



Praxis für Pathologie



Dr. med. Simon Savin
www.pathologie-savin.de



1. Die histologische Bearbeitung

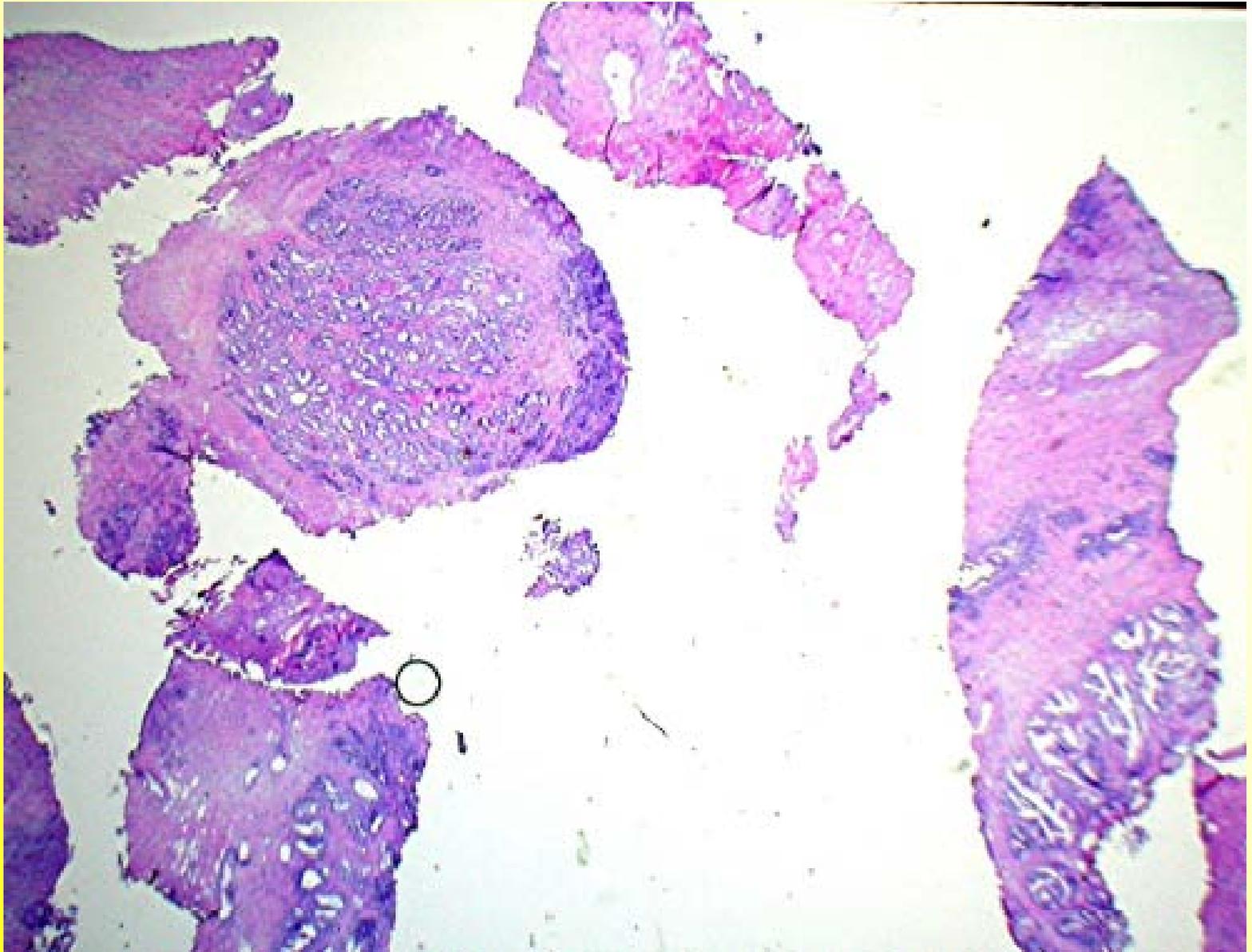
2. Gleason Score (modifiziert in 2005)

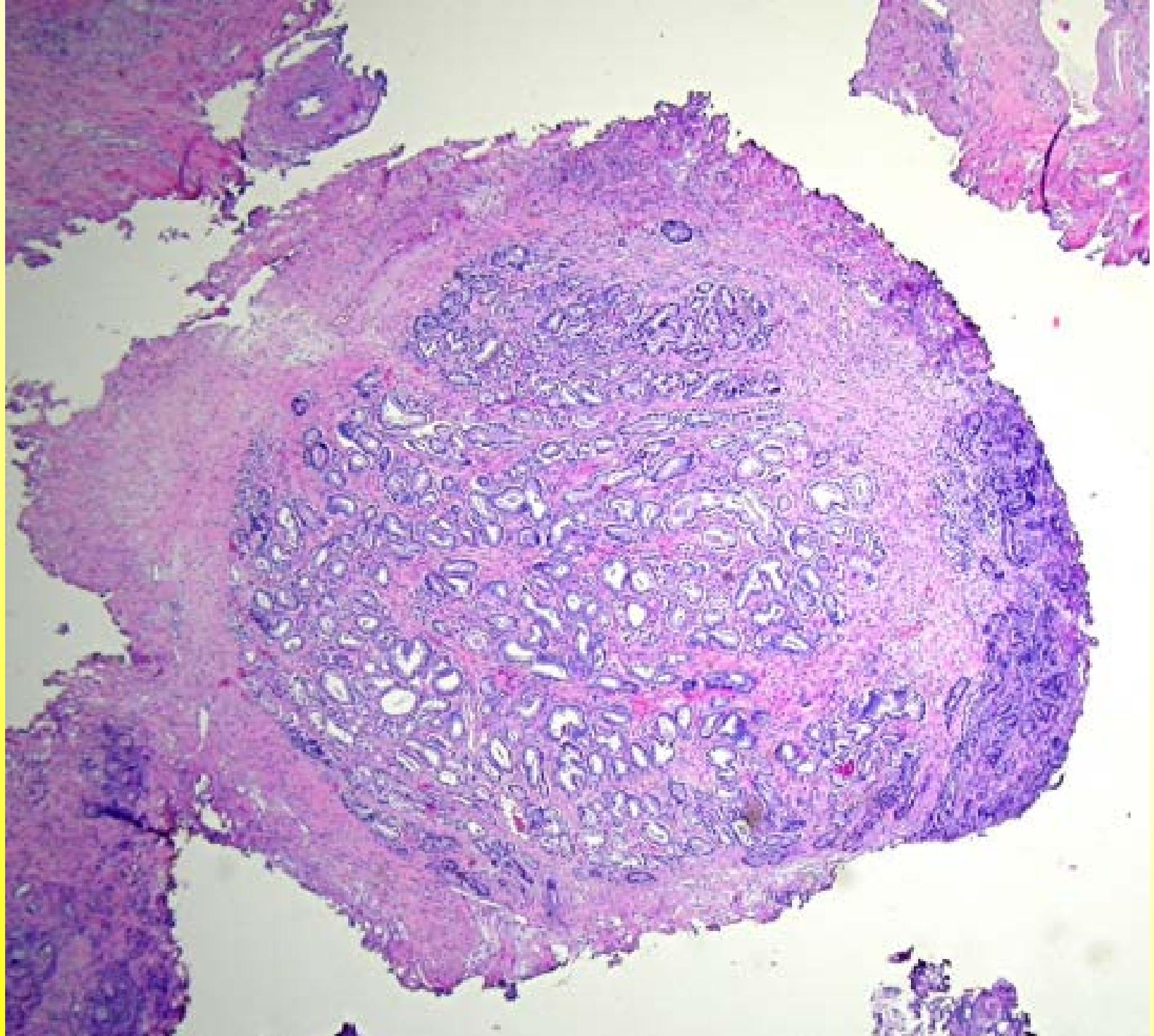
3. DNA Zytometrie

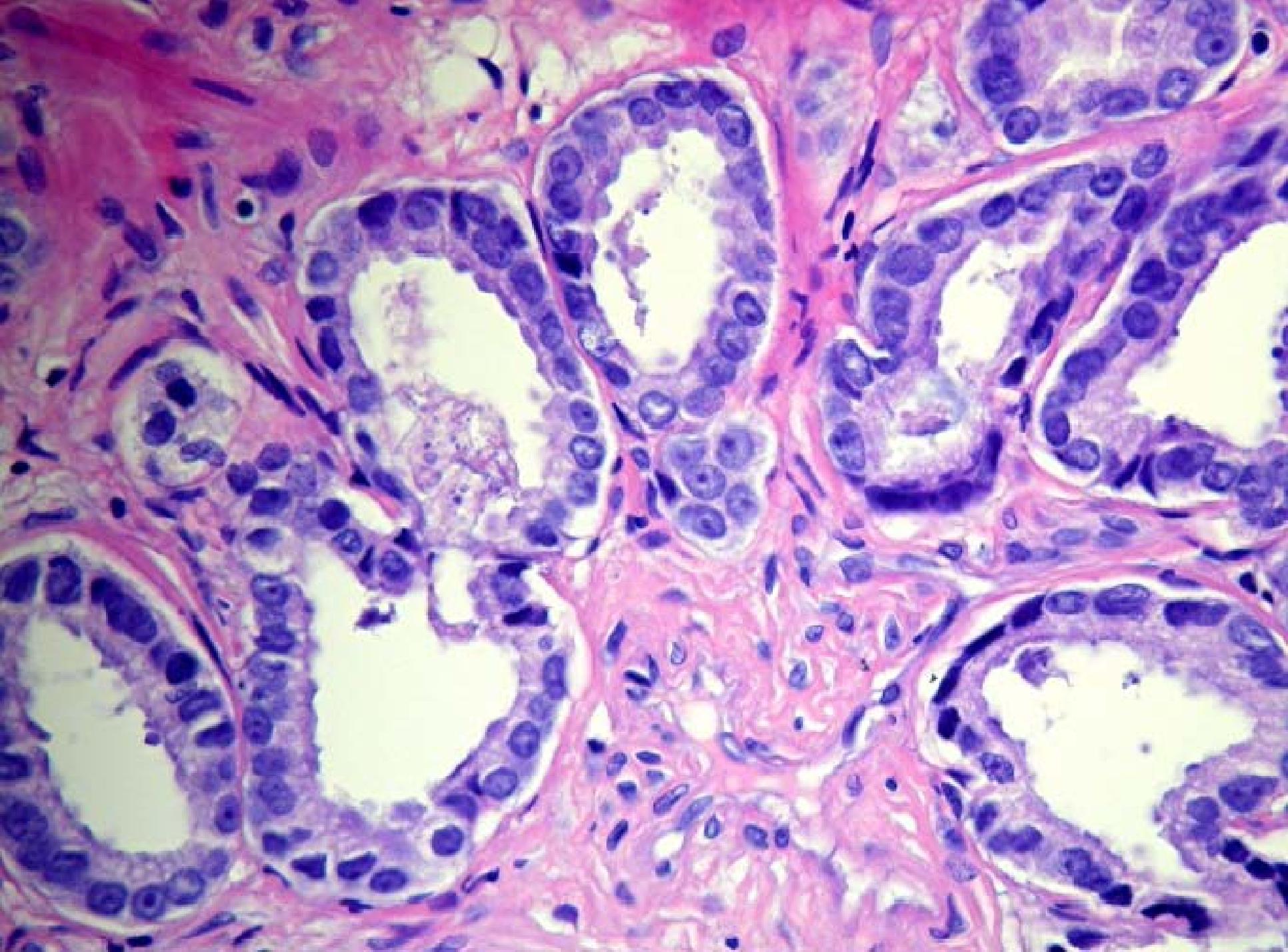
Gewebe einer transurethralen Resektion wegen gutartiger Vergrößerung der Prostata



In 15 % der TUR Material findet man ein Krebs



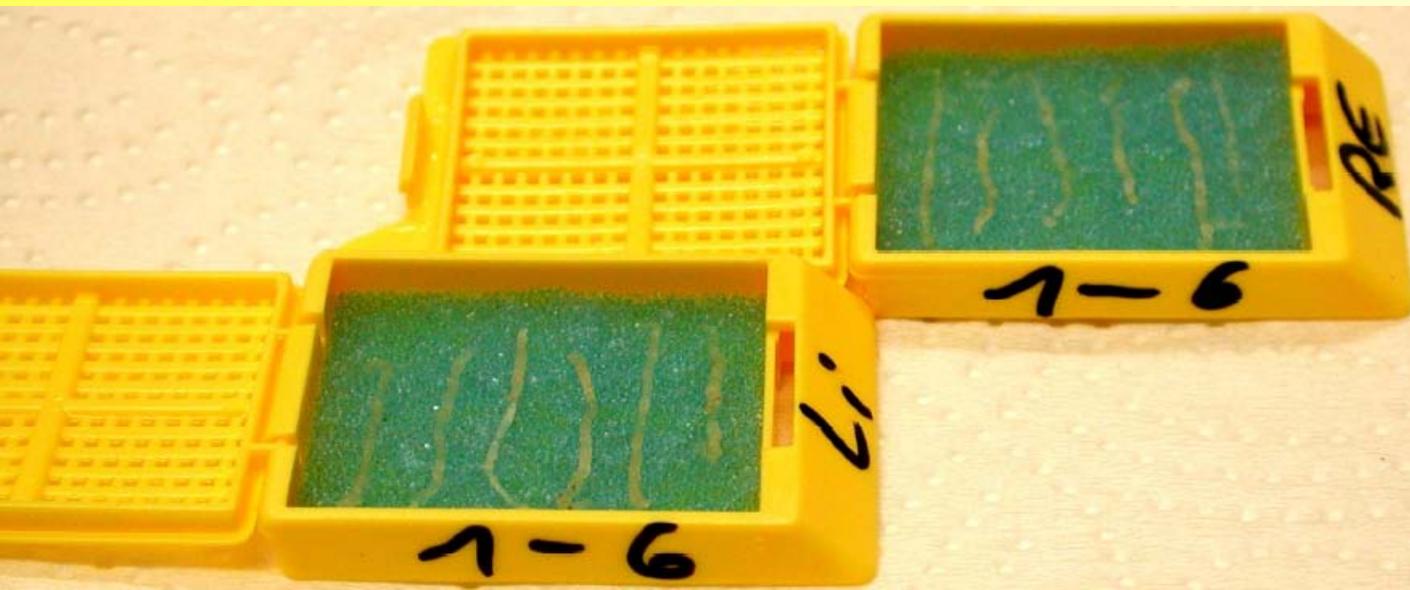
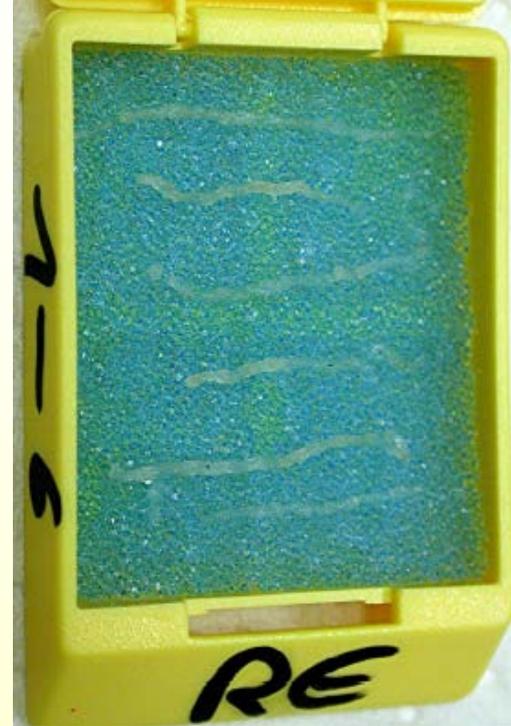




