

**Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink**

**Chromosomale Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung beim
Urothelkarzinom;
Diagnose, Früherkennung und Vergleich mit der Urinzytologie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Julia Fischer
aus Bad Neustadt / Saale**

Würzburg, April 2008

Referent: Prof. Dr. H. Griesser

Koreferent: Prof. Dr. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

21.08.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinische Symptome	1
1.1.3	Entstehungsfaktoren	2
1.1.3.1	Exogen	2
1.1.3.2	Genetisch-somatisch.....	3
1.1.4	Diagnostik.....	6
1.1.5	Graduierung und Stadieneinteilung	8
1.1.6	Therapie	9
1.1.6.1	Oberflächliche Karzinome (Ta, Tis, T1)	9
1.1.6.2	Muskelinvasive Karzinome (T2-T4, NxM0).....	10
1.1.7	Prognose	10
1.1.8	Lösungswege zum verbesserten Nachweis von Urothelkarzinomen	11
1.2	Chromosomale Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	12
1.2.1	Anwendungsgebiete	12
1.2.2	FISH-Methodik.....	12
1.2.3	FISH-Auswertung.....	13
1.2.4	Untersuchungen mit der chromosomalen FISH-Diagnostik	14
1.3	Fragestellung und Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Patienten	17
2.2	Zellmaterial und –aufbereitung	18
2.3	Vorbereitung gefärbter Präparate	19
2.4	Vorbereitung ungefärbter Präparate	20
2.5	Sonden-Anwendung und Hybridisierung	21
2.6	Waschvorgänge und Gegenfärben.....	21
2.7	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	22
2.7.1	DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie).....	23
2.7.2	Rot-Grün-, Aqua-, Gold-Fluoreszenzfilter (Chromosome 3, 7, 17 und Genlokus 9p21).....	23
2.8	Analyse und Interpretation	23
2.8.1	Analysekriterien und Dokumentation.....	23
2.8.2	Interpretation	24
2.9	Präparateaufbewahrung	25
2.10	Reagenzien, Enzyme, Lösungen.....	25
2.11	Geräte.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Präparatekollektiv	29
3.2	FISH-Anwendung.....	30
3.3	Mikroskopische Analyse	31
3.3.1	DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie).....	31

3.3.2	Rot-Grün-Fluoreszenzfilter und Aqua-Fluoreszenzfilter (Chromosome 3, 7 und 17).....	32
3.3.3	Gold-Fluoreszenzfilter (Genlokus 9p21).....	33
3.3.4	Schwierigkeiten bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertbarkeit.....	33
3.4	Verteilung und Häufigkeit genetisch abnormer Zellen	34
3.4.1	Allgemeine Verteilung	34
3.4.2	Isolierte genetische Veränderungen.....	35
3.4.3	Parallele genetische Veränderungen.....	36
3.4.4	Korrelation von genetischer Aberration und Tumorgrad	37
3.5	Analyse der Ergebnisse	37
3.5.1	Allgemeine Untersuchung	38
3.5.2	Einzelanalysen	39
3.5.2.1	G1-G3-Karzinome	39
3.5.2.2	C0, C1,C2	40
3.5.2.3	Zustand nach Karzinom.....	41
3.5.2.4	Negativkontrollen	42
3.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
3.6	Präparateaufbewahrung	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Generelle Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	45
4.2	Präparate	47
4.3	FISH-Anwendung.....	48
4.4	Mikroskopie.....	49
4.5	Ergebnisse.....	50
4.6	Schlussfolgerung	53
5	Zusammenfassung	55
5.1	Hintergrund und Zielsetzung	55
5.2	Methoden und Ergebnisse	56
5.3	Schlußfolgerung	57
6	Bilder	59
6.1	DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie).....	59
6.2	Rot-Grün-Fluoreszenzfilter (Chromosome 3 und 7) und Aqua-Fluoreszenzfilter (Chromosom 17).....	62
6.3	Gold-Fluoreszenzfilter (Genlokus 9p21).....	66
6.4	Schwierigkeiten bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertbarkeit.....	68
7	Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist die siebthäufigste Krebserkrankung weltweit (entsprechend 3 % aller bösartigen Tumoren) (57) mit jährlich weltweit ca. 260.000 Neuerkrankungen bei Männern und 76.000 bei Frauen (24). Es rangiert auf Platz 4 aller Krebserkrankungen bei Männern und ist bei Frauen das neunthäufigste Karzinom (4). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 65 Jahre, selten erkranken Patienten unter 40 Jahren (67). Dabei zeigen sich neben einer deutlichen Bevorzugung des männlichen Geschlechts mit einer Geschlechterverteilung von 3,5 : 1- Erkrankungen (68) regionale Unterschiede mit einer bis zu 6-mal höheren Inzidenzrate in Industrieländern gegenüber Entwicklungsländern (69, 71). Das Harnblasenkarzinom umfasst Karzinome urothelialen Ursprungs (Urothelkarzinome, 90 - 95 % der Fälle) (57), Plattenepithelkarzinome (1,1 - 2,8 %), Adenokarzinome (1,5 - 1,9 %) (69) und seltene Untergruppen anderer Zelldifferenzierungen (55, 21). Eine besondere Form des Urothelkarzinoms ist das Carcinoma in situ (Tis), eine flache intraepitheliale Läsion hohen Malignitätsgrades (9).

1.1.2 Klinische Symptome

Art und Ausmaß klinischer Zeichen und Symptome beim Vorliegen eines invasiven Harnblasenkarzinoms hängen von Ausbreitung und Lokalisation des Tumors ab. Die meisten Patienten weisen eine Mikrohämaturie auf (54). Daneben ist eine schmerzlose Makrohämaturie das in 80 % der Fälle am häufigsten zu beobachtende klinische Zeichen (104), manchmal mit Bildung von Blutgerinnseln oder Schmerzen bei der Miktion. Bei ausgedehntem Tumor kann das Fassungsvermögen der Harnblase stark reduziert sein, so dass es zu einer Erhöhung der Miktionsfrequenz kommt. Tumore, die den Blasenhalss bedecken, führen oft zu irritativen Symptomen mit Flankenschmerz, Dysurie, Harndrang und Pollakisurie. Ein sehr ausgeprägter Befund eines Tis kann dabei ähnliche Symptome hervorrufen, jedoch zeigen die meisten Patienten mit diesen flachen Läsionen keine oder nur uncharakteristische Beschwerden (27). Bei Befall im Bereich der Harnleitermündung besteht die Gefahr eines Harnrückstaus und conse-

kutiver Hydronephrose, die als schlechtes prognostisches Zeichen gilt (30). Ein palpabler Tumor im Beckenbereich oder Ödeme der unteren Extremitäten, Gewichtsverlust und Knochenschmerzen sind Hinweise auf eine bereits stattgefundene Metastasierung.

1.1.3 Entstehungsfaktoren

1.1.3.1 Exogen

Mehrere Risikofaktoren für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms gelten mittlerweile als gesichert (siehe Tabelle 1). Den Hauptfaktor stellt Zigarettenrauchen dar, welches das Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, gegenüber dem von Nichtrauchern um das 2 – 6-fache erhöht (15, 61). Dabei scheinen Frauen bei gleicher Exposition stärker gefährdet zu sein als Männer (7). Bei Nikotinverzicht sinkt das Risiko einer Karzinomerkkrankung und bewegt sich nach ca. 15 Jahren im Bereich dessen eines Nichtrauchers (36). Die Exposition gegenüber karzinogenen Stoffen wie aromatischen Aminen (Benzidin und 1-/2-Naphtylamine) (35) ist in schätzungsweise 25 % aller Erkrankungsfälle ursächlich für eine Karzinomentstehung (70). Vermutlich stellt das Vorkommen von Arsen in chloriertem oder verunreinigtem Trinkwasser einen potentiellen Risikofaktor dar (14, 34, 95). Neueren epidemiologischen Studien zufolge erhöht ebenso ein jahrelanger Abusus phenacetinhaltiger Analgetika das Risiko für ein Harnblasenkarzinom signifikant (35). Ähnliches scheint für Zytostatika wie Cyclophosphamid zu gelten (98), die insbesondere für das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen der ableitenden Harnwege verantwortlich gemacht werden (99). Deren Entstehung wird ebenso durch eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* begünstigt, wahrscheinlich als Folge einer chronischen Zystitis (5, 21).

• Aluminiumproduktion	• Kohle-Teer-Gruben
• 4-Aminobiphenyl	• Kohleverbrennung
• Arsen im Trinkwasser	• Magenta-Herstellung
• Benzidine	• 2-Naphtylamine
• Chlornaphazine	• Phenacetinhaltige Analgetika
• Cyclophosphamide	• Schistosoma haematobium-Infektion
• Gummiproduktion	• Zigarettenrauch

Tabelle 1: Alphabetische Auflistung von Stoffen und Expositionen, welche mit der Entstehung des Harnblasenkarzinoms assoziiert werden (nach (21)).

1.1.3.2 Genetisch-somatisch

Verschiedene Studien belegen, dass beim Vorliegen eines Urothelkarzinoms bei einem Familienmitglied das Erkrankungsrisiko unter Verwandten ersten Grades um das bis zu zweifache erhöht ist (2, 26, 42). Sporadisch aufgetretene Erkrankungsfälle zeigen im Vergleich zu den seltenen Fällen einer familiären Häufung eine größere und deutlicher ausgeprägte Variabilität an Zellveränderungen (1). Charakteristisch für diese Karzinome sind multiple, oft nebeneinander bestehende chromosomale und numerische Veränderungen, die innerhalb des Chromosoms verschiedene Genorte betreffen und bezeichnenderweise Genamplifikationen (Vermehrung von Genkopien) im Bereich diverser Onkogene und Funktionseinbußen bei Tumorsuppressorgenen aufweisen (77, 78, 79). Diese verschiedenen Abweichungen von der Norm treten nicht nur isoliert auf, sondern begünstigen oder bedingen sich teilweise gegenseitig.

Das Vorkommen von Genveränderungen jeglicher Art hängt von der „genetischen Stabilität“ des Tumors ab. Neben der Tumorklassifikation nach TNM (siehe Punkt 1.1.5) lassen sich die Harnblasenkarzinome in eine genetisch stabile Gruppe der niedrig-gradigen nicht-invasiven papillären Tumore (pTaG1-2) und eine genetisch instabile Kategorie der hochgradigen nicht-invasiven (pTaG3 und Tis) und invasiven Karzinome (pT1-4) einteilen. Diese letztere Gruppe unterscheidet sich deutlich hinsichtlich der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen. Stabile Harnblasenneoplasien zeigen nur geringe genomische Veränderungen. Am häufigsten finden sich Verluste von Anteilen oder des gesamten Chromosom 9 (6). Selten sind molekulargenetische Veränderungen wie Mutationen von Genen, die an der Regulation diverser Zellprozesse

(Zellzyklus, DNA-Reparatur, programmierter Zelltod) beteiligt sind (25, 33, 58, 78). Dazu gehört beispielsweise das p53 (TP53)-Gen auf 17q23, welches als Tumorsuppressorgen agiert und im Falle von LOH (loss of heterozygosity) eines Allels und Mutation des verbleibenden Allels inaktiviert wird (55).

Karzinome der als instabil angesehenen Kategorie weisen eine Vielzahl verschiedener chromosomaler Veränderungen auf. Je höher Tumorstadium und Grad sind, desto mehr aneuploide Zellen können gefunden werden (86). In einer CGH (comparative genomic hybridization)-Studie konnte ein vermehrter Verlust von 2q, 5q, 10q und 18q neben Zugewinnen bei 5p und 20q bei pTaG3-Tumoren beobachtet werden. Daneben zeigte sich molekulargenetisch ein hohes Vorkommen an LOH auf verschiedenen Genloci (siehe Tabelle 2) (81, 108).

Chromosom 9-Deletionen kommen nicht nur bei genetisch stabilen, sondern auch bei genetisch instabilen hochgradigen Karzinomen vor und gehen mit einem Verlust an Tumorsuppressorgen einher. Neben dem Harnblasenkarzinom werden auch bei Karzinomen der Lunge (53), der Haut (74), des Ovars (89) und der Niere (13) Chromosom 9-Deletionen gefunden. Molekulargenetisch finden sich zwei LOH-Bereiche auf 9p21, den Genloci der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) N2A (p16/p14arf) und N2B (p15) (40), die als Zellzyklus-Kontrollgene fungieren. Daneben existieren weitere Suppressor-Genloci auf 9q, welche unter anderem für das Zellzyklus-Kontrollgen DBCCR1 (Deleted in Bladder Cancer Chromosome Region candidate 1) codieren. DBCCR1-Genverluste finden sich in 50 % aller Harnblasentumore (29). Bei 30 – 80 % muskelinvasiver Harnblasenkarzinome wurde eine Inaktivierung des Retinoblastom 1 (Rb1)-Gens auf 13q14 beobachtet (12, 37, 49), meist als Folge von heterozygoten 13q-Deletionen bei gleichzeitiger Mutation des verbleibenden Allels (17). Das Rb1-Gen ist maßgeblich an der Zellzyklus-Regulation beteiligt, daher besteht ein Zusammenhang zwischen Geninaktivierung und invasivem Wachstumsverhalten (12, 38, 72). Mehrere Studien belegen, dass Rb-Genveränderungen mit einer verringerten Überlebensrate der erkrankten Patienten einhergehen (18, 49).

Bei bis zu 40 % der Harnblasenkarzinome wurde in zytogenetischen Studien eine Polysomie (> 2 Zentromersignale) des Chromosom 17 entdeckt. Diese Veränderung ist dabei mit einem hohen Tumorgrad und invasivem Wachstum assoziiert. Gleichzeitig ist

beim Vorliegen einer Polysomie 17 besonders bei pTa-Tumoren mit einer Tumorprogression zu rechnen, unabhängig vom histologischen Grad (62).

Chromosomenort	Frequenz der Genalteration			Chromosomenort	Frequenz der Genalteration		
	Karyotypisierung	CGH	LOH		Karyotypisierung	CGH	LOH
1p-	18 %	n.a.	20 %	9p-	22 %	31-47 %	33-82 %
1q+	11 %	37-54 %		9q-	27 %	23-47 %	43-90 %
2p+	2 %	8-30 %		10p+	4 %	13-19 %	
2q-	13 %	17-30 %	58 %	10q-	11 %	18-28 %	39-45 %
3p-	4 %	2-9 %	23 %	11p-	11 %	24-43 %	9-72 %
3q+	7 %	7-24 %		11q-	9 %	22-34 %	17-30 %
4p-	7 %	8-21 %	22 %	12p+	4 %	4-30 %	
4q-	4 %	10-30 %	26 %	12q+	9 %	14-30 %	
5p+	20%	24-25 %		13q-	18 %	19-29 %	15-32 %
5q-	9 %	16-30 %	6-50 %	17p-	2 %	19-24 %	32-57 %
6p+	7 %	16-24 %		17q+	4 %	29-49 %	
6q-	18 %	19 %	27 %	18q-	4 %	13-30 %	36-51 %
7p+	13 %	20-23 %		20q+	7 %	22-28 %	
8p-	16 %	29 %	18-83%	Y	11 %	15-37 %	
8q+	11 %	37-54 %					

Tabelle 2: Prozentuales Vorkommen genetischer Veränderungen nach unterschiedlichen Untersuchungsmethoden bei pT1-4 Urothelzellkarzinomen (nach (21)).

Es ist schwierig, eine Abfolge einzelner genetischer Veränderungen für die Karzinomentstehung hierarchisch festzulegen, da in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode die prozentuale Häufigkeit der beteiligten chromosomalen Anomalien schwankt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass ein Verlust von Teilen von Chromosom 9 oder des gesamten Chromosoms die häufigste genetische Veränderung beim Harnblasenkarzinom darstellt, die mit der Karzinomentstehung assoziiert ist (31) und früh in der Karzinogenese auftritt (64). Im Rahmen einer fortschreitenden Tumorentwicklung finden sich zunehmende chromosomale Instabilität und Aneuploidie (31).

Neben Funktionseinbußen der Tumorsuppressorgene spielen Genveränderungen bei Onkogenen, die an die betroffenen Genloci angrenzen, eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung. Gehäuft sind die transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinase HER2/neu, Topo-isomerase 2 Alpha (TOP2A), h-ras, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), Cycline und MDM2 (murine double minute-2) beteiligt. Diese Onkogene werden durch Überexpressionen und Genamplifikationen aktiviert.

Die hinsichtlich Tumorrezidiv und Prognose am aussagekräftigsten erscheinenden Onkogene (65, 90, 91) sind CDK und Cycline. Das Cyclin D1-Gen (CCND1) auf 11q13

ist in 10 – 20 % der Harnblasenkarzinomfälle genamplifiziert (8, 76, 87), in 30 – 50 % überexprimiert (66, 90, 91) und somit das am häufigsten veränderte Onkogen beim Harnblasenkarzinom.

1.1.4 Diagnostik

Der Großteil der Patienten weist bei der Erstuntersuchung einen oberflächlichen Tumor auf (Ta, Tis, T1), bei 30 % liegt bereits eine Muskelinvasion vor. Da oberflächliche Harnblasenkarzinome überwiegend organerhaltend therapiert werden, ist eine zuverlässige Diagnostik unumgänglich. Initial steht die klinische Untersuchung des Patienten mit Palpation des Nierenlagers, des Unterbauchs und des inneren Genitales (rektale und/oder vaginale Untersuchung). Neben Laboruntersuchungen und Harnkulturen kommt der zytologischen Untersuchung des Urins eine besondere Bedeutung zu (57). Für die Exfoliativzytologie wird Spontanurin, Katheterurin oder Blasenspülflüssigkeit verwendet; Sammelurin oder Morgenurin ist aufgrund degenerativer Zellveränderungen nicht geeignet. Der Spontanurin enthält beim Gesunden im Normalfall nur wenige regelrechte Urothelien, die Blasenspülflüssigkeit weist einen hohen Zellgehalt mit Urothelien aller Epithelschichten auf. Urotheliale Karzinomzellen fallen besonders durch Kernatypien und eine gesteigerte Kern-Zytoplasma-Relation auf. Die Kerne sind meist unregelmäßig konturiert, pleomorph und deutlich vergrößert (siehe Tabelle 3).

<u>Zytopathologische Merkmale maligner Urothelzellen</u>
• betont exzentrische Kernlagerung
• mosaikartige Kernlagerung in Urothelzellgruppen./-verbänden
• Kern-Zytoplasma-Verhältnis > 1 : 2
• starke Kernpleomorphie
• Nukleolen in einigen/vielen Tumorzellen
• scholliges, unregelmäßig verteiltes Chromatin
• im Spontanurin gesteigerter Urothelzellgehalt

Tabelle 3 (nach (27))

Die Sensitivität und Spezifität der Zytologie für die Erkennung des in-situ, als auch des invasiven Urothelkarzinoms mit starken Kernatypien liegt bei > 95 %, ist jedoch bei Karzinomen mit geringeren Atypien (G1-2) vergleichsweise wenig zuverlässig (27). Gut differenzierte Tumore entgehen in mehr als 50 % der Fälle einer urinzytologischen Diagnostik. Begleitende Harnwegsinfekte, Harnsteinleiden etc. schränken die Spezifität durch falsch-positive Ergebnisse ein (57).

Da es schwierig ist, reaktive Zellveränderungen mit leichten und mäßigen Kernanomalien (z.B. im Rahmen von Entzündungen) von einem malignen Geschehen sicher zu unterscheiden (28), werden zunehmend immunchemische Nachweisverfahren und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Genanalysen zur Erkennung chromosomaler DNS-Störungen eingesetzt. Bei der DNS-Zytometrie werden die Urothelien mit DNS-Fluoreszenzfarbstoffen versetzt und der DNS-Gehalt im Laserlicht des Durchflusszytometers bestimmt, der somit Rückschlüsse auf Neoplasien oder Entzündungen liefert. Da für dieses Verfahren eine größere Menge dissoziiert liegender Urothelien benötigt wird, die nur durch invasive Spülverfahren gewonnen werden kann, ist die generelle Anwendung zum Tumornachweis eingeschränkt (27).

Zur Detektion von Harnblasenkarzinomen sowie zur Bestimmung von Tumorstadium und -grad werden verschiedene Verfahren herangezogen. Sie umfassen die Zystoskopie mit Biopsie als wichtigstes Tumornachweisverfahren, daneben bildgebende Verfahren (z.B. Computertomografie (CT)). Die transurethrale Elektroresektion (TUR) hat sowohl diagnostische als auch therapeutische Bedeutung. Bei Verdacht auf eine hämatogene Streuung sind Röntgen-Thoraxaufnahmen in zwei Ebenen zum Ausschluss von Lungenmetastasen obligat, daneben ist bei symptomatischen Patienten und bei muskelinvasiven Karzinomen eine Knochenszintigraphie indiziert (57).

Oosterlink et al. wiesen in Studien nach, dass in 95 % der Harnblasenkarzinomfälle die Diagnose bereits durch Zystoskopie gestellt werden konnte (63). Da die Zystoskopie mit Probiopsien aller Blasenareale allein jedoch nicht alle Karzinome entdeckt, muss besonders in Zweifelsfällen eine weitere zytologische Kontrolle und histologische Abklärung durch transurethrale Elektroresektion (TUR) erfolgen (57). Die TUR gibt neben dem Tumorgrad Auskunft über Infiltrationstiefe und eventuelle begleitende Veränderungen. Dabei kommt den entnommenen Randbiopsien zusätzlich eine prognostische Bedeutung zu, da in bis zu 80 % der Fälle beim Vorliegen hochgradiger

Epitheldysplasien oder Tis im unmittelbaren Umfeld des Karzinoms mit einer Tumordiversion oder -rezidivneigung zu rechnen ist (3).

1.1.5 Graduierung und Stadieneinteilung (nach WHO-Klassifikation von 1973 (60))

Die anatomische Ausbreitung (Staging) des Harnblasenkarzinoms wird durch die TNM/pTNM-Klassifikation definiert, die im Rahmen unserer Studie nach den Regeln der UICC (1997) erfolgte (siehe Tabellen 4 und 5). Die T-Kategorie (Tumorinvasion) richtet sich nach dem histologischen Ergebnis der TUR. Von den 90 % als Transitional-Zell-Karzinom (TCC) eingestuften Blasenkrebskrankungen gibt es vier Untergruppen: präinvasive Karzinome (pTis), nicht invasive papilläre TCC (pTa), minimal invasive TCC (pT1) und muskelinvasive Tumore (pT2-4). Die N-Kategorie beschreibt den Befall regionaler Lymphknoten, die M-Kategorie eine hämatogene Metastasierung (Lunge, Leber, Knochen).

TNM-Klassifikation	
T – Primärtumor	N – Regionale Lymphknoten
TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden	NX Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
T0 Kein Anhalt für Primärtumor	N0 Kein Anhalt für regionale Lymphknoten
Ta Papilläres nicht- invasives Karzinom	N1 Metastase(n) in solitärem Lymphknoten, 2cm oder < in der größten Ausdehnung
Tis Carcinoma in situ	N2 Metastase(n) in solitärem Lymphknoten, > 2cm, jedoch < 5cm in der größten Ausdehnung
T1 Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe	N3 Metastase(n) in Lymphknoten mit mehr als 5cm in der größten Ausdehnung
T2 Tumor infiltriert Muskulatur	
T2a Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)	
T2b Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äussere Hälfte)	
T3 Tumor infiltriert perivesikales Gewebe	
T3a mikroskopisch	M – Fernmetastasen
T3b makroskopisch	MX Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
T4 Tumor infiltriert eine der folgenden Strukturen: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand	M0 Kein Anhalt für Fernmetastasen
T4a Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina	M1 Fernmetastasen
T4b Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand	

Tabelle 4 (nach (21))

Beim Vorliegen mehrerer synchroner Karzinome wird bei der pTNM-Klassifikation der am weitesten fortgeschrittene Tumor berücksichtigt und der pT-Kategorie entweder (m) oder die Zahl synchroner Karzinome in Klammern beigefügt.

Stadieneinteilung (Staging)			
Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, b	N0	M0
Stadium III	T3a, b	N0	M0
Stadium IV	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1, N2, N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 5 (nach (21))

Der histopathologische Differenzierungsgrad (Grading) richtet sich nach zellulärer Anaplasie in drei Grade G1-G3, wobei G1 den geringsten Grad an Anaplasie beschreibt. Weniger subjektiv ist eine Einteilung der Urothelkarzinome nach Helpap (siehe Tabelle 6).

Grading der Urothelkarzinome nach Helpap (1989)

G	Zahl der Zelllagen	Mitosen	Kern-Plasma-Relation	Kernfärbbarkeit	Sonstiges
G1	>7	Vereinzelt in Basalzone	1 : 4	Leicht	
G2	>20	Bis 5/Gesichtsfeld (40x)	1 : 2	Mäßig	
G3		> 5 /Gesichtsfeld (40x)	> 3 : 4	Stark	Starke Kernpolymorphie, Riesenzellen

Tabelle 6 (nach (57))

Fakultativ können bei Urothelkarzinomen weitere histomorphologische Parameter beschrieben werden wie Invasionstyp, peritumoröse Entzündung, auffällige Stoma-reaktionen sowie eine zusätzliche Lymphgefäß- und Veneninvasion (L- bzw. V-Kategorisierung) (57).

