

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
- Funktionsbereich Cytopathologie -

DNA-Bildzytometrie als prognostischer Marker bei Borderlinetumoren des Ovars

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Fleischer

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Markus Fleisch

Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht, sondern weil wir es nicht wagen, ist es schwer.

Lucius Annaeus Seneca, genannt Der Jüngere

Meiner Großmutter Johanna

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie, Diagnostik und Prognostik von Tumoren und tumorartigen Läsionen des Ovars	1
1.1.1	Maligne Ovarialtumoren: Eine Gruppe von Tumoren mit insgesamt schlechter Prognose	1
1.1.2	Das Ovar-spezifische Konzept des Borderline-Tumors zur Abgrenzung einer epithelialen Tumorgruppe unbestimmbarer Dignität mit besonders guter Prognose	5
1.2	Prognosefaktoren bei Borderline-Tumoren des Ovars	11
1.3	DNA-zytometrische Untersuchungsansätze bei Borderline-Tumoren	12
1.4	Problemstellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Aufbau der Patientengruppe	17
2.2	Tumortypisierung, Stadieneinteilung und Tumorgradierung	18
2.2.1	Tumortypisierung	18
2.2.2	TNM-Klassifikation	18
2.2.3	FIGO-Klassifikation	19
2.2.4	Tumorgradierung	20
2.3	DNA-bildzytometrische Untersuchungen	20
2.3.1	Präparation zytologischer Ausstriche aus Paraffinblöcken durch enzymatische Zellvereinzelung	20
2.3.2	Feulgen-Färbung	21
2.3.3	DNA-bildzytometrische Messungen und ihre Auswertung	23
2.4	Erhebung des klinischen Verlaufes der Patientinnen	28
2.5	Studienauswertung	28

2.5.1	Definition der Endpunkte	28
2.5.2	Statistik	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Verteilung klinischer und morphologischer Grunddaten	31
3.2	Verteilung DNA-bildzytometrischer Messwerte	33
3.3	Klinische Verläufe der Patientinnen	34
3.4	Vorhersage eines Tumorrezidivs oder einer Tumorprogression mit klinischen bzw. DNA-zytometrischen Daten	36
3.4.1	Allgemeine deskriptive Statistik	36
3.4.2	Korrelationen zwischen den klinischen Verläufen und Alter, Tumortyp bzw. Tumorstadium	38
3.4.3	Korrelationen zwischen den klinischen Verläufen und den Messergebnissen der DNA-Bildzytometrie	43
3.4.4	Prädiktion des klinischen Verlaufes durch eine Kombination aus Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie	45
4	Diskussion	49
4.1	Aufgabenfelder der Pathologie in der Diagnostik epithelialer Ovarialtumoren	49
4.2	DNA-Bildzytometrie in der Prognostik von Borderline-Tumoren des Ovars - Möglichkeiten und Grenzen	51
4.3	Perspektivische Entwicklungen in der Beurteilung von Borderline-Tumoren des Ovars	57
5	Zusammenfassung	62
6	Literatur	64
7	Anhang	70
7.1	Abstract	70
7.2	Fragebogen zur Erfassung des klinischen Verlaufs	71

7.3	Danksagung	72
7.4	Lebenslauf	73
7.5	eidstattliche Versicherung	75

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Diagnostik und Prognostik von Tumoren und tumorartigen Läsionen des Ovars

1.1.1 Maligne Ovarialtumoren: Eine Gruppe von Tumoren mit insgesamt schlechter Prognose

Tumoren und tumorartige Läsionen des Ovars, darunter insbesondere die funktionellen Zysten, machen einen bedeutenden Teil der Raumforderungen bei Frauen im Bauch- und Beckenbereich aus. Während die benignen Läsionen des Ovars recht unkompliziert behandelt werden können, sind die malignen Läsionen aufgrund ihrer durchschnittlich eher schlechten Prognose nach wie vor eine Herausforderung. Bezogen auf die 2013 veröffentlichten, im Folgenden verwendeten aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Institutes für 2009/2010 stellen maligne Läsionen des Ovars über 20% aller Tumoren des weiblichen Genitalsystems und 3,5% der Tumoren bei Frauen überhaupt (Robert-Koch-Institut 2013). Insgesamt treten Malignome des Ovars, von denen die ganz große Mehrzahl Karzinome und nur ca. 10% maligne Keimzelltumoren und andere seltene Entitäten repräsentieren, bei uns bei derzeit knapp 8.000 Frauen pro Jahr auf, was einer altersstandardisierten Erkrankungshäufigkeit von 12,1 pro 100.000 Frauen entspricht. Damit liegen die Erkrankungsraten in Deutschland etwa in der Mitte der europäischen Zahlen, welche einen abnehmenden Gradienten für die Erkrankungshäufigkeit von Nord- nach Südeuropa erkennen lassen. In Deutschland wird das Lebenszeitrisiko dafür, am Ovarialkarzinom zu erkranken, mit 1,5% angegeben.

Dass die Erkrankungsraten dabei in Deutschland seit mindestens 40 Jahren, also über einen längeren Zeitraum weitgehend unverändert sind, ist aus dem DDR-Krebsregister sowie seiner Fortschreibung bis 2000 recht gut zu entnehmen; gleichzeitig lässt sich ablesen, dass die Mortalität erst seit den 90er Jahren, wohl bedingt durch den Einsatz von potenteren adjuvanten Chemotherapeutika, langsam absinkt (Abb. 1). Für die Zeit nach 2000 ist die Entwicklung etwas positiver, nimmt doch die Zahl der Ovarialkarzinome seitdem etwas ab (Abb. 2).

Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970–2000
Erkrankungen pro 100.000

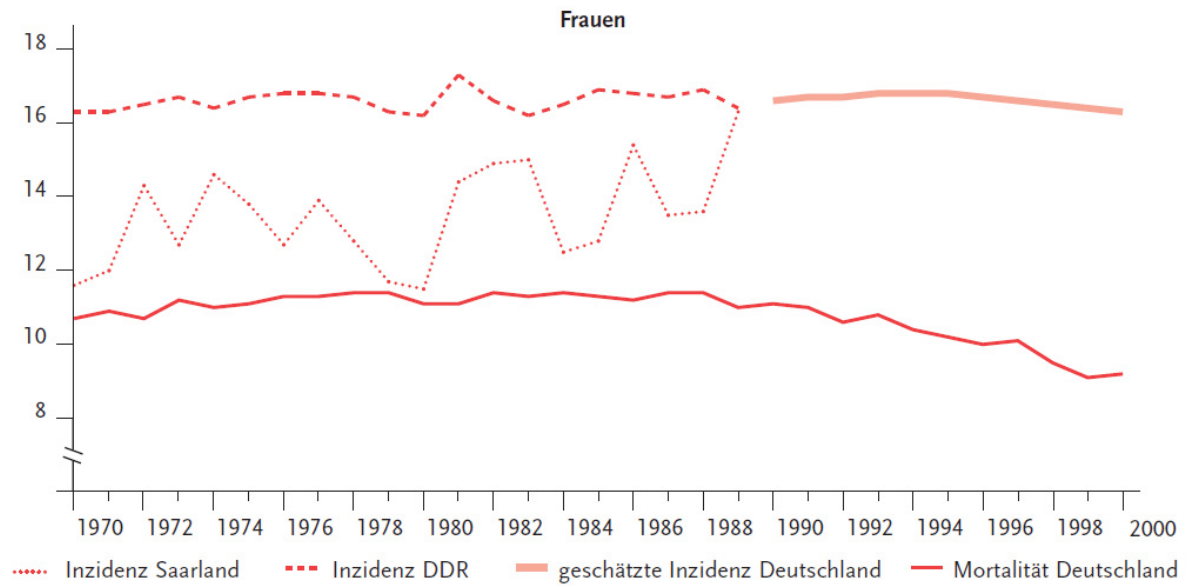
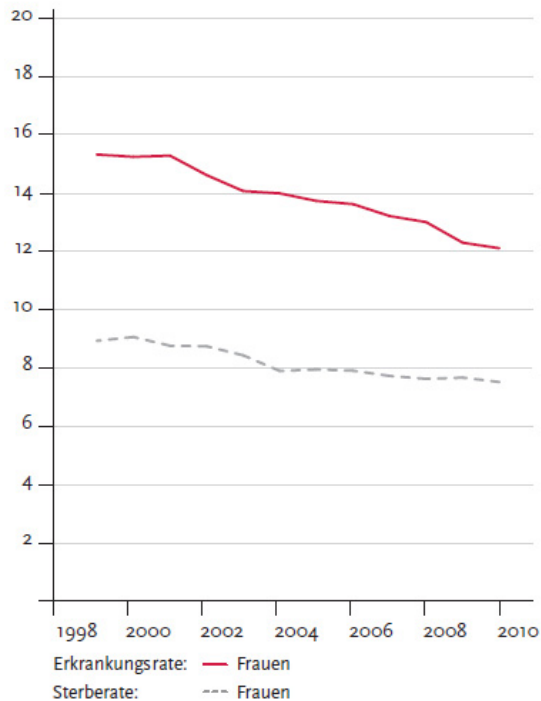


Abb. 1: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität am malignen Ovarialtumoren in Deutschland 1970 - 2000 (ABKD 2004)

Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, ICD-10 C56, Deutschland 1999 – 2010
je 100.000 (Europastandard)



Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, ICD-10 C56, Deutschland 1999 – 2010

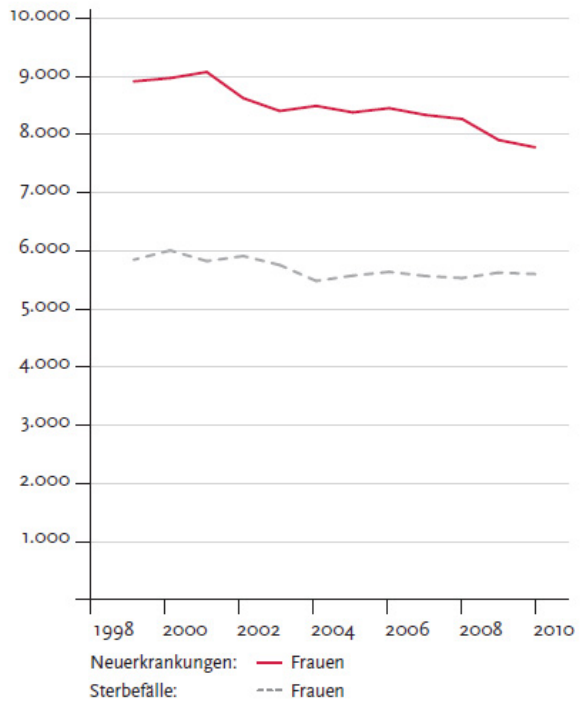


Abb. 2: Altersstandardisierte (links) bzw. absolute (rechts) Inzidenz und Mortalität von malignen Ovarialtumoren in Deutschland 1998 - 2010 (Robert-Koch-Institut 2013)

Zahlen zur Altersverteilung der malignen Ovarialtumoren sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Inzidenz und Mortalität nach Altersgruppen, Deutschland 2000

Fälle pro 100.000

Alter in Jahren	Frauen	
	Inzidenz	Mortalität
bis unter 45	4,8	0,8
45 bis unter 60	23,7	11,7
60 bis unter 75	50,7	33,3
75 und älter	76,0	64,4
Insgesamt	23,0	14,5

Tab. 1: Inzidenz und Mortalität an malignen Ovarialtumoren in Deutschland 2000, wiedergegeben nach Altersgruppen (ABKD 2004)

Dennoch liegt die Prognose der Ovarialkarzinome nach wie vor unter dem Durchschnitt von malignen Tumoren der Frau, was sich bereits an dem höheren Anteil der Mortalität im Vergleich zur Inzidenz (5,6% vs. 3,5%, Robert-Koch-Institut 2013), bezogen auf alle Malignome der Frau, dokumentieren lässt. Insgesamt versterben an ihrem malignen Ovarialtumor bei einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 42% letztendlich fast zwei Drittel der betroffenen Patientinnen (Robert-Koch-Institut 2013). Gegenüber den Daten um 2000 herum, als die relative, also Erkrankungsalter-korrigierte 5-Jahres-Überlebensrate mit etwa 39 % angegeben wurde, und den Daten der späten 80er Jahre von 35% (ABKD 2004) ist also sicher ein gewisser Fortschritt eingetreten.

Das relative 10-Jahres-Überleben wird bei uns, bezogen auf die sehr detaillierten Daten des Tumorzentrums München, mit 33,8% angegeben (Rottmann et al. 2014). Der Verlauf wird dabei im Wesentlichen, wie bei vielen anderen Tumorentitäten auch, durch das Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose (Details zu Definitionen s. unten) bestimmt. Bezogen auf die in München erfassten 3.420 Fälle (Abb. 3) ergaben sich recht unterschiedliche relative 10-Jahres-Überlebensdaten von ca. 90% für das FIGO-Frühstadium IA (Häufigkeit: 12.5%), von ca. 65% für die FIGO-Stadien IB - IC (10.7%), von ca. 50% für die FIGO-Stadien IIA - IIC (6.3%), von knapp 30% für die FIGO-Stadien IIIA und IIIB (7.4%) und von ca. 20% bzw. ca. 10% für die FIGO-Stadium IIIC (40.1%) und IV (23.1%).

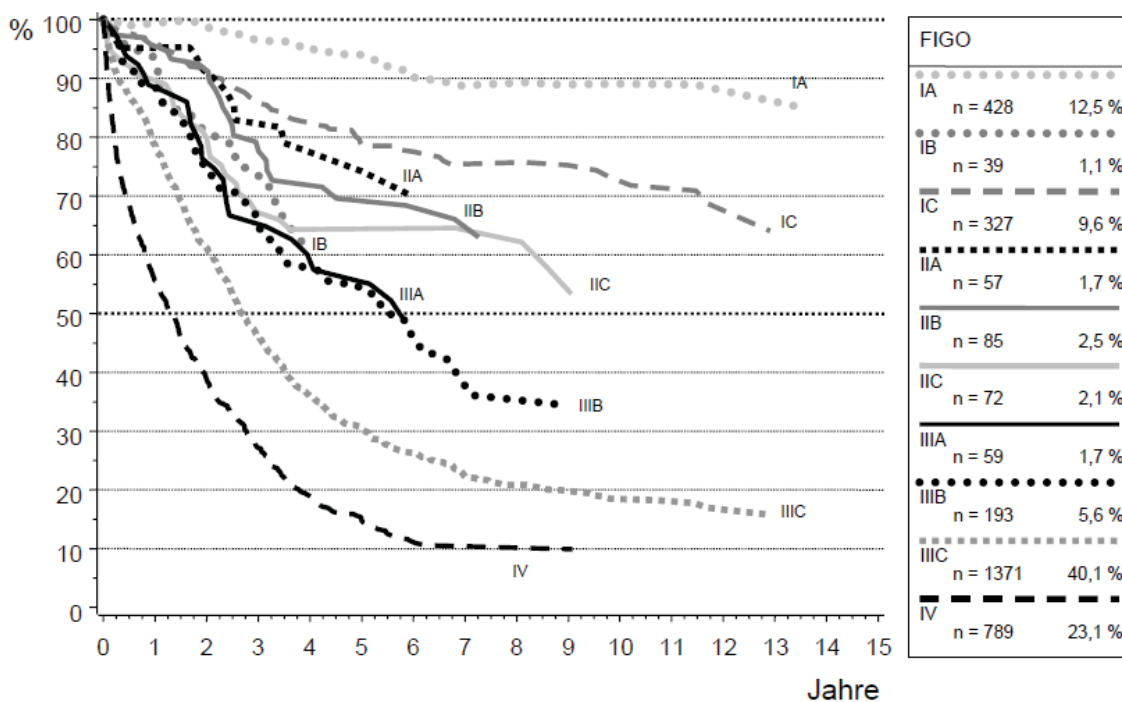


Abb. 3: Stadienabhängige Prognostik von malignen Ovarialtumoren in Deutschland; Zahlen zum relativen Überleben des Tumorzentrums München (Rottmann et al. 2014)

Dies bedeutet, dass es prognostisch günstige maligne Ovarialtumoren durchaus gibt, dass sie an Zahl aber eher selten sind, während sich fast genau 70% der Fälle nach wie vor bei Diagnosestellung weit fortgeschritten (Stadien III und IV) und damit prognostisch ungünstig präsentieren. Bedenkt man dabei allerdings, dass es sich um Zahlen zum relativen, nicht zum absoluten Überleben handelt, so bedeutet auch ein Ovariakarzinom im Stadium IA bereits ein durchaus gehöriges Mortalitätsrisiko. Diese für Deutschland repräsentativen Zahlen gelten ganz ähnlich auch für andere Regionen Europas (Robert-Koch-Institut 2013).

Andere wichtige Eigenschaften, die im Einzelfall die Prognose mit bestimmen, entstammen der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung des Tumorgewebes. Hier sind insbesondere der spezielle histogenetische Tumortyp (insbesondere Karzinom vs. Keimzelltumor), innerhalb der Karzinome wiederum die Zuordnung zu bestimmten Zelldifferenzierungen (serös-papillär, muzinös, endometrioid und weitere seltene Formen) sowie die Tumorgradierung als gut, mäßig oder gering differenziert (G1, G2, G3) zu nennen. Die Durchführung weiterführender genetischer und molekularer Subtypisierungen ist derzeit kein Standard, dürfte aber

durchaus in den kommenden Jahren Einfluss auf die Therapieplanung erhalten (Stichwort „Individualisierte Tumortherapie“), gerade wenn man an die Vision einer Antikörpertherapie gegen im Tumor identifizierte Antigene denkt.

Die Hauptprognostikatoren der Ovarialkarzinome als größter Subgruppe der malignen Ovarialtumoren sind in der seit Juni 2013 gültigen S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“ (Leitlinienprogramm Onkologie 2015) zusammenfasst, die die bis zum 1.1.2012 gültige S2k-Leitlinie „Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren“ (AWMF 2007) inzwischen abgelöst hat.

1.1.2 Das Ovar-spezifische Konzept des Borderline-Tumors zur Abgrenzung einer epithelialen Tumorgruppe unbestimmbarer Dignität mit besonders guter Prognose

Während die Entität eines „Carcinoma in situ“ bei beinahe allen epithelialen Tumorentitäten in etwa gleichartig definiert ist, stellt das Konzept des „Borderline-Tumors“ des Ovars eine Besonderheit dar, die sich nirgendwo anders so findet.

Das Carcinoma in situ, das zu den obligaten Präkanzerosen gezählt wird, beschreibt als Begriff alle Arten von Karzinomen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch nicht invasiv sind, erkennbar daran, dass sie die jeweilige anatomische Leitstruktur noch nicht verletzt bzw. überwunden haben. Klassische und häufige Beispiele sind das Carcinoma in situ der Cervix uteri, das duktales Carcinoma in situ der Mamma bzw. sinnverwandt das papilläre nicht-invasive Urothelkarzinom im Stadium pTa (Leitstruktur bei allen dreien: erhaltene Basalmembran) oder das Carcinoma in situ im kolorektalen Adenom (Leitstruktur: fehlender Durchbruch der Lamina muscularis mucosae). Allen Carcinomata in situ ist prinzipiell gleich, dass sie zum einen nicht metastasierungsfähig sind und zum anderen bei kompletter Entfernung kein Risiko eines Lokalrezidivs tragen. Insofern handelt es sich um zwar aus malignen Zellen bestehende, aber klinisch (noch) harmlose und eindeutig kurativ behandelbare Läsionen.

Beim Ovar hingegen ist ein Carcinoma in situ nicht definiert, obwohl es auch bei diesem Organ Tumoren gibt, die formal dessen oben genannten Kriterien erfüllen. Diese gehören aber ununterscheidbar als Teilmenge in die Gruppe von Borderline-Tumoren hinein, die sich in ihrer biologischen Wertigkeit als Gesamtgruppe sicher

vom Carcinoma in situ unterscheiden, da sie nämlich trotz vollständiger Entfernung über ein Rezidiv- und Metastasierungspotential verfügen, gleichzeitig aber prognostisch günstig sind. Letzterer Aspekt wiederum entspricht aus klinisch-praktischer Sicht einer Abgrenzung gegenüber den insgesamt gesehen prognostisch ungünstigen „Standardkarzinomen“ des Ovars.

Die formale Definition der Borderline-Tumoren des Ovars selber wiederum folgt den Vorgaben der WHO. Diese definiert sie heute als „*ovarian tumours of low malignant potential exhibiting an epithelial proliferation greater than that seen in their benign counterparts but without evidence of stromal invasion*“ (Kurman et al. 2014) - grenzt also über die zytologischen Kriterien, die Proliferation nahelegen, gegenüber den rein gutartigen Ovarialtumoren und durch das Kriterium des fehlenden Nachweises einer Stromainvasion gegenüber den Ovarialkarzinomen ab. Frühere Definitionen der WHO aus der Zeit, als die in dieser Studie untersuchten Fälle diagnostiziert wurden, gleichen der heutigen dabei weitestgehend (Scully 1999).

Innerhalb der Subtypen stellen die serösen¹ und die muzinösen Formen den größten Anteil, während die übrigen Formen selten sind bzw. als Rarität angesehen werden müssen. Die in Tabelle 2 dargestellten aktuelle Subtypisierung ist gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation wiedergegeben (Kurman et al. 2014), die aber auch hier gegenüber der früheren Version aus der Zeit der Diagnostik der Studienfälle identisch ist (Scully 1999).

Tumorentität	ICD-O-Klassifikation
<u>Seröse Borderline-Tumoren</u>	
Zystischer Typ	M 8442/1
Papillär-zystischer Typ	M 8462/1
Papillärer Oberflächentyp	M 8463/1

¹ Bei den serösen Formen wird darüber hinaus noch ein Borderline-Tumor mit Mikroinvasion von den anderen Borderline-Tumoren und vom Ovarialkarzinom als „*an ovarian serous tumour of low malignant potential exhibiting early stromal invasion characterized by the presence in the stroma of individual or clusters of neoplastic cells cytologically similar to those of the associated non-invasive tumour. One or more foci may be present; none should exceed 10 mm²*“ getrennt und so als weitere Zwischenform definiert, welche aber im Kontext der hier besprochenen Studie nicht näher betrachtet werden soll.

Adenofibrom / Zystadenofibrom	M 9014/1
<u>Muzinöse Borderline-Tumoren</u>	
Zystischer Typ	M 8472/1
Intestinaler Typ	
Endozervikaler Typ	
Adenofibrom / Zystadenofibrom	M 9015/1
<u>Endometrioide Borderline-Tumoren</u> [inclusive Varianten mit plattenepithelialer Differenzierung]	
Zystischer Typ	M 8380/1
Adenofibrom / Zystadenofibrom	M 8381/1
<u>Klarzellige Borderline-Tumoren</u>	
Zystischer Typ	M 8310/1
Adenofibrom / Zystadenofibrom	M 8313/1
<u>Transitionalzellige Borderline-Tumoren</u>	
Borderline-Tumor vom Brenner-Typ	M 9000/1
Proliferierende Variante	M 9000/1
<u>Gemischte Borderline-Tumoren</u>	M 8323/1

Tab. 2: Aktuelle WHO-Klassifikation der Grundtypen von Borderline-Tumoren des Ovars (Kurman et al. 2014) mit ICD-O-Klassifikation, soweit separat definiert. Die Klassifikation gleicht derjenigen aus der Zeit der Diagnosestellung der Fälle unserer Studie (Scully 1999).