Prostata-Stanzen

Auffälliger Tastbefund, PSA Anstieg oder familiäre Anamnese





Markierung

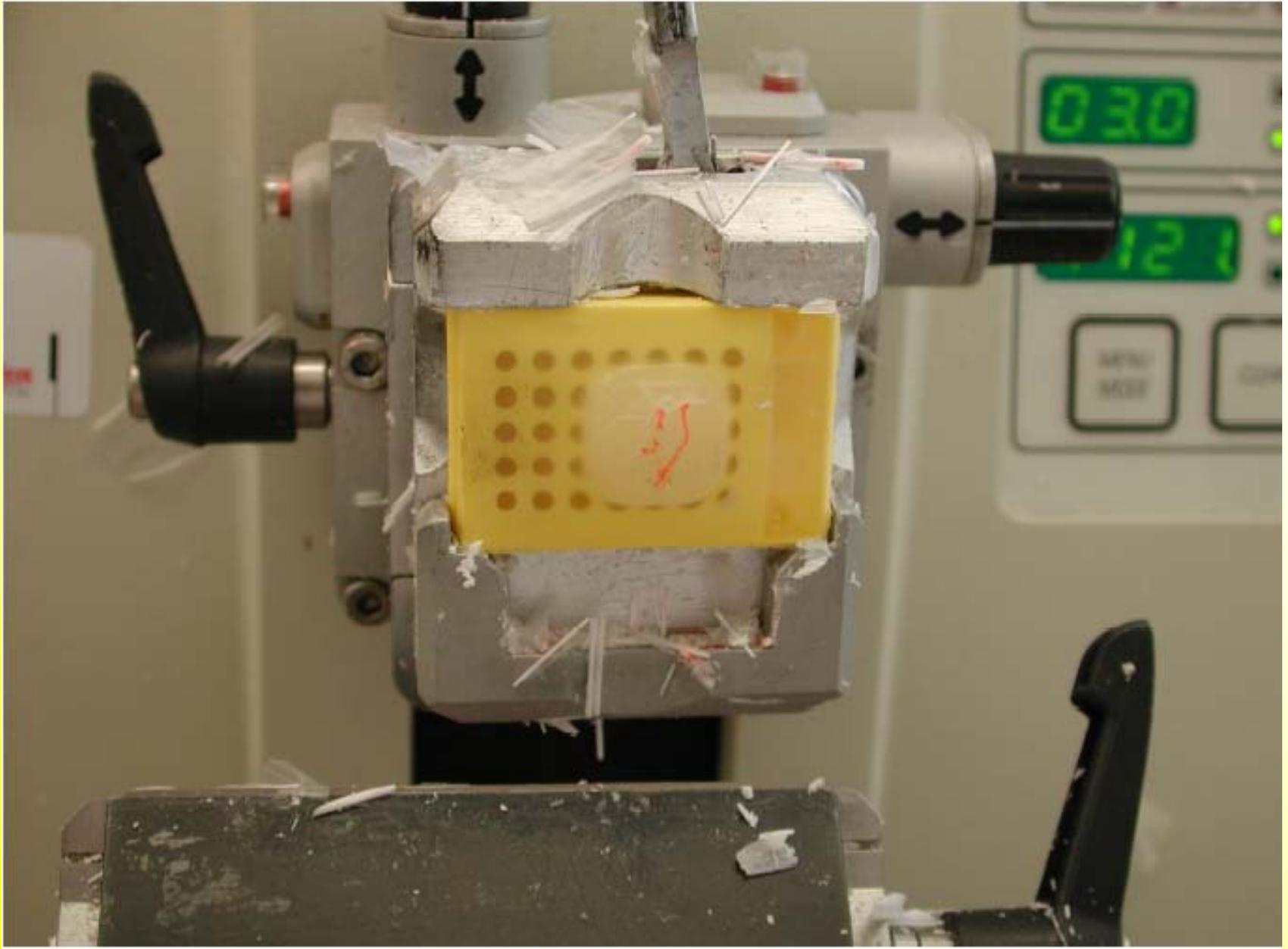
links

rechts





Mikrotom



Schneiden



Wasserbad



Auf Objektträger ziehen





Trocknen im Brutschrank

**Bereit zu
mikroskopieren**



4110/10

I₂ H



4110/10

I₂ H

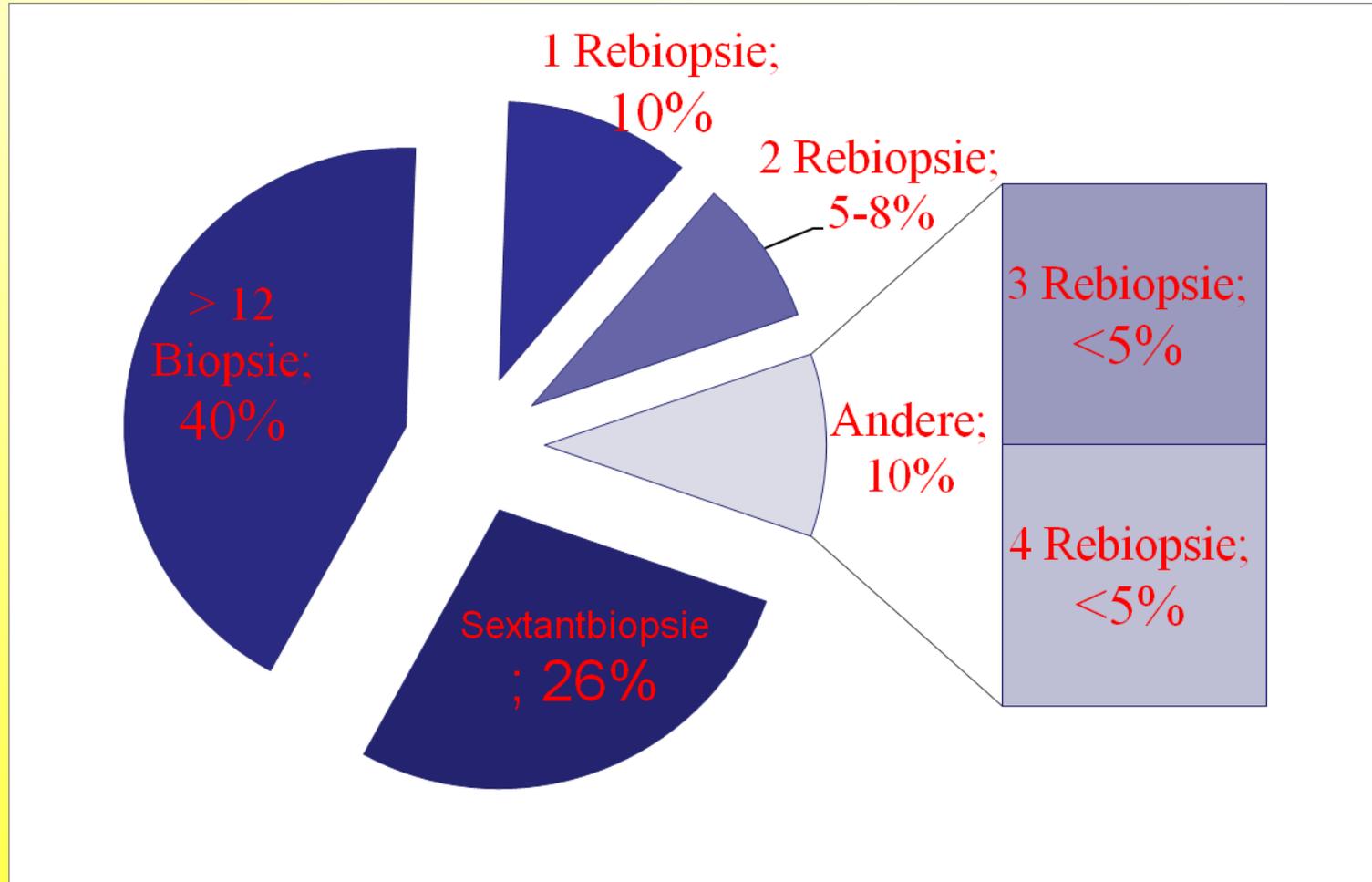


4110/10

I₂ ABP



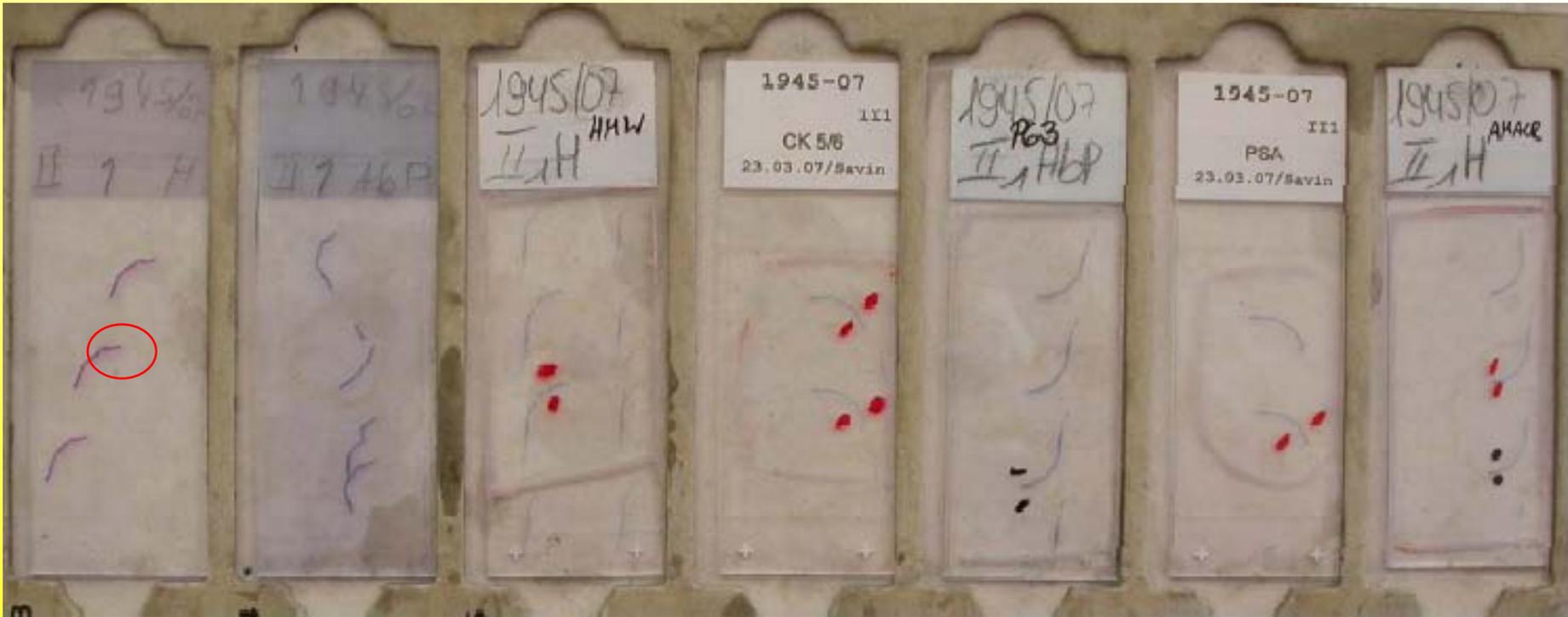
Treffsicherheit



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

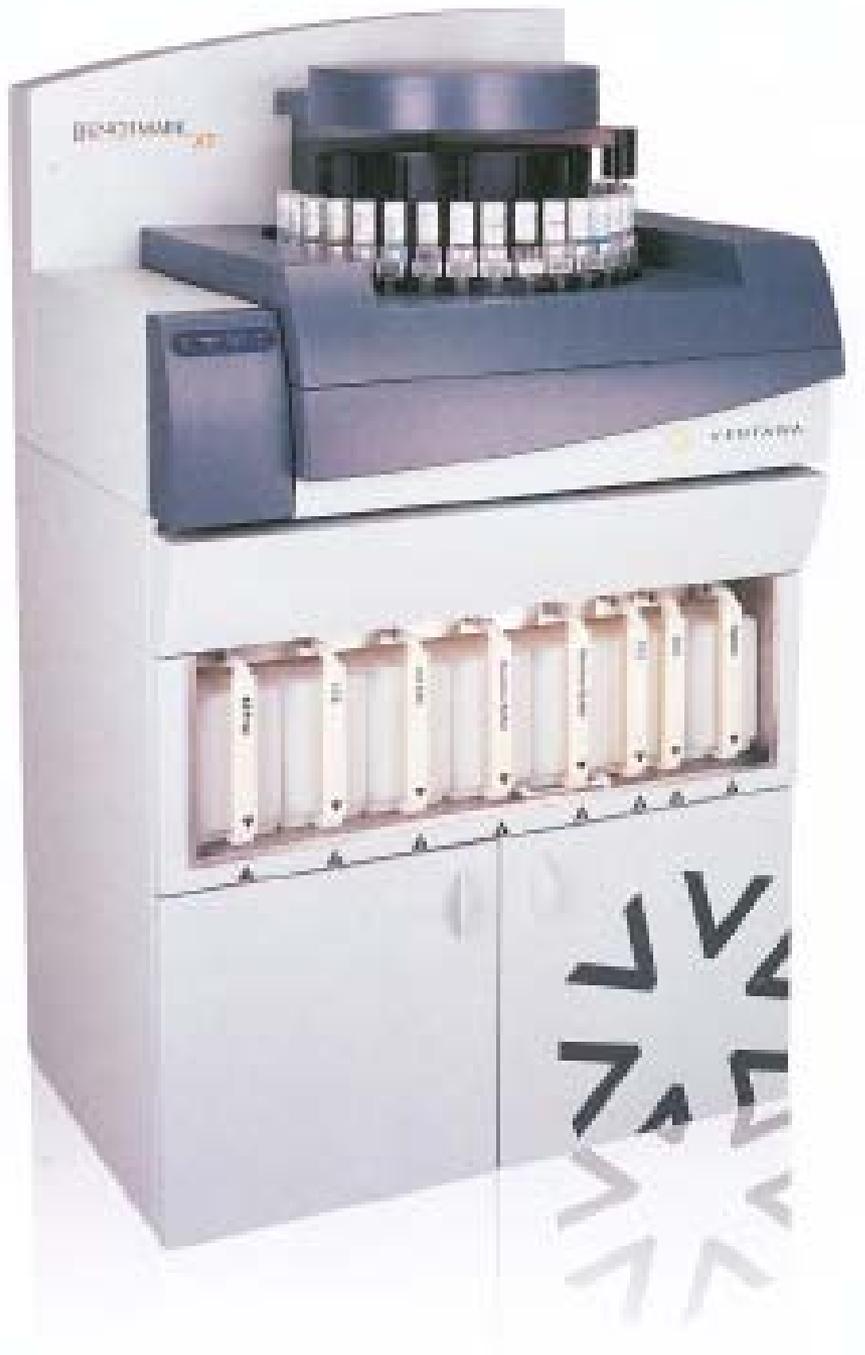
Auffälliger histomorphologischer Befund



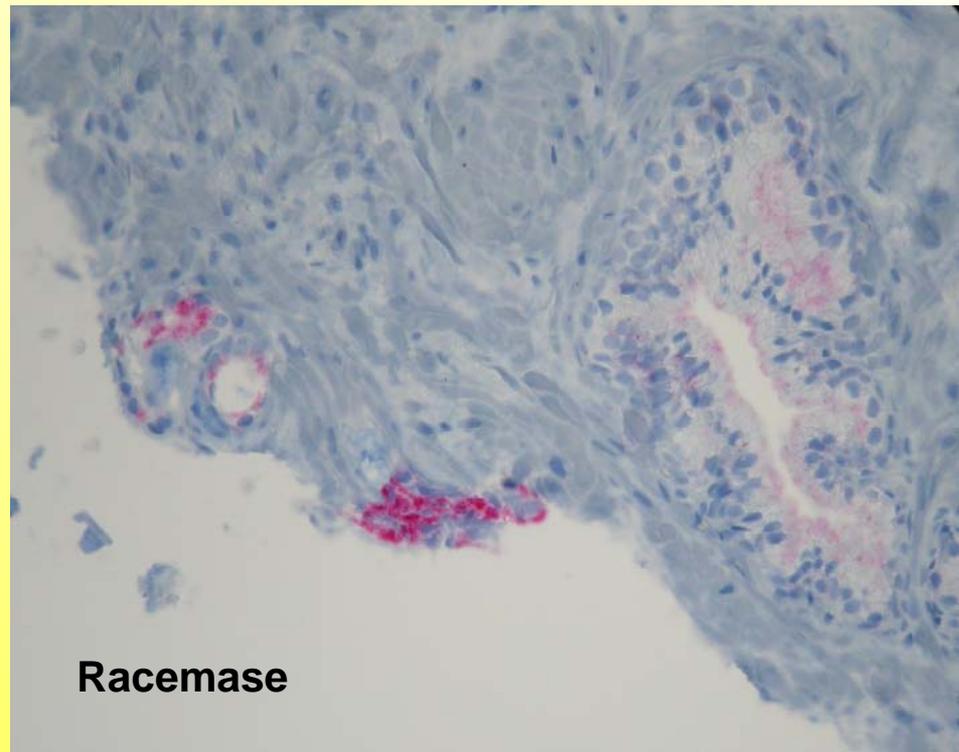
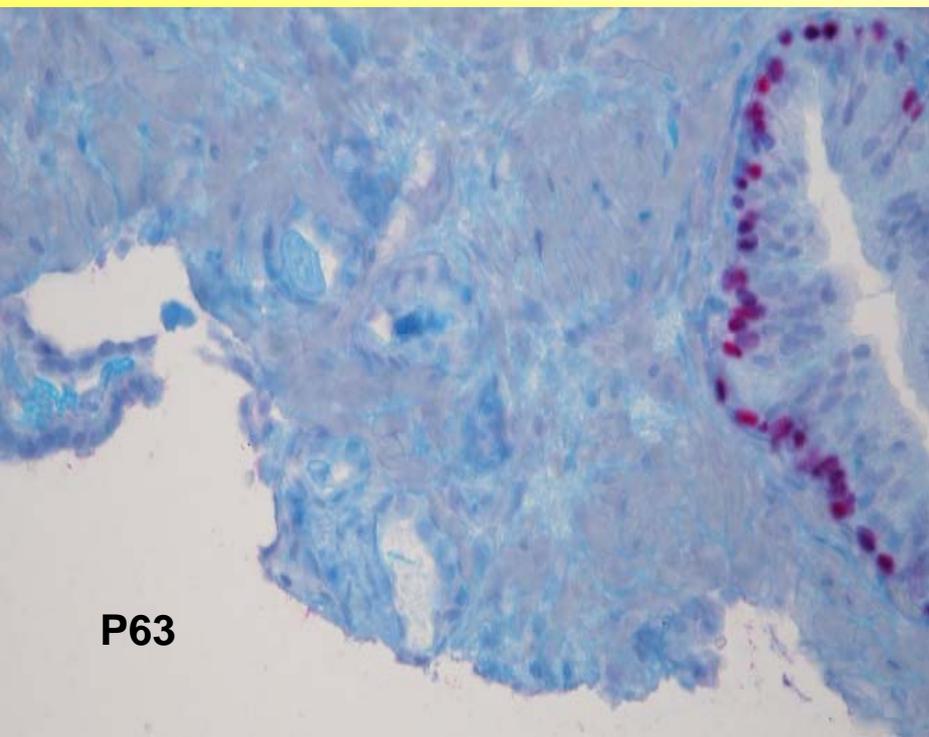
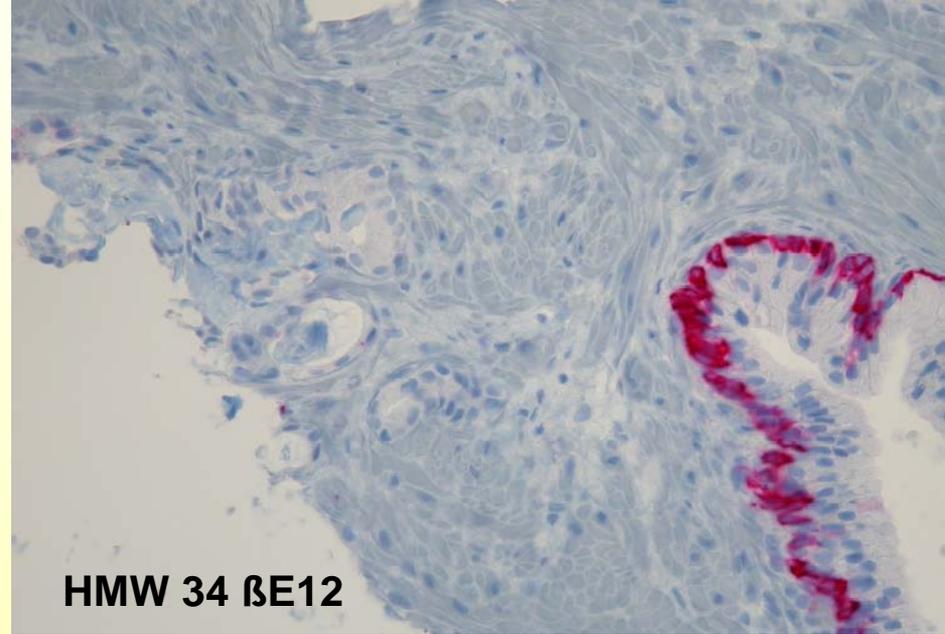
