

Reproduzierbares zytologisches Malignitäts- Grading des Prostatakarzinoms

A. Böcking*

Pathologisches Institut der Universität Freiburg i. Br.
(komm. Direktor: Prof. Dr. W. Oehlert)

Einleitung

Während eine histologische Tumorklassifikation primär Neoplasien verschiedener histogenetischer Ableitung unterscheidet (z. B. Plattenepithel-, Urothel-, Adenokarzinom), trennt ein Malignitätsgrading histogenetisch einheitliche Tumoren (z. B. das Adenokarzinom der Prostata) in Gruppen mit unterschiedlicher Dignität und Prognose. Ein Grading muß prognostisch relevant sein, d. h. die Tumorgade müssen mit den Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten korrelieren. Voraussetzungen dafür sind, daß die Gradierungen reproduzierbar sind und daß der an einer kleinen Stichprobe gewonnene Malignitätsgrad repräsentativ für den Gesamtumor ist. Die zur Gradierung herangezogenen diagnostischen Kriterien müssen mit der Prognose korrelieren. Das erste und derzeit am meisten verbreitete zytologische Grading des Prostatakarzinoms stammt von *Espoti* (7, 8). Von ihm selbst angewandt besaß es eine gute prognostische Validität, doch erwies es sich für andere Anwender als schlecht reproduzierbar (19, 2). Wir fanden eine nur 56%ige interspezifische Reproduzierbarkeit der Gradierungsergebnisse bei Anwendung der *Espotischen* Kriterien (3). Damit fehlt aber eine wesentliche Voraussetzung für die prognostische Relevanz dieses zytologischen Grading des Prostatakarzinoms.

Mit dem Ziel, die Reproduzierbarkeit und prognostische Validität des zytologischen Grading zu verbessern, haben wir die verschiedenen Ausprägungen der bekannten diagnostischen Kriterien der Prostatazytologie mit halbautomatischer Bildanalyse und Zytophotometrie quantitativ erfaßt. Durch eine Korrelation mit prognostisch relevanten Parametern des DNS-Verteilungsmusters der Tumorzellkerne sollen diejenigen zytologischen Kriterien ermittelt werden, die selbst mit der Prognose korrelieren. Über das Ergebnis wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

Material und Methoden

Aus dem Einsendungsgut des Pathologischen Instituts der Universität Freiburg wurden 52 konsekutive zytologische Präparate ausgewählt:

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bo 582/2).

Zusammenfassung

Es wird ein neues Verfahren für das zytologische Malignitäts-Grading des Prostatakarzinoms vorgestellt, das mit 86% eine höhere interspezifische Reproduzierbarkeit als das klassische Grading nach *Espoti* aufweist. Dabei werden sechs prognostisch relevante diagnostische Kriterien in ihrer Ausprägung jeweils von 1 bis 3 bewertet: Kerngröße, Kerngrößenvariabilität, Nukleolengröße, Nukleolengrößenvariabilität, Zelldissoziation und Kernordnung. Aus der Summe der sechs Bewertungsziffern ergeben sich die *Malignitätsgrade I bis III*. Da die zytologischen Malignitätsgrade mit prognostisch relevanten Parametern der Ploidieverteilung von Tumorzellkernen korrelieren, dürften sie auch selbst ein valides Maß für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Prostatakarzinompatienten darstellen.

Reproducible Grading of Prostatic Carcinoma Based on Cytological Criteria of Malignancy

A new system for the cytological grading of malignancy of prostatic carcinomas is described. The interspecific reproducibility of this grading was found to be 86%. It is thus better than that of the classical grading of *Espoti*. Six diagnostic criteria of prognostic significance are rated from one to three according to their deviation from the normal: Nuclear area, variability of nuclear area, nucleolar size, variability of nucleolar size, dissociation of cells and regularity of nuclear arrangement. Three grades of malignancy result from the sum of rating numbers. As these cytological grades of malignancy do correlate with criteria of DNA-distribution of tumor cell nuclei, which are of prognostic significance, it is supposed that the grades are a valid index for the probability of survival of prostatic carcinoma patients.

Key-Words: Grading – Grade of malignancy – Prostatic carcinoma – Aspiration biopsy – Cytology

10 normale Prostatae bzw. Prostatahyperplasien,
10 granulomatöse Prostatitiden und
32 Karzinome unterschiedlichen Differenzierungsgrades.

