Verh. Dtsch. Ges. Path. 74, 176–185 (1990)

DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik[1]

DNA-Cytometry and Automation in Clinical Diagnostics

A. Böcking[2]

Summary

The biological basis for DNA-cytometric assistance in the diagnostic evaluation of dysplasias and borderline lesions is «chromosomal aneuploidy» as a marker for neoplasia. The detection of its equivalent in DNA-cytometry («DNA-aneuploidy») may be taken as a marker for neoplastic transformation. Examples for the DNA-cytometric detection of prospective malignancy are reported for cervical dysplasias, myelodysplasias and borderline cystadenomas of the ovary. Further examples are given for diagnostic assistance in the cytological detection of malignant cells in touch preparations from soft tissue and bone tumours and in urine samples. The basis for «DNA-grading» of malignancy is the fact that the modal chromosomal aneuploidy and its variability in many tumours correlate with the patients prognosis. The prognostic validity of their DNA-cytometric equivalents (modal DNA-ploidy = stemline-ploidy and 2c Deviation Index resp.) are demonstrated for chronic myelogenous leukemias and urinary bladder cancers. Other DNA-cytometric parameters may also be prognostically valid. Data, concerning the prognostic relevance of DNA-cytometry are known for at least 18 different tumour sites. The reproducibility of «DNA-grading» of malignancy is high as compared with subjective morphological grading systems. Modern technological equipment for Feulgen-staining and interactive DNA-measurements for diagnostic purposes is described.

Gemäß Beschluß einer «Task Force» der Internationalen Akademie für Zytologie und der American Society of Cytology on «Standardisation of Quantitative Methods in Diagnostic Pathology» auf der Conference on «The Computerized Cytology and Histopathology Laboratory» vom März 1990 in Chicago ist unter den messenden diagnostischen Verfahren ausschließlich die DNA-Zytometrie für die klinische Anwendung empfohlen worden. Die Gründe hierfür sind die folgenden:

1. Die DNA-zytometrische Diagnostik hat in der Tumor-Zytogenetik eine theoretisch-biologische Grundlage, ist also nicht reine Empirie.
2. Die Methode ist hinreichend standardisiert und reproduzierbar (interner Eichstandard meist vorhanden, Feulgen-Färbung).
3. Benutzerfreundliche Meßgeräte für Durchfluß- und Einzelzellzytometrie sind im Markt.
4. Objektive Interpretationsalgorithmen stehen zur Verfügung.

Tab. 1: DNA-Zytometrie als diagnostische und prognostische Hilfe bei extragenitalen Tumoren. Bewertung ihrer Leistungsfähigkeit in der klinischen Praxis für Neoplasie-Diagnose, Malignitäts-Grading und Therapie-Monitoring bei verschiedenen Tumoren durch die «Task Force on Standardization of Quantitative Methods in Diagnostic Pathology» auf der «International Conference on the Computerized Cytology and Histopathology Laboratory», 24. bis 27. März 1990 in Chicago.

	Neoplasie-Diagnose	Malignitäts-grading	Therapie-Monitoring
Prostatakarzinom	–	+	+
Lungenkrebs (nicht kleinzellig)	+	+	–
Urothelkarzinom	+	+	+
Dickdarmkarzinom	–	+	–
Brustkrebs	–	+	–

[1] Mit Unterstützung durch den Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen.

[2] Institut für Pathologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

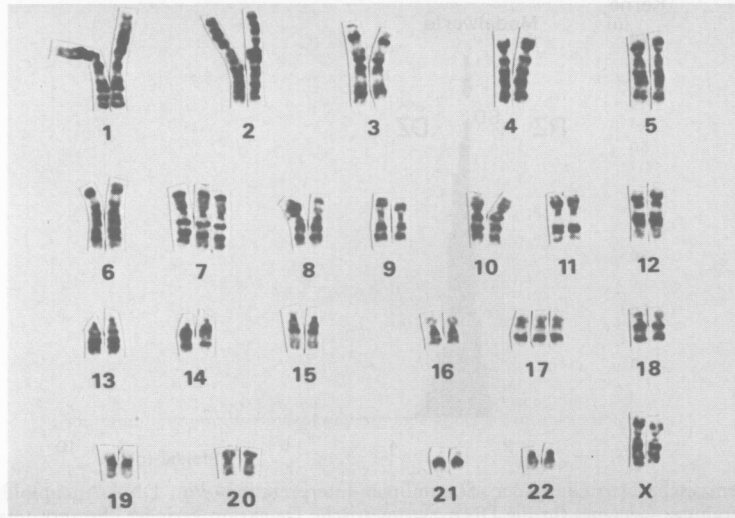

Abb. 1: Karyogramm einer Tumorzelle aus einem papillären Nierenzellkarzinom Grad 1 mit Trisomie 7 und 17 (Photo Dr. Füzesi, Pathologie Aachen).

5. Ausreichende Studien zur diagnostischen und prognostischen Validierung der DNA-Meßdaten liegen für die meisten Tumoren vor.

Die «Task Force» unterscheidet in der Anwendung der DNA-Zytometrie zwischen «Presence of Neoplasia», «Grading of Malignancy» und «Therapy Monitoring» und hält den klinischen Einsatz für die in Tab. 1 markierten extragenitalen Tumoren für gerechtfertigt.

