

Zusammenfassung

DNA-Analysen zur Bestimmung der Ploidie werden als Prognosefaktor für Progressionsrate und Überlebenszeit bei Patienten mit Prostatakarzinom diskutiert. Wir analysierten die Überlebenszeit von 61 Patienten mit primär metastasierten Prostatakarzinom, bei denen impulszytometrisch die DNA-Ploidie aus dem Prostatagewebe bestimmt wurde. Das Gewebe wurde dabei im Rahmen der Diagnosestellung durch Stanzbiopsie oder durch eine palliative TUR gewonnen. Alle Patienten wurden antiandrogen behandelt und bis zu ihrem Tod nachbeobachtet. 37% der ausgewerteten DNA Histogramme zeigten ein diploides, 63% ein non-diploides Verteilungsmuster. Die mittlere Überlebenszeit betrug für Patienten mit diploidem Tumor 44 (1–126) Monate, die Patienten mit non diploidem Tumor lebten durchschnittlich 40 (1–96) Monate. Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant. Die Kombination von non-diploidem und niedrig differenziertem (G3-) Tumor reduzierte allerdings die Überlebenszeit signifikant [20 (1–62) Monate]. Eine Korrelation von Grading und Ploidie wurde nicht nachgewiesen. Keiner der untersuchten Patienten zeigte die Kombination eines diploiden und hoch differenzierten Karzinoms. Deshalb erlaubt die gemeinsame Betrachtung von Ploidie und Grading eine differenzierte Tumorbetrachtung.

Schlüsselwörter

Prostatakarzinom – Impulszytometrie – Ploidie – Überlebensrate

Einfluß von DNA-Ploidie und Grading auf die Überlebenszeit beim primär metastasierten Prostatakarzinom

A. Kugler¹, A. J. Gross¹, G. Zöller¹, B. Hemmerlein², M. Kallerhoff¹ und R.-H. Ringert¹

¹ Abteilung Urologie, Georg August Universität Göttingen

² Abteilung Pathologie, Georg August Universität Göttingen

Das klinische Erscheinungsbild beim Prostatakarzinom reicht vom latenten Karzinom bis zum schnell wachsenden und metastasierenden Tumor. Diese Unterschiede sind einerseits schwer mit morphologischen Kriterien zu korrelieren [19], jedoch werden verschiedene klinisch-pathologische und biochemische Parameter eingesetzt, um das biologische Verhalten des Tumors abzuschätzen. Zu diesen Parametern gehören Stadium, Grading, Tumolvolumen und Höhe des PSA-Werts. Allerdings ist keiner dieser Parameter zuverlässig [10]. Die Therapieschemata sind unterschiedlich aggressiv und reichen von einer abwartenden Haltung bis zur radikalen Prostatektomie beim lokal schon fortgeschrittenen Karzinom [5, 7]. Die antiandrogene Therapie in Form einer Orchiektomie bzw. LH/RH-Analoga mit und ohne zusätzlichem Cyproteronacetat bzw. Flutamid ist derzeit die Standardtherapie des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Prostatakarzinoms [13, 15]. Eine abwartende Haltung bei metastasiertem Prostatakarzinom bis zum Einsetzen klinischer Symptomatik wird ebenfalls diskutiert [7, 11]. Diese Überlegungen sind auch deshalb gerechtfertigt, da bisher keine prospektiv randomisierte Studie eine Verlängerung der Überlebenszeit durch antiandrogene Therapie bewiesen hat.

Durchflußzytometrische Untersuchungen an Patienten mit unterschiedlichem Tumorstadium zeigten bisher, daß Patienten mit diploidem Prostatakarzinom eine bessere Prognose und eine längere Überlebenszeit haben als Patienten mit aneuploidem Tumor [3, 9, 14]. Tribukait [17] berichtet über 199 Patienten mit Prostatakarzinom und einem Follow-up von 4 Jahren mit einer 95%igen Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit diploidem Tumor gegenüber einer Überlebensrate von nur 40% für Patienten mit aneuploidem Verteilungsmuster. Andere Autoren konnten allerdings diesen Zusammenhang nicht verifizieren [12].