Entscheidend für die individuelle Patientin und somit auch maßgeblich für die zu wählende Therapie ist in allererster Linie der für sie zu erwartende klinische Verlauf. Hier ist zum einen wichtig zu erwähnen, dass die Borderline-Tumoren sich häufig in einem noch frühen Stadium befinden. Die am Tumorzentrum München dokumentierten Fälle befanden sich beispielsweise zu 86.8% im FIGO-Stadium I und nur zu geringen Prozentsätzen in den FIGO-Stadien II, III und IV (5.8%, 6.8% bzw. 0.6%), ganz anders also als oben für die manifesten malignen Ovarialtumoren wiedergegeben (Engel et al. 2010). Hierzu passen auch die guten Überlebensraten, die besser als diejenigen der malignen Ovarialtumoren im Stadium IA sind; Abbildung 4 illustriert ein absolutes bzw. relatives 10-Jahres-Überleben von 87.8% bzw. 95.1%, was nicht ganz einer normalen Lebenserwartung entspricht, aber nahe an diese

heranreicht und somit ein nur vergleichsweise geringes Mortalitätsrisiko dokumentiert.

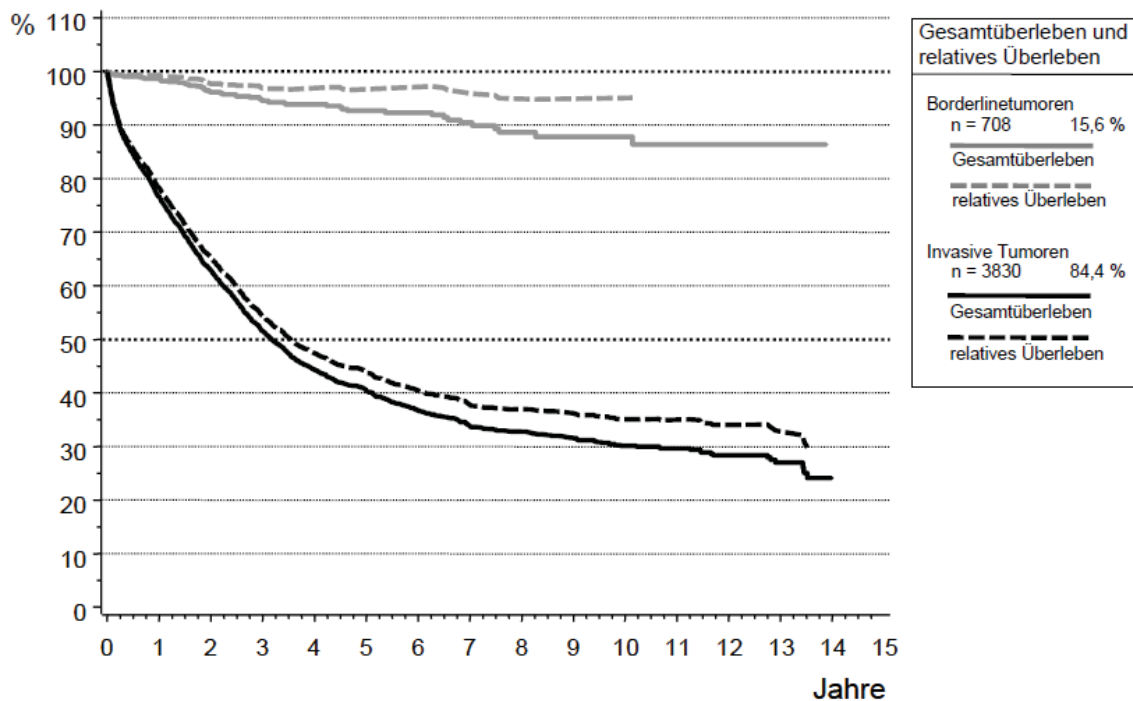


Abb. 4: Prognose von Borderlinetumoren des Ovars in Deutschland: Absolutes 10-Jahres-Überleben: 87,8%, relatives 10-Jahres Überleben: 95,1%. Zahlen des Tumorzentrums München, 708 Fälle (Rottmann et al. 2014)

Solange die nicht seltenen, für die serösen Formen mit 20-30% Häufigkeit angegebenen Implantate von Tumorherden, welche vor allem peritoneal und im Omentum maius sowie auch in den regionären Lymphknoten vorkommen, nach intensiver histologischer Aufarbeitung nicht-invasiv sind, bedeutet ihr Auftreten keine Verschlechterung der Prognose, so dass bei unauffälligem intraoperativen Situs eine Tumor-Lymphadenektomie der Becken- und paraaortalen Lymphknoten genauso wenig empfohlen wird wie eine adjuvante Therapie (Dettmar et al. 2014).

Anders sieht es aus, wenn solche Implantate invasiv sind. Sie können an den gleichen Stellen auftreten wie die häufigeren nicht-invasiven Implantate, also ebenso im Peritoneum oder der Appendix, ferner auch in Lymphknoten. Die Invasivität belegt sich aus einer histologisch zu sichernden Infiltration in tiefere und angrenzende

Gewebeschichten. Der Nachweis invasiver Implantate ist zwar mit einer ungünstigeren, eher dem klassischen Ovarialkarzinom vergleichbaren Prognose verbunden (5-Jahres-Überlebensrate 17%-33%); dennoch wird die Indikation zur Chemotherapie, die bei einem klassischen Ovarialkarzinom mit peritonealer Aussaat oder mit Lymphknotenmetastasen klar gegeben wäre, auch noch bei Borderline-Tumoren mit invasiven Implantaten kontrovers diskutiert (Dettmar et al. 2014).

Diese hier aus dem Zahlenwerk des Tumorzentrums München wiedergegebenen Zahlen finden sich auch in übergreifenden Publikationen in ähnlicher Höhe (zur Übersicht siehe du Bois et al. 2009).

Inhaltlich weitgehend unverändert zur früheren S2k-Leitlinie werden aktuell in der oben genannten S3-Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2015) folgende wesentliche Statements zu Borderline-Tumoren formuliert, die auch die Vorgehensweise bei unserem retrospektiv betrachteten Patientengut abbilden:

- Konsensbasierte Empfehlung 11.1²: „Borderline-Tumore sollen nach WHO charakterisiert und subtypisiert werden. Dies soll die Charakterisierung eventuell vorhandener Implantate (invasiv - nicht invasiv), sowie Angaben zur Mikroinvasion miteinschließen.“

- Evidenzbasierte Empfehlung 11.2: „Ein sorgfältiges chirurgisches Staging ist erforderlich und sollte neben der kompletten Tumorentfernung (einschließlich bilateraler Salpingo-Oophorektomie) die Inspektion des Abdomens mit Gewinnung einer Spülzytologie, Resektion aller auffälligen Areale und peritonealer Biopsien unauffälliger Areale, sowie eine Omentektomie umfassen. Bei muzinösen Borderline-Tumoren sollte die Metastasierung eines extraovariellen Tumors ausgeschlossen werden. Dazu ist zum Ausschluss einer primären Appendixneoplasie eine Appendektomie erforderlich.“

² Die Zählweise der Empfehlungen folgt der S3-Leitlinie, in der Borderline-Tumoren in Kapitel 11 abgehandelt werden. Nicht aufgenommen wurden die Empfehlungen 11.3 und 11.4, die von unserer Studie entferntere Aspekte (11.3: inkomplette Operation, 11.4: Operatives Vorgehen bei noch bestehendem Kinderwunsch) betrachten.

- Evidenzbasiertes Statement 11.5: „Es gibt keine überzeugende Evidenz für die Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie bei Borderlinetumoren.“
- Evidenzbasierte Empfehlung 11.6: „Patientinnen mit Borderlinetumoren sollen keine adjuvante Therapie erhalten.“

Die in der S3-Leitlinie angesprochene Charakterisierung und Subtypisierung, die durch adäquate histologische Diagnostik in der Pathologie erfolgt, stellt ein ernstzunehmendes größeres Problem dar. Ausweislich der Definition der Borderline-Tumoren geht es in Abgrenzung gegenüber Zystadenomen und Karzinomen um den Nachweis von zytologischen Atypien und um den Ausschluss von invasivem Wachstum. Stellt man sich nun eine oft zystische ovarielle Läsion mit fehlenden oder nur geringen makroskopischen Auffälligkeiten vor, so ergibt sich hier die prinzipielle Frage, in welchem Ausmaß man eine Einbettung von Gewebeabschnitten für die Histologie vornehmen muss. Üblicherweise wird man sich zunächst auf ein orientierendes Einbetten (Faustregel: 1 Paraffinblock pro cm Tumorgroße) beschränken.

Findet man in dieser „Ersteinbettung“ in der üblichen HE-Histologie keine zytologischen Atypien, sondern ein konsistent zytologisch gutartiges Muster und gleichzeitig keine histologischen Hinweise auf eine unklare oder invasive Epithel-Stroma-Beziehung, so wird üblicherweise die Diagnose einer gutartigen Läsion gestellt. Im anderen Fall würde man in großem Stil weiter einbetten müssen, so dass letztendlich die histologische Diagnostik später auf der Untersuchung sehr vieler Schnitte basiert; nicht selten wird dabei die komplette Einbettung auch größerer Zysten mit beispielsweise 60 Paraffinblöcken notwendig sein. Bleiben selbst dann noch Zweifel an der Zuordnung (Zystadenom / Borderline-Tumor / Karzinom), so können auf Ovarialtumoren spezialisierte Referenzpathologen eingeschaltet werden. Sie werden auch immer wieder mit der Zweitbeurteilung betraut, wenn es darum geht, über die Invasivität von Implantaten zu entscheiden.

Zusammenfassend ist die Diagnose eines Borderline-Tumors vom Untersuchungsumfang her aufwendig, beschränkt sich aber auf histologische und zytologische Kriterien. Der Einsatz adjuvanter Methoden (Sonderfärbungen, Histochemie und Immunhistochemie, DNA-zytometrische Verfahren, molekulare Anwendungen) ist

nicht üblich und wird auch von den Leitlinien her nicht empfohlen bzw. verlangt. Aus der Festlegung des Borderline-Charakters des Tumors leitet sich dann die Primärtherapie des Tumors ab, ferner resultieren aus ihr die Entscheidungen über Nachsorgeintervalle und den Umfang von Nachsorgeuntersuchungen.

1.2 Prognosefaktoren bei Borderline-Tumoren des Ovars

Rückschlüsse, darauf, in welchen Fällen von Borderline-Tumoren es konkret zu einem Rezidiv oder zu einer Metastasierung kommen wird, lassen sich aus der Histologie des Primärtumors nicht ziehen. Auch in den entsprechenden Leitlinien, insbesondere der neuen S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren“ von Juni 2013 (Leitlinienprogramm Onkologie 2015) sind keine Angaben über morphologische Prognostikatoren genannt, die es den beteiligten Fachdisziplinen ermöglichen würden, eine Abschätzung des Rezidivrisikos zu tätigen, wenn man einmal von Angaben zu einem Tumorrest nach Primäroperation (= R1- oder R2-Resektion) oder dem oben besprochenen Nachweis invasiver peritonealer oder omentaler Implantate absieht.

Diese Empfehlungen sind im Einklang mit der aus Deutschland stammenden, 2013 veröffentlichten größten kontrollierten Studie an Borderline-Tumoren, in der 950 Fälle aus 24 Zentren zusammengefasst sind und auch die wenigen weiteren systematischen Studien diskutiert werden (du Bois et al. 2013). Herausgearbeitet wurde in der Studie, deren Thematik auch in der Diskussion noch einmal aufgenommen wird, dass nicht etwa Mikroinvasion und mikropapilläres Wachstum, also histologische Parameter, von erstrangiger Bedeutung für die Entwicklung eines Rezidivs war, sondern insbesondere höheres Stadium, unvollständiges Staging und eine R1-Resektion, ferner aber auch der Organerhalt im Sinne einer geplanten Teilresektion, beispielsweise bei noch bestehendem Kinderwunsch.

Die Erkenntnisse moderner molekularpathologischer Arbeiten, aus denen man weiß, dass etwa die Hälfte der serösen Borderline-Tumoren eine K-ras- bzw. B-raf-Mutation aufweisen (Singer et al. 2003, Jones et al. 2012), führten zu der einsichtigen Vermutung, dass diese Mutationen in der Tumorgenese früh auftreten (Ho et al. 2004), wahrscheinlich schon vor der Bildung erkennbarer histologischer Auffälligkeiten. Als Prognosefaktor eignen sich diese Erkenntnisse aber bislang nicht.

Insgesamt scheint aus der Literatur heraus kein mit Morphologie oder Molekularbiologie verbundener, etablierter und allgemein anerkannter Parameter für die Rezidivvorhersage zur Verfügung zu stehen.

1.3 DNA-zytometrische Untersuchungsansätze bei Borderline-Tumoren

Die hier durchgeführte Studie geht von der Überlegung aus, ob man mithilfe der DNA-Bildzytometrie, einer Methode, die an diversen Tumorentitäten zur Abgrenzung gutartig-reaktiver von malignen Läsionen geeignet ist, eine Aussage über ein Rezidivrisiko treffen könnte.

Einen sinnvollen Einsatz in der Routine in unserer Einrichtung findet die DNA-Bildzytometrie beispielsweise bei zweifelhaften zytologischen Befunden an Gallenwegsausstrichen, Pankreaspunktaten, diagnostisch unklaren Bronchialsekreten oder gynäkologischen Vorsorgeabstrichen der Gruppen III-D1 bzw. III-D2 nach Münchner Nomenklatur III (Biesterfeld et al. 2013). Insgesamt werden bei einem Gesamtaufkommen von ca. 16.000 Fällen pro Jahr an ca. 700 Fällen DNA-bildzytometrische Messungen jährlich in der Routinediagnostik vorgenommen, was ca. 45% aller eingesetzten Sonderverfahren entspricht. Hinzu kommen noch etwa 700 Fälle mit immunzytochemischen Anwendungen sowie ca. 150 Fällen mit FisH-, AgNOR- oder molekularen Untersuchungen.

Klinisch nutzbare Erfahrungen mit der DNA-Bildzytometrie liegen für präkanzeröse Läsionen sowohl des Plattenepithels, nämlich der Mundhöhle (Schulte et al. 1991), des Larynx (Crissman und Zarbo 1991), der Bronchialschleimhaut (Auffermann und Böcking 1985), der Vulva (Evans et al. 1987), der Schleimhaut der Ektozervix (Nasiell et al. 1979, Chatelain et al. 1989a) und der Epidermis (Biesterfeld et al. 1995) vor, aber auch am Drüsenepithel, nämlich an der Schleimhaut der Endozervix (Biesterfeld et al. 2001a), des Endometriums (Biesterfeld et al. 2001b) oder der Gallenwege (Krishnamurthy et al. 2001, Osterheld et al. 2005, Biesterfeld und Deacu 2009). Alle diese Untersuchungen erfüllen die heutigen Anforderungen an die Methodik und die Messpräzision (Art und Qualität des Bildanalyseystems, Vorbereitung der Proben aus zytologischen Ausstrichen oder nach Zellvereinzellung

aus Paraffinblöcken), was man für die wenigen Untersuchungen an den Borderline-Tumoren des Ovars nicht uneingeschränkt sagen kann.

Erste Übersichten DNA-bildzytometrischer Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen wurden schon in den 70er Jahren vorgenommen (Böhm und Sandritter 1975). Historische Anfänge speziell an Borderline-Tumoren des Ovars wurden dabei von Kaern et al. (1993) zusammengestellt. Die dort genannten fünf Arbeiten aus den Jahren 1969 bis 1988 (Weiss et al. 1969, Erhardt et al. 1986, Dietel et al. 1986, Fu et al. 1986, Olinici et al. 1988) umfassten verschiedene Entitäten ovarieller Tumoren, aus denen die Autoren die wenigen Borderline-Fälle extrahierten. Insgesamt wurden 84 Fälle erfasst, von denen 19 nach den jeweils angelegten Kriterien als aneuploid³ eingestuft wurden (= 22,6%). Andere Arbeiten verfügten allerdings über deutlich höhere Aneuploidieraten, nämlich die ebenfalls 1993 erschienene Arbeit von Drescher et al. (9/21 = 42,9%) und vor allem auch die erste Arbeit an höheren Fallzahlen, welche von Padberg et al. 1992 mit immerhin 80 Fällen vorgelegt wurde (59/80 = 73,8%), so dass von vornherein die Daten nicht immer als vergleichbar angesehen werden können.

Ein besonderes Problem insbesondere der älteren Arbeiten sind ihre methodischen Einschränkungen. So gehen beispielsweise die Studien von Erhardt et al. (1984), Fu et al. (1986), Dietel et al. (1986) sowie Padberg et al. (1991) auf Messungen an Schnitten zurück, was heute entsprechend den Richtlinien der ESACP-Konsensus-Vereinbarungen (Haroske et al. 1998, Giroud et al. 1998) nicht mehr *state of the art* ist. Gleiches gilt auch für die Zahl analysierter Messzellen; während heute 250-300 Zellen pro Fall als notwendig angesehen werden, waren es seinerzeit oftmals nur 100 oder gar weniger. Auch die Definitionen für Stammlinienaneuploide waren nicht in allen Arbeiten deckungsgleich, andererseits aber so ähnlich, dass man von einer grundsätzlichen Vergleichbarkeit ausgehen kann.

³ Mit den Begriffen „aneuploid“ bzw. „Aneuploidie“ ist im Folgenden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, stets „DNA-aneuploid“ bzw. „DNA-Aneuploidie“ in Abgrenzung gegenüber „chromosomal aneuploid“ bzw. „chromosomaler Aneuploidie“ gemeint. Gleiches gilt für „diploid“ bzw. „Diploidie“.

Neuere DNA-bildzytometrische Arbeiten gibt es nur wenige. Eine davon, die Studie von Korabiowska et al. (2004), stützt sich erneut auf die verlassene Methode der Messung an Schnitten und ist somit ebenfalls nur eingeschränkt verwendbar; außerdem sind die Ergebnisse auch datentechnisch nicht durchgehend nachvollziehbar. Die Studie von Pradhan et al. (2009) umfasst mit 222 klassischen Borderline-Tumoren ein sehr großes Kollektiv, hat aber keinen Ansatz, der in Richtung der Analyse der klinischen Verläufe geht, sondern vergleicht die ermittelten DNA-zytometrischen Ergebnisse mit denen einiger invasiver Ovarialkarzinome. Aus dem gleichen Jahr stammt auch die Arbeit von Verbruggen et al. (2009), in der 93 Fälle untersucht worden sind. Die dort vorgenommenen Auswertungen beziehen sich rein auf die Lage der DNA-Stammlinie. Wichtigstes Ergebnis der Studie war nach multivariater Analyse, dass vor allem das Stadium des Tumors (T1a (96%) vs. alle anderen Stadien (79%)) von prognostischer Relevanz bezogen auf das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben war. In der univariaten Auswertung hatte auch der Tumortyp (muzinös (96%) vs. serös (80%)) zu einem signifikanten Resultat geführt. Die DNA-Bildzytometrie war ohne signifikante klinische Bedeutung geblieben.

Mit der Methode der DNA-Durchflußzytometrie wurden ebenfalls Untersuchungen an Borderline-Tumoren des Ovars vorgenommen. Ein gewisser Vorteil dieser Methode ist die hohe Zahl an Zellen, die zur Analyse zur Verfügung steht, ein Nachteil ist, dass pyknotische Kerne ebenso wie Kernfragmente mitgemessen werden. Die Tatsache, dass alle Zellen und nicht nur die der eigentlichen zur Untersuchung anstehende Zellpopulation erfasst werden, kann ferner als weiterer Nachteil dazu führen, dass kleine aneuploide Zellpopulationen im sogenannten „Grundrauschen“ der DNA-durchflußzytometrischen Histogramme methodenimmanent untergehen.

Fasst man die überwiegend an nur einer beschränkten Zahl von Fällen durchgeführten Arbeiten zusammen, so ergaben sich durchflußzytometrisch vorwiegend diploide Stammlinien bei Borderline-Tumoren des Ovars. In der Studie von Lodhi et al. (2000) waren beispielsweise alle 15 Fälle diploid, in der von Darai et al. (1988) 34 von 35 (97,1%) und in der von Friedlander et al. (1984) 42 von 44 (95,5%). In anderen Arbeiten (Lai et al. 1996, Klemi et al. 1988, Demirel et al. 1996) lagen die Aneuploidieraten bei Fallzahlen zwischen 40 und 50 Fällen mit 14% - 16,7% etwa bei einem Sechstel bis einem Siebtel der Fälle. Lediglich eine Arbeit

ermittelte bei 40 untersuchten Tumoren eine deutlich höhere Aneuploidierate, nämlich von 40% (Seidman et al. 1993). Die klinischen Aussagen waren ebenfalls nicht einheitlich, möglicherweise aufgrund zu kleiner Fallzahlen pro Studie. Eindeutige Schlüsse auf das biologische Verhalten der Läsionen ließen sich nicht ableiten. Eine Ausnahme stellt die Arbeit von Klemi et al. (1988) dar, in der bei einer Grenzwertziehung des DNA-Index bei 1.3, was somit einer DNA-Stammlinie von 2.6c entspricht, eine Prädiktion von Rezidiven für möglich gehalten wurde. Andererseits können auch Rezidive selber wiederum durchaus ein diploides DNA-Profil zeigen (Tan et al. 1994).

Die unseres Wissens einzige Arbeit, in der sowohl die DNA-Bildzytometrie, als auch die DNA-Durchflußzytometrie an Borderline-Tumoren des Ovars zum Einsatz kamen, bezog sich auf 43 Fälle, bei denen sich eine hohe Konkordanz der Ergebnisse bezogen auf die Stammlinieninterpretation zeigte (Fležar et al. 2003). 40 Fälle waren mit beiden Methoden diploid, zwei aneuploid, lediglich einer wurde mit einer beiden Methoden als diploid, mit der anderen als aneuploid eingestuft. Ergänzend wurden DNA-bildzytometrisch in fünf Fällen Zellen mit Einzelwerten $> 5c$ bzw. auch Zellen im oktaploiden Bereich gefunden. Einen klinischen Bezug ihrer Ergebnisse zum Überleben oder zu Stadienparametern der Tumoren konnten die Autoren nicht herstellen.

1.4 Problemstellung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Datenlage zu DNA-bildzytometrischen Untersuchungen bei Borderline-Tumoren des Ovars bisher keine klare Interpretation des Stellenwertes dieser Methode erlaubt. Dieses dürfte nicht nur daran liegen, dass die Rezidivrate dieser Tumorentität relativ niedrig ist, sondern möglicherweise auch an methodischen Fragen wie der Wahl geeigneter Variablen und Interpretationsmodi.