Die DNA-zytometrische Diagnostik hat folgende biologische Grundlagen: Aneuploidie, welche von den übrigen Körperzellen abweicht, gilt international als harter Marker für neoplastisch transformierte Zellen. Darunter versteht man numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen (Abb. 1). Das bedeutet, daß der Nachweis von Aneuploidie in Zellen einer Dysplasie oder einer borderline lesion die eindeutige Diagnose einer Neoplasie zuläßt. Damit kommt der Aneuploidienachweis als Diagnosehilfe in Grenzfällen der Dignitätsdiagnostik in Frage, wobei nur der positive Aneuploidienachweis beweisend ist. Ein fehlender Nachweis von Aneuploidie schließt Neoplasie dagegen nicht aus. Malignität kann bei Nachweis von Aneuploidie nur dann angenommen werden, wenn entweder kein gutartiger Tumor differentialdiagnostisch in Frage kommt oder das Ausmaß der Aneuploidie für Malignität im konkreten Fall beweisend ist. Ein Aneuploidie-Nachweis mittels Chromosomenanalyse nach Zellkultur ist aber zu zeitaufwendig und teuer. Außerdem ist es meist unmöglich, die relevanten Zellen, z. B. einer Dysplasie, in Kultur zu bringen. Wenn es aber möglich ist, das Äquivalent chromosomaler Aneuploide DNA-zytometrisch zu erfassen, dann läßt sich Neoplasie auch mit diesem Verfahren diagnostizieren.

Chromosomale Aneuploidie ist ein Phänomen der einzelnen Zelle. Wenn sie gering ausgeprägt ist, wie z. B. bei Trimosie 7 und 17, typisch für papilläre Nierentumoren (Abb. 1), kann sie DNA-zytometrisch an der Einzelzelle nicht nachgewiesen werden, da die Zunahme an DNA pro Zellkern nur ca. 4,3 % beträgt, entsprechend 2,08c. Eine derart geringe Abweichung des Zellkern-DNA-Gehaltes kann aber durch Messung von hunderten von Zellen bewiesen werden, wenn man ihre Meßwerte statistisch mit denen von individual- und gewebespezifischen Referenzzellen vergleicht. Sofern sich ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen läßt, kann DNA-Aneuploidie angenommen werden. Wir bezeichnen dieses Vorgehen als «Stammlinien-Interpretation» von DNA-Aneuploidie (Sandritter und Carl, 1966; Okagaki und Izuo, 1978; Fu et al., 1981) (Abb. 2). Damit lassen sich auch geringe chromosomale Aneuploidien in einer großen Zahl von Zellen nachweisen. Durch

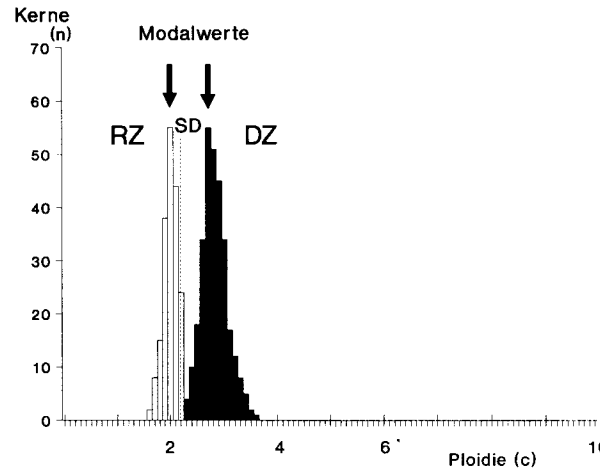

Abb. 2: Schematische Darstellung der «Stammlinien-Interpretation» von DNA-Aneuploidie anhand eines Histogramms. Geeignet für die DNA-zytometrische Detektion geringer chromosomaler Aneuploidien in einer Vielzahl von Zellen; auch in Geweben mit Polyploidisierung. RZ = Referenzzellen, DZ = Diagnosezellen (Tumorzellen), SD = Standardabweichung der Referenzzellpopulation.

Ausgrenzung der Bereiche um 4c, 8c, 16c ist auch ein DNA-Aneuploidienachweis in polyploidisierenden Geweben (z. B. Urothel, Mesothel, Hepatozyten) möglich. Dieser Interpretationsmodus von DNA-Aneuploidie ist sehr spezifisch, aber relativ insensitiv, da sehr viele Zellen mit den charakteristischen Aneuploidien vorliegen müssen, was meist in Proben von Dysplasien oder borderline lesions nicht der Fall ist. Wenige, aber im Prinzip für Malignität beweisende Zellen (rare events) entgehen diesem Interpretationsmodus.

Aus dem Gesagten folgert, daß auch einzelne Zellen DNA-zytometrisch als aneuploid erkannt werden können. Da DNA-Gehalte bis 4c normalen G2/M-Phase-Zellen entsprechen können und ein methodischer Fehler einkalkuliert werden muß, hat sich eine Ploidie > 5c empirisch als diagnostisch relevant erwiesen (Ploem-Zaaijer et al., 1975; Böcking, 1983; Hemstreet et al., 1983). Dabei ist nicht der Prozentsatz an Zellen > 5c entscheidend, er kann subjektiv bei der Messung leicht beeinflußt werden, sondern ihr absolutes Vorkommen. Das heißt, daß Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c in einem Präparat zur Dignitätsdiagnose gesucht werden dürfen. Der Index heißt 5c Exceeding Events (5cEE)) (Böcking, 1990). Wir bezeichnen dieses Vorgehen als «Einzelzell-Interpretation» von DNA-Aneuploidie (Abb. 3). Dieses Vorgehen ist nur bei Geweben ohne euploide Polyploidisierung sinnvoll (z. B. Plattenepithelien). Damit lassen sich größere chromosomale Aneuploidien nachweisen, die aber nur in sehr wenigen Zellen nachweisbar sein müssen. Dieser Interpretationsmodus ist vergleichsweise unspezifisch, aber sehr sensitiv. Beide Methoden der diagnostischen DNA-Dateninterpretation sind korrekt. Sie sollten daher kombiniert werden, da sie sich in ihrer Sensitivität und Spezifität ergänzen.