Die Präparate waren alkoholfixiert (Merckofix®) und nach *Papanicolaou* (15) gefärbt. Von jedem Präparat wurden nach Zufallskriterien je zehn Schwarzweißfotos bei 60-, und zehn bei 200facher Primärvergrößerung angefertigt und auf ein Endformat von 18×24 cm vergrößert (entsprechend 380 und 1520facher Vergrößerung). Um die diagnostischen Kriterien in ihrer Ausprägung quantifizieren zu können, wurden sie so formuliert, daß sie einer Messung mittels halbautomatischer Bildanalyse oder Zytophotometrie zugänglich wurden (siehe Tab. 1). Umfänge, Flächen und Entfernungen wurden auf den Fotos mit dem Gerät *Digiplan* (Kontron, München) durch einfaches Umfahren der Strukturen oder durch Antippen von Bildpunkten mit einem sog. Cursor gemessen (Auflösung = 0,1 mm). Pro Bild wurden nach Zufallskriterien 15 Zellkerne bzw. ein definiertes Zytoplasmaareal ermittelt. Formabweichungen der Kerne vom Kreis wurden durch den *Formquotienten* (FQ) bestimmt, der für einen Kreis 1 beträgt.

$$FQ = \frac{PN}{2\sqrt{\pi \cdot AN}} \quad (PN = \text{Kernumfang, } AN = \text{Kernfläche}).$$

Tab. 1 Quantifizierung diagnostischer Kriterien durch Bestimmung verschiedener bildanalytischer Parameter

Diagnostisches Kriterium:	Quantifizierung durch Messung von:
Nukleolen	Anzahl der Kerne mit Nukleolen Größter Nukleolendurchmesser pro Kern Mittlere Nukleolenzahl pro Kern
Kerngröße	Größter Kerndurchmesser Kernfläche
Anisonukleose	Variabilität der Kerndurchmesser und -flächen; Verhältnis der Durchmesser des größten und des kleinsten Kernes
Kernpolymorphie Kernelongation Kernmembranundulation	Formquotient (FQ) Elongationsquotient (EQ) Undulationsquotient (UQ)
Kernordnung	Rate der Kernüberlagerungen Flächenanteil der Kernüberlagerungen Variabilität der Kernabstände
Kernplasmarelation	Zytoplasmafläche pro Kernfläche Mittlerer Kernabstand
Zelldissoziation	Umfang-Flächen-Verhältnis der Zellkomplexe Zahl der Nacktkerne
Kernanfärbbarkeit Hyperchromasie Heterochromasie	Mittlere Kerndichte (Extinktion pro Fläche) Variabilität der Kerndichte

Unregelmäßigkeiten der Kernkontur wurden mit Hilfe eines Undulationsquotienten (UQ) bestimmt, der für Kreise und Ellipsen 1 beträgt.

$$UQ = \frac{2 \pi N^2}{\pi \cdot (D_{\max}^2 + D_{\min}^2)} \quad (D_{\max}, D_{\min} = \text{größter und kleinster Durchmesser eines Zellkerns}).$$

Das Achsenverhältnis der Zellkerne wurde durch einen Elongationsquotienten (EQ) quantifiziert, der für einen Kreis ebenfalls 1 beträgt.

$$EQ = \frac{D_{\max}}{D_{\min}} \cdot \frac{N}{N}.$$

Zur Messung der Kernanfärbbarkeit wurde das Verhältnis der Extinktion zur Fläche an je 50 Zellkernen pro Fall bei 535 nm mit einem Vickers M 86 Scanning-Microdensitometer bestimmt (14, 3). Die etwa 85 000 Primärdaten der halbautomatischen Bildanalyse wurden on line über ein Interface in einen Elektronenrechner (Hewlett-Packard 9815A) eingespeist und dort in ca. 250 000 abgeleitete Daten umgerechnet (Mittelwerte, Standardabweichungen, Quotienten). Mit diesen Daten wurde eine Varianzanalyse gerechnet, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen in den einzelnen diagnostischen Parametern zu bestimmen (3).

