrundete Nukleolen, intakte Zellgrenzen Grad 1 (Score 10), (Papanicolaou, 100 × Obj.)

#### *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 3% 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.

#### *Zytomorphologische Veränderungen 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, 14). 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 Orchiektomie, 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).

Abb. 3: Zytologische, entrundete (Score 14), (Papanicolaou, 100 × Obj.)



, z.T. entrundete

eutlich von dem  
3-Karzinom aber

ler Zytologie und  
opsien über eine  
Therapieversagen  
n Patienten nicht

er Stanzbiopsie –  
eim lokal fortge-

wir an über 900  
n haben (1, 14).  
kung am Tumor  
n eindeutig gesi-  
iH-Analoga oder  
1 6 Monate nach  
1, während nach  
zuverlässig beur-

Nukleolen: Kern-  
Kernchromatin.

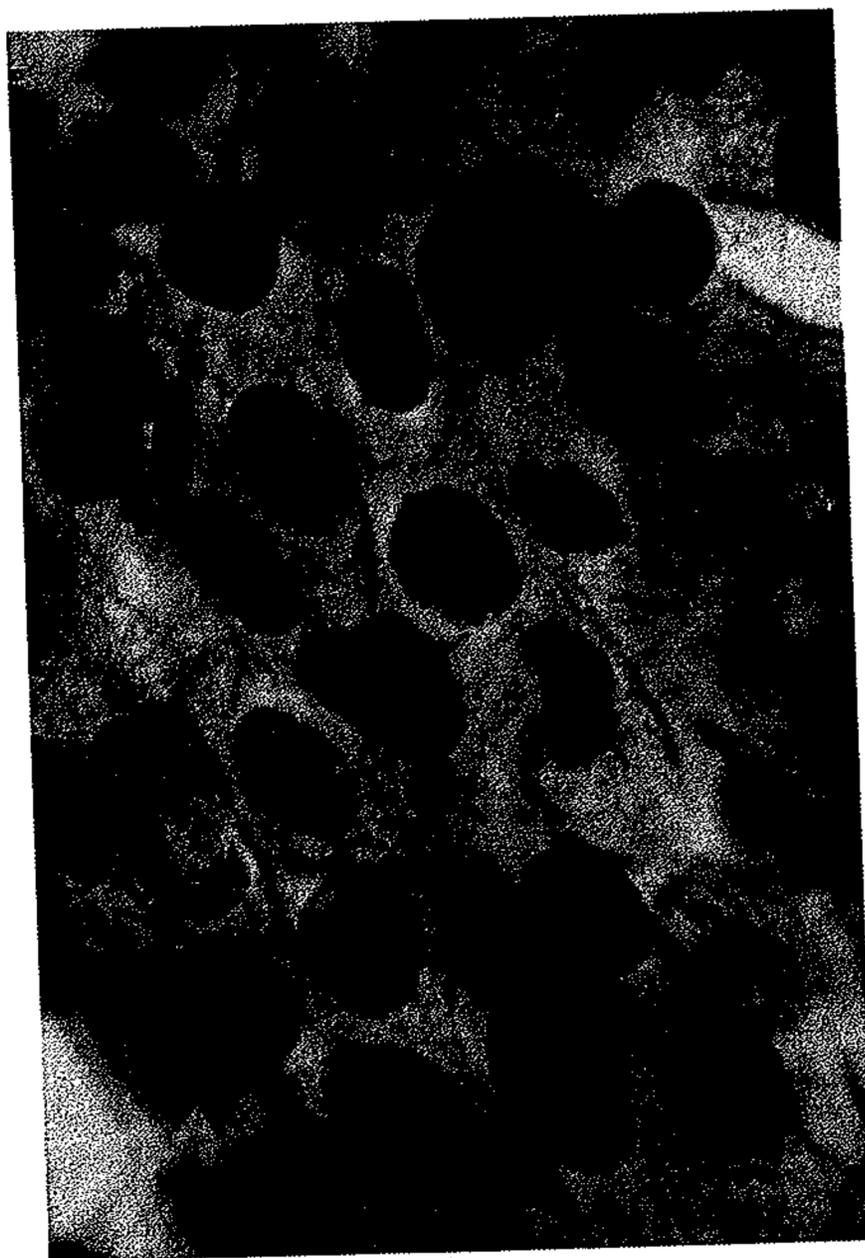


Abb. 3: Zytologisches Ausstrichpräparat: Mäßige Polymorphie und Hyperchromasie der Kerne, prominente, entrundete Nukleolen, herdförmig mehrere Nukleolen/Zellkern, gestörte Kernordnung. Grad 2 (Score 14), (Papanicolaou, 100 × Obj.)