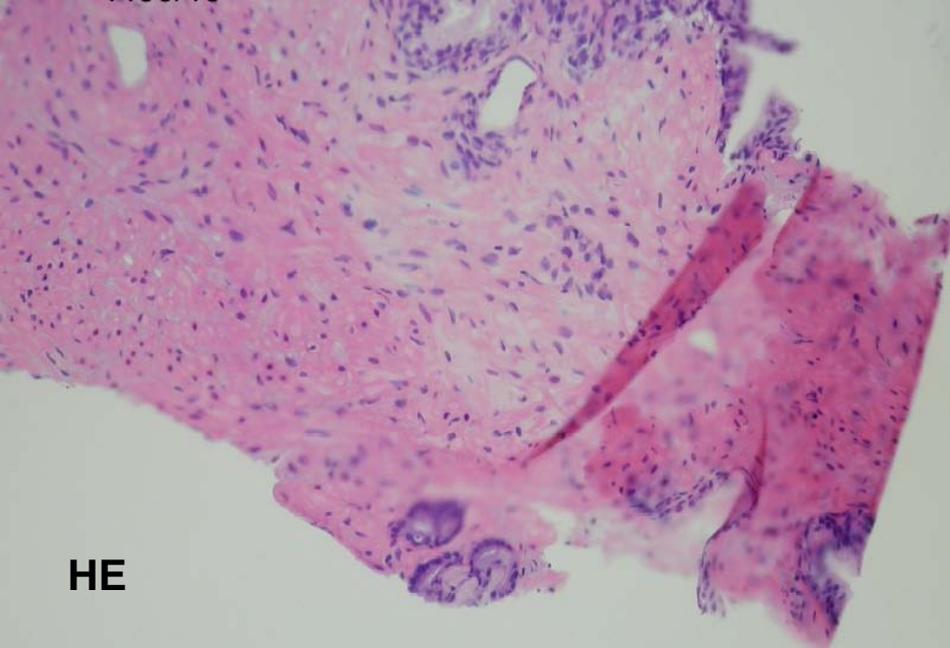
4456/10

Auffälliger histomorphologischer Befund



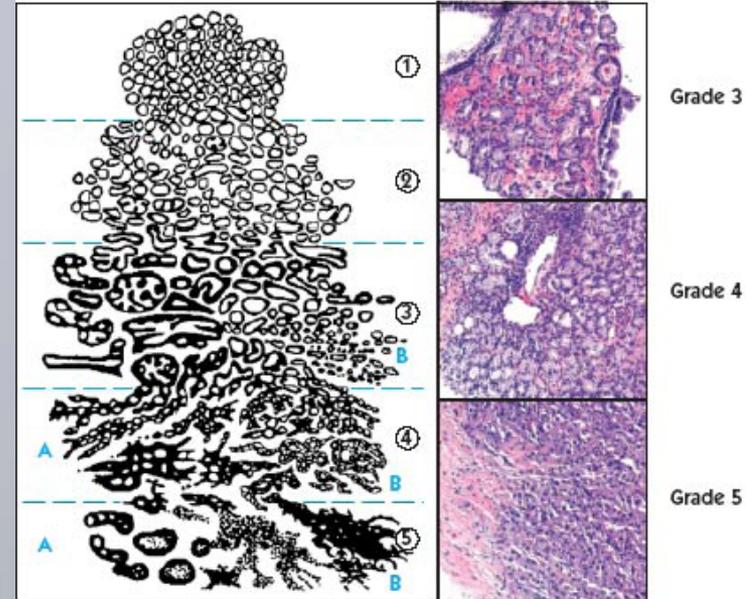


Automat für Immunhistochemie





Dr. Donald Gleason

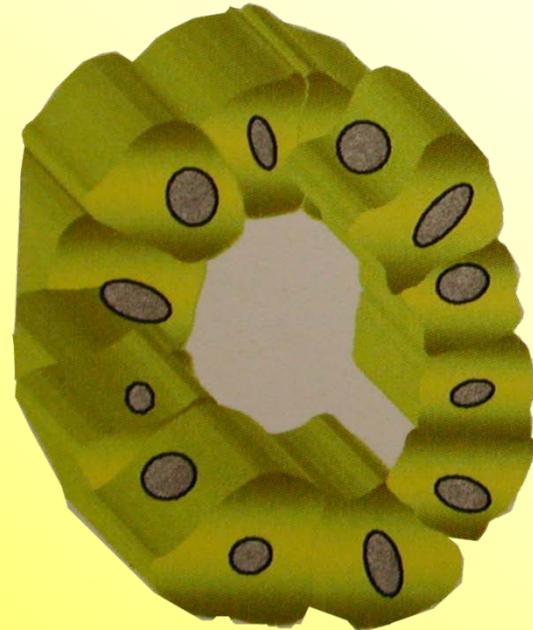
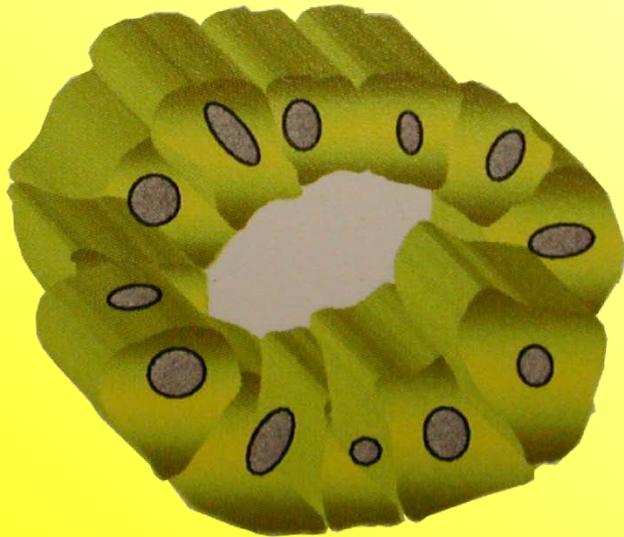
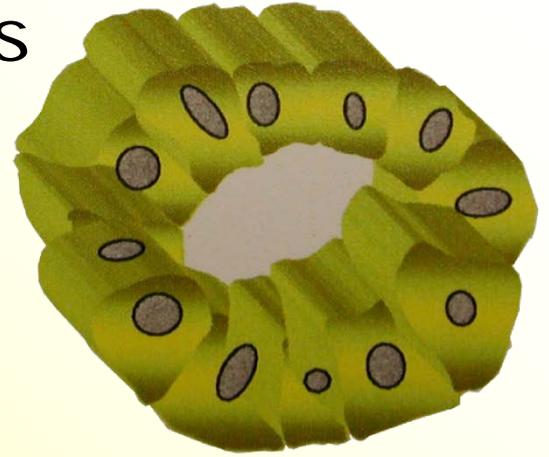
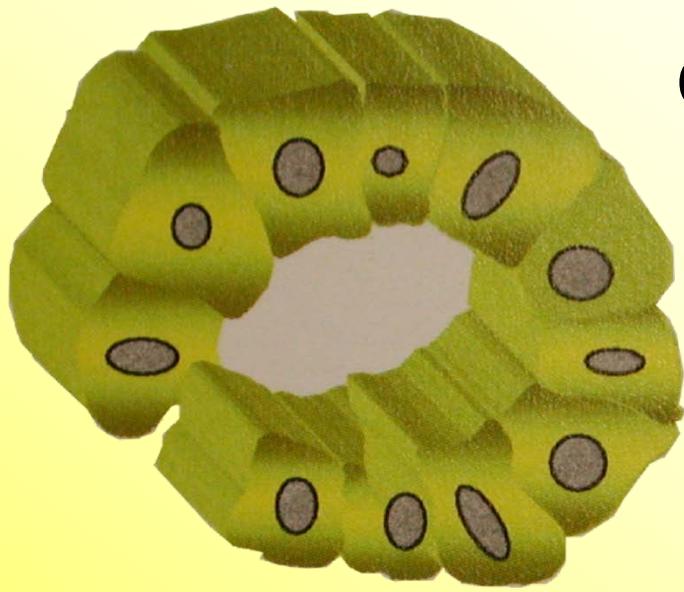


1. Die histologische Bearbeitung

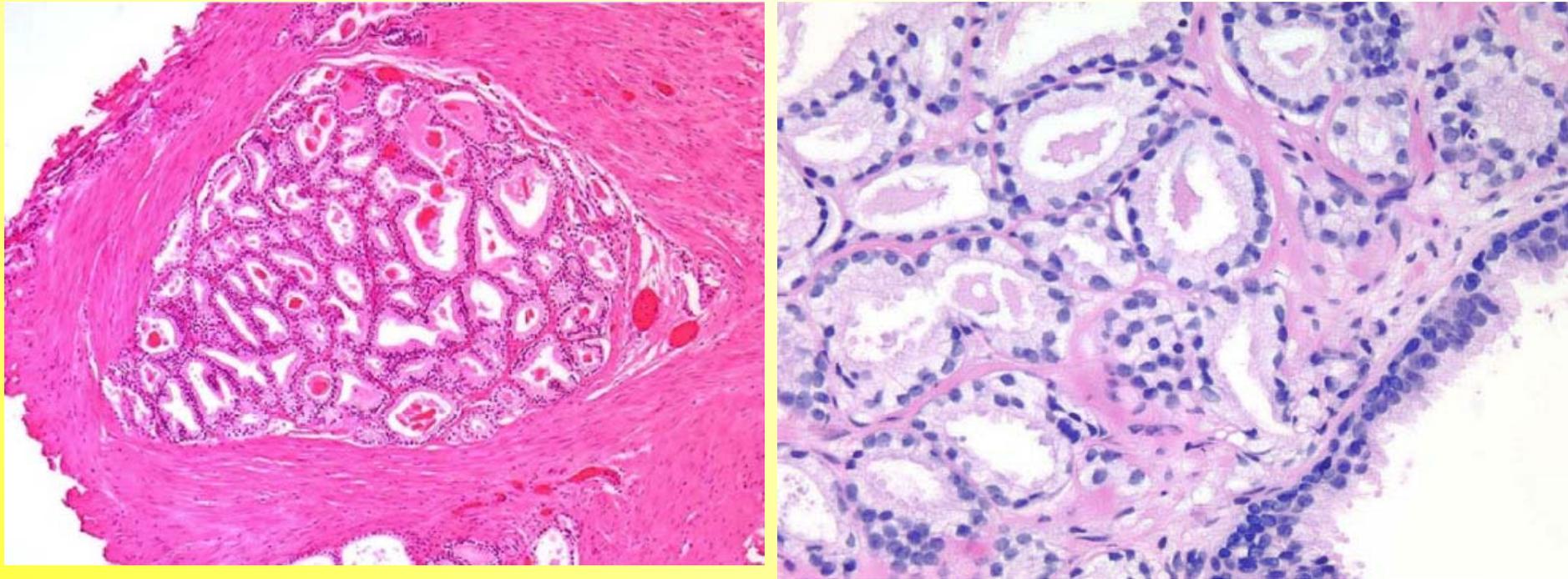
2. Gleason Score (modifiziert in 2005)

3. DNA Zytometrie

Gleason eins



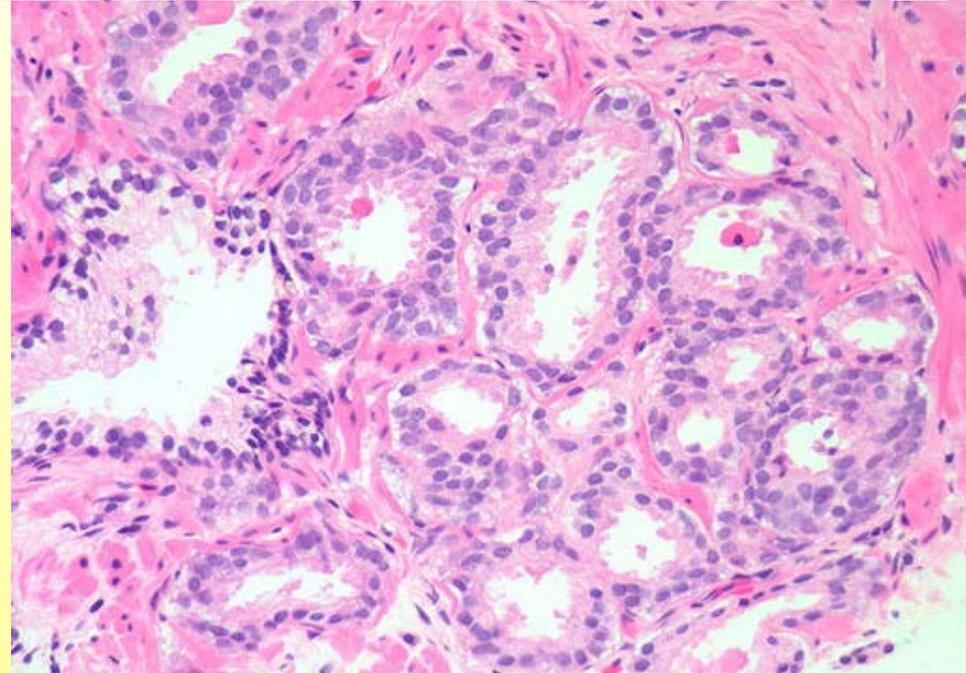
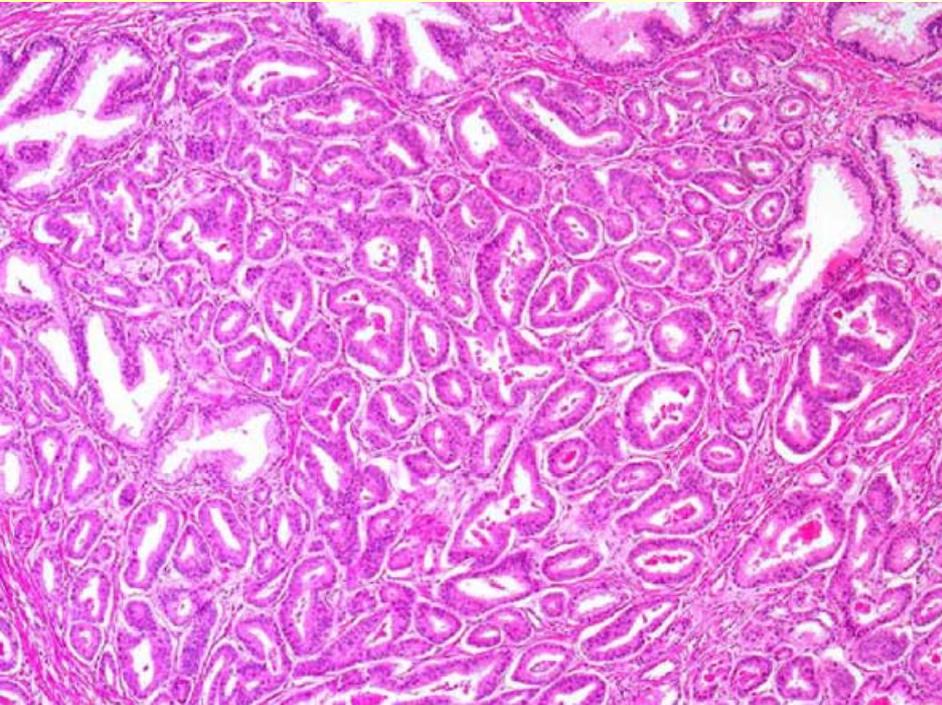
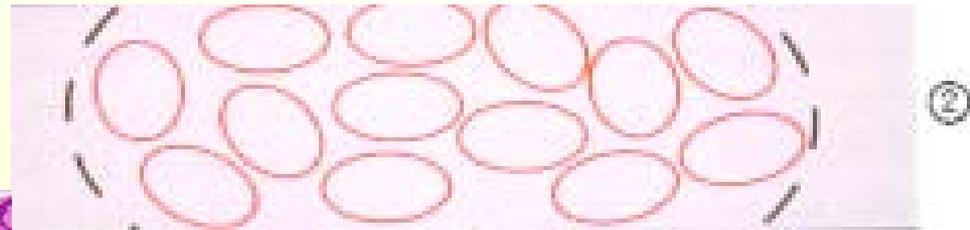
Gleason eins plus eins



