

DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik

A. Böcking

Institut für Pathologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule, Aachen

Einleitung

Die speziellen Indikationen für den Einsatz der zytologischen Diagnostik in der Medizin ergeben sich heute aus der Notwendigkeit, Zellen in *Körperflüssigkeiten* (Liquor, Urin, Ergüsse, Sputum) auf Krankhaftigkeit hin untersuchen zu müssen und aus der, verglichen mit einer Gewebsentnahme, ungleich weniger belastenden und komplikationsarmen Art der Materialgewinnung. Dies gilt vor allem für die *Exfoliativ-Zytologie* (Gebärmutterhals-, Genital-, Mund-, Rachen-, Kehlkopfschleimhaut- oder Hautabstriche), aber auch für die *moderne Feinnadelpunktionszytologie* (ZNS, Speicheldrüsen, Lymphknoten, Schilddrüse, Lunge, Mediastinum, Mamma, Leber, Pankreas, Prostata, Nieren). Letztere hat durch den Einsatz moderner bildgebender Verfahren, wie Ultraschall und Computertomographie erheblich an Treffsicherheit gewonnen. Damit können nunmehr zielgenau auch wenige Millimeter große Raumforderungen mit einer dünnen Aspirationsnadel (0,6–0,7 mm) getroffen werden [36, 104].

Es stellt ein ethisches Gebot dar, auf eine Gewebsentnahme für die Histologie immer dann zugunsten einer Zellgewinnung für die Zytologie zu verzichten, wenn die diagnostische Fragestellung mit einer der Histologie ebenbürtigen Sicherheit auch durch die Zytologie beantwortet werden kann. Die moderne Zytopathologie hat zwar auch eigene, von der Histopathologie unabhängige Indikationen, sie macht ihr in manchen Gebieten heute aber auch Konkurrenz. Der Kliniker muß daher vor der Materialentnahme seine diagnostische Fragestellung präzisieren, um die Frage nach der indizierten Art der Material-

gewinnung beantworten zu können. (Dignitäts-Bestimmung, histogenetische Tumor-Klassifikation, Malignitäts-Grading, Regressions-Grading?)

Sodann muß er, im Hinblick auf das zu untersuchende Organ und die darin zu erwartenden Raumforderungen abwägen, ob die gegebene Fragestellung zytologisch mit einer der Histologie vergleichbaren Treffsicherheit beantwortet werden kann. Dazu müssen Sensitivitäten, Spezifitäten und Klassifikationsgenauigkeiten organspezifisch für *Zytologie und Histologie* bekannt sein [37].

Schwächen der zytologischen Tumordiagnostik ergeben sich häufig durch

1. die Spärlichkeit des Untersuchungsmaterials,
2. das Fehlen der Möglichkeit an Nachschnitten Zusatzfärbungen oder immunhistochemische Reaktionen anzubringen,
3. die verlorengegangene Verbandsstruktur der Zellen.

Dies schlägt sich insbesondere bei der histogenetischen Klassifikation gelegentlich in einer mangelhaften Präzision nieder.

Aus der Abwägung von Vor- und Nachteilen der Zytodiagnostik ergeben sich heute folgende Hauptindikationen:

1. Massen- und Risikogruppen-Screening zur Krebsfrühdiagnose bei geeigneten Lokalisationen (Lunge, Zervix, Harnblase).
2. Präoperative Tumordiagnostik zur spezifischen Planung der Operationsstrategie (die präzise Tumortypisierung erfolgt am Resektat (z. B. Mamma-, Speicheldrüsen-, Pankreaskarzinom).
3. Tumornachsorge mit Therapiemonitoring, Rezidiv- und Metastasendiagnostik (z. B. Mammakarzinom, Prostatakarzinom).
4. Definitive, prätherapeutische Tumordiagnostik bei ausgewählten, nicht zu operierenden Tumoren (z. B. Bronchial- und Prostatakarzinom).
5. Untersuchungen von Körperflüssigkeiten auf Tumorzellen.

Um ein Massenscreening, als Domäne der Zytologie zur Frühdiagnose geeigneter Tumoren zu ermöglichen, müssen genügend diagnostische Kapazitäten geschaffen und die Untersuchungen treffsicher sowie preiswert angeboten werden. Zu diesem Zweck werden seit den 70er Jahren Zytoautomaten entwickelt, über deren heutigen Leistungsstand in einem der folgenden Kapitel dieser Arbeit berichtet wird.

Methodische Innovationen in der zytologischen Tumordiagnostik

Es muß das Ziel der klinischen Zytologie sein, durch methodische Verbesserungen und Neuerungen, die diagnostische Leistungsfähigkeit der Methode stetig zu verbessern, um mehr Patienten eine risikoreichere und belastendere Gewebsentnahme für eine histologische Untersuchung zu ersparen. Darüber hinaus kann die Zytologie bei speziellen Fragestellungen versuchen, qualitativ bessere Diagnosen als die Histologie zu stellen. Da sich am zytologischen Untersuchungsmaterial bestimmte Untersuchungstechniken besser, als an histologischem Material durchführen lassen (z. B. Zellkern-DNA-Messungen, Morphometrie), kann daran auch eine der Histologie überlegene diagnostische Qualität erreicht werden. Dies gilt insbesondere für die diagnostischen Dimensionen der

- Dignitätsdiagnose und des
- Malignitätsgrading,

während die histogenetische Tumorklassifikation, auch unter Zuhilfenahme der Immunhistochemie, bis auf wenige Ausnahmen, vorerst noch Domäne der Histologie bleibt.

Unter allen, bis heute im Hinblick auf ihre routinemäßige diagnostische Verwendbarkeit untersuchten Zell- und Gewebsparametern, hebt sich der Zellkern-DNA-Gehalt heraus. In einer Literaturrecherche zählten wir kürzlich mehr als 1500 Publikationen, die sich seit den 50er Jahren mit der DNA-Zytometrie menschlicher Tumoren befassen. Das heutige Wissen über Zellkern-DNA und Tumoren, sowie die Technologie der zur Verfügung stehenden Meßapparaturen hat ein Stadium erreicht, das es erlaubt, die DNA-Zytometrie als adjuvante Methode in die routinemäßige Tumordiagnostik bei Problemen der Dignitätsbestimmung des Malignitätsgrading einzuführen.

Die Morphometrie dagegen steht in einem viel früheren Stadium ihrer Entwicklung. Sie ist über das Sammeln von Daten kaum hinausgekommen und kann heute noch nicht den Anspruch stellen, routinemäßige diagnostische Hilfestellungen anzubieten. Dies liegt vor allem an der Artefaktanfälligkeit morphometrischer Parameter (vor allem durch die Fixation), dem Fehlen eines internen Eichstandards und der Tatsache, daß für jedes Gewebe eigene Analyse- und Interpretationsalgorithmen entwickelt werden müssen. Diese erweisen sich als ungleich komplexer als solche, die für die diagnostische DNA-Zytometrie erforderlich sind.

Im folgenden sollen daher die biologischen Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie erläutert, Meßapparaturen und Interpretationsalgorithmen vorgestellt und diagnostische Resultate präsentiert werden.

Biologische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie

Dignitätsdiagnose

Mit Ausnahme der Keimzellen enthalten menschliche Zellkerne je 2×23 Chromosomen ($2 \times 22 + xx$ bzw. xy), entsprechend einem doppelten Chromosomensatz, genannt $2c$. Vor Zellteilungen liegt in der G₂-Phase des Zellzyklus ein 4facher Chromosomensatz vor, entsprechend $4c$. In manchen Geweben kommt es aber, z. B. bei Hypertrophie des Herzmuskels, zu regelhaften Vervielfachungen des Chromosomensatzes, entsprechend den ganzzahligen Potenzen des $2c$ -Wertes $2^n c$ ($n = 1, 2, 3, 4 \dots$), also $4c, 8c, 16c, 32c$.

Diesen Vorgang nennt man euploide Polyploidisierung. Polyploide Chromosomensätze findet man z. B. in Schilddrüsenepithelien, Mesothelien, Leberepithelien, Samenblasenepithelien und Urothelzellen sowie als Folge mancher zytologisch nachweisbarer Virusinfekte (z. B. HPV). Eine euploide Polyploidisierung wird auch bei manchen gutartigen Tumoren beobachtet. In der Synthesephase des Zellzyklus kann ein entsprechender Prozentsatz von Zellen DNA-Gehalte zwischen diesen ganzzahligen Potenzen des $2c$ -Wertes aufweisen [152].

Numerische oder strukturelle Abweichungen von diesen Chromosomensätzen, bzw. den diesen entsprechende DNA-Gehalte, nennt man Aneuploidie (Abb. 1). Kommt es zur Aneuploidie in einer befruchteten Eizelle, so führt dies meist zum Absterben der Frucht mit Abort.

Nur wenige Typen aneuploider Chromosomenstörungen sind lebensfähig.

Die Kinder mit derartigen angeborenen Chromosomenstörungen weisen Mißbildungssyndrome auf, z. B. Mongolismus, bei dem das Chromosom 21 in jeder Körperzelle dreimal vertreten ist. In diesen Fällen weisen aber alle Zellen des betreffenden Individuums dieselbe, aneuploide Chromosomenstörung auf. Isolierte numerische oder

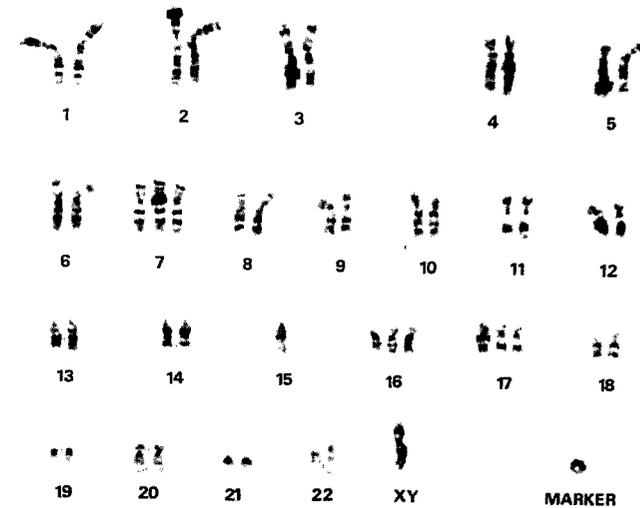


Abb. 1. Chromosomenkonstellation einer Zelle eines renalen Adenokarzinoms mit numerischen und strukturellen Aberrationen (= chromosomale Aneuploidie). (Präparation: Dr. Füzesi, Institut für Pathologie, RWTH Aachen).

strukturelle Chromosomenaberrationen treten ansonsten in euploiden Organismen nur bei (meist malignen) Tumoren auf (Abb. 1).

Chromosomale Aneuploidie gilt daher in der Zytogenetik als harter Marker für neoplastische Zellen [87]. Dies bedeutet, daß der Nachweis von Zellen mit aneuploiden Chromosomensätzen dem Nachweis neoplastisch transformierter Zellen gleichkommt [5, 93, 135, 159]. So wird z. B. in der Praxis der zytogenetische Nachweis aneuploider Zellen in der zytologischen Diagnose von Pleuraergüssen als Marker für Malignität genutzt [87]. Durch Einwirkung ionisierender Strahlung oder zytostatischer Agenzien kann allerdings Aneuploidie auch in gutartigen Geweben entstehen. Will man Aneuploidie als Marker für einzelne maligne Zellen benutzen, so muß man diese beiden Einwirkungen ausschließen. Eine ganz Population proliferierender gutartiger Zellen wird durch Bestrahlung oder Zytostatika allerdings nicht aneuploid. Damit kann der Nachweis einer aneuploiden Stammlinie auch nach Bestrahlung oder Zytostatikatherapie als Marker für Malignität gelten.

Weniger die Tumorzytogenetik als die DNA-Zytophotometrie hat sich in den vergangenen Jahren der Aneuploidie als Marker für neoplastische Zell-Transformationen bedient [5, 17, 18, 23, 85, 86, 137, 151, 188].

Ein Zellkern-DNA-Gehalt gilt in der DNA-Zytometrie dann als «aneuploid», wenn er keinem normalen, euploiden oder polyploiden Chromosomensatz entsprechen kann. Aus dem oben Gesagten, kann daher abgeleitet werden, daß in nicht polyploidisierenden Geweben Zellkern-DNA-Gehalte $>4c$ im Prinzip als «aneuploid» anzusehen sind. Berücksichtigt man jedoch den Gesamtfehler der Feulgen DNA-Zytophotometrie, so sollten erst Zellkerne mit einem DNA-Gehalt $>5c$ als «aneuploid» gewertet werden (Abb. 6). Um den Fehler durch eine evtl. nicht erkannte Polyploidisierung auszuschließen, kann man sicherheitshalber die Werte $\pm 12,5\%$ um die ganzzahligen Potenzen des $2c$ -Wertes zusätzlich von der Annahme aneuploider Zellen ausschließen. Die absolute Zahl so definierter, aneuploider Zellen über $5c$ heißt « $5c$ exceeding events» [37], der Prozentsatz « $5c$ exceeding rate» [29, 35]. Bei Ausschluß einer Strahlen- oder Zytostatikatherapie kann in nicht polyploidisierenden Geweben der Nachweis von drei oder mehr Zellkernen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$ als Marker für Malignität gelten. Im Prinzip reicht in der Tumorzytogenetik eine eindeutig als aneuploid erkannte Zelle aus, um Neoplasie zu diagnostizieren [87, 159]. Um aber auszuschließen, daß es sich bei dieser einen Zelle um eine letale Mutation handelt und um mögliche Fehler der Methode zu berücksichtigen, wurde die Zahl von drei aneuploiden Zellen mit einem DNA-Gehalt ≥ 5 als Grenzwert für den Neoplasienachweis vorgeschlagen. Dieses Vorgehen entspricht dem der Tumorzytogenetik, da sich der Begriff Aneuploidie auf einzelne Zellen und nicht primär auf eine ganze Zellpopulation bezieht.

In Geweben, in denen eine euploide Polyploidisierung bis $8c$ beschrieben ist, kann sinngemäß der Nachweis von drei oder mehr Zellen mit einem DNA-Gehalt $>9c$ als Marker für Neoplasie gelten [47].

