



# Praxis für Pathologie



Dr. med. Simon Savin  
[www.pathologie-savin.de](http://www.pathologie-savin.de)



**1. Die histologische Bearbeitung**

**2. Gleason Score (modifiziert in 2005)**

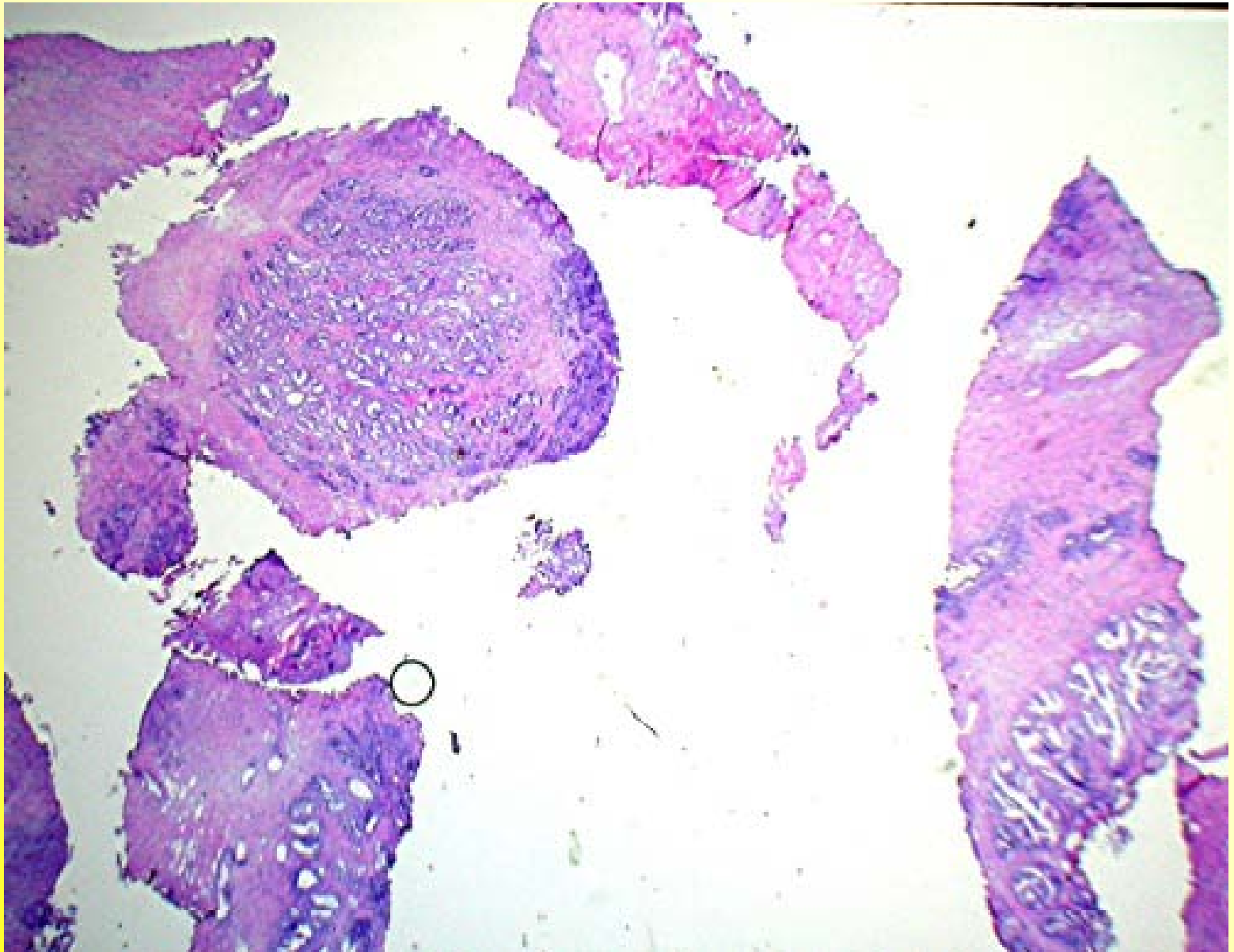
**3. DNA Zytometrie**

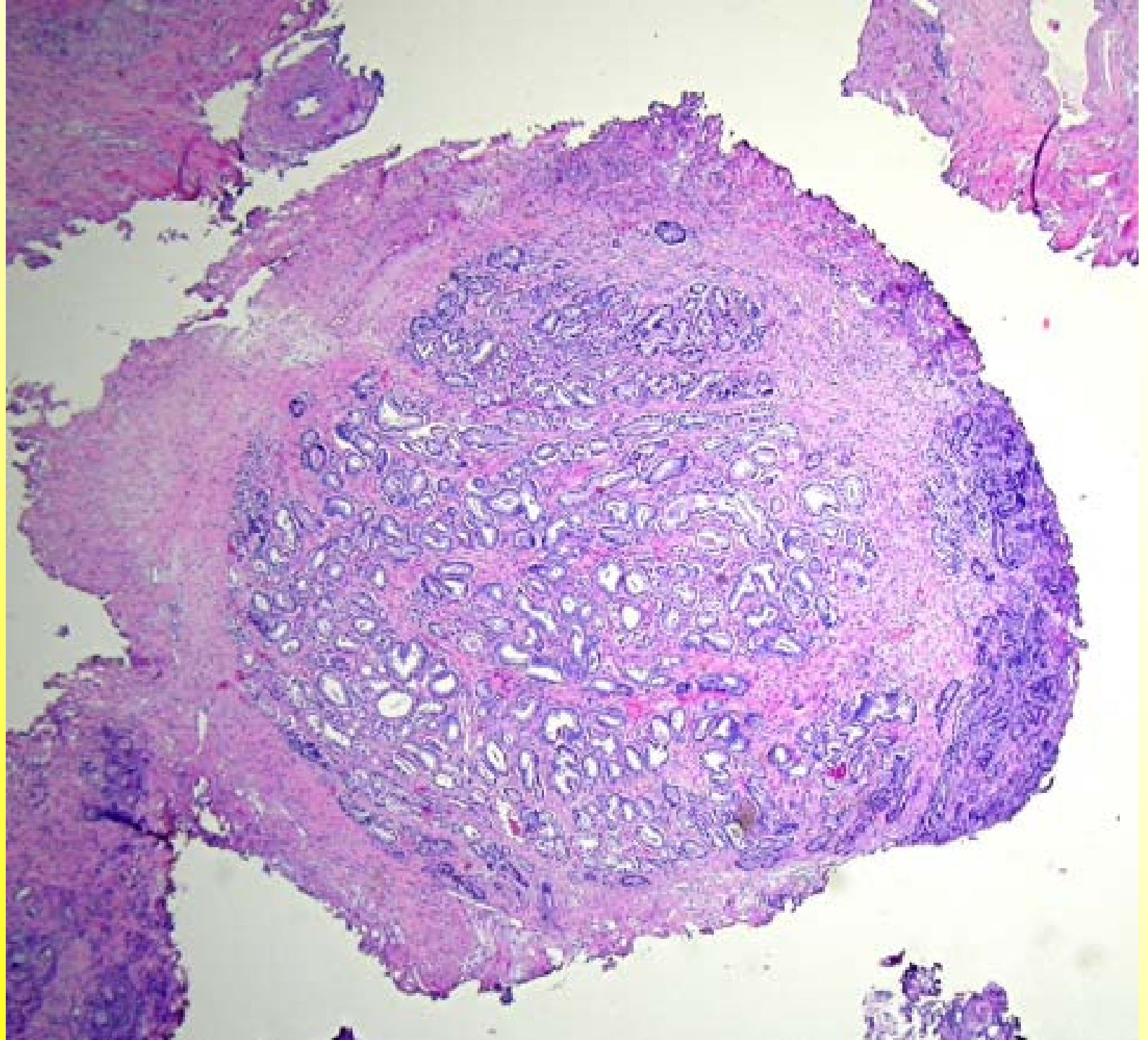


# Gewebe einer transurethralen Resektion wegen gutartiger Vergrößerung der Prostata

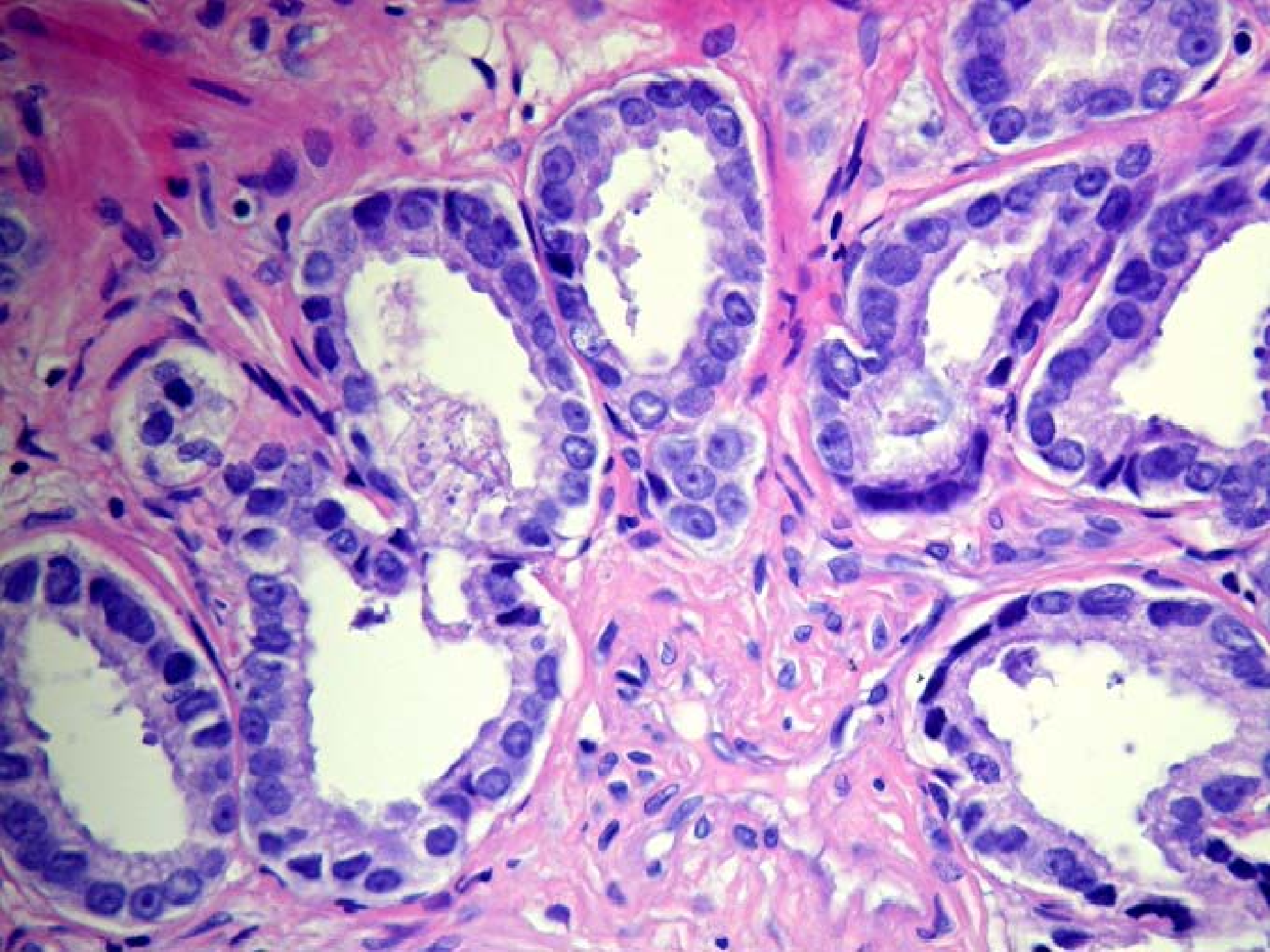


**In 15 % der TUR Material findet man ein Krebs**







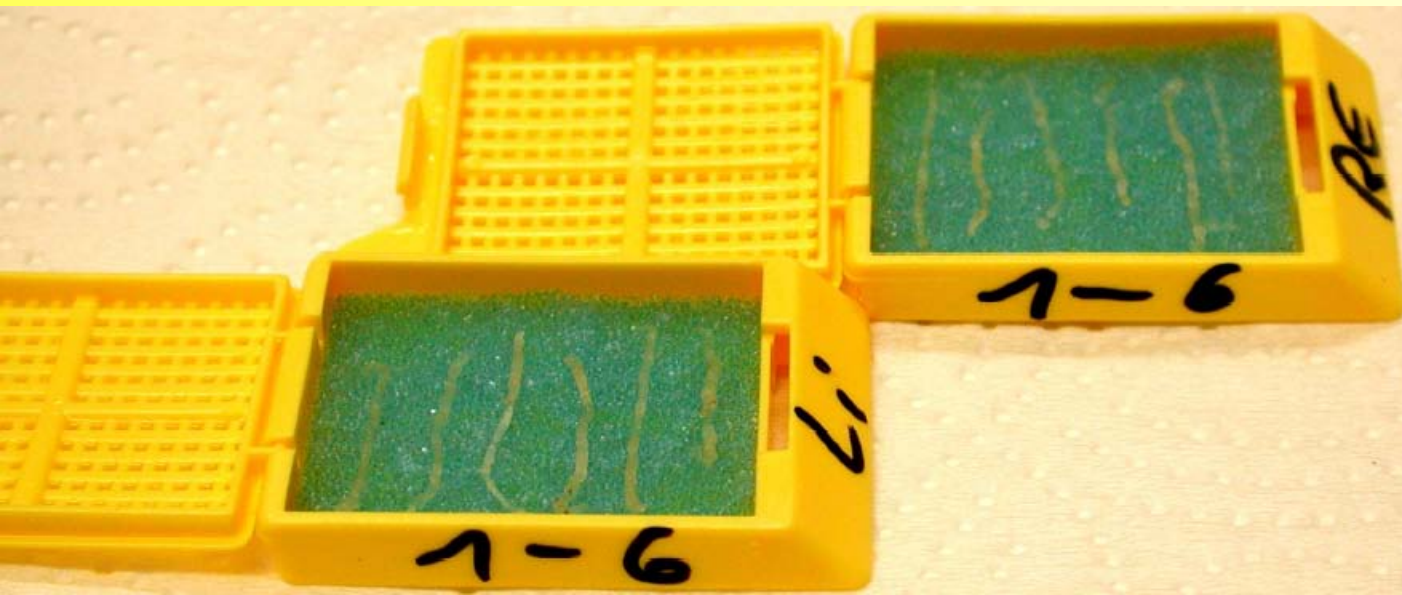


# Prostata-Stanzen

**Auffälliger Tastbefund, PSA Anstieg oder familiäre Anamnese**







**Markierung**

links

rechts

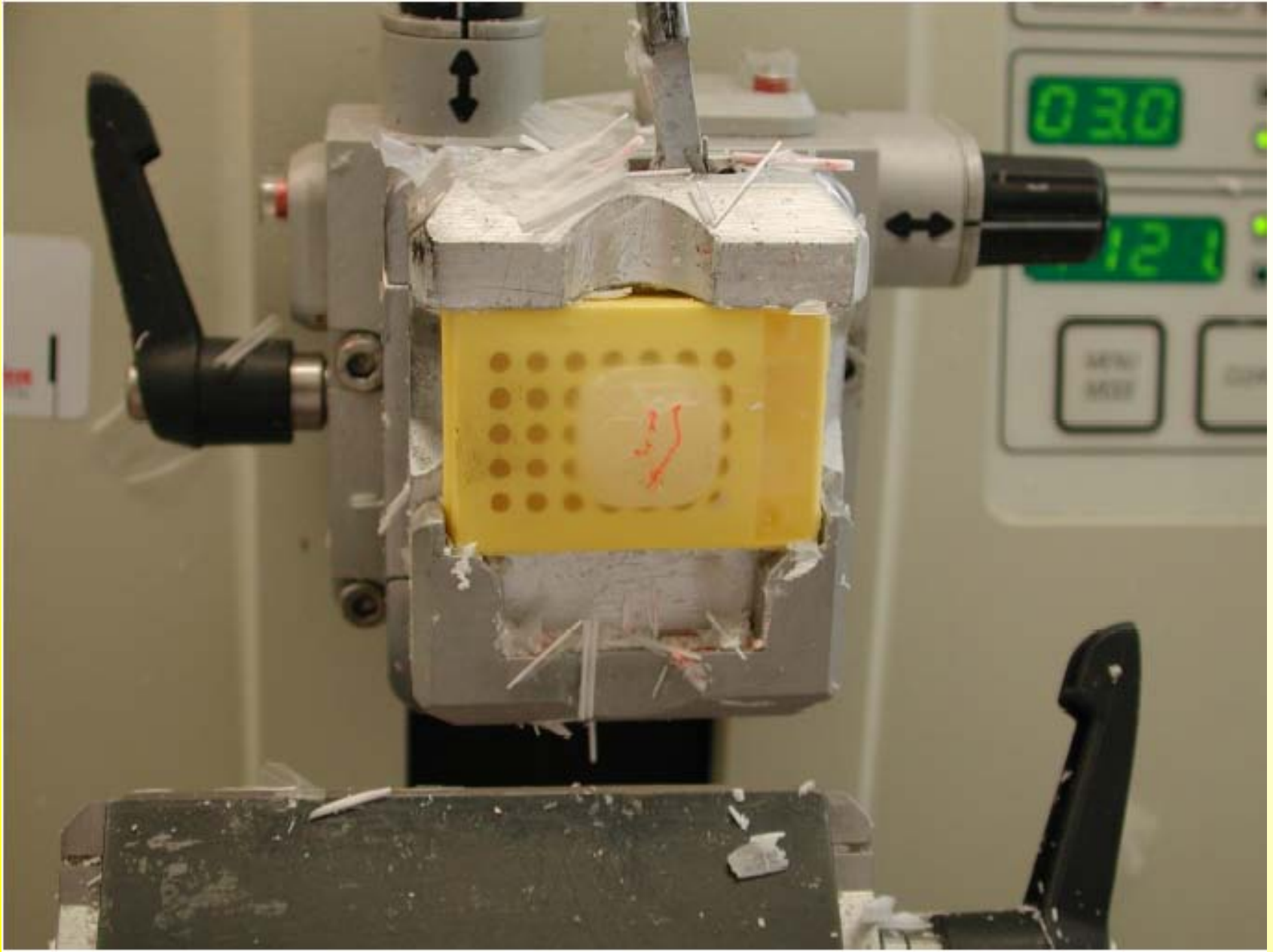








# Mikrotom



# Schneiden



# Wasserbad





**Auf Objektträger ziehen**







**Trocknen im Brutschrank**

**Bereit zu  
mikroskopieren**



4110/10

I<sub>2</sub> H



4110/10

I<sub>2</sub> H

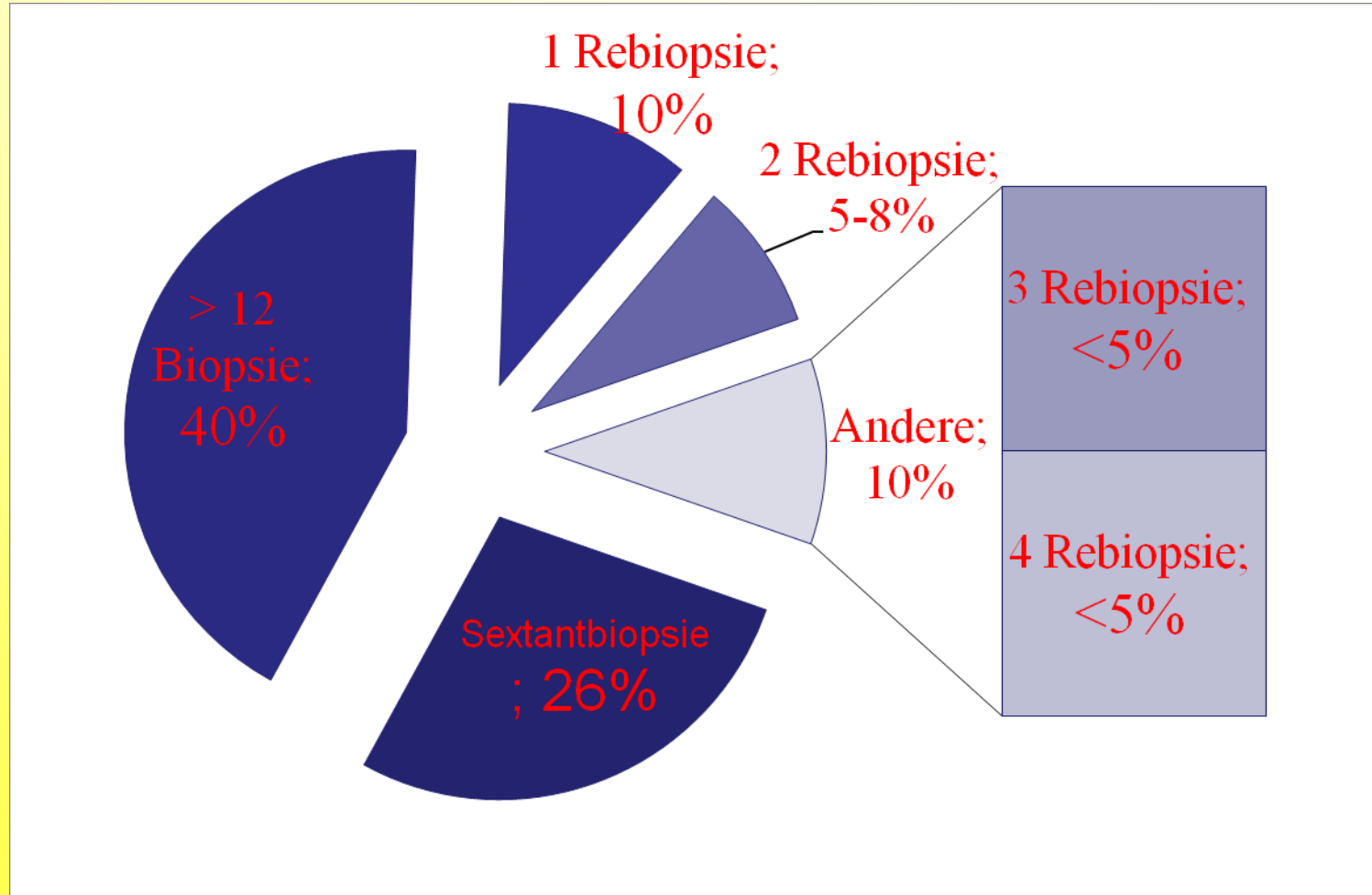


4110/10

I<sub>2</sub> ABP



# Treffsicherheit



**van der Kwast TH, Lopes C, Santonja C et al. (2003) Guidelines for processing and reporting of prostatic needle biopsies. J Clin Pathol 56: 336–340**

**Eskew LA, Bare RL, McCullough DL (1997) Systematic 5 region prostate biopsy is superior to sextant method for diagnosing carcinoma of the prostate. J Urol 157: 199–202**



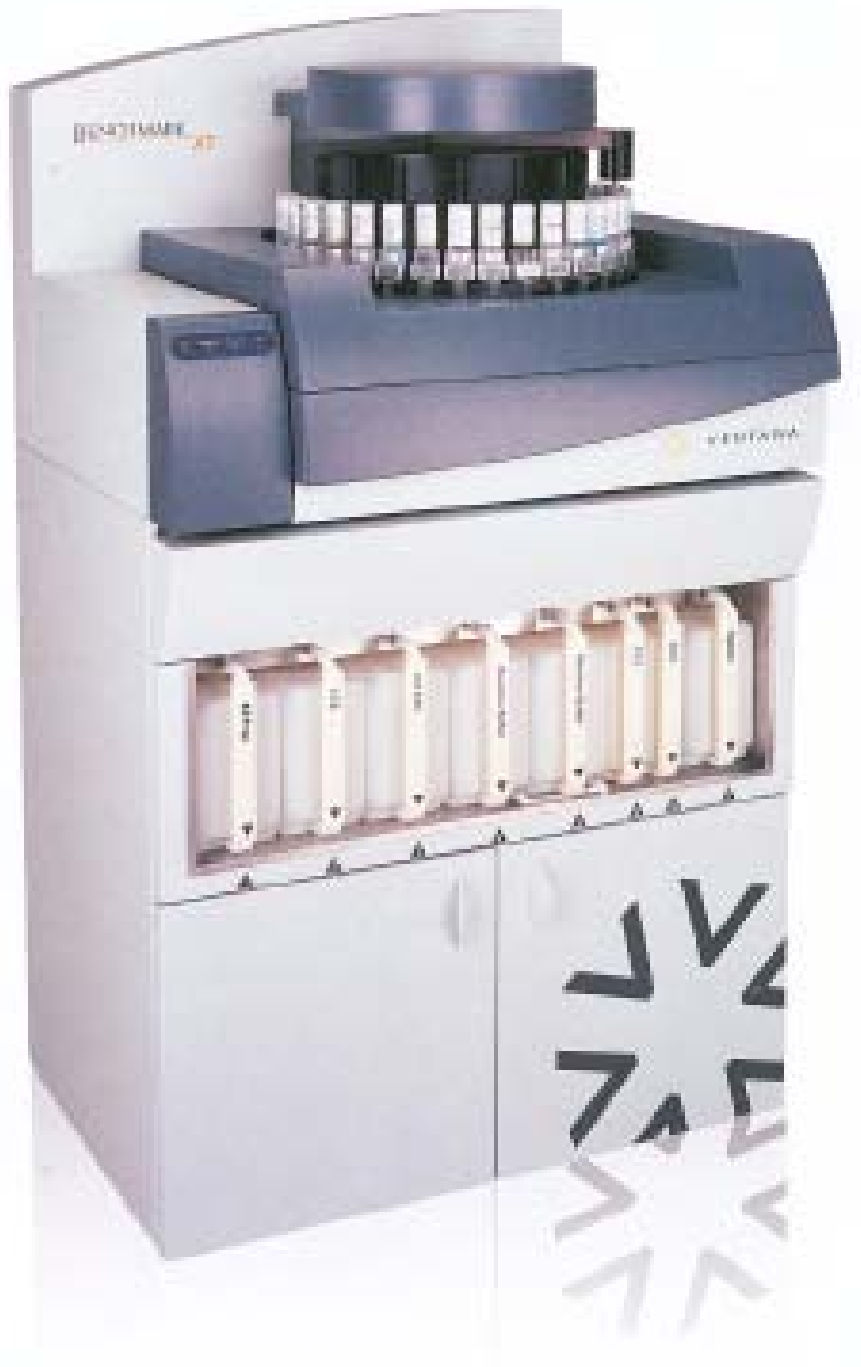
# Auffälliger histomorphologischer Befund