Bevor Beispiele klinisch-diagnostischer Anwendung dargestellt werden, sei die heutige Technologie der diagnostischen DNA-Zytometrie kurz umrissen. Die auch von der IAC für die DNA-Einzelzell-Zytometrie empfohlene Feulgen-Färbung kann, irrespektive der Vorfixation oder Vorfärbung, nach einer Nachfixation mit gepuffertem 4 %igem Formaldehyd, standardisiert und reproduzierbar über Nacht mit einer dafür konstruierten Version eines kommerziellen Färbeautomaten (Shandon Varistain F) durchgeführt werden (Chatelain et al., 1989). Als Materialien eignen sich Zellausstriche, Abtupf- oder Sedimentationspräparate, die auch Jahre alt und bereits eingedeckt sein können. Auch aus archivierten, formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben lassen sich mittels enzymatischer und mechanischer Zellvereinzelungsverfahren (Delgado et al., 1987) Zellen zur Messung isolieren. Unter ge-

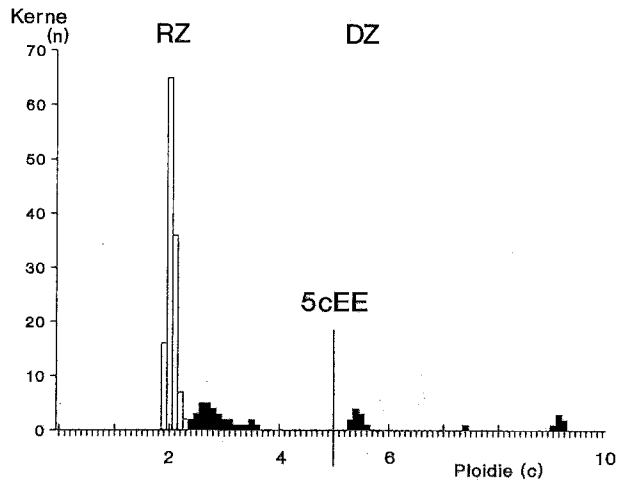

Abb. 3: Schematische Darstellung der «Einzelzell-Interpretation» von DNA-Aneuploidie anhand eines Histogramms. Geeignet für die DNA-zytometrische Detektion großer chromosomaler Aneuploidien in einer geringen Zellzahl in nicht polyploidisierenden Geweben. RZ = Referenzzellen, DZ = Diagnosezellen (Tumorzellen), 5cEE = 5c Exceeding Rate.

wissen Einschränkungen ist auch die DNA-Messung an Gewebsschnitten erlaubt (Schnittdickenkorrektur notwendig, größere Meßwertstreuung berücksichtigen).

Die DNA-Durchflußzytometrie hat den Vorteil, tausende von Zellen in wenigen Minuten messen zu können und damit eine präzise Bestimmung des Ploidiewertes der Stammlinie zu ermöglichen. Sie weist für Pathologen aber folgende entscheidende Nachteile auf:

1. Es besteht keine Kontrolle über die real gemessenen Zellen. Ob beispielsweise ein 2c-Gipfel in einer Gewebsprobe aus der Harnblase Bindegewebszellen oder Tumorzellen entspricht, bleibt ohne immunologische Zusatzuntersuchungen ungeklärt.
2. Wegen der unteren Auflösungsgrenze von etwa 1% sind in der Probe selten vorkommende Zellen (rare events), wie z. B. Myeloblasten bei CML im Blut, nicht separat zu messen.
3. Eine gezielte Messung vorher morphologisch klassifizierter, z. B. dysplastischer oder Hodgkin-Zellen ist nicht möglich.
4. Eine wiederholte Messung von Zellen (z. B. zur Qualitätskontrolle) ist ebenfalls nicht möglich.

Die moderne interaktive DNA-Zytometrie erfolgt mit TV-Bildanalysesystemen, die mit einem Mikroskop kombiniert sind (DNA-Bildzytometrie) (Abb. 4). Die Auswahl der nach Feulgen umgefärbten Zellen zur Messung erfolgt durch den Pathologen am Bildschirm durch Markierung mit einem Curser. Das TV-System «erkennt» sodann diese Zellkerne und bestimmt ihre integrierte optische Dichte. Durch Vergleich mit den Werten der im Präparat meist vorhandenen Referenzzellen (Lymphozyten, Granulozyten, normale Epithelzellen) kann der DNA-Wert in c angegeben werden (Abb. 5). Eine derartige Zellkernmessung dauert heute zwei bis drei Sekunden. Das Bildanalysesystem bietet diverse Hilfestellungen an, um dicht beieinanderliegende oder sich berührende Zellkerne separat messen zu können oder um eine Vielzahl von Zellkernen pro Monitor simultan zu vermessen, bei gleichzeitigem interaktiven Ausschluß von Artefakten oder unerwünschten Zellen. Dadurch sind in technisch guten Präparaten (Leukämien, Lymphome, Zellvereinzelungs- und Sedimentationspräparate) 300 Zellen in wenigen Minuten zu messen, während für die gleiche Zellzahl von Ausstrichpräparaten von Feinnadelpunktaten unter Umständen eine Stunde veranschlagt werden muß. Wegen der in letzter Zeit erzielten Beschleunigung des Meßablaufes