Um die prognostisch relevanten diagnostischen Kriterien zu ermitteln, wurden die Korrelationen berechnet, die zwischen jedem gemessenen diagnostischen Parameter und zwei Ausdrücken der Ploidie-Verteilungsstörung bestehen. Diese Ausdrücke (2c Deviation-Index = 2c DI und 4,5c Exceeding-Rate = 4,5c ER) wurden an den identischen Zellen ermittelt, an denen auch die Bildanalyse vorgenommen worden war. Dazu wurden die zytologischen Präparate entfärbt und nach Feulgen (9) zur zytophotometrischen Zellkern-DNS-

Bestimmung gefärbt (16, 17, 5, 3). Die Extinktionsmessungen der mit pararosanilgefärbten Zellkerne erfolgte an einem Zeiss UMSP I (Ultramikrospektrophotometer) bei 570 nm (100 Zellkerne pro Fall). 2c DI und 4,5c ER sind Ausdrücke zur Quantifizierung der prognostisch relevanten Ploidie-Verteilungsstörung und sollen gut mit der Prognose korrelieren (18, 4, 3).

Ergebnisse

Wie Tabelle 2 zeigt, ließen in der Prostatazytologie mehrere klassische zytologisch-diagnostische Tumorkriterien keine Korrelation mit prognostisch validen Kriterien der Ploidie-Verteilung (2c DI und 4,5c ER) erkennen: Kernpolymorphie, Kernplasmarelation, Hyperchromasie und Heterochromasie der Zellkerne.

Zytologisch-diagnostische Kriterien, die mit prognostisch relevanten Parametern der Ploidie-Verteilung beim Prostatakarzinom korrelieren und damit selbst prognostisch valide sein dürften, sind dagegen nach diesen Untersuchungen:

Die *mittlere Kerngröße*, die *Kerngrößenvariabilität* (Anisonukleose), die *mittlere Nukleolengröße*, die *Nukleolengrößenvariabilität*, die *mittleren Kernabstände* und deren *Variabilität* (entspricht der Ordnung der Kernlagerung) sowie die *Zelldissoziation* (für die sowohl die Zahl der Nacktkerne als auch die mittleren Kernabstände ein Maß ist).

Danach ergibt sich ein zytologisches Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms, in dem unabhängig voneinander in jeweils demselben Zellkomplex die folgenden 6 Kriterien in ihrer Ausprägung von 1–3 bewertet werden (siehe Abb. 9):

- Kerngröße,
- Kerngrößenvariabilität,
- Nukleolengröße,
- Nukleolengrößenvariabilität,
- Zelldissoziation,
- Kernabstandsvariabilität.

Die sechs Bewertungsziffern werden addiert, wobei eine Bewertungsziffernsomme 6–10 dem Malignitätsgrad I (Abb. 3 und 4),

Tab. 2 Korrelation verschiedener zytologisch-diagnostischer Kriterien mit prognostisch relevanten Parametern der Ploidie-Verteilung (2c DI = 2c Deviation-Index, 4,5c ER = 4,5c Exceeding Rate)

Zytologisch-diagnostisches Kriterium	Korrelation mit	
	2c DI	4,5c ER
Kerngröße	+++	+++
Kerngrößenvariabilität	+++	+++
Nukleolengröße	+	++
Nukleolengrößenvariabilität	++	++
Kernabstände	++	++
Kernabstandsvariabilität	++	+
Zahl der Nacktkerne	0	+
Kernpolymorphie	0	0
Kernplasmarelation	0	0
Kernhyperchromasie	0	0
Kernheterochromasie	0	0

+++ = $r > 0.8$ = stark positive Korrelation

++ = $r > 0.6$ = mäßig positive Korrelation

+ = $r > 0.4$ = schwach positive Korrelation

0 = $r < 0.4$ = keine Korrelation

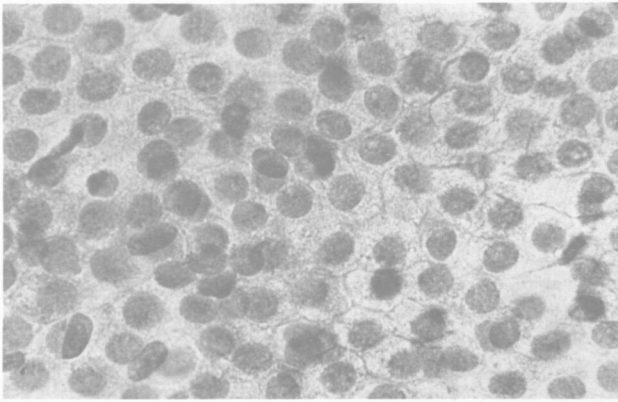


Abb. 1 Epithelien aus normaler Prostata.