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

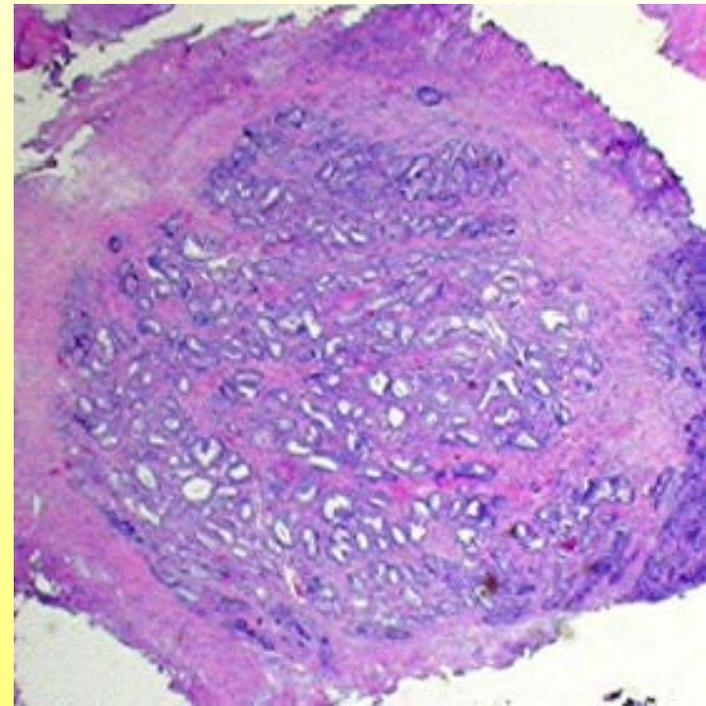


Gleason 2: **unscharf** begrenzter Knoten

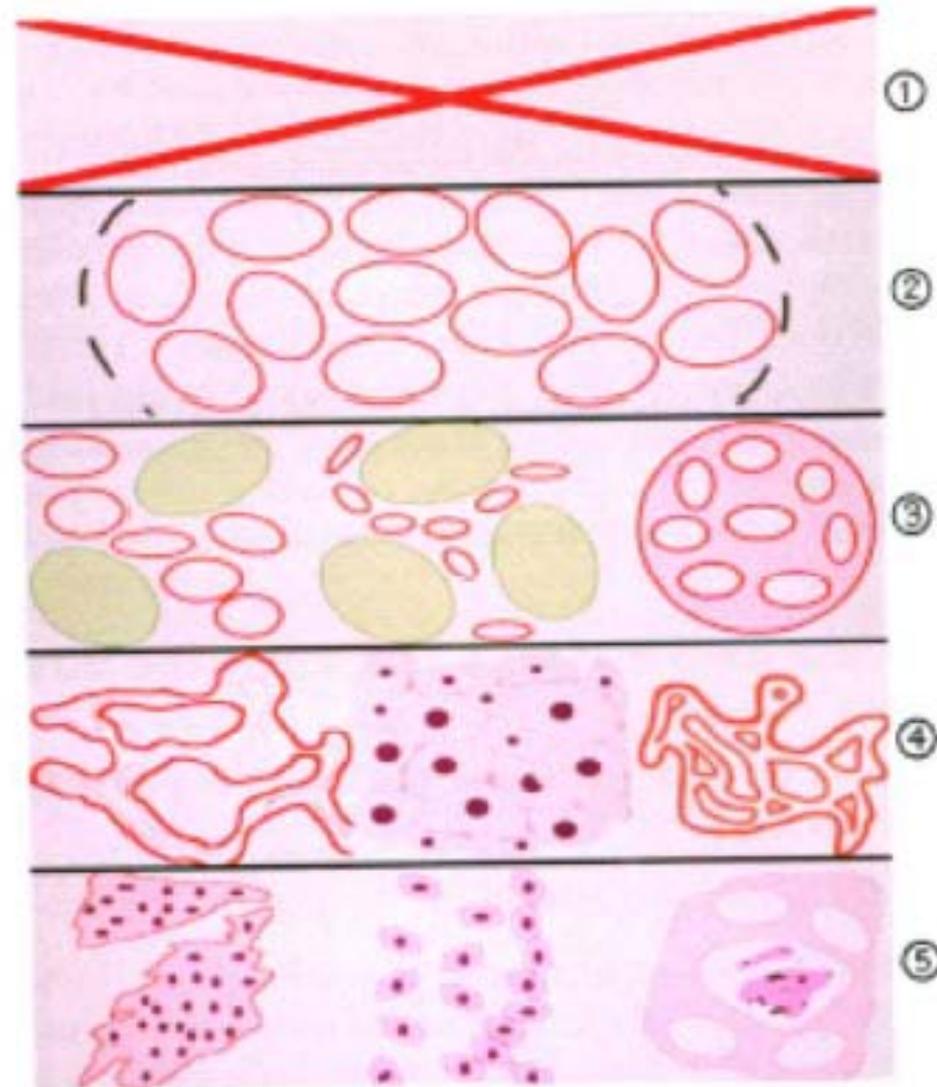
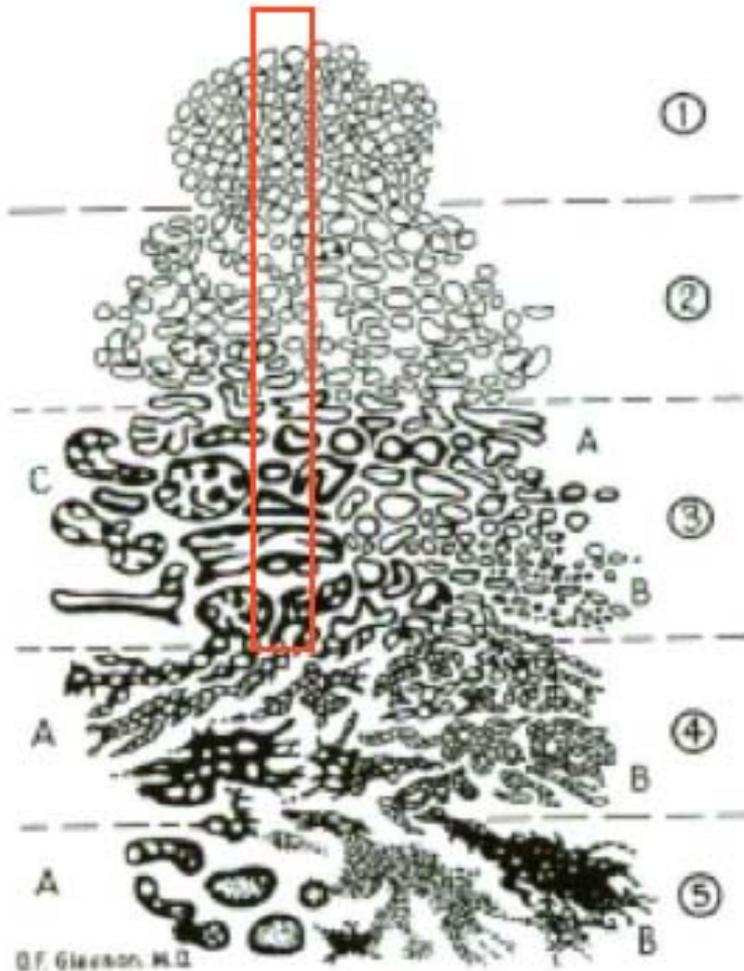
Gleason 2: Ähnlich Muster 1, noch weitgehend umschriebene, z. T. **nicht ganz scharf begrenzte Tumorknoten** mit minimaler **Stromainfiltration**. Die Drüsen sind jedoch lockerer arangiert und nicht mehr so uniform wie in Muster 1..

Gleason eins und zwei

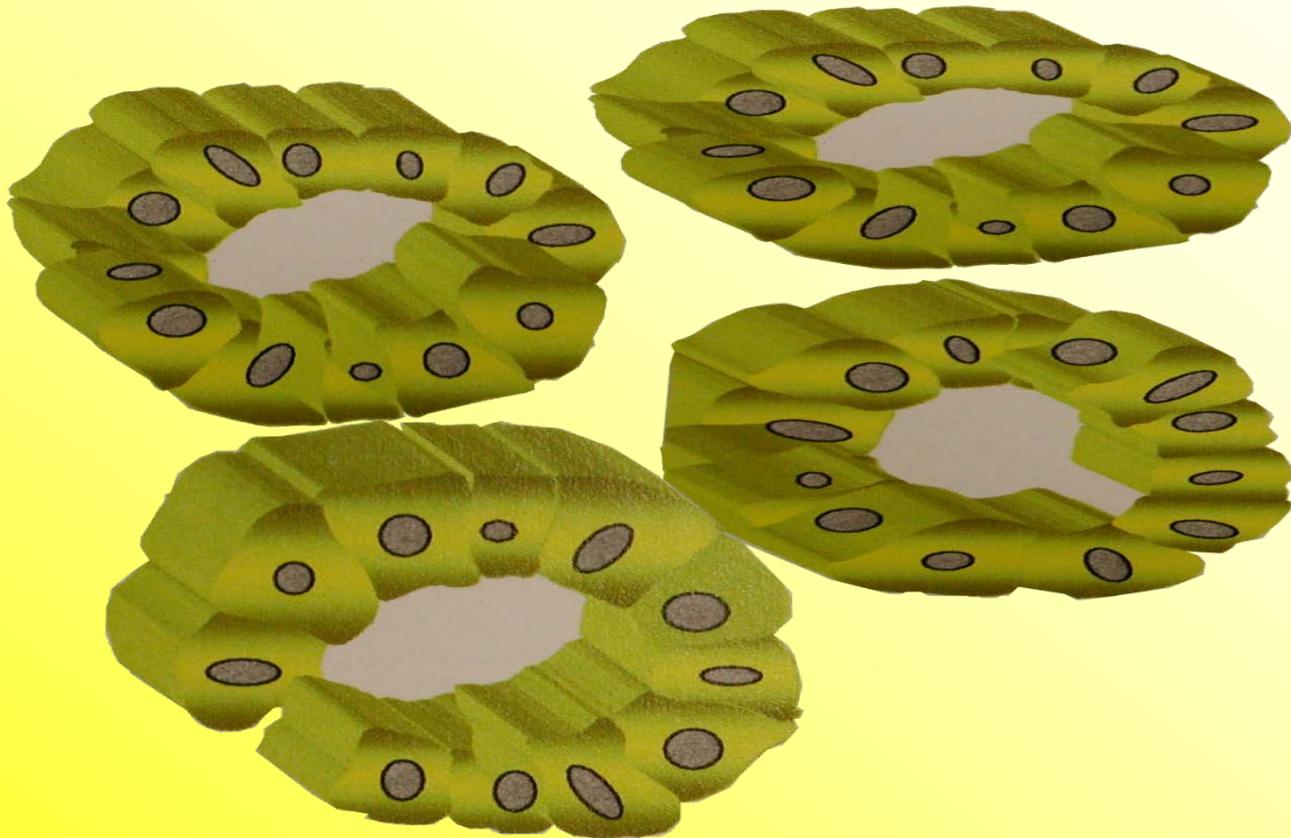
Diese finden sich nur in **anterozentralen** sog. **inzidentellen** Karzinomen nach Transurethralem Resektat Der Prostata (TURP).



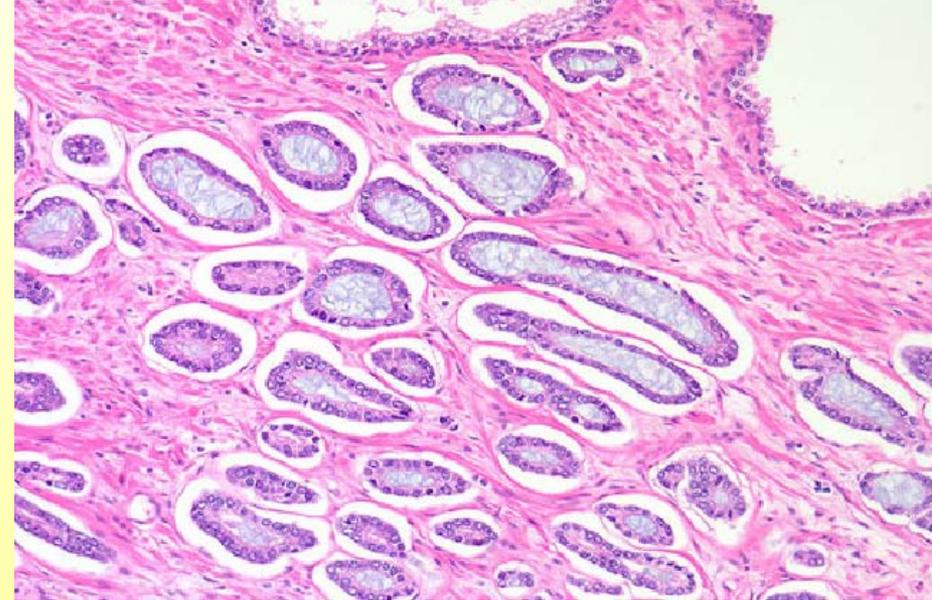
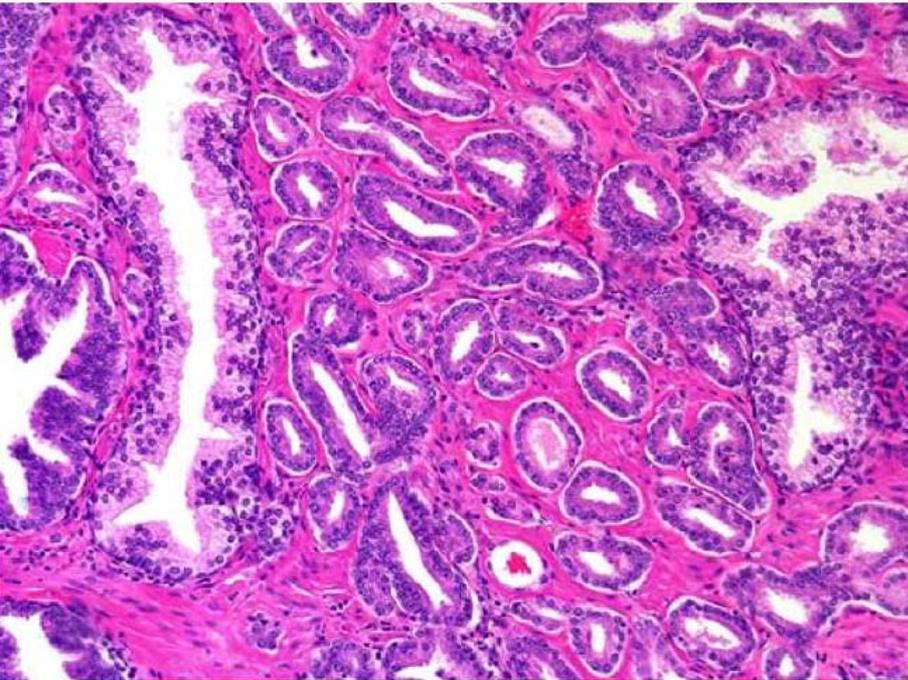
In den Karzinomen aus der **Prostataperipherie** sind **keine Muster 1 und 2 bzw. Scores 2–4 messbar.**



Gleason drei



Gleason 3:

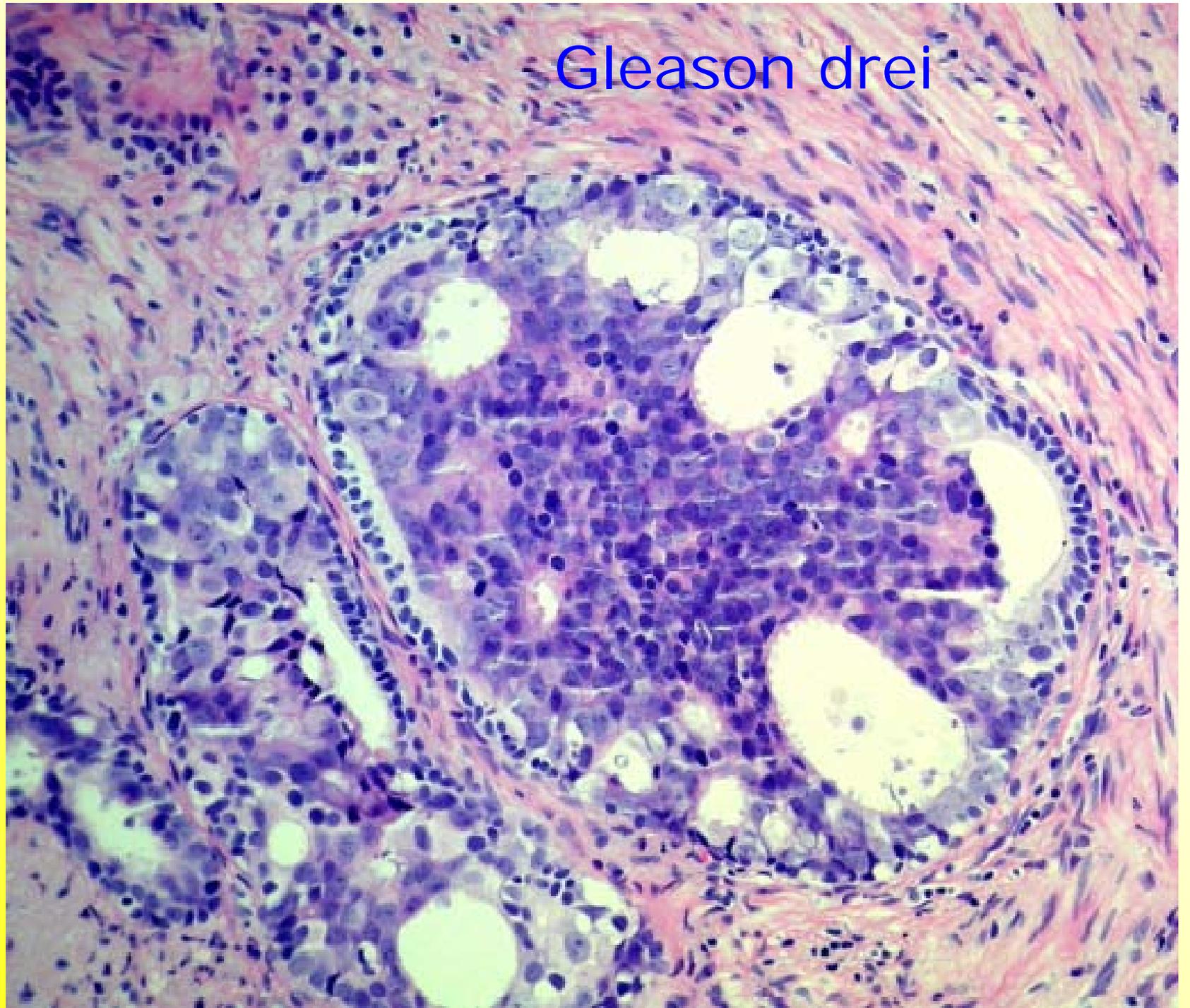


Infiltration **zwischen** vorbestehenden Drüsen!

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

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

Gleason drei



Gleason 3, 4?



Gleason 3

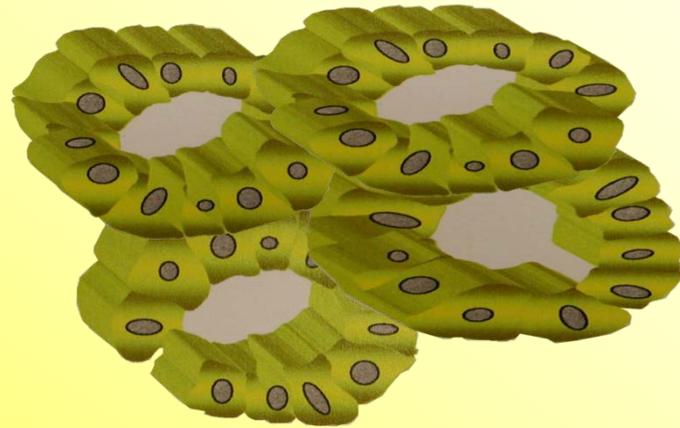
Haustier

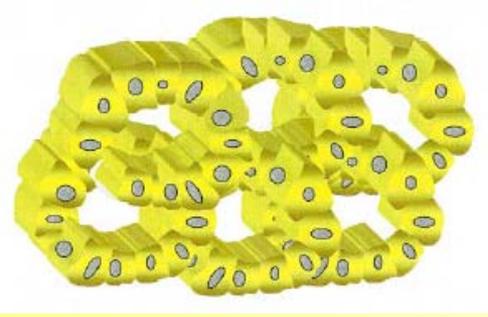


Gleason 4

Raubtier

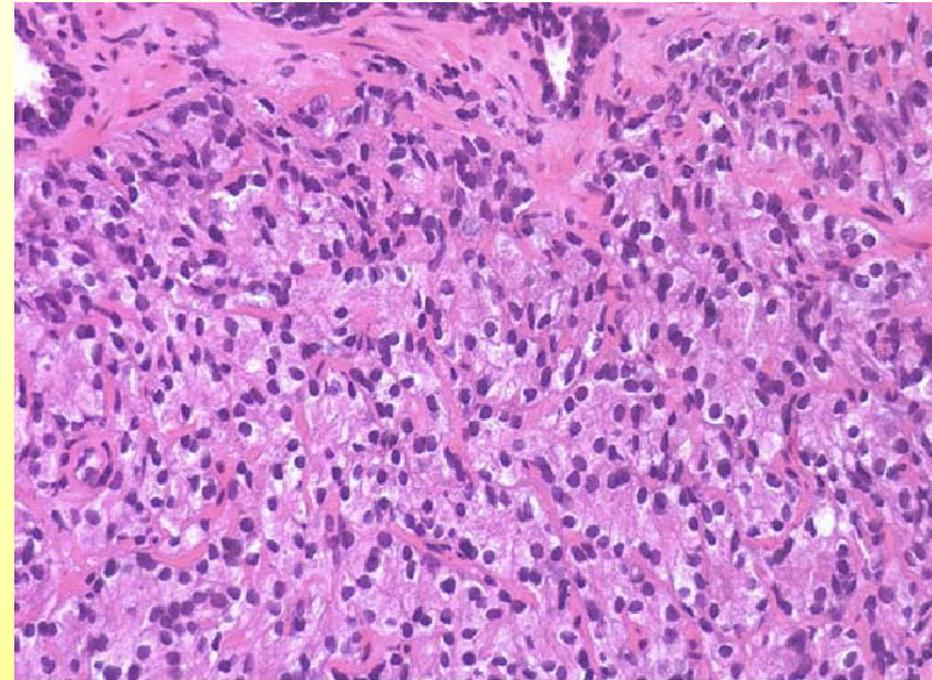
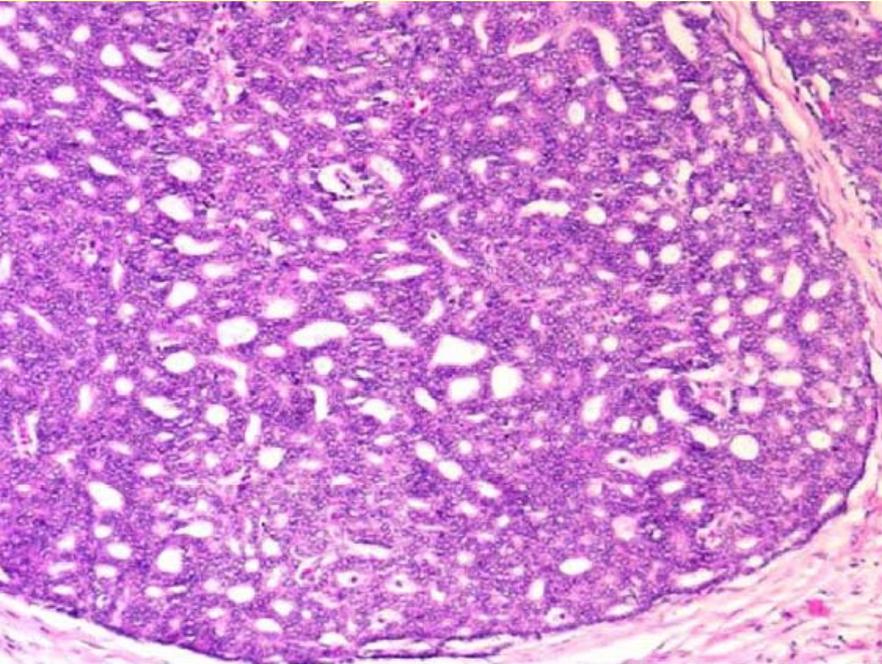
Gleason vier





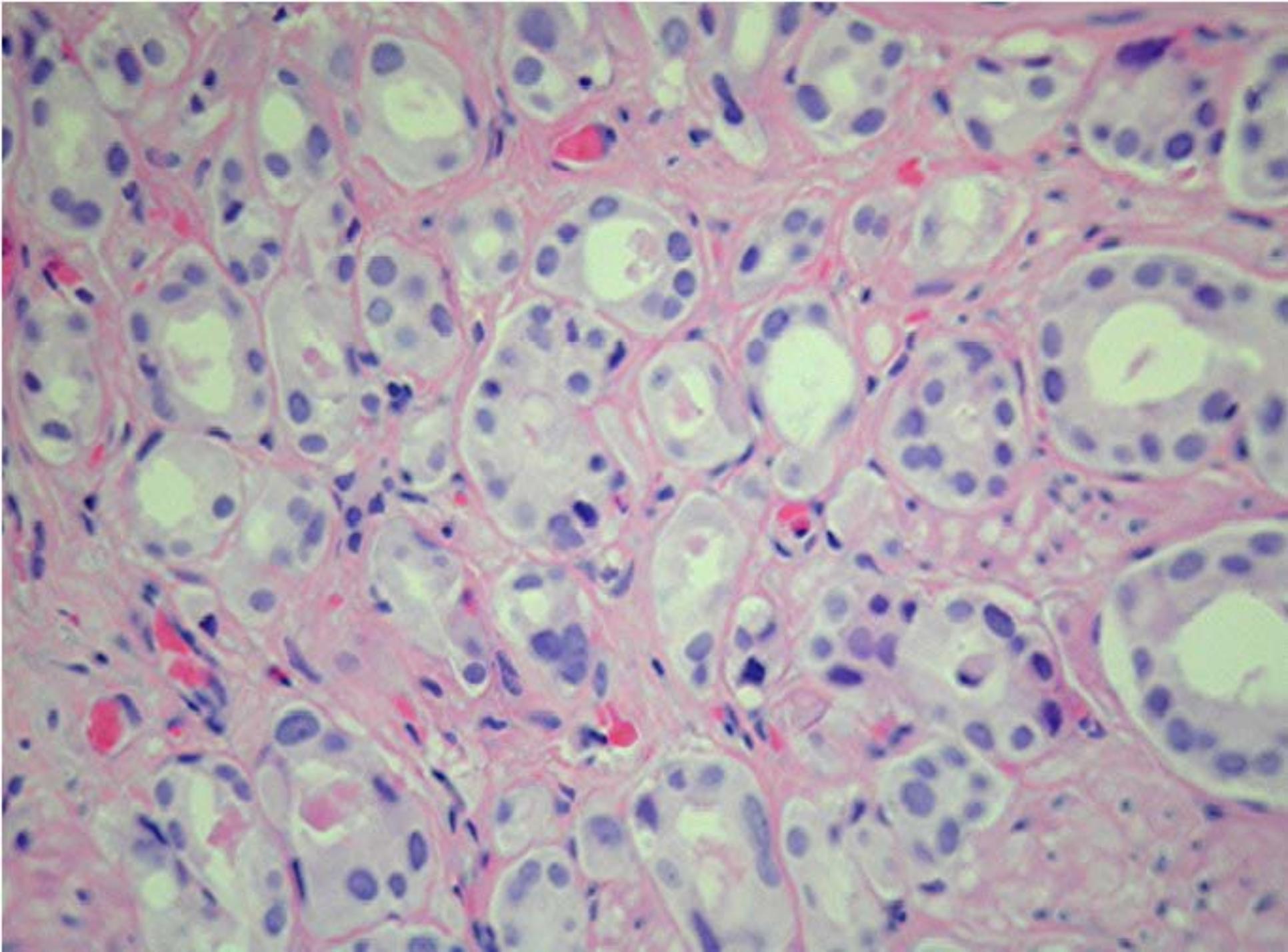
Gleason vier

Kribriformer Typ

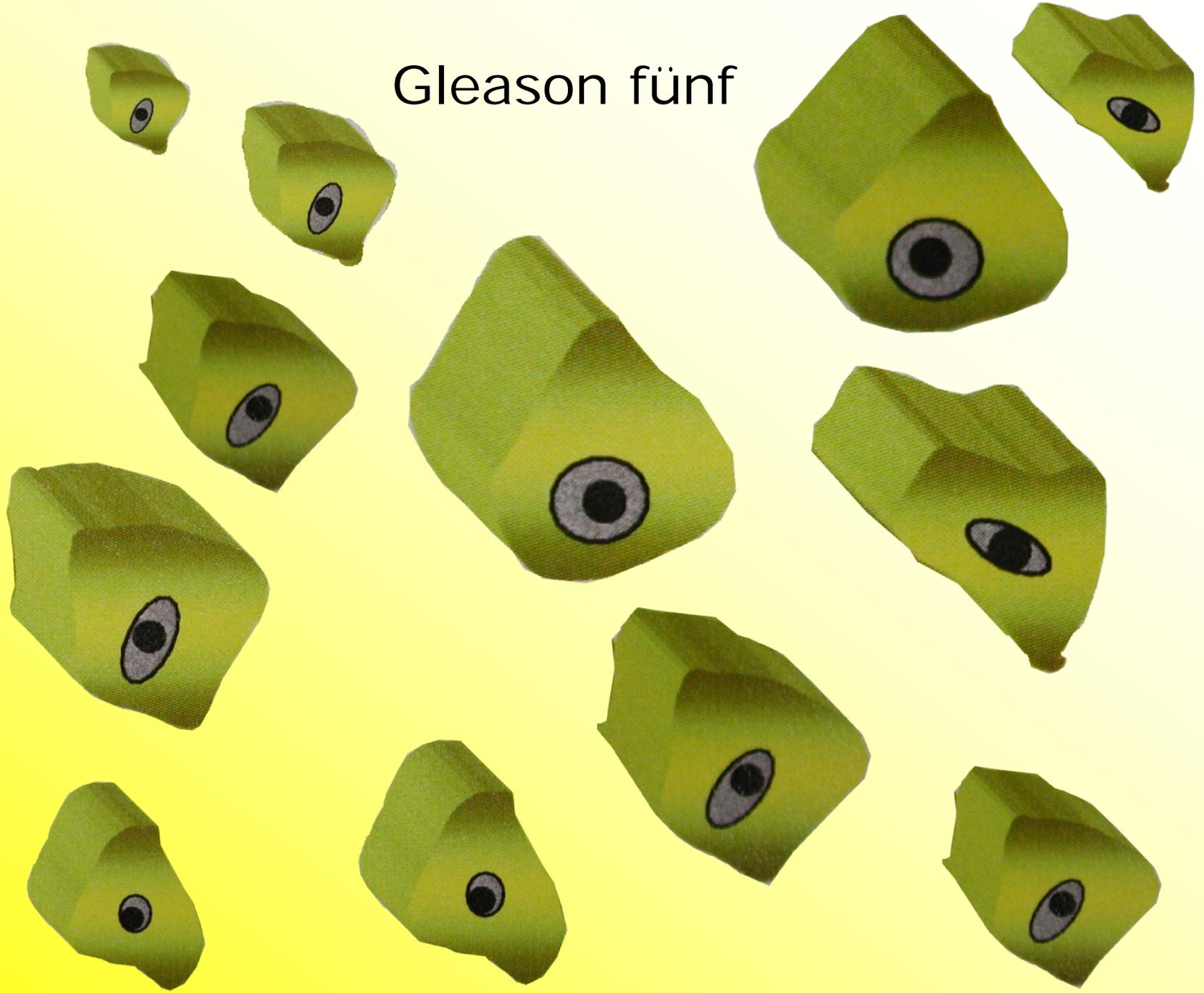


Gleason 4: Fusionierte mikroazinäre Drüsen, wenig differenzierte Drüsen mit schwach ausgebildeten Drüsenlichtungen.