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Oberflächliche Karzinome (Ta, Tis, T1)

Bei oberflächlichen Karzinomen kommt die transurethrale Elektresektion (TUR) als diagnostischer und kurativer Eingriff zum Einsatz mit vollständiger Entfernung des Tumorgewebes im Gesunden. Um eine mögliche Rezidiv- und Progressionstendenz zu verringern, kann zusätzlich eine adjuvante Instillationstherapie bei gegebener Indikation erfolgen. Diese wird hauptsächlich in Abhängigkeit von Stadium und Differenzierungs-

grad getroffen. Für die Therapie stehen Zytostatika (Doxorubicin, Mitomycin C) und der Immunmodulator BCG (Bacillus Calmette-Guérin) zur Verfügung (46, 47). Verschiedene bestehende Therapieschemata gleichen sich in einer Induktionsphase von 6 bis 8 Wochen, die dann in eine Erhaltungsphase im Sinne einer Langzeittherapie von Monaten bis mehreren Jahren übergeht (57). Bei Nichtansprechen der Therapie und einem Rezidiv innerhalb von 3 bis 6 Monaten ist eine radikale Zystektomie indiziert (39).

1.1.6.2 Muskelinvasive Karzinome (T2-T4, NxM0)

Die radikale Zystektomie ist die Standardtherapie muskelinvasiver Karzinome, deren Prognose mit der T-Kategorie und dem Behandlungsverfahren korreliert. Sie erfolgt in der Regel mit einer pelvinen Lymphadenektomie, der vor allem eine diagnostische Bedeutung im Hinblick auf das Tumorstadium zukommt. Bei funktioneller Inoperabilität (z.B. schlechtem Allgemeinzustand oder erhöhtem Operationsrisiko) ist eine Radiotherapie indiziert (57). Diese wird auch palliativ zur Symptomreduktion eingesetzt.

Beim Vorliegen von Fernmetastasen hat eine adjuvante Chemotherapie nach radikaler Zystektomie in mehreren Studien einen Überlebensvorteil aufzeigen können (93, 97), jedoch scheint eine primäre Polychemotherapie vor operativer Blasenentfernung keinen positiven Effekt auf die 2-Jahresüberlebensrate (JÜR) zu haben (51).

1.1.7 Prognose

Beim invasiven Harnblasenkarzinom haben sich in Studien Multifokalität des Tumors (83), eine Tumorgöße von > 3cm und gleichzeitiges Vorliegen eines CIS (102) als hohe Risikofaktoren bezüglich Karzinomrezidiv und –progression herausgestellt (80). Daneben sind ein Ausbreiten des Tumors über die Blasenwand, Infiltration des Bereichs der Harnleitermündung, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen mit einer schlechten Prognose assoziiert (30).

Morphologisch sind Grad und Stadium des Tumors prognoseweisend. Der histologische Grad besitzt hauptsächlich Bedeutung bei früh invasiven pT1-Tumoren. Patienten mit G1pT1-Tumoren haben nach entsprechender therapeutischer Intervention keine signifikant verringerte Lebenserwartung (16, 20). Von besonderer Aussagekraft ist die

pT-Kategorisierung. Studien ergaben, dass Tumore mit Invasion über die Lamina muscularis mucosae hinaus eine deutlich erhöhte Progressionstendenz aufweisen (32, 107). Hochgradige Tumore infiltrieren oft noch nicht die Muskulatur, zeigen jedoch bei dieser Eindringtiefe eine Rezidivrate von 80 %, Tumorprogression von 60 % und somit eine 10-JÜR von nur etwa 35 % (59). Des Weiteren beeinflusst eine lymphogene und/oder hämatogene Streuung die Prognose nachhaltig, so dass beim Vorliegen von Metastasen bei pT1-Karzinomen die 5-JÜR bereits auf 44 % sinkt (48).

Einige genetische Veränderungen sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Neben Veränderungen des TP53-Tumorsuppressor-Gens und des Rb-Genes kommen denen der Cyclin-abhängigen Kinasen, besonders p21 und p27, prognostische Bedeutung zu. Stein et al. zeigte an Untersuchungen von 242 invasiven Harnblasen-Karzinomfällen, dass p21-negative Karzinome im Vergleich zu p21-positiven Tumoren die schlechtere Prognose aufweisen (96). Zu ähnlichen Ergebnissen kam Quereshi et al. hinsichtlich der Expression von p27; hierbei betrug die Langzeitüberlebensrate 60 % bei Patienten mit p27-positiven Tumoren im Gegensatz zu 0 % bei p27-Negativität (100).

1.1.8 Lösungswege zum verbesserten Nachweis von Urothelkarzinomen

Das Harnblasenkarzinom ist ein häufiges urogenitales Karzinom. Ziel ist daher, bei meist geringer Beschwerdesymptomatik und gleichzeitig oft bereits bei Diagnosestellung vorliegendem infiltrativen Tumorwachstum Methoden für eine sichere Erkennung von Primärkarzinom und Rezidiv zu entwickeln. Bisher sind Zystoskopie und zytologische Begutachtung diagnostische Standardverfahren. Sie sind jedoch nicht uneingeschränkt anwendbar (Invasivität des Eingriffs und Häufigkeit von nötigen zystoskopischen Untersuchungen bei geringer Sensitivität der Zytologie für niedriggradige Harnblasenkarzinome (82)). Daher werden zunehmend neue Methoden entwickelt, Karzinome nicht-invasiv und trotzdem zuverlässig zu detektieren. Einer dieser neuen methodischen Ansätze beruht auf der chromosomalen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, die Gegenstand der vorliegenden Studie ist und auf die in den folgenden Punkten genauer eingegangen wird.

1.2 Chromosomale Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

1.2.1 Anwendungsgebiete

In der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms sind die Zystoskopie mit Biopsie und die zytologische Urindiagnostik Standard. Als DNS-analytische Methode ist in der Zytologie die Zytometrie ein anerkanntes Ergänzungsverfahren. Sie liefert wertvolle Zusatzinformationen und ist besonders beim Harnblasenkarzinom von diagnostischer Bedeutung. Kleine DNS-Veränderungen jedoch können zytometrisch nicht nachgewiesen werden und messbare genetische Alterationen lassen sich keinem bestimmten Chromosom bzw. Gen zuordnen. Dies gelingt mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die Darstellung spezifischer DNS-Sequenzen in Einzelzellen. Anders als in der Zytologie können Änderungen der Chromosomenzahl, chromosomale Teilverluste (Deletionen), Genamplifikationen und andere Aberrationen an zytologischen Präparaten weitgehend unabhängig von Fixations- oder Färbearbeit im Interphase-Zellkern identifiziert werden. FISH wird ebenso in der Diagnostik verschiedener anderer Tumorarten eingesetzt: zum Nachweis von HER2-Amplifikationen beim Mammakarzinom, NMYC-Amplifikationen bei Neuroblastomen und Nachweis einer 13q14-Deletion beim multiplen Myelom (10). Die Methode eignet sich besonders für die Analyse von soliden Tumoren wie dem Harnblasenkarzinom, die durch starke Polyploidie oder Polysomie mehrerer Chromosomen charakterisiert sind (22, 23). Wenig aggressive papilläre Urothelkarzinome mit geringen Atypien, die, wie bereits unter Punkt 1.1.4 angeführt, zytologisch nur schwer zu erfassen sind, können so aufgespürt werden. Ebenso eignet sich das Hybridisierungsverfahren für die Abgrenzung neoplastischer Zellveränderungen von reaktiven Alterationen, die zum Beispiel bei Harnwegsinfekten, Blutungen oder nach Zytostase auftreten sowie für eine sensitive Verlaufsbeobachtung (27).

1.2.2 FISH-Methodik

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden DNS-Zielsequenzen mit spezifischen Proben markiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Grundsätzlich kommen zwei verschiedene Typen von FISH-Proben zum Einsatz: Proben für die Zentromerregion (mit repetitiven DNS-Sequenzen), die zur Zählung der Kopiezahl

von Chromosomen verwendet werden und Proben für spezifische Genlokalisierungen (Genloki), mit denen sich Verluste (Deletionen) und Zugewinne (Amplifikationen) bestimmter Chromosomen bzw. Chromosomenorte erfassen lassen (10). Verwendet werden bei der Diagnostik von Harnblasenkarzinomen Urothelzellen in der Interphase aus Spontanurin, Katheterurin oder Blasenspülflüssigkeiten (27). Als Marker dienen fluoreszenzmarkierte Sonden für Chromosom 3, 7, 17 und den Genlocus 9p21. Initial werden die zellulären Proteine durch Proteasen „verdaut“, damit die Hybridisierungssonden in die Zelle und den Zellkern eindringen können. Die Denaturierung zellulärer DNS durch Kombination von Hitze, Formamid und Säure führt zur Öffnung des DNS-Doppelstranges. Die fluoreszenzmarkierten Sequenzen der FISH-Probe lagern sich im nächsten Schritt an die komplementäre Stelle der betreffenden Chromosome an (10) (siehe Abbildung 1). Überschüssige Probe wird nach der Hybridisierung durch einen Waschschrift entfernt.

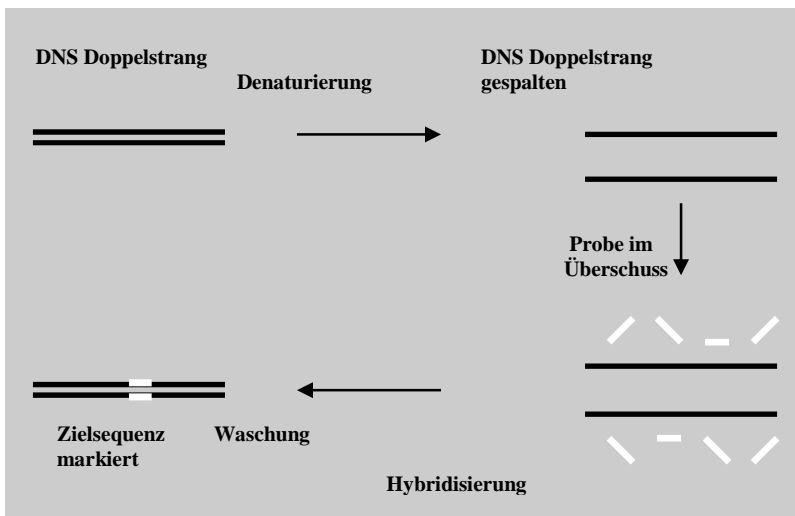


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der elementaren Schritte der FISH-Technik (nach (10))

1.2.3 FISH-Auswertung

In der Regel können nach Hybridisierung mit den Sonden fluoreszenzmikroskopisch zwei Signale nachgewiesen werden - entsprechend dem doppelten Chromosomensatz normaler Zellkerne (27). Verlust eines der beiden Chromosome führt zu Monosomie, bei erhöhter Chromosomenanzahl liegt eine Polysomie vor. Ebenso wie das Vorkommen von Zellen mit ungerader Zahl von Signalen (Aneuploidie) sind diese Veränderungen Malignitätskriterien. Polysomie ist bei Tumorzellen meist Ausdruck

einer allgemeinen chromosomalen Instabilität. Verluste oder Zugewinne kurzer DNS-Sequenzen sprechen für eine veränderte Genfunktion: Deletionen weisen auf eine fehlende oder verminderte „Bremswirkung“ eines Tumorsuppressorgens hin, Zugewinne gehen mit einer erhöhten Genaktivierung einher. Dabei führen hochgradige Amplifikationen mit mindestens 3x mehr Gensignalen als Referenzsignalen meist zu einer deutlichen Aktivierung und Überexpression von Onkogenen (siehe Abbildung 2) (10).

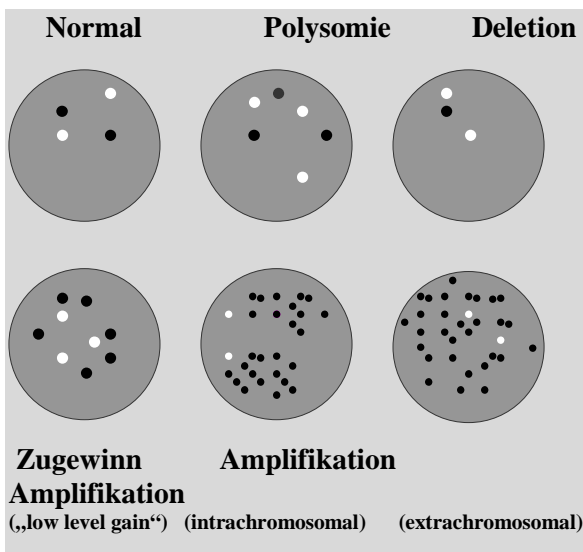


Abbildung 2: Zentromerprobe = weiß; Genprobe = schwarz
Normale Zelle = zwei Zentromer- und zwei Gensignale; **Polysomie** (am Beispiel Trisomie) = drei Zentromer- und drei Gensignale; **Deletion** = weniger Gensignale als Zentromersignale; **„low level gain“** = mehr Gensignale als Zentromersignale (nicht über den zweifachen Wert); **Amplifikation** = eindeutig mehr Gensignale als Zentromersignale, Lagerung der Gensignale in umschriebenen Haufen (intrachromosomal) oder diffus (extrachromosomal) (nach (10)).

1.2.4 Untersuchungen mit der chromosomalen FISH-Diagnostik

FISH-Untersuchungen zeigten in bisher veröffentlichten Studien eine höhere Sensitivität für die Detektion von Rezidiven von Harnblasenkarzinomen als die Urinzytologie und können als Zusatzverfahren bei Screening-Untersuchungen eingesetzt werden (103). Dadurch lassen sich zystoskopische Nachsorgeuntersuchungen individuell planen und ein nötiges kurzzeitiges intervenierendes Verhalten kann forciert, im Gegenzug eine abwartende Vorgehensweise gerechtfertigt werden. Nach Bubendorf et al. (10) liegt sehr wahrscheinlich bei der Mehrzahl von zystoskopisch unauffälligen, aber FISH-positiven Resultaten eine makroskopisch nicht erfassbare Neoplasie vor, die sich erst im Verlauf zu einem sichtbaren Tumor entwickelt. Patienten mit diesen Ergebnissen

benötigen daher auch bei negativem Zystoskopiebefund engmaschige Kontrollen. Umgekehrt gilt bei negativem FISH-Befund, dass die Kontrollintervalle bei niedrigem Rezidivrisiko verlängert werden können (10). Die FISH-Methodik soll daher eine bessere Einschätzung des malignen Geschehens hinsichtlich eines Rezidivs und der Progression bieten und eine bessere Therapieplanung erlauben.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Das Harnblasenkarzinom ist ein häufiges Karzinom. Hauptpfeiler der Diagnostik bilden Zystoskopie mit Biopsie, histologische Untersuchung und Urinzytologie. Mehr als zwei Drittel aller Harnblasenkarzinome rezidivieren (73), zum Teil mit Tumorprogression (62). Daher ist eine sichere Diagnostik mit darauf abgestimmter Therapie entscheidend. Die Zystoskopie muss in regelmäßigen Intervallen erfolgen und ist als invasiver Eingriff mit Risiken verbunden. Sie stellt für den Patienten eine belastende diagnostische Methode dar. Die nicht-invasive Urinzytologie wiederum erfasst Zellveränderungen, besonders bei niedriggradigen Karzinomen, nicht sicher genug, um als alleinige diagnostische Nachweismethode auszureichen (die Sensitivität für Detektion von G1-3-Tumoren beträgt in der Zytologie 20 - 80 % (50, 75, 106)). Daher sind weitere diagnostische Marker wünschenswert, mit deren Hilfe Harnblasenkarzinome sicher und nicht-invasiv an Urinproben detektiert werden können.

In dieser Studie wird die Anwendbarkeit der chromosomalen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durch das UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) zum Nachweis von Harnblasenkarzinomen untersucht. Mit der vorgelegten Studie soll die Tauglichkeit des Verfahrens im Routineeinsatz geprüft werden. Dieses Ziel wurde verfolgt mit der Anwendung der FISH-Methodik mit dem UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit an ungefärbten, an Hämatoxylin-Eosin (HE)- und an Papanicolaou (Pap)-gefärbten Spontanurinproben, an Präparaten von Blasenspülungen und Ersatzblasenurin. Im Einzelnen beabsichtigen wir

1. die Durchführbarkeit der Methode an bereits zytologisch aufbereiteten (gefärbten) Präparaten zu untersuchen;

2. einen Vergleich zu führen zwischen zytologischem Untersuchungsergebnis und FISH-Resultat;
3. zytologisch zweifelhafte Befunde zu klären;
4. retrospektiv festzustellen, ob eine im Verlauf beobachtete Karzinomentwicklung (positives follow-up) bei noch negativen zytologischen Resultaten zu einem früheren Zeitpunkt durch die FISH-Methode vorhersagbar gewesen wäre.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Für die Versuchsreihen wurden Urinproben von insgesamt 79 Patienten untersucht. In unserem Untersuchungsgut waren unter den positiven Proben nur urothelial differenzierte Karzinome enthalten (histopathologische Einteilung G1- bis G3-Karzinome). Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war, dass Ergebnisse der Kontroll- oder Nachuntersuchungen der klinischen Verlaufsbeobachtung verfügbar waren. Die Zeitdauer zwischen zytologischem Primärbefund und erster zytologischer bzw. histologischer Nachuntersuchung lag im Schnitt bei 3,2 Monaten (zwei Wochen bis 11 Monate). Der in diesem Zeitraum erhobene letzte Befund (follow-up) zum Patienten wurde als endgültige (richtige) Diagnose definiert. Im Patientenkollektiv waren 59 Männern und 20 Frauen (Tabelle 7). Das Durchschnittsalter lag bei 65 Jahren (33 bis 91 Jahre). Als Negativkontrollen dienten Urinproben von Patienten ohne Anhalt für ein Harnwegskarzinom in der Vorgeschichte. Mit „Z.n. Karzinom“ wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung karzinomfreie Fälle bezeichnet, bei denen ein Harnblasenkarzinom anamnestisch bekannt war. C0- Präparate bezeichneten einen zytologisch unverdächtigen Befund, C1 einen Befund mit geringen bis mäßigen Zellanomalien und C2 einen malignitätsverdächtigen zytologischen Befund. Als positives follow-up wurde ein progredientes Karzinom, ein Rezidiv oder das Neuauftreten eines Urothelkarzinoms in der Verlaufsbeobachtung gewertet.

Gruppe	Männer	Frauen	Gesamt
G1-Karzinom	2	1	3
G2-Karzinom	8	0	8
G3-Karzinom	2	1	3
C0	6	3	9
C1	5	3	8
C2	1	0	1
Z.n. Karzinom	19	1	20
Negativkontrolle	16	11	27
Gesamt	59	20	79

Tabelle 7: Anzahl der untersuchten Präparate, eingeteilt nach zytologischem bzw. histopathologischem Primärbefund und Geschlecht der Patienten.

2.2 Zellmaterial und –aufbereitung

Als Untersuchungsgut dienten Hämatoxylin-Eosin (HE)- oder Papanicolaou (Pap)-gefärbte und ungefärbte Zytozentrifugenpräparate von Proben, die aus Spontanurin, Blasenspülungen oder Ersatzblasenurin gewonnen wurden. Der Urin wurde nach Entnahme bis zur Weiterverarbeitung kühl gehalten, um eine Keimvermehrung zu verlangsamen. Die Blasenspülflüssigkeiten wurden durch Instillation von 50ml physiologischer Kochsalzlösung im Rahmen endoskopischer Untersuchungen gewonnen. Alle zu untersuchenden Flüssigkeiten (in der Regel 50 ml pro Einsendung) stammten aus der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg. Da diese Studie retrospektiv die Durchführbarkeit und diagnostische Wertigkeit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an zytologischen Routineeinsendungen untersucht, lag das Zellmaterial routinemäßig für die mikroskopische Untersuchung aufbereitet vor.

Im ersten Verarbeitungsschritt wurden die Proben in konische Zentrifugenröhrchen gefüllt und in einer Tischzentrifuge 6 Minuten lang bei 2500 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen der überstehenden Flüssigkeit bis auf ca. 1 – 2 ml des Überstandes wurde dieser zusammen mit dem Sediment in eine Zentrifugenkammer (funnel) pipettiert, mit Filterpapier und Objektträger aufgeklammert und in einer Zytozentrifuge (Shandon) bei 700 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert, das Präparat dann luftgetrocknet. Für Urinproben, die routinemäßig mit HE gefärbt werden sollten, erfolgte vor dem zweiten Zentrifugieren eine Zellfixierung mit 1 - 2 Tropfen 70 %igem Alkohol. Die Präparate wurden vor der Färbung sprayfixiert (Merckofix, Fa. Merck, Darmstadt). HE- und Papgefärbte Präparate wurden, anders als ungefärbte Proben, mit einem Deckglas versehen. Um zu gewährleisten, dass für die spätere Aufsichtfluoreszenzmikroskopie eine repräsentative Anzahl an einschichtig liegenden Zellkernen zur Bewertung vorhanden war, erfolgte vor Beginn der Sondenmarkierung eine lichtmikroskopische Beurteilung der Qualität des Präparates (200fache Vergrößerung). Auswahlkriterien für die Aufnahme zur Studie geeigneter Präparate waren das Vorhandensein von Zellarealen, die 100 - 200 Zellen im Blickfeld aufwiesen, möglichst frei von Verunreinigung (Bakterien, Zelldetritus o. ä.) waren und sich nicht in Clustern (Zellhaufen) präsentierten, um eine ausreichende Denaturierung der zellulären DNS und konsekutive Sondenmarkierung zu erreichen. Geeignete Präparatareale wurden nach der mikroskopischen Vorabprüfung mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite des Präparates markiert.

2.3 Vorbereitung gefärbter Präparate

Der Zeitraum zwischen primärer (zytologischer) Präparaterstellung und Beginn der FISH-Aufbereitung lag im Schnitt bei 2,6 Monaten (gleicher Monat bis 10 Monate). Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Präparate lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt worden.

Um gleiche Ausgangsbedingungen zwischen gefärbten und ungefärbten Präparaten zu schaffen, wurden die mit einem Deckglas versiegelten, gefärbten Präparate vorbehandelt. Im ersten Schritt erfolgte das Entdeckeln durch zweimalig fünfminütiges Waschen in Xylol mit anschließender Spülung in 100 %igem Alkohol 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Präparate in Aqua dest. gespült und 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im zweiten Schritt folgte die Entfärbung des Zellmaterials, um einen möglichst ursprünglichen Zellzustand wiederherzustellen. Die getrockneten Präparate wurden hierfür zunächst zwei Minuten in 2 x SSC bei 73°C im Wasserbad erhitzt und anschließend 20 Minuten bei 37,5°C in 0,5 ml Pepsin in 10mM HCl im Wasserbad inkubiert. Pepsin als Protease bewirkt eine Proteolyse der zytoplasmatischen Proteine und ermöglicht das spätere Eindringen der Gensonden. Nach fünfminütigem Waschen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei Raumtemperatur wurden die Präparate für fünf Minuten in 1 %igem Formaldehyd inkubiert und anschließend für die gleiche Zeit in PBS gereinigt. Als zusätzlicher Schritt wurden speziell die nach Pap-gefärbten Präparate danach zur Fixierung fünf Minuten bei Raumtemperatur in Carnoy-Lösung eingebracht, die sich aus Chloroform, Eisessig und Methanol zusammensetzt. Chloroform bewirkt eine Extraktion von Fettsubstanzen und erleichtert das Eindringen der eigentlichen Fixantien Methanol und Eisessig. Abschließend erfolgte die Inkubation aller Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %-, 80 %- und 100 %iger Alkohol für je fünf Minuten) und die Lufttrocknung bei Raumtemperatur.

Praktische Durchführung

- Lösen des Deckglases in Xylol 2x5'
- Fixierung in 100 % Alkohol 2x5'
- Spülen in Aqua dest. < 1'
- Lufttrocknung bei RT 15'
- Inkubation in 2 x SSC bei 73°C 2'
- Inkubation in Pepsin-Puffer bei 37,5°C 20'
- Waschen in PBS bei RT 5'

- Inkubation in 1 % igem Formaldehyd bei RT 5'
- Waschen in PBS bei RT 5'
- Fixierung in Carnoy-Lösung bei RT (Pap-Präparate) 5'
- Inkubation in 70 %, 80 %, 100 % Alkohol je 5'
- Lufttrocknung bei RT 15'

2.4 Vorbereitung ungefärbter Präparate

Vor der Sondenanwendung mit dem UroVysion™-Kit wurden alle Präparate weitgehend nach dem Schema des Herstellers vorbehandelt und fixiert. Zuerst wurden die trockenen Präparate 2 Minuten lang in 2 x SSC bei $73^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend erfolgte ein Einbringen für 20 Minuten in eine Proteaselösung bei $37,5^{\circ}\text{C}$. Die Proteaselösung war zuvor bei Erreichen der Arbeitstemperatur durch Zugabe von 25 mg Pepsin zu 50 ml 2 x SSC durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren für eine homogene Durchmischung erstellt worden. Hierbei wurde vom vorgegebenen Protokoll des Herstellers abgewichen, der ein Verbleiben der Präparate von 10 Minuten \pm 1 Minute in der Proteaselösung vorsieht. Diese Zeit hat sich im Vergleich zur von uns verwendeten doppelten Einwirkzeit der Protease als unbefriedigend herausgestellt, da die Sondenmarkierung bei der späteren Auswertung der Präparate mit 10minütiger Pepsin-Einwirkzeit aufgrund der unzureichenden Proteinaufschlüsselung nur ungenügend oder teilweise gar nicht erfolgt war.

Nach dem proteolytischen Verdau folgten Wasch- und Fixierungsvorgänge von jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dabei wurden die Präparate zuerst in PBS inkubiert, danach in 1%igem Formaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Es folgte eine Dehydrierung für die Dauer von jeweils 1 Minute in 70-, 80- und 100 %igem Ethanol. Abschließend wurden die Präparate schräg aufgestellt luftgetrocknet.

Praktische Durchführung

- Inkubation in 2 x SSC bei $73^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 2'
- Inkubation in Proteaselösung bei $37,5^{\circ}\text{C}$ 20'
- Waschen in PBS bei RT 5'
- Fixierung in 1 %igem Formalin bei RT 5'
- Waschen in PBS bei RT 5'
- Dehydrierung in 70 %, 80 %, 100 % Alkohol je 5'
- Lufttrocknung bei RT

2.5 Sonden-Anwendung und Hybridisierung

Die für den sich nun anschließenden Hybridisierungsvorgang verwendete Sondenmischung entstammt dem UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden).