Der mitunter lange Verlauf der Erkrankung bewirkt, daß nur wenig Studien die Überlebenszeit beim Prostatakarzinom in Korrelation zur Ploidie stellen. Darüber hinaus wird meist kein frisches sondern paraffiniertes Gewebe zur DNA-Analyse verwendet. Die Verwendung von frischem Gewebe wird dabei als aussagekräftiger eingestuft [16].

In der vorliegenden Studie wird der prognostische Wert von Ploidiebestimmung bei frischem Prostatagewebe mittels Impulszytometrie (ICP) zusammen mit dem Grading des Tumors in Korrelation zu der Überlebenszeit gestellt. Alle Patienten wurden bis zu Ihrem Tod nachbeobachtet.

Dr. A. Kugler, Urologische Universitätsklinik Göttingen, Robert Koch Straße 40, D-37075 Göttingen

Influence of DNA ploidy and grading on survival time of patients with primary metastasized prostatic carcinoma

A. Kugler, A. J. Gross, G. Zöller, B. Hemmerlein, M. Kallerhoff and R.-H. Ringert

Summary

An aneuploid pattern of prostatic cancer defined by flow cytometry was shown to be of value in predicting progression rates and patient survival times. We evaluated the long-term value of DNA analysis in prostatic cancer in 61 patients with advanced disease. We performed flow cytometry on 61 fresh prostate specimens obtained from a transrectal needle biopsy or a transurethral resection. All patients received anti-hormonal therapy. Time until death was evaluated in all patients. Of the DNA histograms analyzed, 37% showed a diploid pattern, 63% a non-diploid pattern, and 37% a tetraploid or hypertetraploid pattern. Kaplan-Meier plots were generated for analysis of the probability of survival. Mean survival time was 44 months for patients with diploid (range 1–126 months) and 40 months for patients with non-diploid tumors (range 1–96 months). This difference is not statistically significant. However, the combination of non-diploid and low-differentiated (G3) tumors reduced survival time significantly (mean 20 months, range 1–62 months). There was no patient with combination of a diploid and highly differentiated tumor.

Key words

Prostatic carcinoma – Flow cytometry – Ploidy – Survival

Tabelle 1
Verteilung des Stagings

Patienten	n	≥ N1 M0	> N1 M1 Knochenmetastasen	> N1 M1 mehrere M. Loci
	61	28 (45%)	23 (37%)	10 (16%)

Tabelle 2
Verteilung der Therapieformen

Patienten	n	Radikale Prostatektomie (M 0)	Orchiektomie	LHRH-Analoga	Chemotherapie
	61	5 (8%)	26 (42%)	35 (58%)	17 (27%)

Patienten und Methoden

Zwischen 1978 und 1990 wurde bei 61 Patienten mit primär metastasiertem Prostatakarzinom, N+ und/oder M1 (Tabelle 1), bestimmt durch Lymphadenektomie bzw. Knochenszintigraphie mit Nativröntgen, impulszytometrische Untersuchungen vorgenommen. Dabei wurde insbesondere die Ploidie betrachtet. Die Gewebeprobe wurden frisch nach Gewinnung von randomisierten Prostatabiopsien – je 3 transrektale Stanzzyylinder aus jedem Prostatalappen – oder im Rahmen einer palliativen TUR analysiert. Die gewonnenen Gewebeprobe wurden jeweils halbiert, der 1. Teil wurde zur histologischen Aufarbeitung, die restlichen Gewebeprobe zur impulszytometrischen Untersuchung verwendet. Zusätzlich wurde das Tumorstadium und das Grading zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie die Zeit bis zum Tod bestimmt. Das Grading der Karzinome wurde histopathologisch von einem unabhängigen Pathologen festgelegt, der nicht über die ICP-Ergebnisse informiert war. Alle Patienten wurden antiandrogen, entweder durch Orchiektomie oder LH/RH-Analoga, therapiert (Tabelle 2); 8% der Patienten, die eine ausschließlich lymphogene Metastasierung aufwiesen, wurden vor der antiandrogenen Therapie radikal postatektomiert.

