

Prospektive validierende Kohorten-Studie mit gutem Referenz-Standard:

DNA-Bildzytometrie zum Ausschluss eines Progresses bei Mikrokarzinomen der Prostata

„DNA-ProKo-Studie“

Hintergrund:

Die Entscheidung zu einer Active Surveillance-Strategie bei Vorliegen eines sog. klinisch insignifikanten Mikrokarzinoms der Prostata beruht derzeit neben der Kleinheit des Tumor-Herdes und dem PSA-Wert im Blut entscheidend auf der subjektiven histopathologischen Malignitätsgradierung an gefärbten Schnitten von Stanzbiopsien nach Gleason (1973) (Interdisziplinäre S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2009). Da diese Gradierung erwiesenermaßen schlecht reproduzierbar (Burchardt et al., 2008) und nicht hinreichend prognostisch valide ist (Böcking, 2011), wird ein Parameter gesucht, der objektiver, reproduzierbarer und prognostisch valider als der Gleason-Score alleine eine zu erwartende Nicht-Progression von Mikrokarzinomen der Prostata vorhersagt und damit eine Entscheidung zur Active Surveillance für Arzt und Patient sicherer macht.

Wenn dies gelingt, würde sich der Nachweis von DNA-Diploidie als zu den Gleason-Scores 6 und ggf. 7a zusätzliches Eingangskriterium für die Durchführung einer AS-Strategie bei Patienten mit Mikrokarzinomen der Prostata empfehlen (siehe „Anleitung Prostatakarzinom“ der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Bundesverbandes Deutscher Pathologen, März 2011).

Hypothesen:

Diese Studie geht von der Hypothese aus, dass die gesuchte, objektive, reproduzierbare, dem Gleason Score überlegene prognostische Variable die sog. DNA-Ploidie ist, die DNA-bildzytometrisch als gebührenordnungsmäßig anerkannte Methode (EBM Nr. 19330) in der Breite in Deutschland verfügbar ist.

1. Hypothese der geplanten Studie ist, dass DNA-Bildzytometrie an Stanzbiopsien der Prostata (Peridiploidie mit niedriger Proliferationsfraktion, Tribukait, 2006) das Auftreten eines Progresses von unbehandelten Mikrokarzinomen unter Active Surveillance signifikant besser vorhersagen kann, als der Gleason-Score (6 und 7a) alleine. Die negativen Prädiktionswerte (NPV) für die Vorhersage einer Nicht-Progression sollten sich zwischen beiden Verfahren demnach signifikant unterscheiden.
2. Hypothese ist, dass das jährliche Progressionsrisiko für derartige, DNA-diploide Mikrokarzinome $\leq 1\%$ beträgt, in 5 Jahren also $< 5\%$.
3. Hypothese ist, dass die interindividuelle Reproduzierbarkeit der objektiven prognostischen DNA-Bildzytometrie signifikant höher ist, als diejenige der subjektiven Gleason-Gradierung.
4. Hypothese ist, dass eine Verkürzung der PSA-Verdoppelungszeit auf < 3 Jahre bei primär peridiploiden Mikrokarzinomen des Typs A mit einer Änderung des DNA-Ploidie-Musters Richtung der Typen B oder C einhergeht.

Studiendesign:

An den 287 Patienten mit Mikrokarzinomen der Prostata aus der von der Stiftung Männergesundheit aktuell bereits durchgeführten HAROW-Studie, die sich bis einschließlich Mai 2001 freiwillig und mit ihrem Einverständnis bereits einer AS-Strategie unterworfen haben und einem engmaschigen Follow-up unterzogen werden (s.o.), soll nachträglich an allen ihren Tumor-haltigen Stanzbiopsien eine prognostische DNA-Bildzytometrie nach gezielter enzymatischer Zellvereinzlung durchgeführt werden (<http://www.harow.de>). An allen Rebiopsien, welche Karzinomherde aufweisen, soll ebenfalls eine solche erfolgen, um ggf. eine Tumorprogression DNA-zytometrisch nachzuweisen.

Die prognostische Klassifikation der resultierenden DNA-Histogramme erfolgt gemäß dem beigefügten Schema in die vier Gruppen: A, B, C und D (Tribukait 1993); ferner soll eine Modifikation dieser Klassifikation in sechs Gruppen A, AB, B, BC, C und D (Haroske et al., 2001; Engelhardt, 2011, Tils, 2011). Die Erweiterung der bisherigen vier (Tribukait, 1993) auf sechs prognostische Gruppen ergab sich durch die Erkenntnis, dass die Hinzunahme der Proliferationsfraktion (> 5%) bei den Patienten mit diploiden Karzinomen eine weitere prognostische Differenzierung erlaubt (Tribukait, 2006). Als prognostisch besonders günstig, mit dem geringsten Risiko für einen Progress und daher am ehesten für eine AS-Strategie geeignet, sind demnach Patienten mit Mikrokarzinomen des Typs A (peridiploid mit Proliferationsfraktion <5%). Ob ggf. auch Patienten mit Mikro-Prostatakarzinomen der Typen AB oder B ein derart niedriges Progressionsrisiko aufweisen, soll im Rahmen dieser Studie ebenfalls geprüft werden.