Die klassische DNA-Zytophotometrie bezieht jedoch den Begriff Aneuploidie auf den Modalwert einer Zellpopulation, d. h. auf den am häufigsten vorkommenden Wert (= peak). Liegt dieser Modalwert in einem «aneuploiden» Bereich, wird Aneuploidie der gesamten Population angenommen (Abb. 7). Man spricht dann z. B. von einem «aneuploiden» Tumor, obwohl lediglich die meisten, nicht

aber alle Zellkerne einen «aneuploiden» DNA-Gehalt aufweisen. Ein Modalwert, der außerhalb von $2c \pm 2 \times CV$ ($CV =$ Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation) liegt, wird z. B. als «aneuploid» gewertet [81]. Bei polyploidisierenden Geweben wird ein Modalwert außerhalb von $2^n c \pm 2^n c \times CV$ «aneuploid» gewertet. Diese konservative Interpretation der DNA-Werte hinsichtlich des Vorliegens von Aneuploidie ist als sehr sicher (spezifisch) anzusehen, jedoch auch als relativ insensitive, da erst dann Aneuploidie angenommen wird, wenn die Mehrzahl der Zellen entsprechend veränderte Chromosomensätze aufweist. Das bedeutet in der Praxis, daß über den Nachweis einer «aneuploiden» Stammlinie die Malignitätsdiagnose bei vielen Tumoren erst relativ spät erfolgen kann, weil erst spät im Verlauf der «natural history» mancher Tumoren die Mehrzahl der Zellen zytophotometrisch erkennbare Aneuploidie aufweisen, während eine geringe Zahl schon frühzeitig eindeutig «aneuploid» ist. Eine Frühdiagnose von Malignität wird also mit der Stammlinien-Interpretation von Aneuploidie weniger sensitiv als mit der Einzelzell-Interpretation sein, dafür möglicherweise spezifischer. Um den Nachweis «aneuploider» Zellen bzw. einer «aneuploiden» DNA-Verteilung zu führen, ist es sinnvoll, morphologisch oder von der Farbtintensität her eher verdächtige bzw. klar als atypisch erkennbare Zellen zur Messung auszuwählen, d. h., daß z. B. in einem Abstrich mit normalen und dysplastischen Zellen gezielt letztere zur Messung aufgesucht werden müssen. Es ist nicht sinnvoll, bei der Suche nach «aneuploiden» Zellen oder DNA-Verteilungen, außer zur Eichung, normale Zellen mitzumessen. Da es gilt, das u. U. seltene, aber für Malignität beweisende Ereignis weniger, «aneuploider» Zellen zu finden, ist es erlaubt, a priori die morphologisch verdächtigsten Zellen zu suchen und zu messen, da diese, und nicht normale Zellen, möglicherweise «aneuploide» DNA-Gehalte aufweisen.

Malignitäts-Grading

Aus der Zytogenetik ist bekannt, daß bei manchen soliden Tumoren des Menschen das Ausmaß chromosomaler Aberrationen mit der Prognose der Krebspatienten korreliert [87]. Sandberg zeigte 1986 für das Harnblasenkarzinom, daß nicht invasive Tumoren der

histologischen Grade I und II meist nahe diploide Karyogramme aufwiesen und nur gelegentlich Markerchromosomen, während Grad-III-Tumoren meist stark aneuploid waren und reichlich Markerchromosomen enthielten. Oberflächlich invasive Grad-II-Tumoren zeigten mehr Aberrationen als nicht invasive Tumoren. Massive chromosomale Aberrationen dagegen fanden sich vor allem in aggressiven Tumoren. Bei den nicht invasiven, papillären Tumoren zeigten 90% der Fälle mit Markerchromosomen Rezidive, aber nur 5% der Fälle ohne Chromosomen-Anomalien. Pauwels [135] zeigte für das Harnblasenkarzinom, daß weniger die am häufigsten vorkommenden Chromosomenanomalien (modal value), als vielmehr die Variabilität der beobachteten, verschiedenartigen Chromosomenanomalien (range) in einem Tumor prognostisch relevant ist. Diesen Beobachtungen aus der Tumorzytogenetik entsprechen seit ca. 20 Jahren Beobachtungen der DNA-Zytophotometrie der verschiedensten malignen Tumoren. Schon früh beschrieben beispielsweise Tavares et al. [173] eine statistisch signifikant bessere Prognose für Harnblasen- und Prostatakarzinome, die eine Stammlinie im «diploiden» oder «tetraploiden» Bereich aufwiesen gegenüber Tumoren mit «aneuploiden» Stammlinien im 3c-6c-Bereich. Auch für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, daß Patienten mit «diploiden» Tumoren signifikant länger leben als Patienten mit «aneuploiden» Tumoren [116]. Die Zahl der Publikationen, die über eine enge Beziehung zwischen der DNA-Verteilung des Tumors und der Prognose berichten, ist mittlerweile kaum noch überschaubar.

Gänzlich uneinheitlich ist in der statischen und in der durchflußzytometrischen DNA-Analyse allerdings die prognostisch relevante Interpretation der DNA-Verteilung. Häufig beschränken sich die Autoren auf die subjektive Beschreibung der DNA-Häufigkeitshistogramme. Mit einer großen Zahl bisher nicht genormter Begriffe versucht man die Charakteristika der DNA-Verteilung zu beschreiben, obwohl man meist auf die Lage der Stammlinie abhebt. Darunter verstand man den häufigsten (= modalen) Wert, der meist von einem Verdoppelungsgipfel, entsprechend den Zellen in G2/M-Phase begleitet ist [150]. Mit Worten wie diploid, triploid, tetraploid, hyperpentaploid, nahe hexaploid, hyperoctoploid etc. versuchte man den DNA-Modalwert zu charakterisieren, ohne daß präzise festgelegt war, was unter diesen Begriffen zu verstehen sei. Andere Autoren beschrieben verschiedene, prognostisch relevante Histogrammtypen,

bei denen die gefundene DNA-Verteilung subjektiv zugeordnet werden muß [10]. Auf die mangelhafte Reproduzierbarkeit der subjektiven Histogramminterpretation wiesen aber bereits Pfitzer et al. 1976 hin. Präzise und objektive Angaben stellen dagegen

- der DNA-Index des Modalwertes dar [17, 70]
- der mittlere DNA-Gehalt der Zellkerne [162]
- der Prozentsatz der Kerne mit einem DNA-Gehalt $> 5c$ [137]
- der «diploid deviation quotient»: DDQ [67], der ein Ausdruck

für die mittlere Ploidie ist, sowie

- der Z-Wert [161], welcher das Verhältnis euploider zu aneuploiden DNA-Werten angibt.

Die einfachste und anerkannteste prognostisch relevante DNA-zytometrische Unterscheidung maligner Tumoren ist die in «diploide» und «aneuploide» [111].

Es ist ein pragmatisches Vorgehen, all diejenigen Tumoren als «diploid» zu bezeichnen, deren Modalwert (Stammlinie) innerhalb $2c \pm 2c \times CV$ (= Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation) liegt [81]. All diejenigen Tumoren, deren Modalwert innerhalb $2^n c \pm 2^n c CV$ liegen, werden als polyploid bezeichnet.

Als besonders prognostisch valide hat sich für verschiedene Tumoren die Varianz der DNA-Werte um den normalen 2c-Wert erwiesen. Dieser Index wird als «2c deviation index» [29, 35] bezeichnet. Die Varianz um den 2c-Normalwert der Zytophotometrie entspricht dabei der Variabilität (range) der Chromosomenanomalien in der Zytogenetik [159]. Je höher die beobachteten Meßwerte und je größer deren Variabilität, um so höher wird die Varianz um den 2c-Wert sein. So wird als prognostisch besonders schlechtes Zeichen der Verlust einer Stammlinie gewertet, der zu einer besonders hohen Varianz der DNA-Werte führt. Da für den Kliniker die Varianz als prognostischer Index zu abstrakt ist, empfiehlt sich eine logarithmische Umrechnung des 2c-Deviation-Index (2cDI) in die Skala eines DNA-Malignitätsgrades (DNA-MG), die von 0 bis 3 reicht (Abb. 8, 9). Bei dieser Umrechnung wird die niedrigst denkbare Varianz von 0 als DNA-Malignitätsgrad 0 gesetzt und der höchste beobachtete Wert (eines Osteosarkoms) von 51 als DNA-Malignitätsgrad 3,0 [35]. Die prognostische Relevanz dieses DNA-Malignitätsgrades wurde bisher für maligne Lymphome, das Kehlkopf-, Prostata-, Mamma- und Harnblasenkarzinom in follow-up-Studien statistisch belegt (s. u.).

Meßsysteme für die DNA-Zytometrie

Zellkern-DNA-Messungen zu diagnostischen Zwecken werden heute vorzugsweise mit Durchflußzytometern oder mit TV-Bildzytometern durchgeführt. Konventionelle Mikroskopphotometer sind für diese Zwecke kaum mehr gebräuchlich, da die Messungen mit ihnen zu zeitaufwendig und nicht immer präzise genug sind [12].

1. *Durchflußzytometer* (Abb. 2) ermöglichen die sehr schnelle Messung einer großen Zahl von in Suspension befindlichen Zellen (z. B. in Sperma, Urin, Blut, Liquor). Zur Messung an soliden Tumoren müssen Suspensionen durch mechanische und enzymatische Zellvereinzelung speziell hergestellt werden. Eine Messung an histologischen oder zytologischen Routinepräparaten ist nicht möglich. Einen Vorteil der Methode stellt die Repräsentativität der hohen untersuchten Zellzahl dar, sofern auf die Präzision der Stammlinien-Ploidie-Bestimmung abgehoben wird oder lediglich zwischen «diploiden» und «aneuploiden» Tumoren unterschieden werden soll. Vorteilhaft ist ferner die Möglichkeit, am selben Untersuchungsmaterial mehrere Parameter gleichzeitig zu bestimmen, wie den Zellkern-DNA-Gehalt, die angenäherte Zellkern-Größe, den Zellproteingehalt und neuerdings auch verschiedene immunologische Marker. Dabei kommen Mehrfachmarkierungen derselben Zelle zur Anwendung, die bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Aufwendige

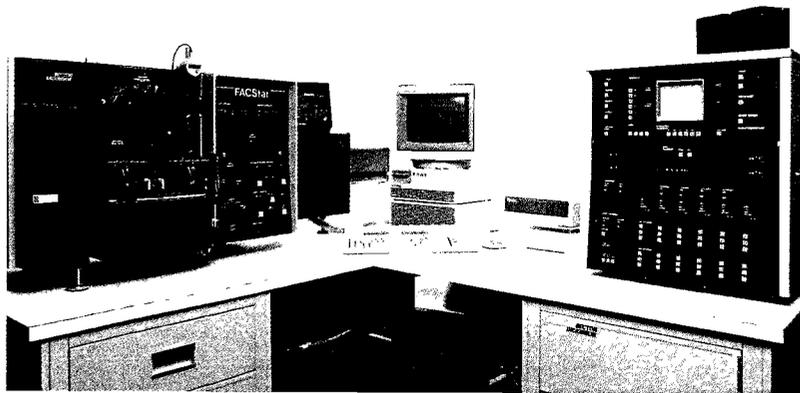


Abb. 2. MIAMED TV-Bildanalyse-System (Wild-Leitz GmbH, Wetzlar).

Geräte (siehe Abb. 2) bieten zusätzlich die Möglichkeit, Zellen mit bestimmten detektierten Eigenschaften, z. B. einem DNA-Gehalt $>5c$, selektiv aussondern zu lassen (= cell sorter), um sie z. B. einer weiteren morphometrischen Analyse mit einem Bildanalyse-System zuzuführen.

Diese Geräte erlauben aber keine morphologische Identifikation und Klassifikation der analysierten Zellen mit hoher Auflösung, also auch keine gezielten Zellvermessungen. Damit können Tumorzellen nicht sicher von mituntersuchten Kernaggregaten, Lymphozyten, Granulozyten, Histiozyten, Bindegewebszellen oder gesunden Epithelien abgegrenzt werden. Daneben verhindert das stets vorhandene «Rauschen», bedingt durch Artefakte, eine Detektion einzelner Zellen. Die Beseitigung von Artefakten stellt für Durchflußsysteme ein erhebliches Problem dar, da technisch relativ wenig Eingriffsmöglichkeiten bestehen. Eine vermessene Zelle – oder ein Artefakt – können nicht noch einmal visuell überprüft werden. Hier hat die Bildanalyse deutliche Vorteile, da das Präparat für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht und interessierende Zellen wiederholt z. B. bei höherer Vergrößerung, in Fluoreszenz, etc. analysiert werden können.

Zudem liegt das Auflösungsvermögen der Durchflußsysteme bei etwa 1%, d. h., daß Zellsubpopulationen die weniger als 1% der Gesamtpopulation ausmachen, nicht identifiziert werden können. Atypische Myeloblasten im peripheren Blut eines Kranken mit chronisch myeloischer Leukämie in der chronischen Phase wären z. B. nicht zu erkennen und zu vermessen. Dysplastische Zellen einer Schleimhautveränderung wären nicht unabhängig von den umgebenden normalen Epithelien zu messen. Wenige Tumorzellen in einem Erguß oder Organpunktat blieben unentdeckt. Wenige, prognostisch relevante Zellkerne mit hohen DNA-Gehalten blieben ebenfalls unberücksichtigt. Eine wiederholte Kontrollmessung derselben Probe ist meist nicht möglich.

2. *TV-Bildanalyse-Systeme* (siehe Abb. 3, 4) erlauben dagegen Messungen an zytologischen, u. U. auch an histologischen *Routinepräparaten*, d. h., daß keine erneute Probenentnahme beim Patienten nötig ist. Für DNA-Messungen muß aber eine Umfärbung nach Feulgen erfolgen. Eine individuelle und gewebsspezifische Eichzellpopulation kann für jedes Präparat passend ausgewählt werden. Durch die Möglichkeit, jede einzelne Zelle vor dem Meßvorgang morphologisch zu identifizieren und zu klassifizieren, können die in-



Abb. 3. Interaktiver Monitor des MIAMED zur Messung des DNA-Gehaltes von Zellkernen. Meßergebnisse sind in c auf die entsprechenden Kerne geschrieben.

teressierenden Zellen gezielt und ohne Artefakte zur Messung ausgewählt werden.

Dies ermöglicht auch selten vorkommende Zellen, welche von besonderem diagnostischen Interesse sind, aufzufinden und isoliert zu messen (z. B. dysplastische Zellen in einem Zervixabstrich, Immunoblasten in einer AIL, atypische Zellen in einem Pleuraerguß). Auch ein Malignitätsgrading in einer gemischten Population aus Tumorzellen und normalen Epithelien (z. B. bei Harnblasenkarzinomen) ist so möglich.

Weiterhin erlauben TV-Bildanalyse-Systeme neben den DNA-Messungen an identischen Zellkernen auch noch deren morphometrische Vermessung (Größe, Form, Chromatinmuster). Mehrere Zellpo-

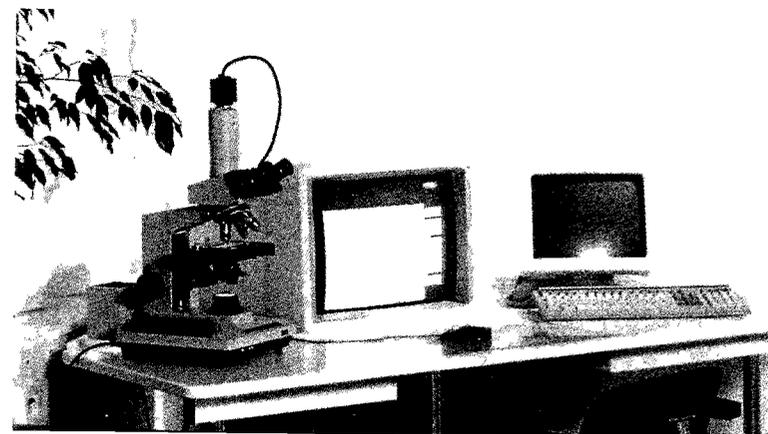


Abb. 4. EXCELL TV-Bildanalyse-System (Imtec, Schweden).

pulationen können gleichzeitig vermessen werden. Eine direkte Zuordnung der Meßergebnisse zu den einzelnen Zellen auf dem Monitor erlaubt eine unmittelbare Meßwertrückkoppelung (Abb. 5). Die jederzeitige Kontrollmöglichkeit und Wiederholbarkeit einer individuellen Zellmessung stellt einen entscheidenden Vorteil im Sinne der Qualitätskontrolle dar. Außerdem bieten diese Geräte heute meist noch die Möglichkeit einer Quantifizierung immunhistochemischer Reaktion, wie z. B. der Östrogenrezeptoranalyse bei Mammakarzinomen an zytologischem und histologischem Material.