Außer der Überlebenszeit wurden die Todesursachen der Patienten festgehalten. Das Alter der Patienten lag bei Diagnosestellung zwischen 55 und 84 Jahren (durchschnittlich 69 Jahre). Alle Patienten wurden bis zu ihrem Tod beobachtet (maximal 126 Monate).

Die Gewebeprobe wurden direkt nach Gewinnung durch Biopsie oder TUR untersucht. Nach mechanischer Disaggregation wurde eine 30minütige Pepsinierung in 0,5%iger Pepsinlösung durchgeführt. Verunreinigungen wurden mittels Zentrifugie-

ren sowie Filtration durch einen 30 µm großen Nylonfilter entfernt. Zur Färbung der DNA wurde Mithramycin C/Ethidiumbromid (0,001%) benutzt. Um nukleäre RNA zu entfernen, wurde dem Fluorochrom RNase-Lösung zugegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (700 G für 5 min), resuspendiert in frischer Färbelösung, gewaschen und erneut durch einen 27-µm-Nylonfilter geleitet. Die gefärbten Zellkerne wurden in einem Impulszytometer (ICP 11/22, Phywe, Göttingen) analysiert, der mit einer 100-W-Quecksilberlampe ausgerüstet ist und einen UGI-UV-Filter besitzt. Mindestens 20000 Zellen wurden bei jeder Untersuchung evaluiert und der DNA-Gehalt mittels der 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Fluoreszenzintensität bestimmt, aufgezeichnet und in einem Histogramm ausgedruckt. Als Referenzzellen dienten Lymphozytenpopulationen.

Jedes DNA-Histogramm wurde als diploid, aneuploid, tetraploid oder hypertetraploid eingestuft, hierbei wurde der DNA-Index, beschrieben durch Hidemann [6], verwendet. Diploide Tumoren sind definiert durch einen DNA-Index von < 1,05. Aneuploidie durch einen DNA-Index zwischen 1,06 und 1,95; Tetraploidie zwischen 1,96 und 2,05. Histogramme mit einem DNA-Index > 2,05 sind hypertetraploid. Bei Vorliegen unterschiedlicher Ploidiewerte bei denselben Patienten wurde immer der höchste DNA-Index gewertet.

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte durch das SAS-Statistikprogramm (Statistical Analyse Systems, SAS Institute Inc. Cary, N.C., U.S.A.). Die Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier [8] unter Verwendung der „Log-rank-Tests“ mit non-parametrischem Vergleich der univariaten Überlebensgruppen erstellt.

Die Unabhängigkeit der Parameter Ploidie und Grading wurde durch den Standard- χ^2 -Test berechnet.

Tabelle 3
Verteilung der Ploidie und des Gradings

Patienten	n	Alter mittleres	Diploid [%]	Non-diploid [%]	G 1 [%]	G 2/3 [%]
	61	69	37	63	9	91

