

A. Böcking¹ · S. Biesterfeld² · J. Dietz³ · G. Haroske⁴ · J. Kriegsmann⁵ · H. Motherby⁶ · S. Falk⁶¹ Institut für Pathologie, Krankenhaus Düren, Düren, Deutschland² Pathologie Koblenz, Koblenz, Deutschland³ Landesverband Baden-Württemberg im Bundesverband Prostatakrebs Selbsthilfe, Baden-Württemberg, Deutschland⁴ Institut für Pathologie „Georg Schmorl“, Städtisches Klinikum Dresden, Dresden, Deutschland⁵ Medizinisches Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier, Deutschland⁶ Gemeinschaftspraxis für Pathologie, Frankfurt, Deutschland

Objektive DNA-Malignitätsgradierung als Ergänzung zum histologischen Gleason-Score

Frankfurter Konsens

Eine standardisierte, objektive DNA-Malignitätsgradierung an Tumorge-webe in Prostatastanziopsien kann das Gleason-Scoring bei Erfüllung der Eingangskriterien zur Indikationsstellung einer aktiven Überwachungsstrategie („active surveillance“) lokal begrenzter Prostatakarzinome ergänzen.

Unter der Schirmherrschaft der „Akademie für Fortbildung in der Morphologie“ fand am 08.11.2014 in Frankfurt a. M. eine Fortbildungsveranstaltung „Prognostische DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom“ statt. Unter der wissenschaftlichen Leitung von A. Böcking, Düren, S. Falk und H. Motherby, Frankfurt, trug J. Dietz, stellvertretender Vorsitzender des Landesverbandes Prostatakrebs Selbsthilfe Baden-Württemberg im Bundesverband Prostatakrebs Selbsthilfe (BPS) zur „Aktiven Überwachung von lokal begrenzten Karzinomen der Prostata laut S3-Leitlinie“ vor (interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 2.2-2, 2014).

Frau V. Goda aus Düren erläuterte technische Details der „Enzymatischen Zellvereinzelung und der Feulgen-Färbung“. G. Haroske aus Dresden referierte

über die „ESACP-Standards für eine diagnostische/prognostische DNA-Bildzytometrie“ (ESACP European Society for Analytical Cellular Pathology).

A. Böcking erläuterte „Zytogenetische Grundlagen und Ergebnisse der prognostischen DNA-Zytometrie des Prostatakarzinoms“ und „Daten aus der Weltliteratur“ laut der unten genannten systematischen Literaturrecherche [3]. Außerdem trug er Vorschläge für eine „Standardisierte Befundung prognostischer DNA-Zytometrie von Prostatakarzinomen“ vor. S. Biesterfeld aus Düsseldorf berichtete über eine „Prospektive Kohortenstudie zur Validierung der prognostischen DNA-Zytometrie bei Patienten mit Prostatakarzinom unter aktiver Überwachung“. J. Kriegsmann erläuterte schließlich „Aspekte der Abrechnung der DNA-Karyometrie“.

Nach Abschluss der sich anschließenden ausführlichen, strukturierten und teilweise kontroversen Diskussion wurde unter den 22 teilnehmenden Pathologen einstimmig ein Konsens über die nachfolgend präsentierten 3 Dokumente erzielt.

Technik der standardisierten prognostischen DNA-Karyometrie beim Prostatakarzinom

1. Indikation
Objektive Malignitätsgradierung des Prostatakarzinoms in Ergänzung zum histologischen Gleason-Score ≤ 6 und 7.
2. Untersuchungsmaterialien
 - a. Stanzbiopsien oder transurethrales Resektionsmaterial mit einem Adenokarzinom der Prostata für eine topographisch-histologisch gesteuerte enzymatische Zellvereinzelung (zwecks Isolierung intakter Zellkerne);
 - b. Ausstriche von Feinnadelaspirationsbiopsien mit Tumorzellen;
 - c. Schnittpräparate ohne die Möglichkeit der Zellvereinzelung sind nicht analysierbar;
 - d. zu neuroendokrinen oder anderen Sonderformen des Prostatakarzinoms existieren keine gesicherten Daten; diese Tumoren können derzeit hinsichtlich ihrer Prognose DNA-karyometrisch nicht mit der erforderlichen Sicherheit interpretiert werden;
 - e. Alle tumorhaltigen Zell- oder Gewebeproben sollten samt Beleg-