Gegenüber der Durchflußzytometrie müssen Abstriche an der Zahl meßbarer Zellen hingenommen werden. Nachteilig ist ferner der größere Zeitaufwand für die Vermessung einer Probe (z. Zt. ca. 20 min für 20 Referenz- und ca. 200 Tumorzellen, MIAMED-DNA, Wild-Leitz GmbH).

Im Prinzip gibt es fließende Übergänge zwischen den interaktiven TV-Bildanalyse-Systemen und den Zytoautomaten, welche ebenfalls auf der Basis der Fernsehbildanalyse arbeiten. Folgende Analyseschritte sind unabhängig voneinander automatisierbar und variabel kombinierbar:

Präparateherstellung, Präparateinzug, Applikation von Immersionsöl, Objektivwechsel, Autofokus, Absuchen des Präparates (Scanmuster), Objektidentifikation und -segmentation, Artefaktelimina-

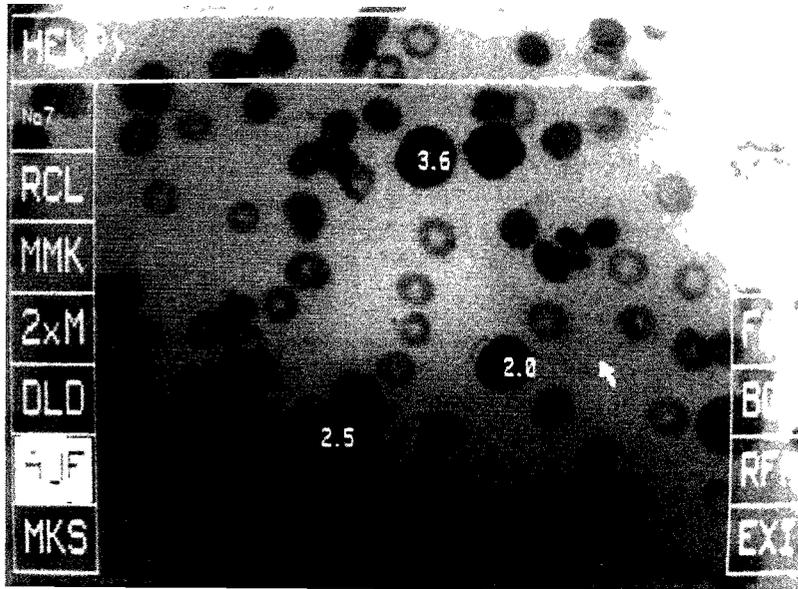


Abb. 5. FACSTAR plus Durchfluß-Zytometer mit Cellsorter (Becton-Dickinson, USA).

tion, Objektvermessung und Meßwertinterpretation. Kritische Schritte im Zusammenhang mit der Automation sind bis heute insbesondere die Präparateherstellung und die zweifelsfreie Objektidentifikation. Bei der automatischen Artefaktelimination sind erhebliche Fortschritte erzielt worden. Kein Zytoautomat ist aber bis heute in der Lage, an Routinepräparaten zu arbeiten, sondern bedarf hinsichtlich einer optimalen Zellvereinzelnung spezielle und aufwendig hergestellte Präparate. Das Vereinzelnungsverfahren ist speziell jedem Untersuchungsmaterial anzupassen. Bisher gibt es nur eine Entwicklung eines Präparationsautomaten, über den bisher noch nicht genügend Erfahrung für einen routinemäßigen Einsatz vorliegen [133]. Die zweifelsfreie Objektidentifikation und Artefaktrejektion ist heute lediglich für ganz speziell präparierte Abstrichpräparate von der Zervix uteri gelöst. Ein Einsatz darüber hinaus erfordert für jede Zell- und Präparationsart speziell adaptierte Detektions- und Artefakteleminations-Algorithmen, die vor ihrem Einsatz auf ihre Leistungsfähigkeit hin überprüft werden müssen. Es besteht die Gefahr, daß Anwender im blinden

Vertrauen auf die Zellidentifikationsfähigkeiten von Zytoautomaten Zellproben automatisch analysieren lassen, ohne eine Kontrolle darüber zu haben, was der Automat eigentlich gemessen hat. Auf welchen Zelltyp sich die Meßergebnisse dann beziehen, bleibt offen. Aus unserer Sicht stellt es eine Fehlindikation dar, wenn aufwendige TV-Zytoautomaten dafür eingesetzt werden, an Tumورproben DNA-Verteilungen, z. B. zum Zweck der Malignitätsgradierung, zu ermitteln. Dies ist preiswerter, gezielter und Tumortyp-unabhängig mit Halbautomaten zu erreichen. Die bekanntesten, z. Zt. im Handel befindlichen Bildanalysatoren zur DNA-Zytometrie und Morphometrie sind in Tabelle 1 aufgeführt und spezifiziert.

Diagnostische Ergebnisse der DNA-Zytometrie

Wie in Kapitel «Biologische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie» dargestellt, eignet sich diese Methode insbesondere zur

1. Abklärung der Dignität bei zytologisch oder histologisch diagnostizierten Dysplasien, borderline lesions oder in ihrer Dignität grundsätzlich unklaren Krankheitsbildern sowie zur
2. Malignitäts-Gradierung.

Im folgenden sollen daher, getrennt nach Organen, für eine routinemäßige Anwendung der DNA-Diagnostik wesentliche und wissenschaftlich dokumentierte Ergebnisse referiert werden. Pathologen und morphologisch spezialisierte Kliniker mögen daraus die für sie jeweils relevante Indikation für eine DNA-zytometrische Diagnostik entnehmen.

Mamma

Dignität

Diagnostisches Ziel ist die Identifikation obligat präkanzeröser Veränderungen unter den Mastopathien. Normales Brustdrüsengewebe und gutartige Tumoren der Brust zeigen eine «diploide» DNA-Verteilung [102, 180]. 40–100% der Mammakarzinome zeigen dagegen eine «aneuploide» Stammlinie [6, 20, 22, 51, 52, 85, 86, 89, 96, 111, 180]. Unter den Mastopathien fanden Izuo et al. [96] sowohl

Tabelle 1. Systembeschreibungen kommerzialisierter TV-Bildanalyseysteme für Zytometrie, Karyotypie, etc. (Angaben ohne Gewähr)

System-Bezeichnung	Hersteller	Betreibender Wissenschaftler	Autofocus	Scanringtisch	Automat. Vergrößerungswechsler	Autolokalisation	Freiprogramm	Spez. DNA-Meßprogramm	Datensicherung	Allg. Morphometrie-Programm	Spez. Hormonrezeptoranalyse-Programm	Chromatinmuster-Analyse	Micro-nucleus-Test	Metaphase-Finder	Karyotyping	Mikroskophersteller	Echtzeitbildanalyse	Auswertezusatz	Software-Modultät
Biocom 2000	(Frankreich)	?	+	+	-	-	?	+	-	+	-	-	-	-	Leitz	*	-	-	-
CAS 200	Becton & Dickinson (USA)	J. Bacus	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	Reichert Jung	-	-	-	-
CUE	Olympus (Japan)	J. Rüschhoff	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	Olympus	+	+	(+)	+
Cytoscan	Image Recognition Systems (England)	D. Rutovitz, I. Piper, T. Tucker	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Nikon Japan u. a.	-	-	+	+
EXCELL	Imtec (Schweden)	B. Stenkvist, E. Bengtsson	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	frei (Olympus)	-	-	-	+
IBAS (VIDAS)	Zeiss/Kontron (BRD)	Th. Gahm, V. Mizutok	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	Zeiss	+	+	+	+
Magiscan	Joyce Loebel (England)	J. Zeidler	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Wild Leitz	-	-	-	+
MIAMED	Wild Leitz GmbH (BRD)	A. Böcking, DNA-Rezeptoranalyse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Wild Leitz	-	-	-	+
n.n.	O. Ahrens (BRD)	U. Folkner, U. Askenzien, O. Ahrens, G. Auer	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	frei (Leitz, Nikon)	-	-	-	-
Purple Iris TM	Int. Remote Imaging Systems (USA)	G. Wied	+	+	+	+	?	+	+	+	+	-	-	-	?	+	+	+	-
Samba 2005	A. Ientel TTN (Frankreich)	G. Brugal	+	+	-	+	C + Fortran, Pascal	+	-	+	+	+	+	+	Zeiss Axioskop	+	+	****	?
VISIAC	Feinwerk Elektronik (BRD)	K. Kayser	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Reichert Jung o. Leitz	-	-	-	+

* Bakterienzählung, Histologie-Analyse, Gel-Analyse, Autoradiographie-Analyse
 ** Planormorphometrie, Metallographische Densitometrie, Autoradiographie, 3D-Rekonstruktion
 *** 3D-Rekonstruktion
 **** Nervenfasermorphometrie, ZNS-Analyse, Autoradiographie, in situ Hybridisierung-Analyse, Knochen-Morphometrie

«diploid-tetraploide» Fälle als auch «aneuploide». Während sich die ersteren nie in manifesten Krebs weiterentwickelten, war dies bei den meisten «aneuploiden» Mastopathien der Fall. D. h., daß DNA-zytometrisch detektierte Stammlinien-Aneuploidie als Marker für prospektive Malignität bei Mammakarzinomen infrage kommt. Böcking et al. [39] fanden bei allen von 104 untersuchten Mammakarzinomen aneuploide Zellkerne > 5c.

Malignitäts-Grading

Diagnostisches Ziel ist die Identifikation derjenigen Patienten mit T1-Tumoren, die ein extrem niedriges Metastasierungsrisiko aufweisen und bei denen auf eine adjuvante Chemo- oder Strahlentherapie verzichtet werden kann. Die grobe, willkürliche und subjektive Unterteilung in «diploide» und «aneuploide» Mammakarzinome ergab in mehreren Studien signifikant unterschiedliche Überlebenszeiten für beide Gruppen [51, 53, 55, 85, 86, 111, 134]. Eine subjektive Histogrammklassifikation nach Auer et al. [9] erlaubte die Unterscheidung von drei Patientengruppen mit statistisch signifikanter, unterschiedlicher Überlebenszeit [10, 42, 63, 64]. Die Reproduzierbarkeit dieser Klassifikation wurde von Opfermann et al. [131] und Böcking et al. [39] in Frage gestellt.

Böcking et al. [39] untersuchten die prognostische Relevanz, Reproduzierbarkeit und Repräsentativität des skalaren DNA-Malignitätsgrades bei 104 Patienten im Vergleich mit dem histologischen Grading nach Bloom und Richardson [28], der Histogrammklassifikation nach Auer und der Kerngröße. Drei Gruppen mit signifikant unterschiedlichem Überleben konnten mit dem DNA-MG unterschieden werden. Er korrelierte zudem signifikant mit dem Lymphknotenstatus. Die Reproduzierbarkeit der DNA-MG Bestimmung war derjenigen der subjektiven Klassifikationen überlegen.

Zervix uteri

Dignität

Diagnostisches Ziel ist die Identifikation obligat präkanzeröser Läsionen unter den zervikalen Dysplasien und deren Abgrenzung von reaktiven bzw. regressiven Veränderungen durch DNA-zytometrischen Nachweis von Aneuploidie (Abb. 6).

Gutartige Schleimhautveränderungen weisen keine «aneuploiden» DNA-Stammlinien auf [45, 62, 126, 148]. Auch einzelne «aneuploide» Zellen $>5c$ werden nicht in normalen Zervixepithelien gefunden [29, 34, 97, 158, 190]. Karzinome des Plattenepithels der Zervix dagegen weisen fast immer «aneuploide» DNA-Stammlinien auf [45, 92, 126, 148, 149]. Ebenso wiesen alle untersuchten Carcinomata in situ einzelne Zellkerne $>5c$ auf [29, 34]. Fu et al. [73] zeigten, daß alle invasiven Zervixkarzinome aus Dysplasien mit DNA-Aneuploidien hervorgingen. Schon die Untersuchung von Sprenger et al. [161], Wagner et al. [178] und Hilgarth [90] belegten den Wert des Markers «DNA-Aneuploidie» zur Früherkennung des Zervixkarzinoms im morphologischen Stadium der Dysplasien. Böcking et al. [32] konnten dies bestätigen: In einer Follow-up-Studie von 48 Patienten mit geringen und mittleren Dysplasien entwickelten 31 im Beobachtungszeitraum ein Plattenepithelkarzinom. Bei 30 dieser Fälle wurden «aneuploide» Einzelzellen nachgewiesen, wodurch die DNA-zytometrisch richtige Diagnose prospektiver Malignität zu stellen war. Dies entspricht einer Sensitivität von 97% für prospektive Malignität. Falsch-positive DNA-zytometrische Diagnosen kamen in dieser Untersuchung nicht vor.

Bollmann [41] bestätigte diese Ergebnisse: Von 35 Fällen geringer bis mittlerer Dysplasie, welche im Follow-up ein Carcinoma in situ bzw. invasives Karzinom entwickelten, wurden 51% DNA-zytometrisch richtig als prospektiv maligne identifiziert. Alle der 43 DNA-zytometrisch als benigne eingestufteten Dysplasie-Fälle zeigten im zytologischen Follow-up einen unauffälligen Befund. Vergleichbare Ergebnisse erzielte Bollmann [41] auch für das Adenokarzinom in situ der Zervix.

Da ein HPV-Infekt zu einer Polyploidisierung bis zu $8c$ führen kann, muß die Schwelle zum sicheren Einzelzellnachweis von Aneuploidie bei zytologischem Nachweis von Koilozyten auf $9c$ angehoben werden. Chatelain et al. [46] konnten über die « $9c$ exceeding events» unter 18 Patientinnen mit koilozytischer Dysplasie 12 von 13 identifizieren, die im Follow up ein Karzinom entwickelten. Falsch-positive DNA-Diagnosen traten nicht auf. Das bedeutet für die Praxis, daß Dysplasien der Zervixschleimhaut DNA-zytometrisch weiter abgeklärt werden können, wobei ein Einzel- oder Stammlinien-nachweis von DNA-Aneuploidie einem frühen Malignitätsnachweis gleichkommt.

Univ. Prof. Dr. Alfred Böcking
Institute for Pathology
Technical University of Aachen
Pauwelsstr. 30
5100 Aachen, F.R.G.

Aachen, 17.08.89

=====

D N A I M A G E C Y T O M E T R Y

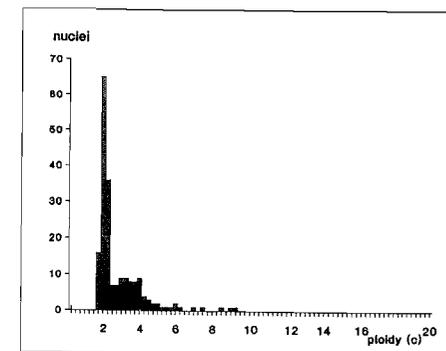
=====

Name: Müller
Patient data:
Registration no.: 1045/89
Cytological diagnosis: Pap IIID

=====

D N A - D I A G N O S I S : aneuploid

=====



Assumptions and data on which the diagnosis is based:

The threshold for the assumption of malignancy is the detection of ≥ 3 aneuploid nuclei with a DNA content $\geq 5c$ as you excluded:

- polyploidization $> 4c$
- cytologically detectable virus infection
- irradiation or cytostatic therapy

In this case the DNA-diagnosis is aneuploid, because 8 nuclei with a DNA content of $\geq 5c$ were found.
Within the relevant cell population nuclei were selected.