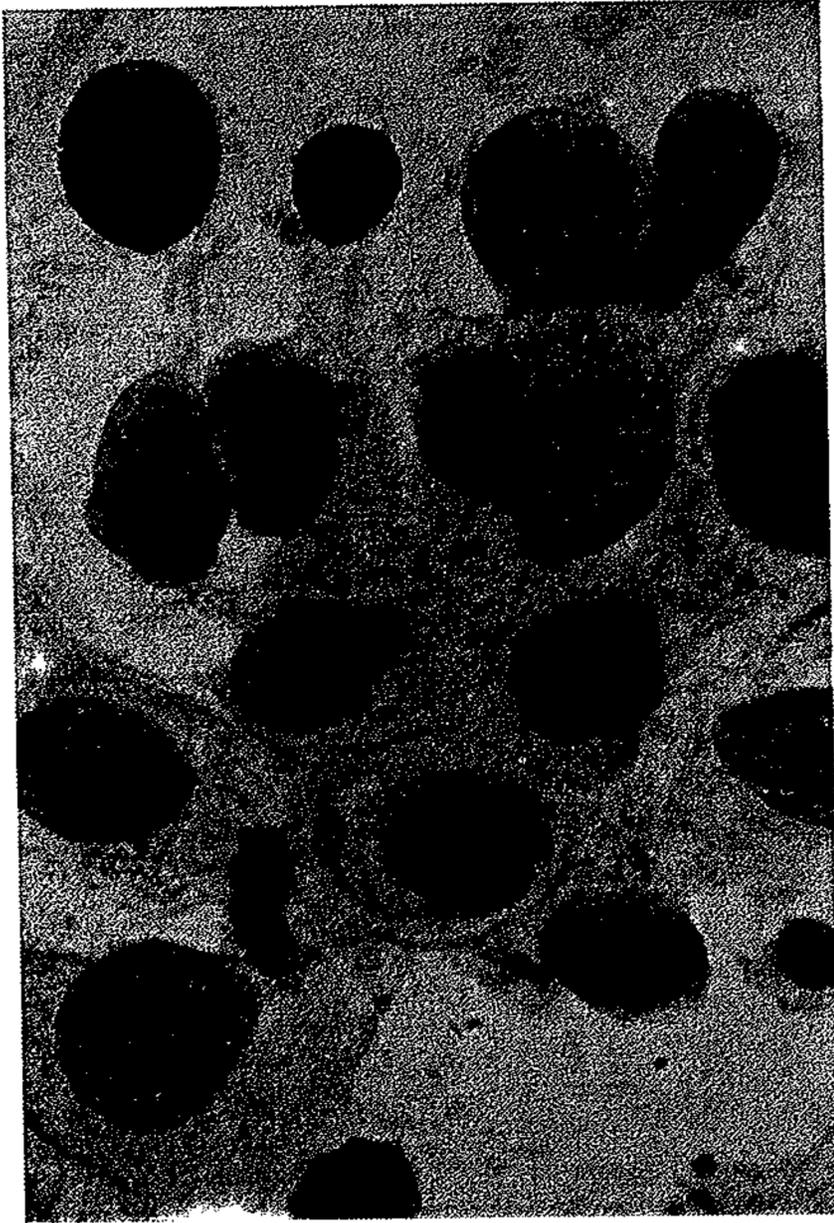


Abb. 4: Zytologisches Ausstrichpräparat: Deutliche Polymorphie und Hyperchromasie der Kerne, polymorphe Nukleolen, starke Kerndissoziation. Grad 3 (Score 17), (Papanicolaou, 100 × Obj.)

Abb. 2a: Zytologische Veränderung des Kern- (Papanicolaou, 100 × Obj.)

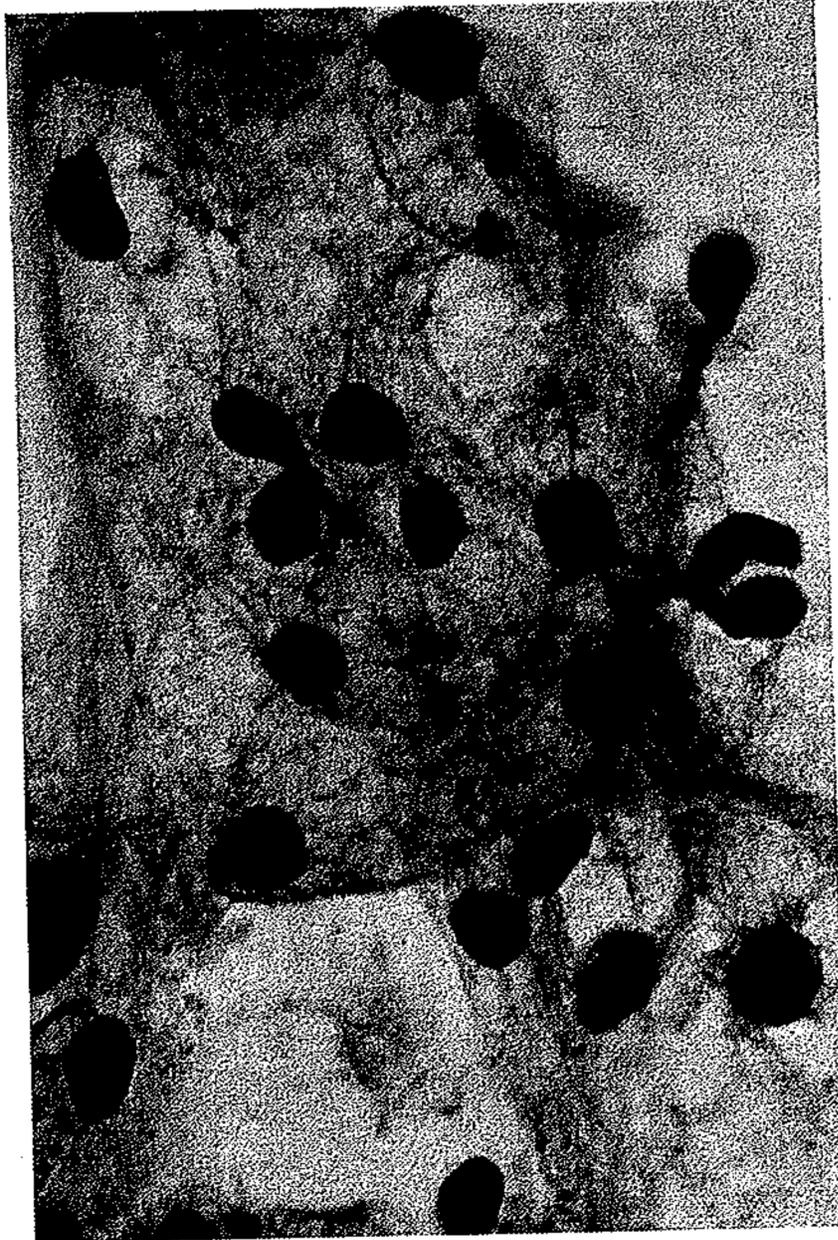


Abb. 2a: Zytologisches Ausstrichpräparat des gleichen Patienten (vgl. Abb. 2): Starke degenerative Veränderung des Kern- und Zellzytoplasmas mit Kernpyknosen, Regressionsgrad II, guter Therapieeffekt (Papanicolaou, 100 × Obj.)