- schnitten vorliegen, wenn möglich mit einer Kopie des Vorbefundes;
- f. das Poolen von Gewebeproben ist statthaft, ggf. Angabe der Probenzahl und Gewebefläche.
- 3. Färbung
 - a. Nachfixation mit Formalin;
 - b. nach R. Feulgen mit Pararosanilin oder Thionin.
- 4. Interne Kalibration
 - a. Mit normalen prostatichen Epithelzellen oder Lymphozyten auf demselben Objektträger;
 - b. mit auf demselben Objektträger vorhandenen externen oder internen Fibroblasten oder Lymphozyten;
 - c. $n \geq 30$.
- 5. Messpräzision
 - a. Variationskoeffizient der Referenzzellen $< 5\%$;
 - b. Korrelationskoeffizient der Referenzzellen (Fläche vs. DNA) $r < 0,4$.
- 6. Analysezellen
 $n > 300$.
- 7. Prognostische Interpretation
 - a. Nach Haroske et al. [10] in (Abb. 1):
 - peridiploid (DNA-Malignitätsgrad 1),
 - peritetraploid (DNA-Malignitätsgrad 2),
 - x-ploid (DNA-Malignitätsgrad 3) und
 - multiploid (DNA-Malignitätsgrad 4);
 - b. Bestimmung der Proliferationsfraktion nur bei DNA-Grad 1;
 - c. Benennung des Gesamtumors nach dem höchsten Malignitätsgrad.
- 8. Dokumentation
 - a. Art des Untersuchungsmaterials;
 - b. Gegebenenfalls Zahl gepoolter Proben;
 - c. DNA-Histogramm mit Angabe von Zahl und Typ der Referenzzellen.
- 9. Wissenschaftliche Grundlagen der Methode
Vier Consensus-Reports on Diagnostic DNA-Image-Cytometry der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP):
 - Böcking et al. [4],
 - Haroske et al. [9],
 - Giroud et al. [8],

- Haroske et al. [10],
Systematischer Review der Literatur: Böcking et al. [6]. Letter to the editor von Molecular Cytogenetics: Böcking [2].
- 10. Benennung der Methode
Kommen für eine automatische Auswahl und Bewertung der für eine diagnostische/prognostische Analyse relevanten Zellkerne neben der Bestimmung von deren DNA-Gehalt digitale Klassifikatoren zum Einsatz, empfiehlt sich die Benennung der Methode als „DNA-Karyometrie“.

Standardisierte Befunderstellung in der prognostischen DNA-Karyometrie des Prostatakarzinoms

DNA-Karyometrie-Befund

1. Patient: Name, Vorname, Geburtsdatum
2. Befundendes Institut
3. Eingangsnummer (eigen, ggf. fremd)
4. Morphologische Diagnose (ggf. eigen und fremd)
5. Zur prognostischen DNA-Karyometrie eingesandtes/verwendetes Untersuchungsmaterial (z. B. gefärbte Ausstriche von Feinnadelaspirationsbiopsien, Paraffinblöcke mit Stanzen, Gewebe von transurethralen Resektionen (TUR), radikale Prostatektomien, zugehörige Schnitte)
6. Ggf. histologisch-topographische Bestimmung(en) und Identifizierung(en) der zu untersuchenden Gewebestruktur(en) an morphologischem Untersuchungsgut mit enzymatischer Zellvereinzelnung von Karzinomgewebe zur DNA-Karyometrie
7. Ggf. Poolen mehrerer Karzinomherde mit Größenangaben
8. Färbung nach Feulgen mit Pararosanilin/Thionin
9. Interne Kalibration/Referenzzellen (Art, Zahl, Variationskoeffizient)
10. Analysezellen (Art, Zahl)