DNA parameters

Mean DNA (c):	2.79
DNA-indx (modal):	1.00
2cDI (c^2):	2.11
5.0c exceeding rate:	4.02
5.0c exceeding events:	8
9.0c exceeding events:	0

Physician's signature:

Krafft

Malignitäts-Grading

Die meisten Autoren konnten nachweisen, daß Zervixkarzinome mit hohen DNA-Stammlinienwerten eine schlechte Prognose haben, solche mit nahe «diploiden» dagegen eine bessere [7, 74, 78, 99, 100, 125, 145] (Abb. 7). Ebenso ist das rezidivfreie Intervall bei Patienten mit hohen DNA-Stammlinienwerten kürzer [127].

Ovar

Dignität

Diagnostisches Ziel ist die Identifizierung der prospektiv malignen Fälle unter den borderline Tumoren.

Alle gutartigen Tumoren weisen «diploide» Stammlinien auf, wohingegen in Ovarialkarzinomen in unterschiedlicher Häufigkeit «aneuploide» Stammlinien gefunden wurden [4, 5, 17, 61, 69, 94, 110].

Dietel [54] und Friedlander et al. [71] konnten über den Nachweis von DNA-Aneuploidie die prospektiv malignen, metastasierenden bzw. rezidivierenden borderline Ovarialtumoren von den nicht progressiven Tumoren trennen. Dies bedeutet für die Praxis, daß Borderline-Tumoren des Ovars in ihrer Dignität DNA-zytometrisch weiter abgeklärt werden können.

Malignitäts-Grading

Ovarialkarzinom-Patientinnen mit «diploiden» Tumoren (Stammlinie) leben statistisch signifikant länger als solche mit «aneuploiden» Tumoren [74, 183].

Endometrium

Dignität

Diagnostisches Ziel ist die Identifikation obligat präkanzeröser Fälle unter den glandulären, adenomatösen und atypischen Hyper-

Abb. 6. Ergebnisbericht einer diagnostischen DNA-Messung (MIAMED-DNA) bei einem Fall von geringer-mittlerer Dysplasie der Zervix uteri (Pap IIID). DNA-Diagnose: aneuploid (prospektiv maligne) wegen des Nachweises von 8 Zellen $> 5c$.

Univ. Prof. Dr. Alfred Böcking
Institute for Pathology
Technical University of Aachen
Pauwelsstr. 30
5100 Aachen, F.R.G.

Aachen, 17.08.89

=====

D N A I M A G E C Y T O M E T R Y

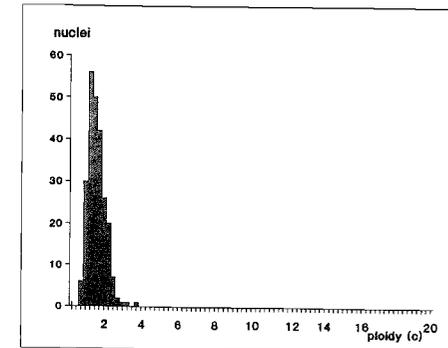
=====

Name: 'taB087
Patient data: B087
Registration no.: 0238/87
Histological diagnosis: minimal deviation carcinoma

=====

D N A - D I A G N O S I S : aneuploid
D N A - G R A D E : 0.25

=====



=====

Assumptions and data on which the diagnosis is based:

=====

The threshold for the assumption of aneuploidy is the detection of a stemline ploidy $>/< 2c^{\pm} \pm n \times CV$ of reference cells ($n = 1, 2, 3, \dots$).

In this case the DNA-diagnosis is aneuploid, because the stemline ploidy is $1.26c$.

Within the relevant cell population nuclei were not selected.

The DNA-grade of malignancy is based on the variance of the tumor cell values around the normal $2c$ peak.

DNA parameters

Stemline ploidy (c):	1.26
Mean DNA (c):	1.58
DNA-index (modal):	0.63
2cDI (c ²):	0.39
5.0c exceeding rate:	0
5.0c exceeding events:	0
9.0c exceeding events:	0

Physician's signature: *Kraft*

plasien des Endometriums. Glandulär zystische Hyperplasien zeigen reguläre «diploide» DNA-Verteilungen [146, 186, 189]. Die Rate der Karzinome mit «aneuploiden» DNA-Stammlinien ist beim Endometrium aber vergleichsweise gering [8, 75, 76, 95].

Malignitäts-Grading

Patientinnen mit «diploiden» Endometrium-Karzinomen leben statistisch signifikant länger als solche mit «aneuploiden» Karzinomen [7, 119]. Das rezidivfreie Intervall ist bei «aneuploiden» Endometrium-Karzinomen kürzer als bei «diploiden» [95].

Niere

Dignität

Diagnostisches Ziel ist eine schärfere, objektive Grenzziehung zwischen prospektiv gutartigen und bösartigen kleinen Nierentumoren, d. h. zwischen Adenomen und Karzinomen. Da die Mehrzahl der Nierenzellkarzinome «aneuploide» DNA-Verteilungen aufweisen, normales sowie gutartig tumoröses Nierengewebe aber nicht, liegt es nahe, Adenome mit «aneuploiden» DNA-Verteilungen als prospektiv maligne zu betrachten.

Malignitäts-Grading

Diagnostisches Ziel ist, diejenigen Low-stage-Nierenzellkarzinome zu identifizieren, die postoperativ keiner Nachbestrahlung oder Chemotherapie bedürfen, da eine Metastasierung extrem unwahrscheinlich ist.

Mehrere Autoren fanden statistisch signifikante Unterschiede der Überlebensraten für Patienten mit «diploiden» bzw. «aneuploiden» Nierenzellkarzinomen [103, 115, 141]. Selbst für Patienten, die bei Diagnosestellung Fernmetastasen aufwiesen, konnten, je nach Tumor-DNA-Gehalt, noch Überlebensunterschiede nachgewiesen

Abb. 7. Ergebnisbericht einer diagnostischen DNA-Messung (MIAMED-DNA) an einem «minimal deviation carcinoma» der Zervix uteri. DNA-Diagnose: aneuploid (prospektiv maligne) wegen des Nachweises einer hypodiploiden Stammlinie.

werden [115]. Patienten mit «aneuploiden» Nierenzellkarzinomen entwickelten wesentlich häufiger Fernmetastasen [132]. Eine Untersuchung von Störkel et al. [166] an 52 Nierenzellkarzinomen ergab eine enge Korrelation zwischen der histomorphologischen Gradierung und dem skalaren DNA-Malignitätsgrad (DNA-MG).

Bei den Wilms-Tumoren (Nephroblastomen), die heute in der Regel operativ und chemotherapeutisch angegangen werden, zeichnet sich dagegen eine günstigere Prognose für chemotherapierte Patienten mit «aneuploiden» Tumoren ab. Dieser Effekt wird auf die größere Chemosensitivität entdifferenzierter, höher maligner Zellen zurückgeführt [142].

Prostata

Dignität

Diagnostisches Ziel ist die Identifikation der prospektiv malignen Fälle unter den Dysplasien der Prostata (z. B. unter den atypischen Hyperplasien).

DNA-Aneuploidie wurde bei gutartigen Prostataveränderungen bisher nicht beschrieben. Dagegen wiesen je nach Meßtechnik und Interpretationsmodus 36 bis 100% der Prostatakarzinome DNA-Aneuploidie auf [29, 101]. Der Stammlinien- oder Einzelnachweis von DNA-Aneuploidie bietet sich daher als Marker für Malignität auch bei Dysplasien der Prostata an. Zur Diagnose hochdifferenzierter Prostatakarzinome erscheint dieser Marker aber weniger erfolgversprechend, da gerade die Grad-I-Tumoren in geringerem Ausmaß DNA-Aneuploidie nachweisen lassen.

Malignitäts-Grading

In mehreren Studien wurden signifikante Überlebensunterschiede zugunsten der Patienten mit geringen DNA-Abweichungen der DNA-Verteilung von der Norm gefunden [11, 66, 114, 157, 164, 173]. Mit Hilfe des DNA-Malignitätsgrades konnten Böcking et al. [30, 38] zwei Patientengruppen mit signifikant unterschiedlicher Überlebenszeit unterscheiden (Abb. 8, 9). Die prognostische Relevanz und Reproduzierbarkeit des DNA-MG war in diesen Studien derjenigen der zytologischen Gradierung überlegen. Darüber hinaus wurde an 19 Fällen von konservativ behandelten Prostatakarzinomen, bei denen

über mehrere Jahre wiederholte Aspirate durchgeführt wurden, ein DNA-Regressionsindex (DNA-RI) getestet, der die Änderung des DNA-MG über die Zeit erfaßt und zum Therapiemonitoring dienen soll. Die Überlebenszeit der Patienten korrelierte, unabhängig vom DNA-MG, auch mit dem DNA-RI. Patienten, die in Progression kamen, wiesen trotz Therapie einen Anstieg des DNA-MG über die Zeit auf. Ähnliche Beobachtungen machten Borgmann et al. [43]. Die DNA-Zytometrie wird routinemäßig z. B. in der Mayo-Klinik zur Therapieplanung und zur Therapiekontrolle eingesetzt [191]. Patienten mit «diploiden» Stammlinien ihrer Tumoren (entsprechend DNA-low-grade-Karzinomen) werden lediglich einer endokrinen Therapie unterzogen, während bei «aneuploiden» Prostatakarzinomen Bestrahlung, Chemotherapie und Operation erwogen werden [199]. Patienten mit «diploiden» Stammlinien (entsprechend DNA-low-Grade-Karzinomen) zeigen ein besseres Ansprechen auf endokrine Therapie, als solche mit «aneuploiden» Stammlinien [112, 196].

Harnblasenkarzinom

Dignität

Wegen der geringeren Aneuploidierate bei differenzierten, Grad-I-Urothelkarzinomen ist eine diagnostische Hilfe bei der zytologisch schwierigen Diagnose dieser Tumoren durch die DNA-Zytometrie vorerst nicht zu erwarten.

Malignitäts-Grading

Urothelkarzinom-Patienten mit «diploider» Stammlinie leben statistisch signifikant länger als solche mit «aneuploider» Stammlinie [67, 91]. Dies gilt auch für T1-Tumoren. Bei Patienten mit rezidivierenden, oberflächlichen Harnblasenkarzinomen fand sich eine Tumourprogression nur für Patienten mit «aneuploiden» DNA-Verteilungen [80].

In der Therapie des Harnblasenkarzinoms ist das DNA-Malignitäts-Grading insbesondere nach primärer Resektion des Tumors gefragt, um objektive und valide Entscheidungsparameter für das weitere Vorgehen zu erhalten. Bei DNA-low-grade-Karzinomen ist eine «wait and see»-Haltung vertretbar, während bei DNA-high-

Univ. Prof. Dr. Alfred Böcking
Institute for Pathology
Technical University of Aachen
Pauwelsstr. 30
5100 Aachen, F.R.G.

Aachen, 17.08.89

=====

DNA IMAGE CYTOMETRY

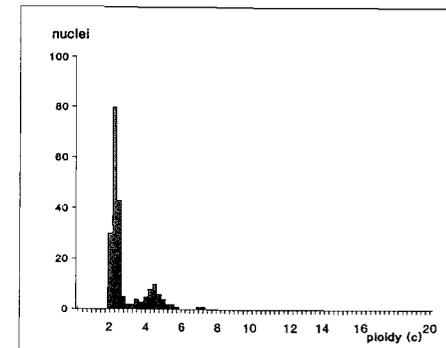
=====

Name: ra10253
Patient data: M. H.
Registration no.: 737/88
Histological diagnosis: Prostatic Ca Grade I

=====

DNA - D I A G N O S I S : aneuploid
DNA - G R A D E : 0.80

=====



Assumptions and data on which the diagnosis is based:

=====

The threshold for the assumption of aneuploidy is the detection of a stemline ploidy $>/< 2c^{11} \pm nxCV$ of reference cells ($n = 1, 3, \dots$). In this case the DNA-diagnosis is aneuploid, because the stemline ploidy is 2.26c. Within the relevant cell population nuclei were not selected. The DNA-grade of malignancy is based on the variance of the tumor cell values around the normal 2c peak.

DNA parameters

Stemline ploidy (c):	2.26
Mean DNA (c):	2.88
DNA-index (modal):	1.13
2cDI (c ²):	1.86
5.0c exceeding rate:	3.15
5.0c exceeding events:	7
9.0c exceeding events:	0

Physician's signature:

K. Hoff

grade-Karzinomen eine Chemotherapie oder Harnblasenexstirpation erwogen werden muß [165].

Hodenkarzinom

Dignität

Hodenkarzinome haben in ihrer Mehrzahl «aneuploide» Stamm-
linien. Durchflußzytometrisch werden 92%–95% angegeben [44, 68,
197]. Schon Carcinomata in situ des Hodens sind an Biopsiematerial
DNA-bildzytometrisch am Vorkommen von Zellen mit einem DNA-
Gehalt $>5c$ zu erkennen [120]. Sogar an Ejakulaten konnten in 50%
der Fälle Carcinomata in situ des Hodens durch Nachweis «aneuploi-
der» DNA-Stammlinien diagnostiziert werden [77].

Malignitäts-Grading

Für die Entscheidung über eine zusätzliche Therapie des Hoden-
karzinoms nach Semikastration (z. B. Lymphadenektomie, Chemo-
therapie) scheint der Nachweis von Zellen mit einem DNA-Gehalt
 $>5c$ ein valider prognostischer Parameter zu sein. Liegen solche
Zellen vor, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Rezidiv zu
rechnen und eine adjuvante Therapie erscheint gerechtfertigt. Liegen
solche prognostisch ungünstigen Zellen nicht vor, so kann eine «wait
and see»-Haltung eingenommen werden [3].

Maligne Lymphome

Dignitäts-Bestimmung

Die angioimmunoblastische Lymphadenopathie galt in den 70er
Jahren nicht als ein malignes Lymphom. Common and Böcking [50]
und Chatelain et al. [46] konnten durch den DNA-zytometrischen
Nachweis «aneuploider» Zellen in Lymphknoten in 9 von 10 Fällen

Univ. Prof. Dr. Alfred Böcking
Institute for Pathology
Technical University of Aachen
Pauwelsstr. 30
5100 Aachen, F.R.G.

Aachen, 17.08.89

=====

D N A I M A G E C Y T O M E T R Y

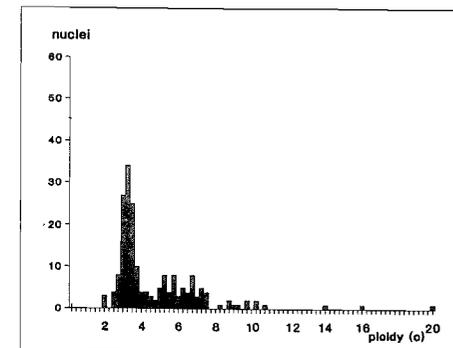
=====

Name: ra6540
Patient data: T. Z.
Registration no.: 6540/88
Histological diagnosis: Prostatic Ca Grade III

=====

D N A - D I A G N O S I S : aneuploid
D N A - G R A D E : 1.90

=====



Assumptions and data on which the diagnosis is based:

The threshold for the assumption of aneuploidy is the detection of a stemline ploidy $>/< 2c^n \pm nxCV$ of reference cells ($n = 1, 2, 3, \dots$).