Hier soll die hier vorgelegte retrospektive Untersuchung ansetzen, deren Ziel es war, moderne DNA-bildzytometrische Konzepte auf diese Tumorart anzuwenden. Hierfür standen diejenigen Fälle zur Verfügung, an denen am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf diese Methode in der Diagnostik innerhalb eines definierten Zeitraumes eingesetzt worden war und für die ein zeitlich hinreichendes Follow-Up erhältlich war.

Zu der Studie liegt ein positives Ethikvotum seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf vor (Studiennummer 4890 vom 4.12.2014).

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Patientengruppe

Die Gesamtkohorte setzte sich aus 71 Patientinnen zusammen. Abbildung 5 zeigt deren Altersstruktur. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose lag bei 42,9 +/- 15,4 (SD) Jahren, wobei sich angedeutete Häufigkeitsgipfel zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr sowie zwischen 50 und 60 Jahren finden.

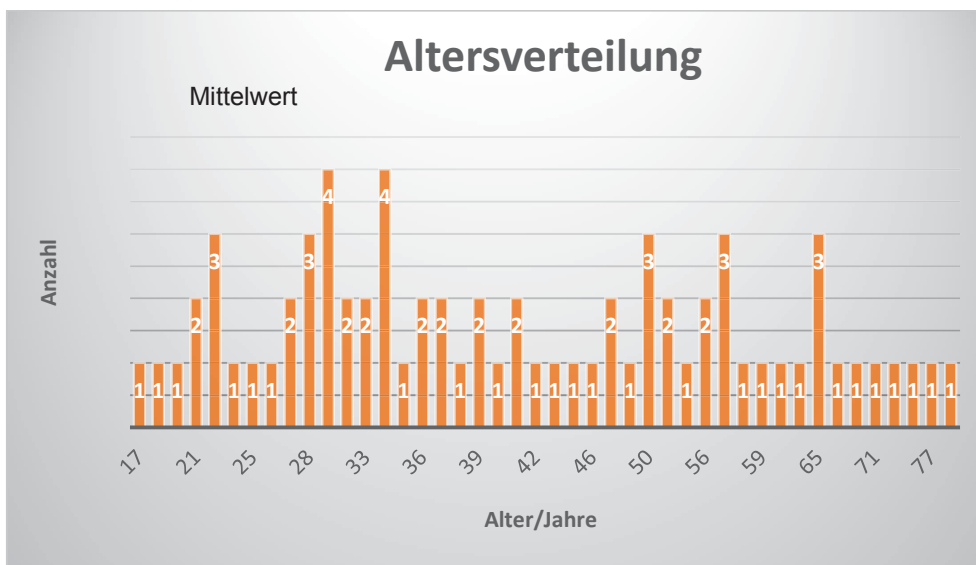


Abb. 5: Altersverteilung aller 71 Studienpatientinnen mit Borderline-Tumoren des Ovars

Die Patientinnen rekrutierten sich retrospektiv aus denjenigen Fällen von Borderline-Tumoren des Ovars, die über einen Zeitraum von fünf Jahren dem Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität konsiliarisch vorgestellt worden waren. Die betreffenden Institute übermittelten repräsentative Paraffinblöcke aus Formalinfixierten Tumoranteilen der resezierten Borderline-Tumoren des Ovars zur DNA-Bildzytometrie.

21 Patientinnen und damit der relativ größte Anteil rekrutierten sich aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, die übrigen Fälle verteilten sich auf die Evangelischen Krankenhäuser Düsseldorf, Mettmann und Köln, das Düsseldorfer Marienhospital,

die Düsseldorfer Universitätsfrauenklinik sowie die Kreiskrankenhäuser Weißwasser und Ehrbach und das St.-Franziskus-Hospital in Ahlen.

2.2 Tumortypisierung, Stadieneinteilung und Tumorgradierung

2.2.1 Tumortypisierung

Der Tumortypisierung wurden in allen primär befundenden Instituten für Pathologie die seinerzeitigen Vorgaben der WHO-Klassifikation (Scully 1999) zugrunde gelegt. Für die spätere Auswertung wurde zwischen serösen und muzinösen sowie als gemischt eingestuften Borderline-Tumoren unterschieden; weitere seltenere Subformen, wie Borderline-Tumoren vom endometroiden, klarzelligem oder transitionalzelligem Typ, kamen nicht vor.

2.2.2 TNM-Klassifikation

Auch die postoperative Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation (Wittekind und Meyer 2010) folgt der Vorgabe der UICC in der bis heute unverändert gültigen Form von 1997, wobei im Folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Wiedergabe irrelevanter Rubriken (z. B. T0 oder Tx etc.) verzichtet wird.

Primärtumor

- pT1: Ein- oder beidseitige Tumoren mit Beschränkung auf die Ovarien
 - pT1a: Tumor auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt. Kein Tumor auf der Oberfläche sichtbar, keine Tumorzellen im Aszites nachweisbar
 - pT1b: Tumor auf beide Ovarien beschränkt, wobei die weiteren Bedingungen von pT1a gelten.
 - pT1c: Tumor auf eines oder beide Ovarien beschränkt mit einer der folgenden Bedingungen:
 - Kapsel rupturiert
 - Tumor auf der Organoberfläche nachweisbar,
 - Tumorzellen in Aszites oder abdomineller Lavage
- pT2: Ein- oder beidseitige Tumoren mit Infiltration nur ins Becken

- pT2a: Ausbreitung oder Metastase auf dem Uterus oder Tuben, keine bösartigen Zellen in Aszites oder abdomineller Lavage
 - pT2b: Ausbreitung oder Metastasen auf anderen Organen des Beckens, ohne Nachweis bösartiger Zellen in Aszites oder abdomineller Lavage
 - pT2c: Ein pT2a- oder pT2b-Tumor, zusätzlich mit Nachweis bösartiger Zellen in Aszites oder abdomineller Lavage
- pT3: Ein- oder beidseitige Tumoren mit Infiltration über das Becken hinaus
- pT3a: Mikroskopischer Nachweis von peritonealen Mikrometastasen außerhalb des Beckens
 - pT3b: Makroskopische Metastasen außerhalb des Beckens mit einem Durchmesser ≤ 2 cm
 - pT3c: Makroskopische Metastasen außerhalb des Beckens mit einem Durchmesser > 2 cm

Lymphknotenstatus

- Nx: Keine regionalen Lymphknoten untersucht
- pN0: Keine regionalen Lymphknoten befallen
- pN1: Metastasen in regionalen Lymphknoten

Fernmetastasen

- Mx: Kein Gewebe auf Fernmetastasen untersucht
- pM0: Keine Fernmetastasen nachweisbar
- pM1: Fernmetastasen nachweisbar

Eine Kategorie pT4 ist für Ovarialkarzinome als einer von sehr wenigen Ausnahmen nicht definiert.

2.2.3 FIGO-Klassifikation

Ähnlich fasst die FIGO-Klassifikation die pTNM-Klassifikation in einem Gesamtstadium zusammen. Da diese allerdings analog zu der pTNM-Klassifikation definiert ist (Scully 1999), wurde auf die Aufnahme der FIGO-Klassifikation verzichtet.

2.2.4 Tumogradierung

Alle Tumoren wurden gemäß den Vorgaben der UICC gradiert und erwiesen sich als gut differenziert (G1).

2.3 DNA-bildzytometrische Untersuchungen

Am Schwerpunkt Cytopathologie erfolgte aus den übermittelten Paraffinblöcken die enzymatische Zellvereinzelung und im Anschluss die Färbung der Zellkerne nach Feulgen. Danach wurden die Präparate mittels DNA-Bildzytometrie an einem Auto-Cyte®-Meßsystem der Firma Roche (s.u.) analysiert. Die DNA-Histogramme dieser diagnostischen Messungen dienten als Grundlage für die Studie.

2.3.1 Präparation zytologischer Ausstriche aus Paraffinblöcken durch enzymatische Zellvereinzelung

Die Operationspräparate wurden im jeweiligen befundenden Institut für Pathologie einer makroskopischen und histologischen Untersuchung unterzogen. Hierzu erfolgte dort im Rahmen des Zuschnitts nach Formalinfixierung die Anfertigung von ca. 3 mm bis 4 mm breiten repräsentativen Scheiben, die nach üblichen Verfahren in Paraffinblöcke überführt wurden. Aus diesen wurden wiederum 4 µm dicke Schnitte für die Mikroskopie hergestellt, anhand derer nach HE- bzw. PAS-Färbung die mikroskopische Tumordiagnostik und -typisierung erfolgte.

Die Gewinnung von zytologischen Ausstrichpräparaten aus Paraffinschnitten mittels eines sogenannten Zellvereinzelungsverfahrens orientierte sich an gering modifizierten Vorgehensweisen aus der Literatur (Delgado et al. 1984) und ist im Folgenden beschrieben. Von den nach erneuter Durchsicht der Präparate ausgewählten Paraffinblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom ca. fünf 30 µm dicke Schnitte ausschließlich aus Tumorarealen abgenommen, in einem Gazetütchen über einer Gasflamme verschweißt und in eine für Flüssigkeiten durchlässige Kunststoffkapsel eingeschlossen. Daraufhin wurde das Gewebe ca. eine Stunde lang in Xylol entparaffiniert. Daran schloss sich die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 70% Äthanol sowie anschließend Aqua dest.) über jeweils 10 - 12 Minuten an. Das mit Gewebe gefüllte Gazetütchen

wurde dann in ein Reagenzglas umgefüllt und eine Stunde lang bei 37 °C im Wärmeschrank in Pepsinlösung (0.5% Pepsin und 0.2% HCl auf 5 ml A. bidest.) angedaut. Der Vorgang dient der Auslösung der Zellkerne aus dem Zellverband. Die Lösung wurde dann in ein zweites Reagenzröhrchen abgeschüttet und die Reaktion des Gewebes mit dem Pepsin durch Zugabe von kaltem Aqua dest. gestoppt. Dazu überspült man die zurückbleibenden Gazetütchen im ersten Reagenzglas mit Aqua dest., um möglichst noch viele der vereinzelter Zellen zu gewinnen, und gibt diese Lösung ins zweite Reagenzröhrchen dazu. Die so gewonnene Zellkernsuspension wurde mit Aqua dest. aufgefüllt und 10 min. bei 3.800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde sodann abgesaugt und das zurückbleibende Zellkernpellet resuspendiert. Daran fügte sich die Zentrifugation der Zellkerne auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger an, welche luftgetrocknet wurden.

2.3.2 Feulgen-Färbung

Grundlage der Feulgen-Färbung ist die Feulgensche Reaktion (Feulgen und Rossenbeck 1924), bei der nach salzsaurer Hydrolyse die DNA mit Schiffischem Reagens stöchiometrisch in einen im sichtbaren Licht erkennbaren Farbstoff umgesetzt wird.

Bei der milden salzsauren Hydrolyse werden die glykosidischen Bindungen der Purinbasen der DNA zerstört, so dass an den C₁-Atomen freie Aldehydgruppen entstehen. Diese werden im folgenden Schritt mit Schiffischem Reagens durch eine rot-violette Farbreaktion nachgewiesen. Da an der RNA eine solche Spaltung der Glykosidbindung des C₁-Atoms nicht möglich ist, findet keine Anfärbung der RNA statt. Ebenfalls werden Histone oder andere Proteine nicht angefärbt. Die *lege artis* durchgeführte Feulgensche Reaktion ist somit spezifisch für DNA und wird allgemein als DNA-stöchiometrisch anerkannt. Diese Eigenschaften erklären die weitverbreitete Verwendung nach Feulgen gefärbter Präparate in der DNA-Bildzytometrie.

Die Feulgen-Färbung muss unter standardisierten Bedingungen erfolgen, da das Färbeergebnis und damit die in der DNA-Zytometrie gemessene integrierte optische Dichte durch eine Anzahl unterschiedlicher Faktoren beeinflussbar ist (Schulte und Wittekind 1990, Schulte 1991). Die eigentliche Färbereaktion mit aus basischem

Pararosanilin hergestelltem Schiffschem Reagens (Graumann 1953) ist in der Praxis unproblematisch; die saure Hydrolyse hingegen erfordert ein exaktes Vorgehen unter Einhaltung festgelegter Bedingungen, u.a. für Temperatur, Säurekonzentration und Einwirkdauer. Dies ist notwendig, da die Hydrolysekurve aus zwei parallel ablaufenden, durch die Temperatur und Säurekonzentration zu beeinflussenden Vorgängen resultiert: Einer Aufbaureaktion mit Erzeugung freier Aldehydgruppen und einer Abbaureaktion mit Zerstörung der Aldehydgruppen (Böhm und Seibert 1966, Böhm 1968). Die Bedingungen der Feulgen-Hydrolyse sollten so gewählt werden, dass möglichst viele Aldehydgruppen entstehen, bevor deren Zerstörung einsetzt. Die besten Färbeergebnisse sind daher zu erzielen, wenn die Reaktion mit Schiffschem Reagens im Hydrolyseoptimum und in einem speziellen Färbeautomaten durchgeführt wird (Chatelain et al. 1989b) (Tabelle 3).

Chemikalie	Einwirkzeit
10% gepuffertes Formalin	50 min.
Aqua dest.	10 min.
Aqua dest.	5 min.
5 N HCl, 27°C	60 min.
Aqua dest. (3 Küvetten)	jeweils 2 min.
Schiff'sches Reagenz	60 min.
Sulfitwasser (3 Küvetten)	jeweils 5 min.
Aqua dest. (2 Küvetten)	jeweils 1 min.
Ethanol 70%	3 min.
Ethanol 96%	3 min.
Ethanol 100%	3 min.
Xylol	10 min.

Tab. 3: Ablauf der automatisierten Feulgen-Färbung in einem Färbeautomaten

Am Ende des Färbevorganges erfolgt die Eindeckung des Präparates in einem konventionellen Medium für die Histologie, z. B. Vitro-Clud, unter einem Deckglas. Bis zur Messung werden die Präparate zum Schutz gegen Ausbleichen in einer lichtdichten Präparatmappe aufbewahrt.

2.3.3 DNA-bildzytometrische Messungen und ihre Auswertung

Die eigentliche DNA-zytometrische Messung wurde mit einem AutoCyte-System der Firma Roche durchgeführt, das dort in Kooperation mit dem Institut für Cytopathologie in Düsseldorf (damaliger Leiter: Prof. Dr. med. A. Böcking) entwickelt worden war.

Durchführung der DNA-bildzytometrischen Messung

Die Messungen erfolgten in 40x-Objektivvergrößerung an einem Axioplan-Mikroskop der Firma Zeiss, bestückt mit einer TV-Schwarz-Weiß-Kamera und verbunden mit einem PC-basierten Bildanalysesystem der Firma Roche, von welchem die Quic-DNA-Software zur Anwendung kam.

Vor Beginn der eigentlichen Messung erfolgte die Einlage eines Interferenzfilters (560 nm +/- 10 nm) in das Mikroskop und daran anschließend die Kalibrierung für das vorliegende Präparat. Zunächst wurde ein zellreicher Anteil des Präparats fokussiert und das Mikroskop „geköhler“ (Anwendung des „Köhler’schen Beleuchtungsprinzips“), sodann der Strahlenteiler des Mikroskops verschlossen. Durch diesen Schritt wurde für das Analysesystem „schwarz“ definiert. Anhand eines zellkernfreien Ausschnitts wurde danach ein Weißabgleich durchgeführt. Danach erfolgte die Einstellung des zu messenden Areal.

Es wurden etwa 30 morphologisch unauffällige, diploide Zellkerne des Präparats zur Kalibrierung gemessen. Hierzu dienten die Kerne von Fibroblasten. Damit wurde der normale diploide DNA-Gehalt festgelegt, indem der Mittelwert ihrer pro Zellkern erhobenen integrierten optischen Dichte (IOD) als normaler DNA-Gehalt von 2c definiert wurde.

Im Folgenden wurden als Messzellen etwa 300 zufällig ausgewählte Epithelzellkerne gemessen. Die erhaltenen Einzelwerte wurden in einem DNA-Histogramm dargestellt. Anzumerken ist, dass keine pyknotischen oder lytischen Kerne gemessen

wurden, um eine Verfälschung der Messergebnisse, bedingt durch das verdichtete bzw. in Auflösung begriffene Chromatin dieser Zellkerne, zu vermeiden.

Auswertung der DNA-bildzytometrischen Messungen

Die Auswertung der Messungen erfolgte kombiniert durch Bestimmung und Interpretation der Ploidie der DNA-Stammlinie und durch eventuellen Nachweis einer DNA-Einzelzellaneuploidie und folgte den von den Konsensuskonferenzen der *European Society for Analytical and Cellular Pathology* (ESACP) vorgegebenen Definitionen (Haroske et al. 1998), angepasst an die Darstellung nach Girmes (2009). Dabei wurden als Variable die Lage der DNA-Stammlinie, das Vorkommen von Zellen mit DNA-Einzelwerten von $> 9c$ ($9c$ *Exceeding Events*, „9cEE“) und die Proliferationsrate gewählt.

DNA-Stammlinie

Der 1963 von Sandritter eingeführte Begriff der DNA-Stammlinie (Seidel und Sandritter 1963), für den es mehrere leicht voneinander abweichende Definitionen in der Literatur gibt, berücksichtigt den DNA-Gehalt der G_0/G_1 -Fraktion einer Zellpopulation und geht häufig mit einer an Zahl geringen Zellpopulation mit doppelt so hohem DNA-Gehalt einher; diese Zellen repräsentieren die G_2/M -Fraktion, also diejenigen Zellen, die die Proteinbiosynthese abgeschlossen haben und zur Teilung in wiederum zwei Zellen mit einem DNA-Gehalt von jeweils $2c$ anstehen.

In dieser Studie bestimmte sich die DNA-Stammlinie als der Modalwert der DNA-Verteilung der gemessenen Zellkerne. Sie wurde als diploid definiert, wenn der Modalwert innerhalb des 97,5%-Konfidenzintervalls des mittleren DNA-Gehaltes der Eichzellpopulation lag (= „diploide DNA-Stammlinie“), als peritetraploid, wenn der Modalwert sich innerhalb des doppelten Vielfachen des 95%-Konfidenzintervalls des mittleren DNA-Gehaltes der Eichzellpopulation befand (= „peritetraploide DNA-Stammlinie“) und als aneuploid in denjenigen Fällen, die einen Modalwert außerhalb der diploiden und peritetraploiden Bereiche zeigten (= „aneuploide DNA-Stammlinie“).

„Exceeding Events“ (EE)

Die „Exceeding Events“ (EE) beschreiben die Zahl von Zellen, die einen bestimmten absoluten DNA-Wert, z.B. 5c („5cEE“) oder 9c („9cEE“), überschreiten. Diese Variablen gehen auf die Überlegung zurück, auf diese Weise Werte zu quantifizieren, die oberhalb der Grenzen für Tetraploidie (4c) bzw. Oktoploidie (8c) liegen, wobei jeweils ein Messfehler von bis zu 1c sicherheitshalber berücksichtigt wird. Als aneuploid wurden Fälle eingestuft, wenn Zellen oberhalb 9c auftraten ($9cEE > 0$). Fälle ohne Nachweis solcher Zellen wurden als nicht aneuploid interpretiert ($9cEE = 0$).

Proliferationsrate

Ferner wurde in den Fällen, in denen sich eine diploide DNA-Stammlinie erheben ließ, die Proliferationsrate erfasst, und zwar als der Anteil derjenigen Tumorzellen mit Messwerten zwischen 2c und 4c (außerhalb des Modalwertes der DNA-Stammlinie + 3 SD der Referenzzellen) befand.

Beispiele typischer DNA-bildzytometrischer Befunde

In den Abbildungen 6 - 8 sind repräsentative DNA-Histogramme mit Beispielen für eine diploide, eine peritetraploide bzw. eine aneuploide DNA-Stammlinie wiedergegeben, wobei die Eichzellpopulation blau und die Analysezellpopulation rot dargestellt ist.