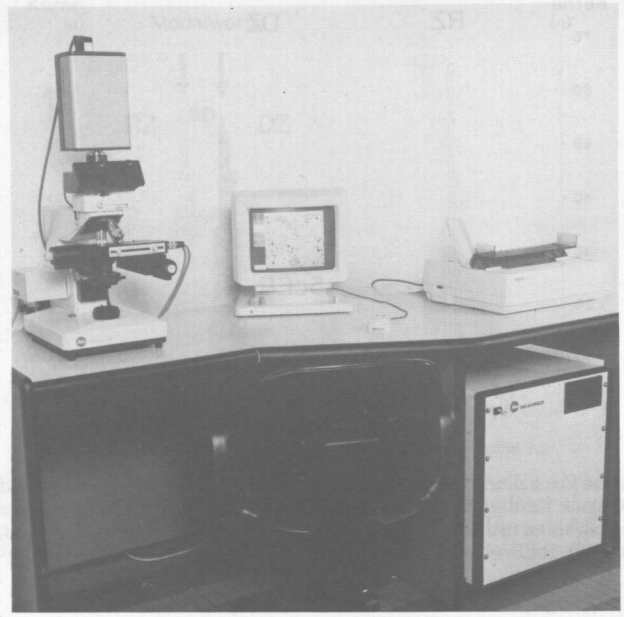

Abb. 4: Interaktives Zytometriegerät MIAMED (Wild-Leitz, Wetzlar), bestehend aus (v. l. n. r.): automatischem Mikroskop, interaktivem Monitor, elektronischer Maus, Drucker, Bildanalyse-Computer.

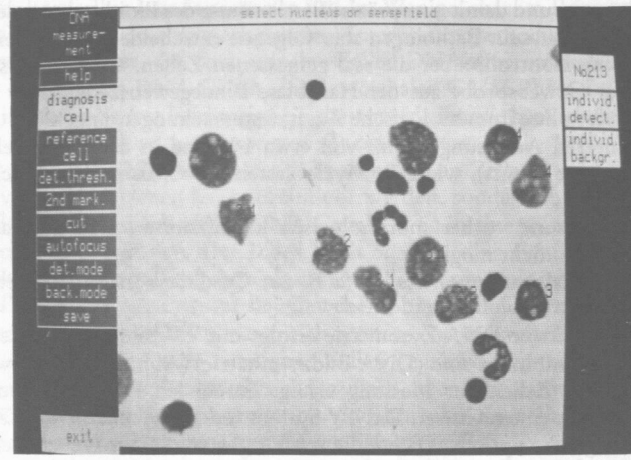

Abb. 5: Interaktiver Monitor des Bildanalysesystems MIAMED während einer DNA-Messung (peripherer Blutausstrich bei CML, Feulgen-gefärbt). DNA-Gehalte in c sind in die gemessenen Zellen geschrieben. Am Monitorrand «Sensefelder» zur Steuerung des Meßablaufes durch den Untersucher.

können daher mit der DNA-Bildzytometrie Zellmengen verarbeitet werden, die früher der Durchflußzytometrie vorbehalten waren.

Unmittelbar nach Abschluß der Messung wird ein Protokoll ausgegeben, welches alle relevanten DNA-Parameter ggf. samt diagnostischer Dateninterpretation und Histogramm enthält. Unter diagnostischer Dateninterpretation verstehen wir eine Analyse hinsichtlich

des Vorliegens von DNA-Aneuploidie sowie die Angabe diagnostisch oder prognostisch relevanter Indices.

Der Qualitätssicherung dienen eine interne Kontrolle der Güte der Referenzzellmessungen (maximal zulässige Streuung), die Möglichkeit, Zellen mit verdächtigen DNA-Gehalten zu relokalisieren und nachzumessen, sowie auf Artefakte verdächtige Messungen zu wiederholen (über die visuelle Kontrolle der abgespeicherten Bilder aller vermessenen Zellen).

Moderne Geräte weisen zudem Aspekte von Expertensystemen auf, da sie bei Bedarf notwendige Informationen abrufbar vorhalten (z. B. Literaturangaben, Entscheidungshilfen bezüglich der Zulässigkeit einer diagnostischen DNA-Messung in Abhängigkeit vom Gewebetyp und sonstigen Erkrankungen oder Therapien). Einige Pathologen haben derartige DNA-Messungen bereits routinemäßig zur Abklärung von Dysplasien und borderline-Fällen sowie zur Malignitätsgradierung bei geeigneten Tumoren eingesetzt. Wir versenden das Meßprotokoll zusammen mit einem erläuternden Brief im Sinne einer epikritischen Stellungnahme, welche sich auf die morphologischen und DNA-zytometrischen Ergebnisse gemeinsam bezieht.