In this case the DNA-diagnosis is aneuploid, because the stemline ploidy is 2.26c.

Within the relevant cell population nuclei were not selected. The DNA-grade of malignancy is based on the variance of the tumour cell values around the normal 2c peak.

DNA parameters

Stemline ploidy (c):	3.45
Mean DNA (c):	4.64
DNA-index (modal):	1.72
2cDI (c ²):	11.41
5.0c exceeding rate:	28.2
5.0c exceeding events:	57
9.0c exceeding events:	8

Physician's signature:

Kraft

Abb. 8. Ergebnisbericht einer diagnostischen DNA-Messung (MIAMED-DNA) bei einem Grad I Prostatakarzinom. DNA-Diagnose: aneuploid, DNA-Malignitätsgrad 0,8.

diese Erkrankung als maligne identifizieren. Dies ist durch Einbeziehung der Erkrankung in die Kieler Lymphomklassifikation mittlerweile akzeptiert. Wegen der Möglichkeit einer virusbedingten Polyploidisierung einzelner lymphatischer Zellen ist ein Aneuploidienachweis DNA-zytometrisch an lymphatischen Zellen nur über die sogenannte Stammlinieninterpretation möglich. Bei AIDS wurde eine euploide Polyploidisierung lymphatischer Zellen, aber keine DNA-Aneuploidie gefunden [14]. Der Nachweis einer «aneuploiden» Stammlinie kann also in einer Lymphknotenpräparation in diagnostischen Zweifelsfällen Malignität zu diagnostizieren helfen.

Malignitäts-Grading

Ein morphologisches Grading der Malignität von Lymphomen sieht die Kiel-Klassifikation in zwei Gruppen und die New Working Formulation in drei Gruppen vor. Die Reproduzierbarkeit dieser subjektiven Klassifikationen und Gradierungen ist beschränkt [109]. Eine prognostisch mindestens gleichwertige DNA-Malignitätsgradierung von Lymphomen, die aber den Vorteil hoher Objektivität und Reproduzierbarkeit aufweist, publizierten Böcking et al. [32, 33], validiert an 173 Patienten mit 8–14jährigem Follow-up. Sofern die einzuschlagende Therapie von einer validen und reliablen Malignitätsgradierung abhängt, sollte daher eine DNA-Malignitäts-Gradierung erwogen werden.

Leukämien

Dignitäts-Bestimmung

Bei der Identifikation prospektiv maligner Fälle unter den Myelodysplasien kann die DNA-Zytometrie hilfreich sein. Auffermann et al. [15] konnten unter 17 Fällen mit megaloblastärer Anämie 8 von 10 Fällen, die später eine akute, nicht lymphatische Leukämie entwickelten, frühzeitig identifizieren.

Abb. 9. Ergebnisbericht einer diagnostischen DNA-Messung (MIAMED-DNA) bei einem Grad 3 Prostatakarzinom. DNA-Diagnose: aneuploid, DNA-Malignitätsgrad 1,9.

Malignitäts-Grading

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 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 aber entscheidend. Chatelain et al. [46] konnten DNA-zytometrisch sowohl durch Nachweis einer hyperdiploiden Stammlinie, als auch einer erhöhten «stemline shoulder fraction» Patienten mit signifikant verkürzter chronischer Phase und Überlebenszeit identifizieren.

Knochtumoren

Dignitätsbestimmungen

Kreicbergs et al. [107] konnten Chondrome und Chondrosarkome mit einer Sensitivität von 54% und einer Spezifität von 100% DNA-zytometrisch diagnostizieren. In einer späteren Studie erreichten diese Autoren [108] eine Sensitivität von 78% bei einer Spezifität von 100% für die durchflußzytometrische Differenzierung zwischen verschiedenen gut- und bösartigen Tumoren [88, 193] (90% Sensitivität, 100% Spezifität für 94 Knochen- und Weichteiltumoren).

Malignitäts-Grading

Ein reproduzierbares histologisches Malignitäts-Grading existiert für Riesenzelltumoren des Knochens nicht [170]. Bei der extremen Variabilität dieses Tumors betreffend seiner Rezidivwahrscheinlichkeit ist für die Wahl der geeigneten Therapie (Curettage vs. Resektion/Amputation) ein Wissen um sein prospektives Verhalten aber entscheidend. Sun et al. [171] konnten für 17 Patienten mit lediglich curettierten Riesenzelltumoren belegen, daß DNA-zytometrisch mit Hilfe des «2c deviation index» [29, 35] Tumoren mit und solche ohne Auftreten eines Rezidivs in mehrjährigem Follow-up ohne Überlappungsbereich unterschieden werden können. Ähnliche Resultate erzielten Mellin et al. [117].

Die prognostische Relevanz der DNA-Verteilung belegten [Kreicbergs et al. [107] für das Chondrosarkom. 93% der Patienten mit

einem schnellen, tödlichen Krankheitsverlauf zeigten «aneuploide» DNA-Verteilungen (10 Jahres Überlebensrate 28% für «aneuploide» vs. 77% für «diploide» Tumoren). Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß irrespektive der histogenetischen Tumorklassifikation gutartige und low grade Knochentumoren «diploide» sind, während hochmaligne Knochentumoren im allgemeinen «aneuploid» sind [88].

Weichteiltumoren

Dignitätsbestimmung

Sapi et al. [153] konnten die Dignität von 69 Weichteiltumoren mittels DNA-Zytometrie mit einer Sensitivität von 97,7% und einer Spezifität von 100% diagnostizieren. Diagnostischer Index war die 5c Exceeding Rate [29]. Die Autoren schlagen die interaktive DNA-Messung daher zur präoperativen Dignitätsabklärung an Feinnadelpunktaten von Weichteiltumoren vor. Akerman et al. [2] konnten an Aspirationsbiopsien von Weichteiltumoren mit einer Sensitivität von 76% und einer Spezifität von 100% Malignität DNA-zytometrisch diagnostizieren. Diagnostischer Parameter war der DNA-Index. Federpiel et al. [65] konnten mittels des DNA-Index 97% der Leiomyosarkome des Gastrointestinaltraktes als maligne und 79% der Leiomyome als benigne identifizieren.

Bronchialkarzinome

Dignitäts-Bestimmungen

Den Einsatz der DNA-Zytometrie zur Differenzierung zwischen Tumorzellen und unspezifischen Zellveränderungen aus dem Bronchialsystem beschrieben schon Ono und Auer [130]. Blöndal und Bengtson [25] und Blöndal und Ponten [27] nutzten die DNA-Zytometrie, um in diagnostischen Problemfällen Karzinoide von kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu differenzieren. Auffermann und Böcking [13] konnten durch Nachweis von Zellen >5c mit einer Sensitivität von 89,5% unter 28 Patienten mit dysplastischen Zellen im Sputum diejenigen 17 ermitteln, bei welchen drei Tage bis sechs Wochen später ein Bronchialkarzinom diagnostiziert wurde. Damit scheint die Identifikation aneuploider Zellen in Sputen oder Bronchialsekreten dem Nachweis prospektiver Malignität zu entsprechen.

Falsch-positive Diagnosen traten DNA-zytometrisch nicht auf. Die Methode kommt daher zur Abklärung von Dysplasien in Sputen und Bronchialsekreten infrage.

Malignitäts-Grading

Während ein prognostisch valides histo- oder zytomorphologisches Grading für das Bronchialkarzinom nicht existiert, wurden in vielen Studien, vor allem durchflußzytometrisch, die hohe prognostische Relevanz des DNA-Ploidiestatus für das kleinzellige [1] und das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom nachgewiesen [26, 129, 175, 181, 184, 185, 198]. Zimmermann et al. [198] belegten, daß statistisch der Ploidiestatus der prognostisch valideste unabhängige Parameter bei Lungenkarzinomen ist, verglichen mit Alter, Geschlecht des Patienten, histologischem Tumortyp, TNM-Staging, Operationsart und Tumorlokalisation.

Speicheldrüsentumoren

Dignitätsbestimmung

Die DNA-Zytometrie zur Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Speicheldrüsentumoren ist bereits 1973 von Eneroth und Zetterberg vorgeschlagen worden. Insbesondere konnten diese Autoren die unterschiedliche Dignität von monomorphen Adenomen und mucoepidermoiden Karzinomen DNA-zytometrisch abgrenzen.

Malignitäts-Grading

Eine DNA-Malignitäts-Grading an Feinnadelaspiraten schlugen Eneroth und Zetterberg [59, 60] für Speicheldrüsenkarzinome vor. Hamper et al. [84] konnten bei 71 Fällen von mucoepidermoiden Speicheldrüsenkarzinomen DNA-zytometrisch nachweisen, daß Fälle mit «diploiden» Stammlinien klinisch einen signifikant günstigeren Verlauf nehmen als DNA «aneuploide» Fälle.

Ösophaguskarzinome

Dignitätsbestimmung

Rubio et al. [144] postulieren aufgrund ihrer Untersuchungen an Dysplasien und Plattenepithelkarzinomen, daß Dysplasien mit «di-

ploidem» DNA-Muster reaktiv, nicht neoplastisch oder nicht progressive Dysplasien darstellen, während «aneuploide» Dysplasien prospektiv maligne «aggressivere Läsionen» darstellen, da Aneuploidie ansonsten nur in Carcinomata in situ und invasiven Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus gefunden wurden [121, 143].

Malignitäts-Grading

Eine enge Korrelation der DNA-Verteilung mit der Überlebenszeit für das Ösophagusfrühkarzinom beschreiben Suginashi et al. [168, 169].

Oropharynx Tumoren

Dignitätsbestimmungen

Schon Bjelkenkrantz et al. [24] erkannten die Bedeutung des Nachweises «hypertetraploider» Zellen in Dysplasien des Kehlkopfes für die Diagnose von obligaten Präkanzerosen. Böcking et al. [31] konnten unter 15 geringen bis mittleren Dysplasien diejenigen vier durch Nachweis von Zellen $>5c$ identifizieren, welche im Follow-up ein Karzinom entwickelten.

Malignitäts-Grading

Die prognostische Validität des DNA-Malignitäts-Grades für das Kehlkopfkarcinom belegten Böcking et al. [31] bei 16 Patienten. Patienten mit DNA-Malignitätsgrad 0–1 lebten im Mittel 7,5 Jahre, solche mit DNA-Malignitätsgrad 1–2, 1,5 Jahre ($p = 0,001$). DNA-Aneuploidie war in der Untersuchung von Tytor et al. [179] an 88 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle signifikant ($p = 0,001$) mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert. An einer kleinen Fallzahl ($n = 7$) illustrierten Chatelain et al. [48] die prognostische Validität des DNA-Malignitätsgrades für das Mundhöhlenkarzinom.

Dickdarmentumoren

Dignitätsbestimmungen

Der DNA-zytometrische Nachweis von Aneuploidie wird in mehreren Untersuchungen als Marker für prospektive Malignität bei

den dysplastischen Schleimhautveränderungen der Colitis ulcerosa vorgeschlagen [16, 83, 113]. Abgesehen davon, daß die Objektivität und Reproduzierbarkeit des Aneuploidienachweises größer als diejenige der subjektiven histopathologischen Gradingung ist, wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Aneuploidienachweis und dem späteren Entstehen von Krebs gefunden [118]. Hamada et al. [22] verwendeten den Aneuploidie-Nachweis in schweren Dysplasien der Dickdarmschleimhaut ebenfalls als Malignitäts-Marker.

Malignitäts-Grading

Die hohe prognostische Validität der DNA-Verteilung für das Dickdarmkarzinom wurde in einer Fülle von Publikationen belegt [79, 139, 155, 167, 192, 195]. Zumeist wird der DNA-Gehalt unabhängig vom histologischen Grading und dem TNM-Staging als diagnostisch valideste Variable bei kolorektalen Karzinomen ermittelt. Der Ploidicstatus wies eine enge Korrelation mit der rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit auf. Keiner der Patienten mit «diploidem» DNA-Verteilungsmuster erlitt ein Rezidiv [105, 106]. Daher wird vereinzelt die DNA-Analyse bereits präoperativ zur besseren Planung der Operationsstrategie gefordert [19, 156].

Automation der zytologischen Diagnostik

Erklärtes Entwicklungsziel der Zytoautomation war es, Maschinen für ein automatisches Präscreening von Gebärmutterhalsabstrichen zu entwickeln. Sie sollten die Funktion einer zytologisch-technischen Assistentin im Vormustern von Zellabstrichen übernehmen, ohne dabei durch Ermüdungserscheinungen Leistungsabfälle zu zeigen. Weitere Vorgaben waren eine falsch-positiv-Rate von $<10\%$, eine falsch-negativ-Rate von $<5\%$, eine Kontrollmöglichkeit der positiven Maschinendiagnosen am selben Präparat durch den Zytologen, eine Bearbeitungsdauer von ca. 5 min oder weniger pro Präparat, ein Präparatedurchsatz von ca. 20 000 pro Jahr und ein Anschaffungspreis von $<500\,000,-$ DM [163]. Nachdem erste Entwicklungen zu Beginn der 70er Jahre in Japan und in den USA vorgestellt wurden, begann in der Bundesrepublik 1973 durch den Minister für Forschung und Technologie eine Förderung zweier Entwicklungsprojekte, in welche bis heute etwa 50 Mio. DM öffentlicher Mittel geflossen

sen sind. Diese Förderung ist mittlerweile ausgelaufen. Lediglich zwei Projekte führten zur Erstellung entsprechender Systeme. Dabei handelt es sich um das System FAZYTAN, welches am Institut für Physikalische Elektronik der Universität Stuttgart von Prof. H. W. Bloss und Dipl.-Ing. P. Schwarzmann zunächst in Zusammenarbeit mit AEG/Telefunken, später dann mit der Firma Kontron entwickelt wurde. Kooperierender Zytologe war zunächst Prof. H. J. Soost vom Institut für klinische Zytologie der Technischen Universität München, später dann Prof. E. Sprenger, Abteilung für Zytopathologie der Universität Kiel. Die heutigen Leistungsdaten des Systems gehen aus Tabelle 2 hervor. Die Frage der Vermarktung ist noch nicht geklärt.

Das System LEYTAS II (heute MIAC) wurde von der Firma Leitz in Wetzlar in Kooperation mit der Ecole des Mines in Fontainebleau (Dr. F. Meyer), Frankreich, und Prof. J. S. Ploem von der Abteilung Histochemie und Zytochemie der Universität Leyden, Niederlande entwickelt (Abb. 10). Es darf im Moment als das am weitesten fortgeschrittene Zytoautomaten-Projekt gelten, mit eindrucksvollen Leistungsdaten, die aus Tabelle 2 ersichtlich sind. Für dieses Gerät wurde in den Jahren 1988 und 1989 unter der Leitung von Prof. H. Naujoks an der Universitäts-Frauenklinik Frankfurt/Main ein sogenannter Labortest durchgeführt, durch den auch praktische Erfahrungen gesammelt wurden. Das System MIAC wird auch für Anwendungen außerhalb des Präscreening für das Gebärmutterhalskarzinom in der Zytopathologie von Tumoren eingesetzt [3, 165]. Die Vermarktung dieses Gerätes ist ungewiß.