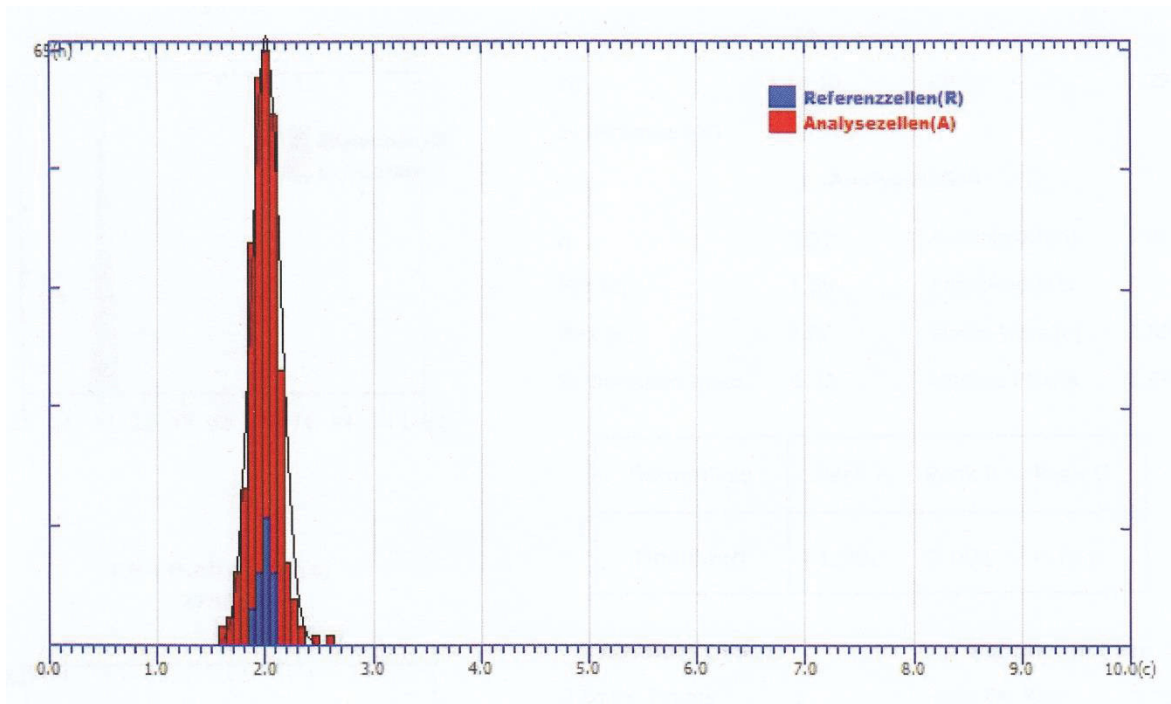


Abb. 6: Beispiel eines DNA-Histogramms mit einer diploiden DNA-Stammlinie bei 2,03 c (Biesterfeld 2014)

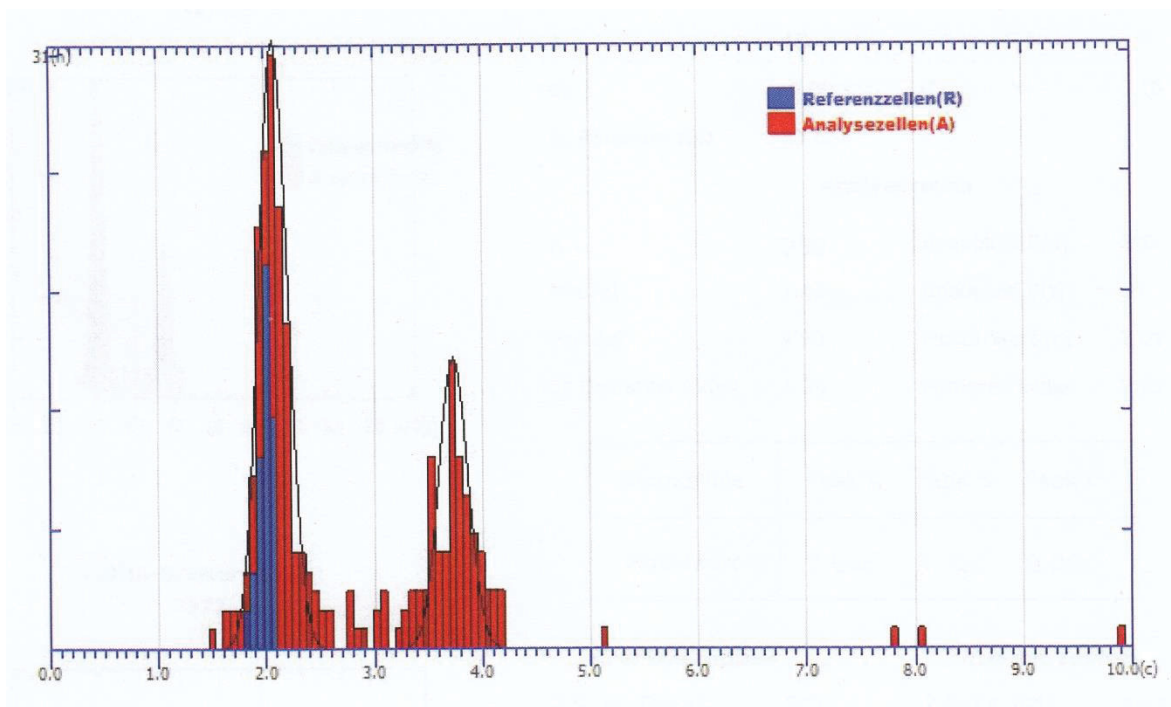


Abb. 7: Beispiel eines DNA-Histogramms mit einer diploiden DNA-Stammlinie bei 2,08 c und einer zweiten, peritetraploiden DNA-Stammlinie bei 3,88 c mit angedeuteter weiterer Verdopplung im 8c-Bereich (Biesterfeld 2014)

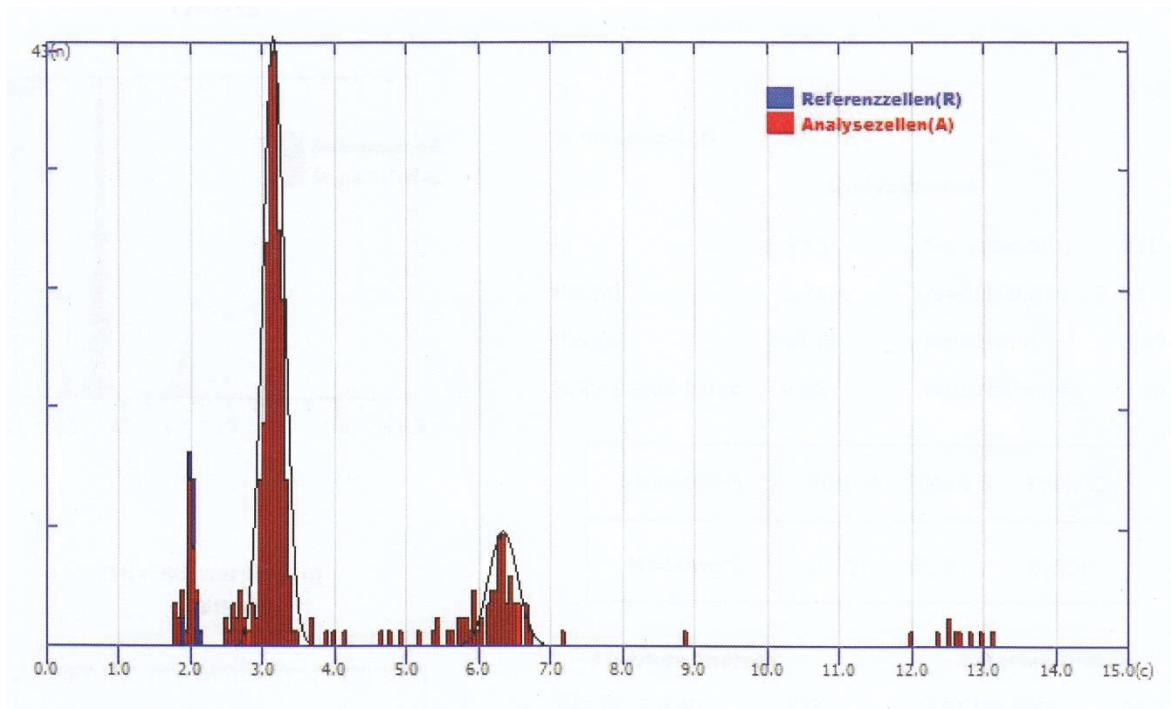


Abb. 8: Beispiel eines DNA-Histogramms mit einer aneuploiden DNA-Stammlinie bei 3,18 c (Biesterfeld 2014)

Interpretation der DNA-bildzytometrischen Messungen

Stammlinie-basierte Diagnostik von DNA-Aneuploidie:

In der hier durchgeführten Studie wurde DNA-Aneuploidie diagnostiziert, wenn eine aneuploide DNA-Stammlinie vorlag oder Zellen oberhalb von 9c ($9cEE > 0$) nachgewiesen wurden. Als diploid oder peritetraploid wurden diejenigen Fälle eingeordnet, die entsprechende Lagen der DNA-Stammlinie aufwiesen und keine Zellen oberhalb von 9c ($9cEE = 0$) zeigten. Beide letzteren Gruppen wurden auch als „nicht aneuploid“ zusammengefasst.

Kombinierte DNA-zytometrische Auswertung:

In der Vorstellung, dass neben der reinen Lage der G_0/G_1 -Population auch die Proliferationsrate als Ausdruck einer biologischen Kinetik von Bedeutung ist, wurden die Fälle mit diploider Stammlinie in zwei Gruppen unterteilt, und zwar in die Fälle mit niedriger Proliferationsrate (unterhalb des Medians) und hoher Proliferationsrate (oberhalb des Medians).

2.4 Erhebung des klinischen Verlaufes der Patientinnen

Um im Rahmen dieser retrospektiven Kohortenstudie das Follow-up zu erheben, wurde ein Dokumentationsbogen entworfen, der mit dem Ziel strukturiert war, anhand der Krankenakten den Krankheitsverlauf nachzuvollziehen, insbesondere in Hinsicht auf ein späteres Tumorrezidiv. Der Entwurf des Dokumentationsbogens wurde mit dem Institut für Pathologie der Humboldt-Universität in Berlin (Charité), einem konsiliarpathologischen Zentrum für Ovarialtumoren, abgestimmt.

An klinischen Daten wurde der genaue Operationsumfang dokumentiert. Außerdem war vorgesehen, eventuelle adjuvante Therapiemaßnahmen wie Chemotherapie oder Strahlentherapie zu erfassen; da bei den in die Studie aufgenommenen Patientinnen aber Leitlinien-gemäß adjuvante Therapien nicht zur Anwendung kamen, konnte auf diesen Aspekt verzichtet werden. Außerdem wurden etwaige Rezidive und bzw. Fernmetastasen erfasst sowie deren Diagnosezeitpunkt, ferner die Zahl der bislang durchgeführten Nachuntersuchungen.

Bei der Erhebung des Follow-Up ergaben sich einige Probleme. Da eine gynäkologische Abteilung mittlerweile geschlossen worden war und die Akten ausgelagert waren, war eine Einsichtnahme nur gegen ein vergleichsweise hohes Entgelt je Akte möglich. Diese Fälle sind von der Erhebung ausgeschlossen worden. Weiterhin verweigerte eine Klinik die Herausgabe von Daten aufgrund juristischer Bedenken. Einige Krankenhäuser waren nicht bereit, sich an der Erhebung zu beteiligen. Insgesamt verblieben so nur 43 Patientinnen, von denen ausreichende klinische Daten vorlagen.

2.5 Studienauswertung

2.5.1 Definition der Endpunkte

Nachdem die Daten aus den Fragebögen für den Ergebnisteil zusammengetragen worden waren, wurden Endpunkte definiert, anhand derer die Fragestellung der Arbeit, durch welche Variablen man einen klinisch günstigen von einem klinisch ungünstigen Verlauf differenzieren könnte, beantwortet werden sollte.

Als Aspekte ungünstiger und komplizierter Verläufe wurden gewählt:

1. Tod der Patientin
2. Rezidiv des Borderline-Tumors
3. Implantate auf dem Peritoneum
4. Implantate auf dem Uterus
5. Implantate auf dem kontralateralen Ovar
6. Implantate auf der Harnblase
7. Lymphknotenmetastasen
8. Pseudomyxoma peritonei
9. Tumorzellnachweis im Douglasraum

Analog werden als Aspekte des günstigen und unkomplizierten Verlaufs gewertet:

1. Überleben der Patientin ohne Rezidiv
2. Fehlendes Auftreten invasiver Implantate auf dem Peritoneum, dem Uterus, der Blase oder dem kontralateralen Ovar

2.5.2 Statistik

Die statistischen Untersuchungen erfolgten mit dem am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf vorgehaltenen Programmpaket BMDP des *Department of Biomathematics* der *University of California*, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA.

Auswertungen zu den biometrischen Grunddaten der deskriptiven Statistik, d.h. Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient, erhoben mit den Unterprogrammen 1D und 2D, wurden um Korrelationskoeffizienten (4M) ergänzt. Außerdem standen der t-Test (3D) sowie der Pearson Chi²-Test zur Auswertung von Mehr-Felder-Tafeln (4F) zur Verfügung.

Bezogen auf einen etwaigen statistischen Unterschied zwischen ungünstigen und günstigen Verläufen ergaben sich als Nullhypothese H_0 und als Alternativhypothese H_1 :

Nullhypothese H_0 : Ungünstiger und günstiger Verlauf sind bezogen auf die verglichenen Variablenausprägungen ohne signifikanten Unterschied verteilt.

Alternativhypothese H_1 : Ungünstiger und günstiger Verlauf sind bezogen auf die verglichenen Variablenausprägungen signifikant unterschiedlich verteilt.

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein α -Niveau von 0,05 angenommen, entsprechend einer Wahrscheinlichkeit von $< 5\%$, die Nullhypothese H_0 irrtümlich zu verwerfen.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung klinischer und morphologischer Grunddaten

Die verbliebenen 43 Patientinnen waren bei Diagnosestellung zwischen 20 und 76 Jahre alt. Der Mittelwert lag bei 45,4 +/- 15,1 (SD) Jahren, der Median bei 43 Jahren. Die Altersverteilung zeigt Abbildung 9.

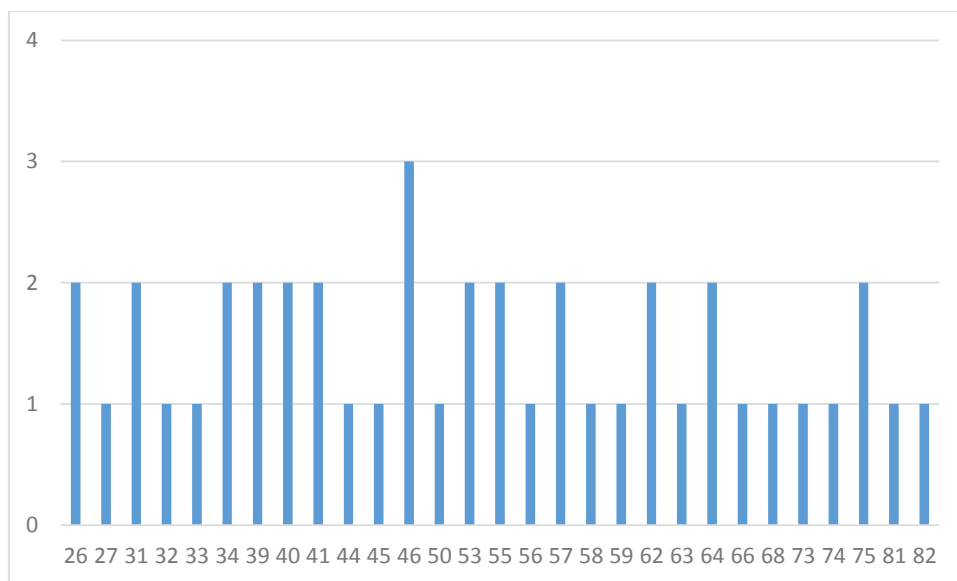


Abb. 9: Altersverteilung der 43 in der Studie verbliebenen Patientinnen mit Borderline-Tumoren des Ovars. x-Achse: Alter in Jahren, y-Achse: Zahl der Patientinnen

In den meisten Fällen, nämlich 37 (86,0%), bestand eine einseitige Tumorbildung, und zwar in 21 Fällen rechts (48,8%) und in 15 Fällen links (34,9%); in einem Fall (2,3%) war die Seite nicht aus dem Befund ablesbar. Sechs Patientinnen wiesen beidseitig einen Borderline-Tumor auf (14,0%). Insgesamt stand somit Gewebe von 49 Tumoren zur Verfügung.

Die Tumoren waren in ihrer Größe recht variabel (Abb. 10). Sie reichte von 1 cm bis 55 cm [sic!] und lag im Mittelwert bei 10,9 +/- 11,4 (SD) cm; der Median erreichte 7,0 cm. Viele kleine Tumoren waren unter der klinischen Diagnose einer Corpus luteum-Zyste operiert worden; der größte imponierte klinisch aber bereits als ein bis zum Rippenbogen reichender Unterbauchtumor.

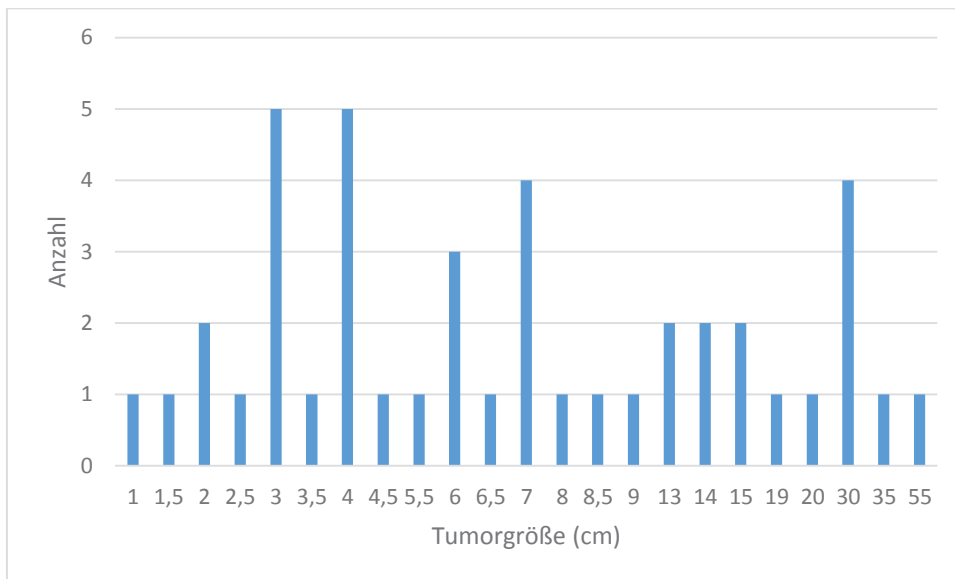


Abb. 10: Größenverteilung der Tumoren bei den 43 Patientinnen. Bei doppelseitigem Befall ist jeweils der größte Tumor aufgeführt.

Vom histologischen Typ her (Abb. 11) überwogen die serösen Tumoren (23/43, 53,5%) deutlich gegenüber den muzinösen (17/43, 39,5%). Drei Tumoren wurden als gemischt, also aus serösen und muzinösen Anteilen aufgebaut, diagnostiziert (7,0%). Die Patientinnen mit beidseitigen Tumoren zeigten jeweils beidseits den gleichen Tumortyp; vier hatten seröse, zwei muzinöse Tumoren.

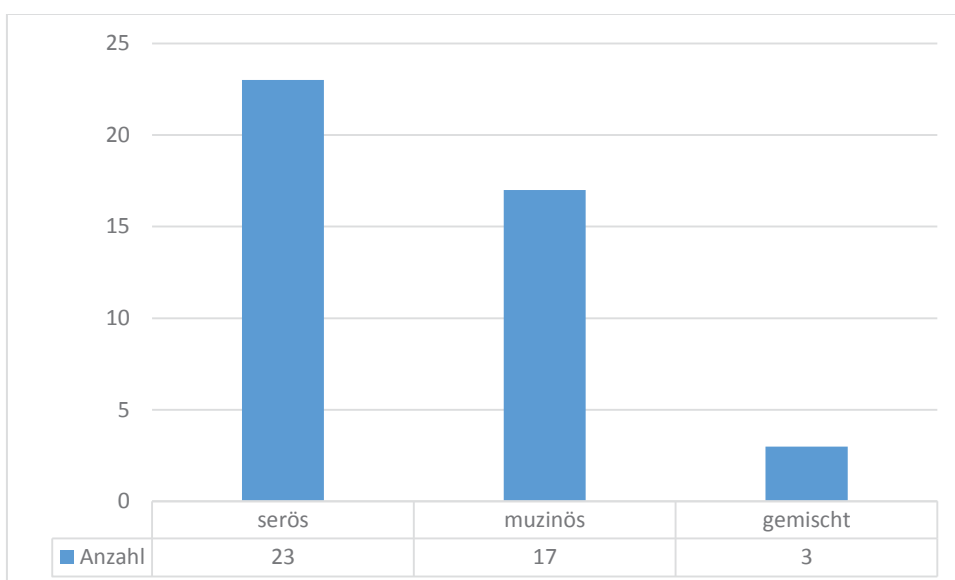


Abb. 11: Histologische Typisierung der Borderline-Tumoren bei den 43 Patientinnen

Vom Stadium her entsprachen die meisten Fälle dem Stadium pT1a, waren also einseitig und hatten die Kapsel des Ovars nicht überschritten (26/43, 60,5%). Dreizehn Fälle entsprachen den Stadien pT1b bzw. pT1c (30,2%). In vier Fällen trat ein TNM-Stadium \geq pT2 auf (9,3%); teilweise wurde hier die Kapsel durchbrochen, wenige Fälle zeigten auch ein Einwachsen in die Strukturen der Umgebung (Abb. 12).

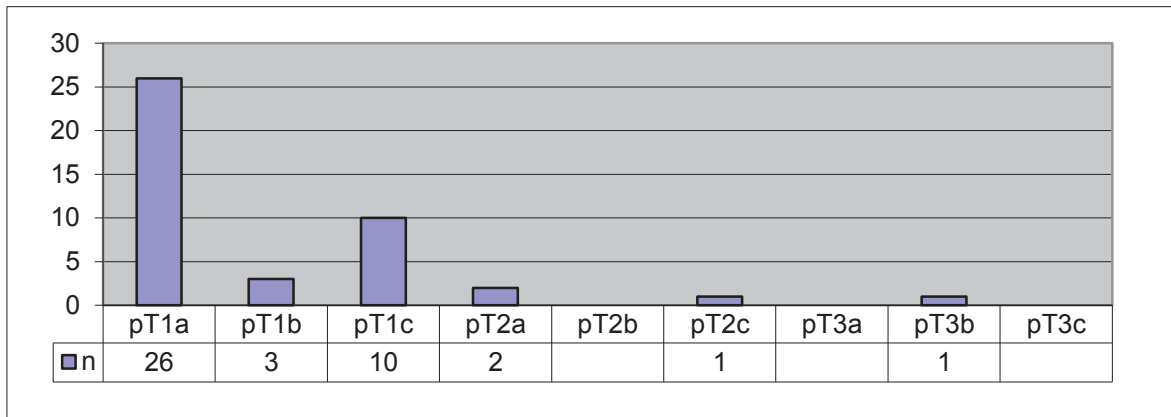


Abb. 12: TNM-Klassifikation der 43 Fälle von Borderline-Tumoren

3.2 Verteilung DNA-bildzytometrischer Messwerte

DNA-Stammlinien

In 35 der 43 Fälle lagen diploide DNA-Stammlinien vor (= 81,4%). Zwei Fälle erwiesen sich als tetraploid (= 4,7%), sechs waren aneuploid (= 13,9%). Die sechs Fälle mit beidseitigem Befall wiesen in beiden Tumoren ein gleichartiges Bild auf; in vier Fällen waren beide diploid, in jeweils einem Fall tetraploid bzw. aneuploid.

9cEE

Zellen oberhalb von 9c (9cEE > 0) fanden sich nur in einem Fall mit einseitigem Tumor; dieser zeigte auch eine aneuploide Stammlinie. Alle anderen 42 Fälle wiesen keine 9cEE auf (9cEE = 0).

DNA-Aneuploidie

Zusammenfassend wurde somit in sechs der 43 Fälle von Borderline-Tumoren über eine aneuploide DNA-Stammlinie die Diagnose von DNA-Aneuploidie gestellt; zwei Fälle wurden als tetraploid interpretiert, die übrigen 35 als diploid (Abb. 13). Alle Diagnosen wurden durch Analyse der Lage der DNA-Stammlinie gestellt. Der Nachweis von Einzelzellaneuploidie spielte für die Diagnostik keine Rolle, da keine Fälle mit diploider DNA-Stammlinie und gleichzeitigem Nachweis von 9cEE vorkamen.