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

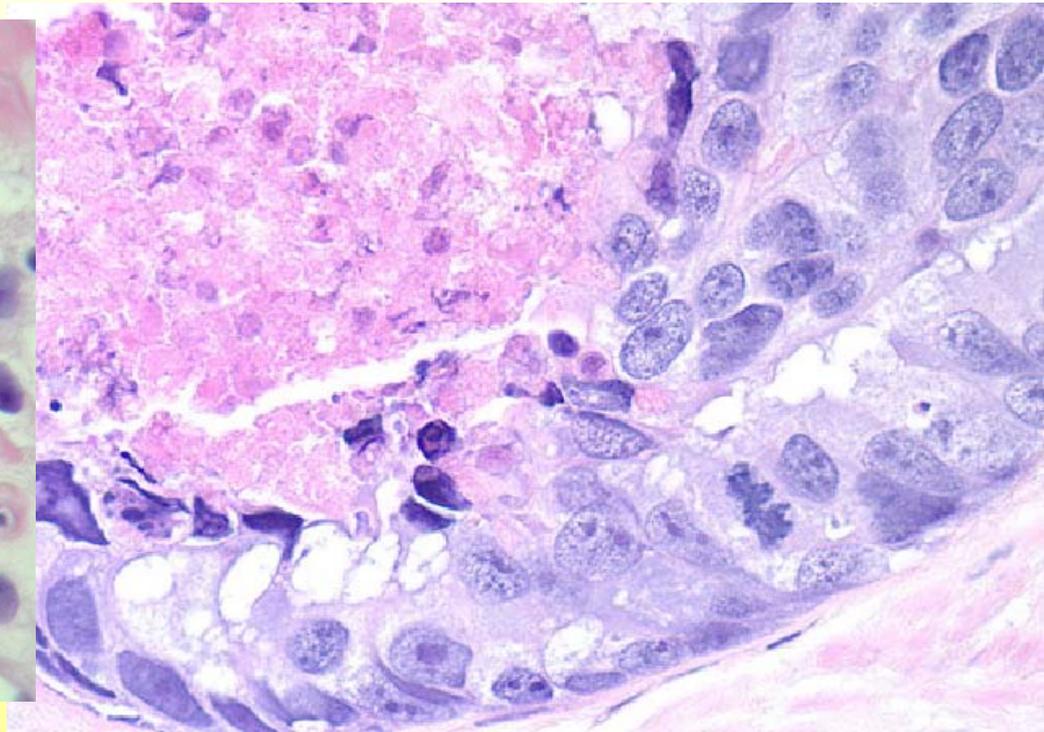
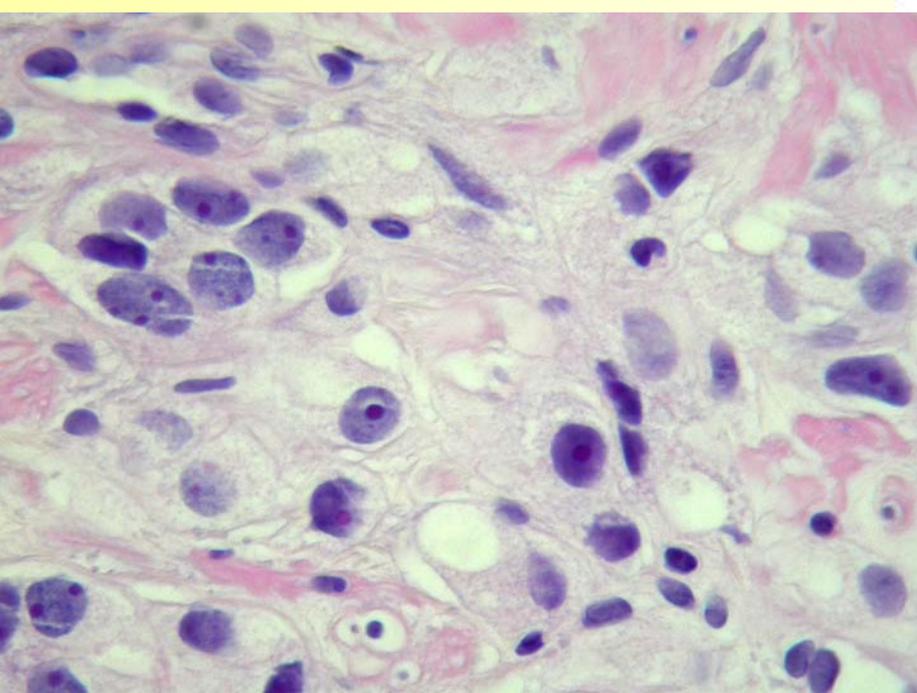


Gleason fünf



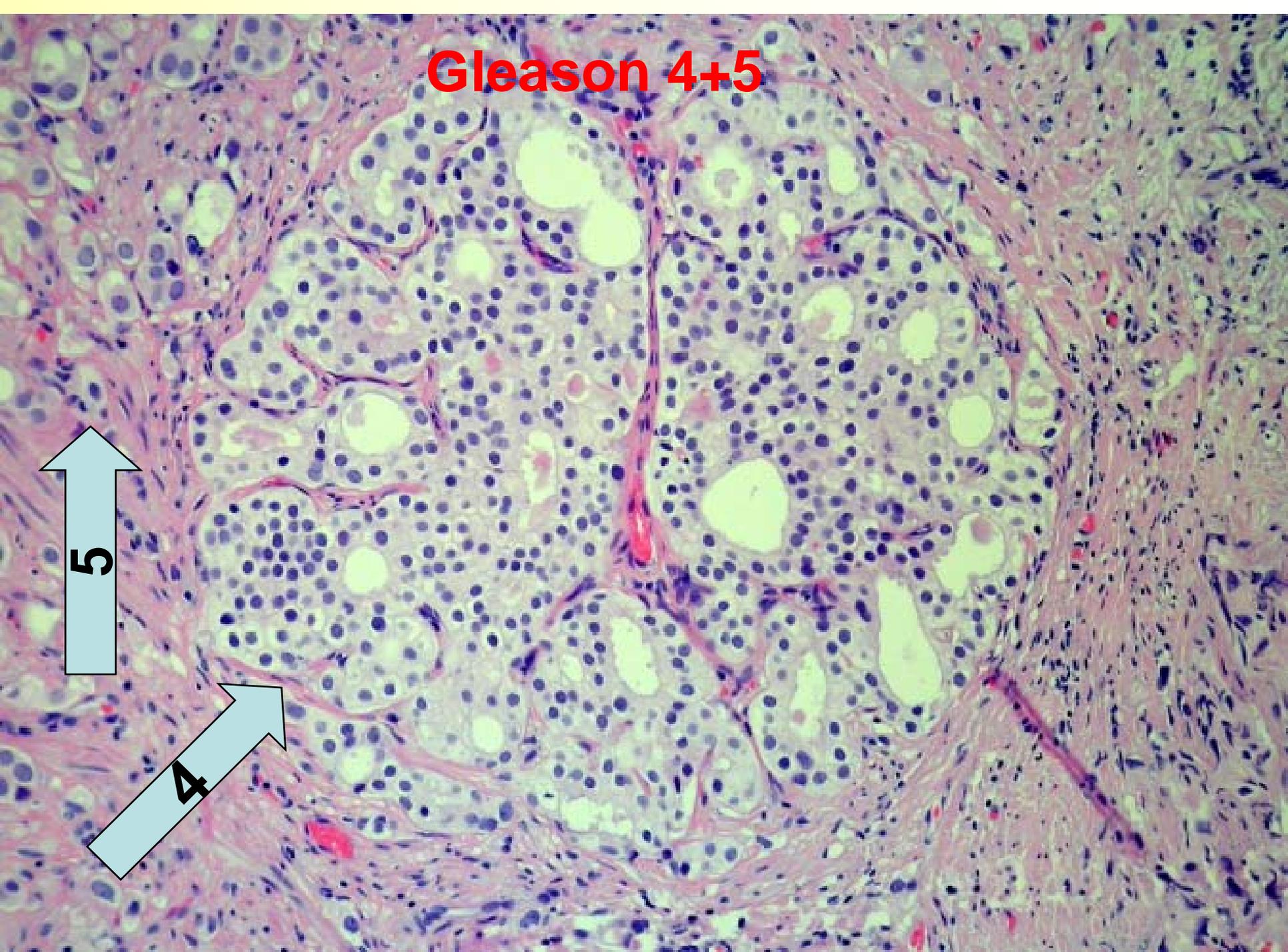
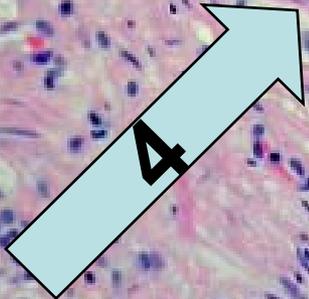
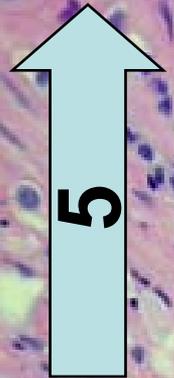
Gleason fünf

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**

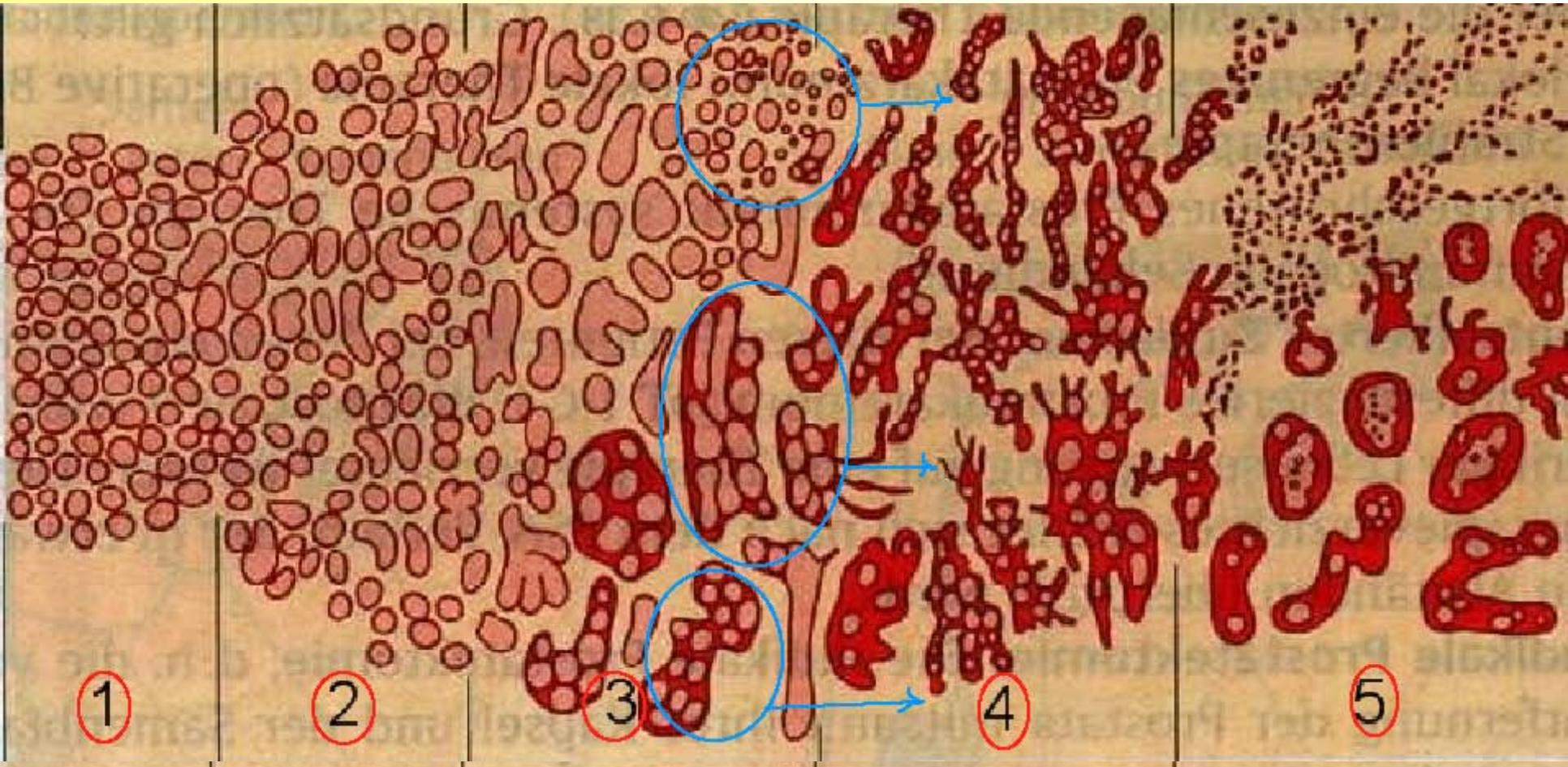
Im Gegensatz zum originalen Grading hat das modifizierte Gleason - Grading nach einer englischen Analyse eine **Interobserver - Übereinstimmung** für den Konsensuscore an Biopsien von **78%**

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.**

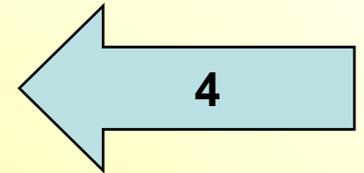
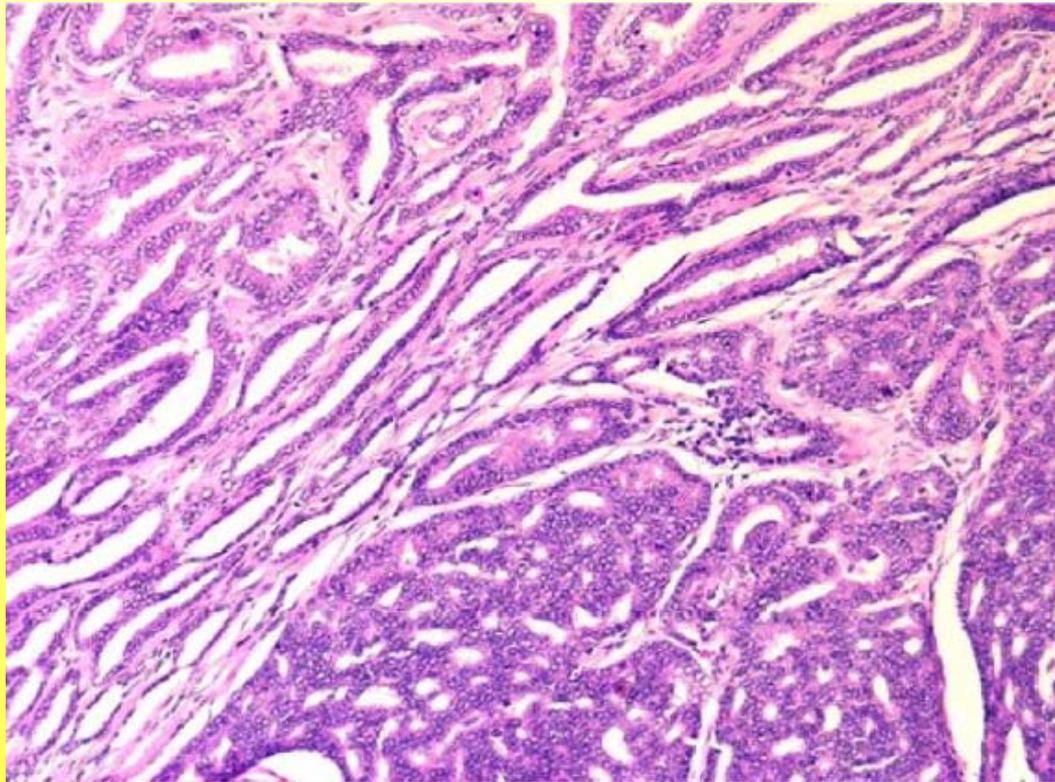
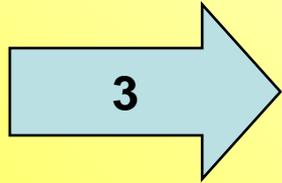
Gleason Grading

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



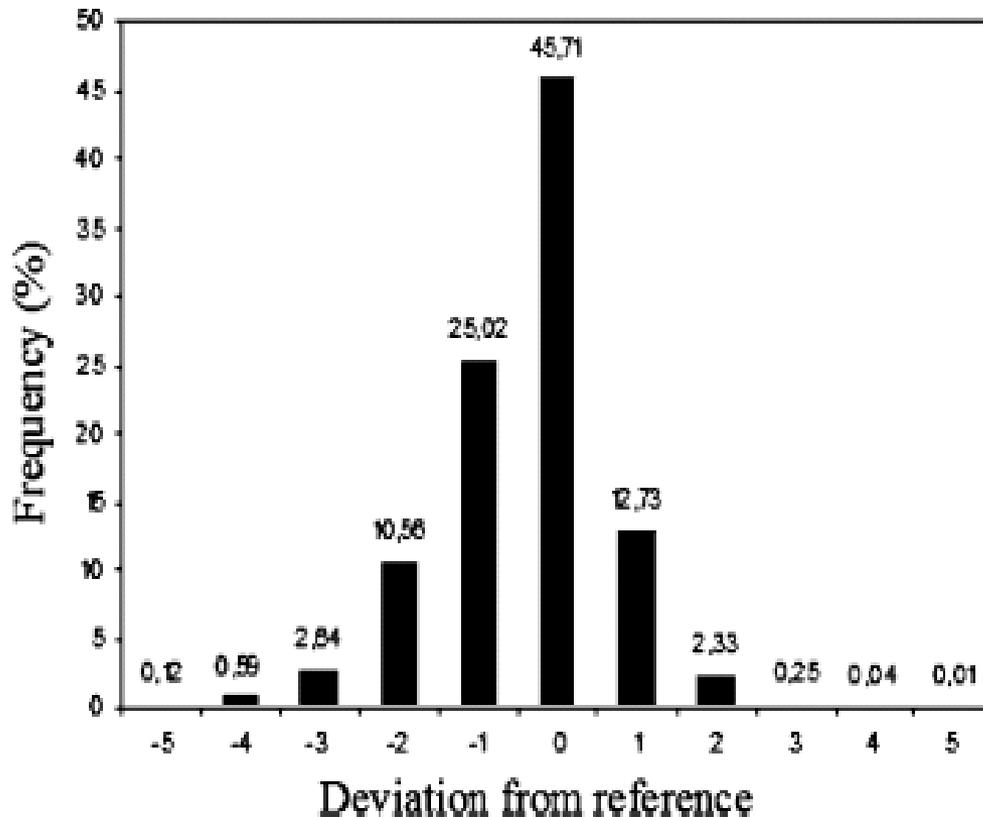
oder Gleason 4 (> 50%) + Gleason 3 (<50%) = Gleason 7 b



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.