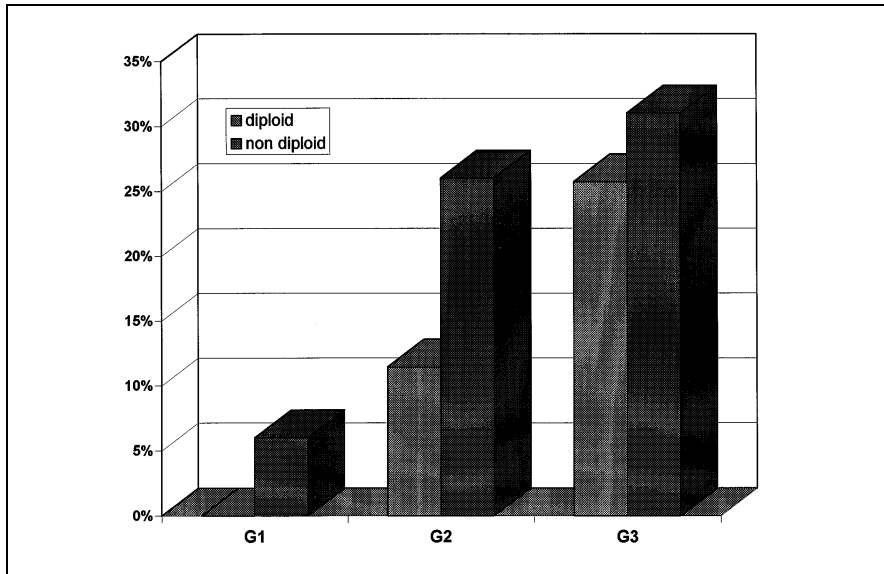


Abb. 1. Prozentuale Verteilung der DNA-Ploidie und des Gradings (n = 61)

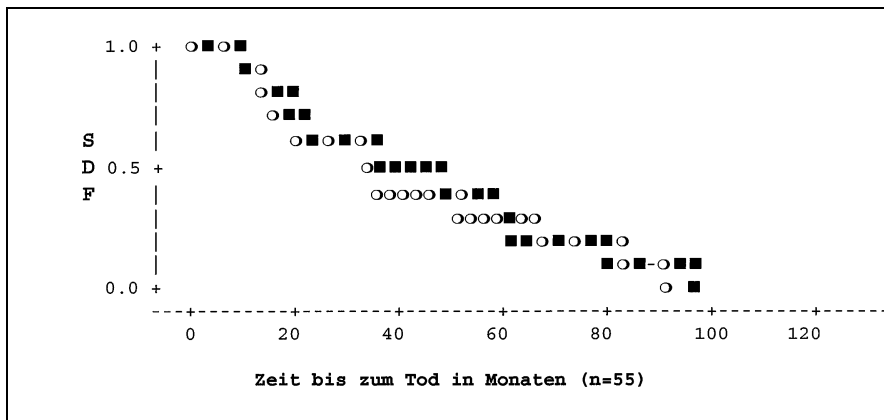


Abb. 2. Überlebenszeit der Patienten mit diploidem [○] und non diploidem [■] Karzinom. Beide Überlebenszeiten sind gleich lang (p = 0,65)

Ergebnisse

22 (37%) der 61 Präparate waren diploid, 16 (26%) aneuploid, 22 (37%) tetraploid bzw. hypertetraploid (Tabelle 3). Für die weiteren Auswertungen wurden die Patienten mit aneuploidem, tetraploidem und hypertetraploidem DNA-Verteilungsmuster als non-diploid zusam-

mengefaßt, um so die Zahl der zu vergleichenden Gruppen zu reduzieren.

Alle Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum, 91% an den Folgen der Erkrankung, die verbleibenden 6 Patienten an Herzinsuffizienz, Apoplex, Bronchialkarzinom oder Herzinfarkt. Von den 61 Patienten hatten nur 6 Patienten (9%) ei-

nen hoch differenzierten Tumor, 91% ein G2- bzw. G3-Karzinom. In Abb. 1 ist die das Grading gegen die Ploidie aufgetragen. Eine Abhängigkeit zwischen den Parametern Ploidie und Grading besteht nicht (χ^2 -Test $p = 0,08$). Unter den Patienten, die am Prostatakarzinom verstarben, waren sowohl Patienten mit einem diploiden als auch mit einem hoch differenzierten Tumor. Eine Kombination dieser Parameter wird allerdings nicht beobachtet. Patienten mit diploidem Karzinom weisen zu 72% einen G3-Tumor auf. Die verbleibenden Patienten mit einem diploiden DNA-Muster haben ein G2-Karzinom. Kein Patient hat die Kombination eines diploiden und G1-Karzinoms. Patienten mit einem nicht diploiden Karzinom zeigen zu etwa 50% einen G2- oder G3-differenzierten Tumor; 15% allerdings ein G1-Karzinom.