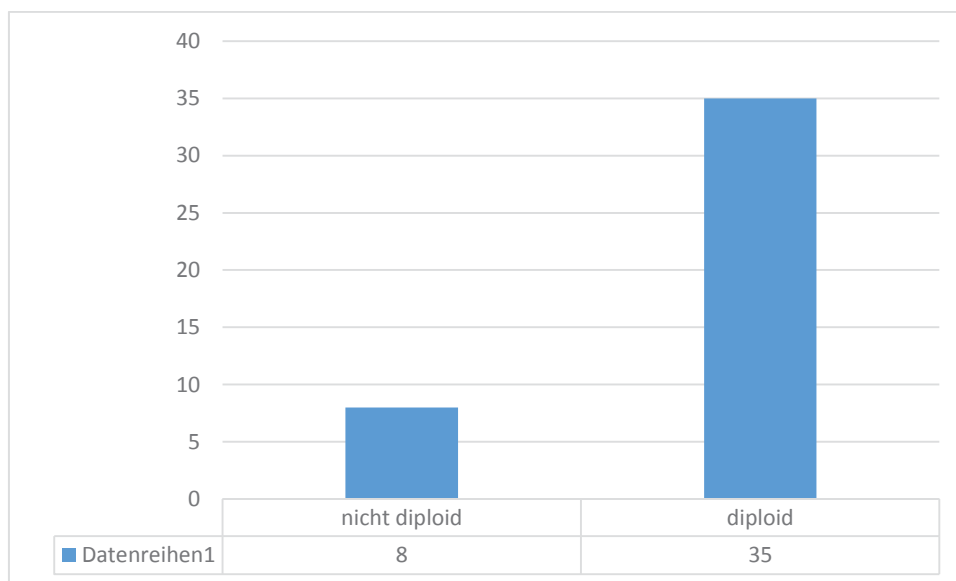


Abb. 13: Verteilung diploider und nicht-diploider DNA-zytometrischer Messergebnisse bei den 43 Patientinnen

Proliferationsrate

Die bei den 35 Fällen mit diploider DNA-Stammlinie erhobene Proliferationsfraktion lag zwischen 1,24% und 13,9%; der Mittelwert betrug 5,0% +/- 3,6% (SD), der Median 3,3%.

3.3 Klinische Verläufe der Patientinnen

Die klinische Verlaufsbeobachtung bezieht sich auf einen zwischen Operation und Ende des Beobachtungsintervalls vergangenen mittleren Zeitraum von 5,8 +/- 1,1 (SD) Jahren und bewegte sich zwischen 4 und 9 Jahren.

Die Grundtherapie bestand zumeist in einer reinen Entfernung der zystischen Läsionen unter Schonung des Ovars. Nach Eingang des histologischen Befundes erfolgte bei allen Patientinnen die Ovariectomie der betroffenen Seite, bei beidseitigem Befall entsprechend beider Seiten. Sehr häufig, nämlich bei 28 der 43 Fälle (65,1%), wurde zusätzlich das kontralaterale Ovar entfernt, im Rahmen dieser Operationen wurden zudem eine Omentektomie und eine Hysterektomie durchgeführt.

Es fanden sich 15 Patientinnen (34,9%), bei denen (teilweise auch aufgrund von Kinderwunsch) lediglich das ipsilaterale Ovar behandelt wurde. Bei diesen Patientinnen kam es in zwei Fällen (13,3%) zu einem Rezidiv der kontralateralen Seite, welches eine Vervollständigung des Eingriffs im o.g. Sinne nach sich zog. Eine Patientin mit einer schweren neurologischen Vorerkrankung wurde lediglich einseitig therapiert, ein Rezidiv trat hier nicht auf.

Alle Patientinnen wurden einer *Second-look*-Operation zugeführt, die zwei bis 12 Monate nach Ersteingriff stattfand.

Todesfälle kamen nicht vor. Beobachtet wurden ein Tumorrezidiv bzw. ein Tumorprogress bei neun Patientinnen, von denen manche von mehreren Ereignissen betroffen waren. Insgesamt traten im Verlauf 12 Ereignisse auf, nämlich sechs Fälle von Implantatbildungen auf dem Peritoneum, drei positive, also Tumorzellen enthaltende Douglaszytologien auf, ferner jeweils ein Fall eines Pseudomyxoma peritonei, von Implantatbildungen auf dem kontralateralen Ovar bzw. von Lymphknotenmetastasen.

In einem Fall mit Nachweis von Tumorzellen in der Douglas-Flüssigkeit bei einem muzinösen Tumor ist festzustellen, dass dieser laut Op-Bericht erst im Endobag punktiert wurde, laut pathologischem Befund aber rundum von Stroma umgeben gewesen war, so dass die iatrogene Punktion als Ursache des Douglasbefalls nicht auszuschließen ist. Betrachtet man das DNA-zytometrische Gutachten, so findet sich eine nicht aneuploide DNA-Verteilung. Außerdem war die durchgeführte *Second-look*-Operation bezüglich o.g. Endpunkte und weiterer Aspekte, die auf einen Tumorprogress hätten hinweisen können, befundfrei. Der weitere klinische Verlauf

war unauffällig, so dass die pathologische Douglaszytologie als iatrogener Nebenbefund ohne klinische Relevanz zu werten ist.

3.4 Vorhersage eines Tumorrezidivs oder einer Tumorprogression mit klinischen bzw. DNA-zytometrischen Daten

3.4.1 Allgemeine deskriptive Statistik

Für die zur klinischen Auswertung heranzuziehenden Variablen, nämlich den Tumortyp, das Tumorstadium, die DNA-Stammlinien-Interpretation und die kombinierte DNA-Auswertung wurde eine Korrelationsmatrix aufgestellt (Tab. 4).

Variable	Alter	Tumorgröße in cm	Tumortyp	Tumorstadium	DNA-Stamm-linien-Interpretation	Kombinierte DNA-Auswertung
Alter	---					
Tumorgröße in cm	-0.283	---				
Tumortyp	-0.169	0.420	---			
Tumorstadium	0.083	-0.074	-0.142	---		
DNA-Stammlinien-Interpretation	0.123	0.086	0.053	0.134	---	
Kombinierte DNA-Auswertung	0.216	-0.040	0.121	0.147	0.754	---

Tab. 4: Korrelationsmatrix für die bezüglich der klinischen Verläufe ausgewerteten Variablen

Sie lässt eine höhere Korrelation zwischen der DNA-Stammlinien-Interpretation und der kombinierten DNA-Auswertung ($r = 0.754$) erkennen, was vor dem Hintergrund,

dass die beiden Variablen per Definition nicht unabhängig sind, nicht überrascht. Ansonsten lassen sich bei Korrelationskoeffizienten von $-0.283 \leq r \leq 0.420$ keine Abhängigkeiten ablesen.

Danach wurde untersucht, ob sich bezogen auf Rezidiv- oder Progressionsereignisse in der Datenverteilung statistisch signifikante Unterschiede ergaben (Tab. 5). Dabei wurde, wie auch in weiter unten folgenden Tabellen, unter „günstiger Verlauf“ ein rezidivfreier Verlauf verstanden. Fälle mit Rezidiv oder Progressionsereignissen wurden als „ungünstiger Verlauf“ bezeichnet.

Variable	Mittelwert +/- SD „Günstiger Verlauf“	Mittelwert +/- SD „Ungünstiger Verlauf“	t-Test bzw. U-Test
Alter [Jahre]	42.8 +/- 14.6	55.0 +/- 14.0	p = 0.0301
Tumorgröße [cm]	11.3 +/- 12.1	9.5 +/- 8.9	p > 0.05
Tumortyp	1.85 +/- 0.96	1.89 +/- 1.05	p > 0.05
Tumorstadium	1.22 +/- 0.48	1.58 +/- 0.43	p = 0.05
DNA- Stammlinien- Interpretation [c]	2.04 +/- 0.11	2.10 +/- 0.18	p > 0.05
Proliferations- rate [%]	4.31 +/- 3.23	9.18 +/- 3.18	p = 0.0037
Kombinierte DNA- Auswertung	1.21 +/- 0.59	1.78 +/- 0.97	p = 0.0310

Tab. 5: Ergebnis des t-Tests für die berücksichtigten Variablen, bezogen auf den Vergleich zwischen günstigem Verlauf (n = 34) und ungünstigem Verlauf (n = 9).

Tumortyp: 1 = serös, 2 = muzinös, 3 = gemischt. T: 1 = T1a, 1,33 = T1b, 1,67 = T1c, 2 = T2a etc. bis 3,6 = T3b. Kombinierte DNA-Auswertung: 1 = diploide DNA-Stammlinie mit niedriger Proliferationsrate; 2 = nicht-diploide DNA-Stammlinie oder diploide DNA-Stammlinie mit hoher Proliferationsrate

Zumindest für das Alter der Patientinnen, das Tumorstadium und die DNA-bildzytometrischen Größen sind somit Unterschiede in der Datenverteilung zwischen Patientinnen der beiden verschiedenen Verlaufgruppen anzunehmen sind, nicht

hingegen für den Tumortyp (Abb. 14) und für die Tumorgröße, für die sich für die günstige Verlaufsgruppe sogar ein höherer Mittelwert ergab als für die ungünstige; die Mediane waren aber mit 6 cm bzw. 6,75 cm annähernd gleich. Auch ein beidseitiger Befall ging nicht mit einem höheren Anteil an nicht-diploiden Befunden einher ($p > 0,05$).

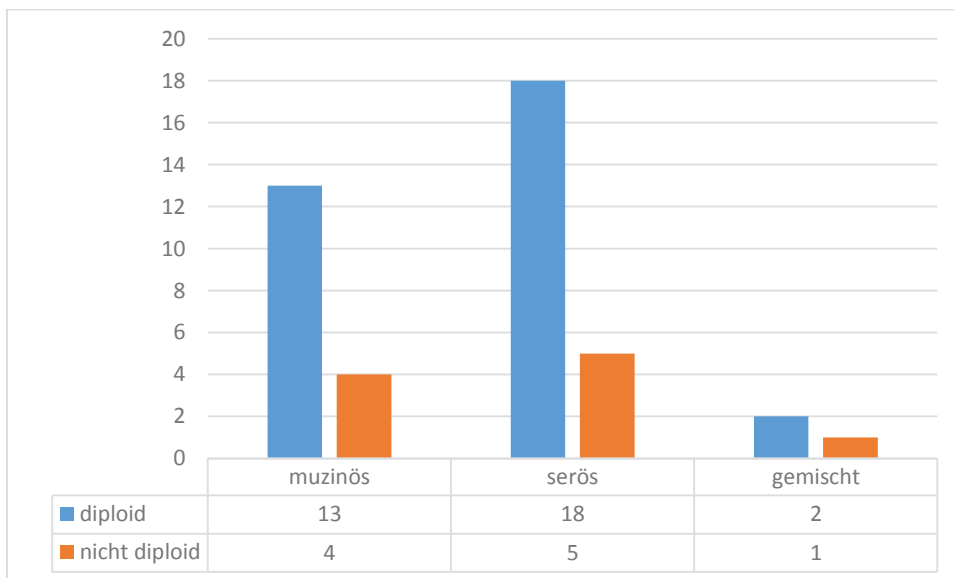


Abb. 14: Zusammenhang zwischen Tumortyp und DNA-zytometrischen Messergebnissen bei den 43 Patientinnen.

3.4.2 Korrelationen zwischen den klinischen Verläufen und Alter, Tumortyp bzw. Tumorstadium

Alter der Patientinnen

Ein eventueller Einfluss des Alters der Patientinnen auf den klinischen Verlauf ist in Tabelle 6 dargestellt. Dabei wurden die Patientinnen nach dem Median der Altersverteilung in zwei etwa gleich große Gruppen (22:21) aufgeteilt.

Alter der Patientinnen	≤ 43 Jahre	> 43 Jahre
Günstiger Verlauf	20	14
Ungünstiger Verlauf	2	7

Tab. 6: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach dem Median der Altersverteilung. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0508.

Das Ergebnis ist mit einem p-Wert von 0.0508 eben gerade nicht mehr statistisch signifikant, auch wenn der Anteil der günstigen Verläufe in der Gruppe der jüngeren Patientinnen mit 20/22 (= 90,9%) deutlich höher war als bei den älteren Patientinnen mit 14/21 (= 66,7%). Es darf aber als allgemeiner Trend dienen.

Teilt man die Patientinnen im Verhältnis 1:2:1 in drei dann allerdings teils relativ kleine Gruppen auf, so ergibt sich die folgende, ebenfalls statistisch nicht signifikante Verteilung (Tabelle 7).

Alter der Patientinnen	≤ 34	35 - 57	> 57
Günstiger Verlauf	11	18	5
Ungünstiger Verlauf	2	3	4

Tab. 7: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression, aufgeteilt in drei Gruppen nach einer 1:2:1-Quantilisierung der Altersverteilung. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0.05

Tumortyp

In Tab. 8 sind die aufgetretenen Rezidive und Progressionen bezogen auf die Zahl der Ereignisse und in Abbildung 15 bezogen auf die betroffenen Fälle dem histologischen Subtyp gegenübergestellt.

Tumortyp	serös	muzinös	gemischt
Günstiger Verlauf	18	13	3
Ungünstiger Verlauf	5	4	0

Tab. 8: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zum histologischen Subtyp. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0,05

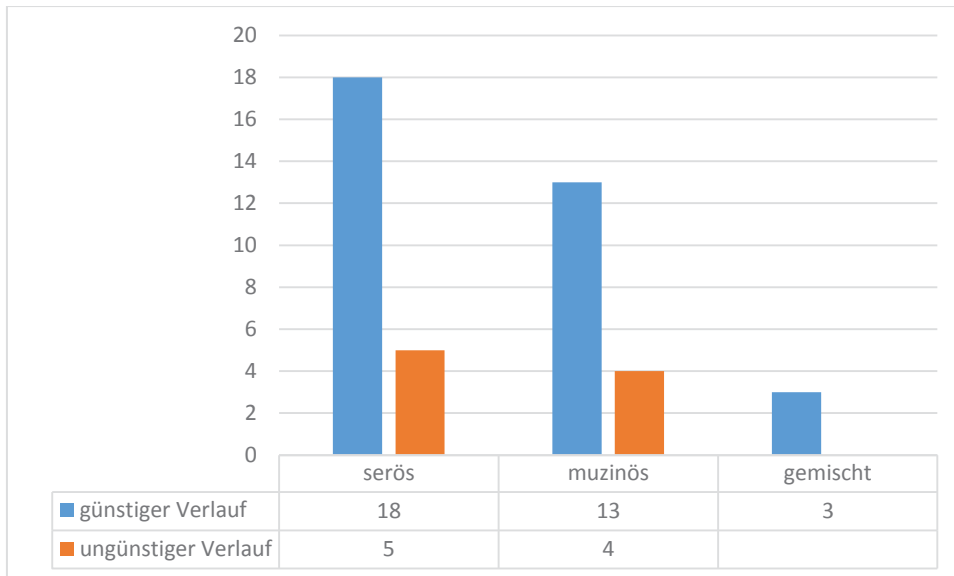


Abb. 15: Graphische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression und dem histologischen Subtyp des zugrunde liegenden Borderline-Tumors, bezogen auf die Gesamtzahl der betroffenen Fälle (n = 9)

Die 12 Rezidiv- bzw. Progressionsereignisse traten bei serösen und muzinösen Tumoren gleich häufig auf (n = 6). Insgesamt betrafen sie fünf Fälle mit serösen (5/17 = 29,4%) und vier mit muzinösen Tumoren (4/23 = 17,4%) so dass auf die Gesamtfälle bezogen ein im Trend relatives Überwiegen bei den serösen Tumoren zu beobachten war (Pearson Chi²-Test: p >0,05).

Tumorgröße

Da die Tumorgröße nicht in die T-Kategorie der TNM-Klassifikation eingeht, soll sie hier einzeln betrachtet werden. Da zu einem Fall die Tumorgröße nicht verlässlich dokumentiert war, bezieht sich die Statistik hier nur auf 42 statt auf 43 Fälle.

Die Beziehung zwischen der Tumorgröße und dem klinischen Verlauf mit einer Gruppierung nach dem Median (7 cm) ergab Gruppen mit 24 bzw. 18 Patientinnen, was daran liegt, dass sechs Fälle genau den Median als Tumorgröße hatten und so definitionsgemäß in die Gruppe der kleineren Tumoren eingeordnet wurden (Tabelle 9).

Tumorgröße	≤ 7 cm	> 7 cm
Günstiger Verlauf	18	15
Ungünstiger Verlauf	6	3

Tab. 9: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression, aufgeteilt in zwei Gruppen nach dem Median der Tumorgröße. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 33) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0.05

Die Verteilung war statistisch nicht signifikant (p > 0.05); während in der Gruppe der kleineren Tumoren 18 von 24 Fällen günstig verliefen (= 75%), waren es in Gruppe der größeren Tumoren sogar 15 von 18 (= 83,3%), also im Grunde unerwarteterweise mehr. Der Trend zu einem nicht unbedingt ungünstigen Verlauf bei größeren Tumoren bestätigte sich auch bei einer Darstellung der Daten nach 1:2:1-Quantilisierung (Tabelle 10, p > 0.05).

Tumorgröße	≤ 3.5 cm	3.5 cm - 14 cm	> 14 cm
Günstiger Verlauf	8	17	8
Ungünstiger Verlauf	2	6	1

Tab. 10: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression, aufgeteilt in drei Gruppen nach einer 1:2:1-Quantilisierung der Tumorgröße. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 33) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0.05

Tumorstadium

26 Tumoren (= 60,5%), befanden sich im Stadium T1a, 13 weitere in den Stadien T1b und T1c (= 30,2%). Nur wenige Tumoren, nämlich vier (= 9,3%), waren bei Diagnosestellung bereits im Stadium T2 bzw. T3. Die folgenden Tabellen stellen zunächst den Zusammenhang zwischen allen vorkommenden Tumorstadien (T1a, T1b, T1c, T2a, T2c und T3b) und dem Verlauf dar (Tab. 11), danach wurden für das Stadium Darstellung in drei Gruppen (T1, T2, T3 bzw. T1a, T1b und T1c, übrige) bzw. in zwei Gruppen (T1a, übrige) gewählt (Tab. 11 - 14).

Tumorstadium	T1a	T1b	T1c	T2a	T2c	T3b
Günstiger Verlauf	25	1	5	2	0	1
Ungünstiger Verlauf	1	2	5	0	1	0

Tab. 11: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zum Tumorstadium unter Darstellung aller aufgetretenen T-Stadien. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0029

Tumorstadium	T1	T2	T3
Günstiger Verlauf	31	2	1
Ungünstiger Verlauf	8	1	0

Tab. 12: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zum Tumorstadium in drei Gruppen (T1a / T1b und T1c / T2 und T3). Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0.05

Tumorstadium	T1a und T1b	T1c und T2a	T2c und T3b
Günstiger Verlauf	26	7	1
Ungünstiger Verlauf	3	5	1

Tab. 13: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zum Tumorstadium in drei Gruppen (T1a / T1b und T1c / T2 und T3). Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0277

Tumorstadium	T1a	T1b - T3
Günstiger Verlauf	25	9
Ungünstiger Verlauf	1	8

Tab. 14: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zum Tumorstadium in zwei Gruppen (T1a / übrige T-Stadien). Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0007

Die Gegenüberstellung der verschiedenen Gruppierungen in den Tabellen 11 - 14 lässt erkennen, dass der in Tabelle 11 ablesbare statistisch signifikante Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Verlauf (p = 0.0029) in erster Linie wohl auf die sehr geringe Rezidivrate der Tumoren im Stadium T1a von 3,8% zurückgeht (1/26), während sie bei den übrigen Stadien mit 47,1% (8/17) deutlich höher war (Tabelle 14, p = 0.0007).

3.4.3 Korrelationen zwischen den klinischen Verläufen und den Messergebnissen der DNA-Bildzytometrie

DNA-Stammlinieninterpretation

Wenn man den Zusammenhang zwischen einem prognostisch ungünstigen Verlauf und dem Auftreten von DNA-Aneuploidie gegenüberstellt, so findet sich der in Tabelle 15 dargestellte Zusammenhang.

DNA-Stammlinie	diploid	nicht diploid
Günstiger Verlauf	30	4
Ungünstiger Verlauf	5	4

Tab. 15: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zur DNA-Stammlinienploidie. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0251

Insgesamt zeigten 50% (4/8) der Patientinnen mit einer nicht-diploiden Stammlinie einen ungünstigen Verlauf im Vergleich zu 14,3% (5/35) der Patientinnen mit einer

diploiden Stammlinie. Der Unterschied zwischen beiden Verlaufsgruppen war statistisch signifikant ($p = 0.0251$).

Proliferationsrate

Der Zusammenhang zwischen dem Verlauf und der bei allen 35 Tumoren mit diploider Stammlinie bestimmten Proliferationsrate ist in Tabelle 16 wiedergegeben. Sie unterteilt die Fälle mit dem Median von 3.3% als Grenzwert in zwei Gruppen. Da mehrere Einzelfälle den Wert 3.3% aufwiesen, ergibt sich für die Gruppen ein Zahlenverhältnis von 19:16, das aber nah am Idealverhältnis von 18:17 liegt. Außerdem wurde eine Berechnung nach 1:2:1-Quantilisierung mit den Grenzwerten 2.2% bzw. 7.4% vorgenommen (Tabelle 17).

Proliferationsrate	$\leq 3.3\%$	$> 3.3\%$
Günstiger Verlauf	19	11
Ungünstiger Verlauf	0	5

Tab. 16: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression für diploide Fälle, aufgeteilt in zwei Gruppen nach dem Median der Proliferationsrate. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 30) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 5): $p = 0.0085$

Proliferationsrate	$\leq 2.2\%$	2.3% - 7.4%	$> 7.4\%$
Günstiger Verlauf	9	16	5
Ungünstiger Verlauf	0	2	3

Tab. 17: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression für diploide Fälle, aufgeteilt in drei Gruppen nach einer 1:2:1-Quantilisierung der Proliferationsrate. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 30) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 5): $p = 0.0754$, demnach nicht statistisch signifikant

Die Verteilung in Tabelle 16 zeigt, dass sich bei neutraler Grenzwertziehung am Median mit der Proliferationsrate Fälle mit einem günstigen Verlauf gut und statistisch signifikant identifizieren lassen ($p = 0.0085$). Da die Fälle mit ungünstigem Verlauf allesamt Proliferationsraten von $\geq 4.6\%$ aufwiesen, wäre theoretisch statt des

Medians von 3.3% ohne Änderungen im Ergebnis auch ein Grenzwert von 4.5% vertretbar.

Kombination aus DNA-Stammlinie und Proliferationsrate

Fasst man die Ergebnisse der DNA-bildzytometrischen Untersuchungen in drei Gruppen unter Berücksichtigung sowohl der DNA-Stammlinie, als auch der Proliferationsrate, zusammen, so ergibt sich folgende Datenverteilung (Tabelle 18).

DNA-Bildzytometrie	Diploide Stammlinie, PRF \leq 3.3%	Diploide Stammlinie, PRF $>$ 3.3%	Nicht-diploide Stammlinie
Günstiger Verlauf	19	11	4
Ungünstiger Verlauf	0	5	4

Tab. 18: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zur Kombination aus DNA-Bildzytometrie und Proliferationsphase in drei Gruppen. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0065

Man erkennt, dass auf diese Weise eine Gruppe mit rein günstigen Verläufen (19/19 = 100%), eine Gruppe mit ca. zwei Dritteln (11/16 = 68,8%) und eine Gruppe mit der Hälfte (4/8 = 50%) günstiger Verläufe statistisch signifikant voneinander abgetrennt werden können.