Die Sondenmischung wurde bei -20°C unter Lichtabschluss gelagert. Aufgrund der lichtempfindlichen Fluorophore wurden die folgenden Arbeitsschritte mit indirekter Lichtquelle durchgeführt. Die Sondenmischung wurde nach dem Auftauen bei Raumtemperatur in einem Vortex durchmischt und danach für 1 - 3 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden 2,5 µl Sondenmischung auf das zuvor gekennzeichnete Areal des Präparates pipettiert und luftfrei mit einem runden Deckglas versehen, welches mit Rubber Cement abgedichtet wurde. Hier wurde vom Herstellerprotokoll abgewichen, welches zur Hybridisierung einen Einsatz von 3 µl Sondenmischung angibt. Es wurden in Vergleichsuntersuchungen in unserem Labor jedoch keine Unterschiede beim Hybridisierungsergebnis durch die geringere Sondenmenge festgestellt. Für die folgende Denaturierung wurden die Präparate in den Heizblock (HyBrite™-Gerät, Vysis Inc., Downers Grove, USA) eingelegt, der gleichzeitig als Hybridisierungskammer diente. Da beide Vorgänge ein feucht-warmes Klima benötigen, wurden die seitlichen Aussparungen neben der Heizplatte im Gerät mit feuchten Papiertüchern ausgelegt. Automatisch eingestellt erfolgte die Denaturierung der DNS der Präparate bei 73°C über zwei Minuten und danach die Hybridisierung mit der Sondenmischung für 20 Stunden bei 39°C.

Praktische Durchführung

- Auftauen der Sondenmischung bei RT
- Vortexen und Zentrifugieren der Sondenmischung je 2“
- Auftragen von 2,5 µl Sondenmischung
- Versiegeln des Präparates mit rundem Deckglas
- Einbringen der Präparate in HyBrite™-Gerät
- Denaturierung der DNS bei 73°C 2’
- Hybridisierung mit Sondenmischung bei 39°C 20h

2.6 Waschvorgänge und Gegenfärben

Da die Sondenmischung und das später verwendete DAPI II-Gegenfärbemittel durch beinhaltete Fluorophore sehr lichtempfindlich ist, erfolgte die weitere Bearbeitung der

Präparate nach erfolgreicher Hybridisierung ab diesem Zeitpunkt bei indirekter Beleuchtung.

Nach Beendigung der Hybridisierung und Entfernung der Deckgläser wurden die Präparate je 2 Minuten lang bei 73°C zuerst in 0,4 x SSC / 0,3 NP-40 und anschließend in 2 x SSC / 0,1 NP-40 inkubiert. NP-40 (Nonidet P-40) löst als nichtionisches Detergens in Waschvorgängen die kern- und zytoplasmatischen Proteine aus den Zellen heraus. Anschließend wurden die Präparate schräg gestellt und im Dunklen bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Abschluss wurden 10 µl DAPI II- Gegenfärbemittel auf die Hybridisierungsareale pipettiert und die Präparate mit einem rechteckigen Deckglas luftleer bedeckt, dieses wurde mit Nagellack versiegelt.

Praktische Durchführung

- Waschen in 0,4 x SSC/ 0,3 NP-40 bei 73°C 2'
- Waschen in 2 x SSC/ 0,1 NP-40 bei 73°C 2'
- Lufttrocknung bei RT
- Auftragen von 10 µl DAPI II- Gegenfärbemittel
- Abdecken des Präparates mit eckigem Deckglas

2.7 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Fluoreszenzfilter wurden entsprechend den Vorgaben in der Anleitung vom Hersteller des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit bezogen und eingesetzt. Die Begutachtung und spätere Analyse aller hybridisierten Präparate erfolgte ohne Kenntnis des initial erhobenen zytologischen Befundes, um Objektivität zu gewährleisten. Vor der Auswertung mit dem Auflichtfluoreszenzmikroskop wurden zunächst bei 200facher Vergrößerung im DAPI-Fluoreszenzfilter für die Analyse geeignete Areale detektiert. Die tatsächliche Auswertung der Präparate erfolgte bei 630facher Vergrößerung in jedem einzelnen der vier Fluoreszenzfilter. Insgesamt wurden pro Präparat 25 morphologisch auffällige Zellkerne analysiert und die Ergebnisse notiert. Bei erschwerten Fluoreszenzbedingungen des Präparates, z.B. durch parallele bakterielle Kontamination, wurden die doppelte Anzahl an Zellkernen mikroskopisch untersucht, da aufgrund der schlechten Präparatequalität nicht jeder ausgewählte Zellkern aussagekräftig interpretiert werden konnte. Alle Zellkerne innerhalb des zuvor ausgewählten und meanderförmig durchgesehenen Areals wurden begutachtet.

2.7.1 DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie)

Die Darstellung der Zellkerne im DAPI-Filter erlaubt Aussagen über die Zellkernmorphologie. Auffällig sind dabei unregelmäßig begrenzte oder vergrößerte Zellkerne, die von der normal glatt konturierten, regelmäßigen Kernform abweichen. Die DAPI-Sättigung normaler Zellkerne zeigt eine gleichmäßige helle, bläuliche Fluoreszenz, entsprechend einer ausgeglichenen Chromatinverteilung. Bei Störungen in der Chromatinstruktur können sich löchrige Bereiche (verminderte Fluoreszenz) bilden, die einem „wolkigem“ Gesamtbild innerhalb des Zellkerns entsprechen oder lokal verdichtete, „schollige“ Areale (verstärkte Fluoreszenz), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für abnorme Kernveränderungen sprechen. Daneben können unterschiedlich zahlreiche unauffällige Zellkerne im gleichen Präparat auftreten.

2.7.2 Rot-Grün-, Aqua-, Gold-Fluoreszenzfilter (Chromosome 3, 7, 17 und Genlokus 9p21)

Veränderungen in der Anzahl einzelner Chromosomen werden im Rot-Grün- (Chromosome 3 [rot] und 7 [grün]), Aqua- (Chromosom 17) und Gold-Fluoreszenzfilter (Genlokus 9p21) sichtbar. Anders als die morphologische Darstellung der Chromatinstruktur im DAPI-Filter erlauben diese Filter Einblicke in die chromosomale Zusammensetzung. Die einzelnen Chromosomen bzw. der Genlokus 9p21 stellen sich dabei als fluoreszierende Punkte innerhalb des Zellkerns dar. Dabei können einzelne Chromosome in Abhängigkeit ihres Zellzyklus teilweise nicht komplett kondensiert sein und sich bei der Auswertung als schwach gefärbte Spiralen oder Fäden darstellen. Dann bleibt eine kräftige punktuelle Fluoreszenz, wie sie bei vollständig kondensierten Chromosomen zu sehen ist, aus.

2.8 Analyse und Interpretation

2.8.1 Analysekriterien und Dokumentation

Im ersten Schritt wurden die Präparate im Bereich des zuvor detektierten Areals im DAPI-Filter analysiert. Das Augenmerk lag dabei auf Zellkernen, die morphologische Auffälligkeiten aufwiesen (siehe 2.7.1). Nach diesen Kriterien erfolgte eine Einteilung der Morphologie des Zellkerns in: 1 = unregelmäßige Konturierung, 2 = „schollige“

Chromatinstruktur, 3 = „wolkige“ Chromatinstruktur, 4 = morphologisch unauffällige Zellkerne, 5 = Zellkernvergrößerung.

In den weiteren Schritten erfolgte die Beurteilung der Chromosomenzahl der einzelnen Zellkerne. Dazu wurden nacheinander die Farbfilter Aqua, Rot/Grün und Gold eingestellt.

In normalen Zellkernen erscheinen durch das Vorliegen des diploiden Chromosomensatzes für jede Sonde jeweils 2 Signale in der jeweiligen Farbe. In die Bewertung gingen Zellkerne ein, die eine Abweichung von diesem Normalsatz aufwiesen. Beim Nachweis der Chromosomen 3, 7 und 17 in den Filtern Rot/Grün und Aqua bedeutete dies eine Zunahme der Chromosomenzahl auf 3 oder mehr Signale, wobei jedes einzelne Sondersignal gezählt und zum entsprechenden Zellkern notiert wurde. Im Gold-Filter galt ein Fehlen eines oder beider gelben Sondersignale als abnormal, als Beleg für eine Deletion des markierten Genlokus 9p21 (siehe Tabelle 8).

Fallnummer	Zellkern	DAPI	Rot (Chr.3)	Grün (Chr.7)	Aqua (Chr.17)	Gold (Lk.9p21)
2907/03	1	4	3	3	3	-
	2	4	4	3	1	-
	3	4	-	-	-	-
	4	1	4	4	-	-
	5	1	4	4	4	-
	6	1, 2	-	-	-	-
	7	1	4	4	3	3

	25	4	3	3	-	1

Tabelle 8: Auszug aus schematischer Präparatedokumentation; DAPI-Verschlüsselung siehe 2.8.1; „-“ steht für den normal-diploiden Chromosomensatz (2 Gensignale) und geht nicht in die Wertung ein; Abweichungen von der Norm, die in die Wertung eingehen, sind **fett** gedruckt.

2.8.2 Interpretation

Die Auswertung der Präparatanalyse erfolgte nach zwei unterschiedlichen Bewertungsschemata. Zum einen fand eine Beurteilung nach den etablierten Kriterien von Vysis™ statt, die auf Erfahrungswerten aus Studien und Anwendung des Herstellers beruhen. Daneben hatten Bubendorf et al. in der so genannten „Basler Arbeitsgruppe“ ein abgewandeltes Auswertungsschema erstellt (11), welches in dieser Studie zusätzlich neben dem Vysis™-Schema erprobt und beurteilt wurde.

Nach Vysis™-Auswertung ist der Befund positiv (= maligne), wenn von 25 gezählten Zellkernen vier oder mehr eine Zunahme der Signale der Chromosomen 3, 7

oder 17 zeigen. Hierbei ist es unerheblich, ob sich innerhalb einer und/oder mehrerer Chromosomenreihen Zugewinne darstellen oder ob die gesamte Zelle polyploid ist. Gleiche Kriterien hinsichtlich der Anzahl abnormer Zellkerne gelten aufgrund besonderer Rahmenbedingungen auch bei der Auszählung von 50 Zellkernen pro Präparat (siehe 2.7). Ein Präparat gilt im Gesamten ebenso als positiv, wenn 12 oder mehr Zellkerne ein oder kein Signal für 9p21 zeigen.

Bei der Bewertung nach den Kriterien der Basler Arbeitsgruppe müssen 2 oder mehr Zellkerne eine Signalzunahme bei Chromosom 3, 7 und 17 oder einen Verlust eines oder beider 9p21-Signale aufzeigen, um das Präparat im Gesamten als positiv (= maligne) zu befunden. Von der Zählung sind hier, anders als bei der Auswertung nach Vysis™, tetraploide Zellen ausgeschlossen.

Polyploide, so genannte Schirmzellen (siehe Punkt 3.3.4), wurden bei beiden Schemata nicht in der Wertung berücksichtigt. Alle Ergebnisse wurden notiert und mit den Ergebnissen des jeweils anderen Auswertungsschemas, den zytologischen Untersuchungsergebnissen sowie dem klinischen Verlauf verglichen.

2.9 Präparateaufbewahrung

FISH-behandelte Präparate sind aufgrund der verwendeten Markierungssysteme (Sondenmischung und DAPI II-Gegenfärbemittel) sehr licht- und temperatur-empfindlich und anfällig für Feuchtigkeit. Die Präparate wurden daher während der mikroskopischen Auswertung verdunkelt auf Eis gelagert. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Präparate durch Einwickeln in Alufolie geschützt und bei -20°C in kältestabilen Plastikbehältern trocken eingefroren.

2.10 Reagenzien, Enzyme, Lösungen

Folgende, in alphabetischer Reihenfolge aufgeführte Reagenzien sind Bestandteile des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit, bezogen über die Firma Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden.

DAPI II-Gegenfärbemittel

DAPI II-Gegenfärbemittel (4,6-Diamidino-2-Penylindol) in 1,4-Phenylendiamin, Glycerin und Puffer im Lieferumfang von 1000 µl zum Gegenfärben der hybridisierten Präparate.

Nonidet P-40 (NP-40)

2 ml Nonidet P-40; nichtionisches Detergens zur Proteinauswaschung.

UroVysion™ Sonden-Mischung

UroVysion™ Sonden-Mischung bestehend aus Fluorophor-markierten zentromer-spezifischen Chromosomensonden (Chromosome Enumeration probe, CEP®) CEP 3 SpectrumRed™, CEP 7 SpectrumGreen™, CEP 17 SpectrumAqua™ und der Lokus-spezifischen Sonde (Locus Specific Identifier, LSI®) 9p21 SpectrumGold™ im Puffer aus Dextransulfat, Formamid und SSC im Lieferumfang von 300 µl für den Nachweis und die Quantifizierung der Chromosomen 3, 7, 17 und dem Lokus 9p21.

20 x SSC-Salz

66 g 20 x SSC- Salz, zusammengesetzt aus 43,9 g Natriumchlorid und 22,1 g Natriumzitat, zum Erstellen von bis zu 250 ml 20 x SSC-Lösung durch Auffüllen mit deionisiertem Wasser.

Daneben wurde ebenfalls von der Firma Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, das FISH-Reagenzien-Kit für die Präparate-Vorbehandlung mit folgenden Enzymen und Puffern angewandt:

Pepsin (2500- 3000 E/mg)

Pepsin-Protease im Lieferumfang von 3 x 25 mg zur Herstellung der Protease-Lösung durch Zugabe zu je 50 ml Pepsin-Puffer für die Proteolyse zytoplasmatischer Proteine.

Pepsin-Puffer

Puffer aus 10 mM HCl in einer Menge von 3 x 50 ml.

Phosphatgepufferte Salzlösung

Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline; PBS) 2 x 250 ml.

100 x MgCl₂

3 x 0,5 ml.

Die nachfolgend aufgeführten Lösungen wurden zusätzlich angesetzt und bei Raumtemperatur durch die Zugabe konzentrierter HCl- bzw. NaOH-Lösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

20 x SSC-Lösung

66 g 20 x SSC-Salz (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) werden zum Erstellen einer 20 x SSC-Lösung in 200 ml deionisiertem Wasser gelöst und bei RT auf pH 5,3 eingestellt.

0,4 x SSC / 0,3 % NP-40

20 ml 20 x SSC-Lösung mit einem Grund-pH-Wert von 5,3 werden mit 3 ml NP-40 (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) vermischt und mit 877 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt. Bei RT erfolgt anschließend die Einstellung der Lösung auf $\text{pH } 7,5 \pm 0,2$.

2 x SSC / 0,1 % NP-40

In 849 ml deionisiertem Wasser werden 100 ml 20 x SSC-Lösung (pH 5,3) und 1 ml NP-40 (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) gelöst. Ziel-pH-Wert ist $7,5 \pm 0,2$.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Zur Erstellung einer Stammlösung werden 8 g NaCl, 0,2g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ und 0,24 g KH₂PO₄ unter Rühren in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,4 bei RT eingestellt. Alle Bestandteile stammen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

1 % Formaldehyd-Lösung

1 % Formaldehyd-Lösung (Staub & Co Chemiehandelsgesellschaft mbH, Nürnberg) aus 12,5 ml 10 % neutral gepuffertem Formalin, 0,5 ml 2M MgCl₂ und 37 ml PBS.

Carnoy-Lösung

Die Carnoy-Lösung besteht aus 150 ml Methanol, 75 ml Chloroform und 25 ml Eisessig. Chloroform bewirkt die Extraktion von Fettsubstanzen und begünstigt somit das Eindringen der Fixantien Methanol und Eisessig in das Gewebe des Präparates. Alle Substanzen wurden von Merck Chemie GmbH, Darmstadt, bezogen.

Daneben wurden 70 %-, 80 %- und 100 %ige Ethanol-Lösungen (BrüggemannAlcohol GmbH & CO KG, Heilbronn) und Xylol (CSC Jäklechemie GmbH & Co. KG, Nürnberg) zum Fixieren und Waschen der Präparate verwendet. Konzentrierte Natronlauge (1 N NaOH) und konzentrierte Salzlösung (HCl) dienten dem Einstellen der gewünschten pH-Werte. NaOH und HCl wurden von Merck Chemie GmbH, Darmstadt, bezogen.

2.11 Geräte

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden zusätzlich zur gängigen Laborausstattung folgende Geräte benötigt:

Auflicht-/ Fluoreszenzmikroskop

Mikroskop Leica DM RBE (Firma Leica, Solms) mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenzeinrichtung zum parallelen Einsetzen farbiger Fluoreszenzfilter zur Detektion Fluoreszenz markierter Gensignale.

Fluoreszenzfilter

Einzelbandpass-Aqua-, Einzelbandpass-Gelb-, DAPI-Einzelbandpass- und DAPI/ Rot/ Grün-Triple-Fluoreszenzfilter zum Einsetzen in Fluoreszenzmikroskope. Alle Fluoreszenzfilter stammen von Vysis Inc., Downers Grove, USA, bezogen über die Firma Abott GmbH & Co KG, Wiesbaden.

Heizblock

Programmierbarer Heizblock mit integrierter Feuchtigkeitskammer (HYBrite™, Vysis Inc., Downers Grove, USA) zur Denaturierung und Hybridisierung.

3. Ergebnisse

3.1 Präparatekollektiv

Von den anfänglich 95 ausgewählten Präparaten stellten sich 79 Präparate als geeignet für die vorliegende Studie heraus. Die Gründe für die Nichtberücksichtigung von 16 Präparaten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Hauptausschlusskriterium war eine zu geringe Zellzahl im gesamten Präparat oder bezogen auf beurteilbare Zellkerne, die keine repräsentative Aussage hinsichtlich der Dignität des Präparates möglich machten. Ebenso erwies sich ein hoher Zellkernreichtum des Präparates als unbefriedigend, da durch Zellüberlagerung einzelne Zellkerne nicht von einander abgrenzbar waren und Sondensignale keiner bestimmten Zelle zugeordnet werden konnten. Daneben zeigten Zellkerne in einzelnen Proben für eine Auswertung zu schwache Sondensignale, da das Eindringen von Protease und Sonden in die Zellkerne aufgrund der gegenseitigen Überlagerung bei hoher Zellkerndichte nicht ausreichend erfolgt war. Weitere Gründe für einen Präparateausschluss waren unzureichende Entfärbung eines primär HE-gefärbten Präparates, Fehler in der Materialart und nachträglich festgestellte fehlende Verlaufskontrolle (siehe Tabelle 9).

Grund	Anzahl
Zellzahl zu gering	9
Sondenmarkierung zu schwach	3
Zellzahl zu hoch (Cluster)	1
Unzureichende Entfärbung	1
Keine Verlaufskontrolle	1
Falsche Materialart (\neq aus Harnblase)	1

Tabelle 9: Grund und Anzahl von Präparaten, die aus der Wertung genommen wurden.

Alle ausgewerteten Präparate zeigten trotz unterschiedlich langer Lagerung vor der Untersuchung keine Qualitätsunterschiede für die Anwendbarkeit des FISH-Verfahrens. Die Zeitdauer zwischen zytologischem Primärbefund und FISH-Bearbeitung lag zwischen 2 Wochen bis 10 Monaten (im Durchschnitt 2,6 Monate). Ebenso bestanden keine signifikanten Einschränkungen oder Vorzüge in Bezug auf Art der Materialgewinnung. Spontan-, Pouchurin und Blasenspülflüssigkeit unterschieden sich teilweise im Zellgehalt, der Zellzusammensetzung und in den Hintergrundbildern (wie Anzahl an

Schirmzellen, bakterielle Kontamination), was jedoch keine Auswirkungen auf Qualität oder Auswertbarkeit hatte.

Signifikante Unterschiede bestanden dagegen bei den Ergebnissen zwischen gefärbten und ungefärbten Präparaten. HE-gefärbte Präparate zeigten sich mit Ausnahme von einem unzureichend entfärbten bzw. drei zu schwach sondenmarkierten Präparaten nach entsprechender Entfärbung für die Anwendung und Diagnostik mittels FISH als vergleichbar geeignet wie ungefärbte Präparate. Davon wichen Papanicolaou-gefärbte Präparate ab. Trotz eines zusätzlichen Waschschrilles dieser Präparate in Carnoy-Lösung während der Entfärbung waren in der mikroskopischen Auswertung 9 der insgesamt 12 initial nach Pap-gefärbten Präparate überdurchschnittlich schwer auswertbar. Die Zellkerne erschienen während der Beobachtung in allen vier Fluoreszenzfiltern von einem grau-matten Schleier überdeckt, der eine Sondendetektion nachhaltig erschwerte. Interessanterweise stammen alle vier negativ diagnostizierten FISH-Ergebnisse bei positivem follow-up (falsch-negativ, siehe 3.5.2.2) aus diesem Präparatekollektiv, was die diagnostische Wertigkeit des FISH-Verfahrens an derartigen Präparaten einschränkt. Im Rahmen dieser Studie gelang es nicht, methodische Modifikationen für ein besseres diagnostisches FISH-Ergebnis an Papanicolau-gefärbten Präparaten zu etablieren.

3.2 FISH-Anwendung

Die FISH-Anwendung erfolgte in der vorliegenden Studie nach den Herstelleranweisungen des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit mit Abweichungen in zwei Punkten.

Im Originalprotokoll wird eine Proteasezeit von 10 Minuten \pm 1Minute für eine Proteolyse als ausreichend angegeben. Präparate, die für diese Zeit in Pepsin-Puffer inkubiert wurden, zeigten bei der mikroskopischen Auswertung nur sehr schwache Sondersignale, die schwer zu detektieren waren. Bei erhöhtem Zellgehalt des Präparates blieb die proteolytische Aufschlüsselung der Zellkerne aus, so dass aufgrund des fehlenden Eindringens der Sonden keine Fluoreszenzmarkierung stattfand. Da die Qualität der späteren Sondersignale und somit auch die diagnostische Aussagekraft entscheidend vom Proteolyseschnitt abhängig sind, wurde die Proteasezeit im Weiteren auf 20 Minuten bei unveränderter Temperatur erhöht. Diese Zeit erwies sich als

ausreichend für eine vollständige Proteolyse und erbrachte in der mikroskopischen Darstellung zufrieden stellende Resultate; eine weitere Erhöhung der Einwirkzeit zeigte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Neben Abweichungen hinsichtlich der Proteasezeit wurde im Verlauf der Studie die Menge der Sondenmischung für die Hybridisierung der Präparate abgewandelt. Nach Vorgaben von UroVysion™ werden 3 µl Sondenmischung pro Präparat benötigt. Eine Verringerung der Menge auf 2,5 µl Sondenmischung erwies sich als völlig ausreichend, um das zuvor gekennzeichnete Areal auf dem Objektträger (siehe Punkt 2.2) vollständig mit Sondenmischung für den Hybridisierungsschritt zu bedecken. Als positiver Nebeneffekt wurde dadurch ein Verrutschen des Deckglases aufgrund einer hohen Flüssigkeitsmenge auf dem Präparat mit der Gefahr des Zerreibens der Zellkerne bei Korrektur des Deckglassitzes umgangen.

3.3 Mikroskopische Analyse

3.3.1 DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie)

Neben der primären Beschreibung der Zellkernmorphologie dienten Auffälligkeiten der morphologischen Darstellung der Zellkerne im DAPI-Filter der indirekten Detektion genetischer Abweichungen. Dabei konnten Präparate ein durchweg homogenes Bild an Zellkernen bieten oder eine unruhige Darstellung mit unterschiedlichen Zellkerngrößen, Zellanhäufungen und -formen aufweisen. Besonderes Augenmerk galt Zellkernen, die sich von der Gesamtheit der übrigen Zellkerne abhoben. Unregelmäßig konturierte, pleomorphe Kerne, die in ihrer Gestalt teilweise pseudopodienartige Ausläufer aufwiesen, sprachen mit hoher Wahrscheinlichkeit für genetische Veränderungen. Ebenso waren vergrößerte Zellkerne und Chromatinveränderungen primär verdächtig für genetische Aberrationen (siehe Punkt 6.1, Abbildungen 4-8). In der Mehrzahl der Fälle erfüllten die untersuchten Zellkerne nicht nur eines der fünf beurteilten Morphologiekriterien (siehe Punkt 2.8), sondern im Schnitt drei pro Präparat. Interessanterweise stellte sich jedoch kein beschriebenes Kriterium im Einzelnen oder in der Summe als Beweis für Malignität dar, ebenso wenig wie eine unauffällige Zellkerndarstellung zwingend für einen normalen Chromosomenbefund sprach. Daneben erwies sich die Zellkerndarstellung im DAPI-Filter als Qualitätskriterium für das Präparat, da die Helligkeit der Fluoreszenz der Zellkerne für die Wirksamkeit der

zuvor stattgefundenen Proteolyse und Sondenmarkierung angesehen werden konnte. Je stärker und leuchtender sich das Präparat in seiner Gesamtheit unter Berücksichtigung der Rahmenbedingungen wie bakterieller Kontamination und Zellgehalt präsentierte, desto klarer war die Sondenmarkierung erfolgt.