Eine Kommerzialisierung der Systeme BioPEPR (Niederlande), CERVIFIP (England) und CYBEST (Japan) ist uns nicht bekannt.

Sensitivität und Spezifität sind bei derartigen Screening-Automaten ebenso voneinander abhängig wie bei der menschlichen Diagnostik; d. h. daß je nach gewünschter oberer falsch-negativ-Rate (FNR) mit einer entsprechenden falsch-positiv-Rate (FPR) gerechnet werden muß. Während das System LEYTAS II (MIAC) z. B. bei einer FNR von 0% eine FPR von 16,5% erzielt, kann die FPR auf 3,3% gesenkt werden, wenn man 7,6% falsch-negative Diagnosen akzeptiert. Damit sind die o. g. Anforderungen an einen Präscreeningautomaten erfüllt. Einer FPR von 11,6% würde dann eine FNR von 1,7% entsprechen [138].

Zum Vergleich ist zu berücksichtigen, daß die FNR der subjektivi-

Tabelle 2. Leistungsdaten verschiedener Zytoautomaten zum Präscreening von Abstrichen der Zervix uteri (Angaben ohne Gewähr)

System-Bezeichnung	Referenz	Hersteller	Zahl unterschiedl. Proben (pos.)	Definition Proben	Falsch positiv	Falsch negativ	Unzureichend	Bearbeitung pro Probe	Untersuchte	Färbung	Bemerkungen
BioPEPR	Zahniser et al. [194]	Ø	3444 (57)	≥ CIN I	24,6%	3,5%	5,2%	4 min	5000	?	
CERVISCAN	Tucker, Husain [177] Tucker, Shippey [178]	Ø	121 (50)	≥ CIN I inkl. Entzündg.	18,0%	4,0%	25%	3 min	20000	Haematoxilin	Entwicklung gestoppt
CYBEST	Tanaka et al. [172] Mukawa et al. [122, 123]	Toshiba, Japan	42,988 (84)	≥ CIN I	30,7%	1,19%	6%	6 min	300	Papanicolaou	Entwicklung 1984 gestoppt
FAZYTAN	Schwarzmann et al. [154]	Kontron Bildanalyse, Eching, BRD	ca. 2800	?	?	7% Pap. IVa 1% Pap. IVb/V	5%	10 min	> 500 < 1000	Papanicolaou	Vermarktung nicht geklärt
LEYTAS II (MIAC)	Naujoks et al. [124] van Driel-Kulker [57] Ploem [138]	Wild Leitz GmbH, Wetzlar, BRD	1500 (117)	≥ CIN III	16,5% 11,6% 5,1%	0% 1,7% 7,6%	2,7% * *	17 min für neg. Proben	70000	Feulgen	Labortest 1989 Univ. Frauenkl. Frankfurt. Vermarktung nicht geklärt

* aus van Driel-Kulker [57]



Abb. 10. MIAC (Leytas II) Zytoautomat (Wild-Leitz GmbH, Wetzlar).

ven, konventionellen Zervixzytologie bei insgesamt ca. 20% liegt [160], wovon jeweils ca. 10% einem Entnahmefehler und einem Zyto-diagnosefehler entsprechen. Die Leistung eines Zervixautomaten kann also entsprechend der gewünschten Sensitivität, Spezifität und Wirtschaftlichkeit eingestellt werden. Da in den USA z. Zt. die Forderung von 0% falsch-negativen Diagnosen im Raume steht, muß man mit etwa 16% falsch-positiven Maschinendiagnosen rechnen, die durch interaktive Zurückweisung von Artefakten auf ca. 11% gesenkt werden können [57]. Diese 11% der Präparate müssen dann, ebenso wie die positiven Maschinendiagnosen, von einem Zytologen nach-mikroskopiert werden.

Hauptproblem, welches den derzeitigen klinischen Einsatz der Zytoautomaten am meisten behindert, ist die aufwendige Präparationstechnik, um «automatengerechte» Zellvereinzlungs-Präparate zu erhalten. Die Automaten können derzeit noch nicht mit genügender Effektivität an Routineausstrichen arbeiten. Dazu müssen die Zellabstriche zunächst in Suspension gebracht werden, um daraus durch Zentrifugation der Zellen auf Objektträger Sedimentationspräparate herzustellen (monodisperse Objektträgerdeposition). Diese Herstel-

lung ist derzeit noch zu zeitaufwendig (ca. 3 h für 12 Präparate) und zu kostspielig. Sie muß heute noch in hochspezialisierten zentralen Laboratorien erfolgen. Solange also keine einsatzfähigen Präparationsautomaten verfügbar sind, ist ein routinemäßiger Einsatz auch der besten Zytoautomaten zum Massenscreening illusorisch. Ansätze für eine Entwicklung derartiger Automaten existieren aber bereits [133].

Als weiteres Einsatzgebiet für Präscreeningautomaten bietet sich die Bearbeitung von Urinen zur Diagnostik des Urothelkarzinoms und von Sputen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms, jeweils bei Risikogruppen, an. Auch hier muß für eine Routineanwendung gleichzeitig das präparatorische Problem gelöst werden. Ferner ist der Einsatz von Zytoautomaten sinnvoll, wenn es darum geht, in einer extrem hohen Zahl von Zellen (z. B. im peripheren Blut) seltene Ereignisse (rare events) wie wenige aneuploide Zellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ oder einzelne immunhistochemisch oder mit DNA-Sonden markierte kranke Zellen aufzufinden (z. B. IEA-positive Zellen im Blut zum Zytomegalienachweis nach Nierentransplantationen und Immunsuppression).

Eine nur bedingte Indikation für den Einsatz von Zytoautomaten stellt dagegen z. B. die Analyse der DNA-Verteilung an Tumorproben mit diagnostischem oder prognostischem Ziel dar. Diese Aufgabe kann von preiswerteren, interaktiven Geräten ebensogut übernommen werden, wobei u. U. ein geringer zeitlicher Mehraufwand für die Zellmessung in Kauf genommen werden muß. Dieser wird aber kompensiert durch die weniger aufwendige Ausstrichpräparation für interaktive Messungen. Eine jederzeitige Kontrolle über die tatsächlich vermessene Zellpopulation wird aber von Pathologen nachdrücklich gefordert. Diagnostisch problematische Routinepräparate mit Dysplasien oder «borderline lesions» können Zytoautomaten zur Dignitätsabklärung mittels DNA-Zytometrie z. Zt. noch nicht vorgelegt werden. Ihre Bearbeitung ist, nach Umfärbung nach Feulgen, nur mit interaktiven Systemen möglich.

Aus zytopathologischer Sicht liegt heute die Indikation für den Einsatz von Zytoautomaten im Massenscreening extrem repetitiver Zellproben (Gebärmutterhalsabstriche, Urine, Sputen), sobald das präparatorische Problem gelöst ist, sowie in der «rare event detection» an mit speziellen Markern behandelten Proben. Die Indikation für den Einsatz interaktiver Meßsysteme liegt dagegen in der Bearbei-

tung zytologischer Routinepräparate zum Zweck der Dignitätsabklärung und des Malignitätsgradings.

Die Vorbehalte gegen die Einführung messender Verfahren in die Routinediagnostik seitens der Pathologen sind sehr groß. Ein Editorial in der Zeitschrift *Pediatric Pathology* mit dem Titel «Quantitative Histology and Other Perversions» möge dies illustrieren [21]. Dennoch zeichnet sich derzeit eine Trendwende in der Pathologie ab. Sowohl die Deutsche Gesellschaft für Pathologie, als auch die Internationale Akademie für Pathologie, Deutsche Sektion, erwägen in ihren Kongressen separate Veranstaltungen zur DNA-Zytometrie in der Diagnostik zu integrieren. Kassenärztliche Vereinigungen befassen sich mit der Möglichkeit einer gebührenordnungsmäßigen Anerkennung diagnostischer DNA-Messungen.

Zusammenfassung

In einem Übersichtsartikel werden die Indikationen für eine DNA-Zytometrie-unterstützte zytologische Krebsdiagnostik dargestellt. Dabei handelt es sich insbesondere um die Dignitätsabklärung von Dysplasien (z. B. der Zervix uteri oder der Bronchialschleimhaut) und von borderline Tumoren (z. B. Ovarial-, Knochen-, Weichteil-) sowie um ein prognostisch valides und reliables Malignitäts-Grading (z. B. für Mamma-, Nieren-, Prostata-, Harnblasen-, Dickdarmkarzinome und maligne Lymphome). Die Einsatzmöglichkeiten der diagnostischen DNA-Zytometrie werden gemäß Literaturangaben für 18 verschiedene Tumorlokalisationen aufgeführt. Moderne Meßapparaturen zur DNA-Zytometrie (Durchflußzytometer und insbesondere TV-Bildanalyse-Systeme) werden samt ihrer Leistungsdaten vorgestellt. Der Entwicklungsstand der Zytoautomaten für ein Präscreening an Gebärmutterhalsabstrichen wird beschrieben.

Literatur

1 Abe S, Makimara S, Itabaski K, Nagai T, Tsuneta Y, Kawakami Y: Prognostic significance of nuclear DNA content in small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1985; 56: 2025–2030.

- 2 Akerman M, Killander D, Rydholm A, Rööser B: Aspiration of musculo skeletal tumors for cytodiagnosis and DNA-analysis. *Acta Orthop Scand* 1987; 58: 523–528.
- 3 Allhoff E, Liedke S, de Riese W, Wittekind Ch, Tanke HJ, Jonas U: Metastatic potential in NSGCT Stage I. *Urol Res* 1989; 17: 332.
- 4 Atkin NB, Baker MC: Chromosome and DNA abnormalities in ovarian cystadenoma. *Lancet* 1970; I: 470.
- 5 Aktin NB: Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia. A clinical and histopathologic assessment. *Cancer* 1971; 27: 1964–1974.
- 6 Atkin NB: Modal desoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. *Br Med J* 1972; 1: 271–272.
- 7 Atkin NB: Prognostic significance of ploidy level in human tumors. I. Carcinoma of the uterus. *J Natl Cancer Inst* 1976; 56: 909–910.
- 8 Atkin NB, Kay R: Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. *Br J Cancer* 1979; 10: 210–231.
- 9 Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS: DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 1980; 2: 161–165.
- 10 Auer GU, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A: Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res* 1984; 44: 394–396.
- 11 Auer GU, Zetterberg A: The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant of breast, prostate and cartilage, in Koss LG, Cleman DV (eds): *Adv Clin Cytol* 1984, vol 2, pp 123–134.
- 12 Auffermann W, Repges R, Böcking A: Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV-image analysis system. *Anal Quant Cytol* 1984; 6: 179–188.
- 13 Auffermann W, Böcking A: Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1985; 7: 218–226.
- 14 Auffermann W, Krüger GRF, Böcking A: DNA image cytometry in acquired immune deficiency syndron (AIDS). *Anal Quant Cytol Histol* 1986; 8: 19–24.
- 15 Auffermann W, Fohlmeister I, Böcking A: Diagnostic and prognostic value of DNA image cytometry in myelodysplasia (MDS). *J Clin Pathol* 1988; 41: 604–608.
- 16 Avtandilov GG, Kazantseva IA: Comparative microspectrophotometric study of the DNA content in the diagnosis of pretumorous processes and cancer. *Virchows Arch Abt Path Anat* 1973; 359: 289–297.
- 17 Barlogie B, Drewinko B, Schuman J: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980; 69: 195–203.
- 18 Barlogie B: Abnormal cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20: 1123–1125.
- 19 Banner B, Tomas de la Vega JE, Roseman DL, Coon JS: Should flow cytometry DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma? *Ann Surg* 1985; 202: 740–744.
- 20 Bedrossian CWM, Raber M, Barlogie B: Flow cytometry and cytomorphology in primary resectable breast cancer. *Anal Quant Cytol* 1981; 3: 112–116.

- 21 Benjamin DR: Quantitative histology and other perversions. *Ped Pathol* 1989; 9: 243.
- 22 Berryman IL, Harvey JM, Sterrett GF, Papadinitriou JM: The nuclear DNA content of human breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1987; 9: 429–434.
- 23 Beust M, Barten M, Kreuzberg M, Krieger-Stojalowska A, Rohde E: Comparative cytophotometric and cytomorphometric investigations on koilocytes and atypical squamous epithelium of the cervix uteri. *Zent Allg Pathol Anat* 1986; 131: 517–521.
- 24 Bjelenkrantz K, Lundgren J, Olofsson J: Single cell DNA measurements in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous laryngeal epithelia, with special reference to the occurrence of hypertetraploid cell nuclei. *Anal Quant Cytol* 1983; 5: 184–188.
- 25 Blöndal T, Bengtsson A: Diagnostic application of nuclear DNA measurements on bronchial secretions. *Anal Quant Cytol* 1982; 4: 269–274.
- 26 Blöndal T, Lindgren A: Fluorescence cytophotometric measurements of nuclear DNA in adenocarcinoma of the lung. Relation of proliferative activity and DNA ploidy to prognosis. *Anal Quant Cytol* 1982; 4: 255–332.
- 27 Blöndal T, Ponten J: DNA ploidy in small cell carcinoma of the lung. *Anticancer Res* 1983; 3: 47–52.
- 28 Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359–377.
- 29 Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W: Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol* 1984; 6: 1–8.
- 30 Böcking A, Auffermann W, Joachim D, Contractor H, Wohltmann D: DNA grading of malignancy and tumor regression in prostatic carcinoma under hormone therapy. *Appl Pathol* 1985; 3: 206–214.
- 31 Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlöndorff G, Goebels R: Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 1985; 56: 1600–1604.
- 32 Böcking A, Chatelain R, Auffermann W, Krüger GRF, Asmus B, Wohltmann D, Schuster C: DNA grading of malignant lymphomas. I. Prognostic significance, reproducibility and comparison with other classifications. *Anticancer Res* 1986; 1205–1215.
- 33 Böcking A, Chatelain R, Löhr GW, Reif M, Rossner R, Becker H: DNA grading of malignant lymphomas. II: Correlation with clinical parameters. *Anticancer Res* 1986; 6: 1216–1223.
- 34 Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, von Kalckreuth G: DNA cytometric diagnosis of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix. *Acta Cytol* 1986; 30: 608–615.
- 35 Böcking A, Auffermann W: Algorithm for DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol* 1986; 8: 363.
- 36 Böcking A: Perkutane diagnostische Punktionen, in Günther RW, Thelen M (eds): *Interventionelle Radiologie*. Stuttgart, Thieme 1988, pp 447–460.
- 37 Böcking A, Chatelain R: Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecological cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1988; 11: 177–186.
- 38 Böcking A, Chatelain R, Orthen U, Gien G, von Kalkreuth G, Joachim D, Wohltmann D: DNA-grading of prostatic carcinoma: Prognostic validity and reproducibility. *Anticancer Res* 1988; 8: 129–136.
- 39 Böcking A, Chatelain R, Biesterfeld S, Noll E, Biesterfeld D, Wohltmann D, Goecke C: DNA grading of breast cancer. Prognostic validity, reproducibility and comparison with other classifications. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11: 73–80.
- 40 Bollmann R: DNA-bildzytometrische Diagnose prospektiver Malignität an zervikalen Dysplasien durch DNA-Zytometrie. *Geburtsh Frauenheilk* 1990; 50: 113–117.
- 41 Bollmann R: Adenocarcinoma in situ der Cervix uteri. Diagnose prospektiver Malignität durch DNA-Zytometrie. *Tumor Diagn Ther* (im Druck).
- 42 Boon ME, Auer GU, van Kaam H, Schwinghammer H: Classifying breast carcinomas with DNA measurements and morphometry. *Cytometry* 1984; 5: 469–472.
- 43 Borgmann V, Al-Abadi H, Nagel R: Treatment of locally advanced prostatic carcinoma with LHRH analogues: Cytological, DNA-cytophotometrical and clinical results. *Am J Clin Oncol* 1988; 11 (suppl 1): 519–529.
- 44 Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B, Kleinemeier B, Schumann J, Göhde W, Ritter J, Müller KM, von Bassewitz DB, Roessner A, Grundmann E: Differential pattern of DNA aneuploidy in human malignancies. *Path Res Pract* 1985; 179: 310–317.
- 45 Caspersson T: Quantitative cytochemical studies on normal, premalignant and atypical cell populations from the uterine cervix. *Scand Arch Physiol* 1936; 73: 8–45.
- 46 Chatelain R, Löhr GW, Common H, Böcking A: Angioimmunoblastic lymphadenopathy – a malignant disease due to DNA aneuploidy. *Anticancer Res* 1989; 9: 129–132.
- 47 Chatelain R, Schunck T, Schindler E, Schindler A, Böcking A: Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasia of the uterine cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med* 1989; 34: 505–510.
- 48 Chatelain R, Hoffmeister B, Härle F, Böcking A, Mittermayer C: DNA grading of oral squamous carcinomas. A preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989; 18: 43–46.
- 49 Chatelain R, Biesterfeld St, Kropff M, Wenzler Th, Wagner A, Wohltmann D, Böcking A, Muller CP: Prognostic significance of DNA-image cytometry in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol* (eingereicht).
- 50 Common H, Böcking A: Angio immunoblastic lymphadenopathy: A malignant lymphoma, due to nuclear DNA content. *Int. Conf. on malignant lymphomas. Current status and prospects. 2.–5. 1981, Lugano, Schweiz. Book of abstracts.*
- 51 Cornelisse CJ, van de Velde CJH, Caspers RJC, Moolenaar AJ, Hermanns J: DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 1987; 8: 225–234.
- 52 Coulsen PB, Thorntwaite JT, Wooley TW, Sugarbaker EV, Sechinger D: Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 1984; 44: 4187–4196.
- 53 Coulsen PB, Thorntwaite JT, Wooley TW, Sugarbaker EV, Sechinger D: Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 1984; 44: 4187–4196.
- 54 Dietel M: Discrimination between benign, borderline lesions and malignant epi-