Die Überlebenszeit der Patienten, die am Prostatakarzinom verstarben (n = 55) wurde nach Kaplan-Meier berechnet (Abb. 2). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit diploidem Prostatakarzinom beträgt 44 Monate, diejenige für Patienten mit non-diploidem Tumor 40 Monate. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (Tabelle 1, $p = 0,65$). Werden unter den Patienten mit non-diploidem Tumor diejenigen isoliert betrachtet, die zusätzlich einen wenig differenzierten (G3-) Tumor haben, beträgt die mittlere Überlebenszeit nur 20 Monate. Diese Patienten leben damit im Vergleich zum Gesamtkollektiv signifikant kürzer ($p = 0,03$, Abb. 3). Werden nur die Patienten mit einem G3-Karzinom betrachtet (n = 34), so leben diejenigen mit einem non diploiden Tumor signifikant kürzer (Abb. 4, $p = 0,03$).

Diskussion

Nur wenige Studien korrelieren die Überlebenszeit von Patienten mit Prostatakarzinom mit der Tumorploidie und verwenden frisches Gewebe zur DNA-Analyse, das aussagekräftiger ist als paraffinisieretes Gewebe [16]. Ein weiteres Problem bei der Interpretation der Ploidie ist das des „sampling errors“, d.h.: Ist die

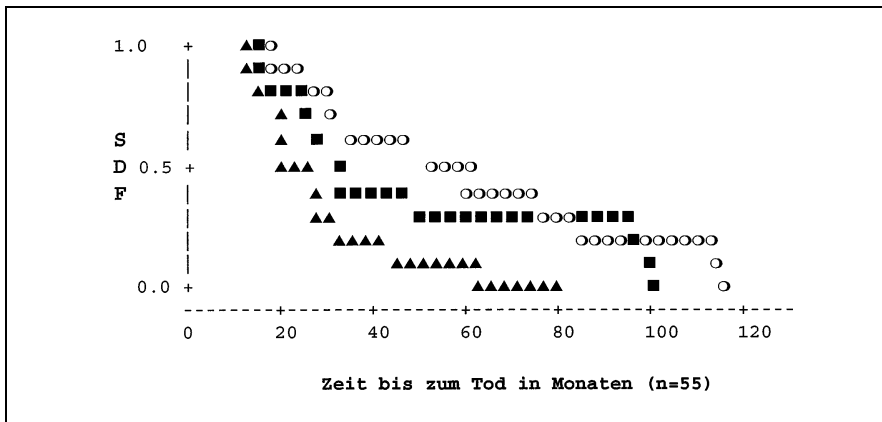


Abb. 3. Überlebenszeit der Patienten mit diploidem/G(1-3) [○], non diploidem/G(1-3) [■] und non diploidem G3 [▲] Karzinom. Die Überlebenszeit von Patienten mit non diploidem G3 Karzinom ist signifikant kürzer ($p = 0,03$)

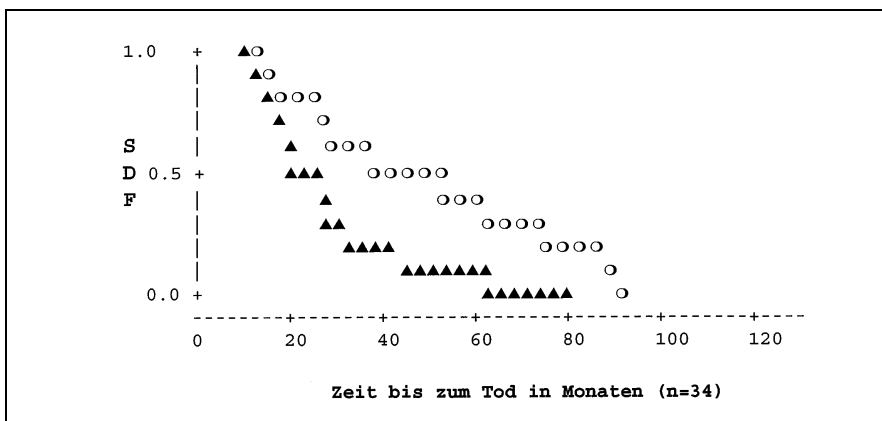


Abb. 4. Überlebenszeit der Patienten mit diploidem/G3 [○] und non diploidem G3 [▲] Karzinom. Die Überlebenszeit von Patienten mit non diploidem G3 Karzinom ist signifikant kürzer ($p = 0,04$)