4456/10

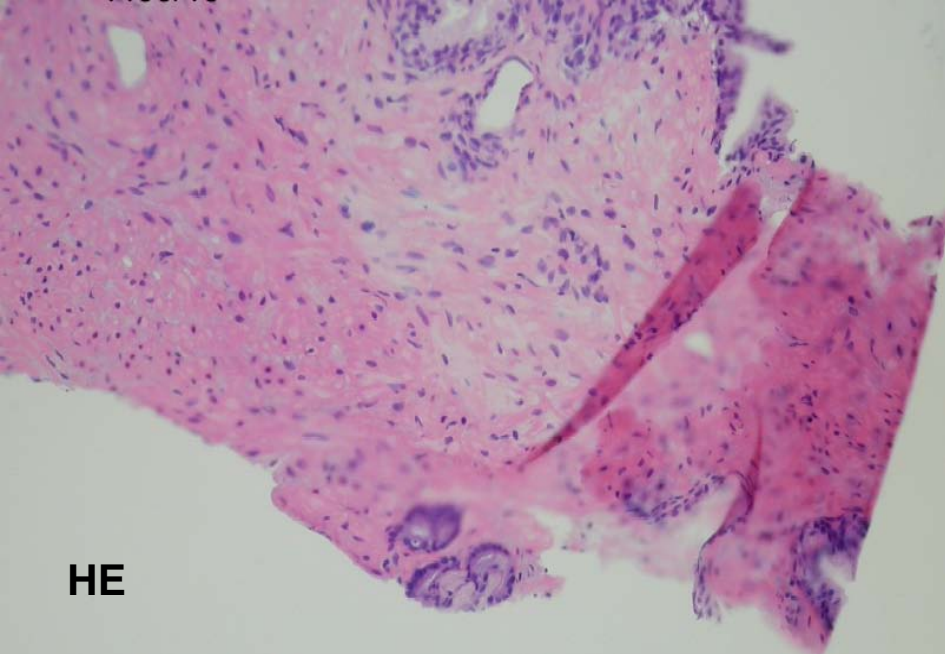
**Auffälliger histomorphologischer Befund**



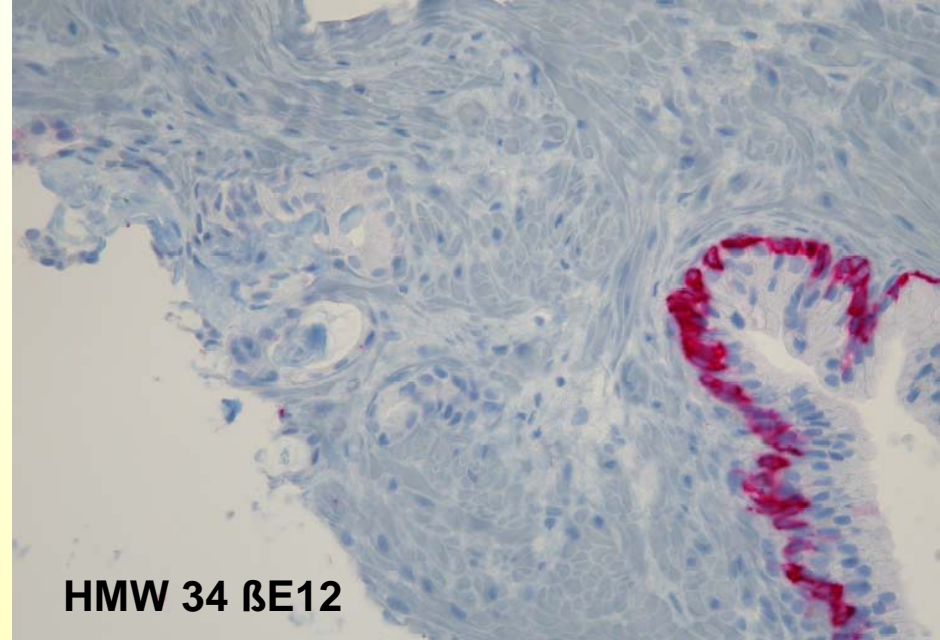


**Automat für Immunhistochemie**

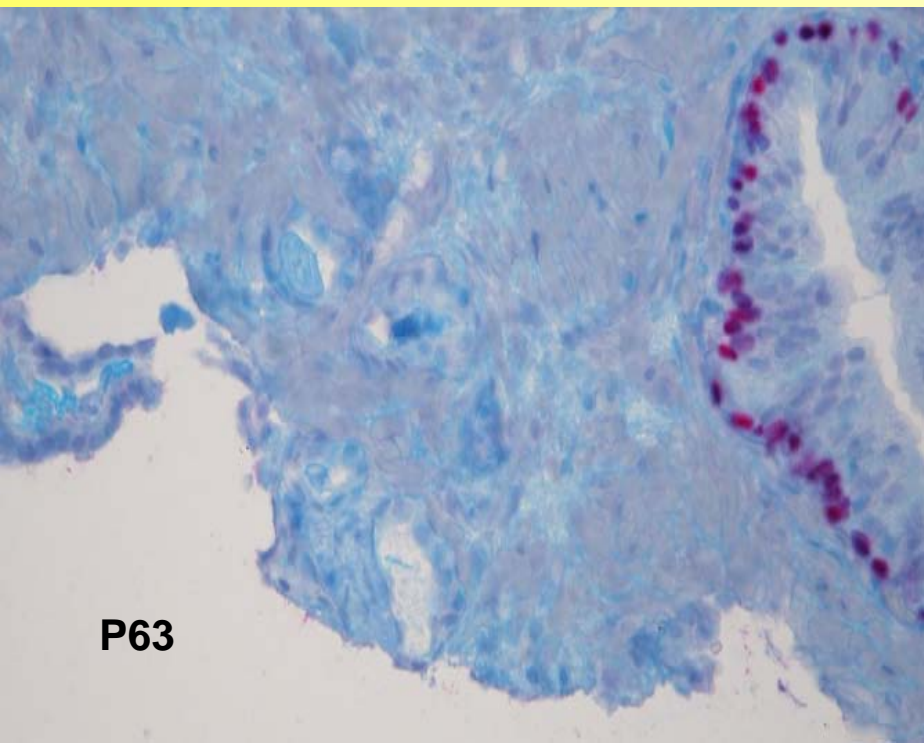




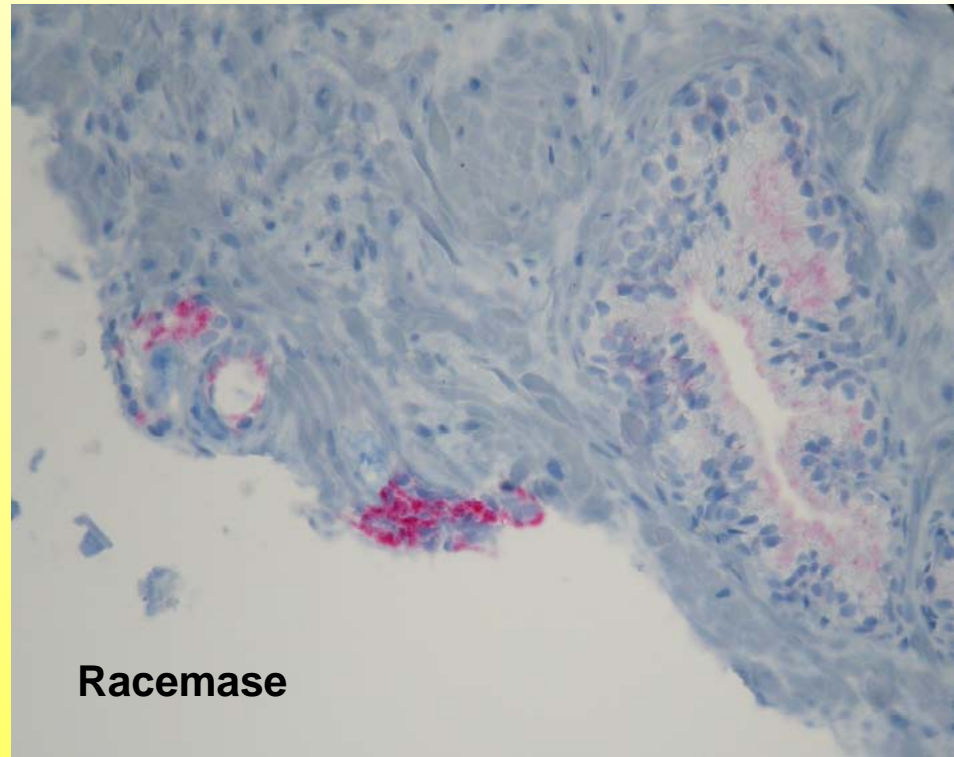
HE



HMW 34  $\beta$ E12



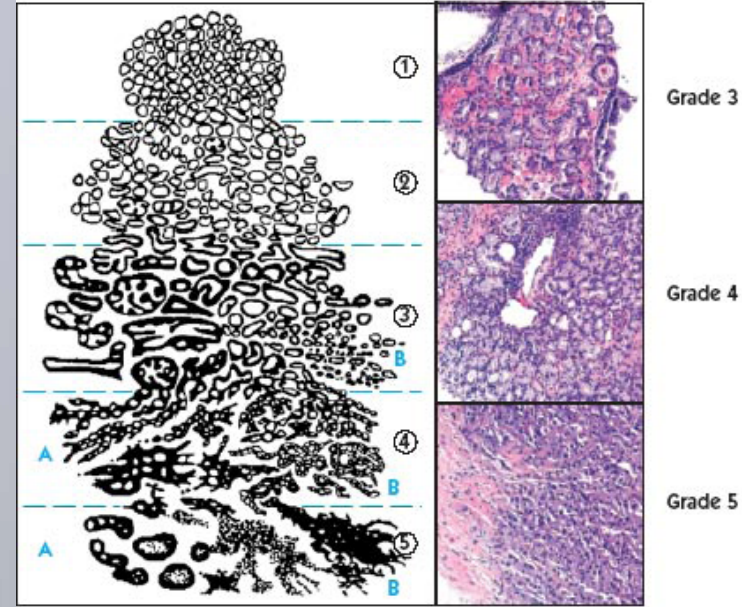
P63



Racemase



**Dr. Donald Gleason**



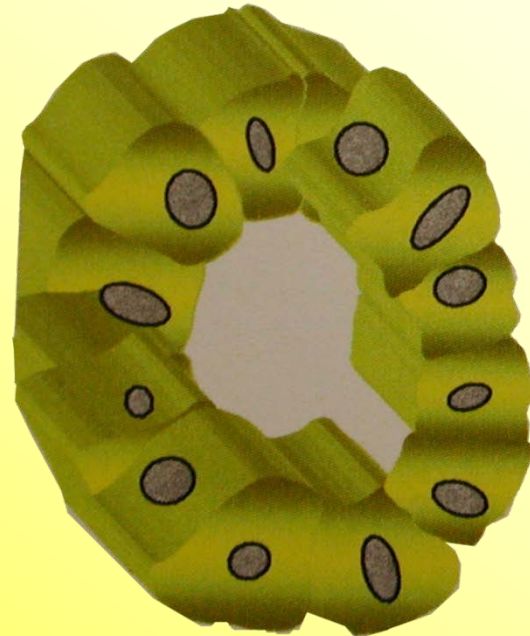
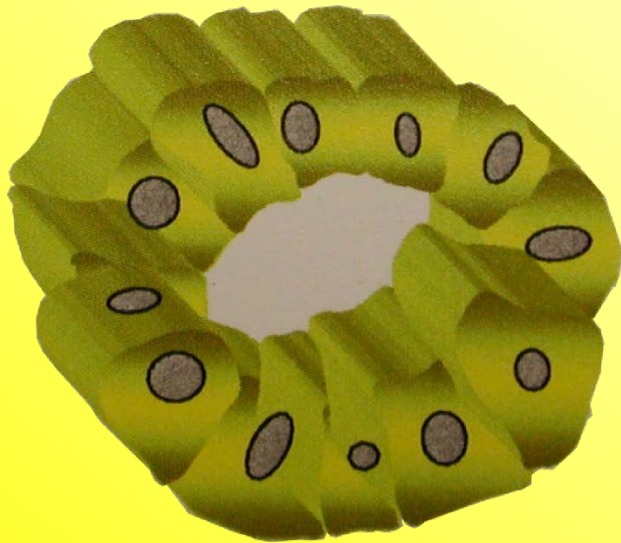
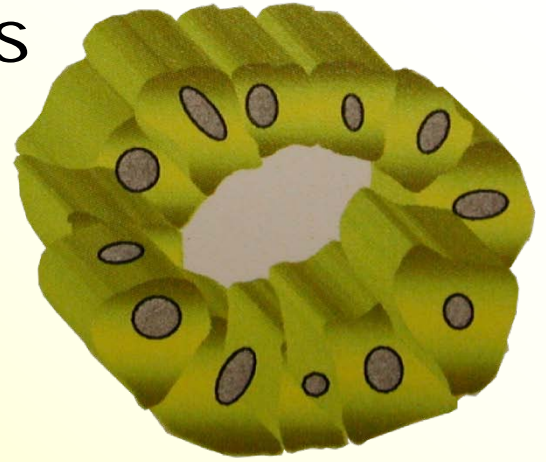
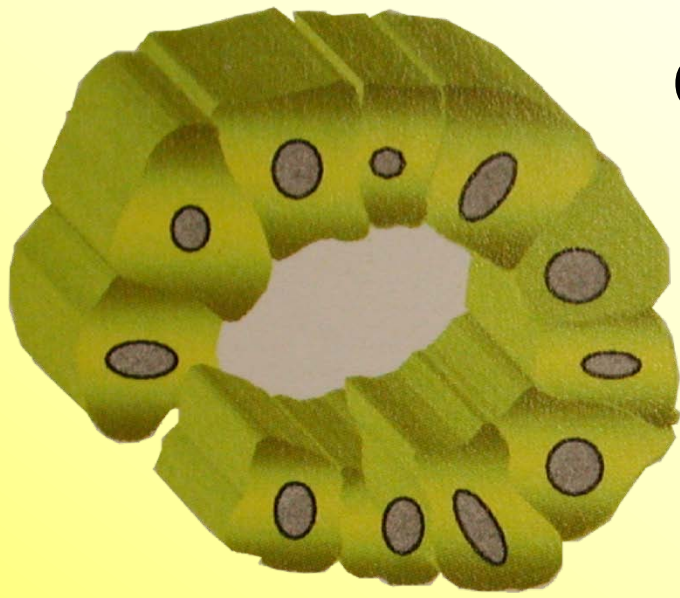
**1. Die histologische Bearbeitung**

**2. Gleason Score (modifiziert in 2005)**

**3. DNA Zytometrie**

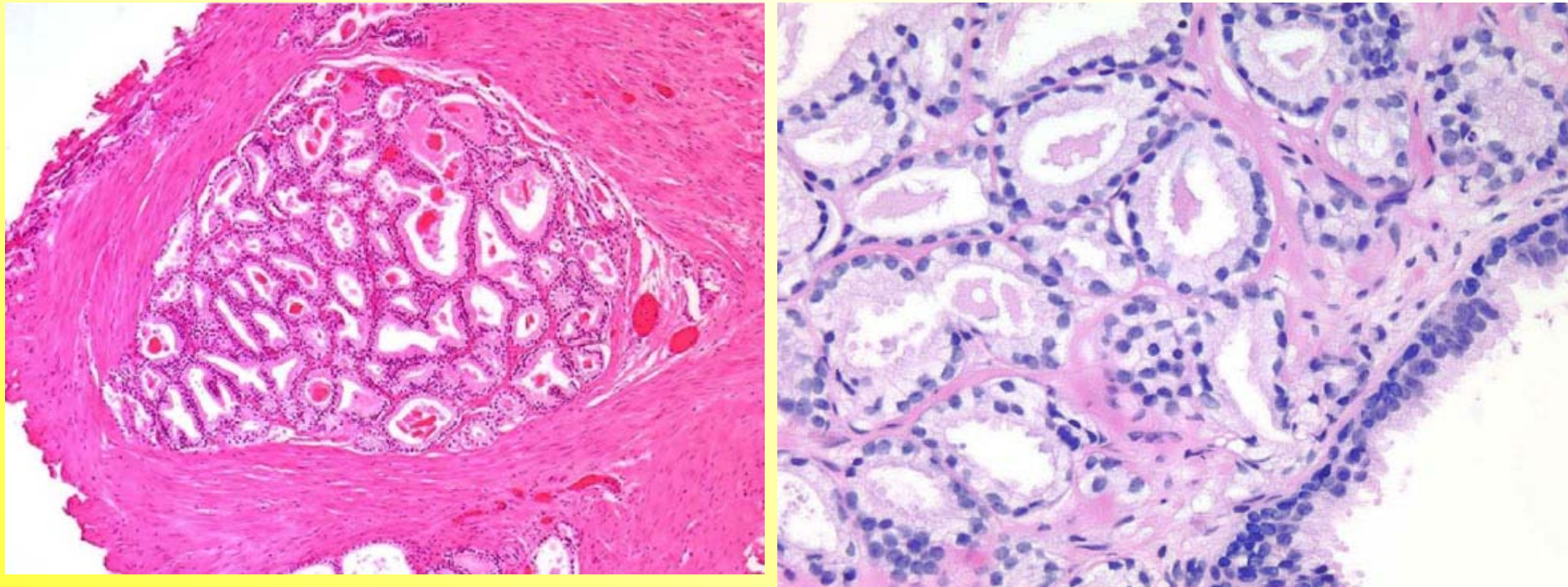


Gleason eins





# Gleason eins plus eins

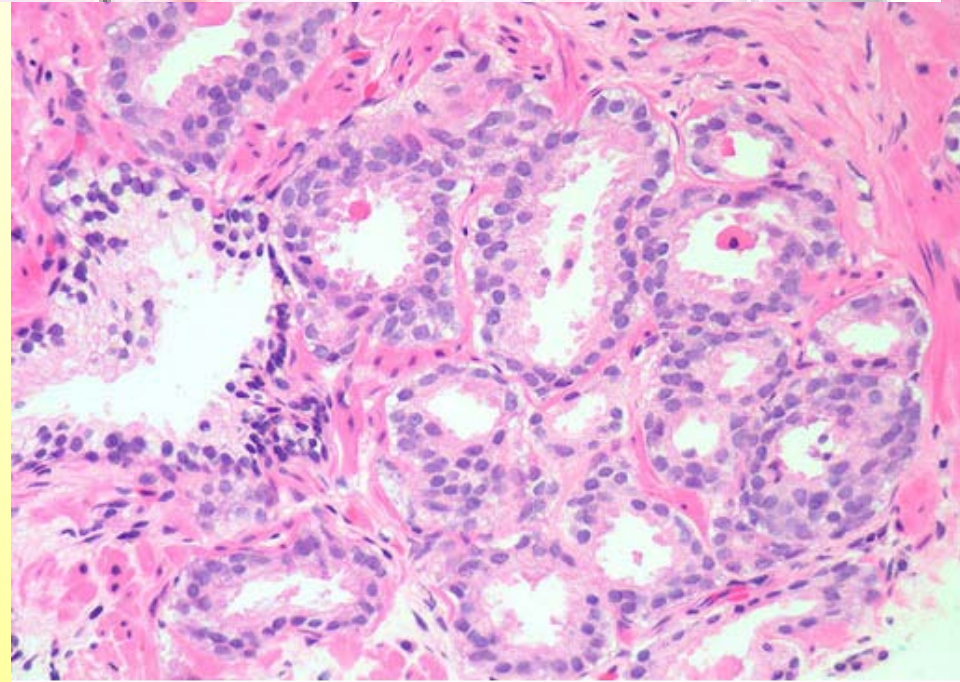
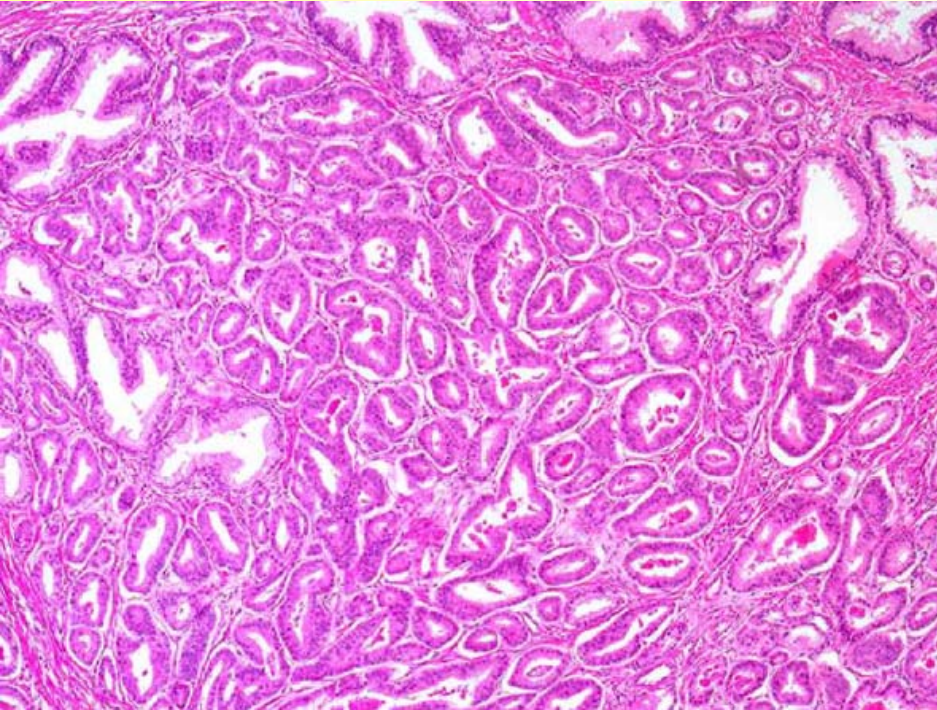
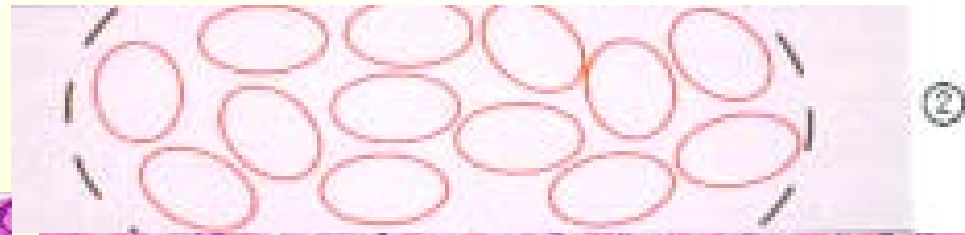


Gleason 1: **scharf** begrenzter Knoten

**Gleason 1: Umschriebene Knoten** von dicht gepackten aber scharf begrenzten Mittelgroßen Drüsen, rundlich bis oval, von mittlerer Größe.



# Gleason zwei

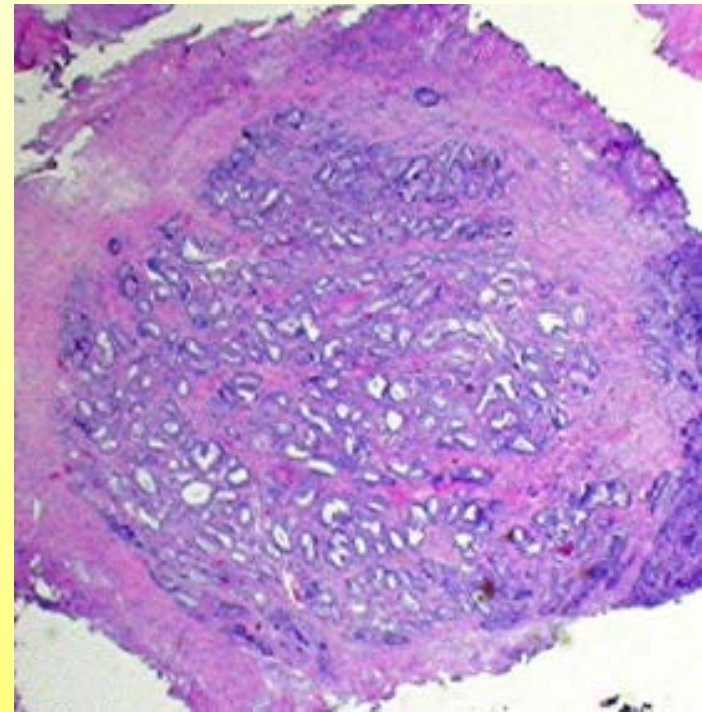


Gleason 2: **unscharf** begrenzter Knoten

**Gleason 2:** Ähnlich Muster 1, noch weitgehend umschriebene, z. T. **nicht ganz scharf begrenzte Tumorknoten** mit minimaler **Stromainfiltration**. Die Drüsen sind jedoch lockerer arangiert und nicht mehr so uniform wie in Muster 1..