Abb. 1–8 Zytologische Ausstriche transrektaler Aspirationsbiopsien der Prostata, gefärbt nach *Papanicolaou*, Vergrößerung 530 $\times$.

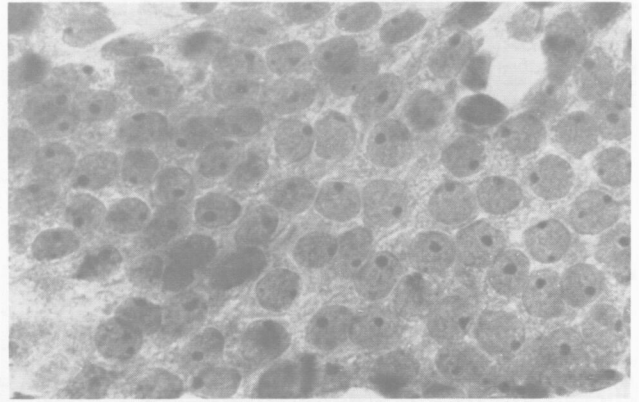


Abb. 4 Prostatakarzinom Grad I.

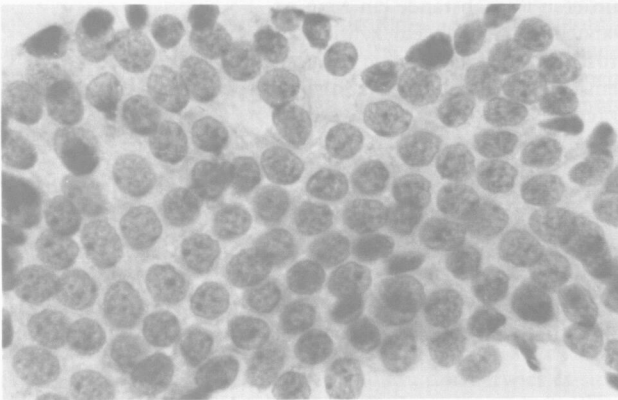


Abb. 2 Aktivierte Epithelien einer Prostatitis.

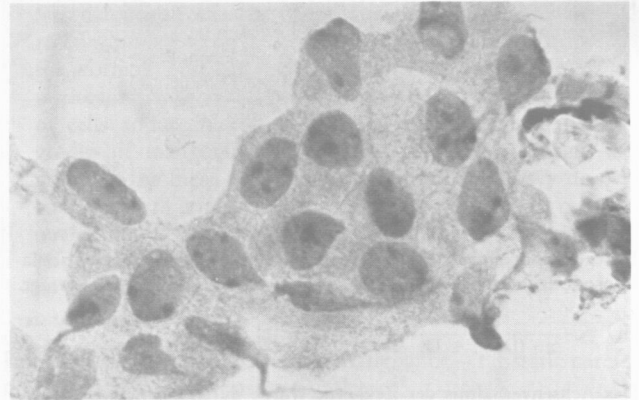


Abb. 5 Prostatakarzinom Grad II.

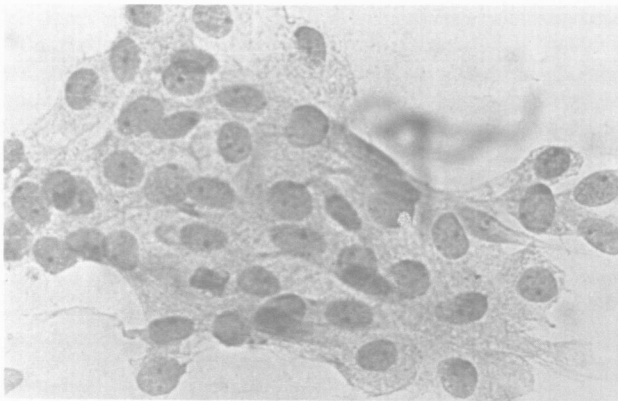


Abb. 3 Prostatakarzinom Grad I.