analysierte Probe tatsächlich repräsentativ für den gesamten Tumor? In dieser Studie versuchten wir diesem Problem durch Teilung der Stanzzyylinder bzw. der durch TUR gewonnenen Prostataaspäne – je zur Hälfte histopathologische und impulszytometrische Auswertungen – zu begegnen.

Für das Prostatakarzinom ist in mehreren Untersuchungen nachgewiesen worden, daß Grading und Ploidie zusätzliche Prognosefaktoren sind, um die Zeit bis zur Progression, Ansprechrate auf die antiandrogene Therapie sowie die Überlebenszeit abzuschätzen [2, 4, 16, 17, 20].

Vorausgegangene Untersuchungen an Patienten mit nicht fortgeschrittenem Prostatakarzinom zeigen dabei eine Korrelation von gut diffe-

renzierten Tumoren und diploidem DNA-Gehalt, sowie von aneuploiden Karzinomen mit niedriger Differenzierung [4]. Eine entsprechende Korrelation kann unsere Studie nicht nachweisen. Hier zeigen Patienten mit diploidem Tumor in 72% einen niedrigen Differenzierungsgrad. Diese Diskrepanz kann dadurch bedingt sein, daß in unserem Kollektiv nur Patienten mit primär metastasiertem Prostatakarzinom eingeschlossen wurden. Die Korrelation von diploidem DNA-Muster und hoch differenziertem Tumor finden wir auch in unserem Patientengut mit primär lokal begrenzten, nicht metastasiertem Prostatakarzinom. Für primär metastasierte Tumoren können wir aber in der vorgestellten Untersuchung keine entsprechende Korrelation fin-

den. In diesem Kollektiv zeigen diploide Karzinome obligat eine niedrige Differenzierung. Andererseits haben G1-Karzinome immer ein non-diploides DNA-Muster. Patienten mit einem diploiden G1-Karzinom kommen nicht in der von uns betrachteten Patientengruppe mit primär metastasiertem Tumor vor, auch ist eine Tumorphase bei Patienten mit lokalisiertem, diploiden Karzinom von anderen [1] seltener beobachtet worden als bei Patienten mit lokalisierten non diploiden Karzinomen.

Eine Korrelation zwischen non-diploiden Karzinomen und einer kürzeren Überlebenszeit wird von mehreren Autoren beschrieben [2, 9, 14, 16, 17]. Die Kombination von Grading und DNA-Index wird dabei als aussagekräftiger eingestuft als jeder einzelne Parameter [1]. Diese Beobachtung an lokal begrenzten Prostatakarzinomen trifft in unserer Studie auch auf Patienten mit primär metastasierten Karzinom zu.

Die Überlebenszeit in unserer Untersuchung unterscheidet sich nicht durch die Ploidie allein. Lediglich diejenigen Patienten, die einen non-diploiden und niedrig differenzierten Tumor aufweisen, lebten signifikant kürzer. Auch bei dem Vergleich der Patienten mit einem G3-Karzinom ($n = 35$) zeigt sich, daß diejenigen mit einem non-diploiden Tumor eine signifikant kürzere Überlebenszeit haben, als diejenigen mit einem diploiden Karzinom.

Hervorzuheben bleibt, daß sowohl hochdifferenzierte als auch diploide Karzinome zum Tode führen können, die Kombination dieser beiden Parameter aber in der Gruppe der primär metastasierten Prostatakarzinome nicht beobachtet wird.

In unserem Kollektiv erhalten alle Patienten eine antiandrogene Therapie entweder durch Orchiektomie oder LH/RH-Analoga. Somit sind die Korrelationen von Ploidie, Grading und Überlebenszeit nur für therapierte Patienten und nicht für den natürlichen Krankheitsverlauf aussagefähig.