11. DNA-Histogramm (DNA-Gehalt vs. Anzahl)
12. Ggf. exemplarische Bilder von Referenz- und Analysezellen
13. Zahl und Lage von DNA-Stammlinien (Modalwerte)
14. Ggf. Proliferationsfraktion bei solitärer Stammlinie
15. Ggf. standardisierte Indizes der DNA-Verteilung (z. B. „rare events“)
16. Ggf. kernmorphometrische Parameter
17. Datum, Unterschrift(en)

Zusammenfassendes Gutachten

18. Art des Untersuchungsmaterials
19. Prognostische Interpretation des Histogramms mit Referenz [11]
20. Anlagen (z. B. DNA-Zytometrie-Bericht, Histogrammtabelle zur prognostischen Interpretation, Publikationen, Blöcke und Schnitte ggf. zurück)

Textvorschläge zur klinisch relevanten prognostischen Interpretation von DNA-Karyometrie-Befunden an Erst- und Folgebiopsien von Prostatakarzinomen

- DNA-Malignitätsgrad 1 (peridiploid)
 - Bei Vorliegen der Eingangskriterien für eine aktive Überwachung/„active surveillance“ von Prostatakarzinomen laut S3-Leitlinie bekräftigt dieser prognostisch sehr günstige DNA-karyometrische Befund die Indikation zu dieser Strategie mit kurativer Option.
 - Wir empfehlen, die DNA-Karyometrie bei den Folgebiopsien im Rahmen der aktiven Überwachung/„active surveillance“ einzusetzen, um ggf. eine zytogenetisch Progression objektiv zu erfassen.
- DNA-Malignitätsgrad 2 (peritetraploid)
 - Bei Vorliegen der Eingangskriterien für eine aktive Überwachung/„active surveillance“ von Prostatakarzinomen laut S3-Leitlinie kann dieser prognostisch überwiegend gute DNA-karyometrische Befund bei bestimmten Patienten die Indikation zu dieser Strategie mit kurativer

| Typische DNA-Histogramme | Diagnose DNA-Grad vs. Gleason-Score | Prognose und Therapie |
|---|--|--|
| <p>DNA-Histogramm [c] für 1931-10</p> | <p>Peridiploide DNA-Verteilung</p> <p>DNA-Grad 1 (Typ A)</p> <p>entspricht etwa GS ≤ 6 (3 + 3 = 6)</p> | <p>Sehr gut</p> <p>Aktive Überwachung/Active Surveillance</p> <p>Befund-Häufigkeit in Stanzen: ca. 55% der Fälle</p> |
| <p>DNA-Histogramm [c] für 1548-10</p> | <p>Peritetraploide DNA-Verteilung</p> <p>DNA-Grad 2 (Typ B)</p> <p>entspricht etwa GS 7</p> | <p>Überwiegend gut</p> <p>Für ältere Patienten wie bei Typ A, ggf. Aktive Überwachung/Active Surveillance</p> <p>Befund-Häufigkeit in Stanzen: ca. 26% der Fälle</p> |
| <p>DNA-Histogramm [c] für 10247b-09</p> | <p>X-ploide DNA-Verteilung</p> <p>DNA-Grad 3 (Typ C)</p> <p>entspricht etwa GS 8</p> | <p>Unbehandelt ungünstig</p> <p>Behandlung wie bei Prostata-Karzinom mit Gleason ≥ 8</p> <p>Befund-Häufigkeit in Stanzen: ca. 10% der Fälle</p> |
| <p>DNA-Histogramm [c] für 3554-09</p> | <p>Multiploide DNA-Verteilung</p> <p>DNA-Grad 4 (Typ C)</p> <p>entspricht etwa GS 9-10</p> | <p>Unbehandelt ungünstig</p> <p>Behandlung wie bei Prostata-Karzinom mit Gleason ≥ 8</p> <p>Befund-Häufigkeit in Stanzen: ca. 9% der Fälle</p> |

Abb. 1 ◀ Übersicht zur prognostischen Interpretation von DNA-Histogrammen beim Prostatakarzinom. (Adaptiert nach [5])

Option unterstützen. Wir empfehlen, die DNA-Karyometrie bei den Folgebiopsien im Rahmen der aktiven Überwachung/„active surveillance“ einzusetzen, um ggf. eine zy-

togenetische Progression objektiv zu erfassen.