Ein Grund, warum in manchen früheren Publikationen kein wesentlicher Beitrag der DNA-Zytometrie zur Diagnostik der Dysplasien und borderline lesions gezeigt werden konnte, ist darin zu suchen, daß die Autoren versuchten, ihre DNA-Ergebnisse mit den simultan erhaltenen morphologischen Diagnosen zu korrelieren. Da Dysplasie aber keine biologisch definierte Entität darstellt, sondern eher dem Versagen morphologischer Kriterien entspricht, in Grenzfällen prospektive Malignität erkennen zu lassen, war dieser Ansatz nicht sinnvoll. Statt dessen erscheint es vernünftig, die «DNA-Diagnose» mit dem letztendlichen histologischen follow up der Patienten zu korrelieren. Die entscheidende Fragestellung lautet also: Wurde im Bereich der Dysplasie später histologisch nachweisbare Malignität diagnostiziert? Die «DNA-Diagnose» muß also am follow up validiert werden. Dies impliziert, daß zwischen der DNA-zytometrischen Diagnose von Aneuploidie und der histologischen Verifizierung der Malignitätsdiagnose Monate oder wenige Jahre vergehen können. Mit anderen Worten: durch DNA-zytometrischen Nachweis von Aneuploidie kann unter Umständen eine Frühdiagnose von Malignität gestellt werden.

Nachfolgend einige Beispiele aus der Literatur über den erfolgreichen Einsatz der DNA-Zytometrie zur Diagnose von (prospektiver) Malignität durch den Nachweis von DNA-Aneuploidie.

Dignitäts-Diagnose

Im Zusammenhang mit dem Hauptthema dieser Tagung sei die Arbeit von Auffermann et al. (1988) erwähnt. Die Autoren untersuchten Knochenmarksausstriche von 17 Fällen mit megaloblastärer Anämie. Sie konnten 8 von 10 derjenigen Fälle DNA-zytometrisch als prospektiv maligne identifizieren, die innerhalb weniger Monate klinisch eine akute, nichtlymphoblastäre Leukämie entwickelten. Falsch positive DNA-Diagnosen traten nicht auf. Diagnostischer Marker war das Vorkommen von Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c.

Bollmann (1990) untersuchte 134 Cervixabstriche mit geringer bis mittlerer Dysplasie (Gruppe III D nach Papanicolaou). Mit einer Sensitivität von 51,4 % konnte er DNA-zytometrisch diejenigen Fälle identifizieren, die sich im histologischen follow up als Carcinoma *in situ* bzw. invasives Carcinom herausstellten. Falsch positive DNA-Diagnosen traten nicht auf. Diagnostischer Marker war wiederum das Vorkommen von Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c bzw. > 9c bei Abstrichen mit HPV-Infekt.

Friedlander und Mitarbeiter (1984) sowie Dietel und Mitarbeiter (1985) benutzten die DNA-Zytometrie, um unter den borderline-Tumoren des Ovars diejenigen zu identifizieren, welche sich prospektiv maligne verhielten. Alle 42 nicht metastasierenden Fälle zeigten eine euploide DNA-Verteilung, während die beiden Fälle, welche später Metastasen aufwiesen, eine aneuploide DNA-Verteilung aufwiesen.

In der zytologischen Diagnostik fällt eine Dignitätsentscheidung vielfach auch wegen Mangels an Zellen und eindeutigen Malignitätskriterien schwer. So ist z. B. eine Dignitäts-

entscheidung bei Feinnadelpunktaten von Weichteil- oder Knochentumoren und an Urinzytologien vielfach problematisch.

Sapi et al. (1989) benutzte die interaktive DNA-Zytometrie, um an zytologischen Präparaten von 69 Weichteiltumoren eine Dignitätsdiagnose zu stellen. Diagnostischer Marker war wiederum das Vorkommen von Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c. Die DNA-Ergebnisse wurden an den histologischen Diagnosen validiert. Mit einer Sensitivität von 97,7 % konnten die malignen Weichteiltumoren richtig als Neoplasien diagnostiziert werden, während keine falsch positiven Dignitätsdiagnosen registriert wurden.

Dreyer et al. (1989) konnten an Tupfpräparaten alle untersuchten 12 aneurysmatischen Knochenzysten als benigne und alle 25 untersuchten Osteosarkome als maligne über den Nachweis von DNA-Aneuploidie identifizieren. Mellin et al. (1985) setzten die DNA-Durchfluß-Zytometrie zur Malignitäts-Gradierung von Knochentumoren ein.

Parry und Hemstreet (1983) verwendeten den Nachweis von Zellen mit einem DNA-Gehalt > 5c für eine Malignitätsdiagnose an Urinzytologien von 523 Risikoprobanden. Während die Sensitivität der konventionellen Urinzytologie nur 56 % betrug, ließ sich diese DNA-zytometrisch auf 88 % steigern, wobei ein falsch positiver Fall auftrat.

Malignitätsgrading

Wesentliches Problem der klassischen, subjektiven, histologischen oder zytologischen Malignitäts-Gradierungen ist ihre mangelhafte Reproduzierbarkeit. Objektivere, reproduzierbarere und dennoch prognostich valide Gradierungs-Alternativen wären für den klinischen Gebrauch wünschenswert.

Aus der Zytogenetik ist bekannt, daß bei vielen soliden Tumoren des Menschen das Ausmaß chromosomaler Aberrationen mit der Prognose der Krebspatienten korreliert (Heim und Mittelman, 1987). Auch für die CML ist bekannt, daß Patienten mit chromosomalen Anomalien, die über die Philadelphia-Translokation hinausgehen, eine schlechtere Prognose haben (Bernstein, 1988).