3.3.2 Rot-Grün-Fluoreszenzfilter und Aqua-Fluoreszenzfilter

(Chromosome 3, 7 und 17)

Gut detektierbar zeigte sich die Sondenmarkierung von Chromosom 3 im Rot-Grün-Filter. Die markierten Chromosome fluoreszierten kräftig und erlaubten dadurch Auswertungen auch bei teilweise inkompletter chromosomaler Kondensation (siehe 3.3.4). In diesem Filter stellte sich der Zellkern zusätzlich zu den sichtbaren Sonden signalen grau dar und ermöglichte somit eine genaue Zuordnung von Signal zu Zellkern. Bei ausgeprägter Polyploidie des Chromosoms 3 kam es zum Teil zu einer starken Fluoreszenz der multiplen Sonden signale über die Umrisse der Zellkerne hinaus, was dem Präparat in der Gesamtheit einen rötlichen Schimmer verlieh. Dieser Hintergrund erschwerte die Auswertung der in diesem Filter gleichzeitig angeregten grünen Sonden signale. Die grüne Fluoreszenz des markierten Chromosoms 7 erwies sich in der Mehrzahl der Fälle aufgrund schwacher Intensität als deutlich schwerer auswertbar als die Sonden signale der Chromosomen 3 oder 17. Sie wurde leicht durch Farbabstrahlung anderer Fluoreszenz signale, Zellkerne oder Bakterien überlagert. Die Detektion der Fluoreszenz signale von Chromosom 17 mit dem Aqua-Filter erwies sich als gut durchführbar. Die blauen Sonden signale hoben sich von der in diesem Filter sehr dunklen Umgebungsdarstellung deutlich ab, nachteilig war lediglich die erschwerte Abgrenzbarkeit der einzelnen Zellkerne untereinander durch die geringe Hintergrundfluoreszenz (siehe Punkt 6.2, Abbildungen 9-12). Das Auftreten chromosomaler Aberrationen innerhalb eines Zellkernes konnte sowohl nur ein Chromosom als auch mehrere Chromosomen unter Einbezug von Genlokusdeletionen betreffen (zur Häufigkeit und Verteilung der genetischen Aberrationen siehe Punkt 3.4). Es lagen innerhalb desselben Sichtfeldes außerdem euploide Zellkerne neben gering- bis hochgradig genetisch veränderten Zellen.

3.3.3 Gold-Fluoreszenzfilter (Genlokus 9p21)

Schwierig gestalteten sich die Auswertungen des Genlokus 9p21 im Gold-Filter (siehe Punkt 6.3, Abbildungen 13-14). In euploiden Zellen befanden sich beide Sondensignale oft in unterschiedlichen Ebenen innerhalb des Zellkerns, so dass für eine richtige Interpretation der Zelle ein komplettes Durchfokussieren des Zellkerns in seinem gesamten Durchmesser Voraussetzung war. Bei unzureichender Durchfokussierung hätten viele Zellkerne durch nur ein einzelnes sofort sichtbares Sondensignal monosom für 9p21 bewertet werden können mit einer demgemäß falsch-positiven Bewertung.

Die Fluoreszenz im Gold-Filter erwies sich aufgrund des von Vorneherein schwachen Fluoreszenzsignals als besonders abhängig vom Erfolg der vorangegangenen Hybridisierungsschritte.

3.3.4 Schwierigkeiten bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertbarkeit

Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate waren einige Besonderheiten zu beachten. In fast jedem Präparat, vermehrt in Blasenspülflüssigkeiten, traten so genannte Schirmzellen auf. Diese Zellen sind physiologischerweise polyploid und von einem breiten, gut sichtbaren Zytoplasmasaum umgeben. Trotz des abnorm erscheinenden FISH-Befundes dürfen sie nicht in die Wertung eines Präparates eingehen. Die Auswertung eines Präparates kann durch Bakterien erschwert werden, die abhängig vom eingesetzten Fluoreszenzfilter unter Umständen starke punktuelle Fluoreszenzsignale erzeugen und damit umgebende Sondensignale überdecken. Für eine objektive Präparatauswertung erwies sich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Objektträger als unabdingbar. Bei ungenügendem Zytozentrifugenpräparat erschwerten Zellanhäufungen (Cluster) eine Abgrenzung einzelner Zellkerne untereinander oder eine erfolgreiche Hybridisierung war vollständig verhindert worden. Bei zu vehementer Sedimentation der Zellen auf dem Objektträger kam es zu einem Aufplatzen der Zellkerne. Die Hybridisierung griff auch in diesen Fällen, jedoch befanden sich, neben fehlender Bewertbarkeit der Zellkernmorphologie, die sondenmarkierten Chromosome zum Teil außerhalb der zerstörten Zellkerne und konnten nicht zugeordnet werden. In beiden Fällen erwiesen sich solche Präparate oft als zu zellarm an auswertbaren Einzelzellkernen, die für eine repräsentative Beurteilung benötigt werden. Eine Gefahr für verfälschte Ergebnisse stellten des Weiteren

inkomplett kondensierte Chromosomen dar. In Abhängigkeit vom Zellzyklus zeigten sich die chromosomalen Hybridisierungssignale teilweise nicht als konzentriert punktuell, sondern als schwach-farbige Spiralen oder Fäden, die schwer zu detektieren waren. Gerade im Falle der Markierung von 9p21 kann dies zu einer falsch-positiven Begutachtung führen, da somit fälschlich vom Fehlen eines oder beider Sondensignale, mithin einer Deletion des betreffenden Genlokus, auszugehen wäre (siehe Punkt 6.4, Abbildungen 15-18).

3.4 Verteilung und Häufigkeit genetisch abnormer Zellen

Von insgesamt 79 Präparaten erwiesen sich 15 als vollständig euploid. Die folgende Darstellung der Verteilung und Häufigkeit genetischer Aberrationen bezieht sich auf die übrigen 64 Präparate der Studie mit genetischen Veränderungen. Dabei gingen alle aneuploiden detektierten Zellkerne in diese Wertung ein, unabhängig davon, ob das dazugehörige Präparat im Gesamten positiv oder negativ beurteilt wurde. Generell konnte beobachtet werden, dass Veränderungen einer Chromosomenreihe nicht notwendig mit einer Euploidie oder Aneuploidie anderer Chromosomen korreliert. Die detektierten genetischen Veränderungen konnten lediglich eine Chromosomenreihe bzw. den Genlokus 9p21 oder bis zu alle drei untersuchten Chromosomenreihen inklusive den Genlokus 9p21 betreffen.

3.4.1 Allgemeine Verteilung

Am häufigsten stellten sich Zugewinne bei Chromosom 3 dar. Von den 64 aneuploiden Präparaten zeigten 47 eine Zunahme auf 3 oder mehr Signale, entsprechend einer Häufigkeit von 73,4 %. Fast ebenso häufig (66,1 %) wurde bei 42 Fällen eine veränderte Chromosom 17-Anzahl gefunden. In 41 Präparaten erwies sich Chromosom 7 als aneuploid (64,1 %). Deletionen des Genlokus 9p21 konnten mit einer Häufigkeit von 59,3 % bei 38 Präparaten beobachtet werden (siehe Diagramm 1). Dabei handelte es sich in 61,5 % der Fälle, entsprechend 23 Präparaten, um eine einfache Deletion (ein SONDENSIGNAL pro Zellkern), 10 Präparate (26,3 %) zeigten kein SONDENSIGNAL für 9p21 (Doppeldeletion) und in 13,2 % kamen in jedem der 5 Präparate beide Arten des chromosomalen Teilverlustes vor (siehe Diagramm 2).

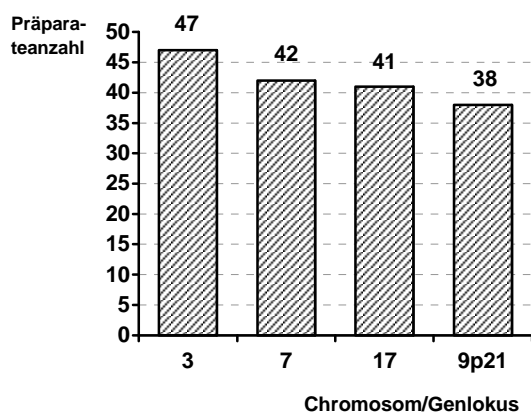


Diagramm 1: Verteilung und Häufigkeit genetischer Aberrationen bei Chromosom 3, 7, 17 und Genlokus 9p21.

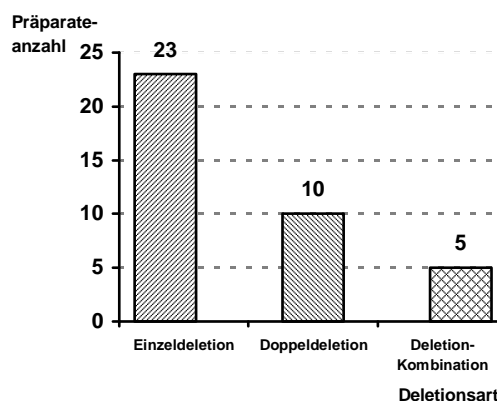


Diagramm 2: Verteilung und Häufigkeit von 9p21-Deletionen.

Mehrere gleichzeitig auftretende genetische Veränderungen betrafen bei 31,2 % der Präparate (entsprechend 20 Präparaten) alle vier fluoreszenzmarkierten Bereiche. Jeweils 18 der 64 Präparate zeigten entweder Aberrationen innerhalb einer Chromosomenreihe oder betrafen parallel 3 verschiedene Chromosomenreihen bzw. den Genlokus 9p21 (je 28,1 %). In nur 8 der 64 Präparate (12,5 %) waren gleichzeitig nur zwei Chromosomenreihen (bzw. entsprechende Chromosomenreihe und Genlokus 9p21) von Aberrationen betroffen (siehe Diagramm 3).

3.4.2 Isolierte genetische Veränderungen

Deutlich am häufigsten zeigten sich mit 50 % der Fälle Abweichungen von der Norm, die isoliert den Genlokus 9p21 betrafen. Neun der insgesamt 18 Präparate dieser Untergruppe wiesen nur ein oder kein SONDENSIGNAL für 9p21 auf. Alleinige Polyploidie des Chromosoms 17 fanden sich bei 5 Präparaten (27,7 %) und in 4 Fällen (22,2 %) des Chromosoms 3. Keines der untersuchten Präparate zeigte isolierte Chromosom 7-Veränderungen (siehe Diagramm 4).

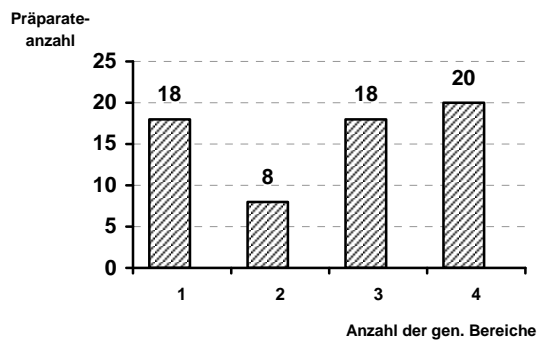


Diagramm 3: Verteilung und Häufigkeit parallel auftretender genetischer Veränderungen; „Bereich/e“ steht für Chromosom und / oder Genlokus 9p21.

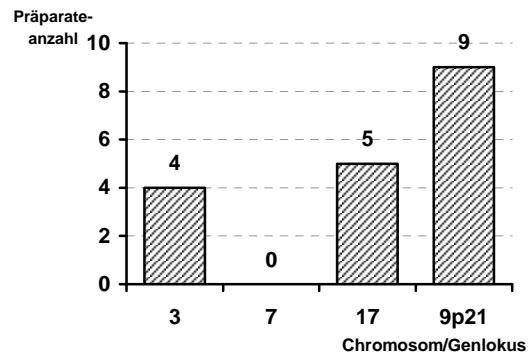


Diagramm 4: Häufigkeit und Verteilung isolierter genetischer Veränderungen.

3.4.3 Parallele genetische Veränderungen

Wie bereits erwähnt, stellten sich in 8 aus 64 Präparaten gleichzeitige Veränderungen zweier und in 18 Fällen dreier Bereiche dar. Beim gleichzeitigen Abweichen vom diploiden Chromosomensatz in zwei Bereichen innerhalb eines Präparates betraf dies in 50 % der Fälle (4 Präparate) ein Zugewinn bei Chromosom 17 bei gleichzeitiger 9p21-Deletion. Bei drei Präparaten (37, 5 %) waren die Chromosome 3 und 7 vermehrt und in 12,5 % (1 Fall) kam es zu Deletionen von 9p21 bei gleichzeitiger Polyploidie des Chromosoms 3 (siehe Diagramm 5). Daneben zeigten 15 der 18 Präparate mit Aberrationen in drei Chromosomen eine Vermehrung der Chromosome 3, 7 und 17 (83,3 %). Ebenfalls zeigten 3 Präparate (16,6 %) Deletionen bei 9p21 neben Zugewinnen von Chromosom 3 und 7. Andere Kombinationen, sowohl mit zwei als auch drei parallel veränderten genetischen Bereichen, traten innerhalb der Präparate nicht auf (siehe Diagramm 6).

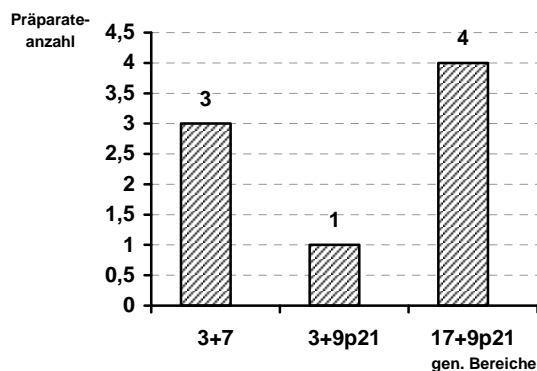


Diagramm 5: parallele Aberrationen in zwei genetischen Bereichen.

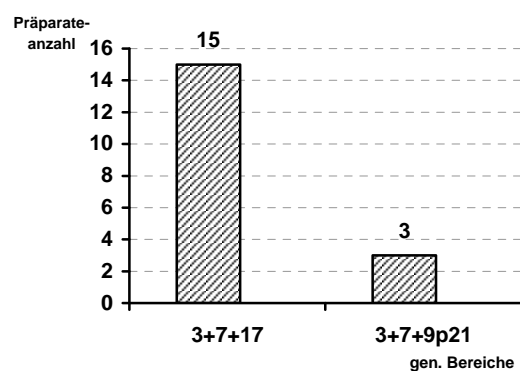


Diagramm 6: parallele Aberrationen in drei genetischen Bereichen.

3.4.4 Korrelation von genetischer Aberration und Tumorgrad

Niedriggradige Karzinome (G1) wiesen eine relativ gleichmäßige Verteilung genetischer Aberrationen ohne signifikante Präferenz einer bestimmten Chromosomenreihe bzw. des Genlokus 9p21 auf. Durchschnittlich zeigten sich, jeweils ausgehend von 25 bewerteten Zellkernen pro Präparat, in diesem Kollektiv 3,3 Zellkerne (13,3 %) als polyploid für Chromosom 3, 17, 2 % (entsprechend 4,3 Zellkernen) für Chromosom 7 und 21,2 % für Chromosom 17. In durchschnittlich 3,3 Zellkernen (13,3 %) fanden sich Deletionen von 9p21. Die Präparate dieser Untergruppe zeigten dabei inhomogenen Abweichungen vom euploiden Chromosomensatz mit bis zu allen vier untersuchten Fluoreszenzmarkern. Im Kollektiv der G2-Karzinome überwogen genetische Zugewinne vor Deletionen. Am häufigsten zeigten sich parallele Polysomien bei Chromosom 3, 7 und 17. In 55,2 % (entsprechend 13,8) der Zellkerne stellten sich Chromosom-3 Zugewinne dar, in 12,7 Zellkernen (50,8 %) Zugewinne von Chromosom 7 und in 46,4 % (entsprechend 11,6 Zellkernen) von Chromosom 17. Deutlich weniger häufig als bei niedriggradigen Karzinomen waren 9p21-Deletionen zu finden (10 %).

Ähnliche Ergebnisse waren auch bei den G3-Karzinomen zu erheben. Insgesamt zeigten sich in 70,4 % (entsprechend 17,6 Zellkernen) Zugewinne bei Chromosom 3, bei 16,3 Zellkernen (65,2 %) bei Chromosom 7 und bei Chromosom 17 in 61,2 % (15,3 Zellkerne pro Präparat). Deletionen des Genlokus 9p21 waren mit einer Häufigkeit von 14,6 % (entsprechend 3,6 Zellkernen) zu finden.

3.5 Analyse der Ergebnisse

Alle folgenden, in Prozent angegebenen Resultate (Sensitivität, Spezifität, positiver/negativer prädiktiver Wert) errechneten sich aus den aktuell in dieser Studie nach Auswertung der Präparate ermittelten Ergebnisse im Abgleich mit den in der zeitlich festgelegten Verlaufsbeobachtung vorliegenden Befunden. Aufgrund des kurzfristigen Nachbeobachtungszeitraums stellt besonders die jeweils angegebene Spezifität der einzelnen Methoden keinen endgültigen Wert dar, sondern entspricht dem momentanen Stand der vorliegenden Ergebnisse und kann somit in einem weiter angelegten Verlaufsrahmen von den hier angegebenen Werten abweichen.

3.5.1 Allgemeine Untersuchung

Insgesamt gingen 79 Präparate in die Wertung ein. Als Kontrolle aller erhobenen Untersuchungsergebnisse diente das follow-up zu jedem Präparat (siehe Tabelle 10). In den folgenden Punkten wurden Zytomorphologie, FISH nach Vysis™-Schema (im Folgenden nur noch „Vysis-Auswertung“ genannt) und FISH nach den Basler Kriterien verglichen (siehe dazu 2.8.2).

Von 79 Präparaten zeigten sich 55 negativ und 24 positiv bezüglich einer Karzinomentwicklung in der kurzfristigen Verlaufsbeobachtung. Die morphologische Zytologie erfasste hiervon 65 Präparate als negativ und 14 als positiv, entsprechend 11 falsch-negativen und einem falsch-positiven Resultat (Sensitivität 54,2 %, Spezifität 98,2 %). Der positive prädiktive Wert (PPW) ist mit 92,8 % höher als der des FISH-Verfahrens. Dagegen wurden nicht alle positiven Verläufe erfasst und der negative prädiktive Wert (NPW) liegt bei 83,1 %.

Die Auswertung nach Vysis-Kriterien zeigt in der Summe aller Präparate eine Sensitivität von 79,2 % bei einer Spezifität von 92,7 %. Insgesamt waren 56 Präparate negativ und 23 positiv. Die 23 positiven Befunde stimmen jedoch nicht vollständig in der Zuordnung von positiv bewerteten Präparaten und tatsächlich im Verlauf aufgetretenen Karzinomfällen überein. Daher liegen, obwohl in der Summe nur ein falsch-negativer Befund ersichtlich ist, insgesamt 5 falsch-negative Resultate bei 4 falsch-positiven vor. Somit wurde ein positiver prädiktiver Wert von 82,6 % erzielt bei einem negativen prädiktiven Wert von 91,1 %.

Mit 13 falsch-positiven (PPW 59,4 %) und 5 falsch-negativen Präparaten (NPW 89,4 %) bei 47 negativen und 32 positiven Wertungen zeigte sich die Auswertung nach der Basel-Methode deutlich weniger spezifisch (Sensitivität 79,2 %, Spezifität 76,4 %) und stuft signifikant mehr Präparate als falsch-positiv ein als Zytomorphologie und die Bewertung nach Vysis.

Die Untersuchungsmethode nach Vysis-Vorgaben und die Zytomorphologie erwiesen sich zusammenfassend ungefähr gleich spezifisch und in diesem Punkt deutlich zutreffender als eine Bewertung nach Basel. Differenzen stellten sich bezüglich der Sensitivität der Untersuchungsergebnisse heraus, beide FISH-Verfahren waren in der Gesamtheit deutlich sensitiver als die Zytologie.

Ergebnis	Zytologie	Vysis- Auswertung	Basler Auswertung	follow-up
Positiv	14	23	32	24
Negativ	65	56	47	55
Falsch positiv	1	4	13	
Falsch negativ	11	5	5	
Sensitivität	54,2 %	79,2 %	79,2 %	
Spezifität	98,2 %	92,7 %	76,4 %	
PPW	92,8 %	82,6 %	59,4 %	
NPW	83,1 %	91,1 %	89,4 %	

Tabelle 10: Ergebnisse von morphologischer Zytologie, Auswertungen nach Vysis und Basel im Vergleich zum klinischen follow-up. PPW = positiver prädiktiver Wert. NPW = negativer prädiktiver Wert.

3.5.2 Einzelanalysen

Die folgenden Ergebnisse wurden in vier Untergruppen nach dem initial erhobenen zytologischen Untersuchungsbefund eingeteilt, da sich in dieser Studie signifikante Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse in bestimmten zytologischen Kategorien darstellten. Die Einteilung erfolgte dabei nach zytologischem Primärbefund wie in Punkt 2.1 dargestellt.

3.5.2.1 G1-G3-Karzinome

Zytologisch waren 14 Präparate als G1-G3-Karzinome (drei G1-, 8 G2-, drei G3-Karzinome) befundet worden. In 13 Fällen stimmte die Diagnose mit dem follow-up überein, bei einem Patienten war kein Karzinom verifizierbar (PPW 92,8 %, NPW in dieser Untergruppe nicht bestimmbar). Die Vysis-Auswertung stimmte in ihren Resultaten zu 100 % mit dem klinischen Verlauf überein. Die Beurteilung nach Basel zeigte in dieser Gesamtgruppe ein falsch-positives Präparat und war somit in Sensitivität und Spezifität mit der Zytologie gleichauf.

In dieser zytologischen Gruppe zeigten alle drei Untersuchungsmethoden die gleich hohe Sensitivität, jedoch erfasste nur die Auswertung nach Vysis das einzig negative Präparat aus der Gruppe G1. Je höher die Graduierung der untersuchten Präparate ausfiel, desto sicherer erwiesen sich alle drei Untersuchungsmethoden in ihren Ergebnissen und erfassten alle 11 Präparate (8 G2- und 3 G3-Präparate) zutreffend positiv. Die diagnostischen Schwierigkeiten sowohl der Zytologie, aber auch von FISH-Untersuchungen, den Übergang von Atypien zu niedriggradigen (G1-) Karzinomen richtig detektieren zu können (10), konnte in dieser Studie nicht aussagekräftig unter-

sucht werden, da mit lediglich drei Präparaten dieser Kategorie keine ausreichend große Anzahl für eine repräsentative Bewertung vorlag.

3.5.2.2 C0, C1, C2

Präparate, die sich in ihrer Gesamtheit und Struktur unverdächtig präsentierten, wurden als C0-Präparate eingestuft. Diese zeigten zeitgleich zytologisch keine oder nur leichte entzündliche Veränderungen. C1-Präparate wiesen geringe bis mäßige Zellanomalien auf, welche meist von kräftigen entzündlichen Veränderungen begleitet wurden. In der Gesamtbeurteilung wurden diese als abnorm, jedoch nicht maligne eingestuft. Atypische, malignitätsverdächtige Präparate zeigten als C2-Präparate stark ausgeprägte Zellanomalien. Eine eindeutige Malignitätszuordnung war in diesen Fällen nicht möglich, da sich parallel starke entzündliche Veränderungen darstellten, welche als Ursache der Zellanomalien nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. C1- und besonders C2-Präparate sind aus zytologischer Sicht kontrollbedürftig, gelten zum erhobenen Zeitpunkt jedoch als nicht (sicher) positiv.

Insgesamt lagen 9 C0-Präparate vor, welche im follow-up zwei positive Verläufe zeigten. Sowohl die Auswertung nach Vysis als auch Basel erfasste jeweils eines dieser Präparate als positiv. Histologisch wurde im Verlauf ein pTaG2-Karzinom diagnostiziert. Das andere im Verlauf positive C0-Präparat war histologisch ein pTaG1-Karzinom. Dieses wurde von beiden FISH-Verfahren nicht erkannt. Die Zytologie befundete beide Präparate falsch-negativ (insgesamt NPW 77,8 %). Zusammenfassend lieferte die Vysis-Auswertung den höchsten positiven prädiktiven Wert mit 100 % bei einem negativen prädiktiven Wert von 87,5 %.

Aus der Untergruppe der C1-Präparate lagen 8 Präparate vor, vier davon mit einem positiven klinischen Verlauf. Von diesen vier Präparaten wurde nur eines durch die beiden FISH-Verfahren als positiv detektiert, welches histologisch als pTaG2-Karzinom diagnostiziert wurde. Die drei anderen sich entwickelnden Karzinome bzw. -vorstufen (pTaG1, pTaG2 und CIS) wurden von keinem Verfahren zum Zeitpunkt der Untersuchung als positiv befundet.

Insgesamt beurteilte die Zytologie alle 8 Präparate dieser Untergruppe als abnorm, jedoch nicht maligne, entsprechend 4 falsch-negativen Resultaten (NPW 50 %). Die Bewertung nach Vysis-Kriterien ergab drei falsch-negative Befunde, d.h. der positive

prädiktive Wert liegt bei 100 %, der negative prädiktive Wert bei 57,1 %. In der Bewertung nach Basel zeigten sich zwei Präparate positiv, die jedoch in der Zuordnung von Präparat und follow-up nicht übereinstimmten und somit 3 falsch-negative und eine falsch-positive Bewertung ergaben (in dieser Gruppe PPW und NPW je 50 %). Das einzige vorliegende C2-Präparat wurde zytologisch nicht eindeutig positiv, jedoch von beiden FISH-Verfahren positiv bewertet, was durch eine Karzinomentwicklung im follow-up bestätigt wurde. Es handelte sich hierbei um ein histologisch als pTis eingestuftes Karzinom.

Zusammenfassend hatte sowohl die FISH als auch die Zytologie im C0-C2-Präparatekollektiv die meisten Probleme mit Übereinstimmung von erhobener Diagnose und follow-up. Insgesamt wurden in dieser Gruppe 2 CIS-, ein pTAG1- und 2 pTAG2-Präparate von keinem der drei Verfahren als positiv eingestuft. Interessanterweise stammten vier der fünf falsch eingeordneten Präparate aus der Gruppe initial nach Papanicolaou (Pap)- gefärbter Zytozentrifugenpräparate.