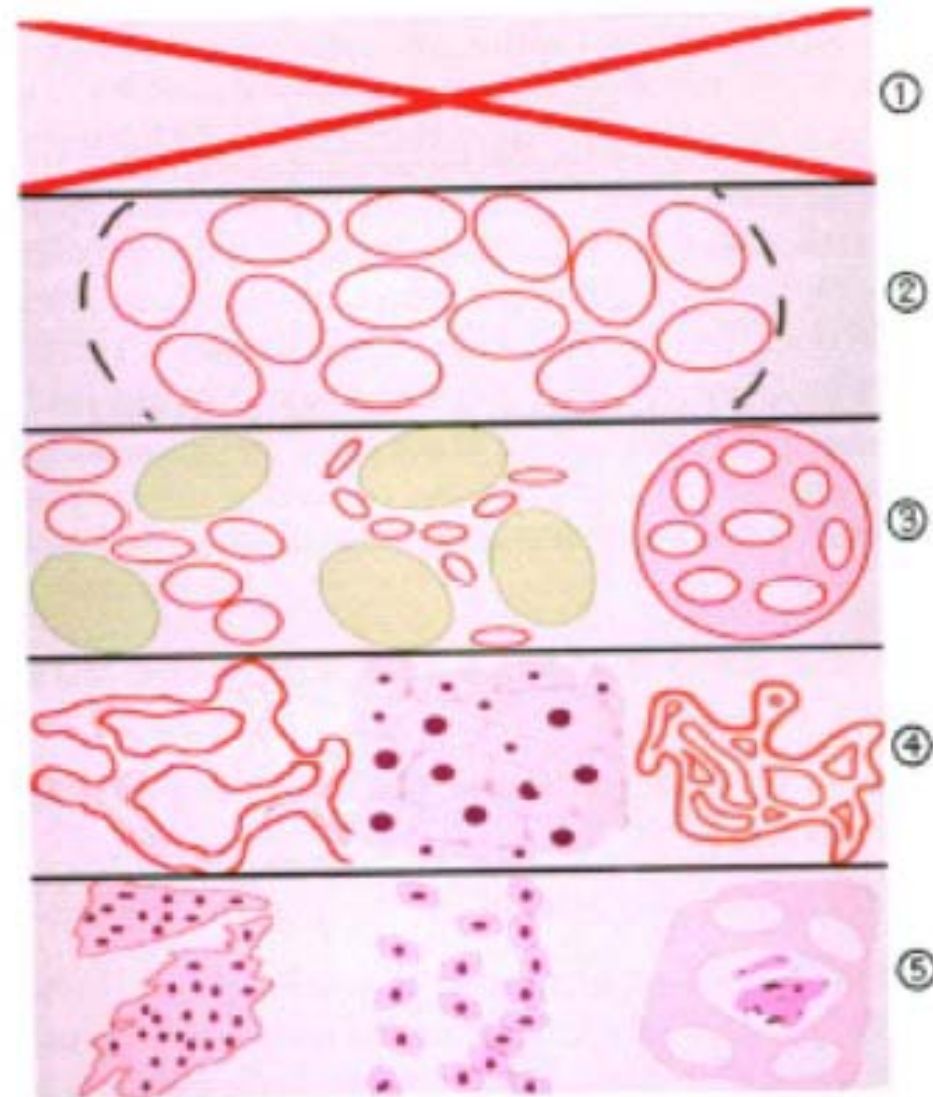
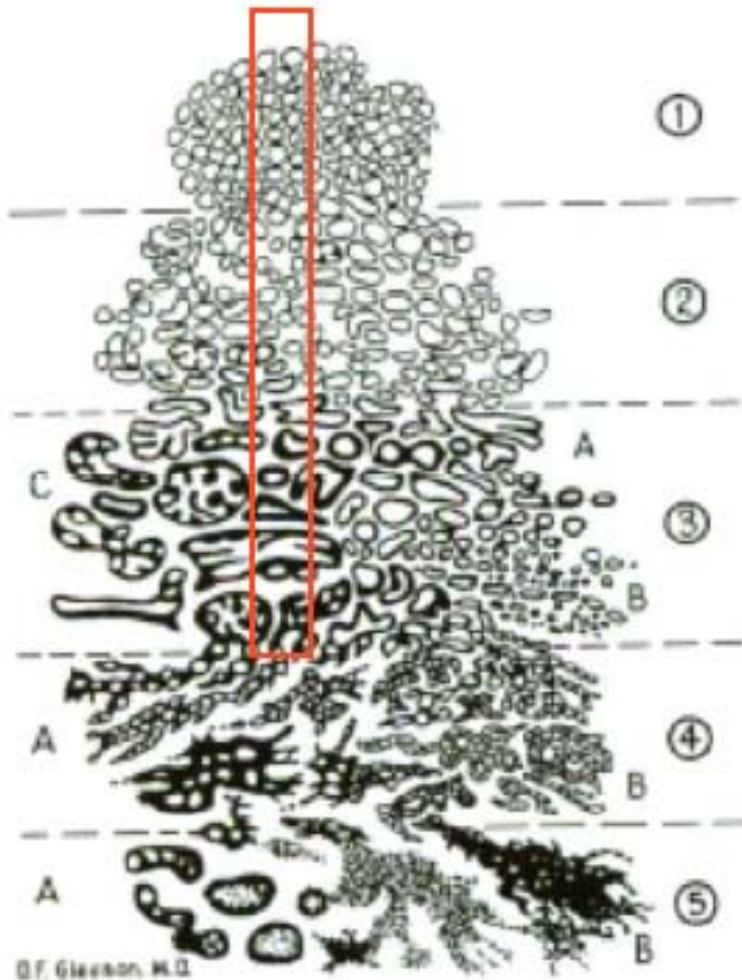
## Gleason eins und zwei

Diese finden sich nur in **anterozentralen** sog. **inzidentellen** Karzinomen nach Transurethralem Resektat Der Prostata (TURP).

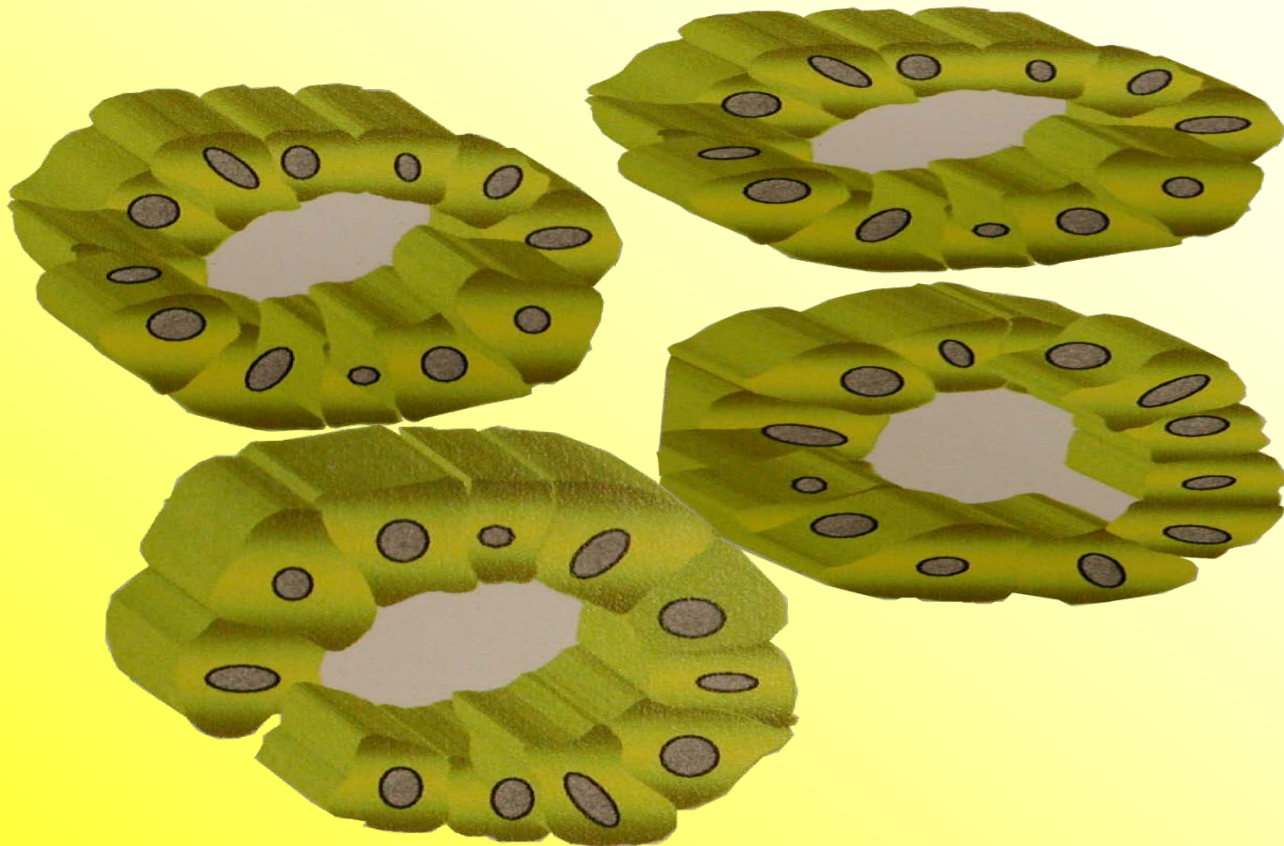




In den Karzinomen aus der **Prostataperipherie** sind **keine Muster 1 und 2 bzw. Scores 2–4 messbar.**

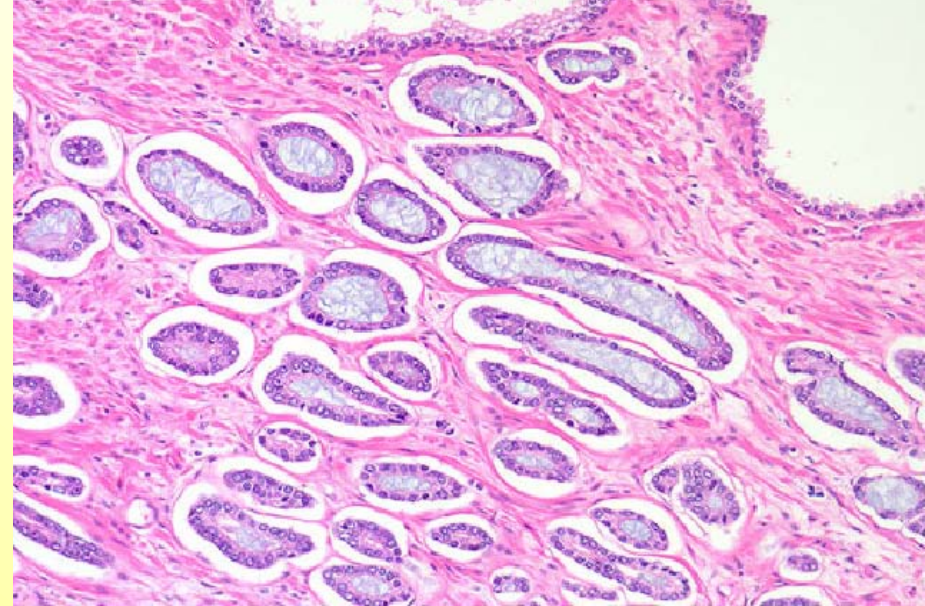
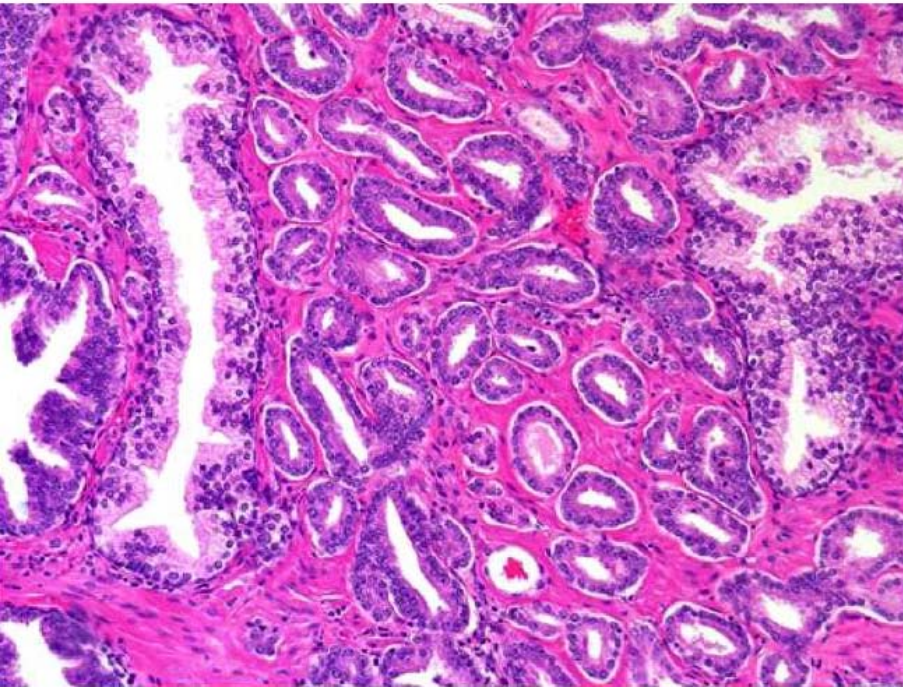


# Gleason drei





# Gleason 3:



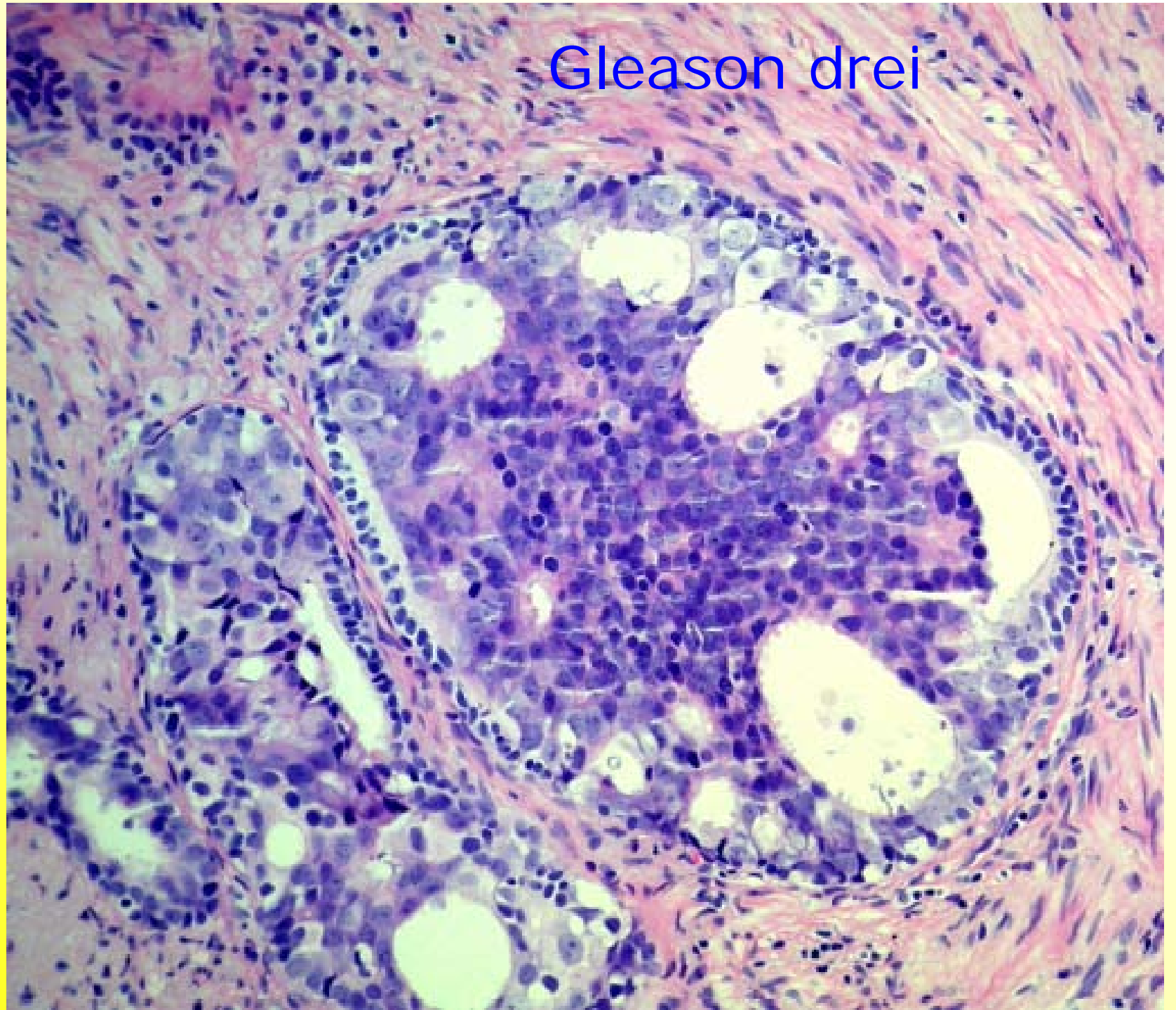
Infiltration **zwischen** vorbestehenden Drüsen!

**Gleason 3:** Diskrete Drüseneinheiten, **kleinere Drüsen** als in Muster 1 und 2. Tumordinfiltrate zwischen nicht-neoplastischen Drüsen.

Deutliche Variationen in Größe und Form, mitunter umschriebene kleine **kribriforme** Tumorknoten.



Gleason drei



# Gleason 3, 4?



Gleason 3

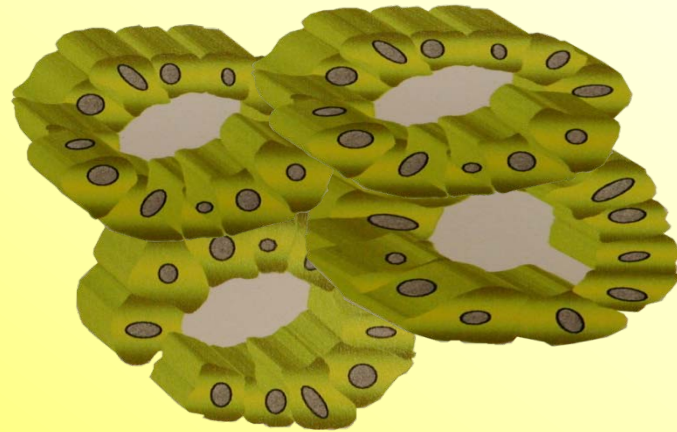
Haustier



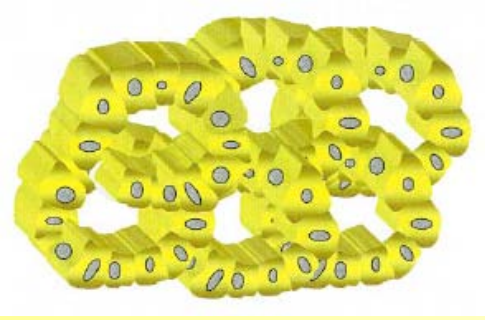
Gleason 4

Raubtier

# Gleason vier

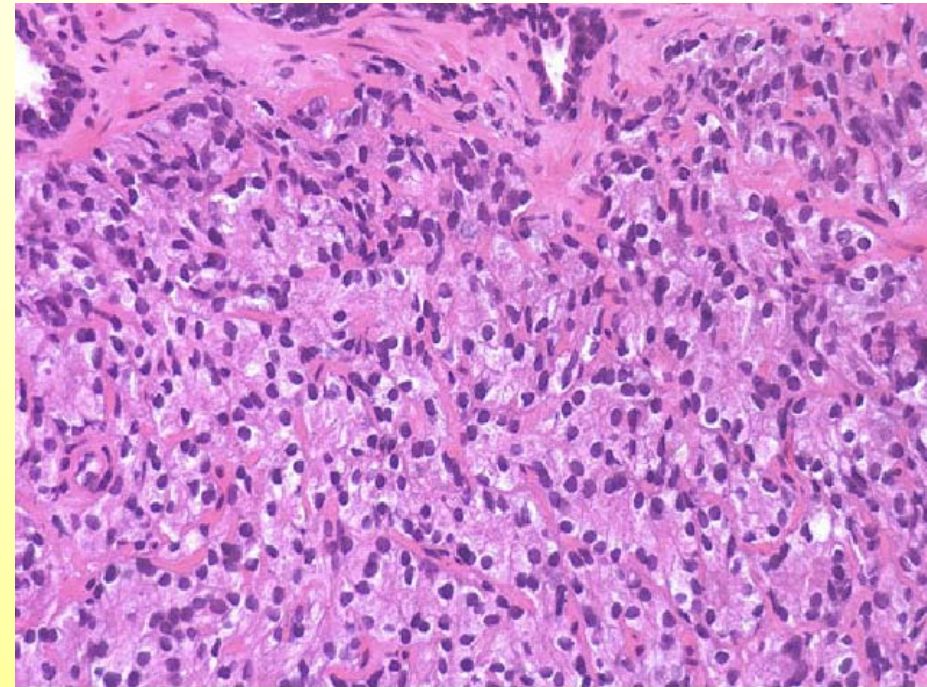
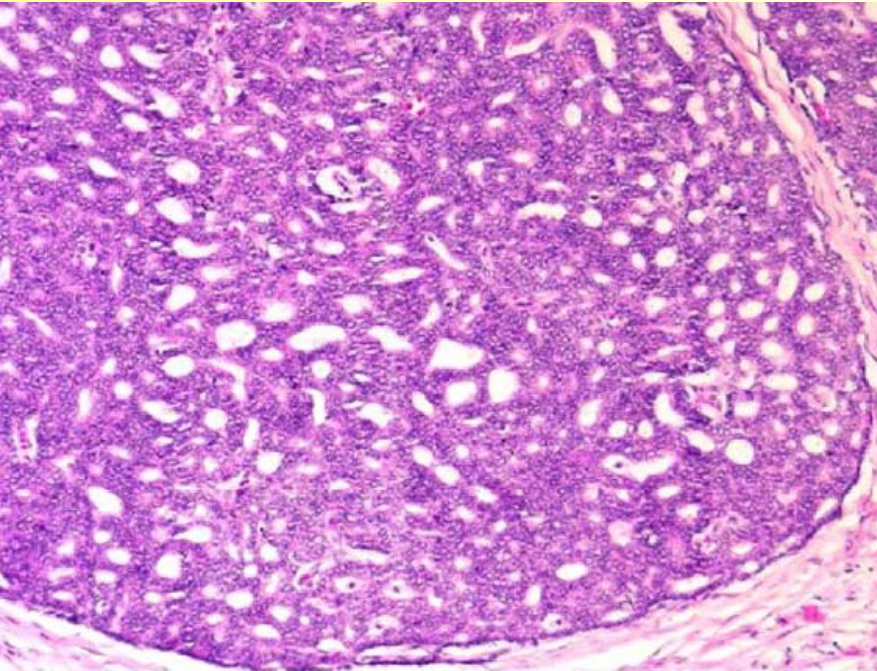






# Gleason vier

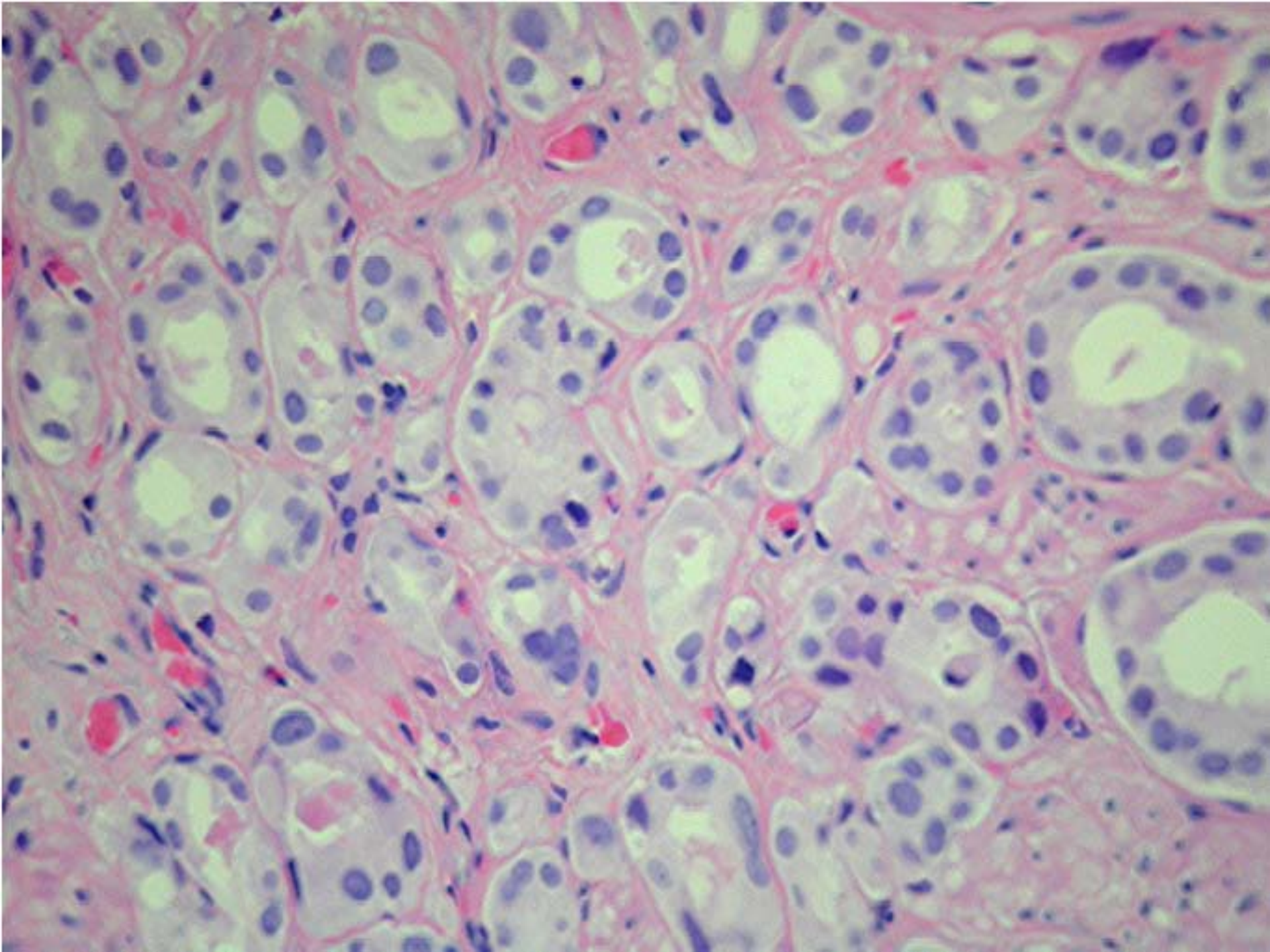
## Kribriformer Typ



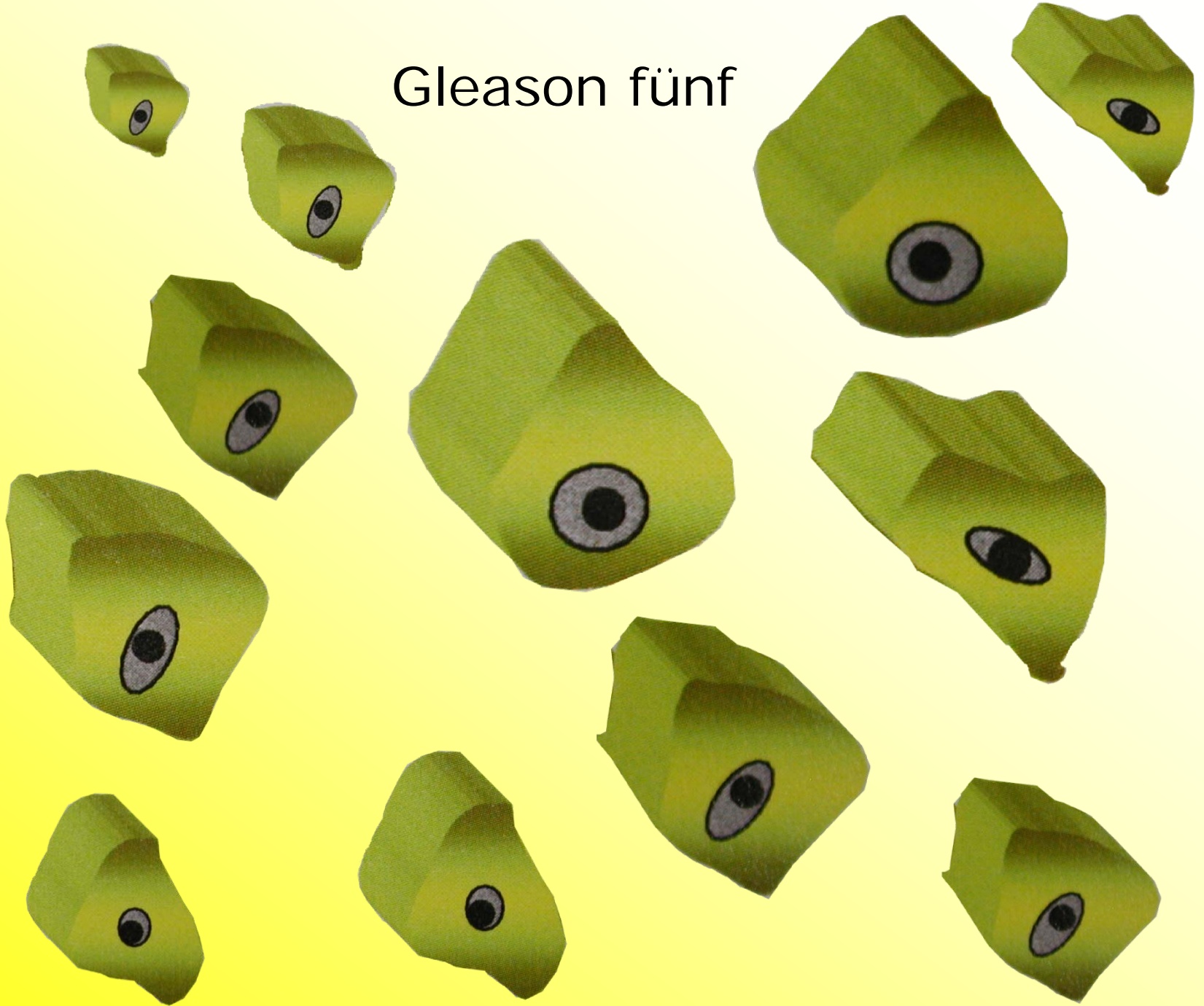
**Gleason 4: Fusionierte mikroazinäre Drüsen**, wenig differenzierte Drüsen mit schwach ausgebildeten Drüsenlichtungen.