Abb. 3a: Zytologisches Ausstrichpräparat des gleichen Patienten (vgl. Abb. 3): Neben Kernpyknosen und Zytoplasmadegeneration finden sich einige große hyperchromatische Zellkerne, Regressionsgrad VI, mäßiger Therapieeffekt (Papanicolaou, 100 × Obj.)

Abb. 4a: Zytologie, Polymorphie nicolaou, 100 × C

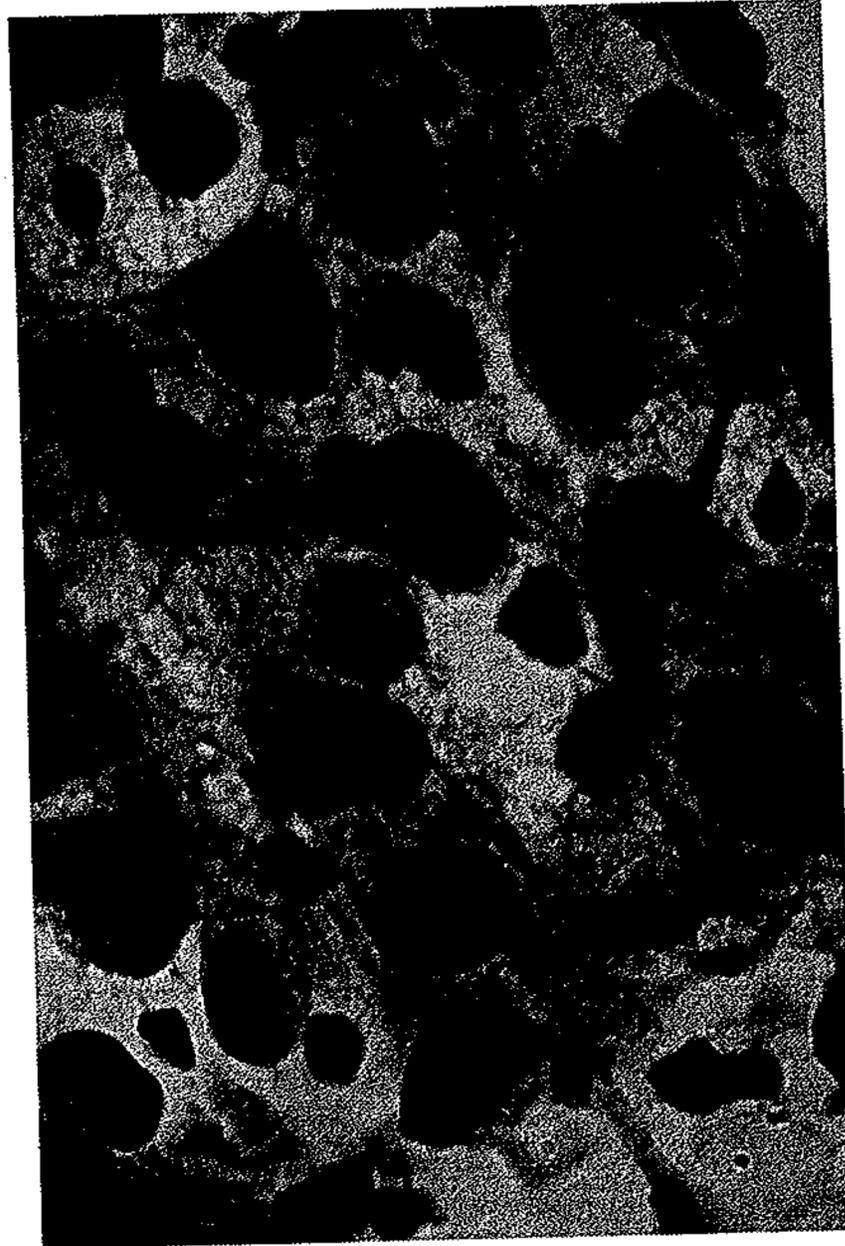


Abb. 4a: Zytologisches Ausstrichpräparat des gleichen Patienten (vgl. Abb. 4): Weiterhin Hyperchromasie, Polymorphie und zahlreiche Tumorzellmitosen, Regressionsgrad X, fehlender Therapieeffekt (Papanicolaou, 100 × Obj.)

Die zytologischen Kriterien der Regression korrespondieren mit denen der Histologie bei Beurteilung einer Stanzbiopsie und entsprechen der Klassifikation der Deutschen Uropathologischen Arbeitsgruppe «Prostatakarzinom» (1, 17, 19, 21).

#### *DNS-Ploidie versus Malignitätsgrad*

Der Ploidiegrad des Prostatakarzinoms erreichte DNS-Werte von 2c (diploid) bis zu 19c. Die häufigsten Ploidiewerte 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 zeigten eine sehr heterogene DNS-Verteilung, obwohl die Karzinome eine einheitliche zytomorphologische Differenzierung aufwiesen.

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ließen sich DNS-Meßwerte in 23,8% 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 Ploide, während 24,8% einen polyploiden und 71% einen aneuploiden DNS-Gehalt aufwiesen und mehr als 2 DNS-Stammlinien und Streuung der Ploidiewerte bis zu 19c.