3.4.4 Prädiktion des klinischen Verlaufes durch eine Kombination aus Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie

Nachdem sich gezeigt hatte, dass insbesondere zwei Konstellationen eine gute Prädiktion eines günstigen klinischen Verlaufes erlaubten, nämlich zum einen der Vergleich von T1a-Tumoren im Vergleich zu den übrigen Tumoren, zu anderen die diploiden Tumoren mit einer Proliferationsrate von \leq 3.3% im Vergleich zu den übrigen Tumoren, wurden die Datenverteilungen für Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie gegenübergestellt.

Tabelle 19 zeigt dabei die Beziehung zwischen T und der Proliferationsrate (n = 35), Tabelle 20 diejenige zwischen T und der Kombination aus DNA-Stammlinie und Proliferationsrate (n = 43).

Tumorstadium	Proliferationsrate	
	≤ 3.3%	> 3.3%
T1a	15	9
übrige Stadien	4	7

Tab. 19: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorstadium und Proliferationsrate in jeweils zwei Gruppen. Pearson Chi²-Test (n = 35): p > 0.05

Tumorstadium	DNA-Bildzytometrie	
	Diploide Stammlinie, PRF ≤ 3.3%	Diploide Stammlinie, PRF > 3.3% bzw. nicht-diploide Stammlinie
T1a	14	12
übrige Stadien	3	14

Tab. 20: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorstadium und kombinierter Auswertung der DNA-Bildzytometrie in jeweils zwei Gruppen. Pearson Chi²-Test (n = 43): p = 0.0176

In den Tabellen 21 und 22 sind zwei gemeinsame Auswertemodelle für T-Stadium und DNA-Bildzytometrie wiedergegeben. Sie gehen davon aus, dass T1a-Tumoren nicht einer primären DNA-bildzytometrischen Untersuchung unterzogen werden müssen, da sie ohnehin eine exzellente Prognose haben. Die übrigen Fälle in den beiden Tabellen verschieden gruppiert.

Verlauf	Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie			
	T1a	T1b - T3, diploide Stammlinie, PRF ≤ 3,3%	T1b - T3, diploide Stammlinie, PRF > 3,3%	T1b - T3, Nicht-diploide Stammlinie

Günstiger Verlauf	25	4	3	2
Ungünstiger Verlauf	1	0	4	4

Tab. 21: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zur Kombination aus DNA-Bildzytometrie und Stadium in vier Gruppen. Modell: Durchführung einer DNA-zytometrischen Messung nur an Fällen im Stadium > T1a. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p > 0.05

Verlauf	Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie		
	T1a	T1b - T3, diploide Stammlinie, PRF ≤ 3,3%	T1b - T3, diploide Stammlinie, PRF > 3,3% oder T1b-T3, nicht-diploide Stammlinie
Günstiger Verlauf	25	4	5
Ungünstiger Verlauf	1	0	8

Tab. 22: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zur Kombination aus DNA-Bildzytometrie und Stadium in drei Gruppen. Modell: Durchführung einer DNA-zytometrischen Messung nur an Fällen im Stadium > T1a. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0001

Geht man von diesem Modell aus, so lässt sich festhalten, dass sich neben den dann bereits von vornherein als günstig „gesetzten“ T1a-Fällen über die DNA-Bildzytometrie noch eine kleine Fallgruppe von sehr guter Prognose abgrenzen lässt. Bei dem T1a-Fall mit ungünstigem Verlauf, der nur als Einzelfallbeobachtung aufgefasst werden kann, handelte es sich um einen 6,5 cm großen serösen Borderline-Tumor mit einer zwar diploiden DNA-Stammlinie, aber einer erhöhten Proliferationsfraktion von 10,4%.

Tabelle 23 berücksichtigt einen anderen Ansatz. In diesem Modell steht die DNA-bildzytometrische Analyse aller Fälle im Vordergrund, durch die 19 rezidivfreie Fälle

mit in unserem Patientinnenkollektiv 100%-iger Treffsicherheit erkannt werden können. In diesen 19 Fällen sind auch 15 der 26 T1a-Fälle (= 57,7%) enthalten.

Verlauf	Tumorstadium und DNA-Bildzytometrie		
	Alle Stadien, diploide Stammlinie, PRF $\leq 3,3\%$	übrige T1a-Fälle	T1b - T3, diploide Stammlinie, PRF $> 3,3\%$ oder T1b-T3, nicht-diploide Stammlinie
Günstiger Verlauf	19	10	5
Ungünstiger Verlauf	0	1	8

Tab. 23: Tabellarische Gegenüberstellung von Tumorrezidiven bzw. Tumorprogression zur Kombination aus DNA-Bildzytometrie und Stadium in drei Gruppen. Modell: Durchführung einer DNA-zytometrischen Messung in allen Fällen, wobei in T1a-Fällen das Messergebnis nicht berücksichtigt wird. Pearson Chi²-Test im Vergleich „Günstiger Verlauf“ (n = 34) vs. „Ungünstiger Verlauf“ (n = 9): p = 0.0001

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Konstellation eines T1a-Tumors (ohne DNA-Bildzytometrie) oder eines größeren Tumors mit diploider Stammlinie und geringer Proliferationsrate einen mit großer Wahrscheinlichkeit günstigen Verlauf nehmen wird (29/30 = 96,7%).

Entscheidet man sich, auch die T1a-Fälle DNA-zytometrisch zu untersuchen, so muss man bedenken, dass auch bei T1a-Tumoren mit günstigen Verläufen durchaus nicht selten auffällige DNA-zytometrische Verteilungen auftraten: Von den 25 Fällen zeigten zwei eine nicht-diploide Stammlinie, acht weitere verfügten bei diploider Stammlinie über eine hohe Proliferationsrate ($> 3,3\%$), so dass man in 10 der 25 Fälle (= 40%) eine suspekte Konstellation gesehen hätte, die aber nur in einem Fall wirklich mit einem ungünstigen Verlauf verbunden war. Offenbar ist hier die T1a-Konstellation der klinisch entscheidendere Parameter.

4 Diskussion

4.1 Aufgabenfelder der Pathologie in der Diagnostik epithelialer Ovarialtumoren

Die primäre Diagnose invasiver maligner epithelialer Tumoren, also bereits manifester Karzinome, erfolgt üblicherweise auf der Basis histologischer Parameter. Diese gilt sowohl für die Abgrenzung gegenüber gutartigen Tumoren (z.B. Adenokarzinom vs. Adenom), als auch gegenüber nicht-invasiven malignen Tumoren (z.B. Adenokarzinom vs. Adenocarcinoma in situ). Diese Vorgehensweise wird auch bei den malignen Tumoren im Ovar gewählt, wobei bei ihnen als weitere Notwendigkeit die Differenzierung zwischen primären Karzinomen und Metastasen, z. B. von Magenkarzinomen oder kolorektalen Karzinomen, hinzutritt.

Während bei vielen Tumorentitäten ergänzende Informationen für die Therapieplanung, vor allem für adjuvante Ansätze, aus immunhistochemischen oder molekularpathologischen Zusatzuntersuchungen gewonnen werden, ist dies beim Ovarialkarzinom und auch beim Borderline-Tumor des Ovars kaum bzw. gar nicht der Fall.

Die aktuelle S3-Leitlinie zu Ovarialtumoren aus dem Jahr 2013 (Leitlinienprogramm Onkologie 2015) hält für Ovarialkarzinome fest, für *„tumorbiologische Marker wie HER-2, Bcl-2, p53, THBS, VEGF oder für p16^{INK4a} und pRb u.a.m. (fänden) sich bislang keine eindeutigen, teils widersprüchliche Ergebnisse im Sinne prognostischer oder prädiktiver Relevanz“*. Lediglich Tumortyp, Tumorstadium (vgl. Abb. 3) und Tumorgradierung stehen derzeit als Prognostikatoren und als Zuordnungskriterien in unterschiedliche Therapiekonzepte (kurativ vs. palliativ) bzw. konkrete Therapieregime zur Verfügung.

Speziell bei den Borderline-Tumoren, deren gute Prognose gut dokumentiert ist (vgl. Abb. 4), geht es gemäß den Leitlinien ausschließlich um eine vollständige Entfernung des Tumors und ggfls. vorhandener Implantate, verbunden mit einer korrekten Stadienzuordnung. So wird in der S3-Leitlinie formuliert: *„Ziel der operativen Therapie des (Borderline-Tumors) ist stets die komplette Tumorsektion. Bei fortgeschrittenen Stadien und inkompletter Resektion fand sich ein signifikanter Einfluss auf die weitere Prognose, sowohl bezüglich der Rezidivrate, als auch des*

Überlebens (...). Bei vermeintlichem Stadium I ist durch die Staging-OP eine Korrektur des FIGO-Stadiums im Sinne eines Up-Staging bei 6-50% zu erwarten (...).“ Unter „Staging-OP“ wird dabei ein zweiter, zeitnahe Eingriff verstanden, der auf die primäre Entfernung des zystischen ovariellen Prozesses mit der oft unerwarteten Diagnose eines Borderline-Tumors folgt. Die Zahlenangaben gehen auf eine Zusammenstellung durch du Bois et al. (2009) zurück, nach der in 70 von 284 Fällen (= 24.6%) im Rahmen einer komplettierenden Operation ein höheres Stadium als nach der primären Operation ermittelt worden war (Abb. 16).

Author	Pts.	Pts. with up-staging = pts. with residuals detected during Re-staging				initial FIGO stage	definitive FIGO stage
		all		serous BOT			
		n	%	n	%		
Fauvet 2005	30	6	20	5/n.a.	-	5 x FIGO IA 1 x FIGO IC	2 x IB, 1 x IA, 2 x IIIA 1 x IIIC
Maneo	30	11	33	n.a./22	-		
Odegaard	21	1	6	n.a.	-	21 x FIGO I	IA -> IB
T.-Colomer	7	1	14	1/n.a.	-	7 x FIGO IA	IA -> IB
Hopkins	15	7	46	n.a.	-	7 x FIGO IA	2x IB/C, 1 x IIA, 1 x IIB, 3 x III
Darai	42	9	21	6/17	35	28 x FIGO IA 12 x FIGO IC 1 x FIGO IIA 1 x FIGO IIC	2 x IB, 2 x IIIA/C 1 x IIIC 1 x FIGO IIB 1 x FIGO IIIC
Fauvet 2004	54	8	15*	7/29	24	41 FIGO I 13 FIGO II/III	3 x IB, 1x IIA, 1x IIB, 1x IIIA, 1x IIIC 1x FIGO IC-> IIIC -
Snider	27	5	19	4/13	31	27 x FIGO I	1 x IA-> IB, 3 x II, 1 x III
Querleu	30	8	27	4/12	33	30 x FIGO IA	4 x IC, 2 x IIIA, 1x IIIC
Camatte	28	14	50	14/n.a.	-	28 x FIGO I	9 x FIGO IA/B -> IC, 5 x IIIA
all	284	70	24,7%	21/71	29,6%		

Abb. 16: Höheres Tumorstadium im Vergleich zwischen der primären Operation („initial FIGO stage“) und der komplettierenden Operation („definite FIGO stage“) bei 284 Fällen von Borderline-Tumoren: 24.6% (in der Tabelle falsch auf 24.7% gerundet) (nach du Bois et al. 2009)

Diese Darstellung belegt die hohe Bedeutung einer komplettierenden Operation und verdeutlicht auch, weswegen in den Leitlinien (von Ausnahmen abgesehen) eine entsprechende Indikation hierfür gesehen wird.

Prognostikoren zu der Frage, wie sich operierte Borderline-Tumoren verhalten werden, hält die Pathologie bislang aber nicht vor. Bedarf hierfür besteht trotz der sehr guten Gesamtprognose. Ein relatives 10-Jahres-Überleben von 95.1%, wie es

für die gut 700 Langzeit-beobachteten Patientinnen des Tumorzentrums München dokumentiert ist (Rottmann et al. 2014), bedeutet dennoch, dass 4.9% oder jede 20. Patientin an ihrem Tumorleiden verstirbt und sicher einige weitere an Rezidiven leiden werden, die nicht todbringend sind. Entsprechend bleibt bei einer wenn auch nur geringen Verringerung der Lebenserwartung eine Verpflichtung der Medizin, prognostische Faktoren zu entwickeln.

4.2 DNA-Bildzytometrie in der Prognostik von Borderline-Tumoren des Ovars - Möglichkeiten und Grenzen

Die hier vorgelegte Studie an Borderline-Tumoren des Ovars stellt retrospektiv die Erfahrungen zusammen, die in einem definierten Zeitraum am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf mit der DNA-Bildzytometrie gesammelt wurden. Die Übersendung der Fälle erfolgte dabei auf Wunsch der Kliniker aus Gründen der Krankenversorgung, nicht hingegen aufgrund einer vorher geplanten Studie. So müssen die Ergebnisse stets unter dem Vorbehalt interpretiert werden, dass man eine etwaige Selektion der Patientinnen nicht sicher abschätzen kann. Das Motiv der Kliniker, Untersuchungsmaterial eines bestimmten Falles zu schicken und das eines anderen eben nicht, wurde im Rahmen der Datenerhebung nicht aufgeklärt.

Sinnvoll ist daher, die statistischen Kenndaten unseres Patientenkollektivs mit denen größerer Fallgruppen zu vergleichen, die auf robustere Daten zurückgehen bzw. auch epidemiologischer Natur sind. Dazu bieten sich zum einen die Zahlen der aktuellen und großen deutschen Multicenter-Studie (n = 950, du Bois et al. 2013) an, zum anderen die des Tumorzentrums München (n = ca. 800, Rottmann et al. 2014) (Tab. 24). Ferner steht ein älteres größeres Studienkollektiv aus Norwegen aus den Jahren 1970-1982 (n = 370), an dem mit der Methode der DNA-Durchflußzytometrie gearbeitet wurde, zum Vergleich zur Verfügung (Kaern et al. 1993).

Studie	n	Alter (Median)	FIGO I T1	FIGO IA T1a	Quotient s / m
Kaern et al. 1993	370	53	84.1%	64.3%	0.98
du Bois et al. 2013	950	49	82.3%	55.3%	2.22
Rottmann et al. 2014	ca. 800	53,9	88.2%	k. A.	k. A.
Eigene Studie 2016	43	43	90.7%	60.5%	1.15

Tab. 24: Kenndaten des Patientenkollektivs im Vergleich zu den Daten einer norwegischen Studie (Kaern et al. 1993), der deutschen Multicenterstudie (du Bois et al. 2013) und des Tumorzentrums München (Rottmann et al. 2014). k. A. = keine Angabe. Quotient s / m = Verhältnis von serösen und muzinösen Borderline-Tumoren.

Die ca.-Angabe beim Patientenkollektiv des Tumorzentrums München bezieht sich auf die relative Angabe von Borderline-Tumoren als 15,6% von 5.040 Fällen von Ovarialtumoren.

Aus dem Vergleich der Daten lässt sich ableiten, dass unser kleines Patientenkollektiv durchaus mit den drei größeren Studienkollektiven vergleichbar ist; die Unterschiede betreffen in erster Linie den bei uns kleinen Quotienten zwischen serösen und muzinösen Tumoren im Vergleich zur Multicenterstudie. Unsere Patientinnen sind bezogen auf den Median die jüngsten. Möglicherweise erklärt sich hieraus auch die vergleichsweise hohe Quote im Stadium I, wobei das Stadium Ia in dem norwegischen Kollektiv noch häufiger war. Letztendlich kann man aber davon ausgehen, dass die eigenen Kenndaten nicht in einem Maße von denen größerer Fallsammlungen abweichen, welches jegliche Dateninterpretation verbieten würde.

Die eigenen Ergebnisse lassen sich von zwei Seiten beleuchten, wie bereits im Ergebnisteil angesprochen:

Nähert man sich von einem zuvor durch histopathologische Untersuchungen gesicherten Tumorstadium her, so könnte man argumentieren, dass eine T1a-Situation mit nur einem Rezidiv bei 26 Fällen (= 3,8%) eine *à priori* so günstige Konstellation repräsentiert, dass DNA-bildzytometrische Messungen entbehrlich seien. Die DNA-Bildzytometrie wäre dann eine Methode, die sich rein auf die „Nicht T1a-Konstellation“ beschränken würde; dort wäre es möglich, mit der herausgearbeiteten kombinierten Interpretation von DNA-Stammlinie und

Proliferationsrate bestimmte Fälle mit zu erwartendem günstigen Verlauf herauszuarbeiten - nämlich diejenigen, die bei höherem Stadium über eine diploide Stammlinie und gleichzeitig über eine geringe Proliferationsrate verfügen. Hier fanden sich bei allerdings nur vier solcher Fälle keine Rezidive. Bei nicht-diploider Stammlinie oder bei diploider Stammlinie und gleichzeitig erhöhter Proliferation lag der Anteil ungünstiger Verläufe bei acht von 13 Fällen und damit bei 61,5%. Diese Zahl ist zu hoch, um diese Frauen nicht anders ärztlich zu beraten als die vorgenannten beiden Patientengruppen, aber andererseits zu niedrig, um bereits zu prophylaktischen adjuvanten Therapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie zu greifen. Die Konsequenz sollte also eine engmaschigere klinische und ggfls. auch bildgebende Kontrolle sein, um Rezidive jeglicher Art möglichst früh zu erkennen.

Eine andere Herangehensweise wäre, stadienunabhängig in jedem Fall eine DNA-bildzytometrische Messung vorzunehmen. Ändern würde sich damit an den Gesamtdaten natürlich nichts, man würde aber Patientinnen, die im Stadium T1a wären, noch mehr Sicherheit über einen zu erwartenden günstigen Verlauf anbieten können; unseren Daten folgend traten in allen 19 Fällen, die eine diploide Stammlinie und eine geringe Proliferation aufwiesen, keine Rezidive auf - was dann einer 100%igen Quote günstiger Verläufe entspräche. Letzten Endes wäre es aus ökonomischer Sicht vermutlich am sinnvollsten, Frauen mit einem Borderline-Tumor im Stadium T1a aufgrund des geringen Risikos nur ein Angebot einer DNA-Bildzytometrie zu machen, sie aber nicht allgemein vorzusehen.

Das ursprüngliche Ziel, mit unserer Studie eine Vorhersage von ungünstigen Verläufen zu ermöglichen, wurde im Grunde nicht voll erreicht; es zeigte sich unerwarteterweise, dass die DNA-Bildzytometrie vor allem zum Gegenteil, nämlich zur Vorhersage günstiger Verläufe, geeignet ist.

Mit dem, was sich an unserem Kollektiv herausarbeiten ließ, gehen wir weit über die klinischen Aussagen der übrigen drei DNA-bildzytometrischen Arbeiten aus der neueren Literatur hinaus, auf welche in der Einleitung bereits allgemein kurz eingegangen worden war (Korabiowska et al. 2004, Pradhan et al. 2009, Verbruggen et al. 2009).

Dass die Arbeit von Korabiowska et al. (2004) methodische Einschränkungen hat, war bereits oben erwähnt worden. Inhaltlich gesehen wurden dort DNA-bildzytometrische Messungen an Schnitten von 68 Borderline-Tumoren des Ovars mit 42 *low-grade*-Karzinomen verglichen. Zielpunkt der Studie war die Überlegung, DNA-bildzytometrisch zur Abgrenzung beider Entitäten beizutragen. Grundsätzlich ist dieses insofern ein guter Ansatz, als die Diagnose eines Borderline-Tumors immer eine Ausschluss-Diagnose ist (vgl. Kurman et al. 2014): Es liegt ein bestimmtes morphologisches Bild vor, das dem eines *low-grade*-Karzinoms mit der Ausnahme gleicht, dass keine Invasion in das angrenzende Stroma gefunden wird. Gerade bei größeren Tumoren, die man nicht komplett untersuchen kann, ist nie auszuschließen, dass ein invasiver Tumoranteil trotz aller Bemühungen einmal nicht gefunden wird. Entsprechend wären ergänzende Kriterien, auf welche man sich bei der Diagnostik mit stützen könnte, prinzipiell sinnvoll. Die vorgelegten Interpretationen der DNA-Histogramme lassen erkennen, dass die Aneuploidierate in *low-grade*-Karzinomen (31/42, 73,8%) etwa doppelt so hoch war wie in Borderline-Tumoren (24/68, 35,3%), bezogen auf die Interpretation nach der Auer-Klassifikation (Auer et al. 1980), nach welcher DNA-Histogramme der Typen I und II als nicht-aneuploid und der Typen III und IV als aneuploid gelten. Ansonsten wurden lediglich Minimal- und Maximalwerte sowie Mediane und Mittelwerte ohne Streuungsmaße für verschiedene DNA-bildzytometrische Variablen präsentiert und zwischen beiden Tumorgruppen auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Diagnostische Schlüsse, beispielsweise durch die Entwicklung eines Algorithmus zur Stratifizierung der Fälle in zwei Gruppen, wurden aber nicht gezogen.

In der Studie von Pradhan et al. (2009) wurden 222 klassische Borderline-Tumoren untersucht, außerdem sieben mit mikropapillärem Wachstumsmuster und zehn mit Mikroinvasion. Verglichen wurden diese Gruppen von Borderline-Tumoren untereinander, darüber hinaus auch mit 62 Ovarialkarzinomen. Nur 14 der 222

klassischen Borderline-Tumoren wiesen eine aneuploide Stammlinie auf, was einem Anteil von lediglich 6,3% entsprach. Bei den Adenokarzinomen waren 34 der 62 Fälle aneuploid (54,8%). Auch die mittlere S-Phase-Fraktion, was im Wesentlichen von der Definition her mit der bei uns verwendeten Proliferationsrate übereinstimmt, unterschied sich mit 0,61% bzw. 5,35% deutlich. Die einzige ggfls. diagnostisch nutzbare Korrelation, die aus den Daten heraus angeboten wurde, war die Angabe eines statistisch signifikanten Unterschiedes in der S-Phase-Fraktion zwischen Borderline-Tumoren und *low-grade*-Karzinomen nach Varianzanalyse ($p < 0.001$); die graphischen Darstellungen (Abb. 25) lassen aber vermuten, dass sich die statistische Signifikanz nicht in eine diagnostische Aussage umsetzen lassen würde.

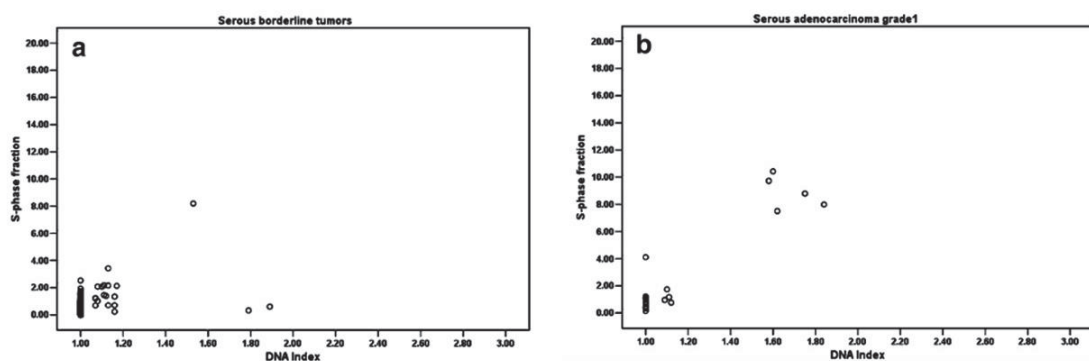


Abb. 25: Graphische Darstellung der S-Phase-Fraktion von Borderline-Tumoren des Ovars (links) im Vergleich zu *low-grade*-Karzinomen (rechts) (Pradhan et al. 2009). Beide Fallgruppen zeigen (y-Achse) ganz überwiegend Werte $< 2\%$; ein diagnostisch verwertbarer Unterschied ist trotz statistischer Signifikanz nicht anzunehmen.