Hellzelliges, **fast hypernephroides** Muster, daneben auch große **kribriforme und papillare** Drüsen mit unscharfen Grenzen.





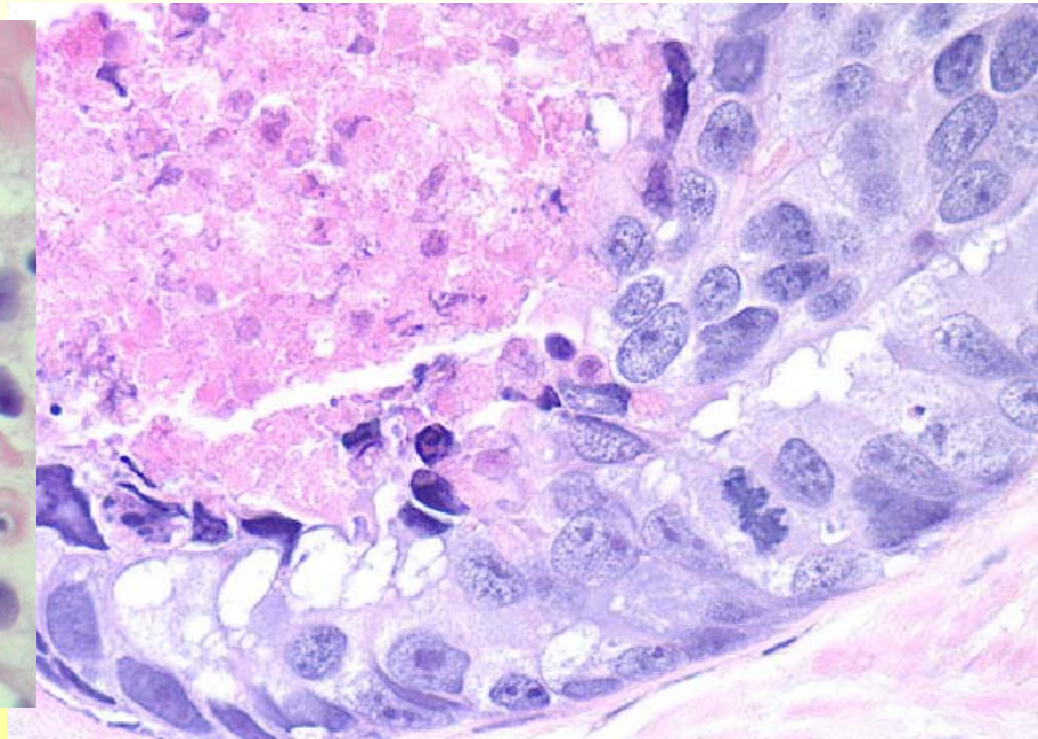
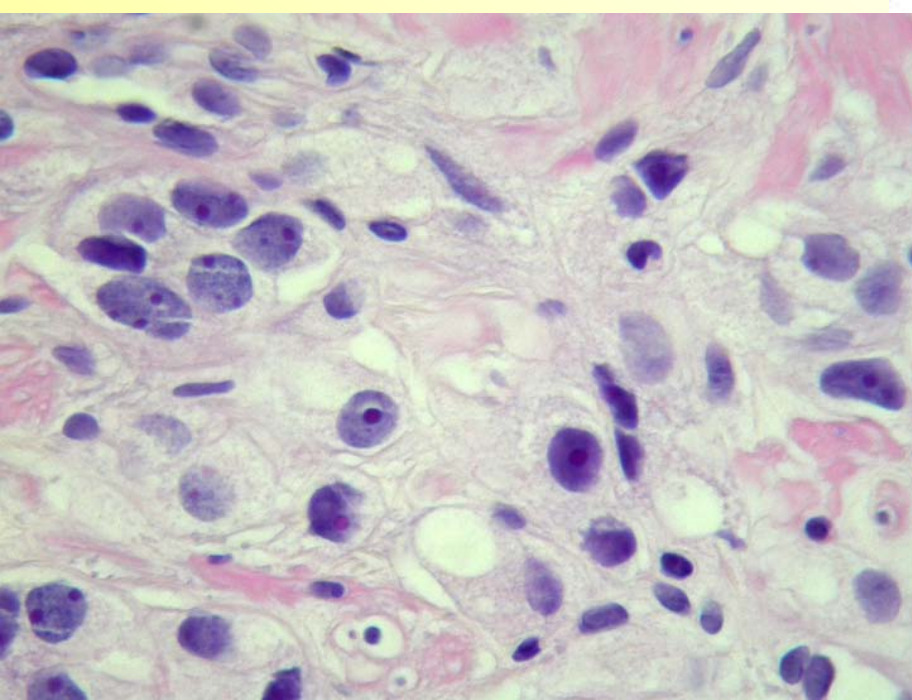
Gleason fünf





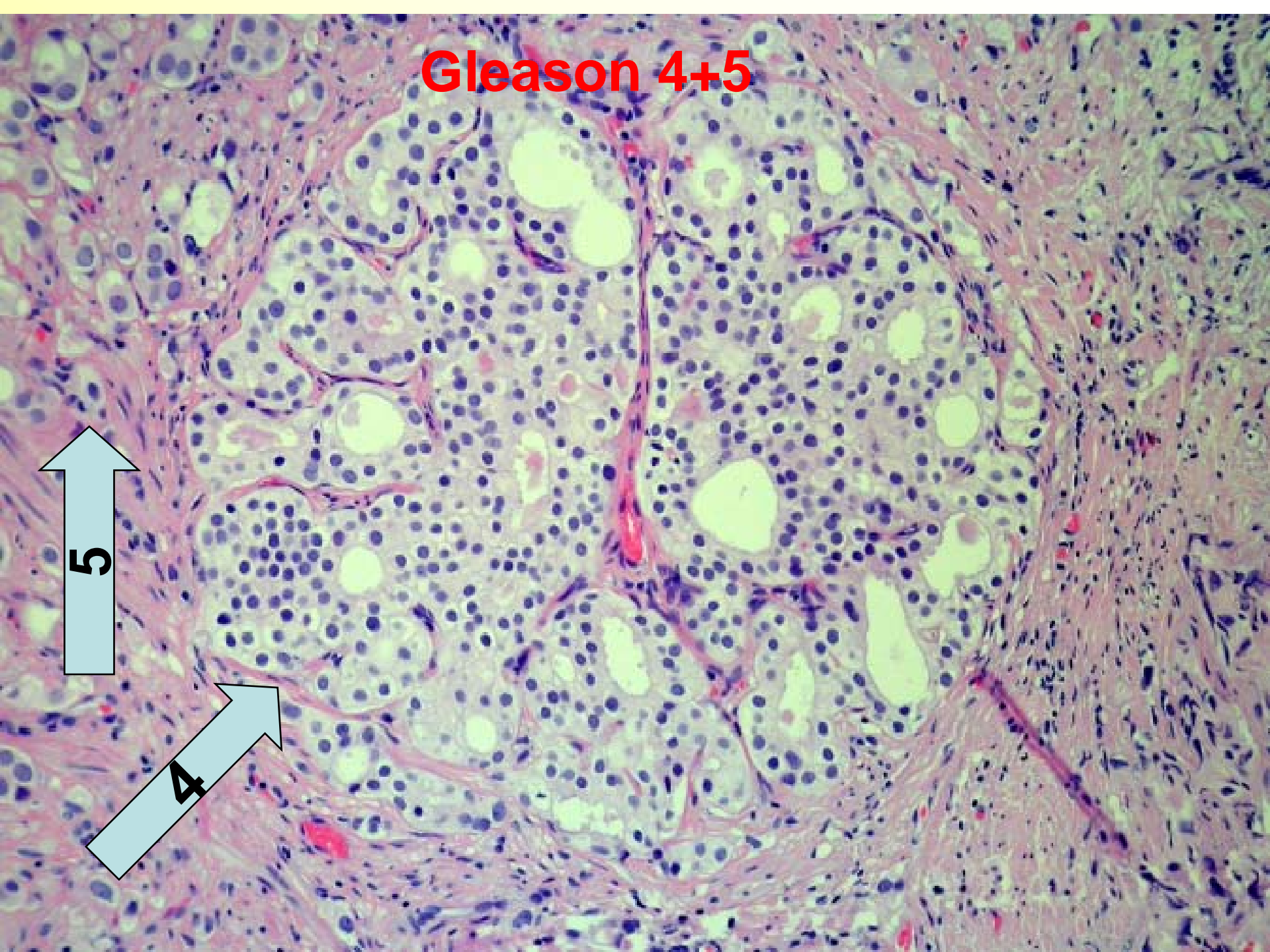
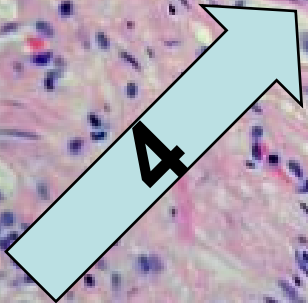
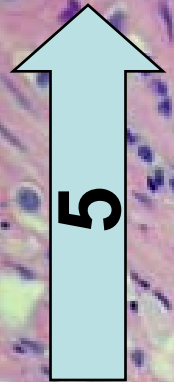
# Gleason fünf

Solid-trabekulär



**Gleason 5:** Keine klaren Drüsenformationen, stattdessen solide Epithelstränge oder Komplexe mit **zentralen Nekrosen** (entsprechend einem Komedokarzinom), umgeben **von papillären, kribriformen** oder **soliden Tumormassen** (polymorphe Einzelzellen inmitten hyalinisierter Stroma).

**Gleason 4+5**



# Gleason – Grading, modifiziert

**Allgemeine Regeln:** Gleason unterscheidet **fünf** verschiedene histologische Wachstumsmuster (sog. **Gleason pattern**).

**Der Gleason-Score ergibt sich** aus der **Addition der zwei häufigsten und schlechtesten** (egal wie groß ist) Wachstumsmuster.

In Stanzbiopsien mit **nur herdförmig** erfaßten Tumordrüsen ist es allgemein üblich den primären Grad **zu verdoppeln** (z.B. **3+3=6**).



## **Modifiziertes Gleason Grading (nach ISUP 2005)**



**Prof. Burkhard Helpap**

Der Anteil von **Gleason 4** (50 %) ist Grundlage für die Einleitung in **Gleason 7 a oder 7 b**

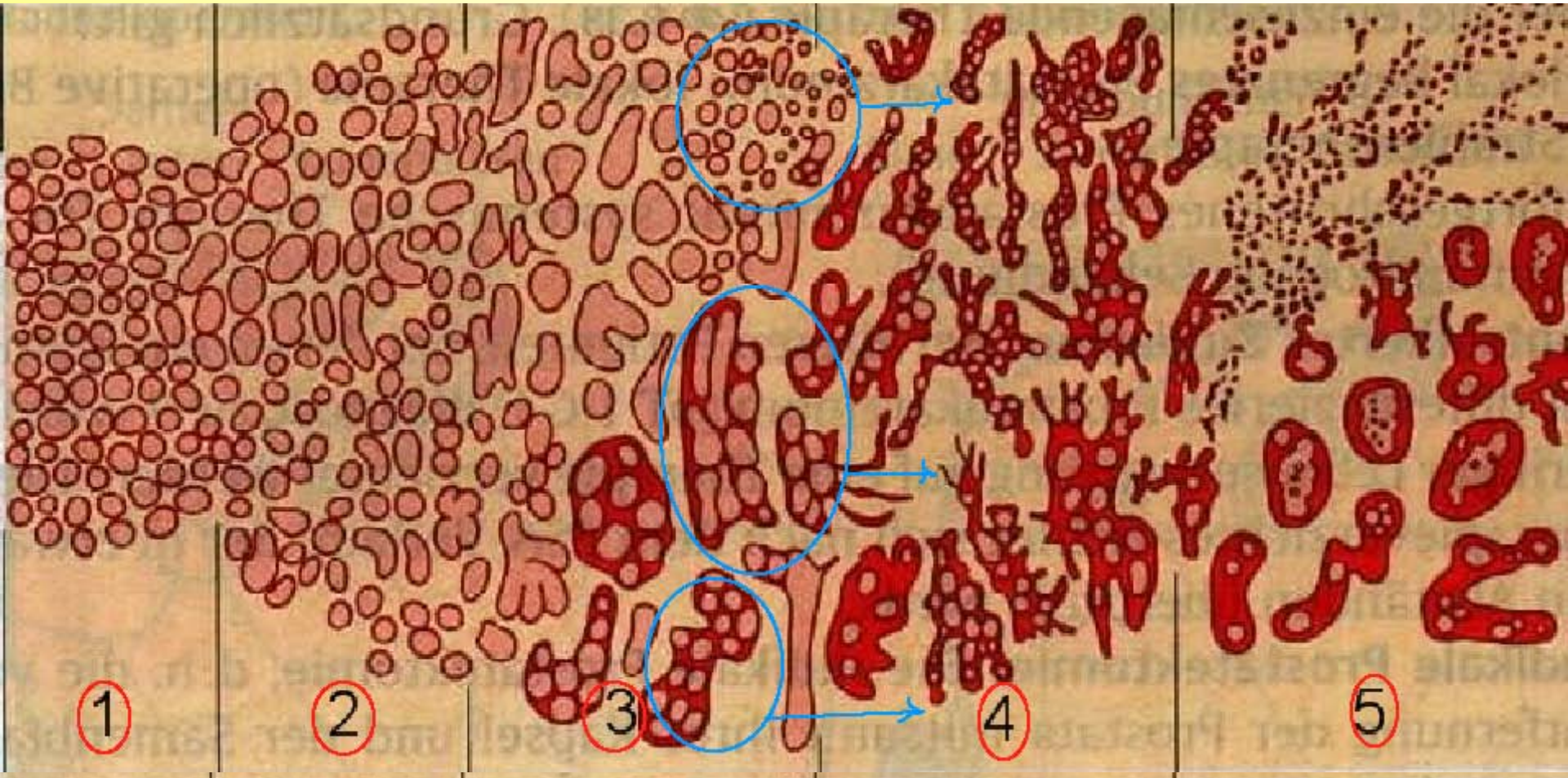
Im Gegensatz zum originalen Grading hat das modifizierte Gleason - Grading nach einer englischen Analyse eine **Interobserver - Übereinstimmung** für den Konsensuscore an Biopsien von **78%**

**Das modifizierte Gleason-Grading ist durch die folgenden Punkte charakterisiert:**

- 1. Eine Verlagerung schlechter differenzierter Tumoranteile aus dem Muster 3 in das Muster 4 und einer Häufigkeitsverschiebung von Gleason-Score 6 nach 7a (3+4).**
- 2. Die häufigsten Gleason-Scores für Biopsien sind im Bereich von 7a und für radikale Prostatektomiepräparate im Bereich von 7a für pT2-Karzinome und im Bereich 7b für pT3-Karzinome angesiedelt.**

# Gleason Grading

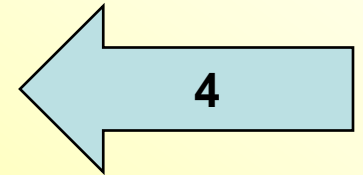
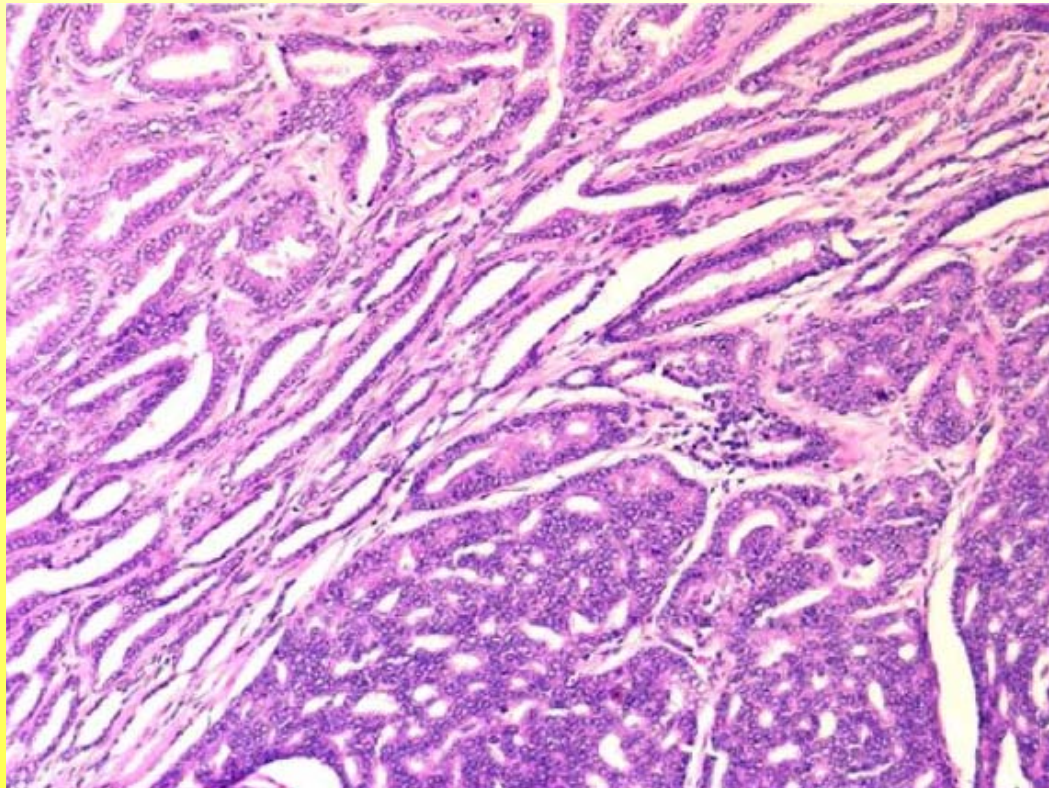
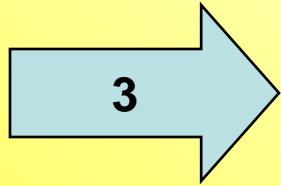
Gleason – Grading 1966, schematische Darstellung, [ISUP 2005](#)





## Gleason vier plus drei

Ein Gleason-Grad 4 liegt vor, wenn zwischen mindestens 4 dicht gelagerten Tumordrüsen **kein Stroma mehr nachweisbar ist.**



Z. B.: Gleason 3 (>50%) + Gleason 4 (<50%) = Gleason 7 a



oder Gleason 4 (> 50%) + Gleason 3 (<50%) = Gleason 7 b

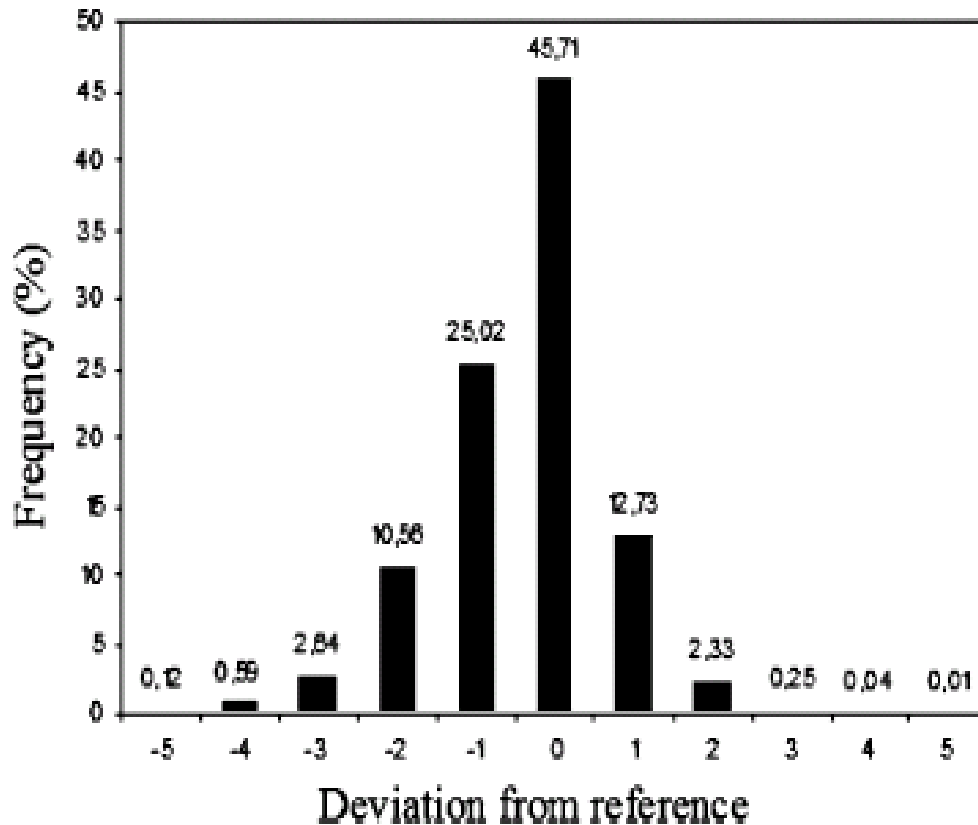




# Reproduzierbarkeit des Gleason Score

- **Intraobserver:** 72 – 87% (+- 1 score)
- **Interobserver:** 69 – 94% (+- 1 score)
- **Stanze/Prostatektomie:** 75% (+- 1 score)

# Interobserver reproducibility of Gleason grading: evaluation using prostate cancer tissue microarrays



M. Burchardt · R. Engers · M. Müller · T. Burchardt ·  
R. Willers · J. I. Epstein · R. Ackermann ·  
H. E. Gabbert · A. de la Taille · M. A. Rubin

*Conclusion* The vast majority of participants undergraded the small tumors. Clinically relevant GS categories were correctly assigned in 68% of cases. This raises a potentially significant problem for pathologists, who have not had as much experience evaluating small PCas.