Tabelle 2: Korrelation von Malignitätsgrad und DNS-Gehalt der Tumorzellkerne bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

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

#### *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).

Tabelle 3: Korrelation von klinischen Stadien und DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

| Stadium<br>(n)    | diploid<br>% | polyploid<br>% | aneuploid<br>% |
|-------------------|--------------|----------------|----------------|
| T3 N0 M0<br>(198) | 38           | 9              | 53             |
| T4 N+ M1<br>(73)  | 22           | 11             | 67             |

#### *Veränderungen der DNS-Ploidie unter der Therapie*

Während die Pathohistologie und Zytomorphologie eher ein morphologisch qualitatives Bild über den Therapieeffekt gibt, erlaubt die DNS-Zytophotometrie durch detaillierte Ana-

lyse des Zellke  
d. h. des Malig  
allen bisher bek  
tielle Analysen  
bei verschiedenen  
DNS-Gehalt d  
unterscheidet, c  
noms erfolgreic  
grades von der  
Aneuploidie da  
vorausgesagt w  
Histogramm de

Fall 1: 63jäh:  
Abb. 2 und 2a):  
Bereich mit We  
6 Monate na  
signifikanten G  
nachzuweisen v  
dem klinischen  
sion (Abb. 5).

Abb. 5: Fall 1: I

Histologie bei  
den Uropatho-

id) bis zu 19c.  
10c- und 12c-  
urden mit 71%  
oiden (4c) und

erogene DNS-  
enzierung auf-

ien (2c), 25,2%  
(3c, 5c) Bereich  
e Verteilung in  
einen aneuploi-  
ng der Ploidie-

71 Patienten mit

analyse 38% der  
% im aneuploi-  
dium T4 wurde  
1 Bereich ermit-

Prostatakarzinom

isch qualitatives  
detaillierte Ana-

lyse 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 Fall 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.

**Fall 1: 63jähriger Patient im Stadium T3 Mo, zytologischer Malignitätsgrad 1 (Score 10) Abb. 2 und 2a):** Vor der Therapie zeigte das Histogramm einen breiten 2gipfligen 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 1/2 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).

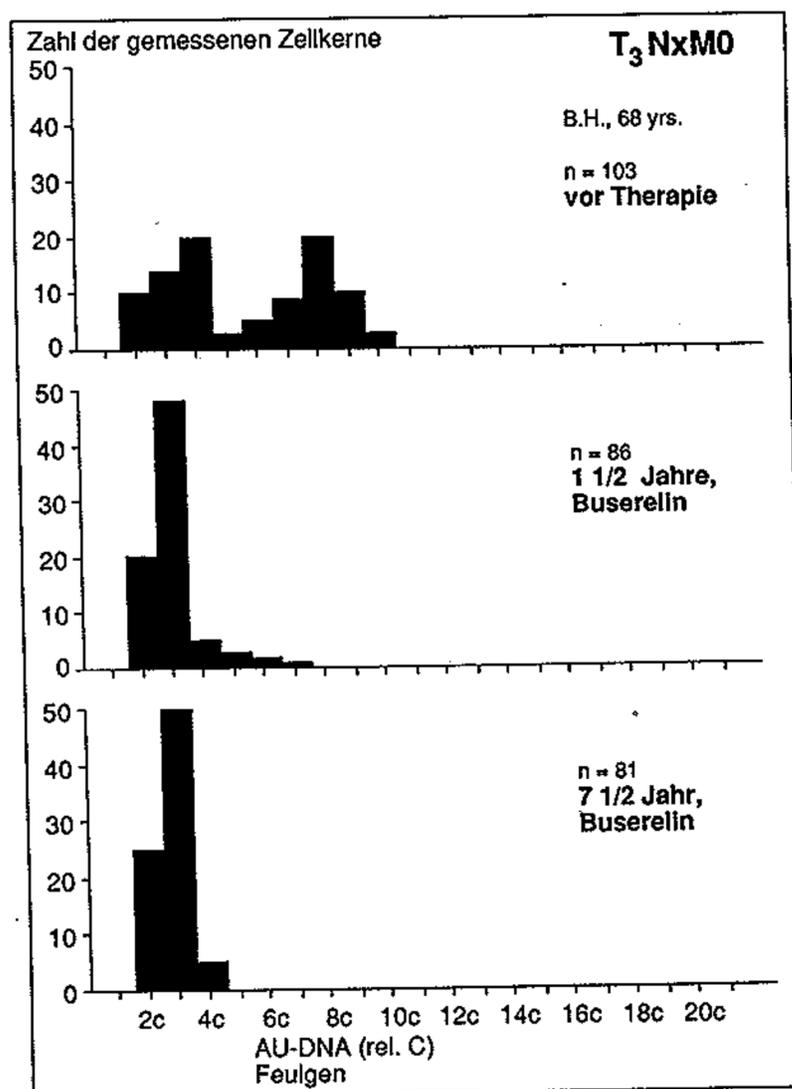


Abb. 5: Fall 1: DNS-Histogramme vor und während der Therapie

Fall 2: 70jähriger Patient mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom T3, zyto- und histologischer 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 1/2 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 1/2 Jahren weiterhin ohne Nachweis von Metastasen (Abb. 6).