Es bleibt in dieser Studie offen, ob die falsch-negativen Ergebnisse durch das schwer zu bewertende (teilweise entzündlich veränderte) Zellbild oder, wie bereits unter Punkt 3.1 dargestellt, die initiale Pap-Färbung aller vier angesprochenen Präparate erklärt werden können.

3.5.2.3 Zustand nach Karzinom

Da in dieser Studie unter anderem die Wirksamkeit der FISH für eine frühe Detektion von Harnblasenkarzinomrezidiven untersucht werden sollte, wurden 20 Präparate einbezogen, die einem „Zustand nach Karzinom“ entsprachen. Von den Patienten erlitt einer im Nachbeobachtungszeitraum ein Karzinomrezidiv. In dieser Untergruppe zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsmethoden. Während sich die Zytologie mit einem falsch-negativen Ergebnis einen sehr hohen NPW von 95 % erzielte, erbrachte die Bewertung nach Vysis-Kriterien bei einer Sensitivität von 100 % lediglich einen positiven prädiktiven Wert von 33,3 %, entsprechend 2 falsch-positiven Resultaten. Noch weniger spezifisch mit 5 falsch-positiven Ergebnissen stellte sich Basel-Methodik dar.

Es bleibt im Hinblick auf die sehr kurze Nachbeobachtungszeit offen, ob die FISH-Diagnostik zu wenig spezifisch ist oder ob sie einen längerfristigen prognostischen Wert

besitzt, da neben dem einen, abweichend von der Zytologie bereits richtig-positiv detektierten Fall eventuell mehr Patienten ein Rezidiv im weiteren Verlauf entwickeln würden.

3.5.2.4 Negativkontrollen

27 Präparate dienten in der vorliegenden Studie als Negativkontrollen, sie stammten von Patienten ohne Karzinomanamnese. Drei Präparate erwiesen sich im Verlauf als positiv, die von der Zytologie nicht erfasst worden waren. Ähnlich der Untergruppe „Z.n. Karzinom“ zeigte sich auch in diesem Präparatekollektiv FISH weniger spezifisch und detektierte 2 (Vysis-Schema) bzw. 4 Präparate (Basel-Auswertung) falsch-positiv bei je einem falsch-negativem Präparat. Beide Verfahren waren also mit einem NPW von 95,6 % bzw. 95,2 % gegenüber 88,9 % der Zytologie in der Detektion negativer Ergebnisse überlegen. In dieser Untergruppen fiel der positive prädiktive Wert jedoch bei allen drei Verfahren niedrig aus (Zytologie: 0 %, Vysis-Schema 50 %, Basel-methode 33,4 %).

Auch in dieser Untergruppe bleibt die Frage offen, ob sowohl eine Bewertung nach Vysis-Kriterien als auch nach Basel sich im Verlauf als zutreffend erweisen werden und die zu diesem Zeitpunkt erhobenen positiven Resultate prädiktiv für eine klinisch noch nicht detektierbare Karzinomentwicklung sind.

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Auf die gesamte Studie bezogen erwies sich die Auswertung nach Vysis-Kriterien und die Zytologie im angelegten Nachbeobachtungsrahmen als vergleichbar spezifisch und erfassten negative, karzinomfreie Präparate mit 98,2 % respektive 92,7 % gleich sicher. Die Bewertung nach Basel-Schema stellte sich signifikant weniger spezifisch dar (entsprechend einem aktuellen PPW von 59,4 %). Hingegen zeigten sich beide FISH-Verfahren der Zytologie in ihrer Sensitivität für die Detektion positiver Ergebnisse in der Gesamtheit klar überlegen. Alles in allem erwies sich in dieser Studie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer Auswertung nach Vysis-Kriterien als das Diagnostikverfahren mit der höchsten Spezifität und Sensitivität.

Allen drei Methoden erfassten G3-Karzinome zu 100 %. Die Sensitivität nahm hingegen mit Abnahme des Malignitätsgrades ab. Während G2-Karzinome durch die

Methode nach Vysis und Basel in 83 % detektiert wurden, erfasste die Zytologie 75 % der G2-Karzinome. Lediglich 66,6 % aller G1-Karzinome wurden gleich sicher von allen drei Verfahren erfasst. Weder die Zytologie, noch die FISH stufte eines der beiden CIS als positiv ein (siehe Diagramm 7). Im Bereich niedriggradiger Atypien zeigten sich Zytologie und die Auswertung nach Vysis und Basel gleich zutreffend, höhergradige Zellveränderungen wurden durch FISH sensitiver als positiv erfasst. Hierbei blieb offen, ob für die falsch-negativen FISH-Ergebnisse in der Karzinomgruppe eventuell die zuvorige Pap-Färbung mit unzureichender Entfärbung ursächlich war.

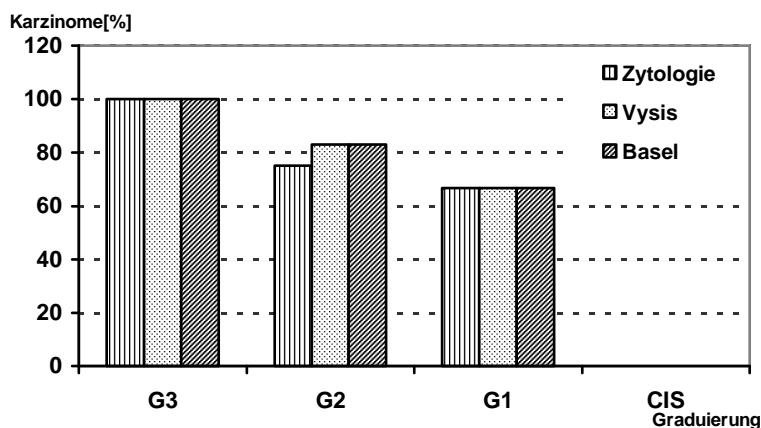


Diagramm 7: Erfasste Karzinome unterteilt nach Graduierung und Verfahren; Angaben in Prozent.

Sowohl bei den Präparaten im Rahmen der Kontrolle nach Karzinom als auch den Negativkontrollen entgingen der Zytologie positive Verläufe, von den FISH-Untersuchungen wurden hingegen jeweils mehr Fälle als positiv detektiert, als sich in der kurzen Nachbeobachtungsperiode bestätigen ließen. Beide Auswertungsverfahren zeigten in diesen Untergruppen im kurzen zeitlichen Verlaufsrahmen unbestätigte positive Ergebnisse. Eine klinische Verlaufsbeobachtung über einen längeren Zeitraum erbrachte Klarheit, ob die Beurteilung nach Vysis- und Basel-Kriterien falsch-positiv war oder ob die zu diesem Zeitpunkt erhobenen positiven Resultate prognostisch für ein späteres Karzinomrezidiv sind und damit deutlich sensitiver als die Zytologie bei guter Spezifität.

3.6 Präparateaufbewahrung

Obwohl die Präparate für die Langzeitaufbewahrung bei -20°C durch Alufolie und Plastikbehälter geschützt vor äußeren Einflüssen eingefroren wurden, stellten sich bei allen Präparaten relativ rasch Qualitätsverluste ein. Trotz Versiegelung des Deckglases mit Nagellack drang Feuchtigkeit und Luft unter das Glas und erschwerte eine mikroskopische Nachbegutachtung nachhaltig. Diesem Vorgang konnte durch eine stärkere Versiegelung oder zusätzliche Plastikbehälter bei der Aufbewahrung nicht entgegengewirkt werden. Erneute Auswertungen eines Präparates im Verlauf der Studie zeigten eine kontinuierliche Qualitätsabnahme durch Ausbildung eines überdeckenden Grauschleiers, der eine Beurteilung verhinderte. Im Durchschnitt erwiesen sich FISH-Präparate bei fachgerechter Lagerung nur über ungefähr 2 - 4 Monate als zuverlässig auswertbar.

4. Diskussion

Zystoskopie und Zytologie sind die Standardmodalitäten zur Überwachung von Patienten mit Harnblasenkarzinom. Diese Verfahren haben jedoch Schwachpunkte. Die Zystoskopie stellt einen invasiven Eingriff dar mit nicht unerheblichen Kosten und die Zytomorphologie besitzt eine geringe Sensitivität für den Nachweis niedriggradiger Karzinome (19, 31, 50, 75). Diverse Studien geben für die Zytologie eine Sensitivität bei G1-, G2- und G3-Karzinomen von jeweils 20 %, 50 % und 80 % an. Daher können einzelne zytologische Kontrollen die Notwendigkeit einer zystoskopischen Untersuchung nicht wesentlich reduzieren oder gar ersetzen (103). Bei etwa 30 % der G1-Karzinome kommt es nach einem Jahr, bei etwa 50 % nach fünf Jahren zu einem Rezidiv (56). Daher wird gerade in dieser Gruppe ein zuverlässiges diagnostisches Verfahren für die Nachbeobachtung benötigt. Eine frühe Detektion von Rezidiven bei Patienten mit positiver Karzinomvorgeschichte ist für eine adäquate Therapieeinleitung wichtig. Das Ziel der vorliegenden retrospektiven Studie war, zu prüfen, ob die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an den für die Zytologie erstellten Präparaten durchführbar ist und einen Beitrag zur Klärung zweifelhafter zytologischer Befunde liefert. Des Weiteren wurden zytologische Untersuchungsergebnisse und FISH-Resultate verglichen und retrospektiv untersucht, ob eine im Verlauf beobachtete Karzinomentwicklung (positives follow-up) bei noch aktuell negativen zytologischen Resultaten zu einem früheren Zeitpunkt durch die FISH vorhersagbar gewesen wäre.

An insgesamt 79 Präparaten verwendeten wir das UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit zur Durchführung einer in-situ-Hybridisierung (FISH) mit fluoreszenzmarkierten, zentromerspezifischen Chromosomensonden und einer Genort-spezifischen Sonde für den Nachweis und die Quantifizierung der Chromosomen 3, 7, 17 und dem Lokus 9p21.

4.1 Generelle Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Das Anwendungsprinzip der chromosomalen FISH beruht auf der Kenntnis, dass die Harnblasenkarzinom-Entstehung ein multifaktorieller Prozess ist (88), der mit charakteristischen genetischen Veränderungen einhergeht. Einigen chromosomalen Ver-

änderungen, die spezifisch für bestimmte Tumortypen sind, schreibt man eine wichtige Rolle für die Tumorentstehung und -progression zu (22, 45).

Chromosomale Verluste oder Zugewinne lassen sich durch Fluoreszenzmarkierung der betreffenden Chromosomen direkt sichtbar machen. So wird der Verlust von Chromosom 9 gehäuft bei frühen und gut differenzierten Tumoren gefunden (84) und dient als ein möglicher prognostischer Marker für Rezidive (23). Dieses direkte Markieren einzelner Chromosomen beinhaltet gleichzeitig Vor- und Nachteile. Mit FISH können genetische Veränderungen in der Chromosomenzahl (numerische Aberrationen), chromosomale Teilverluste (Deletionen) oder Genamplifikationen nachgewiesen werden (10), ohne Berücksichtigung der Kernstruktur oder von Zellveränderungen. Der hochspezifische direkte Nachweis chromosomaler Veränderungen am Interphase-Zellkern lässt sichere Aussagen zum malignen Potential einer Zellpopulation zu. Gleichzeitig werden andere Zellkern- und Zytoplasmastrukturen ausgeblendet, die Grundlage für die zytomorphologische Dignitätsbeurteilung sind. Lediglich in der DAPI-Färbung ist eine Betrachtung der Zellkernmorphologie möglich und lässt Rückschlüsse auf generelle strukturelle Veränderungen im Zellkern zu. Diese Tatsache macht die FISH-Analyse weitgehend unanfällig gegenüber reaktiven Zellveränderungen, wie sie durch bakterielle Infektionen oder therapeutische Maßnahmen hervorgerufen werden können.

Gerade die vollständige Unversehrtheit der einzelnen Zellen eines zytologischen Präparates, welche durch unsachgemäßes Aufbereiten oder Lagern gefährdet werden kann, ist für eine FISH-Analyse von untergeordneter Bedeutung. Zur Diagnosestellung muss lediglich eine repräsentativ große Anzahl an auswertbaren Zellkernen vorhanden sein, unabhängig davon, ob sich die Zellen intakt darstellen oder nicht. Daneben lassen sich die markierten Zellkerne, anders als bei zytologischen Untersuchungen, bei der eine große Erfahrung des Untersuchers notwendig ist, auch von morphologisch unerfahrenen Untersuchern objektiv interpretieren anhand definierter Auswertungskriterien. Von den initial 95 ausgewählten Präparaten der vorliegenden Studie waren 79 Präparate für die FISH-Analyse geeignet. Hauptursache dafür, dass einzelne Präparate verworfen werden mussten, war eine zu geringe Anzahl beurteilbarer Zellkerne im Präparat. Lediglich vier der 95 Präparate mussten wegen technisch bedingter un-

zureichender Sondenmarkierung verworfen werden. FISH erwies sich daher als ein robustes Verfahren, für das objektive Auswertungskriterien etabliert sind.

4.2 Präparate

In der vorliegenden Studie sollte die Durchführbarkeit von FISH an bereits zytologisch aufbereiteten, teilweise gefärbten Präparaten beurteilt werden. Hinsichtlich der Art der Gewinnung des Zellmaterials konnten keine signifikanten Unterschiede bei den Präparaten festgestellt werden. Notwendig für die Anwendbarkeit des Verfahrens war eine repräsentativ große Anzahl an Zellkernen ohne Clusterbildung, jedoch wurden deutlich weniger Zellen als für eine zytologische Bewertung benötigt (94). Diese Bedingungen erfüllten sowohl Spontanurin, Pouchurin als auch Blasenspülflüssigkeit. Zu diesem Ergebnis kamen unabhängig voneinander ebenso Junker et al. und Melonie et al. (41, 52). Daneben stellten in der vorliegenden Studie durch die Art der Materialgewinnung hervorgerufene artifizielle oder durch Begleitumstände - wie eine bakterielle Kontamination - bedingte Zellveränderungen keine Einschränkung in der Anwendbarkeit dar, da nicht die Zell- oder Kernmorphologie entscheidend war, sondern eine suffiziente Einzelmarkierung der Chromosomen. Eine gleich sensitive und spezifische Diagnostik mit der FISH-Untersuchung an Spontanurin und Blasenspülflüssigkeit ist für Patienten von Vorteil, da invasive Methoden zur Urothelgewinnung für eine rein diagnostische Auswertung nicht notwendig erscheinen.

Des Weiteren zeigten sich keine Qualitätsunterschiede in den Ergebnissen oder Einschränkungen einer erfolgreichen Anwendung des FISH-Verfahrens hinsichtlich des Präparatealters (Länge der Aufbewahrungsdauer). Anders als von Bubendorf et al. (10) beschrieben, wurde keine Verschlechterung der Hybridisierungsergebnisse mit Zunahme des Zeitraums zwischen primärer zytologischer Präparaterstellung und Beginn der FISH-Aufbereitung beobachtet. Dies mag dadurch bedingt sein, dass die von uns untersuchten Archivpräparate überwiegend HE-gefärbt und nicht, wie in der Schweiz üblich, Papanicolaou-gefärbt waren. In der vorliegenden Studie konnte allerdings, wie von König et al. beobachtet (106), ein kontinuierlicher Qualitätsverlust bereits hybridisierter Präparate trotz adäquater Lagerung und suffizienter Konservierung bestätigt werden. FISH-Präparate erweisen sich somit als nur zeitlich begrenzt auswertbar. Dies bedeutet, dass Zweitbeobachtungen oder Kontrollen zeitnah nach Erstellen

eines FISH-Präparates erfolgen müssen, da dieses, anders als zytologische Präparate, einen Qualitätsverlust über einen Zeitraum von wenigen Wochen aufweist. Eine gezielte und ausreichende Befunddokumentation, am Besten mittels digitaler Fotografie, zum Zeitpunkt der Beurteilung am Fluoreszenzmikroskop ist unerlässlich. Zusätzlich zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Anwendbarkeit des FISH-Verfahrens bei einigen gefärbten gegenüber ungefärbten Präparaten. HE-gefärbte Präparate ließen sich gut entfärben und mit FISH weiterbehandeln. Dagegen waren 9 der insgesamt 12 initial Papanicolaou-gefärbten Präparate trotz zusätzlichen Waschschrilles in Carnoy-Lösung überdurchschnittlich schlecht auswertbar. Dies wurde in anderen Studien nicht als problematisch beschrieben (10), was unseren Erfahrungen jedoch widerspricht. Insbesondere traten vier der fünf falsch-negativ diagnostizierten FISH-Ergebnisse bei anfänglich Papanicolaou-gefärbten Präparaten auf. Es blieb in dieser Studie offen, ob derart gefärbte Präparate generell für die FISH-Diagnostik ungeeignet sind, oder ob für ein diagnostisch zufrieden stellendes FISH-Ergebnis eine Modifikation und Korrektur einzelner Schritte in der Vorbehandlung dieser Präparate ausreichen könnte. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.3 FISH-Anwendung

Das FISH-Verfahren zeigte sich in der vorliegenden Studie als zuverlässig durchführbar. Entscheidend für das Gelingen der FISH-Anwendung ist die proteolytische Aufschlüsselung der Zellkerne. Erfolgte dieser Schritt nicht vollständig, z.B. durch zu kurze Einwirkzeit der Proteasen oder stark erhöhten Zellgehalt, war keine Interpretation des Präparates möglich. Anders als bei histologischer oder zytologischer Untersuchung wird im FISH-Verfahren jegliche zelluläre Strukturinformation ausgeblendet und das Augenmerk auf die Fluoreszenzmarkierung der Chromosomen gerichtet. Der Untersucher ist folglich für eine sichere Diagnose auf kräftige Hybridisierungssignale angewiesen, die eine ausreichend lange Inkubationszeit im Reaktionsablauf der Proteasevorbehandlung erfordern. Daher wurde in der vorliegenden Studie die vom Hersteller angegebene Inkubationszeit auf 20 Minuten verdoppelt, da sich erst ab diesem Zeitraum spezifische und gut interpretierbare Hybridisierungssignale darstellten. Eine kürzere Zeitdauer mit folglich schwächeren Signalen hätte Unsicherheiten in der Interpretation mit möglichen Fehldiagnosen oder die Notwendigkeit der Neuanfertigung des

Präparates zur Folge. Eine Neuanfertigung ist neben erhöhtem Zeitaufwand auch ein Kostenfaktor, denn das Erstellen von FISH-Präparaten ist kostspielig (11, 31). Dies ist einer der Gründe, warum FISH aktuell nicht routinemäßig zur Diagnostik eingesetzt wird, obwohl mit einer Zunahme der Diagnosesicherheit durch diese Methode Kosten durch Verringerung von Nachkontrollen oder unnötigen Therapieeinleitungen eingespart werden könnten (10). Lediglich vier Präparate mussten wegen unzureichender Entfärbung bzw. insuffizienter Sondenmarkierung ausgemustert werden. Kreuzreaktionen der Fluoreszenzmarker mit anderen Zentromerregionen und falsch-hohe Anzahlen an Sondensignalen, wie in anderen Studien beobachtet, traten nicht auf (106).

4.4 Mikroskopie

Grundsätzlich war neben einer erfolgreichen FISH-Anwendung eine repräsentative Anzahl an Zellkernen für eine objektive Interpretation notwendig. Zehn Präparate wurden aufgrund einer zu geringen, ein Präparat wegen zu hoher Zellkernzahl ausgemustert, da auch nach Zweitbegutachtung keine reproduzierbare Aussage hinsichtlich eines positiven oder negativen Befundes möglich war. Besonders bei einer Anzahl an der unteren Grenze der minimal benötigten Zellkerne war es methodisch wichtig, nicht grundsätzlich alle Zellkerne mit quantitativen Chromosomenstörungen in die Wertung aufzunehmen (11, 43, 101). Insbesondere sind polyploide Schirmzellen nicht als neo-plastisch einzustufen. Dies wurde auch von Bubendorf et al. herausgestellt (10). Die Detektion der Sondensignale von Chromosom 17 im Aqua-Filter erwies sich wie die von Chromosom 3 und 7 im Rot-Grün-Filter als konstant gut durchführbar. Schwierig gestaltete sich die Auswertung des Genlokus 9p21 im Gold-Filter, die nur bei starker Sondenmarkierung reproduzierbar war. Daneben bestätigt sich in unserer Studie, wie von König et al. (106) berichtet, eine erschwerte Auswertung bei bakterieller Kontamination durch fluoreszierendes Überdecken der Sondensignale und den Verlust der Zielsequenz durch Überlagerung bei hoher Zellkernzahl oder inkompletter Chromosomenkondensation. FISH zeigte sich, nicht zuletzt durch die Farbwahl der einzelnen Sonden, als einfacher und sicherer in der Detektion chromosomaler Zugewinne (Signale rot, grün, blau) als im Nachweis von Deletionen (gelbe Signale). Es ist daher zu erwägen, ob die Wahl eines stärkeren Fluoreszenzfarbstoffes für den Nachweis der von

Deletionen eingesetzt werden sollte, um Fehlinterpretationen aufgrund unzureichender Erkennbarkeit vorzubeugen.

4.5 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie zeigte FISH eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion von Urothelkarzinomen.

Die Auswertung nach den Vysis-Kriterien übertraf mit einer gesamten Sensitivität von 79,2 % die der Zytologie signifikant (Sensitivität 54,2 %). Die Bewertung nach dem Basel-Protokoll war gleich sensitiv, jedoch weniger spezifisch als das Vysis-Auswerteschema mit einer Gesamtspezifität von 76,4 % (Basel-Auswertung) gegenüber 92,7 % (Vysis-Schema) und lieferte somit mehr falsch-positive Resultate im Rahmen der allerdings kurzen Nachbeobachtungsperiode.

Vierzehn der insgesamt 79 Studienpräparate gehörten in die Gruppe der Urothelkarzinome. Davon waren 3 G1-, 8 G2- und 3 G3-Karzinome. Außer einem Präparat der G1-Gruppe waren alle follow-up Ergebnisse positiv. Dieses eine Präparat wurde zytomorphologisch und in der FISH-Auswertung nach den Basel-Kriterien falsch-positiv eingestuft. Es handelte sich dabei um ein Pouchurin-Präparat, das mikroskopisch nach FISH-Anfärbung gut auszuwerten war. Die Vysis-Auswertung stimmte in dieser Gruppe mit den Resultaten des klinischen Verlaufs vollständig überein (Sensitivität 100 %). Alle G2- und alle G3-Präparate wurden von der Zytologie und den beiden FISH-Auswerteverfahren vollständig richtig detektiert. In dieser Untergruppe wurde bei anderen Studien mit FISH-Untersuchungen lediglich eine Sensitivität von 60 – 75 % für G1-2 Karzinome (10), beziehungsweise 21 %, 53 % und 78 % für G1-, G2- und G3-Karzinome erreicht (31).

Besonderes Augenmerk lag bei der Auswertung auf dem Präparatekollektiv mit den zytologischen Befundkategorien C0 (unverdächtig, 9 Präparate), C1 (zweifelhaft, 8 Präparate) und C2 (malignitätsverdächtig, 1 Präparat). Zytologisch handelte es sich dabei um Präparate, die aufgrund ihres Erscheinungsbildes keine oder keine eindeutige Malignitätszuordnung erlauben und daher im Falle der C1- und C2-Befunde einer Klärung durch FISH bedurften.

In der Untergruppe C0 kam es zu zwei positiven Verläufen; histologisch ein pTaG1- und ein pTaG2-Karzinom. Die Zytologie stufte alle 9 Präparate als negativ ein, beide

FISH-Verfahren erfassten je nur das pTaG2-Karzinom. Das pTaG1-Präparat wurde weder von Zytologie noch der FISH-Methode nach den Auswertekriterien von Vysis oder Basel detektiert. Untersucht wurde in diesem Fall ein zuvor Papanicolaou-gefärbtes Präparat.

Acht Präparate waren der Untergruppe C1 zugeordnet. Vier davon zeigten einen positiven klinischen Verlauf: ein pTis, ein G1-Karzinom und zwei G2-Karzinome. Beide FISH-Bewertungen erfassten je nur eines der beiden G2-Präparate. Die Basel-Methode bewertete zusätzlich ein Präparat falsch-positiv. Auffallend ist in dieser bekanntermaßen diagnostisch schwierigen Gruppe, dass mit Ausnahme des nicht erkannten G1-Präparates alle anderen vier Präparate (inklusive dem falsch-positiven Baselergebnis) Papanicolaou-gefärbte Präparate waren. Allerdings war auch das einzige C2-Präparat, dessen positiver Verlauf sowohl vom Schema nach Vysis als auch Basel erkannt wurde, initial Papanicolaou-gefärbt. Histologisch wurde ein pTis-Karzinom diagnostiziert.

Zusammenfassend mit den Beobachtungen aus der G1-G3-Gruppe fiel in dieser Studie auf, dass sowohl zytologisch, als auch in beiden FISH-Auswertungen bei niedriggradigen Karzinomen und pTis-Tumoren die meisten Fehleinschätzungen erfolgten. Von insgesamt 11 G2-Karzinomen (8 Primärbefunde, zusätzlich 3 im follow-up) erfasste die Zytologie drei nicht (Sensitivität 72,7 %), die Auswertungen nach Vysis und Basel verfehlten je ein Präparat (Sensitivität 91 %). In der G1-Gruppe von zusammengefasst 5 Präparaten betrug die Sensitivität aller drei Verfahren 60 %. Beide im Verlauf aufgetretenen pTis-Tumoren wurden zytologisch nicht als maligne eingestuft und auch nur mit einer Sensitivität von 50 % durch FISH (Schema nach Vysis und Basel) detektiert.