J Cancer Res Clin Oncol (2008) 134:1071–1078

**Zukunftsperspektiven  
in Diagnostik und Therapie  
des Prostatakarzinoms  
13.11.2010 in Singen**

**PD Dr. Jens Köllermann,  
Wiesbaden  
Gleason Score: Reproduzierbarkeit**

**Prof. Dr. Glen Ole Kristiansen,  
Zürich  
Molekular Diagnostik des Prostatakarzinoms  
TMPRSS2-ERG Genfusion.**









**Prof. Alfred Böcking**

**1. Die histologische Bearbeitung**

**2. Gleason Score (modifiziert in 2005)**

**3. DNA Zytometrie**



# MotiCyte-DNA manual workstation

## Analyse genetischer Strukturen

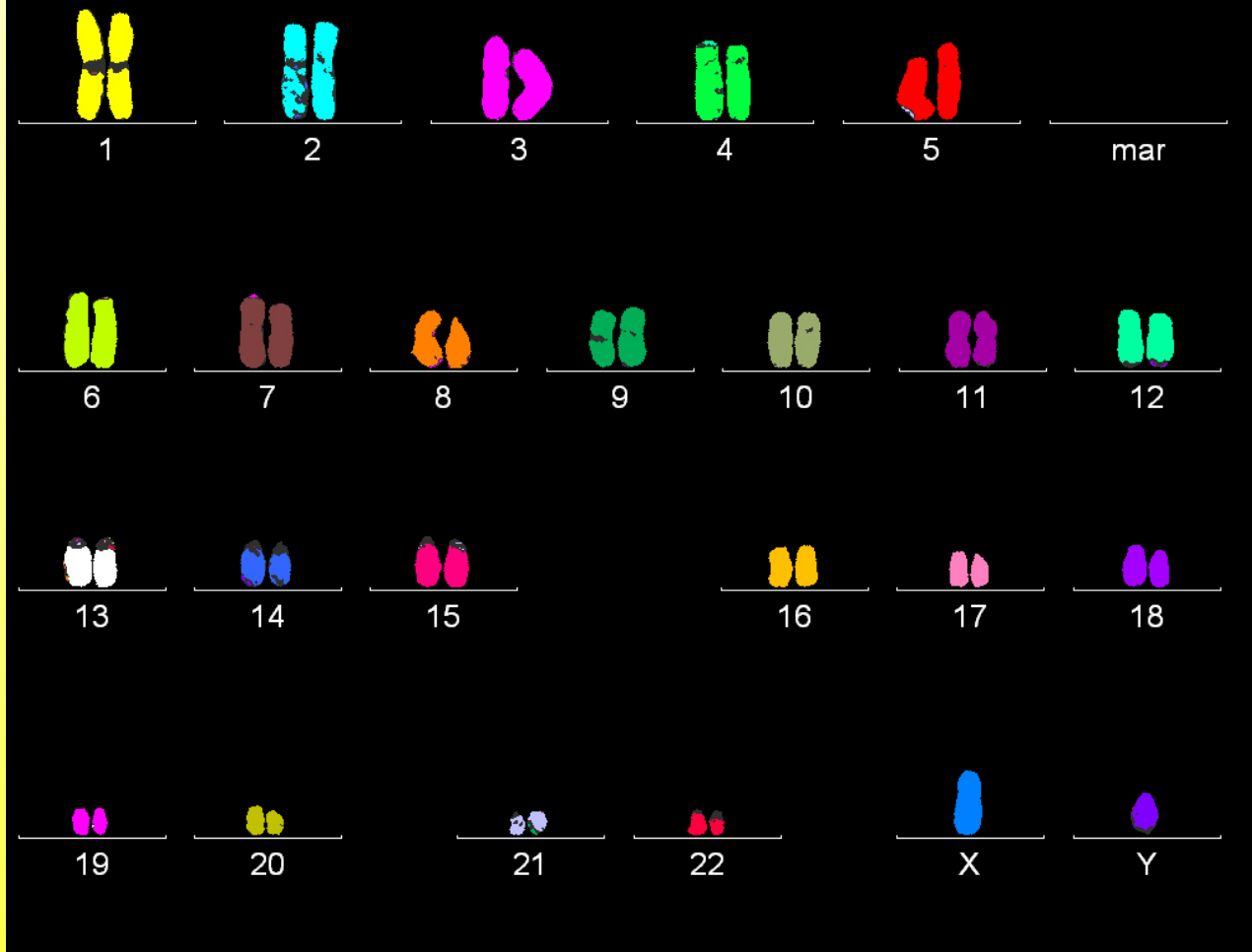
Gesamte DNA	Zellkern	DNA-Analyse, Zytophotometrie
Chromosomen	Zellkern	Zytogenetik
DNA-Abschnitte	Chromosomen	PCR, FISH, CGH
DNA-Sequenz	DNA-Abschnitten	Sequenzierung



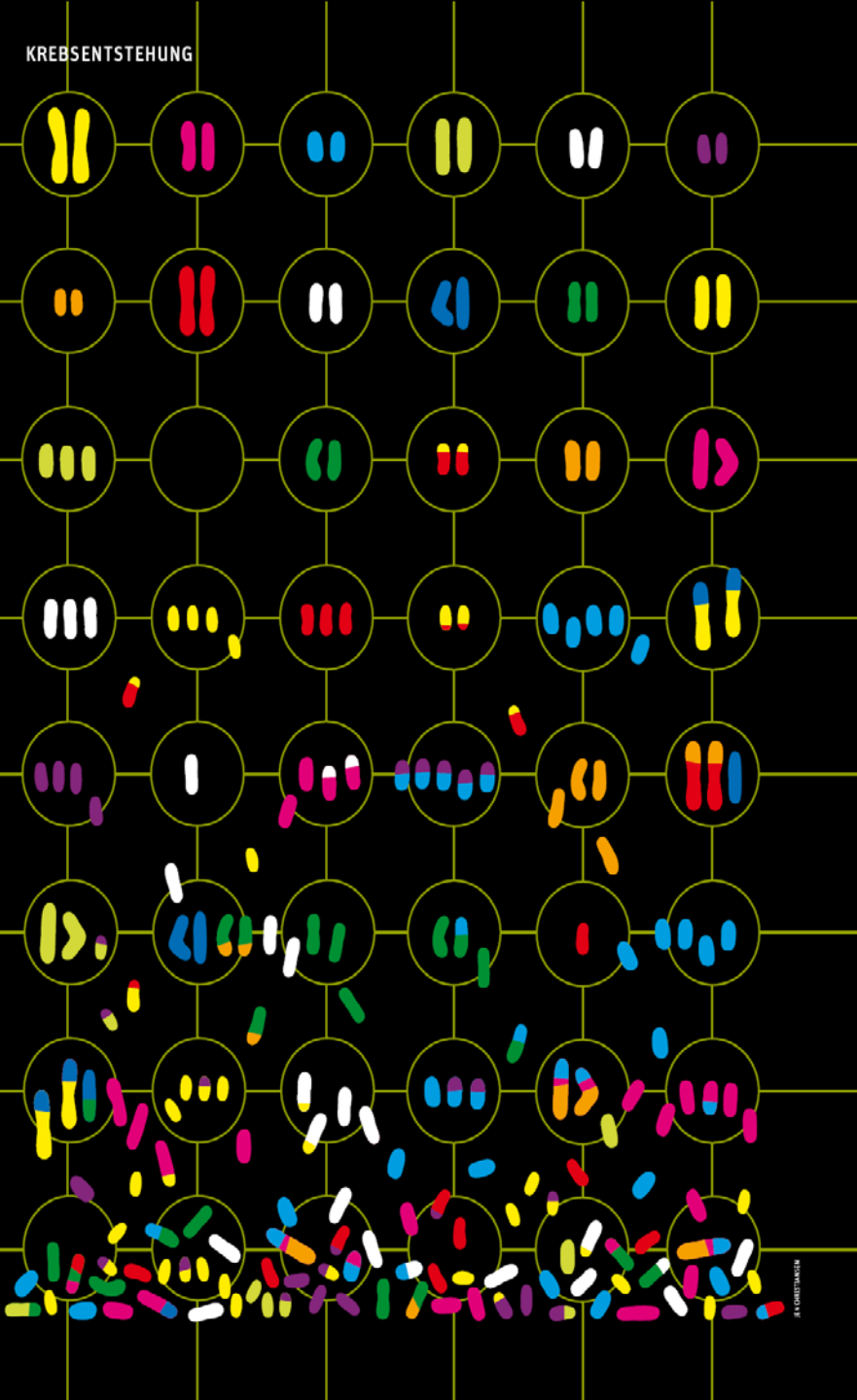
**Densitometrische**  
**Bestimmung der**  
**integrierten**  
**optischen Dichte**  
**der Zellkerne**



# Chromosomensatz einer normalen Zelle



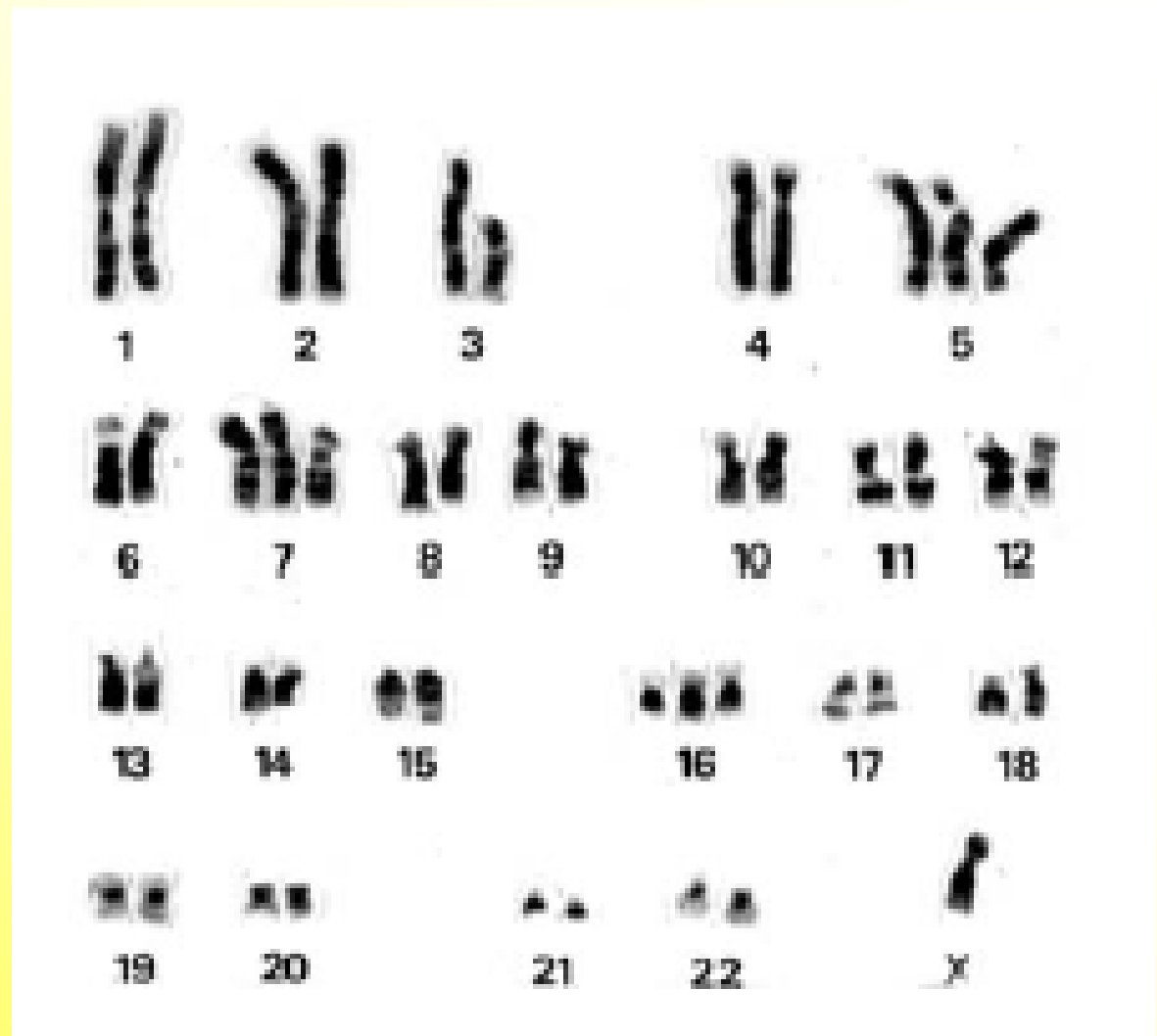
Fast alle Tumorzellen eine **Störung der Anzahl oder Struktur** ihrer Chromosomen (**Aneuploidie**) aufweisen (**Duesberg 2007**).



Statt alle Chromosomen im Einzelnen zu analysieren, reicht es für Zwecke der Krebsdiagnostik meist aus, den Gehalt an Erbsubstanz DNA in einigen Hundert verdächtiger Zellen zu messen. Findet sich eine Abweichung von der Norm, die man DNA-Aneuploidie nennt, so liegen Tumorzellen vor.

Peter Duesberg, **Chaos der Chromosomen**  
 Scientific American, 2007

## Prostatakarzinom



**Fehlerhafter Chromosomensatz einer Krebszelle:** Von den Chromosomen Nummer 5, 7 und 16 liegt je eines **zu viel** vor, das **Y-Chromosom** fehlt (Chromosomale Aneuploidie).

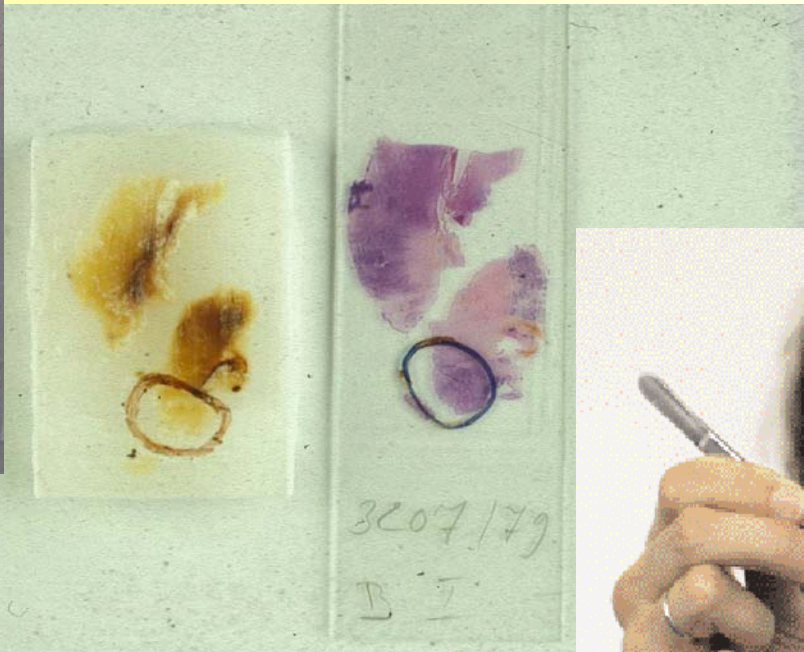


# Wie funktioniert die DNA-Bildzytometrie an der Stenzen?

Die Erbsubstanz DNA in den Zellkernen des Tumorgewebes wird **spezifisch, enzymatisch vereinzelt** und (mit dem Farbstoff Pararosanilin) **angefärbt** (sog. Feulgen-Färbung, benannt nach dem Giessener Biochemiker Robert Feulgen, 1924).

# Enzymatische Zellvereinzellung aus Paraffin-Blöckchen

Markierung auf Schnitten



Markierung auf Paraffin-Blöckchen



Einbringung 70 µm  
Schnitte in Gaze-Beutel

# Feulgen-Färbung

- **Stöchiometrische Anfärbung der DNA mit Pararosanilin oder Thionin**
- **Hydrolyse in 5N HCl bei 27°C für 60 Minuten in Temperaturkontrollierter Cuvette (z.B. Shandon Varistain F)**



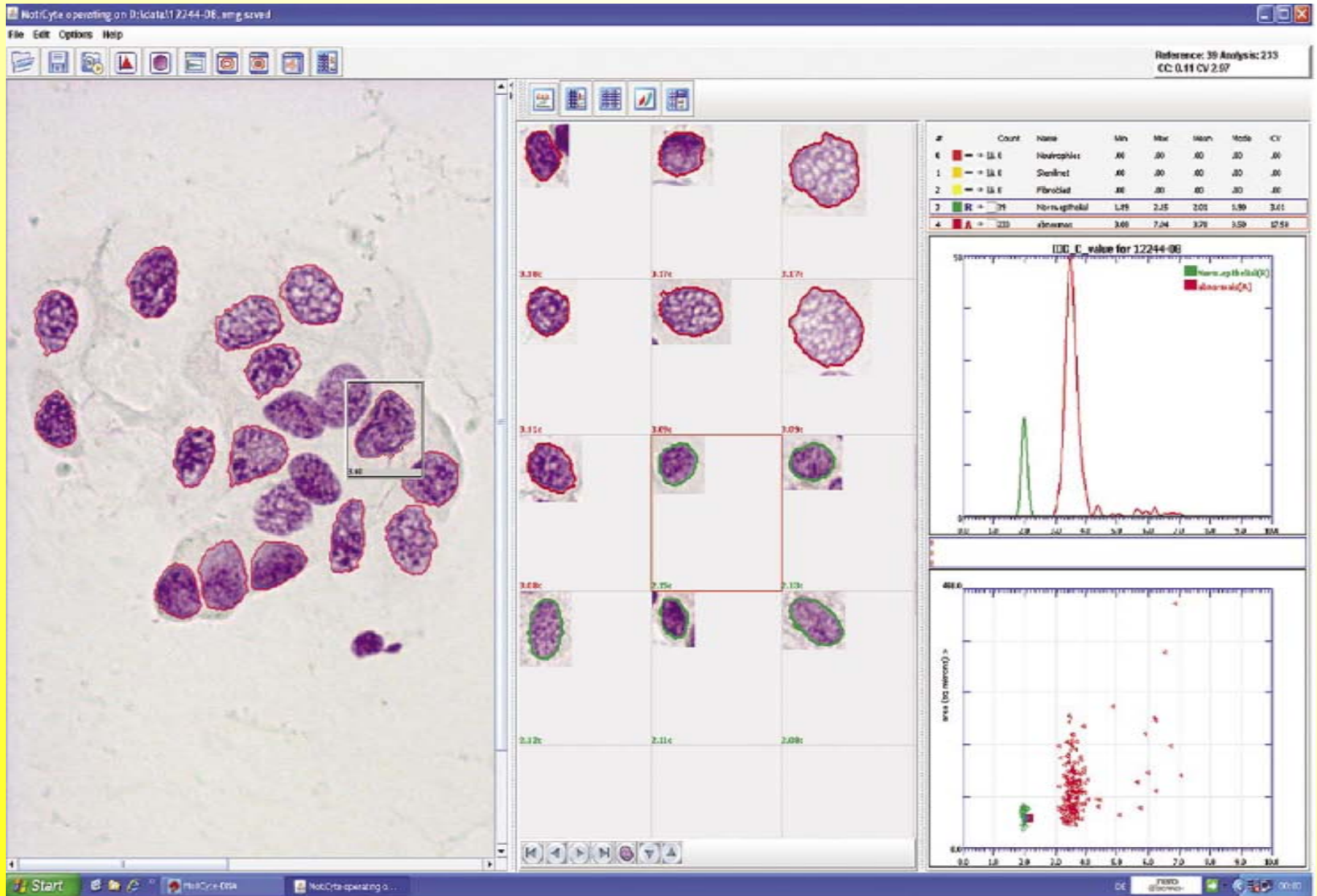


# Wie funktioniert die DNA-Bildzytometrie an der Stanzan?

Mit einem TV-Bildanalyse-System wird pro Probe in etwa 300 Zellkernen im Mikroskop die Farbstoffmenge im Zellkern gemessen.

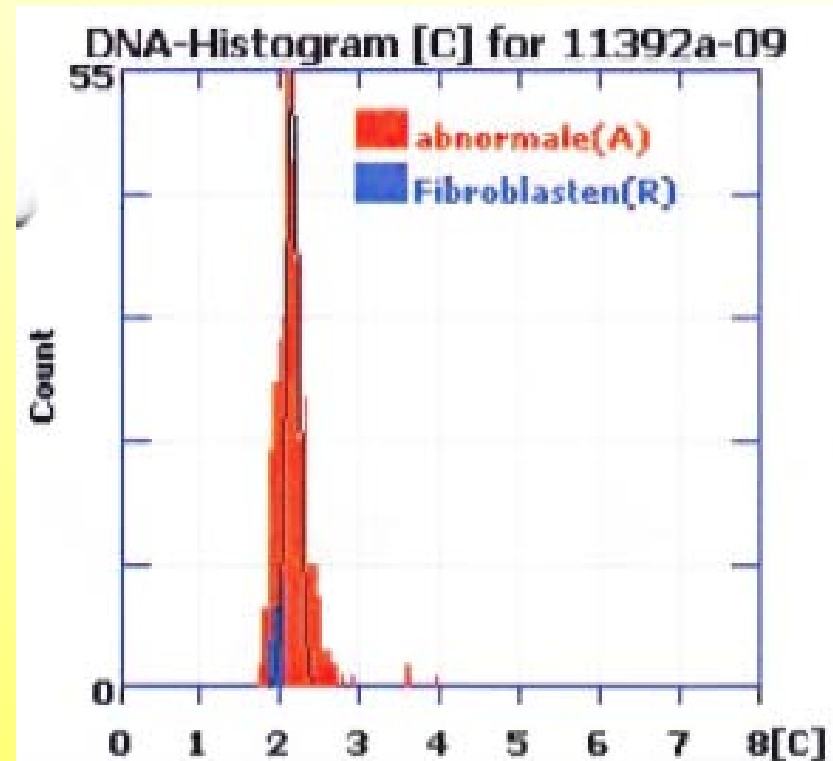
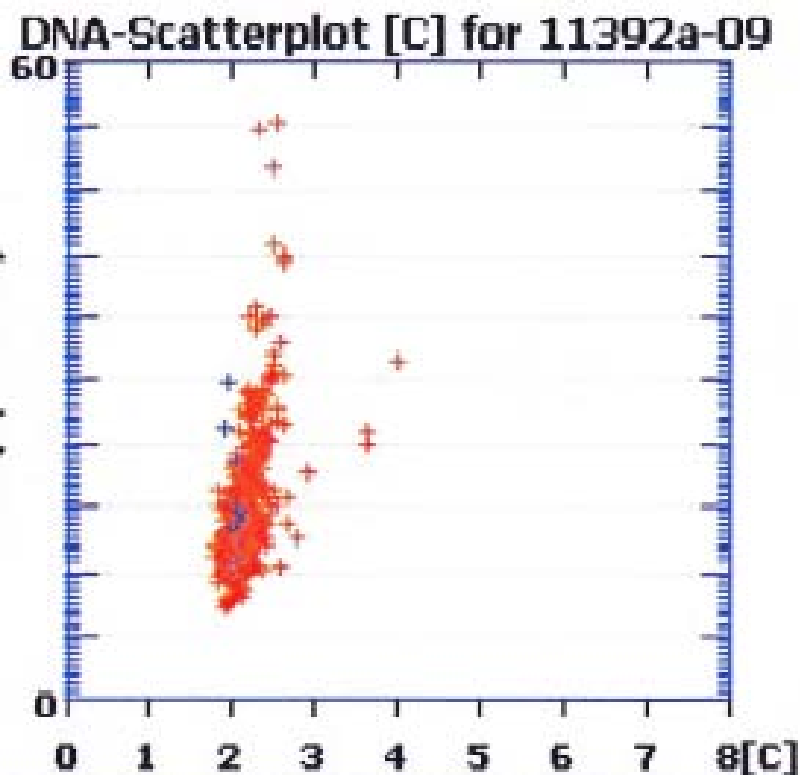
Ein individueller Referenzwert (d. h. ein normaler 2-facher oder diploider DNA-Gehalt, wie ihn jede normale Zelle des Körpers aufweist) wird in derselben Weise an etwa 30 normalen, gutartigen Zellen (z. B. Bindegewebszellen aus derselben Probe) bestimmt und der Messung der Prostatakarzinomzellen zugrunde gelegt (sog. interne Kalibrierung).

# Interaktiver Monitor der DNA-Zytometrie



# Wie funktioniert die DNA-Bildzytometrie an der Stanzen?

Messung von 300  
DNA-Histogramm  
Tumorstammlinie  
c (=content)





# DNA-Euploidie

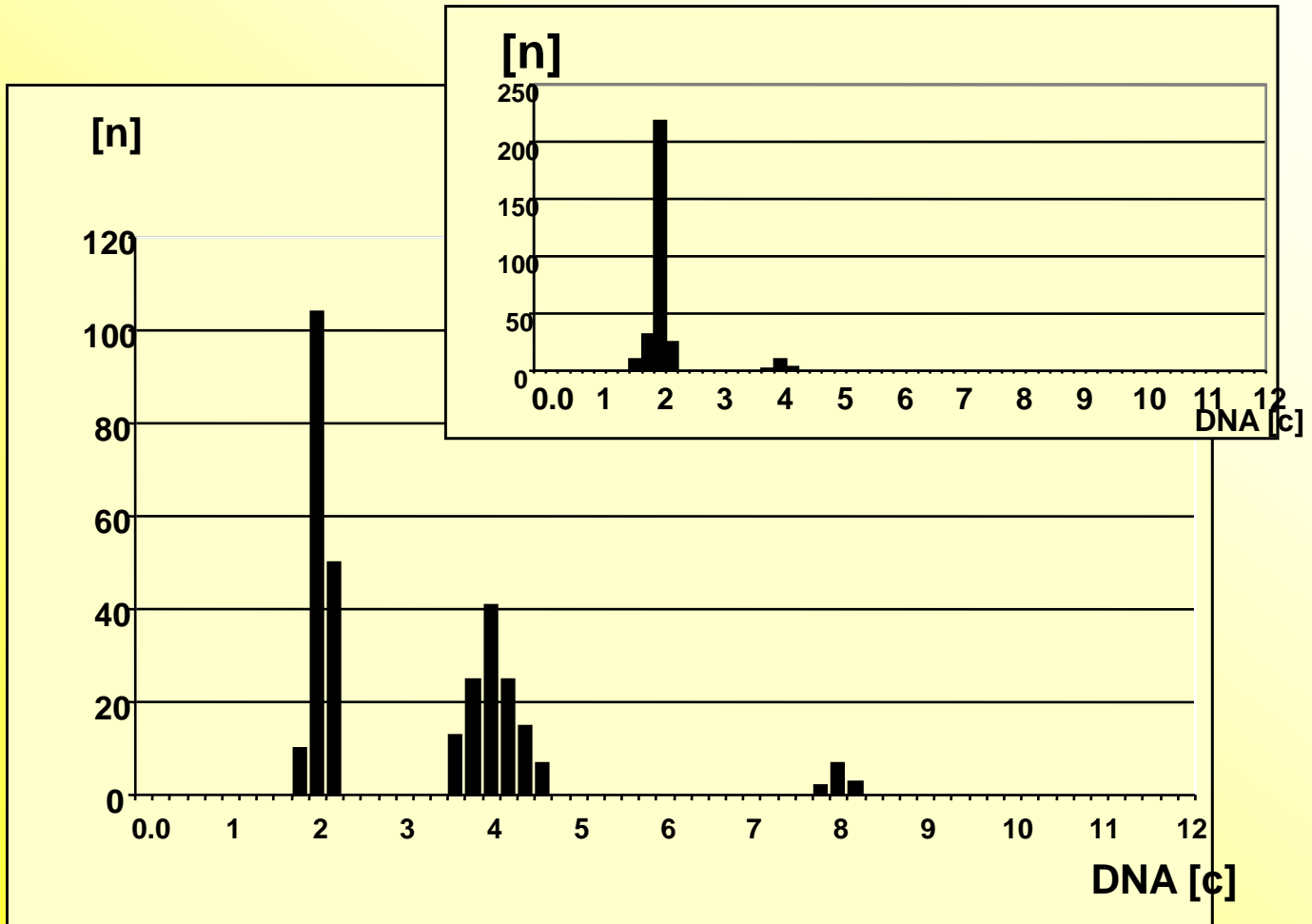
DNA-Verteilung (in c) von Zellkernen  
normaler, nicht neoplastischer Zellen bzw.  
Gewebe