- thelial ovarian tumors using tumor markers. An immunohistochemical study. *Cancer Detect Prev* 1983; 6: 255–262.
- 55 Dowle CS, Owainati B, Robins A, Burns K, Ellis IO, Elston CW, Blamoy RW: Prognostic significance of the DNA content in human breast cancer. *Br J Surg* 1987; 74: 133–136.
- 56 Dreyer T, Gahm T, Delling G: Vollautomatische DNA- und Strukturanalyse zytologischer Präparate von Knochentumoren. *Verh Dtsch Ges Path* 1989; 73: 1.
- 57 Van Driel-Kulker AMJ: Automated image analysis applied to the diagnosis of cervical cancer. These presente a l'Universite Scientifique, Technologique et Medicale de Grenoble, France (1987).
- 58 Eneroth CM, Zetterberg A: Nuclear DNA content as a criterion of malignancy in salivary gland tumors of the oral cavity. *Acta Otolaryngol* 1973; 75: 290–298.
- 59 Eneroth CM, Zetterberg A: Microspectrophotometric analysis of malignant salivary gland tumors. *Acta Otolaryngol* 1974; 77: 289–294.
- 60 Eneroth CM, Zetterberg A: A cytochemical method of grading the malignancy of salivary gland tumours preoperatively. *Acta Otolaryngol* 1976; 81: 489–495.
- 61 Erhardt K, Auer G, Björkholm E, Forsslund G, Moberger B, Silverswärd C, Widesell G, Zetterberg A: Prognostic significance of the nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer Res* 1984; 44: 2198–2202.
- 62 Evans AS, Monaghan JM: Nuclear DNA content of normal, neoplastic and «wart affected» cervical biopsies. *Anal Quant Cytol* 1983; 5: 112–116.
- 63 Fallenius A, Svane G, Auer G, Caspersson TO: Cytochemical classification of non-palpable breast carcinoma. *Anal Quant Cytol* 1983; 5: 9–12.
- 64 Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM: Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 1988; 62: 331–341.
- 65 Federspiel BH, Sobin LH, Helwig EB, Mikel UV, Bahr G: Morphometry and cytophotometric assessment of DNA in smooth muscle tumours (leiomyomas and leiomyosarcomas) of the gastrointestinal tract. *Anal Quant Cytol Histol* 1987; 9: 105–114.
- 66 Fordham MVP, Burdget AH, Matthews J, Williams G, Cooke T: Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome. *Br J Surg* 1986; 73: 400–403.
- 67 Fossa SD, Kaalhus O: Computer-assisted image analysis of Feulgen-stained cell nuclei from transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect A* 1977; 85: 590–602.
- 68 Fossa SD, Petersen EO, Thorud E, Melvik JE, Ous S: DNA flow cytometry in human testicular cancer. *Cancer Lett* 1985; 28: 55–60.
- 69 Friedlander ML, Taylor IW, Russell P, Musgrove EA, Hedley DW, Tattersall MHN: Ploidy as a prognostic factor in ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1983; 2: 55–63.
- 70 Friedlander ML, Russell P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN: Flow cytometry analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumors of borderline malignancy. *Pathology* 1984; 16: 301–306.
- 71 Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1984; 44: 397–400.
- 72 Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW: Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 1984; 37: 961–974.
- 73 Fu YS, Reagan JW, Richart RW: Definition of precursors. *Gynecol Oncol* 1981; 12: 220–231.
- 74 Fu YS, Reagan JW, Fu AS, Janija KE: Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix. II. Prognostic value of nuclear DNA analysis. *Cancer* 1982; 49: 2571–2577.
- 75 Geisinger KR, Homesley HD, Morgan TM, Kute TE, Marshall RB: Endometrial carcinoma. A multiparameter clinicopathologic analysis including the DNA profile and the sex steroid hormone receptor. *Cancer* 1986; 58: 1518–1525.
- 76 Geisinger KR, Kute TE, Marshall RB, Homesley HD, Morgan TM: Analysis of the relationship of the ploidy and cell cycle kinetics to differentiation and the female sex steroid hormone receptors in adenocarcinomas of the endometrium. *Am J Clin Pathol* 1986; 85: 536–541.
- 77 Giwerzman A, Clausen O, Skakkebaek NE: Carcinoma in situ of the testis: aneuploid cells in semen. *Br Med J* 1988; 296: 1762–1764.
- 78 Göppinger A, Freudenberg N, Ross A, Hillemans HG, Hilgarth M: The prognostic significance of the DNA distribution in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol* 1986; 8: 148–151.
- 79 Goh HS, Jass JR, Atkin WS, Cuzik J, Northover JMA: Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in operable rectal cancer: A multivariate analysis. *Int J Colorect Dis* 1987; 2: 17–21.
- 80 Gustafson E, Tribukait B, Esposti PL: DNA profile and tumour progression in patients with superficial bladder tumours. *Urol Res* 1982; 10: 13–18.
- 81 Hall TL, Fu YS: Applications of quantitative microscopy in tumor pathology. *Lab Invest* 1985; 53: 5–21.
- 82 Hamada S, Itoh R, Fujita S: DNA distribution of the so-called severe dysplasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. *Cancer* 1988; 61: 1555–1562.
- 83 Hammberg C, Rubio C, Slezak P, Tribukait B, Öhman U: Flow cytometric DNA analysis as a means for early detection of malignancy in patients with chronic ulcerative colitis. *Gut* 1984; 25: 905–908.
- 84 Hamper K, Schimmelpenninck H, Caselitz J, Arps H, Berger J, Askensten U, Auer G, Seifert G: Mucoepidermoid tumors of the salivary glands. Correlation of cytophotometric data and prognosis. *Cancer* 1989; 63: 708–717.
- 85 Hedley DW, Rugg CA, Ng ABP, Taylor IW: Influence of cellular DNA content on disease free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44: 5395–5398.
- 86 Hedley DW, Philips J, Rugg CA, Taylor IW: Measurements of cellular DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20: 749–752.
- 87 Heim S, Mittelman F: *Cancer cytogenetics*. New York, Alan R Liss, 1987.
- 88 Heliö E, Karaharju E, Nordling S: Flow cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumours. *Cytometry* 1985; 6: 165–171.
- 89 Hiddemann W, Müller KM, von Bassewitz DB, Ottensmeier C, Meyer-Kramer J, Büchner T: Incidence and significance of DNA aneuploidies in breast tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1985; 69: 545–548.

- 90 Hilgarth M: Abklärung unklarer Zervixbefunde durch DNA-Einzelzell-Fluoreszenz-Zytophotometrie. *Fortschr Med* 1976; 94: 1485–1487.
- 91 Hofstädter F, Jakse G, Lederer B, Mikuz G, Delgado R: Biological behaviour and DNA cytophotometry of urothelial bladder carcinoma. *Br J Urol* 1984; 56: 289–295.
- 92 Hrushowetz SB, Lauchlan SC: Comparative DNA content of cells in the intermediate and parabasal layers of cervical intraepithelial neoplasia studied by two-wavelength Feulgen cytophotometry. *Acta Cytol* 1970; 14: 68–77.
- 93 Huber JC: Numerische und strukturelle Chromosomen-Aberrationen bei gynäkologischen Malignomen. Stuttgart, Thieme, 1986.
- 94 Iversen OE, Laerum OP: Ploidy disturbances in endometrial and ovarian carcinomas. *Anal Quant Cytol* 1985; 7: 327–336.
- 95 Iversen OE: Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: A prognostic factor in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 760–766.
- 96 Izuo M, Okagaki T, Richart RM, Lattes R: Nuclear DNA content in hyperplastic lesions of cystic disease of the breast with special reference to malignant alteration. *Cancer* 1971; 28: 620–627.
- 97 Jagella HP, Stegner HE: Zur Dignität der condylomata acuminata. Klinische, histopathologische und cytophotometrische Befunde. *Arch Gynäkol* 1974; 216: 119–132.
- 98 Jakobsen A, Bichel P, Sell A: DNA distribution in biopsy specimens from human cervical carcinoma investigated by flow cytometry. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1979; 29: 337–342.
- 99 Jakobsen A: Ploidy level and short time prognosis of early cervix cancer. *Radiother Oncol* 1984; 1: 271–275.
- 100 Johnson TS, Adelson MD, Sneige N, Williamson KD, Lee MM, Katz R: Cervical carcinoma DNA content, S-fraction and malignancy grading. I. Interrelationship. *Gynecol Oncol* 1987; 26: 41–56.
- 101 Jonas U, Tanke HJ, Ploem TS: Automatische Bildanalyse von zytologischen Präparaten zur Diagnose und Gradierung des Prostatakarzinoms, in Helpap B, Senge Th, Vahlensieck W (eds): Die Prostata. Bd. 2. Prostatakarzinom. Frankfurt, pmi, 1984, pp 204–211.
- 102 Juni N: DNA content of human tumor cell nucleus. A study of fibroadenoma and carcinoma of the breast. *GANN* 1967; 58: 297–304.
- 103 Klöppel G, Knöfel WT, Baisch H, Otto U: Prognosis of renal carcinoma related to nuclear grade, DNA content and Robson stage. *Euro Urol* 1986; 12: 426–431.
- 104 Klose KC, Günther RW: Perkutane diagnostische Punktionen. CT-gesteuerte Punktion, in Günther RW, Thelen M (eds): Interventionelle Radiologie. Stuttgart, Thieme, 1988, pp 459–484.
- 105 Kokal WA, Duda RB, Azumi N, Sheibani K, Kemeng MM, Terz JJ, Harada R: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Arch Surg* 1986; 121: 1434–1439.
- 106 Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada JR: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *J Am Med Ass* 1986; 255: 3123–3127.
- 107 Kreicbergs A, Zetterberg A, Söderberg G: The prognostic significance of nuclear DNA content in chondrosarcoma. *Anal Quant Cytol* 1980; 2: 272–279.
- 108 Kreicbergs A, Silfverswärd C, Tribukait B: Flow DNA analysis of primary bone

- tumors. Relationship between cellular DNA content and histopathologic classification. *Cancer* 1984; 53: 129–136.
- 109 Krüger GRF: New working formulation for Non-Hodgkin-Lymphome: Eine klinisch-pathologische Korrelation, in Diehl v. Sack H. (eds): Diagnostik und Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome Akt Onkol. München, Zuckschwert, 1983, vol 12, pp 9–16.
- 110 Krug H, Eberling K: Impulszytophotometrische Charakterisierung von malignen Ovarialtumoren. *Arch Geschwulstforsch* 1976; 46: 214–224.
- 111 Krug H, Schönfelder M: Impulszytophotometrie und Katamnese bei Mammakarzinom. *Acta Histochem* 1984; 30 (suppl): 117–127.
- 112 Leistenschneider W, Nagel R: Zellkern-DNA-Analyse an unbehandelten und behandelten Prostatakarzinomen mit Scanning-Einzelzellzytophotometrie. *Akt Urol* 1979; 10: 353–358.
- 113 Löfberg R, Tribukait B, Öst A, Broström O, Reichard H: Flow cytometric DNA analysis in longstanding ulcerative colitis: A method of prediction of dysplasia and carcinomal development? *Gut* 1987; 28: 1100–1106.
- 114 Lundberg S, Carstensen J, Rundquist I: DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res* 1987; 47: 1973–1977.
- 115 Ljungberg B, Stenling R, Roos G: Prognostic value of desoxyribonucleic acid content in metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1986; 136: 801–804.
- 116 McGuire WL, Dressler LG: Emerging impact of flow cytometric in predicting recurrence and survival in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 405–410.
- 117 Mellin W, Roessner A, Grundmann E, Wörmann B, Hiddemann W, Immenkamp M: 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* 1985; 180: 619–625.
- 118 Melville DM, Jass JR, Shepherd NA, Northover JMA, Capellaro D, Richman PI, Lennard-Jones JE, Ritchie JK, Andersen SH: Dysplasia and deoxyribonucleic acid aneuploidy in the assessment of precancerous changes in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988; 95: 668–675.
- 119 Moberger M, Auer G, Forsslund G, Moberger G: The prognostic significance of DNA measurements in endometrial carcinoma. *Cytometry* 1984; 5: 430–436.
- 120 Müller J, Skakkebaek NE, Lundsteen C: Aneuploidy as a marker for carcinoma in situ of the testis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1981; 89: 67–68.
- 121 Mukada T, Sasno N, Sato E: Evaluation of esophageal dysplasia by cytofluorometric analysis. *Cancer* 1978; 41: 1399–1404.
- 122 Mukawa A, Kamitsuma Y, Tsunekawa S, Tanaka N: Report on a long-term trial of CYBEST Model 2 for prescreening for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Cell Pathol* 1989; 1: 225–233.
- 123 Mukawa A, Kamitsuma J, Jisaki F, Tanaka N, Ikeda H, Ueno T, Tsunekawa S: Progress report on experimental use of CYBEST model 2 for practical gynecologic mass screening. Alterations of the specimen rejection threshold and specimen preparation. *Analyt Quant Cytol* 1983; 5: 31–35.
- 124 Naujoks H, Strohmeier R, van Driel-Kulker AMJ, Ploem JS: Ergebnisse des Labortests mit dem Leitz MIAC. Arbeitstreffen: Bestandsaufnahme und Perspek-