Zusammenfassend kann eine DNA-Bestimmung an Tumorzellen der Prostata einfach durchgeführt

werden, wenn frisches Biopsiematerial oder Gewebe verwendet wird. Die Kombination mit dem Grading ist von hohem prognostischem Wert. Patienten mit non-diploidem und niedrig differenziertem Karzinom haben eine deutlich schlechtere Prognose als diejenigen mit hoch-differenziertem, diploidem Tumor.

Literatur

1. Adolfsson J, Rönström L, Hedlund P-O, Löwhagen T, Carstensen J, Tribukait B (1990) The prognostic value of modal deoxyribonucleic acid in low grade low stage untreated prostate cancer. *J Urol* 144: 1404–1406
2. Aus G, Hugosson J, Norlen L (1995) Long-term survival and mortality in prostate cancer treated with noncurative intent. *J Urol* 145: 460–465
3. Fordham MVP, Burdge AH, Matthews J, Williams G, Cooke T (1986) Prostatic carcinoma cell DNA content measured by FCM and its relation to clinical outcome. *Br J Surg* 73: 400–403
4. Frankfurt OS, Chin JL, Englander LS, Greco WR, Edson E, Pontes J, Rustum YM (1985) Relationship between DNA ploidy glandula differentiation and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res* 45: 1418–1423
5. Harlan L, Brawley O, Pommerenke F, Wali P, Kramer P (1995) Geographic, age, and racial variation in the treatment of local/regional carcinoma of the prostate. *J Clin Oncol* 13: 93–100
6. Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M et al. (1984) Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5: 445–446
7. Johansson J-E, Adami H-O, Andersson S-O, Bergström R, Krusemo U, Kraaz W (1989) Natural history of localised prostatic cancer. A population based study in 223 untreated patients. *Lancet* 1: 799–803
8. Kaplan EL, Meier P (1958) Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457–481
9. Lee SE, Currin SM, Paulson DF, Walther PJ (1988) Flow cytometric determination of ploidy in prostatic adenocarcinoma: a comparison with seminal vesicle involvement and histopathological grading as a predictor of clinical recurrence. *J Urol* 140: 769–774
10. Lundberg S, Carstensen J, Rundquist I (1987) DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res* 47: 1973–1977
11. Mohler J, Partin A, Epstein J et al. (1992) Prediction of prognosis in untreated stage A2 prostatic carcinoma. *Cancer* 69: 509–511
12. Ritchie AWS, Dorey F, Layfield LJ, Hannah J, Lovrekovich H, deKernion JB (1988) Relationship of DNA content to conventional prognostic factors in clinically localized carcinoma of the prostate. *Br J Urol* 62: 245–260
13. Smith JA (1986) Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) analogs in treatment of prostatic cancer: Clinical perspective. *Urology* 27 [Suppl]: 9–15
14. Stephenson RA, James BC, Gay H, Fair WR, Withmore WF Jr, Melamed MR (1987) Flow cytometry of prostate cancer: relationship of DNA content to survival. *Cancer Res* 47: 2504–2507
15. Studer UE (1995) Fortgeschrittenes Prostatakarzinom – welche Hormontherapie wann? *Urologe A* 34: 361–366
16. Tinari N, Natoli C, Angelucci D et al. (1993) DNA and S-phase fraction analysis by flow cytometry in prostate cancer. *Cancer* 71: 1289–1296
17. Tribukait B (1993) Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: Clinical research and application. *Eur Urol* 23 [Suppl 2]: 64–76
18. Tribukait B (1987) Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genito-urinary neoplasms. *World J Urol* 5: 108–111
19. Wiederanders RE, Stuber RV, Mota C, O'Connell D, Haslam GJ (1963) Prognostic value of grading prostate carcinoma. *J Urol* 89: 881–888
20. Zimmermann A, Truss F, Blech M, Schröter W, Barth M (1983) Bedeutung der Impulszytometrie für Diagnose und Prognose des Prostatakarzinoms. *Urologe A* 22: 151–156