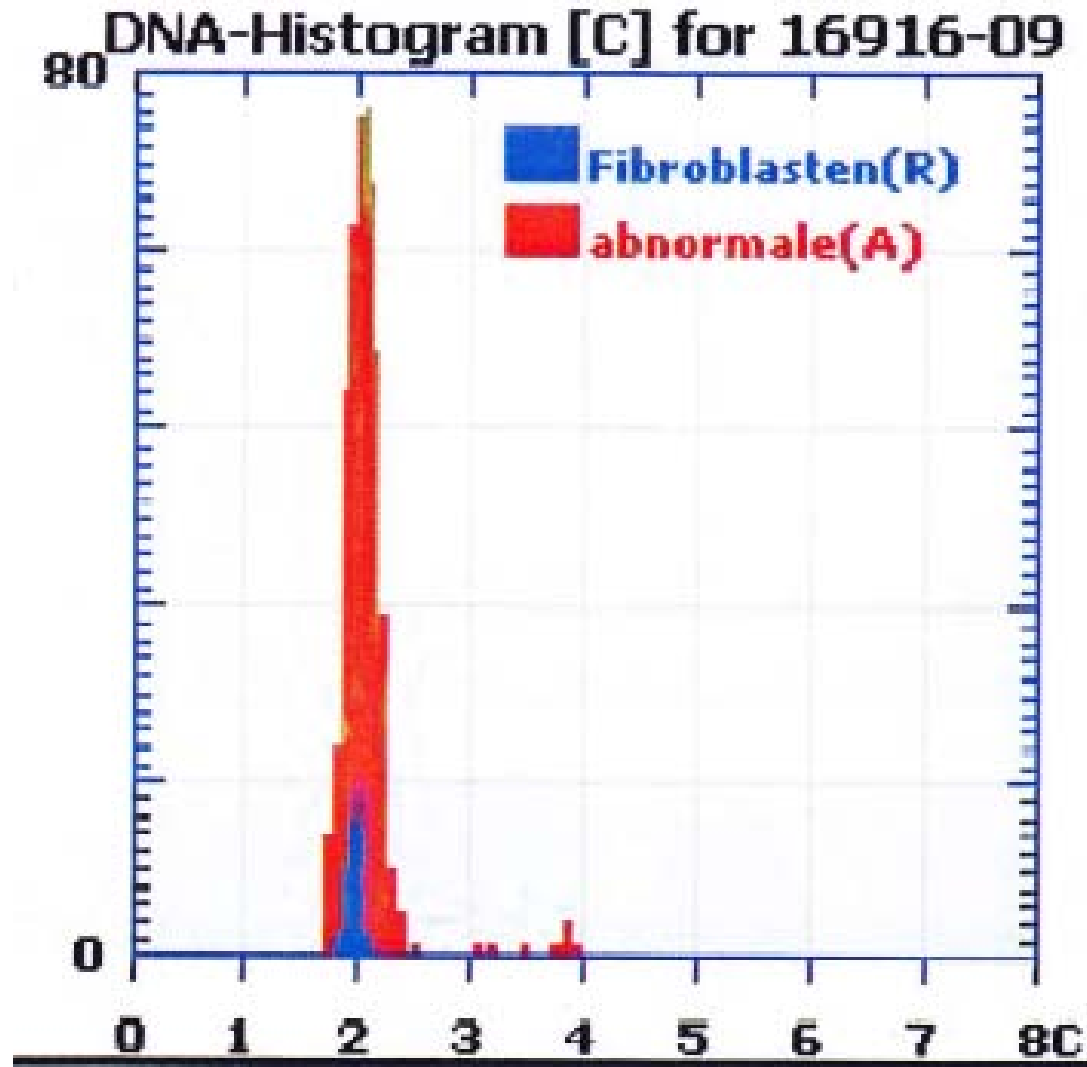
**1c entspricht der DNA-Masse eines haploiden  
Chromosomensatzes (z.B. Spermium)  
Häufigkeits-Gipfel bei 2c und 4c (diploid)**

**Ggf. zusätzlich bei 8c, 16c, 32c (polyploid)**

# Euploide DNA-Verteilungen

(diploid oben, polyploid unten)





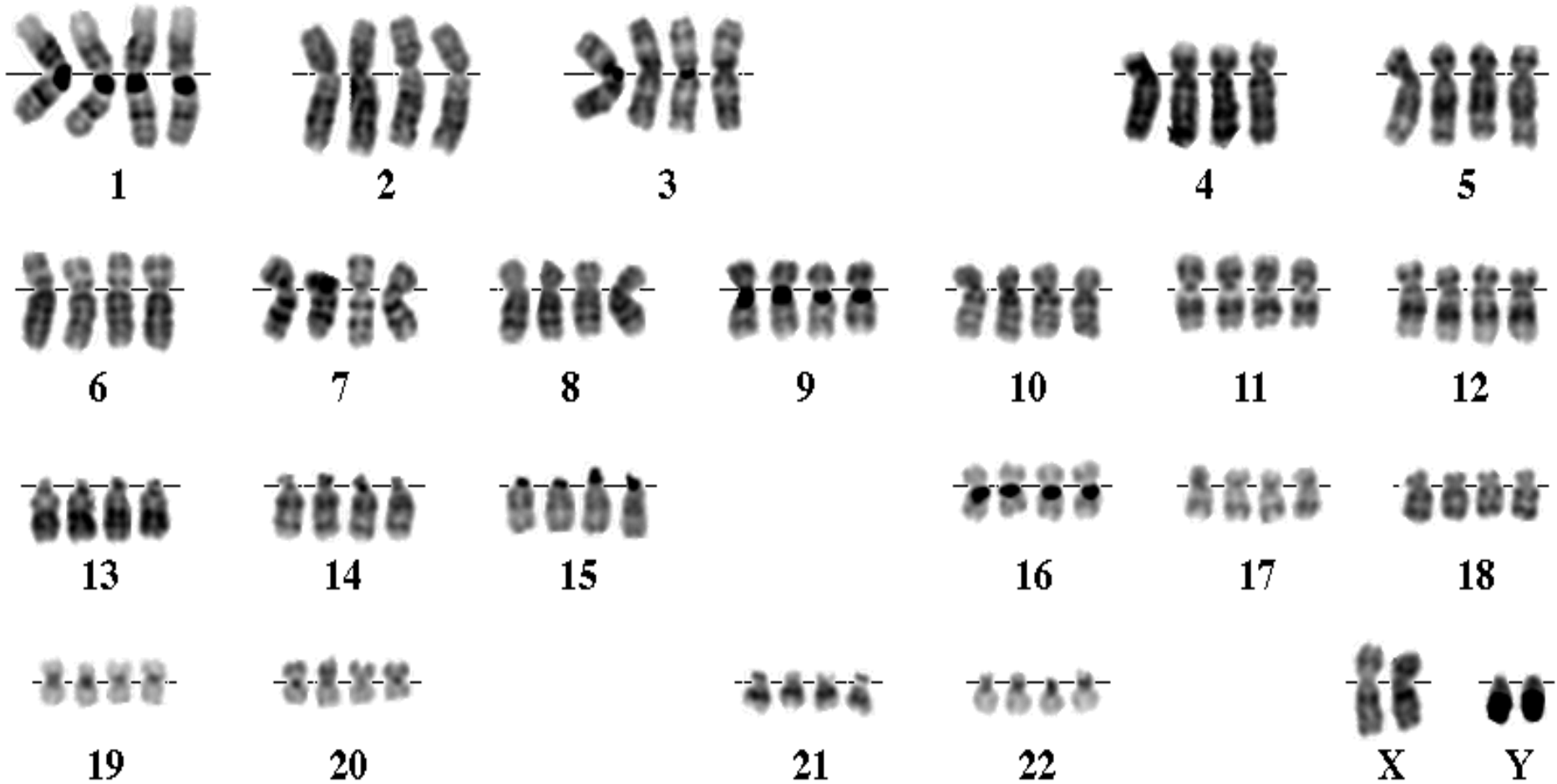
Peridiploide DNA – Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA – Grad I)

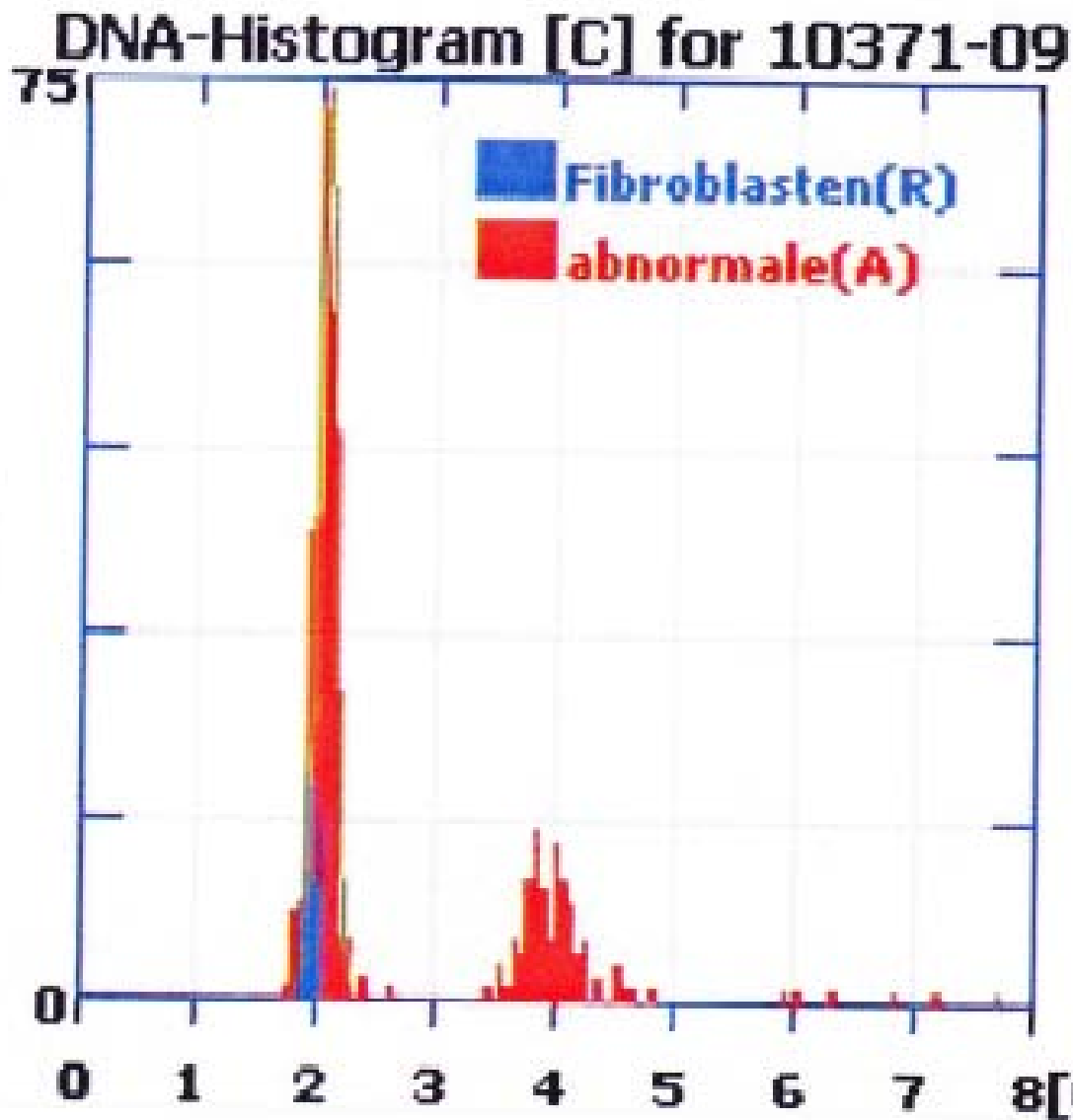
DNA-diploid:  $STL > 1,80c < 2,20c$



# Euploide Polyploidie

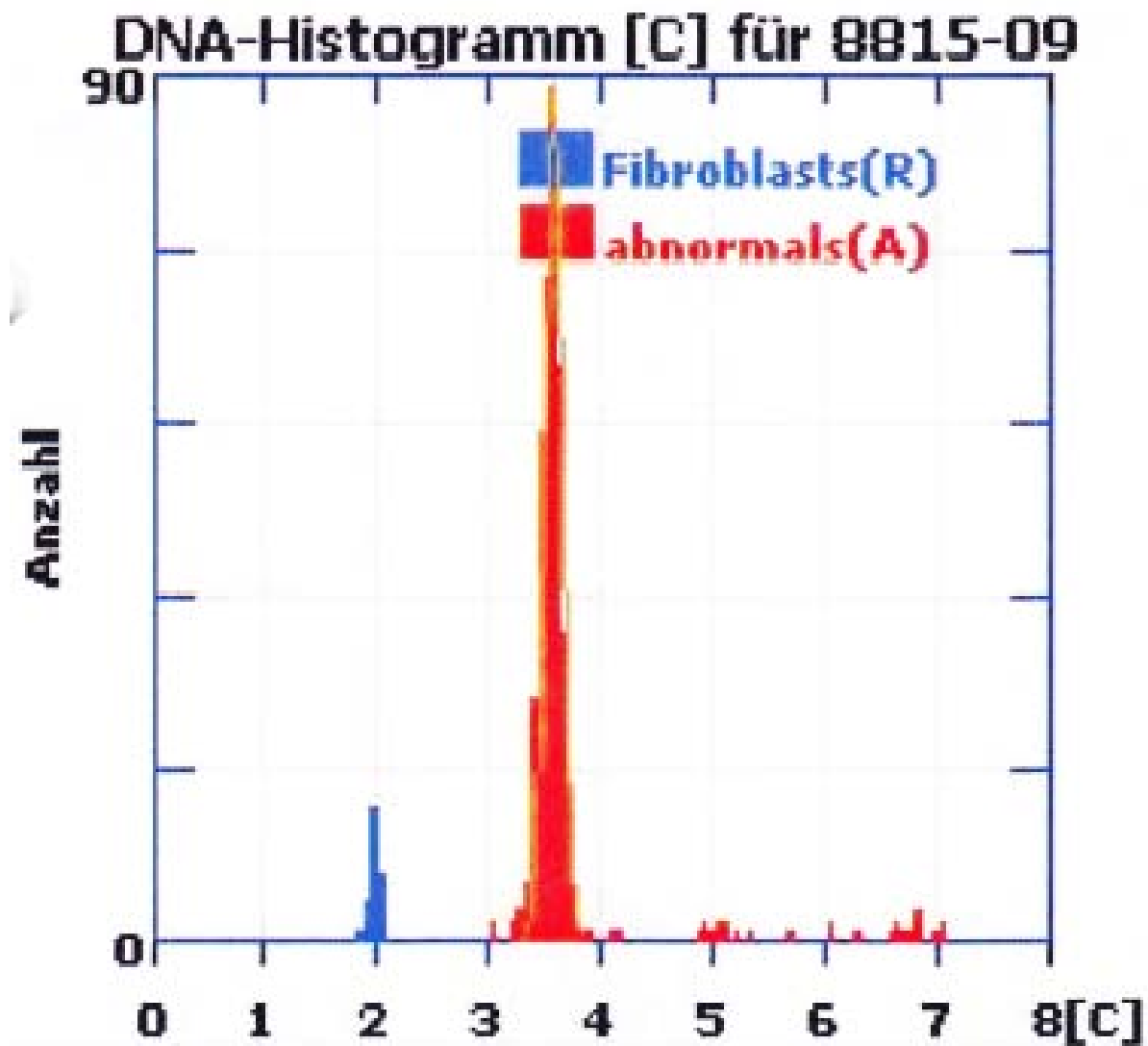
Eine Zelle mit tetraploidem Chromosomesatz,  
 $n=92$





**Peritetraploide DNA** – Verteilung eines Prostatakarzinoms (**DNA-Grad II**)

STL  $>1,80c < 2,20c$  **und**  $>3,60c < 4,40c$  **und**  $>7,20c < 8,80c$

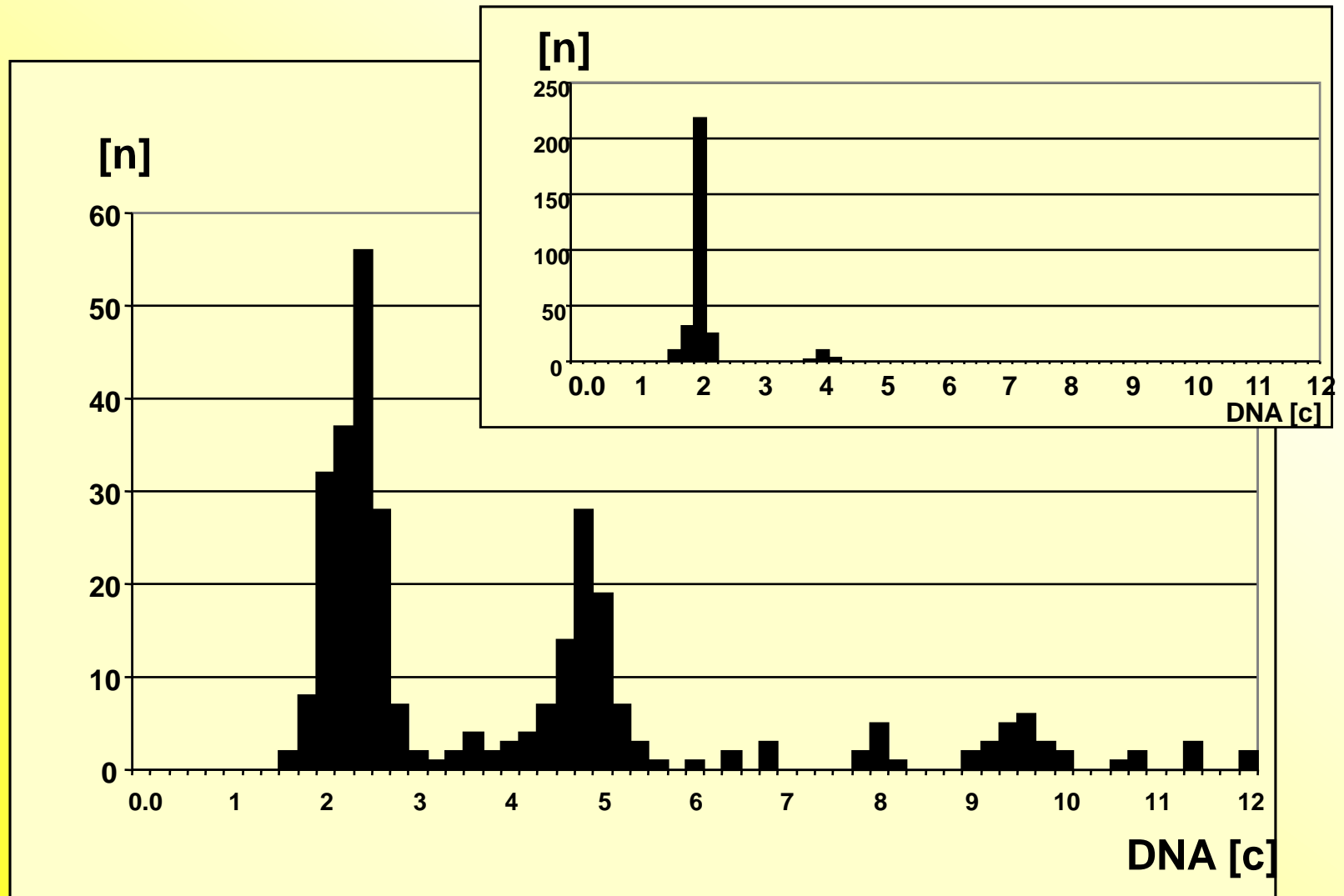


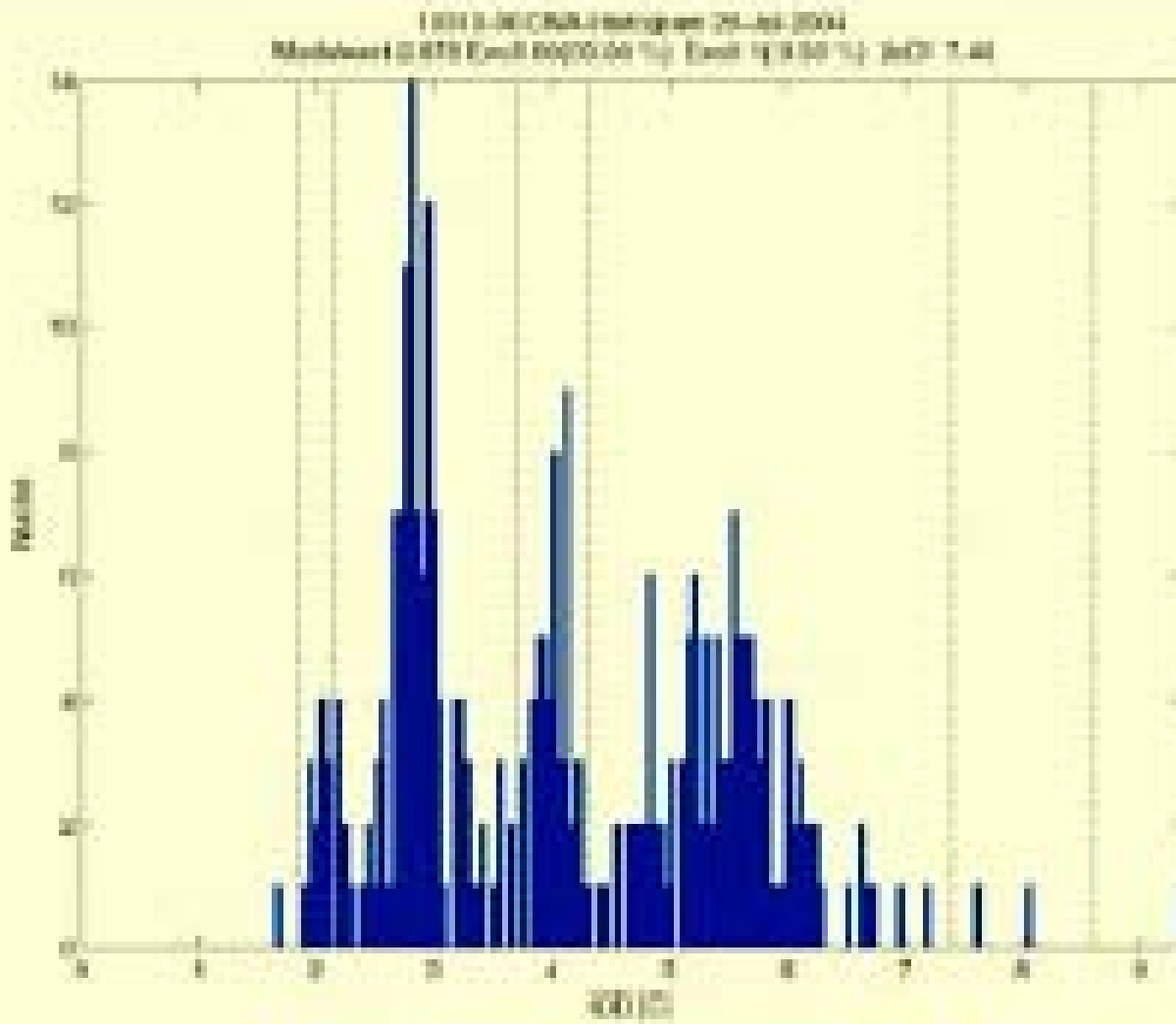
**X -Ploide DNA- Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA – Grad III)**

**abnorme**  $STL < 1,80c > 2,20c$  **oder**  $< 3,60 > 4,40c$  **und/oder** Werte  $> 9c$



# Aneuploide DNA-Verteilung (unten)





**Multiploide DNA- Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA- Grad IV)**

**Mehrere DNA-Stammlinien**

# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

## Reproduzierbarkeit

höher als die der histologischen Gradierung  
(Gleason)

**82,2 %** : Böcking *et al.*, 1989

**94,0 %** : Nguyen *et al.*, 2004

**100 %** : Yalcinkaya *et al.*, 2005



# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

1. Peridiploid (50%)
2. Peritetraploid (25%)
3. X-ploid (12,5%)
4. Multiploid (12,5%)

Tribukait, 1993; Haroske *et al.*, 2001; Ahlgren *et al.*, 1997

# Prognostic Value of DNA Analysis of Prostate Adenocarcinoma: Correlation to Clinicopathologic Predictors

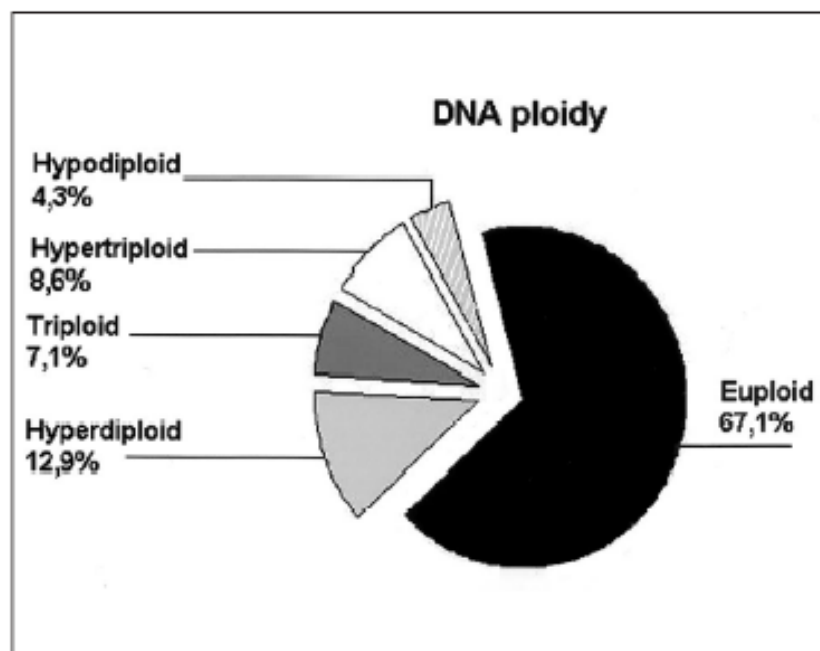


Fig. 3 - The distribution of DNA ploidy for the entire group.