Insgesamt zeigte sich FISH trotz der nicht völlig zufriedenstellenden Ergebnisse in dieser Gruppe zuverlässiger als die Zytologie. Diese Erkenntnis stimmt mit den Daten großer Harnblasenkarzinomstudien überein, in denen sich FISH signifikant sensitiver als die herkömmliche Zytologie erwies bei gleichzeitigen diagnostischen Schwierigkeiten beider Verfahren, den Übergang von nicht-malignen Atypien zu niedriggradigen (G1-) Karzinomen richtig zu detektieren (10). Der Grund dafür könnte das Vorliegen nur geringer oder seltener genetischer Veränderungen in der Tumorzellpopulation niedriggradiger Karzinomen sein (31), wohingegen die Ursache falsch-negativer Befunde bei den CIS auf einer nicht für den Tumor repräsentativen Materialgewinnung

beruhen könnte. Auffällig ist des Weiteren, dass die falsch befundeten CIS-Präparate, beide von allen drei Methoden unerkannten G1-Präparate und das durch Vysis- / Basel-Schema und Zytologie (neben zwei weiteren) nicht detektierte Xn-Karzinom-Präparat anfänglich nach Papanicolaou gefärbt waren. Weitere Studien mit höheren Fallzahlen sind nötig, um zu klären, ob Papanicolaou-gefärbte Präparate generell für die FISH-Untersuchung ungeeignet sind oder ob die Fehleinschätzungen durch das schwer zu bewertende Zellbild und den histologischen Grad bedingt waren.

Von den 79 Präparaten wiesen 20 eine positive Karzinomvorgeschichte auf bei Remission zum Zeitpunkt der Urinuntersuchung. Sie wurden in die Studie aufgenommen, um die Eignung der FISH-Methode für eine frühe Detektion von Rezidiven zu untersuchen und eine mögliche prognostische Aussagekraft der FISH-Ergebnisse (positives follow-up erst im weiteren Verlauf) zu erkunden. In einem Fall zeigte sich im kurzen Nachbeobachtungszeitraum ein positiver Verlauf. Das Vysis-Schema erkannte dieses Präparat, hatte daneben jedoch während unseres kurzen Nachbeobachtungszeitraumes von im Schnitt 3,2 Monaten (siehe 2.1) zwei falsch-positive Ergebnisse (Sensitivität von 100 %, momentaner PPW 33,3 %). Die Basel-Bewertung war gleich sensitiv, jedoch aktuell weniger spezifisch (PPW 16,7 %) mit fünf positiven Ergebnissen, die im Nachbeobachtungszeitraum nicht verifiziert wurden. Diese beinhalten die zwei falsch-positiven Präparate der Auswertung nach Vysis.

In der Negativkontrollgruppe, bestehend aus 27 Präparaten ohne Karzinomvorkommen in der Vorgeschichte, waren die Ergebnisse ähnlich. Bei drei Patienten kam es zu einem positiven follow-up. Nach Vysis- und Basel-Kriterien wurden je zwei der drei positiven Präparate entdeckt; das dritte zeigte eine deutliche Kernclusterbildung, war nur eingeschränkt beurteilbar und entging beiden Verfahren. Zusätzlich stufte die Vysis-Methode zwei und die Auswertung nach Basel vier Präparate (zwei übereinstimmend mit Vysis neben zwei weiteren Fällen) positiv ein (NPW von 95,6 %, bzw. 95,2 %, aktueller PPW 50 %, bzw. 33,4 %). Dieser Vergleich der beiden FISH-Bewertungsschemata bestätigte im Verlauf der Studie die bereits bestehende Beobachtung, dass die Auswertungskriterien nach der Baseler Methode zu wenig spezifisch sind und zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (11). Sie sind daher in unseren Händen nicht zur Auswertung geeignet. Ob die Patienten mit den aktuell nach Vysis-Kriterien falsch-positiven Ergebnissen im Verlauf ein Karzinom entwickeln und diesem FISH-Befund

somit eine prognostische Aussagekraft zukommt, konnte aufgrund des kurz bemessenen Nachbeobachtungszeitraumes der vorliegenden Studie nicht geklärt werden. Hier sind zur zuverlässigen prognostischen Einschätzung Nacherhebungen bei den betreffenden Patienten notwendig. Andere Studien mit Momentaufnahmen falsch-positiver FISH-Ergebnisse konnten jedoch nachweisen, dass sich die Ergebnisse im weiteren follow-up als richtig erwiesen und es bei 88,9 % der Präparate, die zum Zeitpunkt der Studie mit falsch-positiven FISH-Ergebnissen vorlagen, zu einer Karzinomentwicklung kam. Wichtig dabei war der relativ nahe zeitliche Abstand der Entwicklung, bei den angesprochenen Studien 12 bis maximal 15 Monate, so dass beide Ereignisse nicht als unabhängig voneinander zu bewerten waren (92). Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass das FISH-Verfahren mit den in dieser Studie verwendeten Fluoreszenzsonden prognostisch aussagekräftig ist und auch bei den in der vorliegenden Studie entdeckten, bisher klinisch nicht bestätigten positiven Resultaten zumindest in der Auswertung nach den Vysis-Kriterien eine Karzinomentwicklung wahrscheinlich ist.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass FISH durch direkte Analyse des genetischen Materials am Interphasezellkern und durch den Nachweis genetischer Veränderungen eine gute diagnostische, prognostische und therapeutische Aussagekraft besitzt. Es erwies sich als unkompliziertes, nach kurzer Einarbeitungsphase sicher durchführbares und objektiv auswertbares Verfahren.

FISH benötigt für die Materialgewinnung keine invasiven Methoden und ist weitgehend unabhängig von bakterieller Kontamination, entzündlichen oder mechanisch bedingten Zellveränderungen. Nachteilig für eine sichere Auswertbarkeit zeigte sich FISH an zuvor Papanicolaou-gefärbten Routinepräparaten; diese Präparate sind mit der von uns verwendeten Methodik nur eingeschränkt beurteilbar und bergen die Gefahr einer falsch-negativen Bewertung. Dieser Umstand trifft nicht auf HE-gefärbte Präparate zu, die auch nach mehreren Monaten der Lagerung noch im FISH-Verfahren aufgearbeitet werden können. Nachteilig ist eine begrenzte Haltbarkeit und Bewertbarkeit der FISH-gefärbten Präparate; eine fotografische Befunddokumentation ist nach unserer Erfahrung notwendig.

Im Hinblick auf die erbrachten Ergebnisse war FISH mit Auswertung nach den Vysis-Kriterien deutlich sensitiver als die Zytologie (79,2 % vs. 54,2 %). Nach den Basel-Kriterien war die Sensitivität gleich, die Spezifität jedoch mit 76,4 % geringer (Vysis 92,7 %, Zytologie 98,2 %). Auf die Nachbeobachtungszeit unserer Studie bezogen stellte sich die Bewertung nach Basel-Kriterien als zu wenig spezifisch heraus, so dass mit falsch-positiven Resultaten zu rechnen ist. Bei höhergradigen Karzinomen betrug die Sensitivität der Zytologie und der FISH-Analyse 100 %. Im Bereich der niedriggradigen Karzinome hatte sowohl die Zytologie, als auch FISH deutliche Einbußen in der Sensitivität (G2: FISH 91 %, Zytologie 72,7 %; G1: je 60 %). Diese Ergebnisse sind in der Tendenz mit denen anderer großer Studien vergleichbar (19, 31, 103). Daneben kann bei aktuell (noch) falsch-positiven Vysis-Ergebnissen entsprechend den Daten in der Literatur von einer möglichen Karzinomentwicklung im Verlauf ausgegangen werden. FISH besitzt damit eine gute prognostische Aussagekraft und ist bei Patienten mit positiver Karzinomvorgeschichte als Screeningmethode und bei suspekten Zytologiebefunden als Kontrolle ein geeignetes diagnostisches Zusatzverfahren zur Zytologie (31, 41). Umgekehrt kann bei momentanen negativen FISH-Diagnosen von einem aktuell nicht vorhandenen Karzinomrisiko ausgegangen werden. Dies erlaubt eine Intervallverlängerung der Kontrolluntersuchungen, insbesondere der Zystoskopie. Damit trägt die FISH-Analyse zur frühzeitigen sensitiven und spezifischen Diagnosestellung von Urothelkarzinomen und deren Rezidiven bei (105).

In unseren Händen hat sich die chromosomale FISH-Untersuchung als schonendes, nicht-invasives diagnostisches Verfahren bewährt, das zuverlässig an Spontanurin durchgeführt und als Screeningmethode eingesetzt werden kann. Die vergleichsweise hohen Kosten der FISH können dabei durch die Vermeidung des gehäuftten Einsatzes invasiver Methoden, wie der Zystoskopie, in der Verlaufsbeobachtung am Patienten kompensiert werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Hintergrund und Zielsetzung

Das Harnblasenkarzinom ist eines der häufigsten urogenitalen Karzinome. Bei Diagnosestellung wachsen 20 % - 30 % der Urothelkarzinome grob infiltrierend (11), 5 % davon weisen bereits eine Metastasierung auf (27). Eine Frühdiagnose oder zuverlässige Erkennung eines Karzinomrezidivs ist daher entscheidend, gleichzeitig aber eines der maßgeblichen Probleme in der Urologie und Urinzytologie. Das Harnblasenkarzinom verläuft chronisch, 70 – 80 % der Urothelkarzinome rezidivieren und bei einem Drittel dieser Patienten wird eine Befundprogression beobachtet (41). Hauptpfeiler der Diagnostik ist die Zystoskopie inklusive zytologischer Begutachtung. Aufgrund der Invasivität und Häufigkeit von nötigen zystoskopischen Untersuchungen und der geringen Sensitivität der Zytologie für niedriggradige Harnblasenkarzinome (82) wurden in den letzten Jahren zunehmend neue molekulare Marker entwickelt, um Karzinome nicht-invasiv detektieren zu können, darunter die chromosomale Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die molekulare Markierung verschiedener Chromosome, die bei genetischen Aberrationen, wie z.B. Deletion von Chromosom 9, im Rahmen diverser Studien nachweislich mit einer Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden (85), zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Urothelkarzinomen (92).

In der vorliegenden Studie sollte

1. die Durchführbarkeit der Methode an bereits zytologisch aufbereiteten (gefärbten) Präparaten untersucht
2. bereits erhobene zytologische Untersuchungsergebnisse mit den FISH-Resultaten verglichen
3. zytologisch zweifelhafte Befunde geklärt und
4. retrospektiv festgestellt werden, ob eine im Verlauf beobachtete Karzinomentwicklung (positives follow-up) zu einem früheren Zeitpunkt bei noch negativen zytologischen Resultaten durch die FISH-Methode nachweisbar gewesen wäre.

5.2 Methoden und Ergebnisse

In die vorliegende Studie gingen 79 zytologische Präparate aus einem gemischten Kollektiv, gewonnen aus Spontanurin, Pouchurin und Harnblasenspülflüssigkeit ein. Diese wurden nach Primärdiagnose in 8 Gruppen eingeteilt. Generelle Aufnahmebedingung in die Studie war das Vorliegen von Kontroll- bzw. Nachuntersuchungsergebnissen (follow-up) in einem zeitlichen festgelegten Rahmen von maximal 11 Monaten, die als endgültige (richtige) Diagnose für jedes Präparat fungierten. Alle Präparate durchliefen vor FISH-Anwendung mehrere Waschschriffe; nach Papanicolaou-gefärbte Präparate erhielten eine zusätzliche Fixierung in Carnoy-Lösung. Danach wurden die Präparate in einer Proteaselösung inkubiert, die für das Eindringen der Sondenmischung in den Zellkern nötig ist. Nach weiteren Wasch- und Fixierungsvorgängen wurden die Präparate mit der Sondenmischung des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kits inkubiert, die mit zentromerspezifischen Chromosomensonden und einer Lokus-spezifischen Sonde die Chromosomen 3, 7, 17 und den Lokus 9p21 fluoreszenzmarkiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung. Nach dem Gegenfärben konnten die Präparate mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Pro Präparat wurden 25 morphologisch auffällige Zellkerne meanderförmig analysiert. Die Bewertung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Schemata. Bei der Befundung nach Vysis™-Kriterien musste das Präparat für eine positive (maligne) Befundung vier oder mehr der 25 Zellkerne mit einer Zunahme der Signale der Chromosomen 3, 7 oder 17 oder 12 oder mehr Zellkerne mit einem oder keinem Signal für 9p21 aufweisen. Nach den Kriterien der Basler Arbeitsgruppe galt ein Präparat mit 2 oder mehr Zellkernen mit Signalzunahme bei Chromosom 3, 7 und 17 oder bei Verlust eines oder beider 9p2-Signale als maligne. Bei beiden Schemata durften physiologische polyploide Schirmzellen nicht mit in die Wertung eingehen. Erschwerte Auswertungsbedingungen mit falsch-positiven Ergebnissen zeigten sich bei Papanicolaou-Präparaten. Dagegen fielen keine Unterschiede bei der Untersuchung im Hinblick auf Gewinnungsart der Präparate (Spontan-, Pouchurin und Blasenspülflüssigkeit) auf.

Die Langzeitaufbewahrung der Präparate erfolgte in kältestabilen Plastikbehältern bei -20°C. Es zeigte sich dabei eine kontinuierliche Qualitätsabnahme mit Dauer der Aufbewahrung, die erneute Auswertungen deutlich erschwerte bis unmöglich machte. Im

Hinblick auf die erbrachten Ergebnisse war FISH nach Vysis-Schema deutlich sensitiver als die Zytologie (79,2 % vs. 54,2 %). Die Auswertung nach Basel war gleich sensitiv, jedoch mit 76,4 % deutlich weniger spezifisch (Vysis-Verfahren 92,7 %, Zytologie 98,2 %). Aufgrund vieler falsch-positiver Resultate im Verlauf der gesamten Studie zeigte sich die Bewertung nach Basel als zu wenig spezifisch und ist somit für weitere Auswertungen nicht zu empfehlen. Zytologie und FISH waren bei höhergradigen Karzinomen gleich sensitiv (je 100 %). Die Sensitivität nahm mit dem Grad der Zellaberrationen ab. Von den beiden Fällen im Verlauf aufgetretenen CIS wurde keines zytologisch und nur eines durch FISH detektiert. Niedriggradige G1-Karzinome wurden zu 60 % von beiden Verfahren gleich sensitiv detektiert. 91 % betrug die Sensitivität der FISH bei G2-Karzinomen gegenüber 72,7 % der Zytologie.

Daneben kann von einer prognostischen Aussagekraft aktuell falsch-positiver Vysis-Ergebnissen ausgegangen werden. Bereits andere Harnblasenkarzinomstudien (92) konnten zeigen, dass zum Zeitpunkt der Studie falsch-positive FISH-Ergebnisse sich im weiteren follow-up in 88,9 % der Präparate als richtig erwiesen. Eine zeitlich längere klinische Verlaufsbeobachtung erbrachte Klarheit, ob die FISH-Beurteilung falsch-positiv ist oder ob die zu diesem Zeitpunkt erhobenen positiven Resultate prognostisch für eine Karzinomentwicklung stehen.

5.3 Schlussfolgerung

Die aktuelle Studie hat gezeigt, dass FISH mit dem UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit ein sicher und einfach durchführbares Verfahren darstellt, das eine Auswertung nach objektiven Kriterien ermöglicht.

1. Für die Zytologie erstellte ungefärbte Präparate zeigten sich unabhängig von der Gewinnungsmethode des Zellmaterials als uneingeschränkt zugänglich für eine FISH-Auswertung. Lagerungszeiten von mehreren Monaten bis zur FISH-Anwendung brachten keine Funktions- oder Qualitätseinbußen. Unterschiede zeigten sich bei den gefärbten Präparaten. Während HE-gefärbte Präparate ebenso zuverlässig auswertbar wie ungefärbte Präparate waren, zeigte sich FISH an zuvor Papanicolaou-gefärbten Routinepräparaten als unbefriedigend mit falsch-negativen Resultaten und einer erschwerten mikroskopischen Auswertung.

2. Im Vergleich bereits erhobener zytologischer Untersuchungsergebnisse mit den ermittelten FISH-Resultaten erwies sich FISH mit Auswertung nach den Vysis-Kriterien im Gesamten deutlich sensitiver als die Zytologie (79,2 % vs. 54,2 %). Lediglich eine Auswertung nach Basel-Kriterien war bei gleicher Sensitivität weniger spezifisch (Spezifität Zytologie 98,2 %, Vysis- Auswertung 92,7 %, Basler Auswertung 76,4 %).
3. Die Klärung zytologisch zweifelhafter Befunde gelang auch mit FISH nur unbefriedigend. Beide Verfahren hatten im schwierig diagnostizierbaren Bereich der niedriggradigen Karzinome Sensitivitätseinbußen und kamen bei den G1-Karzinomen auf eine Sensitivität von je 60 %. Höhergradige Karzinome (G3) wurden von beiden Verfahren sicher detektiert.
4. Retrospektiv konnte festgestellt werden, dass FISH, wie es die im Vergleich zur Zytologie höhere Sensitivität belegt, in vielen Fällen eine im Verlauf beobachtete Karzinomentwicklung (positives follow-up) zum Zeitpunkt der negativen zytologischen Beurteilung hat nachweisen können. Darüber hinaus stellten sich aktuelle, im zeitlich festgelegten Verlaufsrahmen dieser Studie (noch) falsch-positive FISH-Ergebnisse (kein positives follow-up) dar, welche, in Anlehnung an die Ergebnisse anderer Studien (92), auf eine eventuelle Karzinomentwicklung im weiteren Verlauf prognostisch hinweisen könnten.

Zusammenfassend erwies sich FISH als ein Untersuchungsverfahren mit guter diagnostischer und prognostischer Aussagekraft. FISH ist daher auch an archivierten HE-gefärbten Präparaten eine effiziente Methode in der Urinzytologie mit einem positiven prädiktiven Wert von 82,6 %. Das hier vorgestellte Verfahren eignet sich für den Einsatz in der Routinediagnostik. Als vergleichsweise einfach durchführbares und methodisch stabiles Verfahren steht der Anwendung chromosomaler FISH-Untersuchungen auch an zytologischem Material anderer Organsystemen somit nichts im Wege, z.B. für den Nachweis und die prognostische Beurteilung beim Prostatakarzinom.

6. Bilder

6.1 DAPI-Fluoreszenzfilter (Zellkernmorphologie)

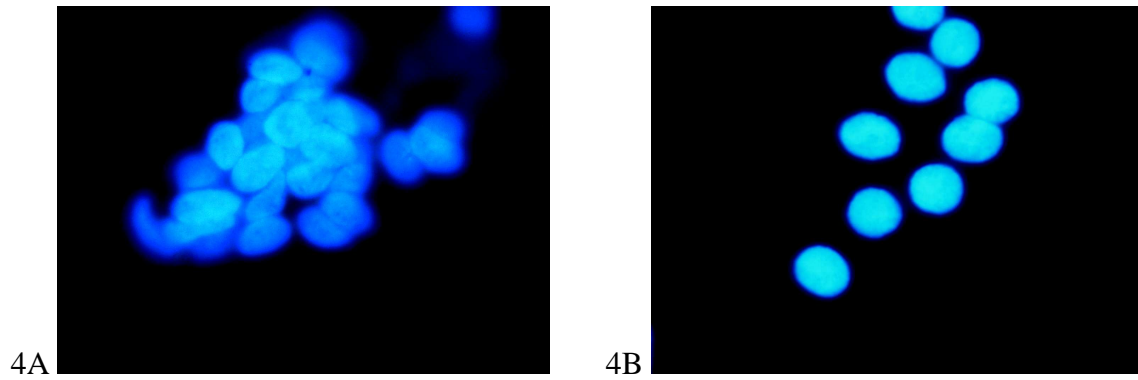


Abbildung 4:

A unauffällige, gleichmäßig glatt konturierte Zellkerne mit Clusterbildung.

B regelmäßig konturierte Zellkerne gleicher Größe.

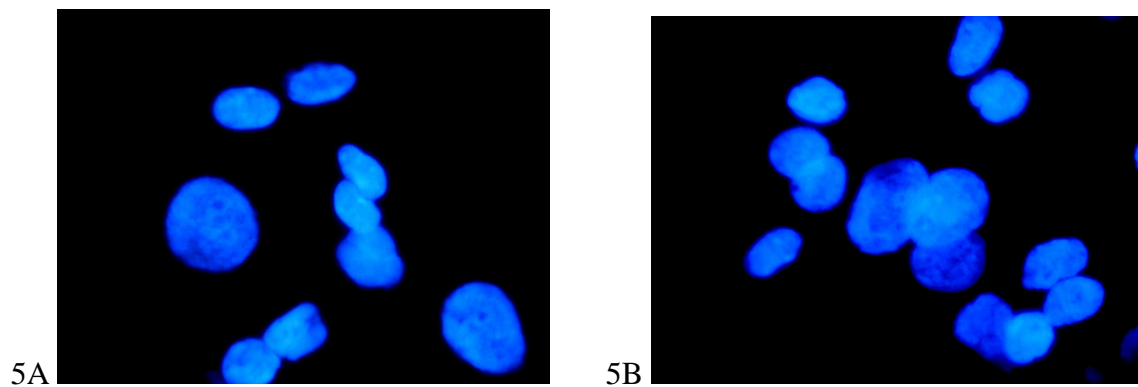


Abbildung 5

A und B: deutliche Zellkernvergrößerung neben unauffälligen Zellkernen.

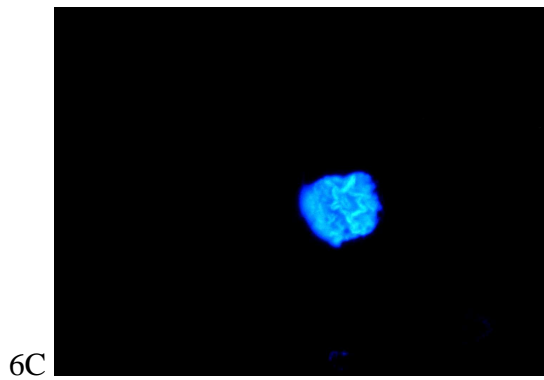
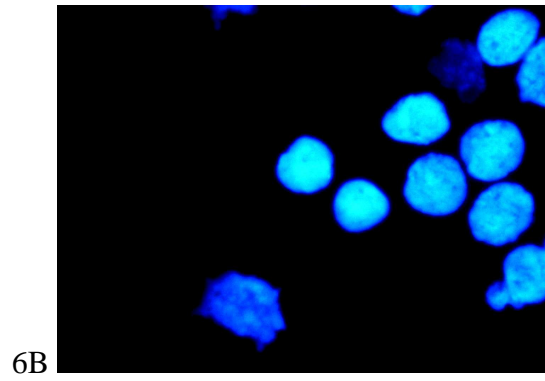
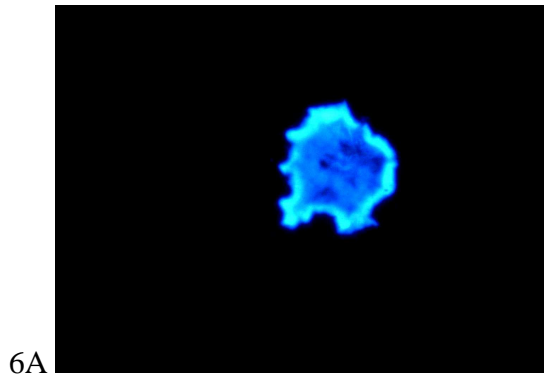
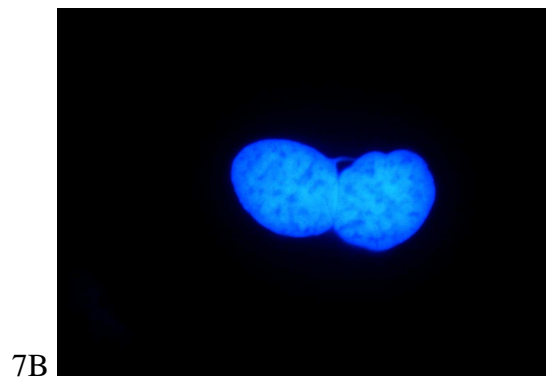
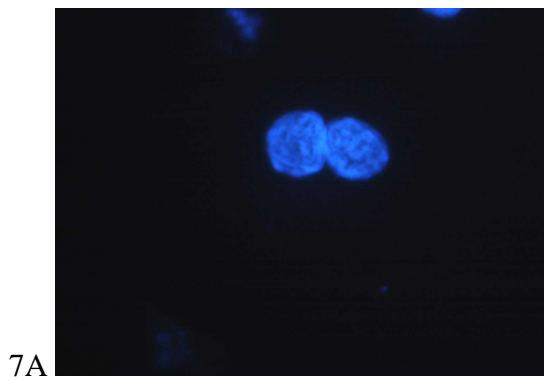


Abbildung 6:
A-C unregelmäßig konturierte, pleomorphe Zellkerne mit zum Teil pseudopodienartigen Ausziehungen.



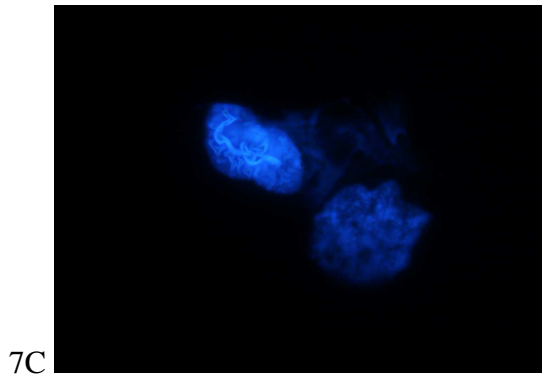


Abbildung 7:

A-C “schollige” Darstellung der Chromatinstruktur mit einem Auftreten von fluoreszenzintensiveren neben farbärmeren Arealen.