Die DNA-zytometrischen Untersuchungen werden am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Biesterfeld durchgeführt. Dazu werden die der HAROW-Studienleitung bekannten behandelnden Urologen mit der Bitte angeschrieben, Namen und Adressen der jeweils die Stanzbiopsien der Patienten befundenden Pathologen mitzuteilen. Auf der Grundlage des von den Patienten bereits schriftlich vorab erteilten Einverständnisses zur Durchführung weiterer Labor-Untersuchungen an ihren Biopsien, werden die betreffenden Pathologen um leihweise Übersendung der in ihren Archiven befindlichen Tumor-haltigen Paraffin-Blöcke samt zugehörigen Schnittpräparaten und Kopien der histologische Begutachtungen gebeten. Nach Durchführung der DNA-Zytometrie erhalten die Pathologen die Paraffinblöcke samt histologischen Schnitten, zusammen mit einer Kopie des DNA-zytometrischen Befundes, zurück.

Als früher Indikator für einen Progress der Mikrokarzinome, bzw. Referenz-Standard dieser Studie, ist ein Anstieg des PSA-Wertes im Serum mit einer Verdoppelungszeit von unter drei Jahren vorgesehen, oder ein Anstieg des Gleason-Scores auf >6. Dabei wird der Tumor in den ersten beiden Jahren durch PSA-Bestimmungen und DRU alle drei Monate kontrolliert. Bleibt er stabil, wird sechsmonatlich untersucht. Rebiopsien werden alle 12- bis 18 Monate vorgenommen (entsprechend der Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, 2009).

Nach Markierung der Karzinom-haltigen Anteile auf den Schnittpräparaten und zugehörigen Paraffin-Blöckchen mittels Filzschreiber werden je drei 70 µm dicke Schnitte angefertigt und die Tumor-tragenden Anteile einer enzymatischen Zellvereinzlung unterzogen (der Rest wird verworfen). Es folgt eine spezifische Färbung der Erbsubstanz DNA mit Pararosanilin nach R. Feulgen (1923). Die Messung des DNA-Gehaltes von mindestens 300 Tumor-Zellkernen und > 30 Kernen von

Fibroblasten zur internen Kalibrierung erfolgt an dem als in-vitro-diagnostisches Gerät CE-zertifizierten MotiCyte-DNA (siehe Anlage). Die Vorklassifikation der Zellkerne in solche von Karzinomzellen und Fibroblasten erfolgt automatisch mit einem von Prof. Dr. Alfred Böcking an 47.000 Objekten aus Prostatakarzinom-Zellvereinzelnungs-Präparaten trainierten digitalen bildanalytischen Klassifikator (k-NN), welcher < 1% der Tumorzellkerne übersieht (Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen, Prof. Dr. T. Aach, D. Friedrich). Das Ergebnis der automatischen Klassifikation wird von der befundenden Pathologin (Frau Dr. N. Pomjanski, Schwerpunkt Cytopathologie) an einer sog. Bildgalerie überprüft und validiert. Die objektive Klassifikation der resultierenden DNA-Histogramme erfolgt automatisch gemäß dem vorgegebenen Algorithmus (Engelhardt, 2011; Tils 2011) nach einem von Dipl. Math. David Friedrich entwickelten Software-Programm des MotiCyte-DNA. Zur Ermittlung der interindividuellen Reproduzierbarkeit der DNA-Gradierung wird diese nachträglich verblindet, sowohl subjektiv und unabhängig durch Prof. Böcking wiederholt, als auch von Prof. Biesterfeld ein zweites Mal einer automatischen digitalen Klassifikation unterzogen.

Die ermittelten DNA-Gradierungen werden in Unkenntnis des klinischen Verlaufes an die Zentrale der HAROW-Studie übermittelt. Nach Ablauf einer Mindestnachbeobachtungszeit von fünf Jahren pro Patient werden die Ergebnisse des klinischen Follow-up bezüglich des Vorliegens eines Progresses mit denjenigen der DNA-Bildzytometrie zusammengeführt. Die statistische Auswertung mit Ermittlung der positiven und negativen Prädiktionswerte erfolgt, samt Vergleich der Signifikanzen, im Rahmen der HAROW-Studie. Eine Auswertung erfolgt auch für die Patienten, für die die vorgesehene fünfjährige Beobachtungszeit noch nicht abgelaufen ist. Die interindividuellen Reproduzierbarkeiten der Gleason- bzw. DNA-Malignitäts-Gradierung werden am Schwerpunkt Cytopathologie der Universität Düsseldorf ermittelt.