A. Bantis, M. Gonidi, P. Athanassiades, Ch. Tsolos, A. Lioffi, E. Aggelonidou, A.M. Athanassiadou, E. Petrakakou, P. Athanassiadou

Pathology Laboratory, Cytology Department Medical School; University and Urology Department, University Hospital Alexandroupolis; Athens, Greece

# **Die Bedeutung der Ergebnisse der DNA Bildzytometrie**



# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

Zur **Prädiktion** von Tumorprogression

**Peridiploide** Prostatakarzinome **sind kaum** je  
progredient, **aneuploide** dagegen **fast alle**

Adolfson et al., 1990; Montgomery et al., 1990; Al-Abadi u. Nagel,  
1995; Ahlgren et al., 1999; Amling et al., 1999; Delivelitos et al., 2003;  
Mora et al., 1999

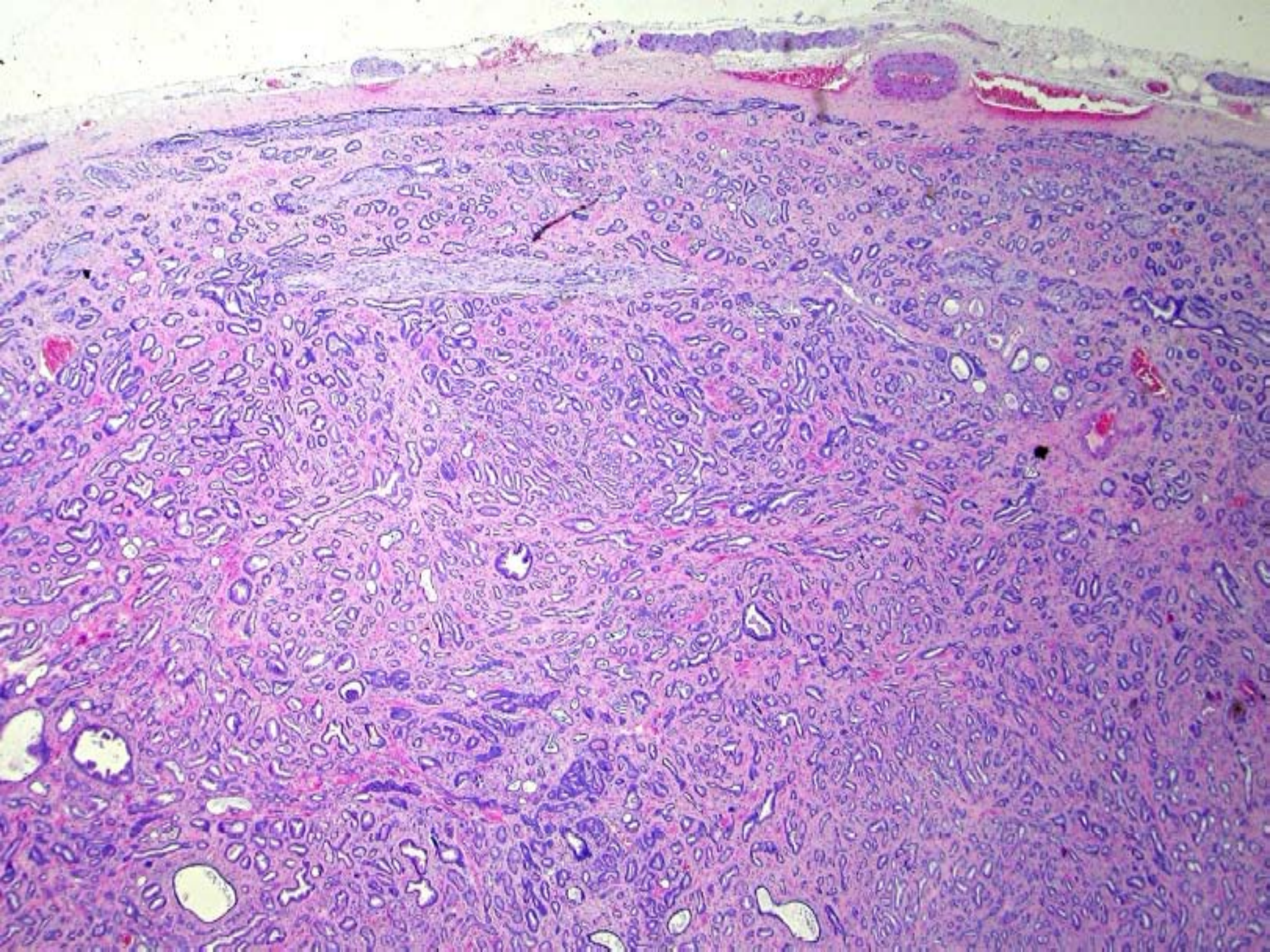
**Die DNA Zytometrie hat eine gute Vorhersage über  
extraprostatischer Ausbreitung, Rezidiv und  
Metastasen an der Stanzbiopsien (Isherwall, Epstein,  
2009). 370 had complete information  
281 organ-confined (75 %) and  
89 nonorgan-confined (25 %) PCa cases**

The use of **DNA ploidy in lieu of the biopsy Gleason score** in each preoperative model evaluated resulted in equivalent or improved organ- vs nonorgan-confined PCa prediction.

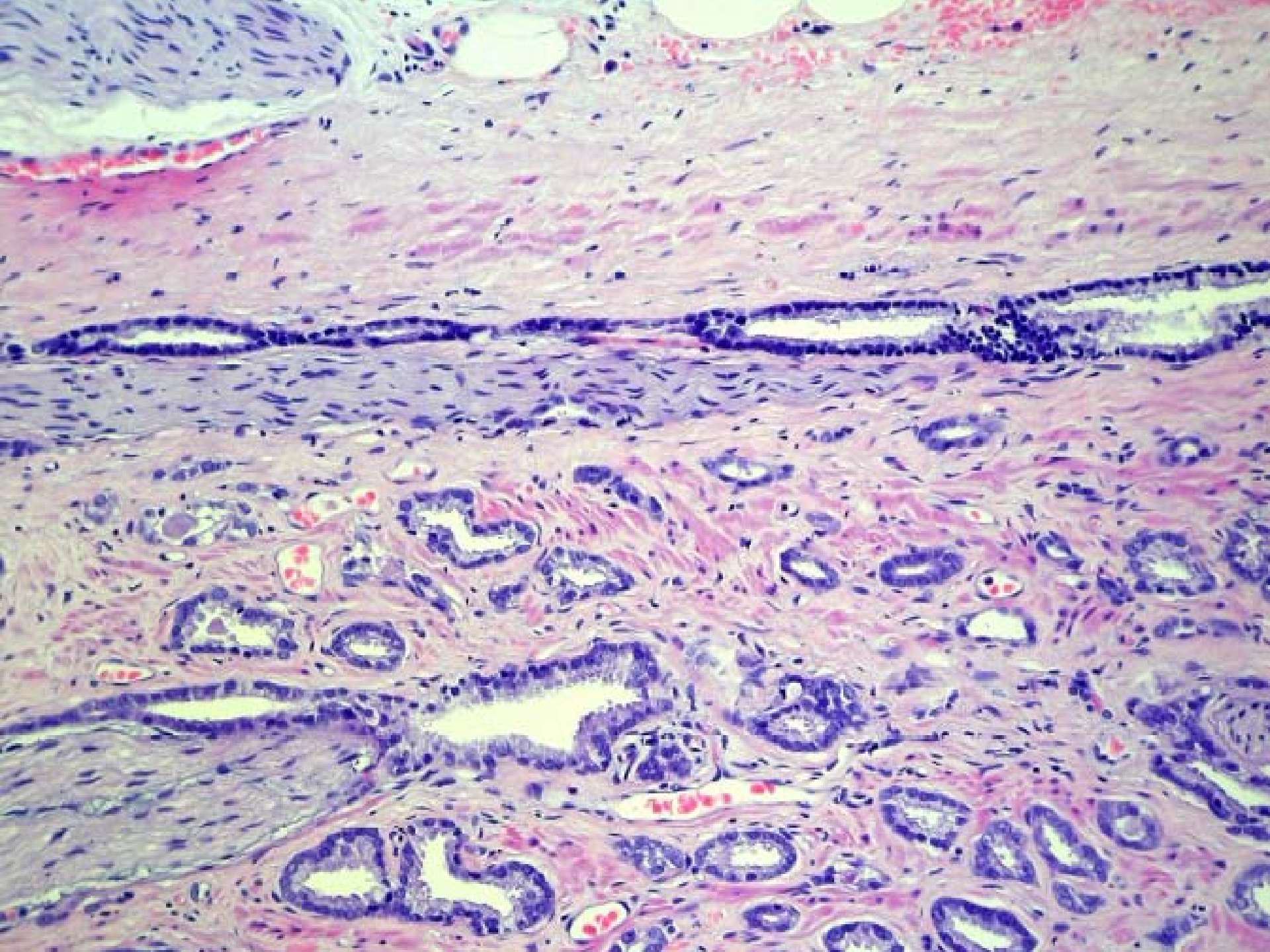
The results of our study have shown that nuclear morphometric alterations provide an **objective and reproducible** quantitative measurement of nuclear structure

and **DNA ploidy** features that **can serve as a surrogate biomarker with the potential to replace biopsy Gleason scores** for organ- vs nonorgan-confined PCa prediction.

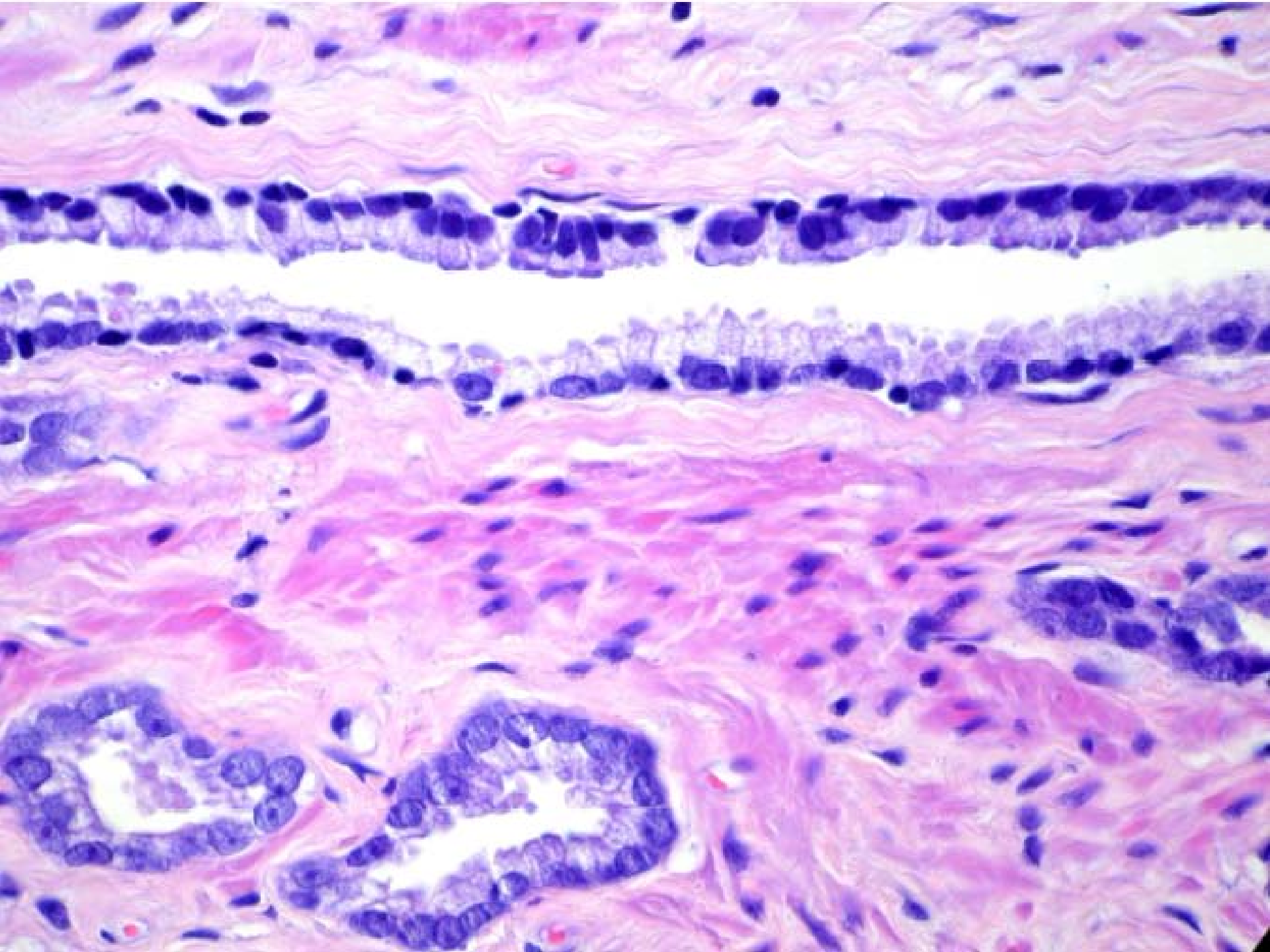


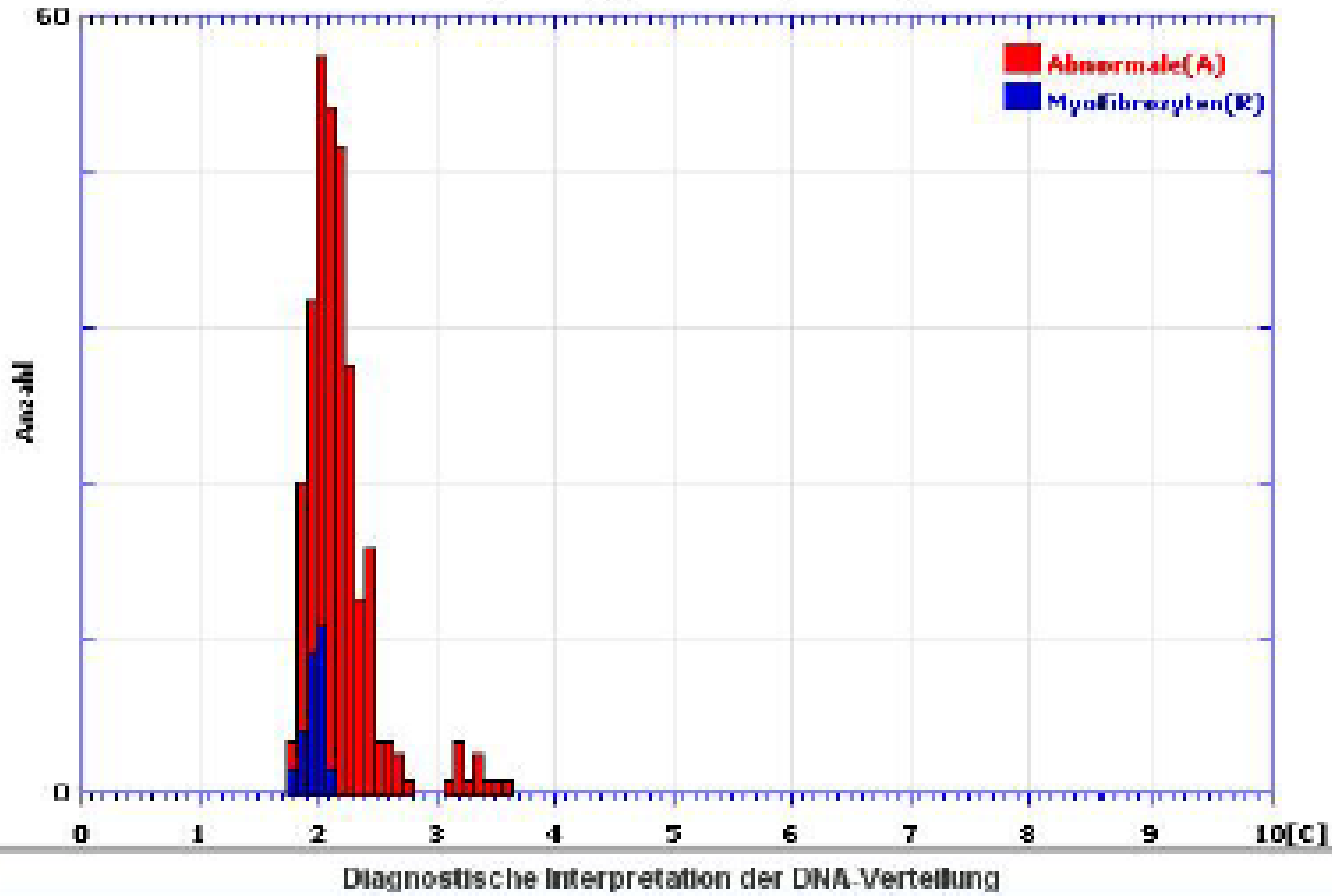












**DNA Dildzytometrie: Peridiploid, sehr günstige Prognose**

# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

zur Prädiktion der  
Überlebenswahrscheinlichkeit

Patienten mit **peridiploiden** Karzinomen

**sterben kaum** an ihrem Tumor, mit

**aneuploiden fast alle**

Tinai et al., 1992; Forslund et al., 1992; Al-Abadi u. Nagel 1995;  
Ahlgren et al., 1997



# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

Ohne Therapie

Patienten mit **peridiploiden** Karzinomen  
leben auch **unbehandelt genauso lang**,  
wie gleichalte, gesunde Männer

Tribukait, Eur. Urol. 23: 64 (1993)

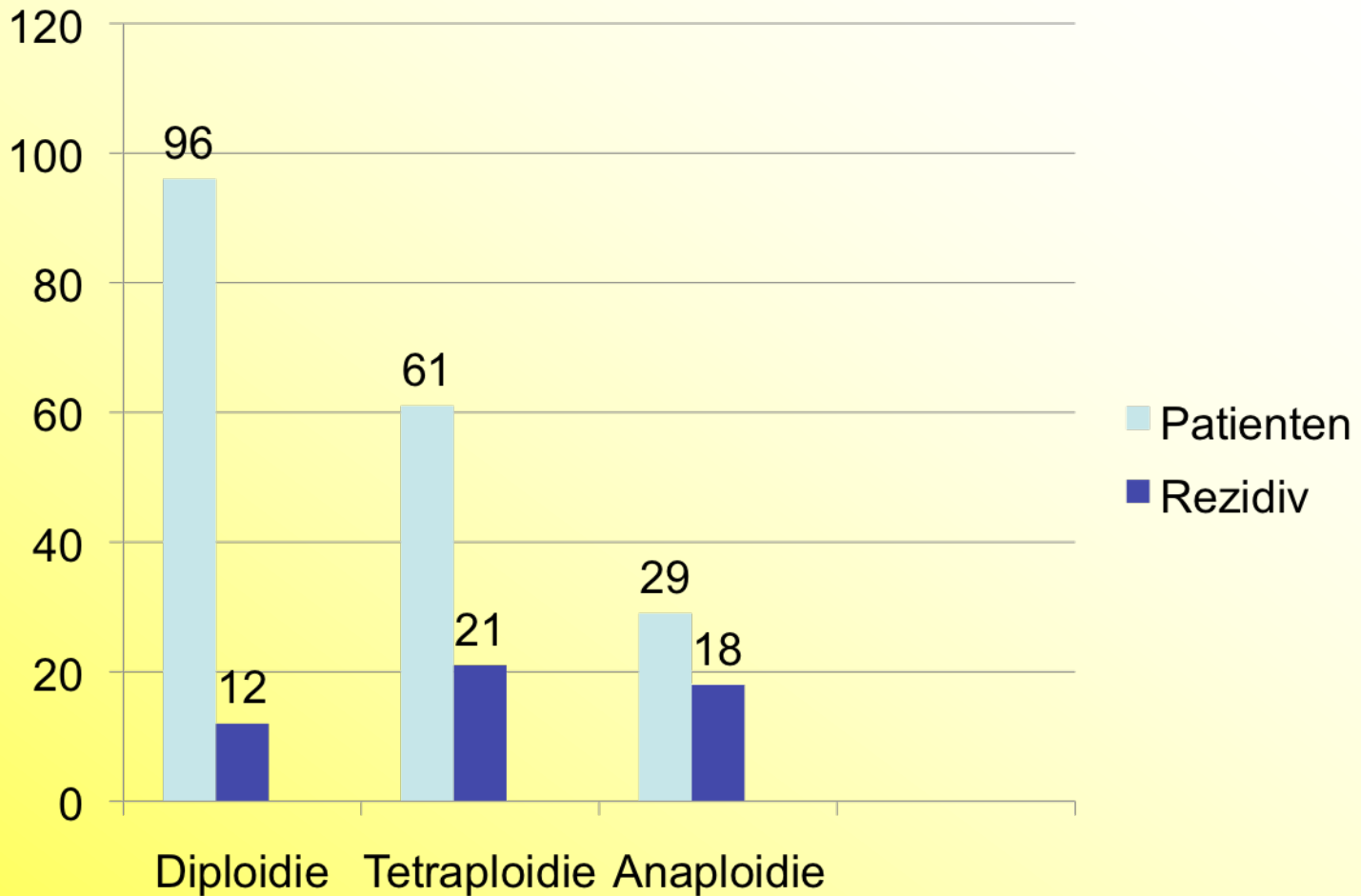
# DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

Nach radikaler Prostatektomie

**Rezidive** oder Progress in ca. **13 %** der Fälle mit  
**peridiploiden** Karzinomen, • fast keine Todesfälle

Lee et al., 1988; Nativ et al., 1989; Ross et al., 1994; Amling et al., 1999; Mora et al., 1999; Delivelitors et al., 2003; Montgomery et al., 1990

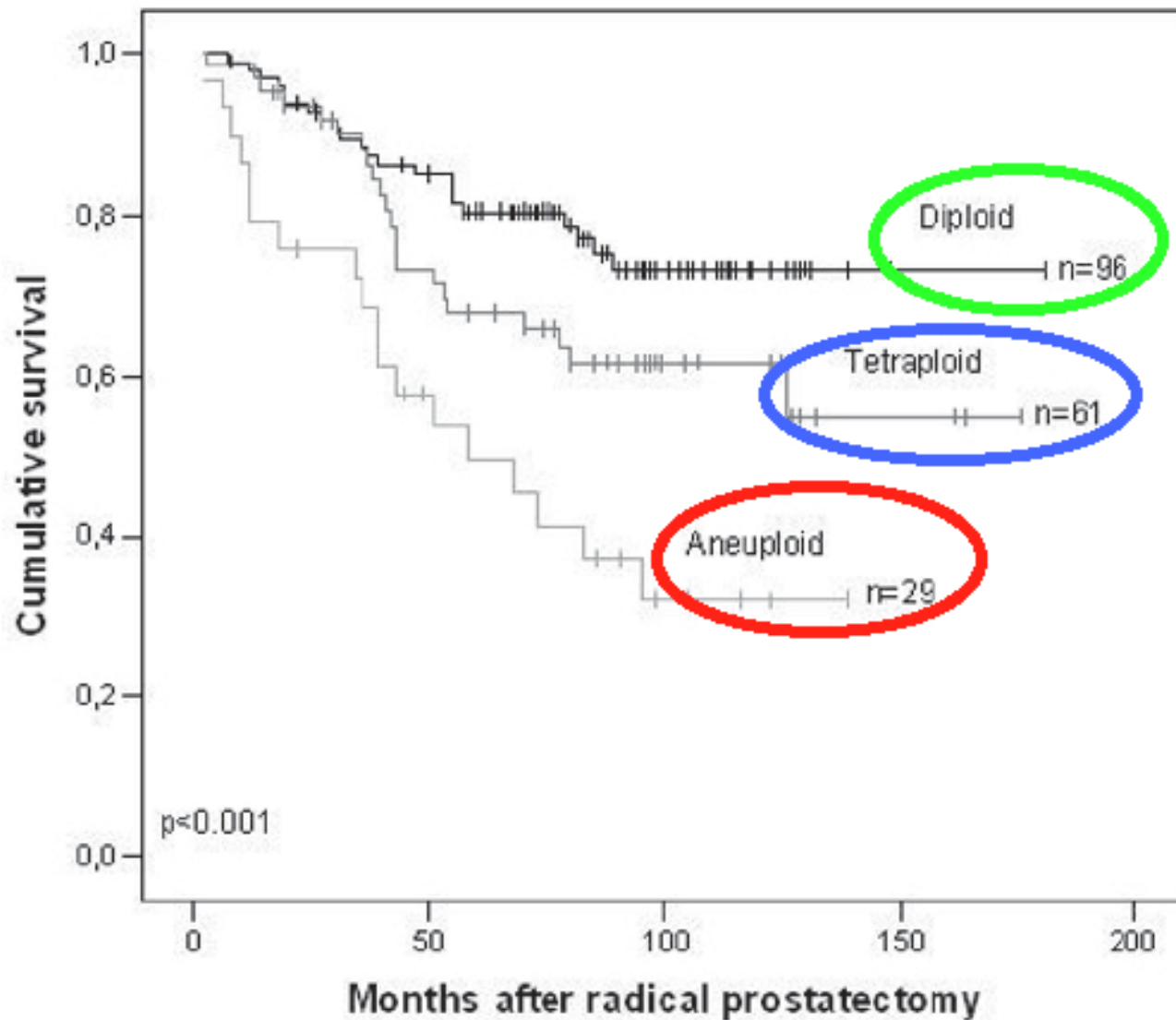
M. Pretarius, Cellular Oncology, 2009



**Rezidiv in 13 % 36% 62%**

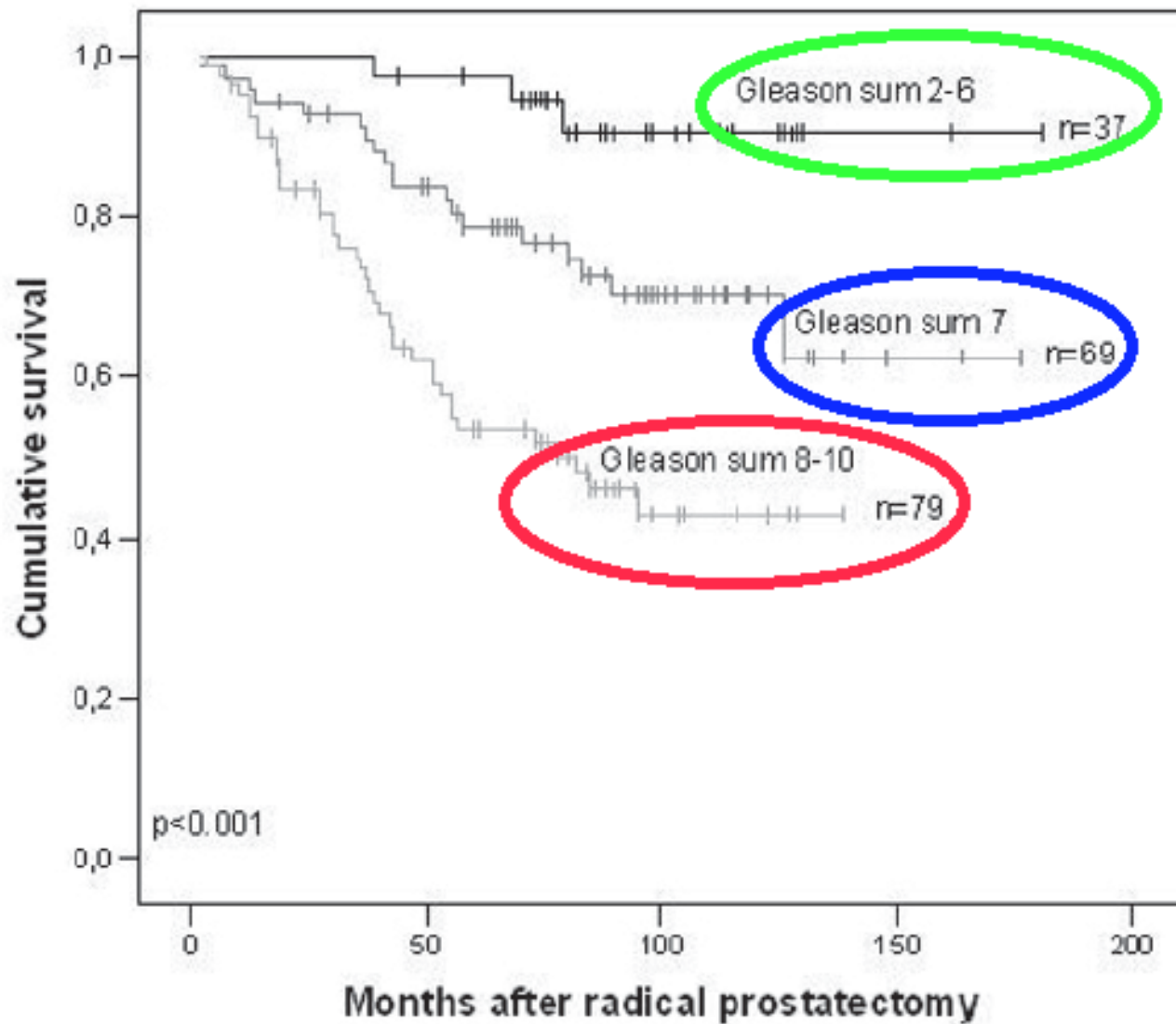
**186 Patienten , follow up von 73,3 Monaten**