Aus dem Jahr 2009 stammt auch die Arbeit von Verbruggen et al. mit 93 Fällen von Borderline-Tumoren. In ihr werden das Patientenalter, den Tumortyp und das Stadium bei Diagnosestellung sowie das Ausmaß der Stadienerhebung als Standardparameter mit einbezogen, ferner als Testvariable die Zahl der Mitosen im Tumor, den Anteil der Tumorzellen am Tumorumfang und die DNA-bildzytometrisch bestimmte Stammlinienploidie (diploid vs. aneuploid). Bei insgesamt nur neun Rezidiven (9,7%) innerhalb des Beobachtungszeitraumes von im Median ca. 4,5 Jahren fanden sich signifikante Unterschiede in der Rezidivquote nur zwischen serösen und muzinösen Tumoren (19,4% vs. 3,5%, $p = 0,0245$) bzw. zwischen dem Tumorstadium Ia und allen übrigen Stadien (3,5 vs. 20,6%, $p = 0.0044$). Von den 21

aneuploiden Fällen (22,6%) rezidierten drei (14,3%), von den 72 diploiden Fällen (77,3%) waren es sechs (8,3%) ($p > 0.05$).

Die einzige ältere, aber aufgrund ihrer Größe durchaus zu berücksichtigende Arbeit aus dem Jahr 1991 umfasste 80 Fälle von Borderline-Tumoren (Padberg et al. 1992), von denen elf in einem bis 46 Monate langen Beobachtungsintervall rezidierten. Die DNA-bildzytometrischen Messungen wurden an Feulgen-umgefärbten Routineschnitten vorgenommen, was ähnlich wie in der Studie von Korabiowska et al. (2004) eine methodische Einschränkung bedeutet. Ausgewertet wurden die Messungen mit der Auer-Klassifikation. Dabei zeigten lediglich 21 Fälle (26,25%) ein nicht-aneuploides DNA-Profil der Typen I und II, die übrigen 59 (73,75%) wiesen einen der beiden aneuploiden Typen III und IV auf. Alle 11 Rezidive waren aneuploid, nur eines von ihnen betraf einen Fall im Stadium Ia / Ib1 ($p < 0,05$). Eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve zum Rezidiv-freien Überleben ließ den deutlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen der Auer-Klassifikation deutlich werden ($p < 0,03$). Außer dem Tumorstadium spielten keine weiteren Variablen, darunter das Alter der Patientinnen und der Tumortyp, eine prognostische Rolle.

Vergleicht man diese vier Arbeiten mit unserer Studie, so fällt die Heterogenität der Ergebnisse deutlich auf. Dies gilt insbesondere für den Anteil an aneuploiden bzw. nicht-diploiden DNA-Messergebnissen, die 35,3% (Korabiowska et al. 2004), 6,3% (Pradhan et al. 2009), 22,6% (Verbruggen et al. 2009), 73,75% (Padberg et al. 1992) bzw. in unserem eigenen Patientengut 18,6% (inklusive zweier tetraploider Fälle) betrug. Es ist verständlich, dass diese Diskrepanz begründet werden muss, wobei als wahrscheinlichste Ursache eine Selektion der Fälle in Frage kommt. Leider geben die vier oben dargestellten Arbeiten keine Angaben dazu, ob es sich um aufeinander folgende Fälle handelte (was das Risiko der Selektion beschränken würde) oder ob sie nach anderen definierten Kriterien ausgewählt worden sind. Unser eigenes Patientengut fasst die Fälle zusammen, die am Schwerpunkt Cytopathologie in konsiliarischem Auftrag zuweisender Frauenkliniken bzw. Institute für Pathologie zu diagnostischen Zwecken gemessen worden sind. Das Motiv der Zuweiser ist dabei nicht bekannt gewesen. Da die DNA-Bildzytometrie trotz in Düsseldorf häufiger Verwendung insgesamt im Fach Pathologie eine diagnostische Randmethode geblieben ist, die nur in Sonderfällen angewandt wird, könnte man sich durchaus

vorstellen, dass auch nur spezielle Fälle von Borderline-Tumoren überwiesen worden sein könnten. Beispielsweise könnte es einer Frauenklinik sinnvoll erscheinen, Fälle von Patientinnen, die aus Gründen des Kinderwunsches nicht an beiden Ovarien operiert werden möchten, untersuchen zu lassen. Gleiches könnte gelten für Fälle von besonders großen Tumoren oder für solche, die seitens der Pathologie morphologische Aspekte zeigten, die von der üblichen Histologie der Borderline-Tumoren abwichen. Letztendlich bleiben diese Überlegungen aber spekulativ. Fest steht, dass die Heterogenität der Patientendaten, soweit aus den anderen Studien bezüglich Altersverteilung und Stadienverteilung ablesbar, eine zusammenfassende Aussage über die Eignung der Methode für die Krankenversorgung zum jetzigen Stand unmöglich macht.

Unseren kombinatorischen Ansatz aus DNA-Stammlinie und Proliferationsrate auf eine bessere Datenbasis zu stellen, könnte durch eine Untersuchung vieler weiterer Fälle, am besten aus einem Haus, gelingen. Tatsächlich haben sich am Schwerpunkt Cytopathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf in den letzten Jahren aus zwei Frauenkliniken so viele Fälle untersuchen lassen, dass im Nachgang der hier vorgelegten Studie eine Auswertung auf wesentlich breiterer Basis und auch an konsekutiven Fällen möglich sein wird.

Auf DNA-durchflußzytometrische Arbeiten soll nur kurz eingegangen werden. Herauszustellen ist hier, dass die einzige von der Fallzahl her relevante Studie mit Follow-Up, nämlich die oben bereits genannte von Kaern et al. (1993), zwar von einer hohen Relevanz der Methode in der Prognostik von Borderline-Tumoren des Ovars ausgeht. Allerdings starben im bis zu 15 Jahre dauernden Beobachtungszeitraum 29 von 31 Patientinnen mit Rezidiv, was den allgemeinen Erfahrungen widerspricht und vermuten lässt, dass es sich bei einer gehörigen Zahl dieser Fälle eben doch schon um manifeste Ovarialkarzinome gehandelt haben könnte. Dieses Datenproblem relativiert die Aussage der Studie doch gehörig.

4.3 Perspektivische Entwicklungen in der Beurteilung von Borderline-Tumoren des Ovars

In der Diagnostik und Prognostik von Borderline-Tumoren des Ovars fehlt es nicht nur an etablierten morphologischen Anwendungen, sondern es gibt auch

vergleichsweise wenige Erkenntnisse auf dem Gebiet der aktuellen molekularpathologischen Methoden.

Eine Frage, der möglicherweise perspektivischer Charakter zukommen könnte, ist, inwieweit sich Borderline-Tumoren als Teil eines inzwischen für Ovarialkarzinome entwickelten dualistischen Modells auffassen lassen bzw. als von diesem unabhängige Neubildungen zu erklären sind. Für die Entstehung von Ovarialkarzinomen stellt man sich heute nämlich modellhaft zwei verschiedene Wege vor, aus denen *low-grade*-Karzinome bzw. *high-grade*-Karzinomen hervorgehen sollen (Übersichten bei Ho et al. 2004, Shih und Kurman 2004 oder Kurman und Shih 2010):

- Die *low-grade*-Karzinome weisen dabei in gut 60% der Fälle Mutationen im K-ras-Gen bzw. im B-raf-Gen auf, die als frühe Ereignisse in der Karzinogenese gelten; auch für muzinöse *low-grade*-Karzinome wird die Quote von K-ras-mutierten Fällen mit immerhin > 50% angegeben. Ganz ähnliche Zahlen werden für die gutartigen serösen Zystadenome berichtet, und auch bei Borderline-Tumoren wurden vermehrt K-ras-Mutationen nachgewiesen, selbst in Rezidiven (Tsang et al. 2013). Insofern könnte man sich bei dieser Konstellation dann den Borderline-Tumor als morphologisches Kontinuum der Tumorprogression vorstellen und ihn als Teil einer Adenom-Borderline-Karzinom-Sequenz interpretieren.
- Dem gegenüber zeigen die serösen *high-grade*-Karzinome vor allem Mutationen im p53-Gen (> 80% der Fälle) und im CCNE1-Gen, während K-ras- und B-raf-Mutationen selten sind. Entsprechend würden *high-grade*-Karzinome dann als *de novo* entstanden aufgefasst. Ein Tumor mit Borderline-Histologie aus dieser Gruppe wäre dann, sofern die Theorie wirklich auf die Praxis übertragbar wäre, eine möglicherweise noch *in situ* befindliche Frühform eines aggressiven Karzinoms.

Bezogen auf die Borderline-Tumoren könnte man die Erkenntnisse der beiden Entstehungswege ggfls. dazu nutzen, Tumoren mit geringerem und höherem Rezidiv- bzw. Progressionspotential zu erkennen. Derzeit sind aber solche

Untersuchungen in der leitliniengerechten Routine-Krankenversorgung nicht empfohlen. In der aktuellen S3-Leitlinie wird lediglich dargelegt, „zukünftige translationale Forschungsansätze sollten (...) die Bedeutung tumorbiologischer Faktoren für die Prognose und Prädiktionsanalyse beim Ovarialkarzinom (weiter) untersuchen“. Aus dem Zitat lässt sich ableiten, dass derzeit von den Expertengremien keine kurz- oder mittelfristigen Wege gesehen werden, über molekulare Methoden zu neuen Behandlungsansätzen zu gelangen.

Molekulare Ansätze könnten ggfls. aber auch zur klareren Abgrenzung zwischen Borderline-Tumoren und bereits manifesten *low-grade*-Karzinomen herangezogen werden. In wie weit sie in der diagnostischen Unterscheidung der Tumoren sinnvoll sein könnten, wurde aktuell mit einem DNA-Microarray (Affymetrix Human Genome U133 plus2.0 Oligonucleotid-Array) an Frischmaterial erprobt (Curry et al. 2014), welcher als Gesamt-Genom-Array die Expression einer Vielzahl von genetischen Mustern und deren Korrelationen untereinander in einem gemeinsamen Ansatz untersucht. Dabei zeigte sich im Vergleich von 13 Borderline-Tumoren mit drei *low-grade*-Karzinomen und acht serösen Zystadenomen nach komplexer bioinformatischer Analyse, dass sich innerhalb der Borderline-Tumoren auf der Basis von Vergleichen im Expressionsmuster von 50 Genen zwei Gruppen von Tumoren abgrenzen ließen, nämlich einmal solche, die Ähnlichkeiten in ihrem genetischen Expressionsprofil zu den Zystadenomen zeigten (n = 7), und ferner eine Untergruppe, deren Profil dem der Karzinome ähnelte (n = 6) (Abb. 26).

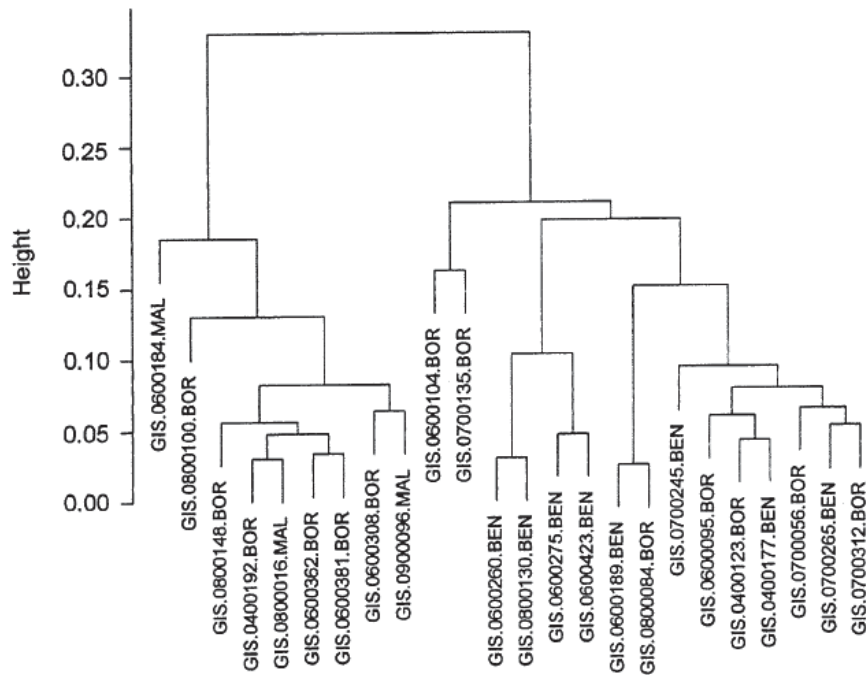


Abb. 26: Cluster-Dendrogramm nach hierarchischem Clustern von serösen Ovarialtumoren, basierend auf Korrelationen einer Genom-weiten Analyse von Gen-Expressionsprofilen. Sechs der 13 Borderline-Tumoren (*.BOR) zeigen Korrelationen mit Karzinomen (*.MAL), die übrigen sieben mit Zystadenomen (*.BEN) (Curry et al. 2014)

Die Ergebnisse ließen sich an einem Datensatz einer anderen, unabhängigen Studie (Tothill et al. 2008) weitgehend validieren. Mit fraglich für die Prognose von Borderline-Tumoren relevanten histopathologischen Kriterien waren die Resultate nicht durchgehend konsistent: Die Fälle mit mikropapillärem Wachstum fielen zwar in die Gruppe der Fälle mit Überschneidungen zu den Karzinomen. Das Auftreten von nicht-invasiven Implantaten kam hingegen in beiden Gruppen etwa gleich häufig vor, und mit dem Tumorstadium schienen die Ergebnisse nicht korreliert zu sein. Insgesamt lässt die Studie erwarten, dass sich Borderline-Tumoren vielleicht wirklich in eine Zystadenom-artige und in eine Karzinom-artige Subgruppe unterteilen lassen könnten. Hieraus könnten dann ggfls. klinische Konsequenzen gezogen werden, was Kontrollintervalle von Patientinnen nach der Operation betreffen könnte. Denkbar wäre auch, dass für den Fall, dass ein Borderline-Tumor Karzinom-nahe Eigenschaften aufwies, mehr Tumormaterial eingebettet würde, um noch sicherer ein manifestes Karzinom auszuschließen.

Letztendlich wird sich die Relevanz solcher Überlegungen aber daran entscheiden, wie sich konkrete Fälle im klinischen Verlauf verhalten. Würden sich entsprechende klinische Korrelationen ergeben, so wäre, eine Bezahlbarkeit der Methode in der Krankenversorgung vorausgesetzt, die Prädiktion des klinischen Verhaltens eines Borderline-Tumors an einem umschriebenen, extra zu diesem Zweck designten kleineren DNA-Microarray in nicht zu ferner Zukunft vorstellbar. Wünschenswert aus Sicht unserer Arbeitsgruppe wäre natürlich, an einem solchen Kollektiv nicht nur molekularpathologische Analysen zu betreiben, sondern auch eine DNA-Bildzytometrie durchzuführen und die Ergebnisse beider bzw. auch weiterer Ansätze zu vergleichen. Ganz allgemein wäre sinnvoll, häufiger Materialien von Studien mit mehreren konkurrierenden Methoden zu untersuchen, um unseren ärztlichen Auftrag, für die Patienten zu optimal nutzbaren Resultaten zu gelangen, verlässlicher erfüllen zu können. Insbesondere wären solche Parallelanwendungen auch an prospektiven Studienkollektiven empfehlenswert.

5 Zusammenfassung

Borderline-Tumoren des Ovars sind gemäß den Vorgaben der WHO als Tumoren mit geringem malignen Potential definiert, deren Histomorphologie nicht mehr einem gutartigen Tumor entspricht, aber aufgrund fehlenden Nachweises von Invasion noch kein manifestes Karzinom ist. Sie verfügen über eine sehr gute Prognose, können aber durchaus rezidivieren und dann auch im Einzelfall ungünstig verlaufen. Prognosefaktoren für Borderline-Tumoren beschränken sich bislang im Wesentlichen auf das Stadium, in welchem sie entdeckt werden, fraglich auf weitere morphologische Faktoren wie mikropapilläres Wachstum oder sogenannte Mikroinvasion.

In der vorliegenden Arbeit wurden 49 gut differenzierte Borderline-Tumoren des Ovars von 43 Patientinnen mit der am Schwerpunkt Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf etablierten Methode der DNA-Bildzytometrie untersucht. Das mittlere Alter der Patientinnen lag bei 45,4 +/- 15,1 (SD) Jahre. In 37 Fällen (86,0%) bestand eine einseitige Tumorbildung, sechs Patientinnen wiesen beidseitig einen Borderline-Tumor auf (14,0%). Die Tumoren waren im Mittel 10,9 +/- 11,4 (SD) cm groß. Vom histologischen Typ her überwogen die serösen Tumoren (23/43, 53,5%) deutlich gegenüber den muzinösen (17/43, 39,5%). Drei Tumoren waren als gemischt, also aus serösen und muzinösen Anteilen aufgebaut, diagnostiziert worden (7,0%). Die meisten Fälle befanden sich nach der TNM-Klassifikation im Stadium pT1a, waren also einseitig und hatten die Kapsel des Ovars nicht überschritten (26/43, 60,5%). Dreizehn Fälle entsprachen den Stadien pT1b bzw. pT1c (30,2%). In vier Fällen trat ein TNM-Stadium \geq pT2 auf (9,3%).

Die DNA-bildzytometrischen Messungen erfolgten an Feulgen-gefärbten zytologischen Ausstrichpräparaten, die aus Paraffinblöcken von repräsentativem Tumormaterial durch ein Zellvereinzelnungsverfahren gewonnen worden waren. Als Messapparatur wurde ein Auto-Cyte[®]QUIC-DNA-Meßsystem der Firma Roche verwendet. Nach Eichung an 30 Fibroblasten wurde der DNA-Gehalt von 300 Tumorzellen bestimmt. Als diagnostische Parameter wurden nach Vorgaben des ESACP-Konsensus die Lage der DNA-Stammlinie (diploid, tetraploid, aneuploid), die

Zahl von Zellen mit einem DNA-Gehalt über 9c (9cEE) sowie im Falle einer diploiden DNA-Stammlinie die Proliferationsrate herangezogen.

In 35 der 43 Fälle lagen diploide DNA-Stammlinien vor (= 81,4%). Zwei Fälle erwiesen sich als tetraploid (= 4,7%), sechs waren aneuploid (= 13,9%). Die sechs Fälle mit beidseitigem Befall wiesen in beiden Tumoren ein gleichartiges DNA-bildzytometrisches Muster auf; in vier Fällen waren beide diploid, in jeweils einem Fall tetraploid bzw. aneuploid. Zellen oberhalb von 9c (9cEE > 0) fanden sich nur in einem Fall mit einseitigem Tumor. Der Mittelwert der Proliferationsfraktion bei den 35 Fällen mit diploider DNA-Stammlinie betrug 5,0% +/- 3,6% (SD).

Im Beobachtungszeitraum, der im Mittel 5,8 +/- 1,1 (SD) Jahre umfasste, wurden ein Tumorrezidiv bzw. ein Tumorprogress bei neun Patientinnen beobachtet. Alter, Tumortyp und Tumorgröße zeigten mit dem klinischen Verlauf (günstig vs. ungünstig) keine statistisch signifikante Beziehung ($p > 0.05$), während das Tumorstadium (T1a vs. anderes Stadium) eine Signifikanz aufwies ($p = 0.0007$), ebenso die DNA-Stammlinie (diploid vs. nicht-diploid, $p = 0.0251$), die Proliferationsrate (\leq Median vs. $>$ Median, $p = 0.0085$) und eine Kombination beider ($p = 0.0065$). Eine kombinierte Auswertung von Tumorstadium und gemeinsamer Betrachtung von DNA-Stammlinie und Proliferationsrate erbrachte die höchste statistische Signifikanz ($p = 0.0001$) und erschien somit am besten für die Vorhersage des Verlaufes geeignet.

In der recht spärlichen wissenschaftlichen Literatur zur DNA-Bildzytometrie bei Borderline-Tumoren des Ovars wurden bisher einzelne Ansätze zur Abgrenzung zur Vorhersage des Verlaufes veröffentlicht. Die Rohdaten waren dabei nicht einheitlich, ebenso nicht die Interpretation der Ergebnisse. Allerdings war DNA-Aneuploidie jeweils mit höherer Rezidivrate verbunden, was aber nicht immer statistisch signifikant war. Insofern leistet unsere Studie, gerade auch aufgrund der Kombination zweier Parameter, einen neuen diagnostischen Ansatz. Eine Validierung der Ergebnisse an einer zweiten, möglichst aus konsekutiven Fällen aufgebauten Kohorte wäre vor einer allgemeinen Anwendung in der Krankenversorgung allerdings sinnvoll.