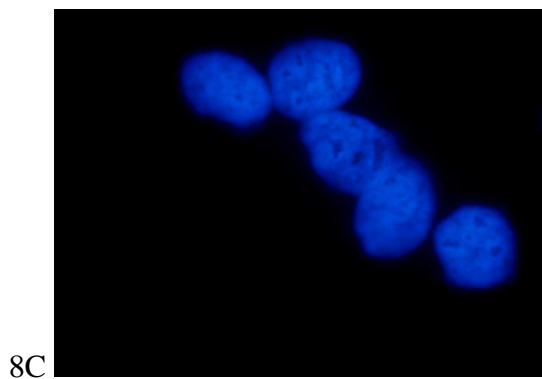
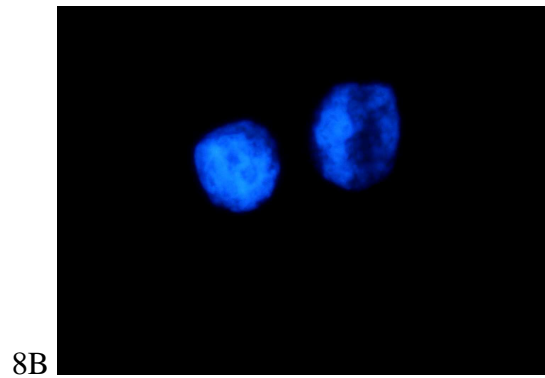
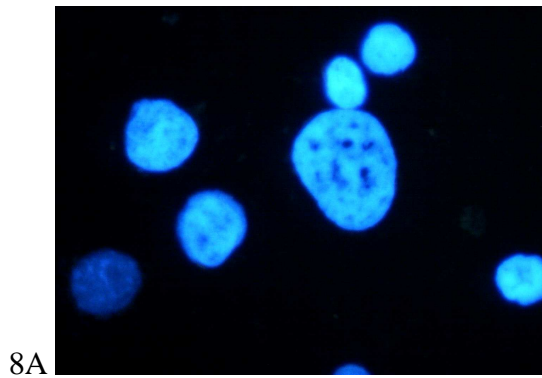


Abbildung 8:

A-C Störungen in der Chromatinverteilung, die zur Bildung von fluoreszenzfreien Arealen (“Lochbildung”) führen.

6.2 Rot-Grün-Fluoreszenzfilter (Chromosom 3 und 7) und Aqua-Fluoreszenzfilter (Chromosom 17)

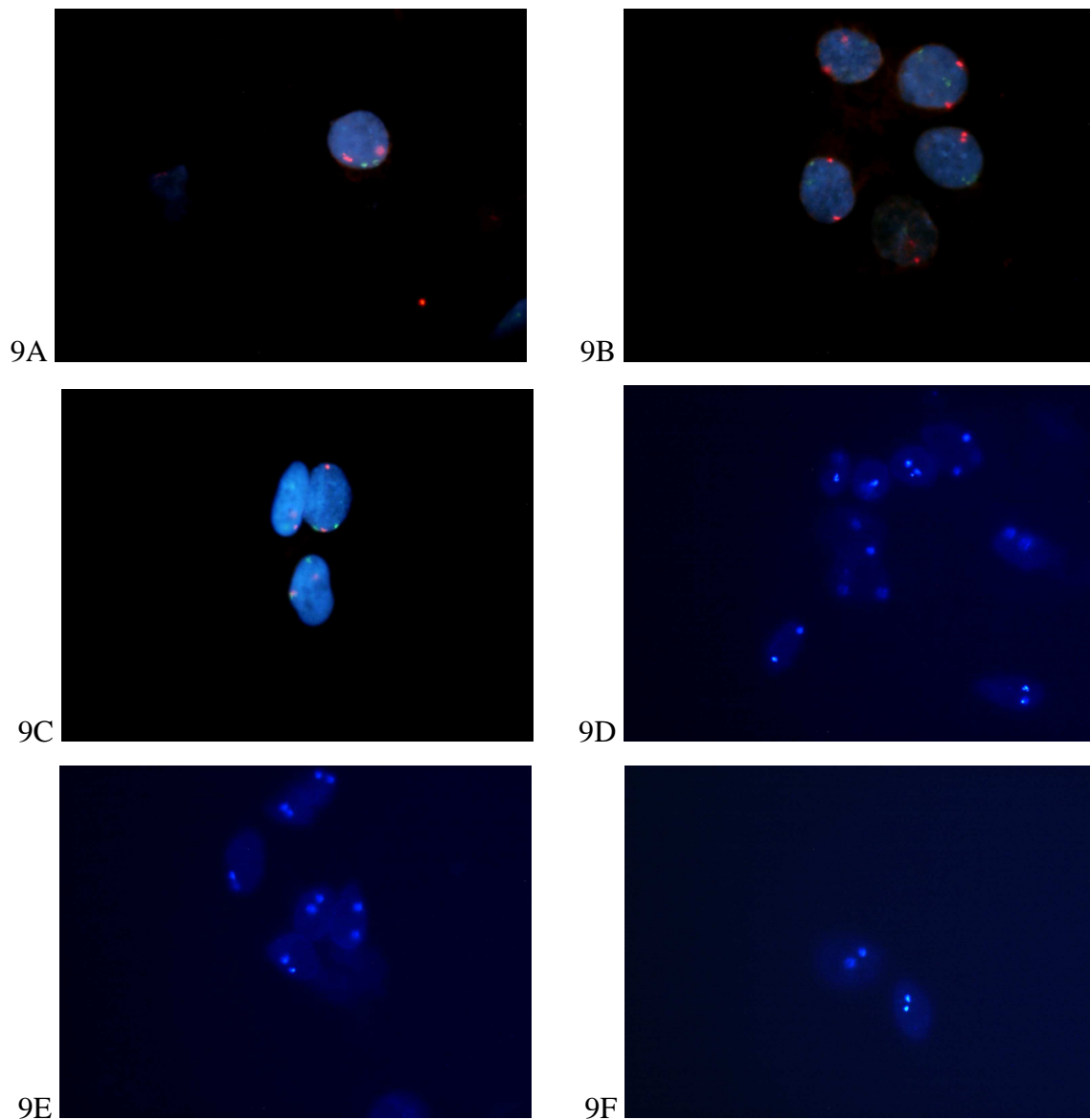


Abbildung 9:

A-C euploide Zellkerne mit je 2 roten und 2 (schwach sichtbaren) grünen Gensignalen pro Zellkern für die Chromosome 3 und 7 (Rot-Grün-Filter).

D-F euploide Zellkerne mit je 2 blauen Gensignalen pro Zellkern für Chromosom 17 (Aqua-Filter).

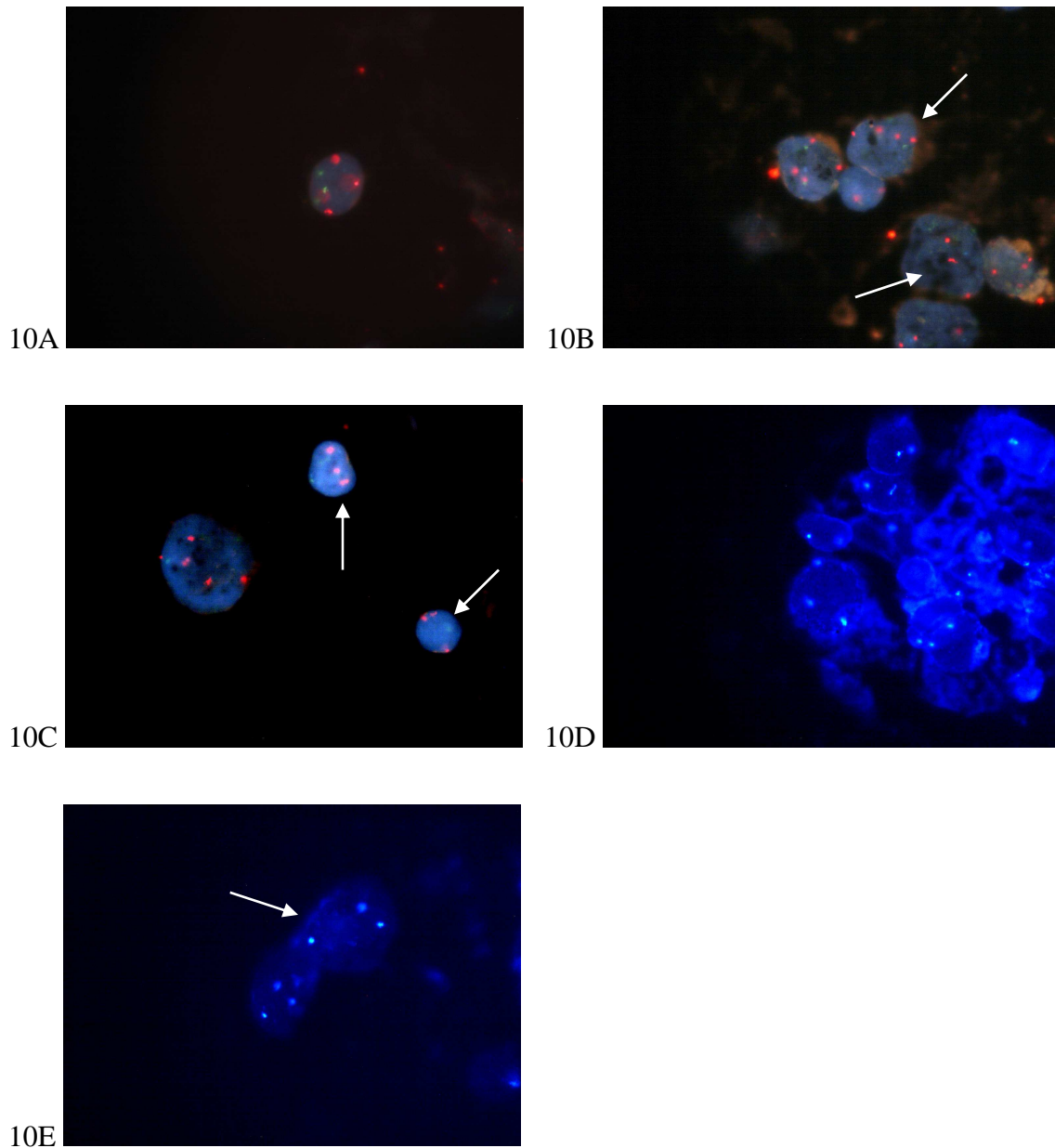
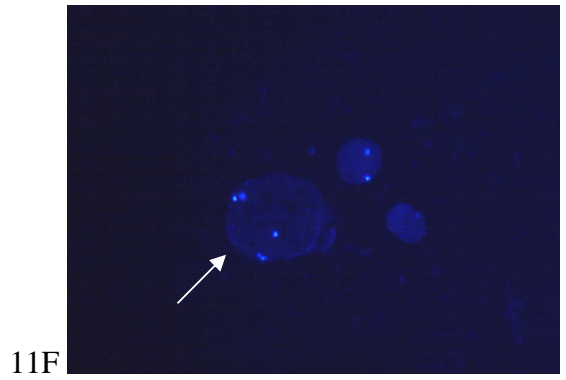
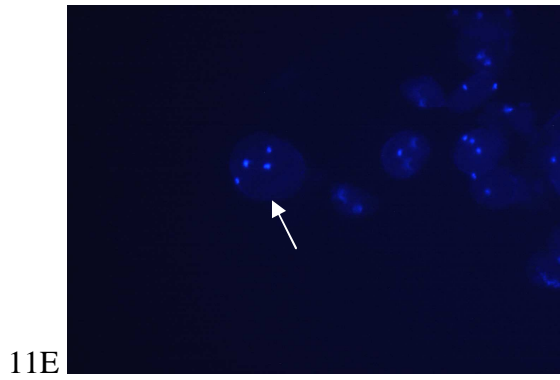
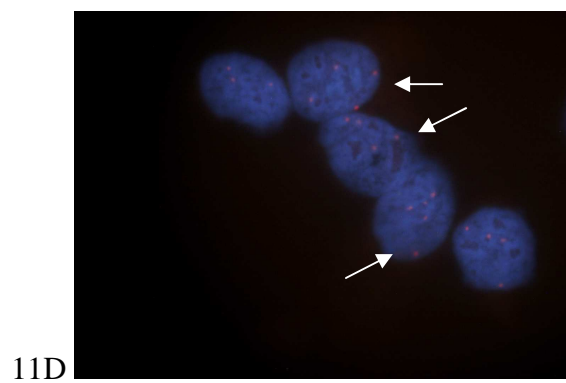
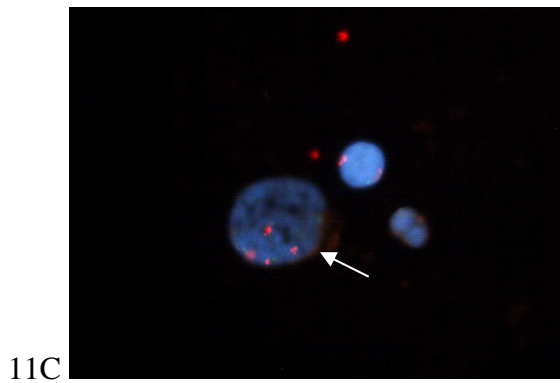
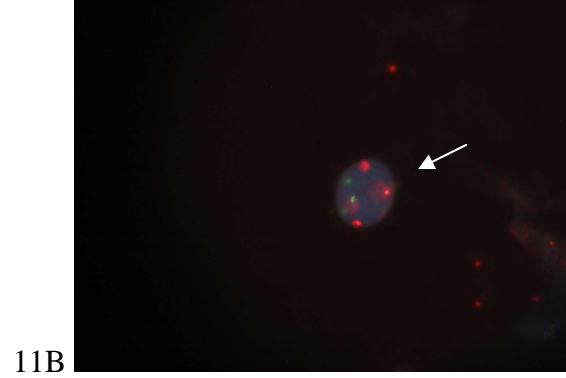
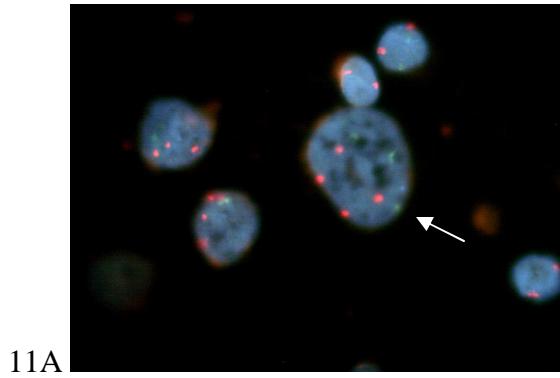


Abbildung 10:
trisome Zellkerne (siehe Pfeile) neben euploiden und tetraploiden Zellen.
A-C Rot-Grün-Filter, Chromosome 3 und 7.
D und E Aqua-Filter, Chromosom 17.



11G

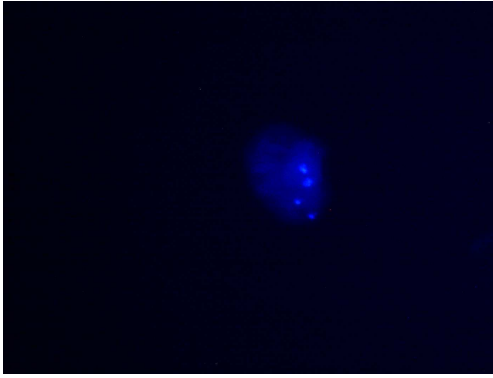


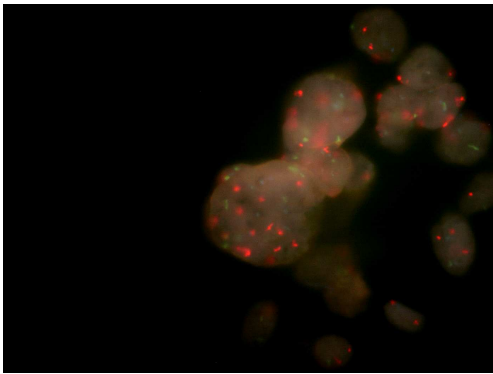
Abbildung 11:

tetraploide Zellkerne (siehe Pfeile) neben euploiden und trisomen Zellkernen.

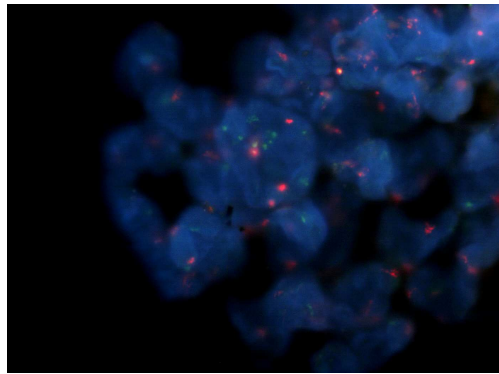
A-D Rot-Grün-Filter, Chromosome 3 und 7.

E-G Aqua-Filter, Chromosom 17.

12A



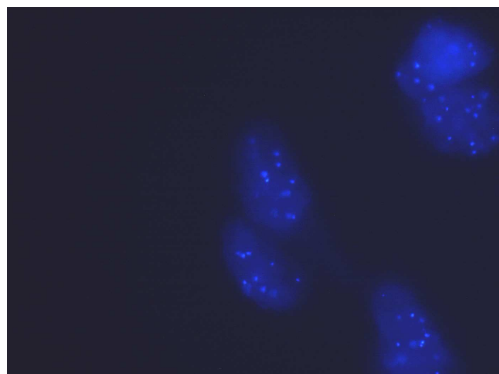
12B



12C



12D



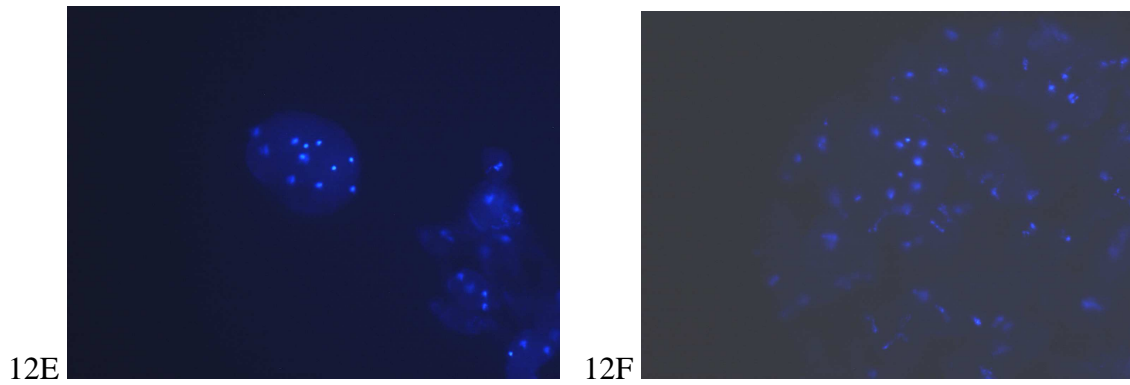
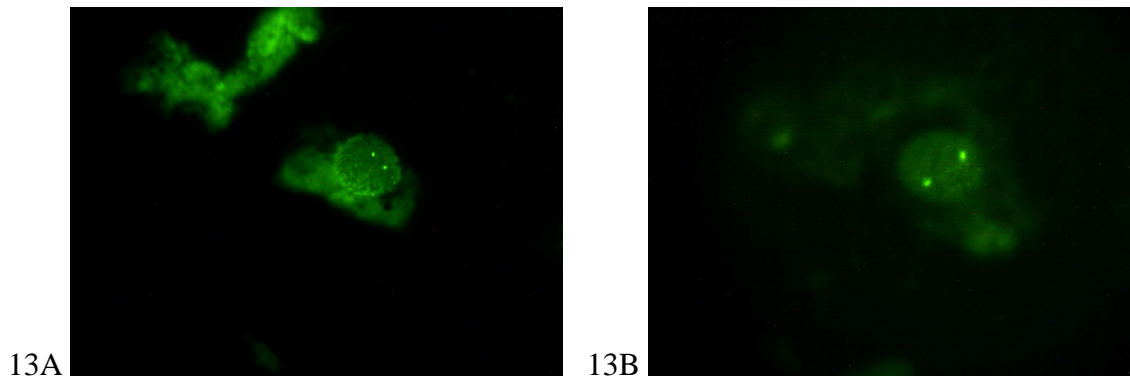


Abbildung 12:

A-C polyploide Zellkerne mit multiplen roten (Chromosom 3) und teilweise durch rötliche Fluoreszenz überlagerten grünen Sondersignalen (Chromosom 7) im Rot-Grün-Filter.

D-F polyploide Zellkerne mit multiplen blauen Sondersignalen für Chromosom 17 (Aqua- Filter).

6.3 Gold-Fluoreszenzfilter (Genlokus 9p21)



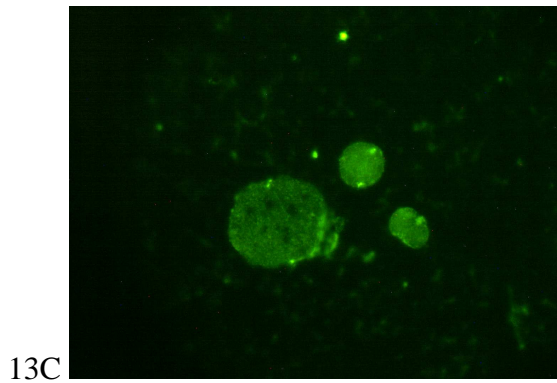


Abbildung 13:

A-C euploide Zellkerne mit je 2 gelben Sondensignalen pro Zellkern für Genlokus 9p21 (Gold-Filter).

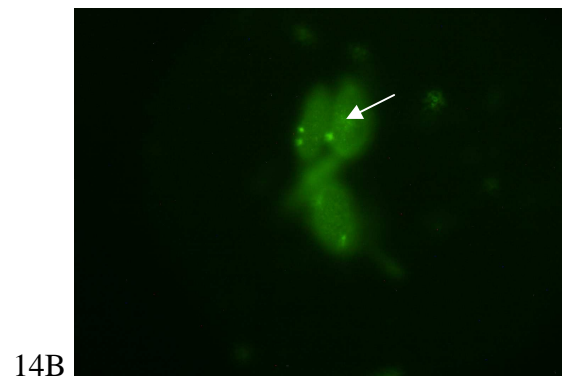
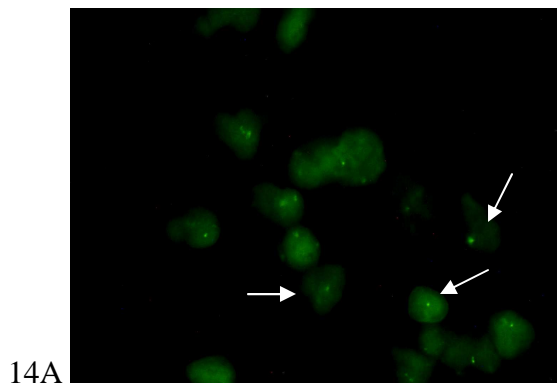


Abbildung 14:

A und B Zellkerne mit nur einem sichtbaren Sondensignal für Genlokus 9p21 bei Deletion (siehe Pfeile) neben euploiden Zellen (Gold-Filter).

6.4 Schwierigkeiten bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertbarkeit

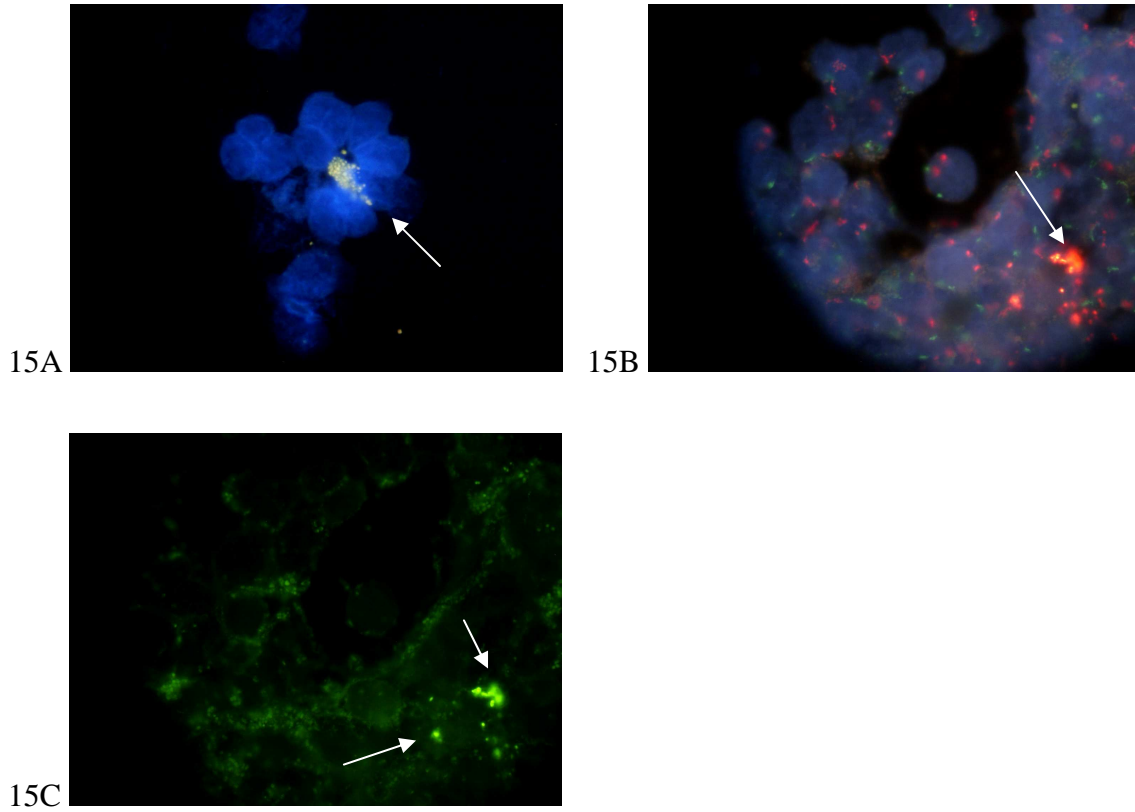


Abbildung 15:

grell-farbig fluoreszierende Bakterien (siehe Pfeile), farblich in Abhängigkeit vom angelegten Farbfluoreszenzfilter.