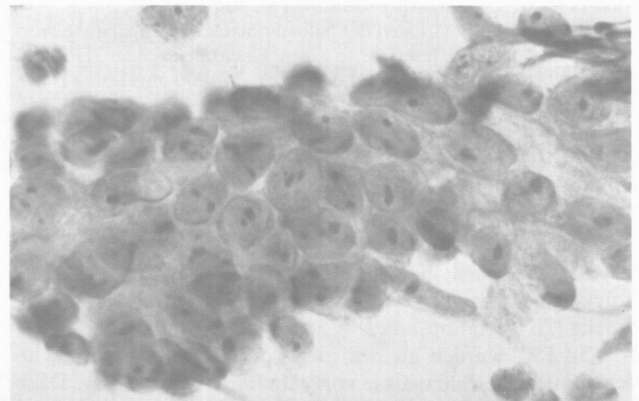


Abb. 6 Prostatakarzinom Grad II.

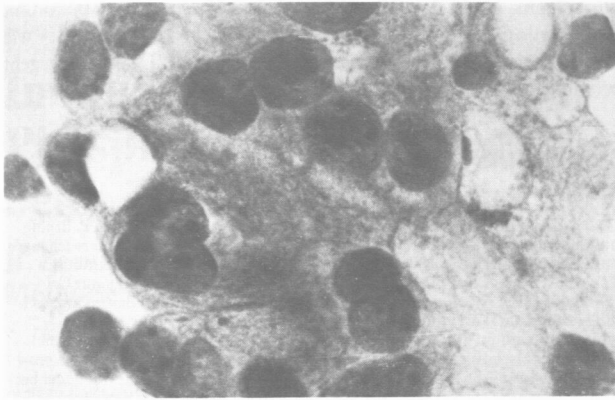


Abb. 7 Prostatakarzinom Grad III.

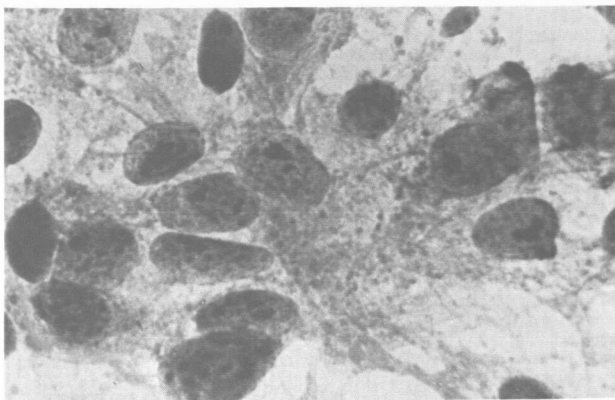


Abb. 8 Prostatakarzinom Grad III.

11–14 Grad II (Abb. 5 und 6) und 15–18 Grad III (Abb. 7 und 8) entspricht.

Maßgeblich für den Malignitätsgrad des gesamten Untersuchungsmaterials sind die Zellkomplexe mit dem höchsten Malignitätsgrad. Bei einer Grading von 20 Prostatakarzinomen nach diesem Schema durch 6 erfahrene Zytologen, die ohne Einübungszeit anlässlich der Vorstellung dieses Verfahrens auf einem Workshop durchgeführt wurde, konnte eine interspezifische Reproduzierbarkeit von 86% erzielt werden (13).

Diskussion

Grading nennt man die Unterteilung histogenetisch einheitlicher Tumoren in Gruppen mit unterschiedlicher Dignität und Prognose aufgrund histologischer, zytologischer oder zytochemischer Kriterien. Der Tumorgrad muß ein valides Maß für die

Überlebenswahrscheinlichkeit sein! Dazu müssen die zum Grading verwendeten Kriterien selbst in ihrer Ausprägung mit der Überlebenswahrscheinlichkeit korrelieren. Ferner müssen die Gradingsergebnisse bei verschiedenen Untersuchern dieselben sein, d. h. es muß interspezifisch reproduzierbar sein. Dies ist nur erreichbar, wenn die Gradingkriterien objektivierbar sind. Das zytologische Gradingsschema für das Prostatakarzinom nach *Esposti* (7, 8) ergab zwar bei Anwendung durch den Autor selbst prognostisch valide Aussagen, aber es ist schlecht durch andere reproduzierbar (19, 3). Auch nach der Analyse bildanalytischer Meßergebnisse nach *Esposti* gradierter Prostatakarzinomen ist es uns nicht gelungen, diese Kriterien objektiv zu definieren. Weder stellen die 3 Tumorgade feststehende Merkmalskombinationen (Muster) dar, noch sind sie durch Zahl oder Ausprägung einzelner zytologischer Kriterien zu definieren. Wir werten dies als Grund für die geringe interspezifische Reproduzierbarkeit des *Esposti* Grading. Um ein neues klinisch valides und reproduzierbares zytologisches Grading des Prostatakarzinoms zu entwerfen, haben wir zunächst versucht, diejenigen zytologischen Kriterien zu ermitteln, die selbst mit der Prognose korrelieren. Dazu wurden die bekannten zytologischen Kriterien mit Hilfe halbautomatischer Bildanalyse und Zytophotometrie quantifiziert. Durch eine Kreuzvalidierung mit Parametern der Ploidie-Verteilung von Tumorzellkernen, die ihrerseits ein Dignitätsmaß darstellen, konnten prognostisch valide von unvaliden Kriterien getrennt werden. Dabei erwiesen sich als nicht mit der Prognose korrelierende Kriterien: das Ausmaß der Kernpolymorphie, der Kernplasmarelation, der Kernhyperchromasie und -heterochromasie. Das besagt nicht, daß sie nicht doch für die diagnosti-