6 Literatur

1. ABKD („Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland“) (Hrsg.) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2004, S. 60ff.
2. Auer GU, Caspersson TO, Wallgren S: DNA content and survival in mammary carcinomas. *Anal Quant Cytol* 2: 161-165, 1980
3. Auffermann W, Böcking A: Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 7: 218-226, 1985
4. AWMF („Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften“) (Hrsg.): Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe „Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren“, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 032/035, Entwicklungsstufe 2k, gültig bis 1.1.2012. Online unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035_S2k_Diagnostik_und_Therapie_maligner_Ovarialtumoren_05-2007_12-2010.pdf mit Datum vom 30.11.2015
5. Biesterfeld S: Zurverfügungstellung urheberrechtlich geschützter Abbildungen aus dem Bestand des Schwerpunktes Cytopathologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 2014
6. Biesterfeld S, Deacu L: DNA image cytometry in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the bile duct, the pancreatic duct and the papilla of Vater. *Anticancer Res.* 29: 1579-1584, 2009
7. Biesterfeld S, Leitloff M, Rath W, Schröder W: DNA image cytometry in the differential diagnosis of endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 23: 123-128, 2001b
8. Biesterfeld S, Pennings K, Grußendorf-Conen EI, Böcking A: Aneuploidy in actinic keratosis and Bowen's disease - increased risk for invasive squamous cell carcinoma? *Brit J Dermatol* 133: 557-560, 1995
9. Biesterfeld S, Pomjanski N, Schramm M: Adjuvante Methoden in der diagnostischen Zytopathologie. *Verh Dtsch Ges Zyt* 2013; 28: 8-16
10. Biesterfeld S, Reus K, Bayer-Pietsch E, Mihalcea AM, Böcking A: DNA image cytometry in the differential diagnosis of the endocervical adenocarcinoma. *Cancer (Cytopathology)* 93: 160-164, 2001a
11. du Bois A, Ewald-Riegler N, du Bois O, Harter P: Borderline tumors of the ovary - a systematic review. *Geburtsh Frauenheilk* 69: 807-833, 2009

12. du Bois A, Ewald-Riegler N, de Gregorio N, Reuss A, Mahner S, Fotopoulou C, Kommos F, Schmalfeldt B, Hilpert F, Fehm T, Burges A, Meier W, Hillemanns P, Hanker L, Hasenburg A, Strauss HG, Hellriegel M, Wimberger P, Keyver-Paik MD, Baumann K, Canzler U, Wollschlaeger K, Forner D, Pfisterer K, Schröder W, Münstedt K, Richter B, Kommos S, Hauptmann S: Borderline tumours of the ovary: A cohort study of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) Study Group. *Eur J Cancer* 49: 1905-1914, 2013
13. Böhm N: Einfluss der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28 °C. *Histochemie* 14: 201-211, 1968
14. Böhm N, Sandritter W: DNA in human tumors: A cytophotometric study. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975
15. Böhm N, Seibert HU: Zur Bestimmung der Parameter der Bateman-Funktion bei der Auswertung von Feulgen-Hydrolysekurven. *Histochemie* 6: 260-266, 1966
16. Chatelain R, Schunck T, Schindler E, Schindler A, Böcking A: Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasias of the uterine cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med* 34: 505-510, 1989a
17. Chatelain R, Willms A, Biesterfeld S, Auffermann W, Böcking A: Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine. *Anal Quant Cytol Histol* 11: 211-217, 1989b
18. Crissman JD, Zarbo RJ: Quantitation of DNA ploidy in squamous intraepithelial neoplasia of the laryngeal glottis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 182-188, 1991
19. Curry EWJ, Stronach EA, Rama NR, Wang YYP, Gabra H, El-Bahrawy MA: Molecular subtypes of serous borderline ovarian tumor show distinct expression patterns of benign tumor and malignant tumor-associated signatures. *Mod Pathol* 27: 433-442, 2014
20. Darai E, Walker-Combrouze F, Dauge-Geoffroy MC; Vincent Y, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY: Ki67 expression in 35 borderline ovarian tumours: relations with clinicopathologic parameters and ploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 76: 175-180, 1998
21. Delgado R, Mikuz G, Hofstädter F: DNA-Feulgen-cytophotometric analysis of single cells isolated from paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract* 179: 92-94, 1984
22. Demirel D, Laucirica R, Fishman A, Owens RG, Grey MM, Kaplan AL, Ramzy I: Ovarian tumors of low malignant potential. Correlation of DNA index and S-phase fraction with histopathologic grade and clinical outcome. *Cancer* 77: 1494-1500, 1996

23. Dettmar P, Anthuber S, Avril S, Höß C, Mayr D, Kern C, Schmalfeldt B, Schmöckel E: Borderline-Tumoren. in: Tumorzentrum München (Hrsg.) und Schmalfeldt B (Hrsg.): Manual „Maligne Ovarialtumoren“. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 10. Auflage 2014, S. 80-84
24. Dietel M, Arps H, Rohlf A, Bodecker R, Niendorf A: Nuclear DNA content of borderline tumors of the ovary, correlation with histology and significance for prognosis. *Virchows Arch* 409: 829-836, 1986
25. Drescher CW, Flint A, Hopkins MP, Roberts JA: Prognostic significance of DNA content and nuclear morphology in borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 48: 242-246, 1993
26. Engel J, Schlesinger-Raab A, Schubert-Fritschle G, Schmalfeldt B: Epidemiologie. in: Tumorzentrum München (Hrsg.) und Schmalfeldt B (Hrsg.): Manual „Maligne Ovarialtumoren“. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 9. Auflage 2010, S. 1-10
27. Erhardt K, Auer G, Björkholm E: Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors. *Cancer Research*, 44: 2198-2202, 1984
28. Evans AS, Monaghan JM, Anderson MC: A nuclear deoxyribonucleic acid analysis of normal and abnormal vulvar epithelium. *Obstet Gynecol* 69: 790-793, 1987
29. Feulgen R, Rossenbeck H: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende Elektiv-Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z Physiol Chem* 135: 203-248, 1924
30. Fležar MS, But I, Kavalar R, Us-Krasovec M: Flow and image cytometric DNA ploidy, including 5c exceeding cells, of serous borderline malignant ovarian tumors. Correlation with clinicopathologic characteristics. *Anal Quant Cytol Histol* 25:139-145, 2003
31. Friedlander ML, Russel P, Taylor IW, Hedley DW, Tattersall MHN: Flow cytometric analysis of cellular DNA-content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumors of borderline malignancy. *Pathology* 16: 301-306, 1984
32. Fu YS, Ro J, Reagan JW, Hall TL, Berek J: Nuclear deoxyribonucleic acid heterogeneity of ovarian borderline malignant serous tumors. *Obstet Gynecol* 67: 478-482, 1986
33. Girmes G: Stellenwert der DNA-Bildzytometrie in der Differentialdiagnostik leiomyogener Tumoren. Med. Diss., Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2009
34. Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *Anal Cell Pathol* 1998; 17: 201-208

35. Graumann W: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. Z Wiss Mikrosk 61: 225-226, 1953
36. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A: 1997 ESACP consensus report on diagnostic image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. Anal Cellul Pathol 17: 189-200, 1998
37. Ho CL, Kurman RJ, Dehari Rm Wang TL, Shih I: Mutations in BRAF and KRAS precede the development of ovarian serous borderline tumors. Cancer Res 64: 6915-6918, 2004
38. Jones S, Wang TL, Kurman RJ, Nakayama K, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW, Papadopoulos N, Shih I: Low-grade serous carcinoma of the ovary contain very few point mutations. J Pathol 226: 413-420, 2012
39. Kaern J, Tropé CG, Kristensen GB, Abeler VM, Pettersen EO: DNA ploidy; the most important prognostic factor in patients with borderline tumors of the ovary. Int J Gynecol Cancer 3: 349-358, 1993
40. Klemi P, Joensuu H, Kilholma P, Mäenpää J: Clinical significance of abnormal nuclear DNA content in serous ovarian tumors. Cancer 62: 2005-2010, 1988
41. Korabiowska M, Brinck U, Skubis J, Sattler B, Fischer G: Application of new ploidy-related parameters for the diagnosis of ovarian tumours. Anticancer Res 24: 4191-4194, 2004
42. Krishnamurthy S, Katz RL, Shumate A, Strohle K, Khanna A, Tucker SL, Rajman I, Lahoti S: DNA image analysis combined with routine cytology improves diagnostic sensitivity of common bile duct brushing. Cancer 93: 229-235, 2001
43. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH: WHO classification of tumours of the female reproductive organs. 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 2014
44. Kurman RJ, Shih IM: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am J Surg Pathol 34: 433-443, 2010
45. Lai CH, Hsueh S, Chang TC, Tseng CJ, Huang KG, Chou HH, Chen SM: The role of DNA flow cytometry in borderline malignant ovarian tumors. American Cancer Society 78: 794-802, 1996
46. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, Abrufdatum: 26. August 2015
47. Lodhi S, Najam S, Pervez S: DNA ploidy analysis of borderline epithelial ovarian tumours. J Pak Med Assoc 50: 349-351, 2000
48. Nasiell K, Auer G, Nasiell M, Zetterberg A: Retrospective DNA analysis in

- cervical dysplasias as related to neoplastic progression or regression. *Anal Quant Cytol* 1: 103-106, 1979
49. Olinici CD, Caluser I. DNA nuclear content in borderline ovarian tumors. *Morphol Embryol* 24: 49-52, 1988
 50. Osterheld MC, Andrejevic Blant S, Caron L, Braunschweig R, Dorta G, Bouzourene H, Mihaescu A: Digital image DNA cytometry: a useful tool for the evaluation of malignancy in biliary strictures. *Cell Oncol* 27: 255-260, 2005
 51. Padberg BC, Arps H, Franke U, Thiedemann C, Rehpenning W, Stegner HE, Lietz H, Schröder S, Dietel M: DNA cytophotometry and prognosis in ovarian tumors of borderline malignancy. A clinicomorphologic study of 80 cases. *Cancer* 69: 2510-2514, 1992
 52. Pradhan M, Davidson B, Tropé C, Danielsen H, Abeler V, Risberg B: Gross genomic alterations differ between serous borderline tumors and serous adenocarcinomas - an image cytometric DNA ploidy analysis of 307 cases with histogenetic implications. *Virchows Arch* 454: 677-683, 2009
 53. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): *Krebs in Deutschland 2009-2010*. 9. Ausgabe, Berlin, 2013
 54. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2007-2008. Häufigkeiten und Trends*. 8. Ausgabe, Berlin, 2012
 55. Rottmann M, Dorn J, Schubert-Fritschle G, Engel J: Epidemiologie. in: Tumorzentrum München (Hrsg.) und Schmalfeldt B (Hrsg.): *Manual „Maligne Ovarialtumoren“*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 10. Auflage 2014, S. 1-10
 56. Schulte E: Standardization on the Feulgen reaction for absorption. DNA image cytometry: A review. *Analyt Cell Pathol* 3: 167-182, 1991
 57. Schulte EK, Joos U, Kasper M, Eckert HM: Cytological detection of epithelial dysplasia in the oral mucosa using Feulgen-DNA-image cytometry. *Diagn Cytopathol* 7: 436-441, 1991
 58. Schulte E, Wittekind D: Standardization of the Feulgen reaction: The influence of chromatin condensations on the kinetics of acid hydrolysis. *Analyt Cell Pathol* 2: 149-157, 1990
 59. Scully RE: Histological typing of ovarian tumours. In: World Health Organization (Hrsg.): *International histological classification of tumours*, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1999
 60. Seidel A, Sandritter W: Cytophotometric measurements of the DNA content of a pulmonary adenoma and of a malignant pulmonary adenomatosis. *Z Krebsforsch.* 65: 555-559, 1963

61. Seidman JD, Norris HJ, Griffin JL, Hitchcock CL: DNA flow cytometric analysis of serous ovarian tumors of low malignant potential. *Cancer* 71: 3947-3951, 1993
62. Shih IM, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 164: 1511-1518, 2004
63. Singer G, Oldt R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman R, Shih I: Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 484-486, 2003
64. Tan LK, Flynn SD, Carangiu ML: Ovarian serous borderline tumors with lymph node involvement. Clinicopathologic and DNA content study of seven cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 18: 904-912, 1994
65. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, Traficante N, Fereday S, Hung JA, Chiew YE, Haviv I; Australian Ovarian Cancer Study Group, Gertig D, de Fazio A, Bowtell DD: Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 14: 5198-5208, 2008
66. Tsang YT, Deavers MT, Sun CC, Kwan SY, Kuo E, Malpica A, Mok SC, Gershenson DM, Wong KK: KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumor are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *J Pathol* 231: 449-456, 2013
67. Verbruggen, MB, van Diest PJ, Baak JP, Broeckaert MAM, Kenemans P, Verheijen RHM: The prognostic and clinical value of morphometry and DNA cytometry in borderline ovarian tumors: A prospective study. *Int J Gynecol Pathol* 28: 35-40, 2008
68. Weiss RR, Richart RM, Okagaki T. DNA content of mucinous tumors of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 107: 409-424, 1969
69. Wittekind C, Meyer HJ: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 2010

DNA-Bildzytometrie als prognostischer Marker in der Beurteilung von Borderlinetumoren des Ovars

Unter den Tumoren des weiblichen Genitalsystems machen Tumoren des Ovars mit ihren Subtypen einen nicht zu unterschätzenden Anteil aus. Borderline-Tumoren des Ovars, als Sonderform ovarialer Tumoren, gelten gemäß WHO-Definition als Tumoren mit nur geringem malignen Potential und einem histologischen Bild, das eher einer benignen als einer malignen Genese entspricht. Prognostisch relevante Parameter für Überleben und Rezidivwahrscheinlichkeit konnten, abgesehen vom histologischen Stadium, nicht identifiziert werden.

Die vorliegende Studie untersucht retrospektiv an insgesamt 43 Patientinnen mit 49 gut differenzierten Borderlinetumoren des Ovars die prädiktive Relevanz der DNA-Bildzytometrie. Das mittlere Alter der Patientinnen lag bei 45,4 +/- 15,1 (SD) Jahren, in 37 Fällen (86,0%) lag ein einseitiger Tumorbefall vor, sechs Patientinnen hatten beidseitig einen Borderline-Tumor (14,0%). Die Tumorgöße lag im Mittel bei 10,9 +/- 11,4 (SD) cm und vom histologischen Subtyp zeigten sich deutlich mehr seröse (24/43 53,5%), als muzinöse (17/43 39,5%) Tumoren. In drei Fällen (7%) zeigte sich ein histologisch gemischtes Bild aus serösen und muzinösen Anteilen. In 60,5% der Fälle (26/43) lag ein Tumorstadium pT1a vor. In 30,2% (13/43) zeigten sich die Stadien pT1b bzw. pT1c. Lediglich in 9,3% (4/43) trat ein ausgedehnteres Tumorstadium ab pT2 auf.

DNA-bildzytometrisch wurde, nach Zellvereinzellung und automatisierter Feulgenfärbung, mit Hilfe eines Auto-Cyte®-Meßsystems der Firma Roche der DNA-Gehalt von jeweils 300 Tumorzellen bestimmt. Als Eichpopulation dienten 30 Fibroblastenkerne des jeweiligen Präparats. Die Beurteilung erfolgte gemäß ESACP-Konsensus. Bewertet wurde die Lage der Stammlinie (diploid, tetraploid, aneuploid), die Zahl von Zellen mit einem DNA-Gehalt über 9c (9cEE), sowie bei diploider Stammlinie die Proliferationsrate.

Die Stammlinie war in 81,4% (35/43) diploid, zwei Fälle (4,7%) wurden als tetraploid und sechs (13,9%) als aneuploid eingeschätzt. Die Fälle mit beidseitigem Befall wiesen in jedem Tumor ein gleichartiges Bild auf. Vier waren beidseits diploid, jeweils in einem Fall beidseits tetraploid und einmalig aneuploid. 9cEE fanden sich in einem Fall mit einseitigem Tumor. Der Mittelwert der Proliferationsfraktion der diploiden Tumoren betrug 5,0% +/- 3,6 (SD) %.

Neun Patientinnen zeigten im Beobachtungszeitraum, der im Mittel bei 5,8 +/- 1,1 (SD) Jahren lag, ein Tumorrezidiv bzw. einen Progress. Statistisch signifikante Differenzen bezüglich Alter, Tumortyp oder Tumorgöße zeigten sich korreliert zum klinischen Verlauf nicht. Allerdings zeigten sich das Tumorstadium (pT1a vs. höheres Stadium, p=0,0007), die Stammlinie (diploid vs. nicht diploid, p=0,0251), die Proliferationsrate (<Median vs. >Median, p=0,0085) und eine Kombination beider (p=0,0065) als statistisch signifikante Prädiktoren des klinischen Verlaufs. Die höchste statistische Signifikanz (p=0,0001) zeigte eine Beurteilung von Tumorstadium und gemeinsamer Betrachtung von Stammlinie und Proliferationsrate. Somit erscheint diese Kombination als Prädiktor am besten geeignet.

Bisherige Arbeiten, die versuchten einen Zusammenhang zwischen Befunden der DNA-Bildzytometrie und dem klinischen Verlauf bei Borderline-Tumoren des Ovars nachzuweisen, zeigten ein nicht einheitliches Bild, auf das in der Diskussion ausgiebig eingegangen wird. DNA-Aneuploidie im Allgemeinen war allerdings häufig als relevanter Marker eines ungünstigen Verlaufs zu differenzieren.

Die vorliegende Studie bietet einen weitergehenden Ansatz, insbesondere durch die Empfehlung der Kombination mehrerer Parameter unter Einbeziehung des Tumorstadiums. Eine Validierung der Ergebnisse in größer angelegten Studien sollte allerdings vor einer Anwendung im klinischen Alltag erfolgen, gerade weil nur relativ wenige Fälle zur Verfügung standen.

Fragebogen für die Verfolgung des klinischen Follow-up's bei Patientinnen mit
Borderline-Tumoren des Ovars

Nr.:

Lokalisation: links rechts beidseitig

Befund des Tumors nach DNA-Bildzytometrie:

Stammlinien: _____ aneuploid: ja nein

Histologisch Malignitätskriterien: ja nein

1. Angaben zur Probeentnahme und operativem Eingriff:

- Feinnadelbiopsie
- Ovarioektomie
- Keilexision

2. Tumorstadien nach pTNM und histologischem Typ:

- histologischer Typ:
 - serös
 - mukös
 - endometrioid
 - seromukös
- pTNM:
 - pT
 - pN
 - M
- Differenzierungsgrad:
 - G

3. Weitere Therapie:

- Cytostatika
 - PC-Schema PP-Schema sonstiges⁴
- Radiatio
 - Gy-Dosis perkutan sonstiges⁵

4. Ergebnisse von Nachuntersuchungen:

- Zahl der Nachuntersuchungen
- Monate seit Diagnosestellung
- Rezidiv des Ovars ipsilateral kontralateral
- Rezidiv an umgebenden Strukturen _____⁶
- Rezidiv von Lymphknoten
- Fernmetastasen bei M0 im ursprünglichen Staging
- weitere Fernmetastasen bei höherem M
- Patientin verstorben: an Rezidiven des Borderline-Tumors
 aus anderen Gründen

⁴ Andere Schemata. Applikation und Dosierungen auf der Rückseite näher zu charakterisieren.

⁵ z.B. Bradytherapie o.ä., auf der Rückseite des Fragebogens näher zu charakterisieren.

⁶ Genauere Bezeichnung des befallenen Organs

Danksagung

Den Professoren Böcking und Biesterfeld danke ich für die Abtretung des Themas und insbesondere Professor Biesterfeld für die Betreuung bei Abschluss der Arbeit auch von Koblenz aus.

Frau Dr. Pomjanski hat mich in die Methode der DNA-Bildzytometrie eingewiesen, auch ihr danke ich, ebenso wie Frau Schumann, die mich beim Versand der Fragebögen unterstützt und den Rücklauf der Fragebögen ins Institut für Cytopathologie koordiniert hat.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung in der Zeit des anspruchsvollen und häufig auch anstrengenden Studiums und der anschließenden Facharztausbildung und natürlich auch für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Insbesondere meiner Mutter Ulla, meiner Schwester Franziska und Rainer, dem Lebensgefährten meiner Mutter, die die Arbeit Korrektur gelesen haben. Besonderer Dank gilt auch meiner Patentante Gerda und ihrem Ehemann Herbert für ihre moralische Unterstützung und das intensive Insistieren das Promotionsvorhaben weiterzuverfolgen.

Zuletzt danke ich meiner Frau Britta, die mich durch die letzte Zeit der Promotion begleitet hat und die Arbeit ebenfalls Korrektur gelesen hat, und meiner Tochter Greta, die mich in den letzten Monaten häufig beruflich und auch im Rahmen des Abschlusses dieser Arbeit entbehren musste. Danke euch, ihr macht mich erst vollständig.

Lebenslauf

Name: Michael Fleischer

Geboren: 16.04.1982 in Bottrop

Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung:

Grundschule: August 1988 – 15.07.1992 Konradschule, Fernewaldstr. 280, 46242 Bottrop

Gymnasium: September 1992 – 30.06.2001 Josef-Albers-Gymnasium, Zeppelinstr. 20, 46238 Bottrop, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,8)

Zivildienst: 01.07.2001 – 30.04.2002 Aufnahme der Kinderklinik des Marienhospitals Bottrop, Josef-Albers-Straße 70, 46236 Bottrop.

Berufliche Ausbildung:

Universität: 01.10.2002 – 25.11.2008 Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Abschluss mit dem Staatsexamen (Gesamtnote 1,88)

Praktisches Jahr (25.08.2007- 25.07.2008):

1. Tertiär Innere Medizin, Lukaskrankenhaus Neuss, Preussenstr. 84, 41464 Neuss (Chefärzte Prof. Dr. med. M. Haude/Prof. Dr. med. T. Heintges)

2. Tertiär Klinik für Kinder und Jugendliche, Lukaskrankenhaus Neuss (Chefarzt Prof. Dr. med. P.G. Kühl)

3. Tertiär Chirurgische Klinik des Kantonsspitals Aarau, Tellstr. 7, CH-5001 Aarau (Chefärzte Prof. Dr. med. R. Schlumpf/Dr. med. N. Renner)

Approbation als Arzt: 27.11.2008

Facharztausbildung: 01.01.2009 - 31.12.2013 Klinik für Kinder und Jugendliche, Lukaskrankenhaus Neuss, Preussenstr. 84, 41464 Neuss (Chefärzte Prof. Dr. med. P.G. Kühl (bis 06/2012)/PD Dr. med. G. Engelmann (seit 07/2012))

Facharzt für Kinder und Jugendmedizin: 27.03.2014

Schwerpunktweiterbildung:

01.01.2014 – 31.03.2015 Klinik für Kinder und Jugendliche, Lukaskrankenhaus Neuss, Preussenstr. 84, 41464 Neuss (Weiterbildungsbefugter OA R. Wentzell)

Ab 01.04.2015 Kliniken der Stadt Köln, Kinderkrankenhaus Amsterdamer Strasse, Fachbereich Neonatologie und Intensivmedizin, Amsterdamer Str. 59, 50735 Köln (Leitender Arzt Dr. med. M. Hoppenz)

Seit 01.04.2016: Oberarzt in der Neonatologie am Klinikum Lippe Detmold, Röntgenstrasse 18, 32756 Detmold (Chefarzt Prof. Dr. med. T. Brune)

Sonstiges:

Mitarbeit im Adipositas-Interventionsprogramm kinetiKIDS: Januar 2010 – Januar 2013 als Trainer und in der Qualitätssicherung (APV)

EPLS-Provider-Kurs: 11.03.2010 - 13.03.2010 Dresden

Kurs praktische Echokardiographie: 15.07.2011 – 16.07.2011, Abteilung für Kinderkardiologie der Universität Bonn

Qualifikation Neugeborenen-Notarzt der GNPI: 18.07.2012

Qualifikation zur genetischen Beratung gem. §7 Abs. 1,3

Gendiagnostikgesetz: 13.05.2014

Leitung und Betreuung klinikinterner Reanimations- und Notfallschulungen:

Juni 2011 bis März 2015.

Vortragstätigkeit: Über die gesamte Weiterbildungszeit im Rahmen interner Fortbildungen, überregionaler Workshops und Fortbildungen im Rettungsdienst.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Poster: B. Mönchmeier, P.G. Kühl, M. Fleischer, G. Engelmann, J. Weise-Bell; „kinetiKIDS“ Ergebnisse eines Interventionsprogrammes für übergewichtige Kinder; im Rahmen der Posterausstellung der DGKJ-Jahrestagung in Düsseldorf 2013

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.