**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

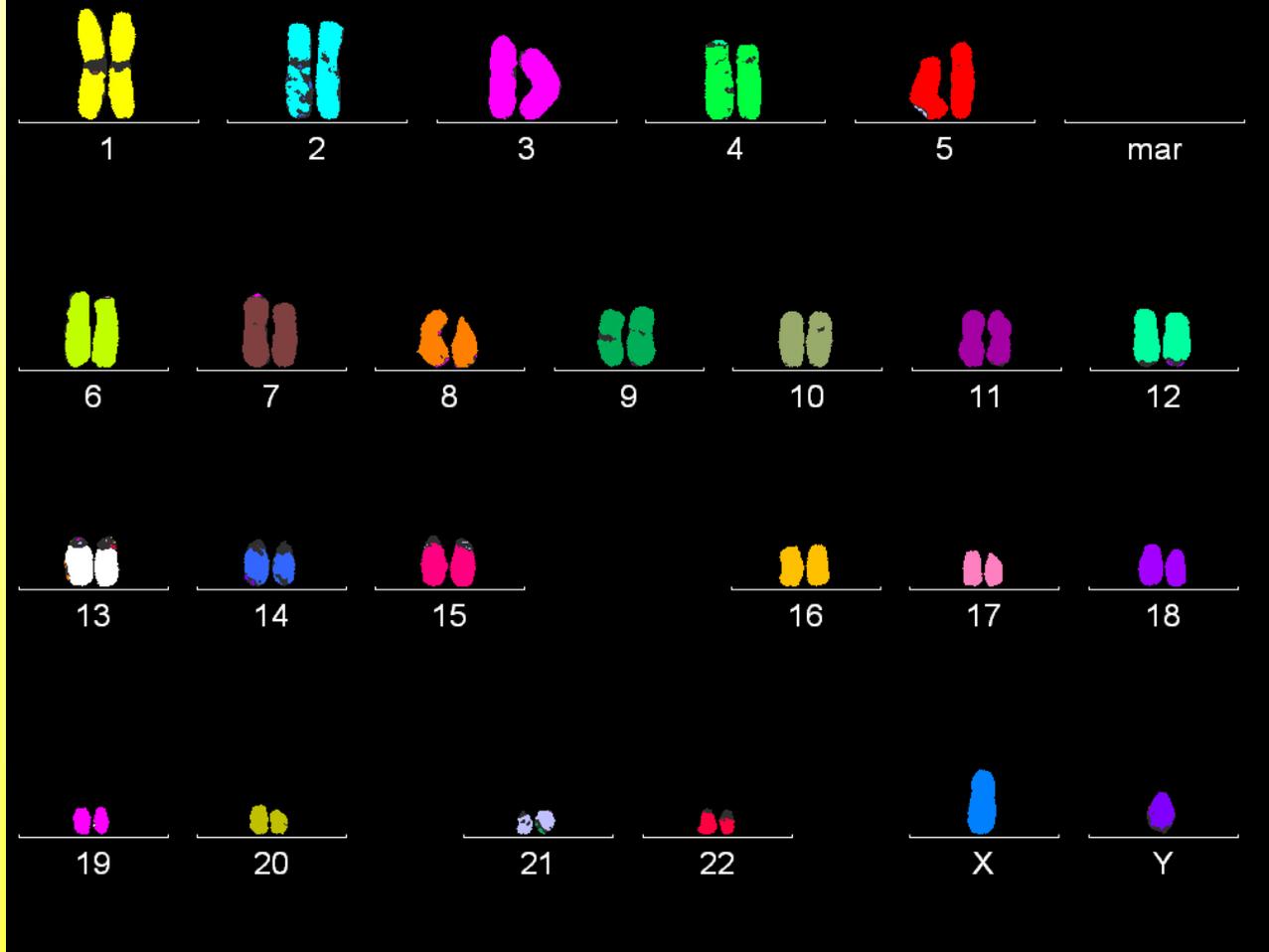
Analyse genetischer Strukturen

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

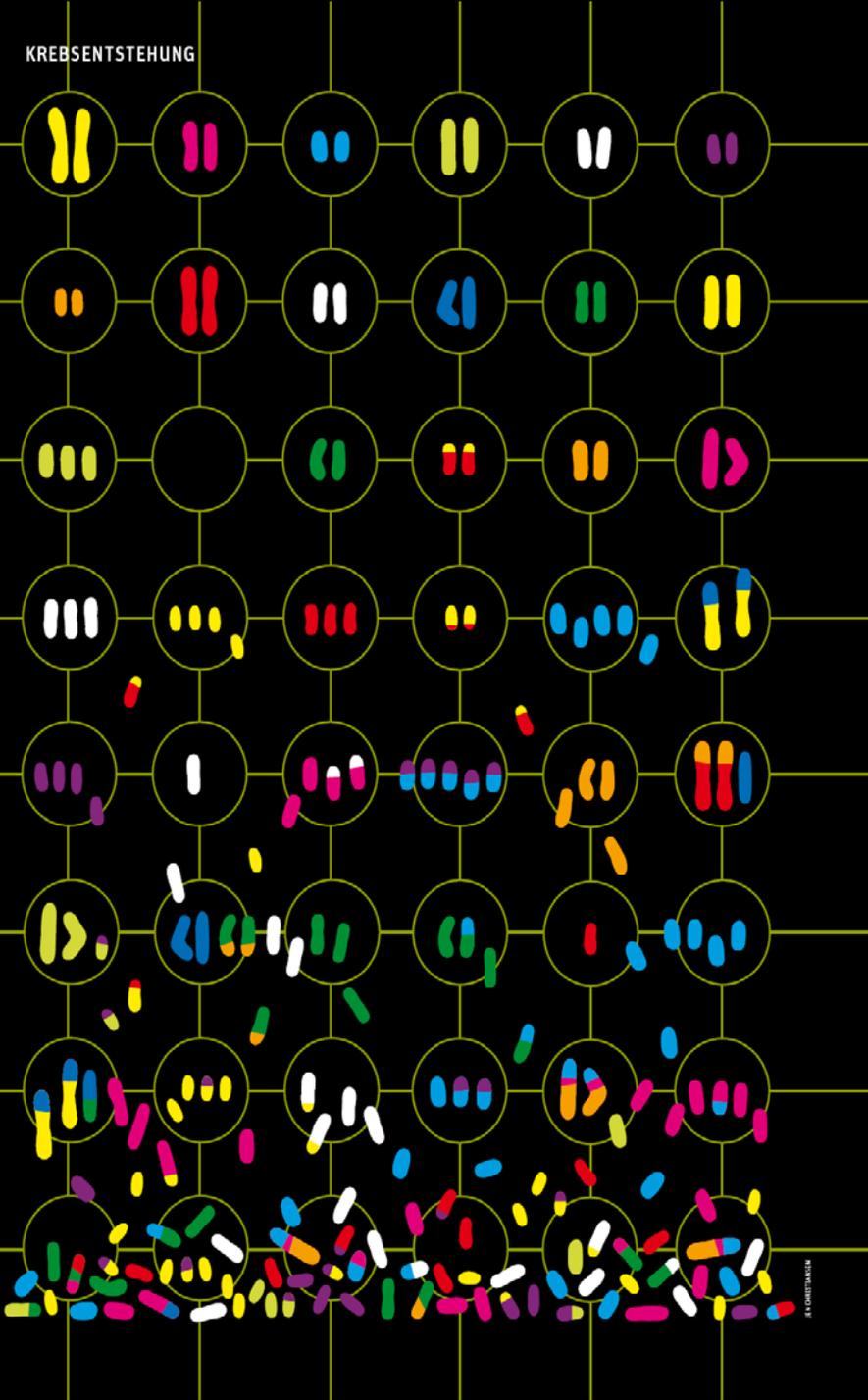


Densitometrische
Bestimmung der
integrierten
optischen Dichte
der Zellkerne

Chromosomensatz einer normalen Zelle



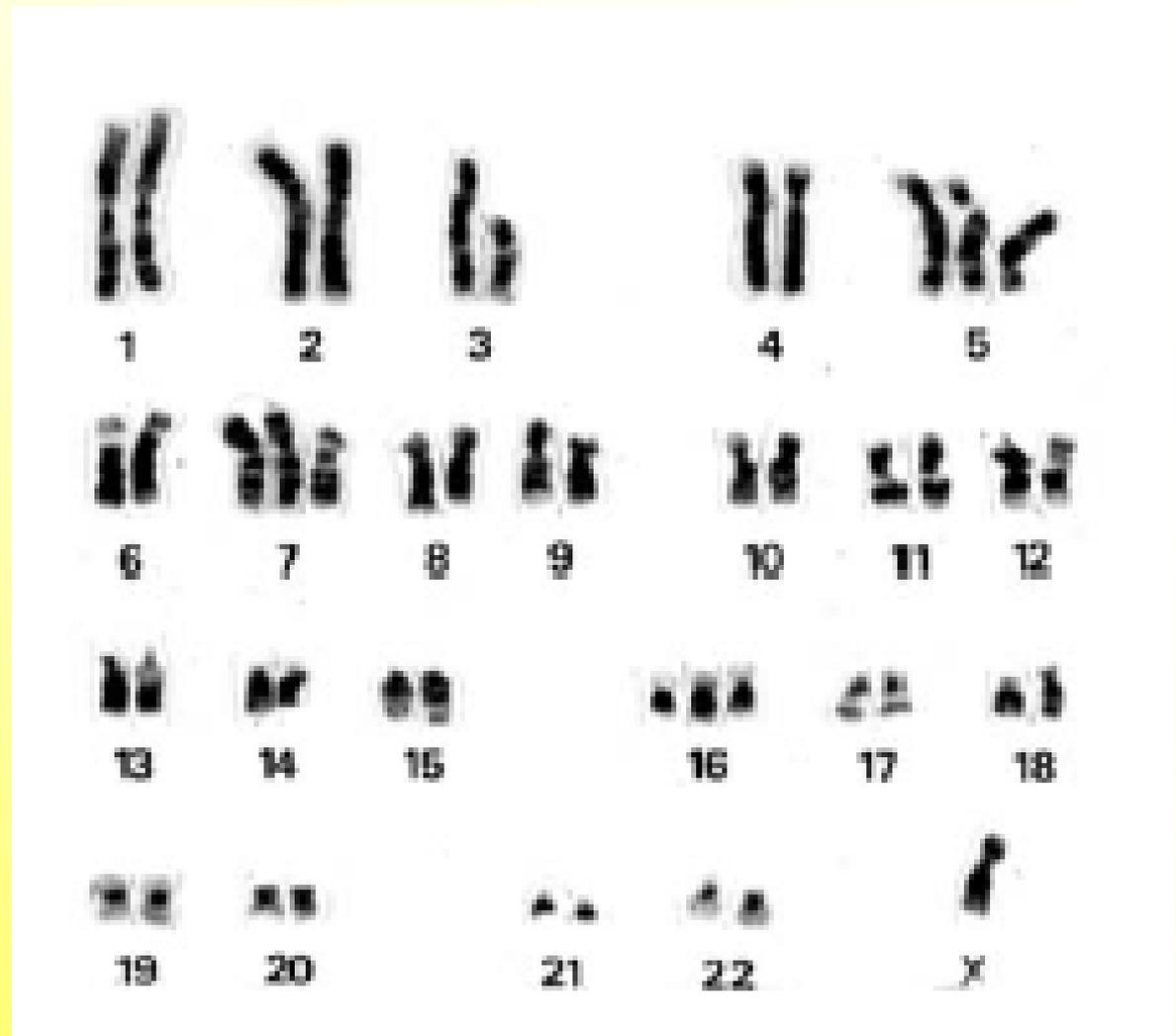
Fast alle Tumorzellen eine **Störung der Anzahl oder Struktur** ihrer Chromosomen (**Aneuploidie**) aufweisen (**Duesberg 2007**).



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



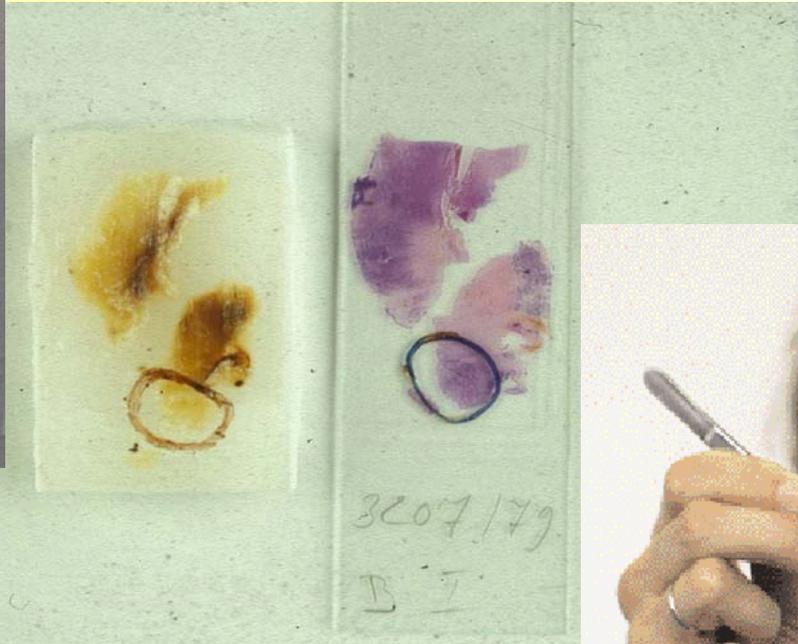
Fehlerhafter Chromosomensatz einer Krebszelle: Von den Chromosomen Nummer 5, 7 und 16 liegt je eines zu viel vor, das Y-Chromosom fehlt (Chromosomale Aneuploidie).

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 μ m
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)**

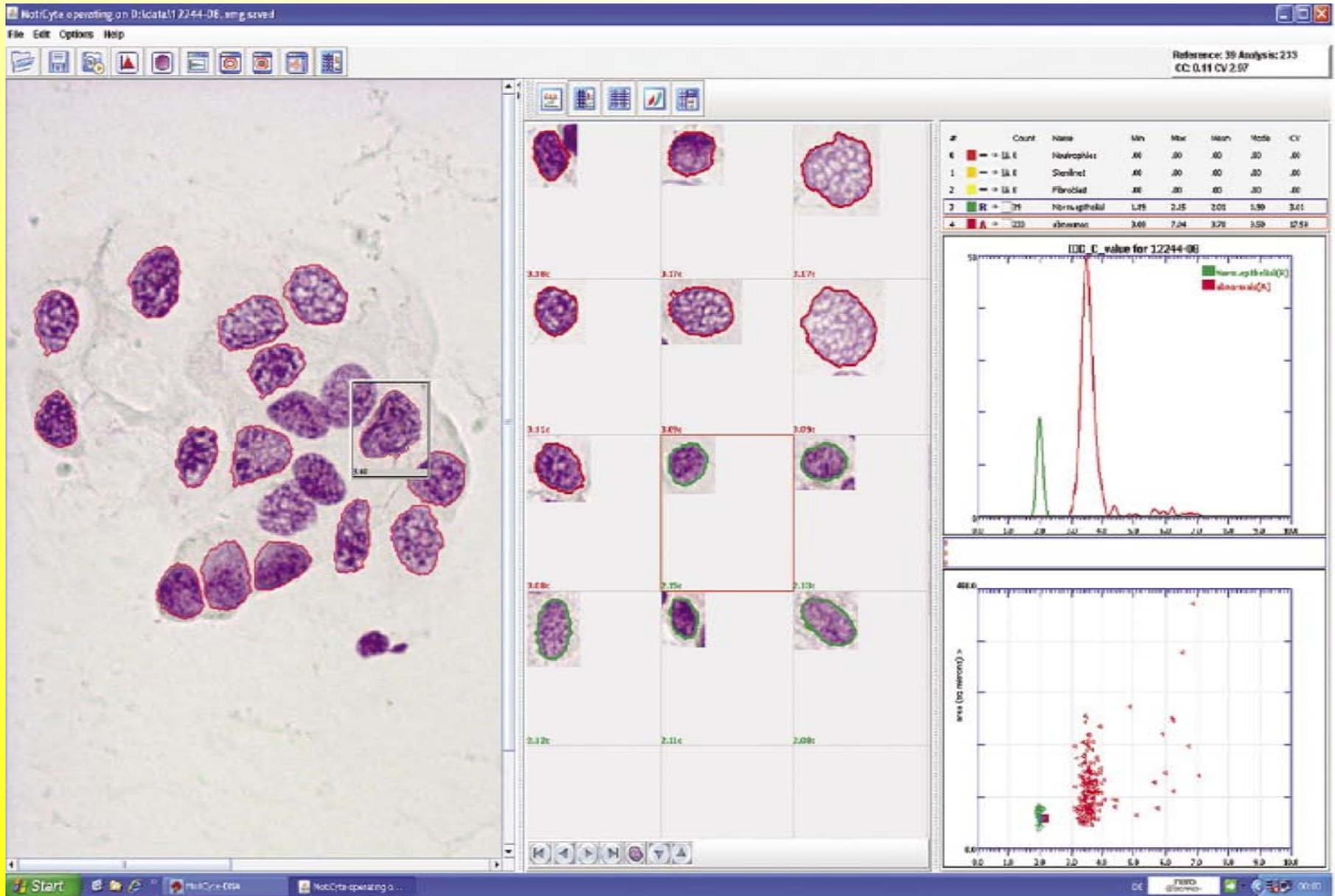


Wie funktioniert die DNA-Bildzytometrie an der Stanzan?