Pauwels et al. (1988) zeigten z. B. für das Harnblasenkarzinom, daß weniger die am häufigsten vorkommenden Chromosomenanomalien (modal value) als vielmehr die Variabilität der beobachteten, verschiedenartigen Anomalien (range) prognostisch relevant sind. Diesen Ergebnissen entsprechen seit ca. 20 Jahren Beobachtungen der DNA-Zytometrie der verschiedensten Tumoren. Die «Task Force on Standardization of Quantitative Methods in Diagnostic Pathology» der IAC hat im April 1990 in Chicago dementsprechend sowohl die DNA-Ploidie der Tumorstammlinie (modal value) als auch die Variabilität der DNA-Werte um den normalen 2c-Wert (2c Deviation Index) (Böcking und Auffermann, 1986) als prognostische Variablen für die Routineanwendung vorgeschlagen (Tab. 1). Die vor allem von Durchflußzytometrikern vielfach getroffene Unterscheidung in «diploide» und «aneuploide» Tumoren wurde dagegen für prognostische Zwecke abgelehnt, da die meisten malignen Tumoren zytogenetisch aneuploid sind, und es wahrscheinlich keine «diploiden» malignen Tumoren gibt. Der Nachweis von DNA-Aneuploidie hängt vielmehr von der Präzision der DNA-Messungen ab. Ein sogenannter «diploider» Tumor dokumentiert dagegen die Insuffizienz der Meßmethode, chromosomale Aneuploidie nachzuweisen. Zu prognostischen Zwecken muß vielmehr das Ausmaß der Aneuploidie quantifiziert werden. Algorithmischen Interpretationen der DNA-Verteilung gibt die «Task Force» den Vorzug vor subjektiven Interpreationen der DNA-Verteilung an Histogrammen. Letztere sind schlecht reproduzierbar und implizieren eine diskontinuierliche Klassierung, welche zytogenetisch und biologisch keine Basis haben (Pfitzer et al., 1976).

Nachfolgend je ein Beispiel für die verschiedenen prognostischen Interpretationsmodi DNA-zytometrischer Daten.

Bei der chronisch-myeloischen Leukämie existiert bis heute kein Zellmarker, um Fälle mit langem Verlauf der chronischen Phase und langer Überlebenszeit von solchen mit kurzem Verlauf der Krankheit abzugrenzen. Die Spanne der beobachteten Überlebenszeiten

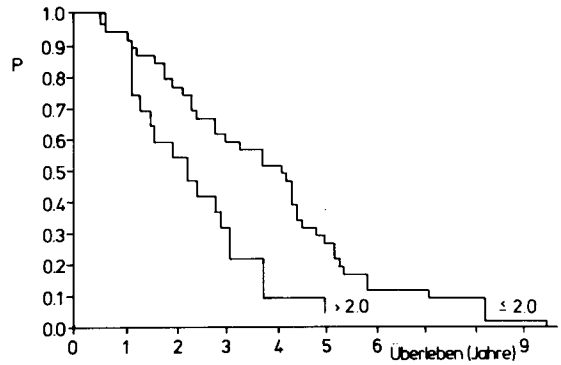

Abb. 6: Kaplan-Maier-Überlebenskurven von 64 Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie in Abhängigkeit von der DNA-Stammlinie der Myeloblasten/Promyelozyten > bzw. < 2c (aus MÜLLER et al., 1990).

liegt zwischen wenigen Monaten und 10 Jahren. Für den biologisch exakt zu terminierenden Einsatz einer Knochenmarkstransplantation ist das Wissen um die prospektive maligne Potenz der Erkrankung entscheidend. MÜLLER et al. (1990) konnten bei 69 Fällen mit einem klinischen follow up bis zu 10 Jahren DNA-zytometrisch sowohl durch Nachweis einer Stammlinie > 2c als auch einer erhöhten «stemline shoulder fraction» Patienten mit signifikant verkürzter chronischer Phase und Überlebenszeit identifizieren (Abb. 6). Damit ist DNA-zytometrisch eine Malignitätsgradierung der CML gelungen, welche morphologisch allein nicht möglich ist.

In der Therapie des Harnblasenkarzinoms ist ein reliables Malignitätsgrading insbesondere nach primärer Resektion oberflächlicher Tumoren gefragt, um objektive und valide Entscheidungsparameter für das weitere Vorgehen zu erhalten («wait and see» versus Chemotherapie bzw. Harnblasenexstirpation). Das konventionelle histopathologische Malignitätsgrading nach MOSTOFI (1973) weist eine mangelhafte interspezifische Reproduzierbarkeit auf (OOMS et al., 1983). HOFSTÄDTER et al. (1984) zeigten, daß Urothelkarzinompatienten mit «diploider» DNA-Stammlinie statistisch signifikant länger leben als solche mit «aneuploider» DNA-Stammlinie. Außerdem besteht eine enge Korrelation der DNA-Parameter »Stammlinienquotient» und «Diploid Deviation Quotient» (FOSSA, 1975) mit dem histologischen Grading und der Infiltrationstiefe der Tumoren. Auch die Tumorrezidivrate und das rezidivfreie Intervall korrelierten signifikant mit dem «Diploid Deviation Quotient». Dies gilt auch für T1-Tumoren. Bei Patienten mit rezidivierenden oberflächlichen Harnblasenkarzinomen fanden GUSTAFSON et al. (1982) eine Tumorprogression nur für Patienten mit «aneuploiden» DNA-Verteilungen. BÖCKING et al. (1990) untersuchten an 117 Harnblasenkarzinom-Patienten vergleichend den prognostischen Einfluß von Tumor Staging (TNM), histologischem Grading (MOSTOFI et al., 1973), subjektiver DNA-Histogrammklassifikation nach FOSSA (1975), mittleren DNA-Gehalt, DNA-Stammlinienunterscheidung in «diploid» versus «aneuploid» und «DNA-Malignitätsgrading» (BÖCKING und AUFFERMANN, 1986). Das TNM-Staging wies die höchste Korrelation mit der Überlebenszeit auf. In multivariaten Regressionsanalysen nach COX (1972) stellte sich das histologische Grading als unabhängige weitere Variable mit zweitbester Korrelation mit der Überlebenszeit heraus. Wurde diese Variable wegen ihrer unzureichenden interindividuellen Reproduzierbarkeit aus den Modellen gestrichen, so wurde der «DNA-Malignitätsgrad» nach dem Staging als «zweitbeste» unabhängige prognostische Variable in das Modell aufgenommen. Mit Hilfe dieses «DNA-Malignitätsgrading» war es möglich, drei Gruppen mit signifikant unterschiedlicher Überlebenszeit zu unterscheiden (Abb. 7). Die subjektive Histogrammklassifikation war ebenso von minderer prognostischer Relevanz wie die einfach Unterscheidung zwischen «diploiden»