- DNA-Malignitätsgrade 3 und 4 (x-ploid und multiploid)
- Trotz evtl. erfüllter Eingangskriterien für eine aktive Überwa-

chung/„active surveillance“ von Prostatakarzinomen laut S3-Leitlinie spricht dieser prognostisch ungünstige DNA-karyometrische Befund gegen diese Strategie.

Addendum

Beschreibung des Konsensprozesses

Eine Rohfassung des hier präsentierten Konsentextes ohne „Textvorschläge zur ... Interpretation ... von Karyometrie-Befunden...“ wurde auf der genannten Veranstaltung allen Teilnehmern schriftlich ausgehändigt. Nach Diskussion insbesondere der infrage kommenden Untersuchungsmaterialien, der Indikationen und Anforderungen an eine Dokumentation sowie der Benennung der Methode und gemeinsamer Erarbeitung der oben genannten „Textvorschläge“ wurde der Text einstimmig von allen 22 teilnehmenden Pathologen konsentiert. Nach dessen schriftlicher Ausarbeitung durch die Autoren wurde dieser Konsensustext den Teilnehmern der Veranstaltung zugestellt und erneut von allen ratifiziert.

Die DNA-Zytometrie „ein alter Hut“?

Wesentliche Gründe, warum sich die diagnostische und prognostische DNA-Zytometrie bisher kaum durchgesetzt hat, sind:

- Der bislang unverhältnismäßig hohe Zeitaufwand von ca. 1 h/Messung und die damit verbundene Unwirtschaftlichkeit.
- Die mangelhafte Verfügbarkeit von zytologisch hinreichend ausgebildetem Personal für diagnostisch relevante DNA-Messungen.
- Die bislang unklare biologische Begründung für die diagnostische und prognostische Interpretation von DNA-Histogrammen.
- Eine mangelhafte Akzeptanz der publizierten interdisziplinären Standardisierung der diagnostischen DNA-Zytometrie [11].

Folgende Entwicklungen geben der DNA-Zytometrie eine neue zytogenetische Grundlage und Praktikabilität in der diagnostischen Routine:

- Neuere Erkenntnisse der Zytogenetik zur nonklonalen und klonalen Aneuploidie als spezifischem Marker der malignen Transformation von Zellen sowie zur zytogenetischen Tumor-

progression liefern fundierte biologische Grundlagen für eine valide diagnostische und prognostische DNA-Zytometrie [1, 2].

- Neuere Entwicklungen der Informationstechnologie und digitalen Bildverarbeitung erlauben durch Teilautomation der von Pathologen trainierten diagnostisch relevanten Selektion und Klassifikation von Zellkernen eine erhebliche Beschleunigung des Arbeitsablaufs und eine Verbesserung der Repräsentativität durch Erhöhung der routinemäßig zu vermessenen Zahl von Zellkernen um mehr als das 100-fache [5, 6, 8].
- Eine aktuelle systematische Literaturrecherche [6] ergab neben 8 die Methode befürwortenden narrativen, nicht systematischen Reviews, 8 Level-1b-Studien nach der Oxford Center of Evidence-Based Medicine zur deren signifikanten diagnostischen Relevanz beim Prostatakarzinom sowie 18 Level-2b-Studien zur Zufügung signifikanter prognostischer Information zum ursprünglichen Gleason-Score. Drei Level-2b- und eine Level-1b-Studie belegen die prognostische Relevanz für unbehandelte Patienten mit Prostatakarzinom unter aktiver Überwachung.