- tiven der Zytoautomation. Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart, 31. 8. 1989.
- 125 Ng ABP, Atkin NB: Histological cell type and DNA values in the prognosis of squamous cell cancer of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1979; 28: 322–331.
 - 126 Nishiya I, Kikuchi T, Moriya S, Shimotomai K, Sauramura I: Cytophotometric study of premalignant and malignant cells of the cervix in an approach towards automated cytology. *Acta Cytol* 1977; 21: 271–275.
 - 127 Okagaki R, Meyer AA, Sciarra JJ: Prognosis of irradiated carcinoma of cervix uteri and nuclear DNA in cytologic postirradiated dysplasia. *Cancer* 1974; 33: 647–652.
 - 128 Olszewski W, Darzynkiewicz Z, Rosen PP, Schwartz MK, Melamed M: Flow cytometry of breast carcinoma. I. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 1981; 48: 980–984.
 - 129 Olszewski W, Darzynkiewicz Z, Claps ML, Melamed MR: Flow cytometry of lung carcinoma. A comparison of DNA stemline and cell cycle distribution with histology. *Anal Quant Cytol* 1982; 4: 90–94.
 - 130 Ono J, Auer G: The significance of DNA measurements for the early detection of bronchial cell atypia. *Cytometry* 1983; 3: 340–344.
 - 131 Opfermann M, Brugal G, Vassilakow P: Cytometric of breast carcinoma: significance of ploidy balance and proliferation index. *Cytometry* 1987; 8: 217–224.
 - 132 Otto U, Baisch H, Huland H, Klöppel G: Tumor cell desoxyribonucleic acid content and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1984; 132: 237–239.
 - 133 Oud P, Haag DJ, Zahniser DJ, Ramaekers FCS, Huysmans ACLM, Veldhuizen JAM, Verhegen RHM, Verrijp K, Broers JCV, Herman CJ, Vooijs GP: Cytopress: Automated slide preparation of cytologic material from suspension. *Cytometry* 1986; 7: 8–17.
 - 134 Patek E, Johannisson E, Kramer E, Riotton G: Microfluorometric grading of mammary tumors: A pilot study. *Anal Quant Cytol* 1980; 2: 264–271.
 - 135 Pauwels RPE: Grading in superficial bladder cancer: Morphological and biological parameters. *Med. Diss. Kath. Univ. Nijmegen*, 1987.
 - 136 Pfitzer P, Vyska K, Stecher G: Analysis of DNA histograms by computer. *Beitr Pathol* 1976; 159: 157–185.
 - 137 Ploem-Zaaijer JJ, Beyer-Boon ME, Leyte-Veldstra L, Ploem JS: Cytofluorometric and cytophotometric DNA measurements of cervical smears stained using a new bicolor method, in Pressmann NJ, Wied GL (eds): *Automation of cancer cytology and cell image analysis. Tutorials of cytology*, Chicago, 1979, pp 225–235.
 - 138 Ploem JS: Das Leitz-MIAC-System; erweiterte Fragestellungen. *Arbeitstreffen: Bestandsaufnahme und Perspektiven der Zytoautomation. Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart*, 31. 8. 1989.
 - 139 Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, Durdey P, Dyson JED, Williams NS, Bird CC: Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 285–291.
 - 140 Raber MN, Barlogie B, Latreille J, Bedrossian C, Fritsche H, Blumenschein G: Ploidy, proliferative activity and estrogen receptor content in human breast cancer. *Cytometry* 1982; 3: 36–41.
 - 141 Rainwater LM, Hosaka Y, Farrow GM, Lieber NM: Well differentiated clear cell

- renal carcinoma: Significance of nuclear desoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *J Urol* 1987; 137: 15–20.
- 142 Rainwater LM, Hosaka Y, Farrow GM, Kramer SA, Kelalais PP, Lieber NM: Wilms tumors: Relationship of nuclear desoxyribonucleic acid ploidy to patient survival. *J Urol* 1987; 138: 974–978.
 - 143 Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovita PS: Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987; 93: 1–11.
 - 144 Rubio CA, Auer GU, Kato Y, Lin F: DNA profiles in dysplasia and carcinoma of the human esophagus. *Anal Quant Cytol Histol* 1988; 10: 207–210.
 - 145 Rutgers DH, von der Linden PM, Peperzeel HA: DNA flow cytometry of squamous cell carcinomas from the human uterine cervix: The identification of prognostically different subgroups. *Radiother Oncol* 1986; 7: 249–258.
 - 146 Sachs H, Wambach EU, Wirthner K: Zytophotometrisch ermittelter DNS Gehalt im normalen, hyperplastischem und karzinomatösem menschlichen Endometrium. *Arch Gynäkol* 1974; 217: 349–365.
 - 147 Sandberg AA: Chromosomal changes in bladder cancer: Clinical and other correlations. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 15: 163–175.
 - 148 Sandritter W, Fischer R: Der DNA Gehalt des normalen Plattenepithels, des Carcinoma in situ und des invasiven Carcinoms der Portio. *Proceedings of the first international congress of exfoliative cytology. Philadelphia, Lippincott*, 1961, pp 189–195.
 - 149 Sandritter W: Cytophotometrische Untersuchungen am Portiocarcinom und seinen Vorstufen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1964; 48: 34–48.
 - 150 Sandritter W, Carl M: Cytophotometric measurements of the DNA content (Feulgen reaction) of malignant human tumors. *Acta Cytol* 1966; 10: 26–30.
 - 151 Sandritter W, Böhm N: DNA in human tumors: A cytophotometric study. *Curr Top Pathol* 1975; 60: 151–219.
 - 152 Sandritter W: *Allgemeine Pathologie*. Stuttgart, Schattauer, 1981.
 - 153 Sapi Z, Bodo M, Sugar J: DNA cytometry of soft tissue tumors with TV image analysis system. *Pathol Res Pract* 1989; 3: 363–367.
 - 154 Schwarzmann P, Bloss WH, Sprenger E: Ergebnisse des Labortests mit dem FAZYTAN-System. *Arbeitstreffen: Bestandsaufnahme und Perspektiven der Zytoautomation. Institut für physikalische Elektronik, Universität Stuttgart*. 31. 8. 1989.
 - 155 Scott N, Wicand HS, Moertel CG, Cha SS, Beart RW, Lieber MM: Colorectal Cancer. Dukes stage, tumor site, preoperative plasma CEA level and patients prognosis related to tumor DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 1987; 122: 1375–1379.
 - 156 Scott N, Beart RW: Colorectal Cancer: Flow cytometric DNA analysis. *Aust NZ J Surg* 1988; 58: 189–191.
 - 157 Seppelt U, Sprenger E, Hedderich J: Investigation of automated DNA diagnosis and grading of prostatic cancer. *Analyt Quant Cytol Histol* 1984; 8: 152–157.
 - 158 Shevchuk MM, Richart RM: DNA content of condyloma acuminatum. *Cancer* 1982; 49: 489–492.
 - 159 Smeets AWGB: Chromosome and flow cytometric studies of urinary bladder cancer. *Med. Diss. Univ. Maastricht*, 1987.

- 160 Soost HJ, Baur S: Gynäkologische Zytodiagnostik. Lehrbuch und Atlas. Stuttgart, Thieme, 1989, pp 248–255.
- 161 Sprenger E, Hilgarth M, Schaden M: A follow up of doubtful findings in cervical cytology by Feulgen DNA cytophotometry. *Beitr Pathol* 1974; 152: 58–65.
- 162 Sprenger E, Volk E, Michaelis WE: Die Aussagekraft der Zellkern-DNA-Bestimmung bei der Diagnostik des Prostatakarzinoms. *Beitr Pathol* 1974; 153: 370–378.
- 163 Sprenger E: Automation in der Zytodiagnostik. In: Automation der zytologischen Diagnostik. Hrsg. Deutsche Forschungs- und Versuchsanstalt für Luft- und Raumfahrt e. V. (DFVLR). Verlag TÜV Rheinland, Köln, 1985, pp 7–16.
- 164 Stephenson RA, James BC, Gay H, Fair WR, Whitmore WF, Melamed MR: Flow cytometry of prostate cancer: Relationship of DNA content to survival. *Cancer Res* 1987; 47: 2504–2509.
- 165 Stöckle M, Tanke HJ, Mesker WE, Ploem JS, Jonas U, Hohenfellner R: Automated DNA image cytometry: A prognostic tool in infiltrating bladder carcinoma? *World J Urol* 1987; 5: 127.
- 166 Störkel S, Pannen B, Kipping G, Thönes B: DNA image cytometry of human renal cell carcinoma. 5. SEK-Symposium, Heidelberg, 10.–12. 4. 1989.
- 167 Streffer C, van Benningen D, Gross E, Schabronak J, Eigler FW, Rebmann A: Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma. *Radiol Oncol* 1986; 5: 303–310.
- 168 Sugimachi K, Inokudi K, Matsuura H, Okamura T, Sasaki O: Cytophotometric DNA analysis of early esophageal carcinoma. *Jap J Surg* 1983; 13: 37–41.
- 169 Sugimachi K, Koga J, Mori M, Huang GJ, Yang K, Zhang RGZ: Comparative data on cytophotometric DNA in malignant lesions of the esophagus in the Chinese and Japanese. *Cancer* 1987; 59: 1947–1950.
- 170 Sun DQ, Feng CH, Fang JQ, Biesterfeld S, Böcking A: Jaffe classification for giant cell tumors of the bone – interobserver variation and its clinical relevance. *Clin Orth Rel Res* 1990 (im Druck).
- 171 Sun DQ, Biesterfeld S, Adler CP, Böcking A: Prediction of recurrence in giant cell tumors of the bone by DNA cytometry. *Cancer* 1990 (im Druck).
- 172 Tanaka N, Ikeda H, Ueno T, Mukawa A, Kamitsuma K: Field test and experimental use of CYBEST Model 2 for practical gynecologic mass screening. *Anal Quant Cytol* 1979; 1: 122–126.
- 173 Tavares AS, Costa J, Maia JC: Correlation between ploidy and prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol* 1973; 109: 676–679.
- 174 Tavares AS, Costa J, de Carvalho A, Reis M: Tumour ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate. *Br J Cancer* 1986; 20: 438–441.
- 175 Tirindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, Modini C, Botti C, Cicconetti F, Stipa S: Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer. 5-year-study. *Cancer* 1987; 60: 844–851.
- 176 Tsushima K, Hagarney DM, Rainwater LM, Adson MA, Farrow GM, Ilstrup DM, Lieber MM: Prognostic significance of nuclear deoxyribonucleic acid ploidy patterns in resected hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Surgery* 1987; 102: 634–643.
- 177 Tucker JH, Husain OAN: Trials with cerviscan experimental prescreening device on the polylysine-prepared slides. *Anal Quant Cytol* 1981; 3: 117–120.
- 178 Tucker JH, Shippey GF: Basic performance tests on the CREVIFIP linear array prescreener. *Anal Quant Cytol* 1983; 5: 129–137.
- 179 Tylor M, Franzen G, Olofsson J: DNA pattern in oral cavity carcinomas in relation to clinical stage and histological grading. *Pathol Res Pract* 1987; 182: 202–206.
- 180 Uccelli R, Calugi A, Forte D, Mauro F, Polonio-Balbi P, Vecchione A, Vizzone A, De Vita R: Flow cytometrically determined DNA content of breast carcinoma and benign lesions: correlations with histopathological parameters. *Tumori* 1986; 72: 171–177.
- 181 Volm M, Brüggemann A, Günther M, Kleine W, Pfliegerer A, Vogt-Schaden M: Prognostic relevance of ploidy, proliferation and resistance predictive tests. *Cancer Res* 1985; 45: 5180–5185.
- 182 Volm M, Drings P, Mattern J, Sonka J, Vogt-Moykopf J, Wages K: Prognostic significance of DNA patterns and resistance predictive tests in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1985; 56: 1396–1403.
- 183 Volm M, Mattern J, Sonka J, Vogt-Schaden M, Wages K: DNA distribution in non-small cell lung carcinomas and its relationship to clinical behavior. *Cytometry* 1985; 6: 348–356.
- 184 Volm M, Bak M, Hahn EW, Mattern J, Weber E: DNA and S-phase distribution and incidence of metastasis in human primary lung carcinoma. *Cytometry* 1988; 9: 183–188.
- 185 Volm M, Mattern J, Müller T, Drings P: Flow cytometry of epidermoid lung carcinomas: relationship of ploidy and cell cycle phase to survival. A five year follow up study. *Anticancer Res* 1988; 8: 105–112.
- 186 Wagner D, Richart RM, Terner JY: Deoxyribonucleic acid content of presumed precursors of endometrial carcinoma. *Cancer* 1967; 20: 2067–2077.
- 187 Wanger D, Sprenger E, Merkle P: Cytophotometric studies in suspicious cervical smears. *Acta Cytol* 1976; 20: 336–371.
- 188 Wied GL, Bartels PH, Dytch HE, Bibbo M: Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis. *Acta Cytol*. 1983; 27: 33–37.
- 189 Wied GL, Messina AM, Meier P, Blough RR: Fluorospectrophotometric analysis on cervical epithelial cells. *Acta Cytol* 1964; 8: 61–67.
- 190 Winkler B, Crum CP, Fujii T, Ferenczy A, Boon M, Braun L, Lancaster WD, Richart RM: Koilocytic lesions of the cervix. The relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA content. *Cancer* 1984; 53: 1081–1087.
- 191 Winkler HZ, Rainwater LM, Myers RP, Farrow GM, Therneau TM, Zincke H, Lieber MM: Stage D1 prostatic adenocarcinoma: Significance of nuclear DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 103–112.
- 192 Wolley RC, Schreiber K, Koss LG, Kavas M, Sherman A: DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 15–22.
- 193 Xiang J, Spanier SS, Benson NA, Braylan RC: Flow cytometry analysis of DNA in bone and soft tissue tumors using nuclear suspensions. *Cancer* 1987; 59: 1951–1958.
- 194 Zahniser DJ, Oud PS, Raaijmakers MCT, Vooy GP, Walle RT, van de: Field test

- results using the BioPEPR cervical smear prescreening system. *Cytometry* 1980; 1: 200–203.
- 195 Zalondik J, Moore M, Hasleton PS: The DNA content of colorectal carcinomas: An analysis of the heterogeneity of aneuploidy and correlation with immunopathological parameters. *Neoplasma* 1988; 35: 389–401.
- 196 Zetterberg A, Esposti PL: Prognostic significance of nuclear DNA levels in prostatic carcinomas. Abstracts of the 10th European Congress of Cytology, Athens, 5.–7. 10. 1981, no. 46.
- 197 Zimmermann A, Truss F: The prognostic power of flow-through cytophotometric DNA determinations for testicular diseases. *Anal Quant Cytol* 1980; 2: 247–251.
- 198 Zimmermann PV, Hawson GAT, Biut MH, Parsow PG: Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. *Lancet* 1987; II: 530–533.
- 199 Zincke H: Neuere Entwicklungen in der Urologie der Mayo-Klinik. Vortrag Medizinische Fakultät der RWTH Aachen, 9. 6. 1988.