Fall 3: 43jähriger 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 von 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 Estracyttherapie 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

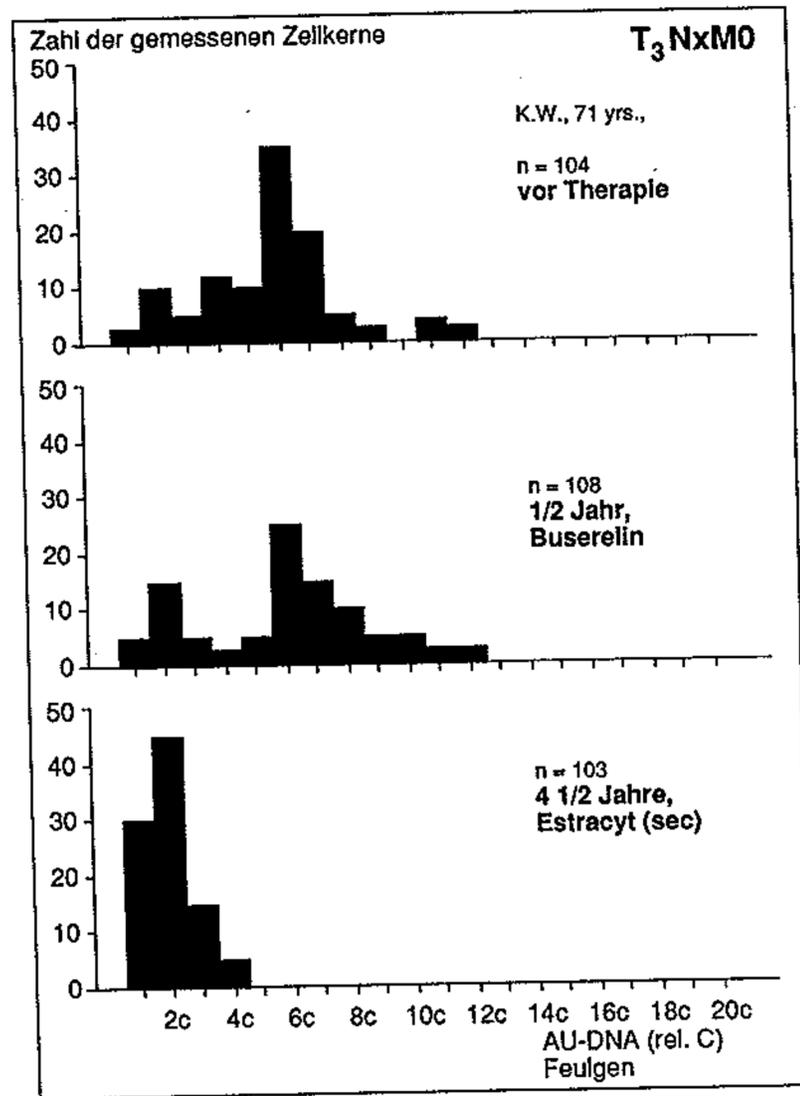


Abb. 6: Fall 2: DNS-Histogramme vor und während der Therapie

Abb. 7: Fall 3: D

klinisch mit einer  
auf Zyklophosphorid  
Hemmung der  
Wochen nach d

*Prognostische*

In der Beobachtungsperiode  
keitsgipfel im d  
gradienten nachg  
Von 141 Pat  
ploiden DNS-  
und verstarben  
Patienten trat r  
stasierung auf.  
leiden. Aus der  
periode 3 Patie

Von den 63  
hatten 33 Pat  
ihrem Tumorl  
Patienten aus

to- und histo-  
apie ein breiter  
nach Therapie  
er 12c. Da sich  
eßen, haben wir  
Estracyt-Thera-  
zeitgipfel im 2-  
Nachweis von

r und zytologi-  
r eine primäre  
Estracyt-Thera-  
sowie im 13c-  
icht nachzuwei-  
igkeitgipfel im  
lungsmuster als  
der Patient auf  
rwies sich der  
n Estracyt resi-  
korrespondiert

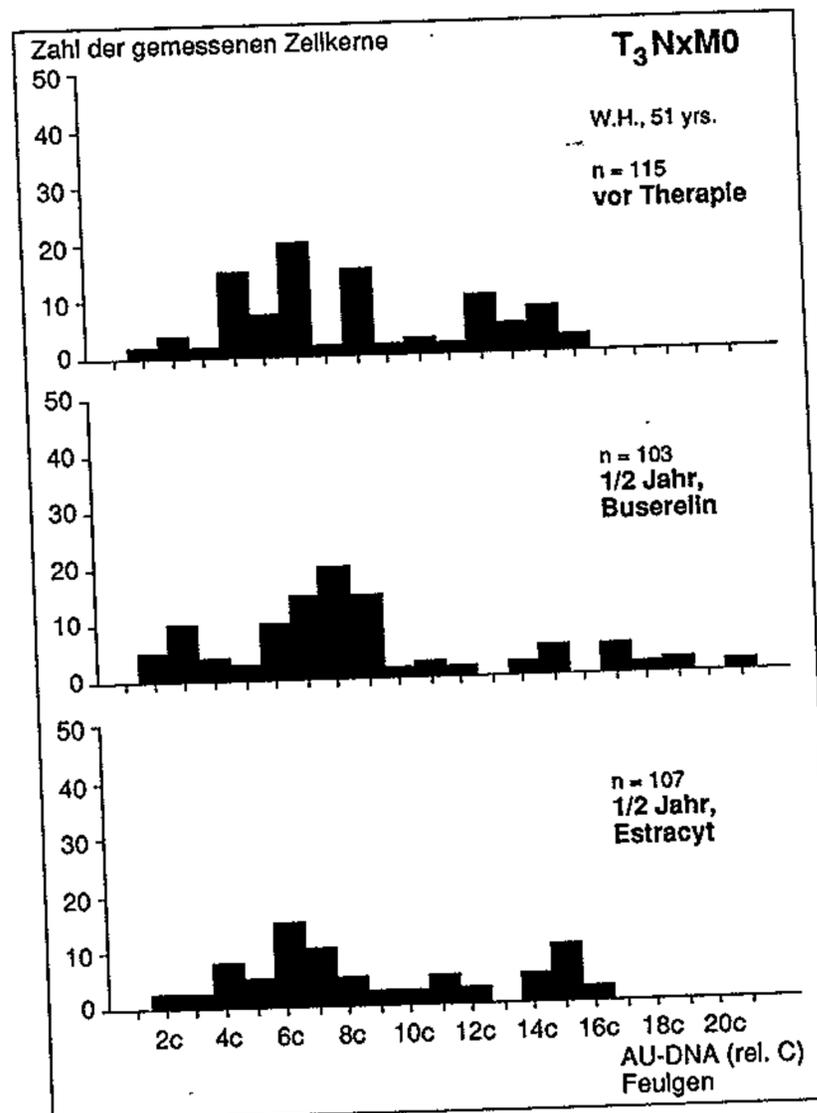


Abb. 7: Fall 3: DNS-Histogramme vor und während der Therapie

klinisch mit einem nachweisbaren Tumoreinbruch in der Blase, deshalb wurde die Therapie auf Cyclophosphamid als tertiäre 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.