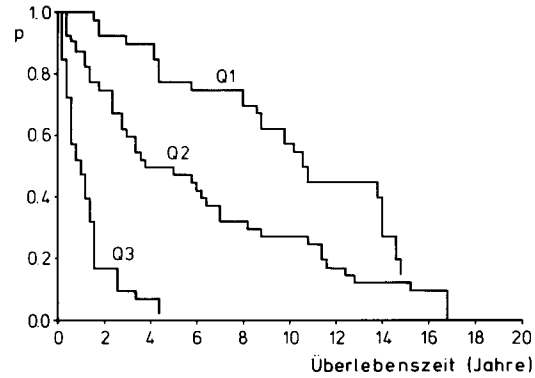

Abb. 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von 117 Patienten mit Harnblasenkarzinomen in Abhängigkeit von ihrem DNA-Malignitätsgrad (aus BÖCKING et al., 1990).

und «aneuploiden» Tumoren. Die interindividuelle Reproduzierbarkeit der «DNA-Malignitätsgradbestimmung» wurde für 20 verschiedene Tumoren untersucht und mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,97 höher befunden als die der subjektiven Malignitätsgradierung (62,6 %).

Eine größere interindividuelle Reproduzierbarkeit der DNA-Malignitäts-Gradierung gegenüber einer subjektiven morphologischen Gradierung konnten wir auch für 56 verschiedene Karzinome (Colon, Mamma, Lunge) belegen (BÖCKING et al., 1989).

Damit bietet sich die Bestimmung des DNA-Malignitätsgrades als gegenüber dem subjektiven, morphologischen Grading reproduzierbarerer und prognostisch meist ebenbürtiger, gelegentlich auch überlegener Parameter an.

Ausreichende Untersuchungsergebnisse über die Eignung der DNA-Verteilung zum Tumormalignitätsgrading liegen für mindestens 18 verschiedene Organtumoren vor (BÖCKING, 1990). Unmittelbare therapeutische Relevanz hat zum Beispiel das «DNA-Malignitätsgrading» bei Prostatakarzinomen erlangt. Sogenannte «diploide» oder «DNA-low grade» inzidentelle Prostatakarzinome werden in der Mayo-Klinik beispielsweise zunächst nicht therapiert, sondern lediglich beobachtet (ZINKE, 1988). Auch für manche therapeutischen Entscheidungen beim Mammakarzinom ist die DNA-Ploidie-Bestimmung heute relevant (AUER et al., 1984; FALLENIUS et al., 1988).

Literatur

AUER, G. U., E. ERIKSSON, E. AZAVEDO, T. CASPERSSON, and A. WALLGREN: Prognostic Significance of Nuclear DNA Content in Mammary Adenocarcinomas in Humans. Cancer Res. *44*, 394–396 (1984). – AUFFERMANN, W., I. FOHLMEISTER, and A. BÖCKING: Diagnostic and Prognostic Value of DNA Image Cytometry in Myelodysplasia (MDS). J. Clin. Pathol. *41*, 604–608 (1988). – BERNSTEIN, R.: Cytogenetics of Chronic Myelogenous Leukemia. Seminars in Hematology *25*, 20–34 (1988). – BÖCKING, A.: Zytophotometrische und automatisierte Zytodiagnostik. Micros. Acta Suppl. *6*, 91–102 (1983). – BÖCKING, A. and W. AUFFMERANN: Algorithm for DNA-Cytophotometric Diagnosis and Grading of Malignancy. (Letter to the editor) Analyt. Quant. Cytol. *8*, 363 (1986). – BÖCKING, A., R. CHATELAIN, M. HOMGE, R. DANIEL, A. GILLISSEN, and D. WOHLTMANN: Representativity and Reproducibility of DNA-Malignancy Grading in Different Carcinomas. Analyt. Quant. Cytol. Histol. *11*, 81–86 (1989). – BÖCKING, A.: DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. In: BONK, U. (Ed.): Aktuelle klinische Zytologie. Beitr. Onkol., Basel, Karger, Vol. *38*, pp. – (1990). – BÖCKING, A., I. POLLMANN, and S. BIESTERFELD: DNA-Grading of Malignancy in Urothelian Carcinoma of the Urinary Bladder: Prognostic Validity, Reproducibility and Comparison with other Classifications. J. Urol., submitted for publication (1990). – BOLLMANN, R.: DNA-bildzytometrische Diagnose prospektiver Malignität an zervikalen Dysplasien durch DNA-Zytometrie. Geburtsh. Frauenheilk. *50*, 113–117 (1990). – DELGADO, R., G. MIKUZ, and F. HOFSTÄDTER: DNA-Feulgen-Cytophotometric Analysis of