Patienten-relevante Endpunkte:

Durch Einbeziehung einer „diploiden DNA-Verteilung mit niedriger Proliferations-Fraktion“ in die Eingangskriterien für eine Active Surveillance Strategie bei klinisch insignifikanten Mikrokarzinomen der Prostata zusätzlich zum Gleason Score soll das Risiko einer möglichen therapeutischen Fehlentscheidung durch Ausschluss von Patienten mit möglicherweise progredienten Karzinomen gesenkt werden. Damit könnten sich mehr Männer beruhigt einer Active Surveillance Strategie unterziehen und damit Nebenwirkungen einer operativen- oder Strahlen-Therapie vermeiden und ihre Lebensqualität anhaltend verbessern. Andererseits würde ein Nachweis von DNA-Aneuploidie rechtzeitig erlauben, die gewählte Active Surveillance Strategie durch eine anderweitige S3-Leitlinien-gerechte Therapie abzulösen.

Publikationen:

Die erhaltenen Ergebnisse werden in peer-reviewed, englisch-sprachigen Fachzeitschriften für Urologie und/oder Pathologie publiziert.

Federführung:

Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld, Leiter des Schwerpunktes Cytopathologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für das Fach Pathologie

Prof. Dr. med. Lothar Weißbach, Wissenschaftlicher Vorstand der Stiftung Männergesundheit, Berlin, für das Fach Urologie

Laufzeit:

Ein Jahr

Kostenschätzung:

- | | | |
|----|--|-----------------|
| 1. | Dokumentationsassistenz/statistische Auswertung durch HAROW-Studienleitung | 5.740 € |
| 2. | Kostenerstattung für Untersuchungsmaterial einsendende Pathologen | 9.975 € |
| 3. | DNA-Zytometrien inklusive Rebiopsien | 22.050 € |

Summe: **37.765 €**

Definitionen der DNA-Ploidie-Grade

DNA-Ploidie Grad	Definition
A (diploid)	Eine Stammlinie bei 2c
A-B	Eine Stammlinie bei 2c und eine Proliferationsrate > 5%
B (tetraploid)	Ein Zellkern > 4,4c
B-C	Eine Stammlinie bei 4c, deren Variationskoeffizient bei >10% liegt
C (x-ploid)	Eine Stammlinie außerhalb von 1,8-2,2c und 3,6-4,4c
D (multiploid)	Mehrere Stammlinien außerhalb von 1,8-2,2c und 3,6-4,4c

Anlagen:

1. [A. Böcking und W. Samsel: Prostatakarzinom: Diagnose und Prognose, GEK, Schwäbisch-Gmünd 2008](#)
2. [W. Samsel und A. Böcking: Prognostische und therapeutische Relevanz der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom, Symposiumsbericht, GEK-Edition, 2006](#)
3. [A. Böcking: Selektive Literatur-Recherche zur prognostischen Relevanz der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom, 28.04.2011](#)
4. [„Anleitung Prostatakarzinom“ der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Bundesverbandes Deutscher Pathologen, März 2011](#)

Referenzen:

1. [Deutsche Gesellschaft für Urologie: Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Düsseldorf, 2009.](#)
2. Engelhardt, M.: PSA-Kinetiken als Indikationsstellung zur Prostatabiopsie, Med. Diss., Univ. Düsseldorf, 2011
3. [Burchardt M, Engers R, Müller M, Burchardt T, Willers R, Epstein JI, Ackermann R, Gabbert HE, de la Taille A, Rubin MA: Interobserver reproducibility of Gleason grading: evaluation using prostate cancer tissue microarrays. J Cancer Res Clin Oncol. 2008; 134: 1071-1081](#)
4. Epstein JI, Allsbrook WC,Jr, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol 2005;29: 1228-1242
5. [Haroske, G., Giroud, F., Reith, A., Böcking, A.: Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA-image cytometry. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. Analyt. Cell. Pathol. 17, 189-200, 1998](#)
6. Epstein JI, Allsbrook WC,Jr, Amin MB, Egevad LL, ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol 2005;29: 1228-1242
7. Tils, M.: DNA-Malignitäts-Grading beim Prostatakarzinom - Reproduzierbarkeit und Korrelation mit dem Gleason-Score und dem Staging. Med. Diss. Univ. Düsseldorf, 2011
8. [Tribukait, B.: Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: Clinical research and application. Europ. Urol. 23 \(2\), 64-76, 1993](#)
9. Tribukait, B.: Klinische Bedeutung der DNA-Durchflusszytometrie beim Prostatakarzinom. In: W. Samsel und A. Böcking: Prognostische und therapeutische Bedeutung der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom. GEK Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 41, 2006, S. 115-133