Publikationen zur prognostischen DNA-Zytometrie unter aktiver Überwachung (zit. in [6]):

- Borre et al. (1998) dokumentierten für 120 Patienten in einer multivariaten Level-2b-Studie die signifikante Überlegenheit der DNA-Ploidie über den WHO-Grad zur Vorhersage der tumorspezifischen Überlebenszeit.
- Adolfsen u. Tribukait (1990) belegten in einer multivariaten Level-1b-Studie eine signifikante Überlegenheit der DNA-Ploidie über den zytologischen Malignitätsgrad nach Esposti zur Vorhersage der rezidivfreien Überlebenszeit.
- Vesalainen et al. (1994) bewiesen für 106 Patienten in einer multivariaten Level-2b-Studie eine signifikantere Korrelation mit der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zum ursprünglichen Gleason-Score.

- Tribukait (1993) zeigte für 187 Patienten in einer multivariaten Level-2b-Studie eine dem zytologischen Malignitätsgrad überlegene signifikante Korrelation der DNA-Ploidie mit dem Gesamtüberleben.

Demnach fehlt bis heute eine prospektive validierende Kohortenstudie des Oxford Levels 1b mit gutem Referenzstandard zum Vergleich der prognostischen Relevanz der DNA-Ploidie mit der des modifizierten Gleason-Scores [7]. Eine solche stellt die derzeit laufende „DNA-ProKo-Studie“ der „Stiftung Männergesundheit“ zusammen mit dem Schwerpunkt Zytopathologie am Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf und dem Institut für Pathologie am Krankenhaus Düren dar. In deren Rahmen wird auch die hier vorgestellte, auf den Vorschlägen von Haroske et al. [11] beruhende prognostische Histogrammklassifikation validiert.

Eine aktuelle Liste derjenigen Institute in Deutschland, welche die prognostische DNA-Zytometrie (DNA-Karyometrie) des Prostatakarzinoms anbieten und sich dem hier präsentierten „Frankfurter Konsens“ verpflichtet fühlen, ist unter www.prostata-shg.de/link/r einsehbar.

Korrespondenzadresse



Prof. Dr. A. Böcking
Institut für Pathologie
Krankenhaus Düren
Roonstraße 30, 52309 Düren
alfred.boecking@web.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. A. Böcking, S. Biesterfeld, J. Dietz, G. Haroske, J. Kriegsmann, H. Motherby und S. Falk geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Blomfield M et al (2014) Karyotypic evolutions of cancer species in rats during the long latent periods after injection of nitrosourea. *Mol Cytogenet* 7:71–96
2. Böcking A (2015) Comparability of tumor-cytogenetics and -DNA-cytometry. *Mol Cytogenet* 8:28–29. doi:10.1186/s13039-015-0132-9

-
3. Böcking A, Dietz J (2013) Prognostische DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom. *Dtsch Z Onkol* 45(4):144–151
 4. Böcking A et al (1995) Consensus-report of the ESACP-task force on standardisation of diagnostic DNA cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Cell Pathol* 8:67–74
 5. Böcking A et al (2013) Diagnostic Cytometry. In: Mehrotra R (Hrsg) *Oral oncology: a concise guide*. Springer Science and Business Media, New York, S 125–146
 6. Böcking A et al (2014) DNA-grading of prostate cancer. Systematic review of the literature with descriptive data analysis. *Pathol Discov* 7:2. doi:doi.org/10.7243/2052-7896-2
 7. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB et al (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Cancer 29:1228–1243
 8. Friedrich D et al (2012) Identification of prostate cancer cell nuclei for DNA-grading of malignancy. In: Tolxdorf T et al (Hrsg) *Bildverarbeitung für die Medizin 2012, Informatik aktuell*. Springer, Berlin, S 234–239
 9. Giroud F et al (1998) 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA-image cytometry. Part II: Recommendations for quality assurance. *Anal Cell Pathol* 17:201–208
 10. Haroske G et al (1998) 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA-image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurements and interpretation. *Anal Cell Pathol* 17: 189–212
 11. Haroske G et al (2001) Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA-image cytometry. *Anal Cell Pathol* 23:89–95