Zytologisches Grading des Prostatakarzinoms

	Bewertungsziffer		
	1	2	3
Kern-größe			
Kern-größenvariabilität			
Nukleolen-größe			
Nukleolen-größenvariabilität			
Zelldissoziation			
Kernabstandsvariabilität			

Abb. 9 Schematische Darstellung der reproduzierbaren zytologischen Grading des Prostatakarzinoms durch Bestimmung der Ausprägung von sechs verschiedenen diagnostischen Kriterien. Der schwarze Punkt rechts oben stellt jeweils die Größe der Erythrozyten dar.

sche Unterscheidung zwischen benigne und maligne valide sein können.

Als prognostisch relevante Kriterien wurden dagegen ermittelt: das Ausmaß 1. der Zellkerngröße, 2. der Kerngrößenvariabilität, 3. der Nukleolengröße, 4. der Nukleolengrößenvariabilität, 5. der Zelldissoziation und 6. der Kernordnung.

Im Prinzip ließe sich ein Grading des Prostatakarzinoms schon mit einem dieser Kriterien durchführen. Da Grading aber ein subjektives Verfahren ist, besteht dabei die Möglichkeit einer subjektiven Fehleinschätzung. Außerdem kann es vorkommen, daß im Einzelfall die Korrelation eines Parameters allein mit der Prognose doch nicht so eng ist, wie es wünschenswert wäre (z. B. durch fixationsbedingte Artefakte). Die Möglichkeit eines Irrtums durch eine subjektive Fehleinschätzung oder wegen fehlender Korrelation eines Parameters mit der Prognose wird im Einzelfall stark reduziert, wenn man mehrere unabhängig voneinander mit der Prognose korrelierende Kriterien bewertet. Dies ist im hier vorgestellten, neuen zytologischen Grading für das Prostatakarzinom gemacht worden. 6 prognostisch relevante zytologische Kriterien werden dabei unabhängig voneinander in ihrer Ausprägung von 1–3 bewertet und die Bewertungsziffern addiert. Aus der Summe der Bewertungsziffern ergibt sich dann der Tumorgrad (6–10 = Grad I: Abb. 3 und 4; 11–14 = Grad II: Abb. 5 und 6; 15–18 = Grad III: Abb. 7 und 8). Da der am geringsten differenzierte Tumoranteil mit der höchsten Proliferationsrate (10, 11) die maligne Potenz des Tumors bestimmt, ist es sinnvoll, ihn nach diesem zu benennen. Ein und derselbe Tumorgrad ist demnach nicht durch die feststehende Kombination von zytologischen Merkmalen definiert und repräsentiert kein feststehendes Muster von diagnostischen Kriterien, sondern kann durchaus verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen entsprechen (siehe Abb. 3–8). Die so objektiv definierten diagnostischen Kriterien sind auch der Messung mit bildanalytischen Verfahren zugänglich (3). Die verbesserte Objektivierbarkeit dieses Grading wurde belegt durch eine interspezifische Reproduzierbarkeit von 86% innerhalb von 6 Zytologen der Pathologischen Arbeitsgruppe »Prostatakarzinom« (13). Voeth et al. (19) ermittelten für das herkömmliche Malignitäts-Grading dagegen eine Reproduzierbarkeit von nur 61%. Da die verwendeten Kriterien mit der Prognose korrelieren, ist zu erwarten, daß auch die resultierenden Tumorgrade I–III ein valides Maß für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten darstellen. Nach ersten Erfahrungen der Pathologisch-Urologischen Arbeitsgruppe »Prostatakarzinom« mit dem hier vorgestellten zytologischen Grading bedeutet dessen Anwendung nur für eine kurze Phase des

Umlernens einen zeitlichen Mehraufwand. Danach bekommt der Zytologe die relevanten Kriterien ebenso »in den Blick« wie die vorher verwendeten Bildmuster, und die Diagnostik geht wieder ebenso rasch vonstatten.