#### *Prognostische Relevanz der DNS-Ploidie*

In der Beobachtungszeit bis zu 12 Jahren konnte bei 67 Patienten (24%) mit einem Häufigkeitsgipfel im diploiden DNS-Bereich (2c) keine Metastasierung und keine lokale Tumorgredienz nachgewiesen werden.

Von 141 Patienten (52%) mit zwei oder mehreren DNS-Stammlinien bzw. breiten aneuploiden DNS-Verteilung hatten 65 Patienten bereits bei der Diagnosestellung Fernmetastasen und verstarben innerhalb der ersten 22 Monate an dem Tumorleiden. Von den übrigen 76 Patienten trat nach 8 bis 36 Monaten nach Diagnosestellung bei 73 Patienten eine Skelettmetastasierung auf. Von diesen 73 Patienten starben 67 in der Beobachtungszeit an ihrem Tumorleiden. Aus der aneuploiden Gruppe mit 141 Patienten sind bis zu 4 Jahre der Beobachtungsperiode 3 Patienten klinisch in einem stabilen Zustand.

Von den 63 Patienten in der Gruppe der polyploiden, nahen diploiden DNS-Verteilung hatten 33 Patienten eine Fernmetastasierung und verstarben trotz Therapieumstellung an ihrem Tumorleiden, weiterhin verstarben 6 Patienten an einem Herz-Kreislaufversagen. 24 Patienten aus dieser Gruppe sind klinisch stabil (Tab. 4, 5, Abb. 8).

Tabelle 4: Klinischer Verlauf versus DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

|           | DNS-Ploidie |      | M1  |      | stabil |      | gestorben |      |
|-----------|-------------|------|-----|------|--------|------|-----------|------|
|           | 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) |

\* Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Tabelle 5: Überlebensrate versus DNS-Ploidie bei 271 Patienten mit Prostatakarzinom

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

entsprechend KAPLAN-MEYER  $p > 0,001$

Tabelle 6: Zellproliferation - Anteile der Aneuploidie - versus pathohistologischem Malignitätsgrad (n=271)

| Grad | (n) | Aneuploidie (%) |
|------|-----|-----------------|
| 1    | 32  | 8-15            |
| 2    | 174 | 51-68           |
| 3    | 65  | 73              |

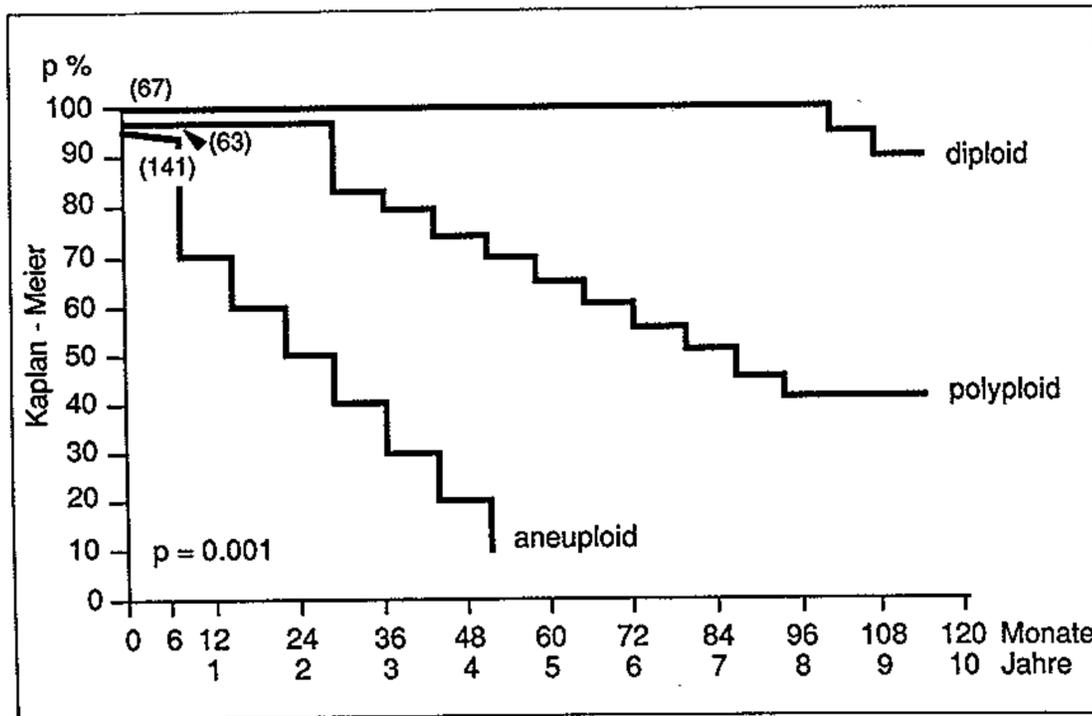


Abb. 8: Überlebenszeiten in Korrelation zur DNS-Ploidie bei Patienten mit Prostatakarzinom; n = 271

### Malignitätsgr

Durch Zellzy G0/G1-Phase, i geht, zeigt sich rend bei den G1 einem hohen a klinisch progrec und einer niedri



Abb. 9: Korrelatio

### Diskussion

Die vorliegen Wachstumsverha gen bisher vorlie Zytometrie als berichten über l Studie fanden w 71% bei schlech Mit Hilfe der den, da nur diese photometrie ist photometrische Vorteil gegenüb bestimmen und kann für Nachu Bei der Durc schmalen, am St mung zugeführt hohe Meßgesch zur Morphologi geht in die Häu

n

|           |      |
|-----------|------|
| gestorben |      |
| n         | (%)  |
| 21*       | (31) |
| 33        | (52) |
| 137       | (97) |

*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 6 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 progredient und starben früher als Patienten mit einem geringen aneuploiden Anteil und einer niedrigen Proliferationstendenz (S, G2, M < 8%), (Tab. 5, Abb. 9).