**M. Pretarius, Cellular Oncology, 2009**



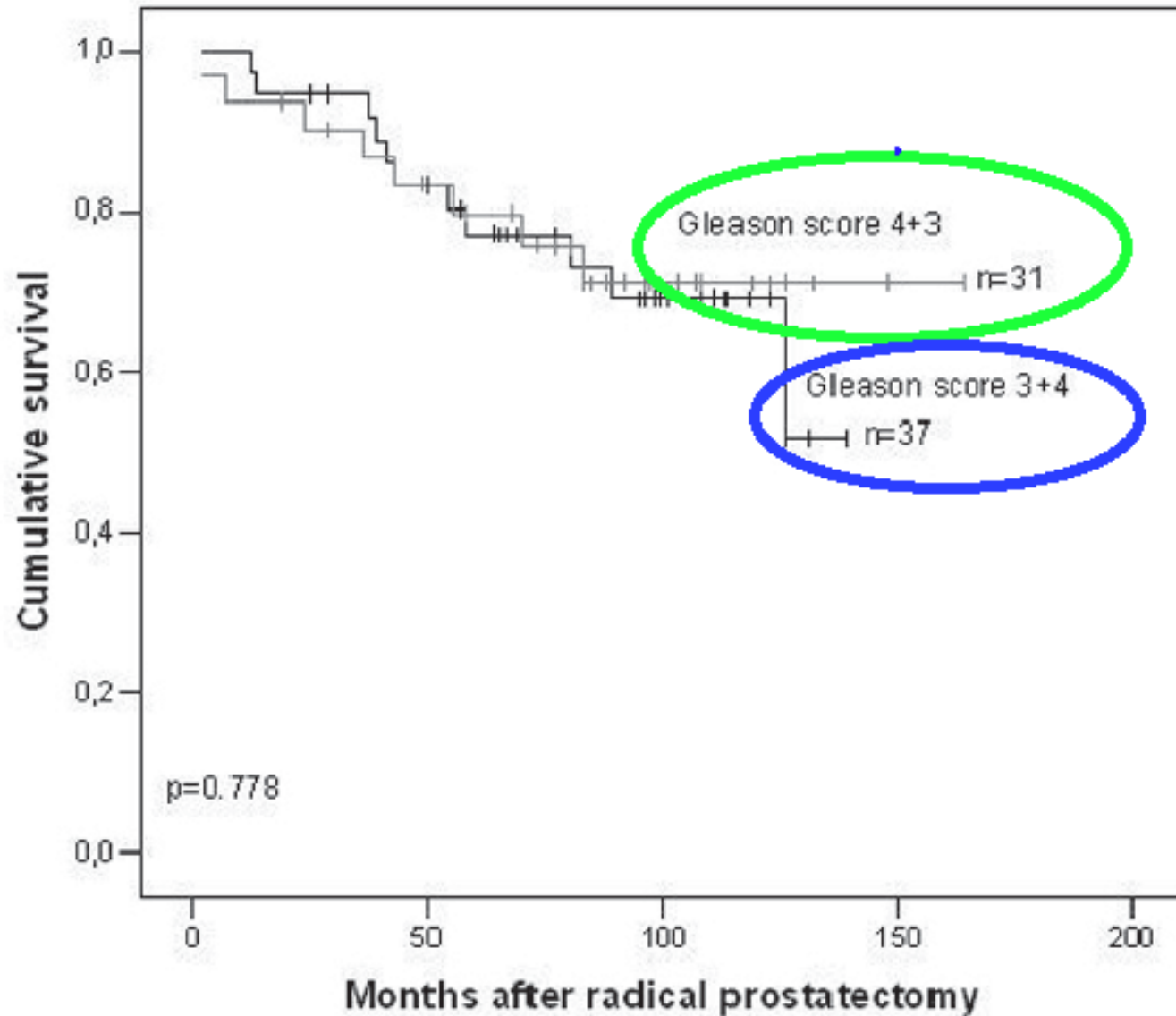
**Figure 1a** Disease free survival according to DNA Ploidy



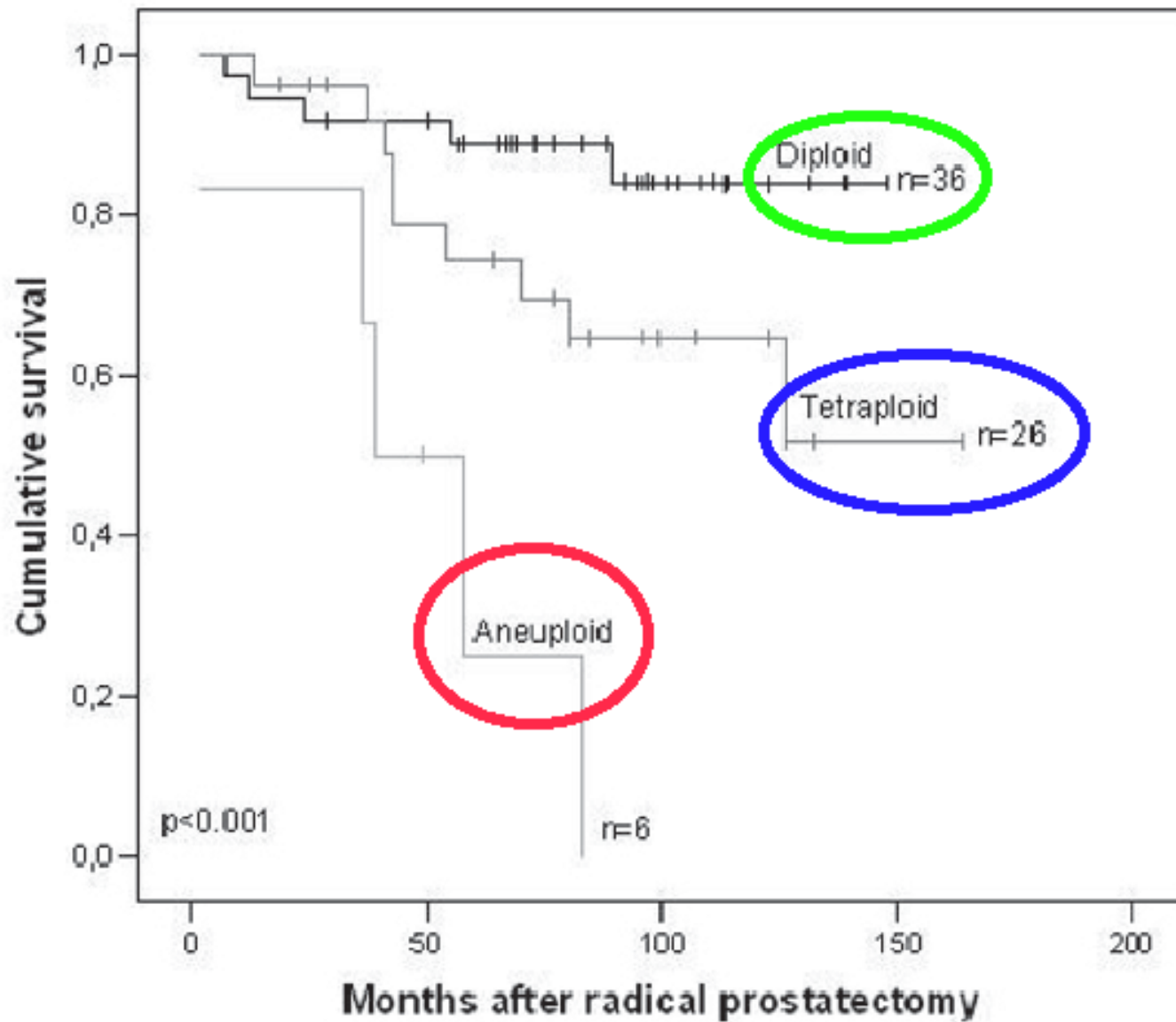


**Figure 1b** Disease free survival according to Gleason score

Außerdem war bei den **69 Patienten** mit **Gleason 7** die DNA Ploidie als **signifikanter** prädiktiver Faktor des Tumorezidivs **als Gleason Score**.



**Figure 2a** Disease free survival according to DNA Ploidy for Gleason 7 patients

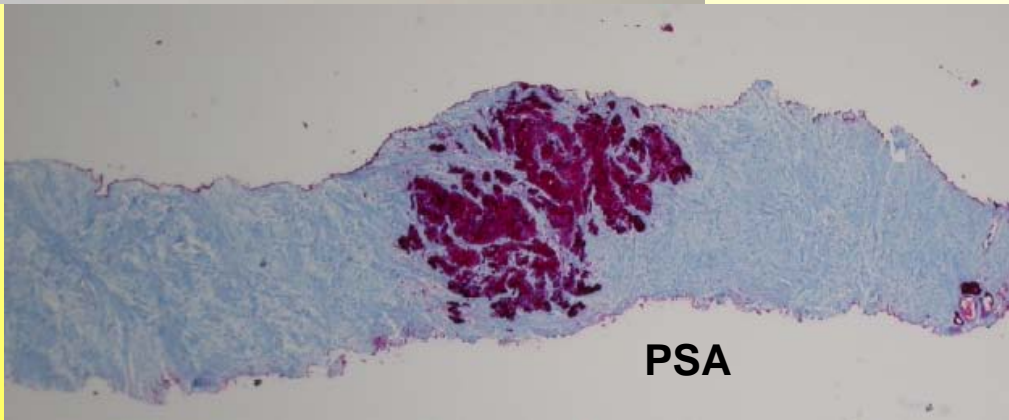
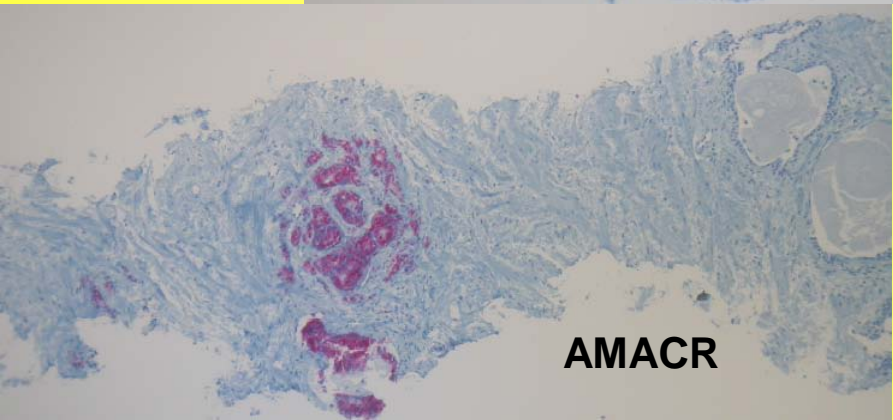
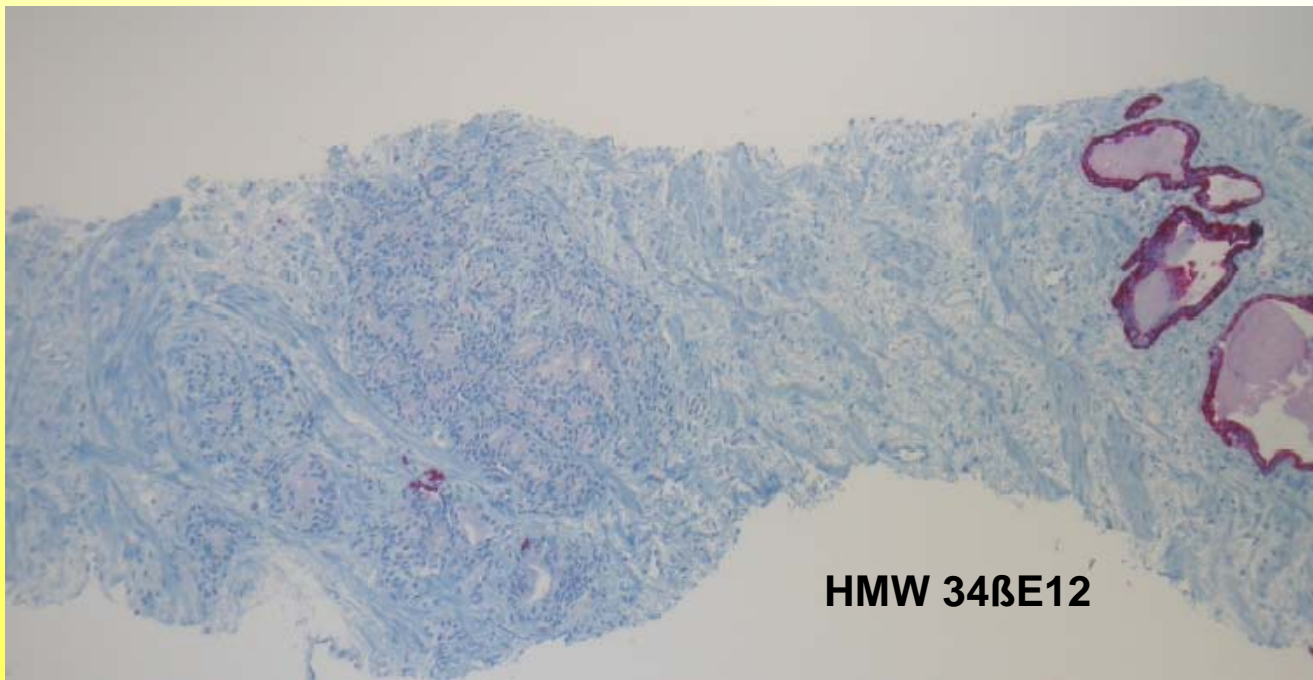
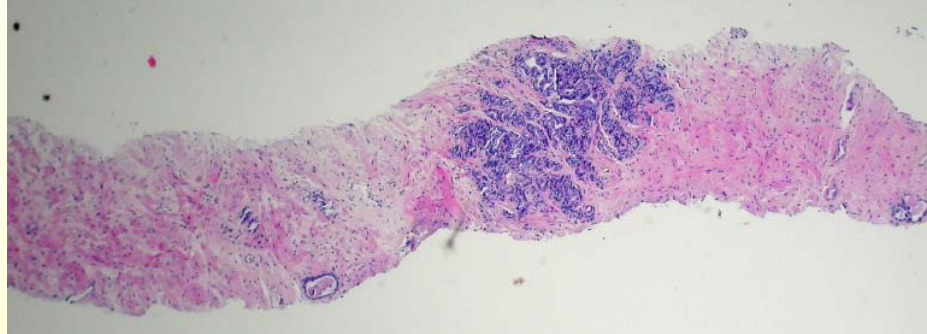
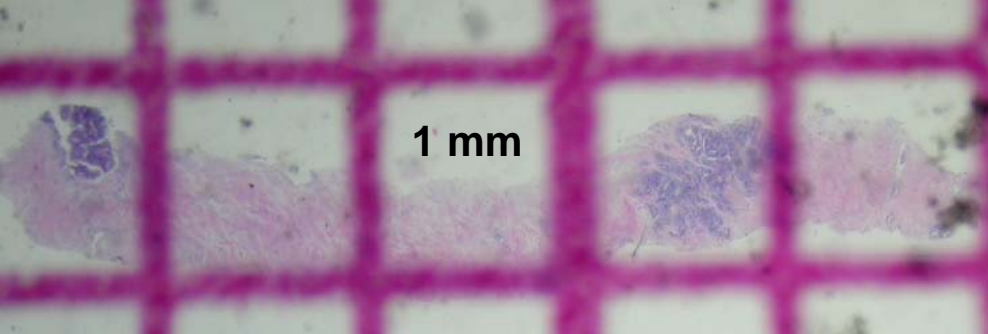


**Figure 2b** Disease free survival according to Gleason score for Gleason 7 patients



## Fazit:

Diese Studie **schlägt vor** das die **DNA Ploidie** als wichtiger Prognose Faktor für Prostatakarzinome berücksichtigt werden muß, besonders **bei Tumoren mit Gleason Score 7.**



# Klinisch insignifikante Prostatakarzinome

Mikrofokales PC:

- GS 6 oder 7a
- in einer Stanze
  - $< 1\text{mm}$
- PSA  $\leq 10\text{ ng/ml}$

**Active surveillance** in Übereinstimmung mit dem Patienten möglich

Helpap und Egevard. Urologe A 48, 170-74 (2009)

# Indikationen zur DNA-Malignitäts-Gradierung beim Prostata-Karzinom

Spezifizierung **Einschluss-Kriterien** für **active surveillance** (**diploid**) prospektive Studie mit BCCA, Vancouver

Spezifizierung **Ausschluss-Kriterien** für **active surveillance** (**x-ploid und multiploid**) prospektive Studie mit BCCA, Vancouver

Spezifizierung **Ausschluss-Kriterien** für **RPE & Brachytherapie** (**x-ploid oder multiploid**) retrospektive Studie mit BCCA, Vancouver



# DNA Publikationen

- [Prostate-Publikationen DNA](#)
- [Pretorius et. al. 2009 - Prognostische Überlegenheit der DNA-Zytometrie über den Gleason-Score](#)
- [Prostata DNA ploidi poster Maria 2009](#)
- [Isharwal2009 DNA ploidy as surrogate in prostate biopsy](#)
- [Wiley InterScience JOURNALS Cancer](#)
- [Radiation Neuro-Oncology Laboratory - Brain Tumor Research Center - Harvard Medical School - Massachusetts General Hospital](#)
- [Göran Ahlgren - research profile on BiomedExperts](#)
- [Griffiths2006 gleason score interpretation different pathologists](#)
- [Lorenzato et. al. 2004](#)
- [Chakravarti et. Zhai 2003](#)
- [Pollack2003](#)
- [Deliveliotis2003 Prognostic value of dna ploidy](#)
- [Martinez2002 Prognostic value of DNA ploidy](#)
- [Fourth updated ESACP consensus report on diagnosti \[Anal Cell Pathol 2001\] - PubMed Result](#)

**info@pathologie-savin.de**

# DNA Publikationen

- [Bostwick2000 Prognostic factors in prostate cancer](#)
- [Wang et. al. 2000](#)
- [Amling et. al. 1999](#)
- [Brinker1999 can ploidy predict radic prostatectomy grade and stage](#)
- [Ross1999 DNA Ploidy Status Predicts Grade Shifting in Prostate Cancer](#)
- [Mora1999 correlation ploidy histology clinical data prostate cancer](#)
- [Borre1998 dna ploidy and survival](#)
- [Pollack et. al. 1997](#)
- [Ahlgren et. al. 1997](#)
- [1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA imag \[Anal Cell Pathol 1998\] - PubMed Result](#)
- [Shankey et. al. 1995](#)
- [Al-Abadi et Nagel 1995](#)
- [Böcking et. al. 1995](#)
- [Schröder et. al. 1994](#)
- [Tribukait et. al. 1993](#)
- [Humphrey1991 comparison Grade DNA ploidy intraglandular tumor extent](#)
- [Forsslund1990 ploidy level determinations prostate carcinoma](#)

**info@pathologie-savin.de**

# DNA Publikationen

## Prognostic Factors in Prostate Cancer

**Morphologisch:** Grad und Stadium, Nervenscheideninfiltration und Gefäßeinbrüche

**Immunhistochemisch:** Ki 67, bcl-2 und P53

### DNA Ploidie

*Jeffrey S. Ross, MD,1,3 Timothy A. Jennings, MD,1 Tipu Nazeer, MD,1 Christine E. Sheehan,1 Hugh A.G. Fisher, MD,2 Ronald A. Kauffman, MD,2 Shagul Anwar, MD,1 and Bhaskar V.S. Kallakury, MD1,4, **American journal of clinical pathology, 2003***

## Pathologenkongress in Mai 2010, Berlin, Prof. Helpap

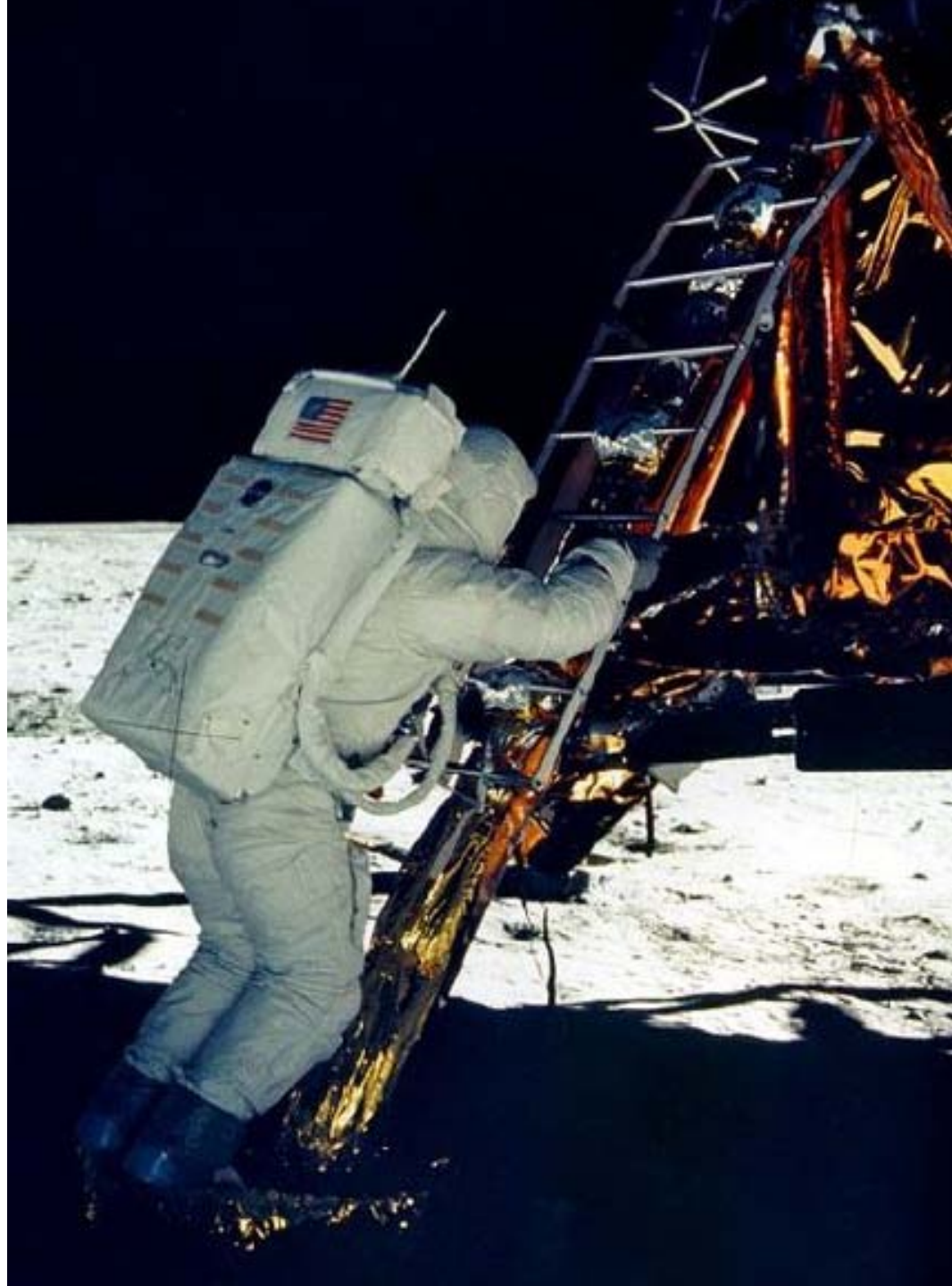
**DNA – Ploidie kann bei diesen Entscheidungen hilfreich sein**

**Bei Diskrepanzen telef. Kontakt zwischen allen Beteiligten**

**DNA – Zytometrie „ ja „**

**Hilfreiche Zusatzuntersuchung (in Einzelfällen), kein Absolutismus**









**Vielen Dank für  
Ihre  
Aufmerksamkeit!**

**Und herzlichen  
Dank für die Einladung  
und Unterstützung**