Single Cells from Paraffin – Embedded Tissue. Pathol. Res. Pract. *179*, 92–94 (1984). – DIETEL, M. und H. ARPS: Morphologie und Wachstumsverhalten von Ovarialtumoren. Untersuchungen mittels DNA-Zytophotometrie, Immunhistologie und Gewebekultur. Onkologie *8*, 278–285 (1985). – DREYER, T., T. GAHM und G. DELLING: Vollautomatische DNA- und Strukturanalyse zytologischer Präparate von Knochentumoren. Verh. Dtsch. Ges. Path. *73*, 1 (1989). – FALLENIUS, A. G., G. U. AUER, and J. M. CARSTENSEN: Prognostic Significance of DNA Measurements in 409 Consecutive Breast Cancer Patients. Cancer *62*, 331–341 (1988). – FOSSA, S. D.: Feulgen-DNA-Values in Transitional Cell Carcinoma of the Human Urinary Bladder. Beitr. Pathol. *155*, 44–55 (1975). – FRIEDLANDER, M. L., P. RUSSEL, I. W. TAYLOR, D. W. HEDLEY, and M. H. N. TATTERSALL: Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA Content as an Adjunct to the Diagnosis of Ovarian Tumors of Borderline Malignancy. Pathol. *16*, 301–306 (1984). – FU, Y. S., J. W. REAGAN, and R. W. RICHART: Definition of Precursors. Gynecol. Oncol. *12*, 220–231 (1981). – GUSTAFSON, T. L. and Y. S. FU: Applications of Quantitative Microscopy in Tumor Pathology. Lab. Invest. *53*, 5–21 (1985). – HEIM, S. and F. MITTELMAN: Cancer Cytogenetics. Alan R. Liss., Inc. U.S. (1987). – HEMSTREET, G. P., S. S. WEST, W. L. WEEMS, C. K. ECHOLS, S. MCFARLAND, J. LEWIN, and G. LINDSETZ: Quantitative Fluorescence Measurements of AO-stained Normal and Malignant Bladder Cells. Int. J. Cancer *31*, 557–581 (1983). – HOFSTÄDTER, F., G. JAKSE, B. LEDERER, G. MIKUZ, and R. DELGADO: Biological Behaviour and DNA Cytophotometry of Urothelial Bladder Carcinoma. Br. J. Urol. *56*, 289–295 (1984). – MELLIN, W., A. ROESSNER, E. GRUNDMANN, B. WÖRMANN, W. HIDDEMANN, and M. IMMENKAMP: Biological Characterization of Human Bone Tumors. VII. Detection of Malignancy in a Giant Cell Tumor of Bone by Flow Cytometric DNA Analysis. Path. Res. Pract. *180*, 619–625 (1985). – MÜLLER, C. P., M. KROPFF, S. BIESTERFELD, R. CHATELAIN, A. WAGNER, T. WENZLER, D. WOHLTMANN, and A. BÖCKING: Detection of High Risk Patients in Chronic Myelogenous Leukemia by DNA-Cytometry. Analyt. Quant. Cytol. Histol., zur Publikation eingereicht (1990). – OKAGAKI, T. and M. IZUO: Correction of Modal DNA Values Obtained by Microspectrophotometry and Tests for their Shifts. J. Nat. Cancer Inst. *60*, 1251 (1978). – OOMS, E. C., W. A. ANDERSON, C. L. ARONS, M. E. BOON, and R. W. VELDHUIZEN: Analysis of the Performance of Pathologists in the Grading of Bladder Tumors. Hum. Pathol. *14*, 144–150 (1983). – PARRY, W. and G. P. HEMSTREET: Cancer Detection by Quantitative Fluorescence Image Analysis. J. Urol. *139*, 270–274 (1988). – PAUWELS, R. P. E., A. W. G. B. SMEETS, R. W. M. SCHAPERS, J. P. M. GERAEDTS, and F. M. J. DEBRUYNE: Grading in Superficial Bladder Cancer. Cytogenetic Classification. Brit. J. Urol. *61*, 135–139 (1988). – PFITZER, P., K. VYSKA, and G. STECHER: Analysis of DNA-Histograms by Computer. Beitr. Pathol. *159*, 157–185 (1976). – PLOEM-ZAAIJER, J. J., M. E. BEYER-BOON, L. LEYTE-VELDSTRA, and J. S. PLOEM: Cytofluorometric and Cytophotometric DNA Measurements of Cervical Smears Stained Using a New Bicolor Method. In: PRESSMANN, N. J. and G. L. WIED (Eds.). Automation of Cancer Cytology and Cell Image Analysis. Tutorials of Cytology, Chicago, 225–235 (1979). – SANDRITTER, W. and M. CARL: Cytophotometric Measurements of the DNA Content (Feulgen Reaction) of Malignant Human Tumors. Acta Cytol. *10*, 26–30 (1966). – SAPI, Z., M. BODO, and J. SUGAR: DNA Cytometry of Soft Tissue Tumours with TV Image Analysis System. Pathol. Res. Pract. *3* (1989). – ZINCKE, H.: Neuere Entwicklungen in der Urologie der Mayo-Klinik. Vortrag Medizinische Fakultät der RWTH Aachen (9. 6. 1988).