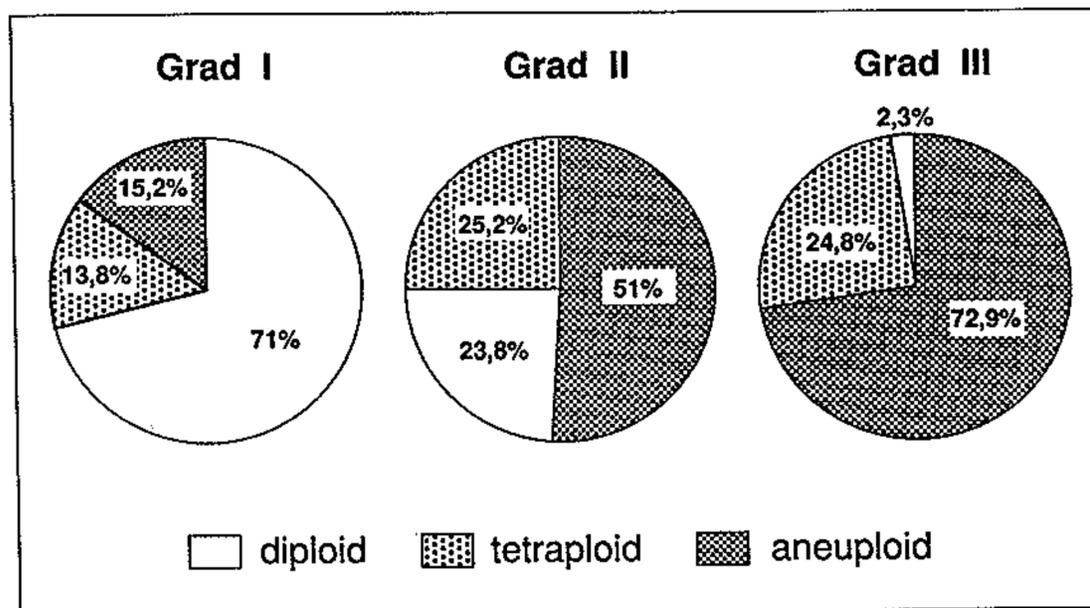


Abb. 9: Korrelation von DNS-Ploidie und Malignitätsgrad

**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 Einzelzell-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, 12, 14, 19).

Mit Hilfe der Einzelzellzytometrie können exakte DNS-Analysen durchgeführt werden, da nur diese Methode eine zuvor visuell diagnostizierte Tumorzelle mißt. Die Einzelzell-photometrie 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, 19, 21, 22).

Bei der Durchflußphotometrie 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 gemessen und geht in die Häufigkeitsverteilung ein, unabhängig davon, ob es sich um einen beschädigten

Malignitätsgrad

loid

lyploid

Monate  
Jahre

arzinom; n = 271

Zellkern, unvollständig getrennte Zellkerne oder fluoreszierende Verunreinigungen handelt (1, 22).

Aufgrund unserer Ergebnisse bei der Zellkern-DNS-Analyse und der Ergebnisse anderer Autoren ist die DNS-Zytometrie in der Lage, eine quantitative Aussage über Erfolg und Mißerfolg der einschlägigen Therapie zu gestatten. Eine Euploidisierung bzw. eine Zunahme der hypodiploiden DNS-Verteilung und ein Schwund der vor der Therapie vorhandenen aneuploiden Zelllinien deuten auf eine Tumorremission unter der Behandlung hin. Bleibt eine aneuploide DNS-Verteilung unter der Therapie bestehen, so liegt eine Tumorprogression vor (1-7, 12, 19, 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, 12, 14, 16, 19). 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 (G0/G1-Phase) > 60%, so ist die Prognose der Patienten günstiger als bei einem Anteil < 60%. Dabei bedeutet ein hoher Anteil von G0/G1-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.

### Schlußfolgerung

Die einzelzellzytometrische Analyse bei 271 Patienten erlaubte in unserer Studie signifikante klinische und prognostische Aussagen. Von Bedeutung sind die Ploidie, die Anzahl der DNS-Stammlinien und die Anteile der Zellzyklusphasen.