Literatur

- (1) Baron, E., A. Angrist: Incidence of occult adenocarcinoma of the prostate after fifty years of age. *Arch. Pathol.* 32 (1941) 787–793
- (2) Böcking, A.: Zytologisches Grading des Prostatakarzinoms: Objektivität und Validität. 8. Dreiländertagung für klinische Zytologie, 6. 5. 1979, Freiburg i. Br.
- (3) Böcking, A.: Grading des Prostatakarzinoms. *Habilitationsschrift Med. Fak. Univ. Freiburg* 1980.
- (4) Böcking, A., H. Sommerkamp: Malignitäts-Grading des Prostatakarzinoms durch Analyse der DNS-Verteilung. 32. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 10.–13. 9. 1980, Berlin
- (5) Böhm, N., W. Sandritter: DNA in human tumors: A cytophotometric study. *Curr. Top. Pathol.* 60 (1975) 151–219
- (6) Breslow, N., C. W. Chan, G. Dhom, R. A. B. Drury, L. Franks, B. Gellei, Y. S. Lee, S. Lundberg, B. Sparke, N. H. Sternby, H. Tulinius: Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. *Int. J. Cancer* 20 (1977) 680–688
- (7) Esposti, P. L.: Cytologic diagnosis of prostatic tumors with the aid of transrectal aspiration biopsy. A critical review of 1 110 cases and a report of morphologic and cytochemical studies. *Acta cytol.* 10 (1966) 182–186
- (8) Esposti, P. L.: Cytologic malignancy grading of prostatic carcinoma by transrectal aspiration biopsy. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 5 (1971) 199–205
- (9) Feulgen, R.: Neue Wege zum biologisch-histologischen Studium der Zellkerne. a) Nuclealfärbung, ein mikrochemischer Nachweis der Thymonucleinsäure. b) Über das Vorkommen von nuclealem Chromatin. *Ber. ges. Physiol.* 22 (1924) 489–490
- (10) Helpap, B., R. Stiens, P. Brühl: Autoradiographische Untersuchungen an inkubierten Prostatapunktaten nach Doppelmarkierung mit C-14- und H-3-Thymidin. *Beitr. Path.* 151 (1974) 65–74
- (11) Helpap, B., R. Stiens, P. Brühl: The proliferative pattern of the prostatic carcinoma before and under hormonal treatment. *Z. Krebsforsch.* 87 (1976) 311–320
- (12) Kirchheim, D.: Das Prostatakarzinom. *Dtsch. Ärztebl.* 77 (1980) 807–814
- (13) Müller, H.-A., E. Altenähr, A. Böcking, G. Dhom, P. Faul, H. Göttinger, B. Helpap, Ch. Hobbach, H. Kastendieck, W. Leistenschneider: Über Klassifikation und Grading des Prostatakarzinoms. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 64 (1980) 609–611
- (14) Noeske, K., H. Ebner: Zum Problem der Hyperchromasie. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 49 (1965) 327–330
- (15) Papanicolaou, G. N.: The diagnostic value of cancer smears. *J. Amer. Med. Ass.* 131 (1940) 372–378
- (16) Sandritter, W.: Über den Nukleinsäuregehalt in malignen Geschwülsten. *Naturwissenschaften* 39 (1952) 46–47
- (17) Sandritter, W., M. Carl, W. Ritter: Cytophotometric measurements of the DNA-content of human malignant tumors by means of the Feulgen reaction. *Acta cytol.* 10 (1966) 26–30
- (18) Tavares, A. S., J. Costa, M. J. Costa: Correlation between ploidy and prognosis in prostatic carcinoma. *J. Urol.* 109 (1973) 676–679
- (19) Voeth, Ch., M. Droese, G. Steuer: Erfahrungen mit dem zytologischen Grading beim Prostatakarzinom. *Urologe A* 17 (1978) 367–370

Priv.-Doz. Dr. med. A. Böcking
Pathologisches Institut der Universität
Albertstraße 19, 7800 Freiburg i. Br.