A Aqua-Filter.

B Rot-Grün-Filter.

C Gold-Filter.

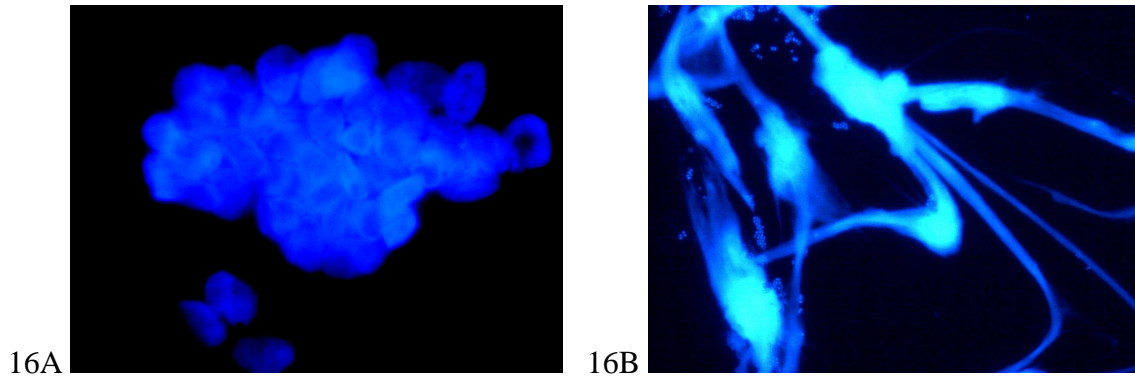


Abbildung 16:

A Cluster-Bildung, welche ein Eindringen der Proteasen und konsekutiv eine objektive Bewertung der Zellkerne kaum ermöglicht (DAPI-Filter).

B aufgeplatzte Zellkerne bei zu vehementer Sedimentation der Zellen auf den Objektträger; keine Auswertung möglich (DAPI-Filter).

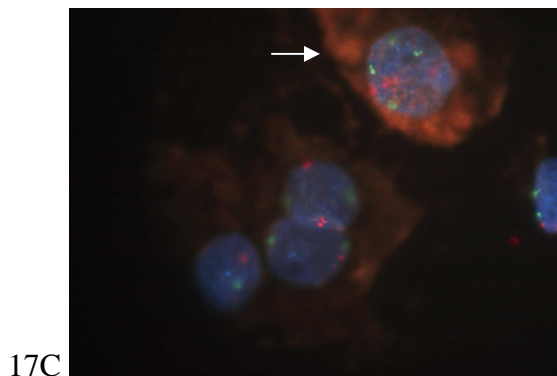
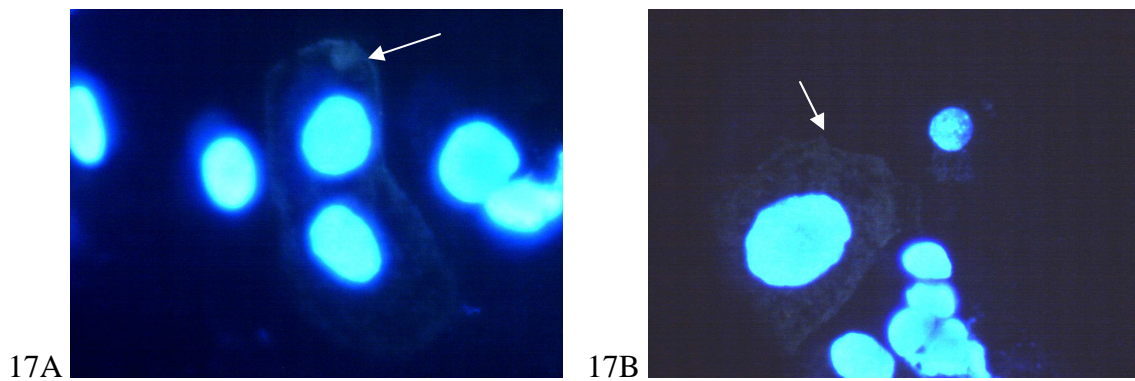


Abbildung 17:

am Zytoplasmasaum (siehe Pfeile) um den Zellkern erkennbare so genannte Schirmzellen; physiologischerweise größer als normale Zellkerne und polyploid.

A und B DAPI-Filter.

C Rot-Grün-Filter.

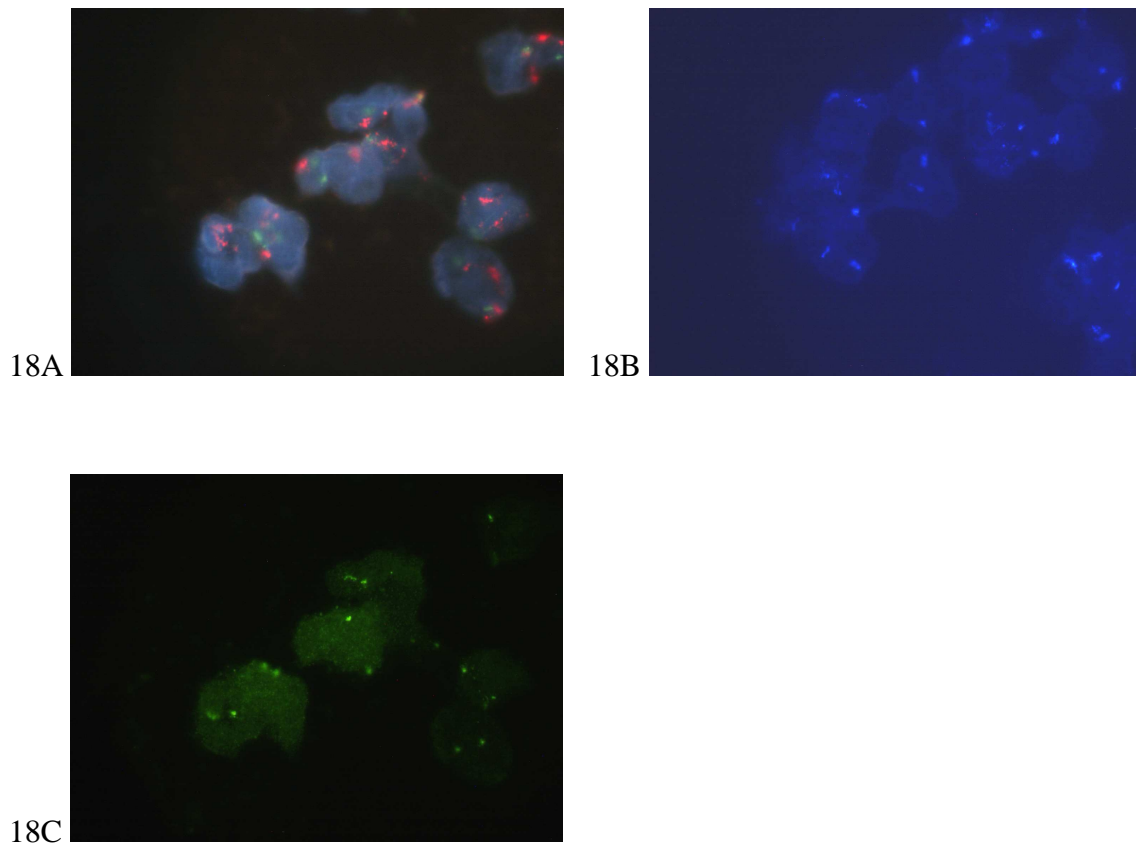


Abbildung 18:
inkomplett kondensierte Chromosomen; durch die dadurch ausbleibende punktuelle
Fluoreszenz des markierten Chromosoms besonders im Gold-Filter werden falsch
positive Ergebnisse einer Deletion begünstigt.
A Chromosome 3 und 7 (Rot-Grün-Filter).
B Chromosom 17 (Aqua-Filter).
C Genlokus 9p21 (Gold-Filter).

7. Literaturverzeichnis

1. Aben KK, Cloos J, Koper NP, Braakhuis BJ, Witjes JA, Kiemeny LA (2000)
Mutagen sensitivity in patients with familial and non-familial urothelial cellcarcinoma.
Int J Cancer 88: 493-496.
2. Aben KK, Witjes JA, Schoenberg MP, Hulsbergen-van de Kaa C, Verbeek AL, Kiemeny LA (2000)
Familial aggregation of urothelial cell carcinoma.
Int J Cancer 98: 274-278.
3. Althausen AF, Prout GFjr, DI JJ (1976)
Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ.
J Urol 116: 575-580.
4. American Cancer Society
Cancer Facts and Figures 2005.
Atlanta: American Cancer Society, 2005.
5. Anderstrom C, Johannson CL, von Schultz L (1983)
Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: A clinicopathologic and prognostic study.
Cancer 52: 1273-1280.
6. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Mediana S, van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F (2001)
Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors.
Am J Pathol 158: 1955-1959.
7. Bretheau D, Lechevallier E, Jean F, Rampal M, Coulange C (1993)
Tumors of the superior urinary tract and associated bladder tumors: clinical and etiological aspects.
Prog Urol 3: 979-987.
8. Bringuier PP, Tamimi Y, Schuurin E, Schalken J (1996)
Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumors; relationship with chromosome 11q13 amplification.
Oncogene 12: 1747-1753.
9. Bruch HP, Trentz O (2003)
Berchtold: Chirurgie.
Urban und Fischer, 4.Auflage: München Jena.

10. Bubendorf L (2002)
FISH in der Zytologie.
Cyto-Info 3: 86-90.
11. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch M, Gasster T, Dalquen P (2001)
Multiprobe FISH for Enhanced Detection of Bladder Cancer in Voided Urine Specimens and Bladder Washings.
Am J Clin Pathol 116: 79-86.
12. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA (1991)
Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma.
Oncogene 6: 2305-2309.
13. Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D (1995)
Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas.
Cancer Res 55: 224.
14. Cantor KP, Lynch CF, Hildesheim ME, Dosemeci M, Lublin J, Alavanja M, Craun G (1998)
Drinking water source and chlorination byproducts. I. Risk of bladder cancer.
Epidemiology 9: 21-28.
15. Castela JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC (2001)
Gender- and smoking-related bladder cancer risk.
J Natl Cancer Inst 93: 538-545.
16. Cheng L, Neumann RM, Nehra A, Spotts BE, Weaver AL, Bostwick DG (2000)
Cancer heterogeneity and its biologic implications in the grading of urothelial carcinoma.
Cancer 88: 1663-1670.
17. Cordon-Cardo C, Reuter VE (1997)
Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer.
Semin Diagn Pathol 14: 123-132.
18. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE (1992)
Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer.
J Natl Cancer Inst 84: 1251-1256.
19. Degtyar P, Neulander E, Zirkin H, Yusim I, Douvdevani A, Mermershtain W, Kaneti I, Manar E (2003)
Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder.
Urol 63: 398-401.

20. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, Zavala Pompa A, Cohen C, Young RH, Amin MB (2000)
Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia.
Mod Pathol 13: 1315-1323.
21. Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I (2004)
Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs.
World Health Organization Classification of Tumors.
International Agency for Research on Cancers, Lyon 2004: 120-123.
22. Fadl-Elmula I, Gorunova L, Madahl N, et al. (2000)
Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas.
Genes Chrom Cancer 29: 256-265.
23. Fadl-Elmula I, Kytola S, Pan Y, et al. (2001)
Characterization of chromosomal abnormalities in urothelial carcinomas by G banding, spectral karyotyping and FISH analysis.
Int J Cancer 92: 824-831.
24. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2001)
Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.
IARC Press: Lyon.
25. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M (1992)
Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer.
Cancer Res 52: 1393-1398.
26. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH (1994)
Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands.
J Natl Cancer Inst 86: 1600-1608.
27. Griesser H (2002)
Exfoliativzytologie der ableitenden Harnwege.
Cyto-Info 3: 79-85.
28. Griesser H (2001)
Zytopathologie- zukünftige Trends.
Verh Dtsch Ges Path 85: 94-99.
29. Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA (1998)
Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33.
Genomics 48: 277-288.

30. Haleblian GE, Skinner EC, Dickinson MG, Lieskovsky G, Boyd SD, Skinner DG (1998)
Hydronephrosis as a prognostic indicator in bladder cancer patients.
J Urol 160: 2011-2014.
31. Halling K, King W, Sokolova I, Meyer R (2000)
A comparison of Cytology and Fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma.
J Urol 164: 1768-1775.
32. Hasui Y, Osada Y, Kitada S, Nishi S (1994)
Significance of invasion to the muscularis mucosae on the progression of superficial bladder cancer.
Urology 43: 782-786.
33. Hickman ES, Moroni MC, Helin K (2002)
The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer.
Curr Opin Genet Dev 12: 60-66.
34. Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicholli H, Smith AH (1996)
Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina.
Epidemiology 7: 117-124.
35. IARC (1987)
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42.
IAC Press: Lyon.
36. IARC (2004)
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking.
IARC Press: Lyon.
37. Ioachim E, Charchanti A, Stavropoulos NE, SKopelitou A, Athanassiou ED, Agnantis NJ (2000)
Immunohistochemical expression of retinoblastoma gene product (Rb), p53 protein, MDM2, C-erbB-2, HLA-DR and proliferation indices in human urinary bladder carcinoma.
Histol Histopathol 15: 721-727.
38. Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R (1991)
Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas.
Cancer REs 51: 5736-5743.

39. Jakse G, Loidl W, Seeber G, Hofstädter F, Marberger H (1985)
Das T1G3-Urothelkarzinom der Harnblase.
Akt Urol 16: 304-308.
40. Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (1998)
Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes.
Am J Pathol 153: 1467-1473.
41. Junker K, Werner W, Mueller C, Ebert W, Schubert J, Claussen U (1999)
Interphase cytogenetic diagnosis of bladder cancer on cells from urine and bladder washing.
Int J Oncol 14: 309-313.
42. Kiemeny LA, Moret NC, Witjes JA, Schoenberg MP, Tulinius H (1997)
Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland.
J Urol 157: 1649-1651.
43. Kline MJ, Wilkinson EJ, Askeland R, et al. (1995)
DNA tetraploidy in Feulgen-stained bladder washings assessed by image cytometry.
Anal Quant Cytol Histol 17: 129-134.
44. Koenig F, Jung K, Schnorr D, Loening S (2000)
Urinary markers of malignancy.
Clinica Chimica Acta 297: 191-205.
45. Kozubek M, Kozubek S, Lukasova E, et al. (1999)
High-resolution cytometry of FISH spots in interphase cell nuclei.
Cytometry 36: 279-293.
46. Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisc TH, Smith JA, Sullivan J, Sarosdy MF, Crissman JD, Coltman CA (1991)
A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder.
N Engl J Med 325: 1205-1209.
47. Lamm DL, Griffith JG (1992)
Intravesical therapy: Does it alter the natural history of superficial bladder cancer?
Semin Urol 10: 39-44.
48. Lapham RL, Grignon DJ, Ro JY (1997)
Pathologic prognostic parameters in bladder urothelial biopsy, transurethral resection, and cystectomy specimens.
Semin Diagn Pathol 14: 109-122.

49. Logothetis CJ, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992)
Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer.
J Natl Cancer Inst 84: 1256-1261.
50. Loweshwar VB, Soloway MS (2001)
Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfil clinical necessity?
J Urol 165: 1067-1077.
51. Martinez-Pineiro JA, Arocena F, Escudero A (1990a)
Neoadjuvant cisplatinium for locally advanced TCC of the urinary bladder: a prospective study of the Cueto Group (meeting abstract).
Eur Urol 18 (suppl 1): 149.
52. Meloni MM, Peier AM, Hadard FS, Powell IJ, Block AMW, Huben RP, et al.(1993)
A new approach in the diagnosis and follow up of bladder cancer.
Cancer Genet Cytogenet 71: 105-118.
53. Merlo A, Gabrielson E, Mabry M, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D, (1994)
Homozygous deletion on chromosome 9p and loss of heterozygosity on 9q,6p, and 6q in primary human small cell lung cancer.
Cancer Res 54: 2322.
54. Messing EM, Vaillancourt A (1990)
Hematuria screening for bladder cancer.
J Occup Med 32: 838-845.
55. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ (2005)
Molecular staging of bladder cancer.
BJU Int., 96: 7-12.
56. Mikulowski P, Hellsten S (2005)
T 1G1Urinary Bladder Carcinoma: fact or fiction?
Scand J Urol Nephrol., 39: 135-137.
57. Miller K, Weißbach L et al (1198)
Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms.
Der Urologe 4: 440-457.
58. Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, Torigoe S, Hosaka M, Iwasaki Y, Danenberg K, Danenberg PV (1993)
Analyses of p53 gene mutations in primary human bladder cancer.
Oncol Res 5: 245-249.
59. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA (1999)
World Health Organisation International Histological Classification of Tumours.
Histological Typing of Urinary Bladder Tumours.
2nd Edition. Springer Verlag: Berlin Heidelberg.

60. Mostofi FK, Sobin LH, Tosini I (1973)
Histological typing of urinary bladder tumors.
International Classification of Tumors, No. 19.
World Health Organisation, Geneva.
61. Negri E, La Vecchia C (2001)
Epidemiology and prevention of bladder cancer.
Eur J Cancer Prev 10: 7-14.
62. Neuhaus M, Wagner U, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R,
Alund G, Knönagel H, Rist M, Moch H, Mihatsch M, Gasser T, Sauter G (1999)
Polysomies But Not Y Chromosome Losses Have Prognostic Significance in
pTa/pT1 Urinary Bladder Cancer.
Human Pathol 30: 81-86.
63. Oosterlinck W, Kurth K-H, Schröder F, Bultnick J, Hammond B, Sylvester R
(1993)
A prospective European Organisation for Resaearch and Treatment of Cancer
Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection
followed by a single intravesical instillation of epirubicin or in a single stage Ta,
T1 papillary carcinoma of the bladder.
J Urol 149: 749-752.
64. Orntoft T, Wolf H (1997)
Molecular alterations in bladder cancer.
Urol Res 26: 223-233.
65. Osman I, Scher H, Zhang ZF, Soos TJ, Hamza R, Eissa S, Khaled H, Koff A,
Cordon-Cardo C (1997)
Expression of cyclin D1, but not cycylins E and A, is related to progression in
bilharzial bladder cancer.
Clin Cancer Res 3: 2247-2251.
66. Oya M, Schmidt B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA (1998)
Expression of G1- >S transition regulatory molecules in human urothelial
cancer.
Jpn J Cancer Res 89: 719-726.
67. Parker SL, Tong T, Colden S, et al (1996)
Cancer statistics.
A Cancer Journal for Clinicians 46: 5-27.
68. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999)
Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990.
Int J Cancer 80: 827-841.

69. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (2003)
Cancer Incidence in Five Continents.
IARC Scientific Publications No 155
IARC Press: Lyon.
70. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A (2002)
Bladder cancer: epidemiology, diagnosis and management.
Cancer Pract 10: 311-322.
71. Pisani P, Bray F, Parkin DM (2002)
Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population.
Int J Cancer 97: 72-81.
72. Presti JC Jr, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C (1991)
Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer.
Cancer Res 51: 5405-5409.
73. Quek M, Sanderson K, Danesumand S, Stein J (2004)
New molecular markers for bladder cancer detection.
Curr Opin Urol 14: 259-264.
74. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL (1994)
Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human non-melanoma skin cancers.
Genes Chromosomes Cancer 11: 222.
75. Ramakumar S, Bhuiyan JA, Besse JA, et al. (1999)
Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer.
J Urol 161: 388-394.
76. Ramos CG, Carvahal GF, Mager DE, Haberer B, Catalona WJ (1999)
The effect of high grade prostatic intraepithelial neoplasia on serum total and percentage of free prostate specific antigen levels.
J Urol 162: 1587-1590.
77. Richter J, Beffa L, Wagner U, Schraml P, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1998)
Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.
Am J Pathol 153: 1615-1621.
78. Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G (1997)
Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.
Cancer Res 57: 2860-2864.

79. Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knonagel h, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999)
Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer.
Cancer Res 59: 5687-5691.
80. Rodriguez-Alonso A, Pita-Fernandez S, Gonzalez-Carrero J, Nogueira-March JL (2002)
Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 und T2a transitional cell bladder carcinoma.
Cancer 94: 1677-1684.
81. Rosin MP, Cairns P, Epstein JI, Schoenberg MP, Sidransky D (1995)
Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder.
Cancer Res 55: 5213-5216.
82. Ross JS, Cohen MB (2000)
Ancillary methods for the detection of recurrent urothelial neoplasia.
Cancer 90: 75-86.
83. Rübber H, Lutzeyer W, Fischer N, Deutz F, Lagrange W, Giani G, and members of the registry for urinary tract tumors RWTH (1988)
Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors.
J Urol 139: 283-285.
84. Ruppert JM, Tokino K, Sidransky D (1993)
Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9.
Cancer Res 53: 1230-1232.
85. Sandberg A, Berger S (1994)
Review of chromosome studies in urological tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer.
J Urol 151: 545-560.
86. Sauter G, Gasser TC, Moch H, Richter J, Jiang F, Albrecht R, Novotny H, Wagner U, Bubendorf L, Mihatsch MJ (1997)
DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometrie and FISH.
Urol Res 25 (suppl) 1: 37-43.
87. Sauter G, Moch H, Gudat F, Mihatsch MJ, Haley J, Meecker T, Waldman F (1993)
[Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH)].
Verh Dtsch Ges Pathol 77: 247-251.

88. Schmitz-Drager BJ, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y (2000)
P53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer.
Playground for urology scientists?
Eur Urol 38: 691-699.
89. Schultz DC, Vanderveer L, Buetow KH, Boente MP, Ozols RF, Hamilton TC, Godwin AK (1995)
Characterization of chromosome 9 in human ovarian neoplasia identifies frequent genetic imbalance on 9q and rare alterations involving 9p, including CDKN2.
Cancer Res 55: 2150.
90. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, de Aloysio G, Ferrari P, Ardito R, de Gaetani C, Capelli G, Cittadini A, Trentini GP (2002)
Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome.
Int J Cancer 97: 671-678.
91. Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD (1997)
Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers.
Br J Cancer 75: 1788-1792.
92. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, Pettay JD, Biscotti CV, Liou LS, Procop GW, Jones JS, Ulchaker J, Zippe CD, Tubbs RR (2003)
Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology.
J Urol 169: 2101-2105.
93. Skinner DG, Daniels JR, Russell CA, Lieskovsky G, Boyd SD, Nichols P, Kern W, Sakamoto J, Krailo M, Groshen S (1991)
The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial.
J Urol 145: 459-467.
94. Smeets AWGB, Pauwels RPE, Beck JLM, Geraedts JPM, Debruyne FMJ, Laarakkers L, Feitz WFJ, Vooijs GP, Ramaekers FCS (1987)
Tissue specific markers in flow cytometry of urological cancers.
III. Comparing chromosomal and flow cytometric DNA analysis of bladder tumors.
Int J Cancer 39: 304-310.
95. Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML (1998)
Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water.
Am J Epidemiol 147: 660-669.

96. Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, Groshen S, Taylor CR, Jones Pa, Skinner GD, Cote RJ (1998)
Effect of p21WAF1/CIP1 expression o tumor progression in bladder cancer.
J Natl Cancer Inst 90: 1072-1079.
97. Stöckle M, Meyenburg W, Wellek S, Voges G, Gertenbach U, Thüroff JW, Huber C, Hohefellner R (1992)
Advanced bladder cancer (stages pT3b, pT4a, pN1, pN2): Improved survival after radical cystectomy and 3 adjuvant cycles of chemotherapy.
J Urol 148: 302-306.
98. Tanguay C, Harvey I, Houde M, Srigley JR, Tetu B (2003)
Leiomyosarcoma of urinary bladder following cyclophosphamide therapy: report of two cases.
Mod Pathol 16: 512-514.
99. Thiede T, Christensen BC (1969)
Bladder tumours induced by chlornaphazine. A five-year follow-up study of chlornaphazine –treated patients with polycythaemia.
Acta Med Scand 185: 133-137.
100. Tiguer R, Lessard A, So A, Fradet Y (2002)
Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer.
World J Urol 20: 190-195.
101. Tribukait B, Gustafson H, Esposti PL (1982)
The significance of ploidy and proliferation of the clinical and biological evaluation of bladder tumours: a study of 100 untreated cases.
Br J Urol 54: 130-135.
102. Utz DC, Farrow GM (1984)
Carcinoma in Situ of the urinary tract.
Urol Clin N Am 11:735-740.
103. Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria M, Crawford E (2003)
The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer.
Urol Oncol 22: 16-19.
104. Varkarakis MJ, Gaeta J, Moore RH, Murphy GP (1974)
Superficial bladder tumor. Aspects of clinical progression.
Urology 4: 414-420.
105. Veeramackaneni R, Nordberg M, Shi R, Herrera G, Turbat-Herrera E (2003)
Evaluation of fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma.
Diagn Cythopathol 28: 301-307.

106. Wolman SR (1994)
Fluorescence In Situ Hybridization: A New Tool for the Pathologist.
Human Pathology 25: 586-590.
107. Younes M, Sussman J, True LD (1990)
The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder.
Cancer 66:543-548.
108. Zhao J, Richter J, Wagner U, Roth B, Schraml P, Zellweger T, Ackermann D, Schmid U, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G (1999)
Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa).
Cancer Res 59: 4658-4661.