### Literatur

1. AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Nuclear DNA-Analysis: Relevance of ploidy, DNA heterogeneity and phases of the cell cycle. An 8-year study of 329 patients with prostatic carcinoma. *Urol Int.* 45, 350-355; 1990 - 2. AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Zellkern-DNS-Analyse bei Nierenkarzinomen unter Berücksichtigung des morphologischen Malignitätsgrades. *Akt Urol* 18, 137-141; 1987 - 3. AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter: Prognostic relevance of nuclear deoxyribonucleic acid ploidy studied by slide cytometry: An 8-year survival time study. *J Urol.* 148, 31-37; 1992 - 4. AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Deoxyribonucleic acid content and survival rates of patients with transitional cell carcinoma of the bladder *J Urol* 151, 37-42; 1994 - 5. AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Prognostic relevance of ploidy and proliferative activity of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 15, 271-276; 1988 - 6. ATKIN, N. B., KAY, R.: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Brit J Cancer* 40: 210-221; 1979 - 7. AUER, G., ERIKSSON, E., AZAVEDI, E., CASPERSON, T., WALLGREN, A.: Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res* 44, 394-396; 1984 - 8. BAISCH, H., OTTO, U., KÖNIG, K., KLÖPPEL, G., KÖLLERMANN, M., LINDEN, W. A.: DNA content of human kidney carcinoma cells in relation to histological grading. *Brit J Cancer* 45, 878-886; 1982 - 9. BARLOGIE, B., GÖHDE, W., JOHNSTON, D. A., SMALLWOOD, L., SCHUMANN, J., DREWINKO, B., FREIREICH, E. J.: Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. *Cancer Res* 38, 3333; 1978 - 10. BLÖNDAHL, T., PONTEN, J.: DNA ploidy in small cell carcinoma of the lung. *Anticancer Res* 3, 47-52; 1983 - 11. BÖCKING, A., ADLER, C. P., COMMON, H. H., HILGARTH, M., GRANZEN, B., AUFFERMANN, W.: Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol* 6, 1-8; 1984 - 12. 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 - 13. BÖHM, N., SANDRITTER, W.: DNA in human tumors: A cytophotometric study. Springer, Berlin-Heidelberg-New York *Curr Top Pathol* 60, 151; 1975 - 14. BORGMANN, V., AL-ABADI, H., NAGEL, R.: Treatment of locally advanced prostatic carcinoma with LH-RH analogues: Cytological,

DNA-cytophotom  
D. E.: Regression  
TRIBUKAIT, B., Es  
tumors. *Urol Res*  
H., LEISTENSCHNE  
sowie Regressions  
Arbeitskreises (Pro  
ric estimation from  
NAGEL, R.: Einzel  
Prostatakarzinom  
Ranking procedur  
SPRENGER, E.: Zel  
zinomen vor und  
31. Tagung, 68-72.  
stimmung und DN  
Akt *Urol* 10, 359-2  
rization of prostat  
Scand *J Urol Neph*  
tion of malignant t  
F. R., SCHREIBER, J  
mas and its relatio

gungen handelt  
ebnisse anderer  
ber Erfolg und  
. eine Zunahme  
ie vorhandenen  
hin. Bleibt eine  
progression vor  
er breiten Streu-  
dem Verhältnis  
Dieses Verhält-  
rphologisch ein-  
ie Prognose der  
teil von G0/G1-  
ten der Maligni-  
proliferierenden

1 unserer Studie  
die Ploidie, die

heterogeneity and  
l Int. 45, 350-355;  
nter Berücksichti-  
DI, H., NAGEL, R.:  
lear deoxyribonu-  
18, 31-37; 199 - 4.  
ts with transitional  
ognostic relevance  
- 6. ATKIN, N. B.,  
: tumors, based on  
, CASPERSSON, T.,  
carcinomas in hu-  
G., KÖLLERMANN,  
stological grading.  
, SMALLWOOD, L.,  
itive characteristics  
O. BLÖNDAHL, T.,  
47-52; 1983 - 11.  
RMANN, W.: Algo-  
ytol 6, 1-8; 1984 -  
: DNA Grading of  
. Appl. Pathol 3,  
hotometric study.  
NN, V., AL-ABADI,  
gues: Cytological,

DNA-cytophotometrical and clinical results. Am J Clin Oncol (Suppl. 1) 11, 19-28; 1988 - 15. COX, D. E.: Regression models and life tables. J Roy Stat Soc series B 34, 187; 1982 - 16. GUSTAFSON, H., TRIBUKAIT, B., ESPOSTI PL: DNA-profile and tumor progression in patients with superficial bladder tumors. Urol Res 10, 13-18, 1982 - 17. HELPAP, B., BÖCKING, A., DHOM, G., FAUL, P., KASTENDIECK, H., LEISTENSCHNEIDER, W., MÜLLER, H. A.: Klassifikation, histologisches und zytologisches Grading sowie Regressionsgrading des Prostatakarzinoms. Eine Empfehlung des Pathologisch-Urologischen Arbeitskreises «Prostatakarzinom». Pathologie 6, 3-7; 1985 - 18. KAPLAN, E. L., MEIER, P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. J Amer Stat Ass 53, 457, 1958 - 19. LEISTENSCHNEIDER, W., NAGEL, R.: Einzelzellzytophotometrische Zellkern-DNS-Analysen beim behandelten, entdifferenzierten Prostatakarzinom und ihre klinische Bedeutung. Urologie (A) 22, 157-161; 1983 - 20. MANTEL, N.: Ranking procedures for arbitrary restricted observations. Biometrics 23, 65; 1967 - 21. SEPPELT, U., SPRENGER, E.: Zellkern-DNS-Analysen durch Einzelzell-Fluoreszenz-Zytophotometrie an Prostatakarzinomen vor und während der Therapie. Verhandlungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 31. Tagung, 68-72; 1980 - 22. SPRENGER, E.: Kommentar zu den Arbeiten: Automatisierte Zellkernbestimmung und DNS-Analyse mit der Einzelzellphotometrie bei der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Akt Urol 10, 359-360; 1979 - 23. TRIBUKAIT, B., ESPOSTI, P., RÖNSTRÖM, L.: Tumor ploidy for characterization of prostatic carcinoma: Flow-cytofluorometric DNA studies using aspiration biopsy material. Scand J Urol Nephrol, Suppl. 55, 59; 1980 - 24. Union International contre le Cancer: TNM Classification of malignant tumors. 3rd edition. International Union Against Cancer, Geneva 1978 - 25. WOLLEY, F. R., SCHREIBER, K., KOSS, L. G., KARAS, M., SHERMAN, A.: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour. J Natl Cancer Inst 69, 15-22; 1982