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

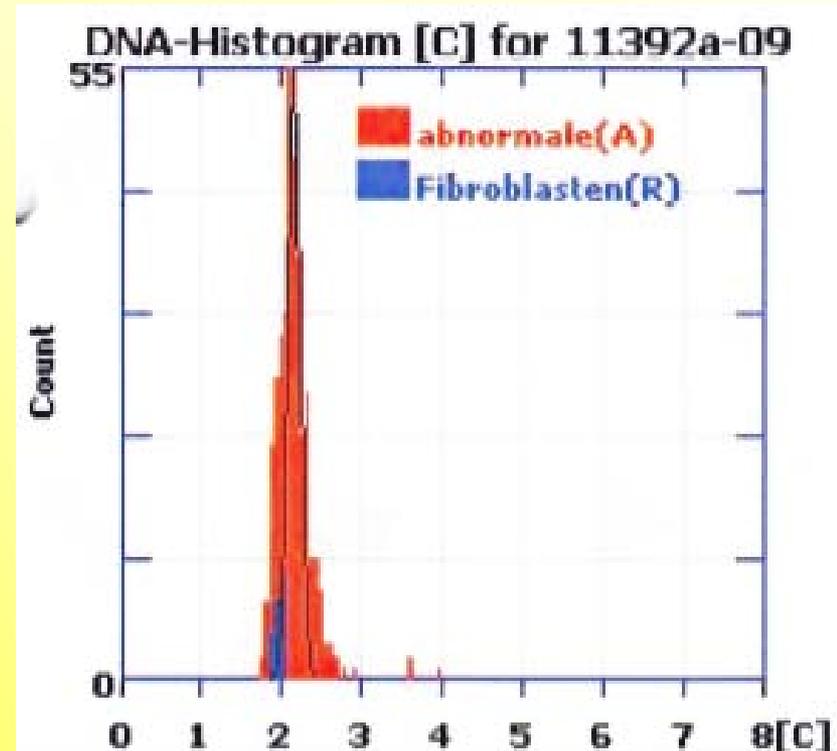
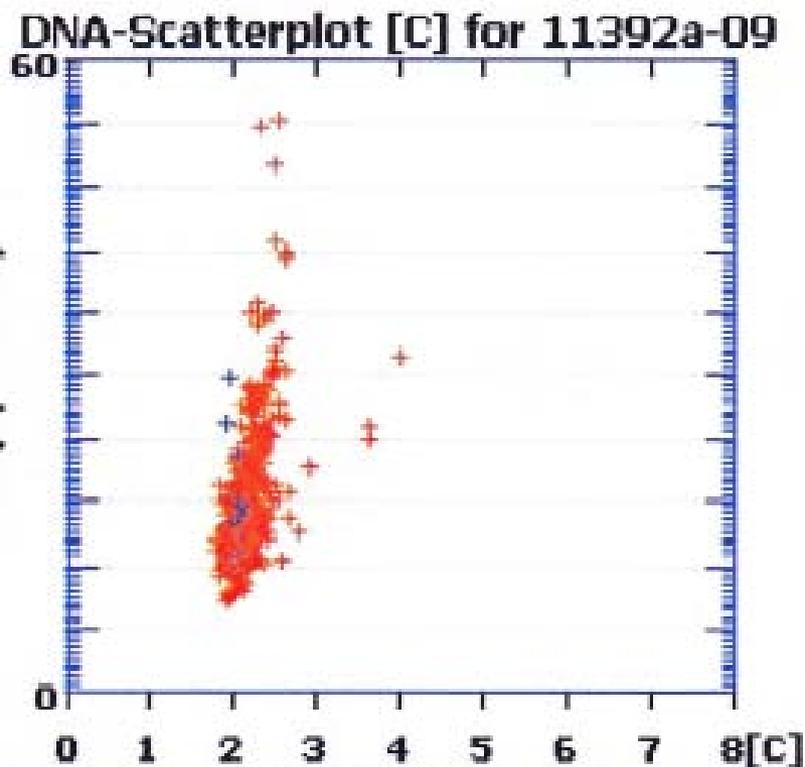
Ein individueller Referenzwert (d. h. ein normaler 2-facher oder diploider DNA-Gehalt, wie ihn jede normale Zelle des Körpers aufweist) wird in derselben Weise an etwa 30 normalen, gutartigen Zellen (z. B. Bindegewebszellen aus derselben Probe) bestimmt und der Messung der Prostatakarzinomzellen zugrunde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

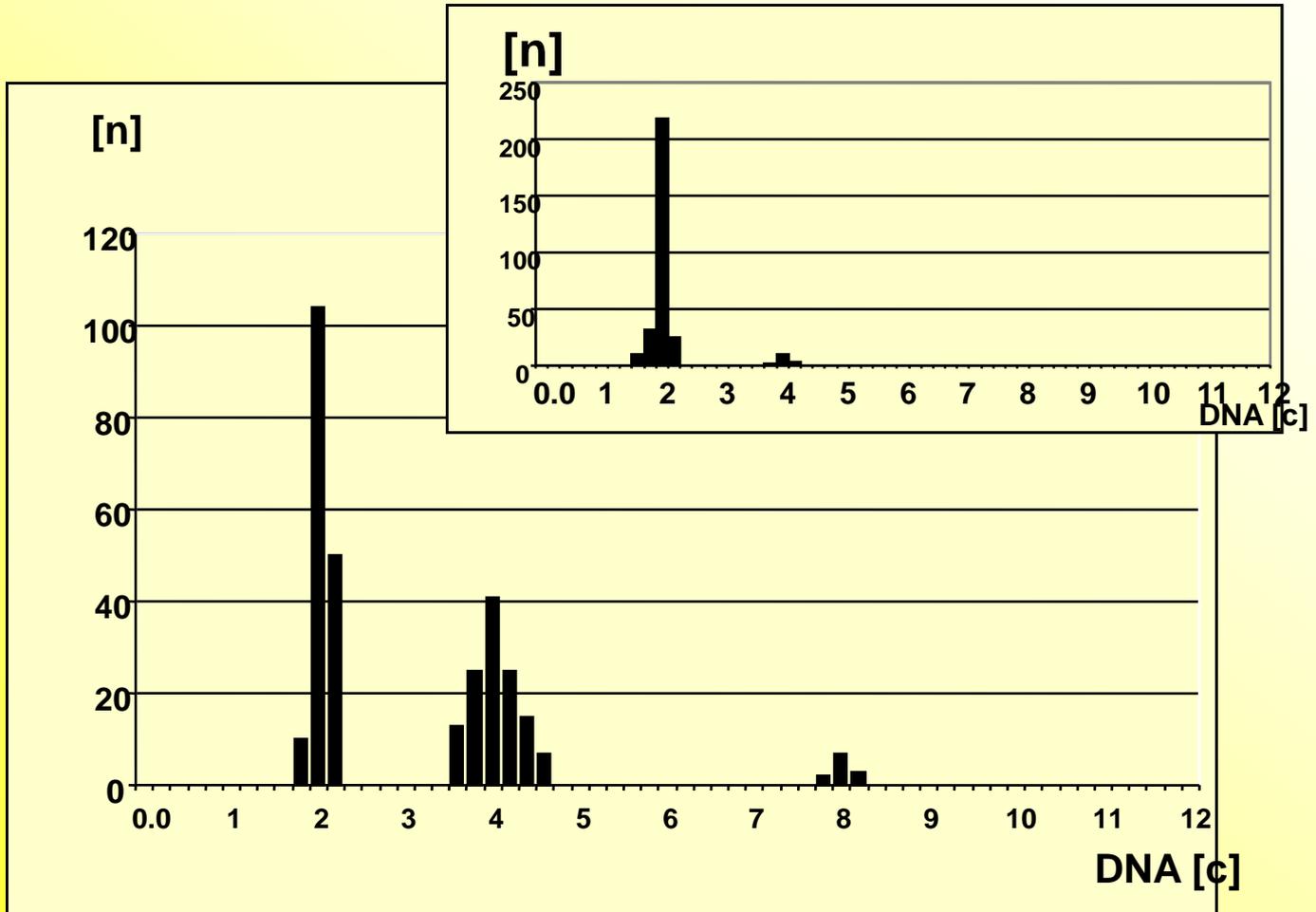
DNA-Verteilung (in c) von Zellkernen
normaler, nicht neoplastischer Zellen bzw.
Gewebe

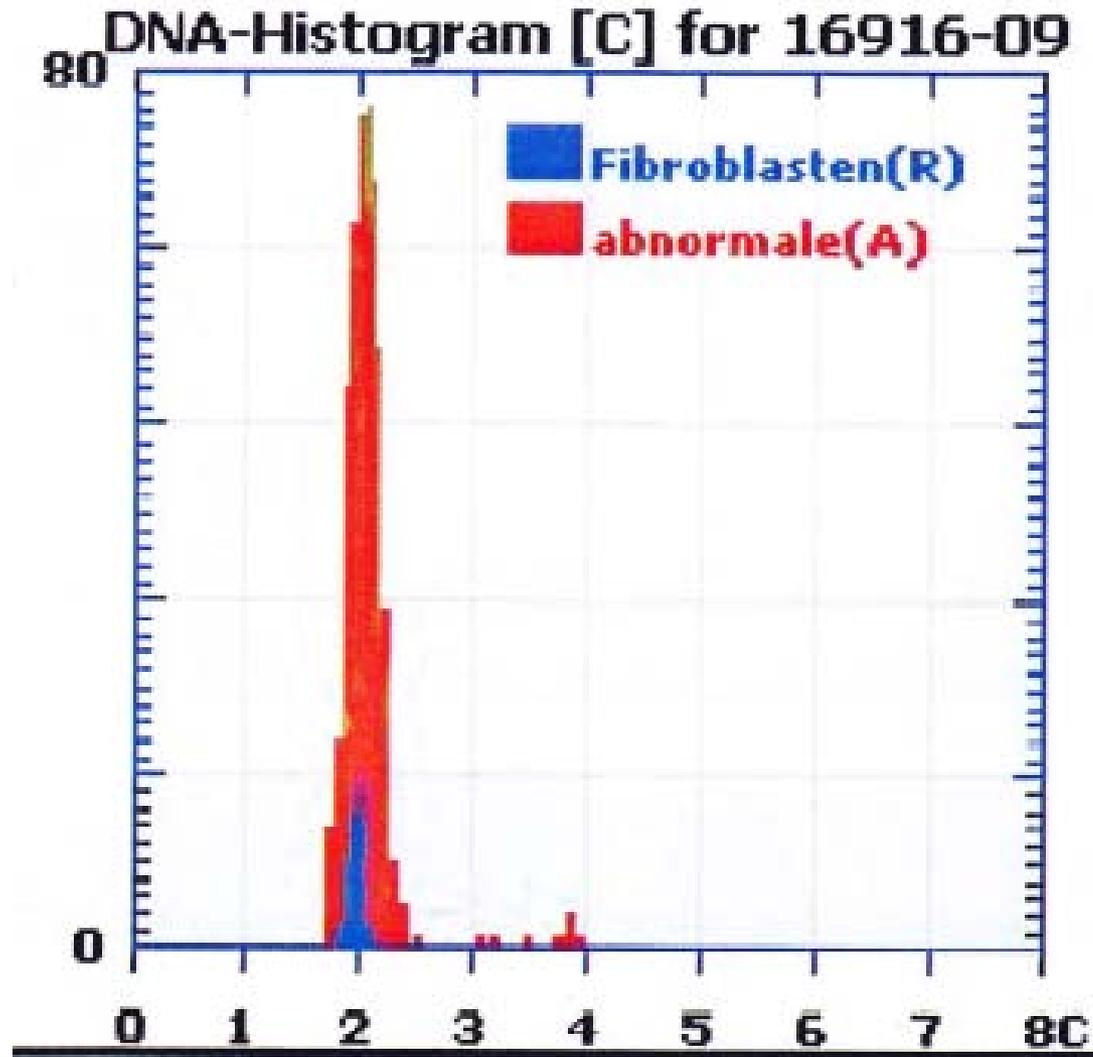
**1c entspricht der DNA-Masse eines haploiden
Chromosomensatzes (z.B. Spermium)
Häufigkeits-Gipfel bei 2c und 4c (diploid)**

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

Euploide DNA-Verteilungen

(diploid oben, polyploid unten)



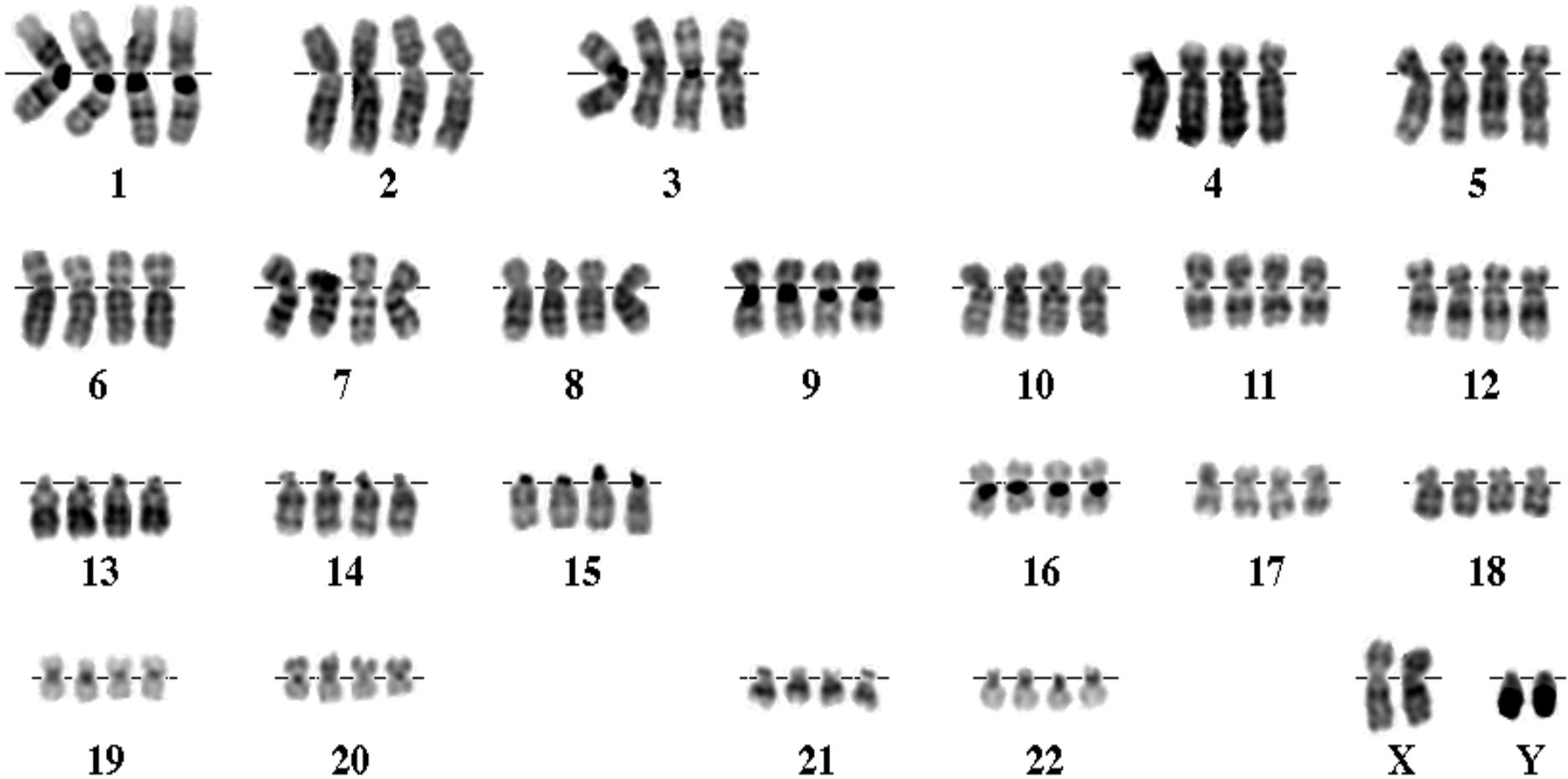


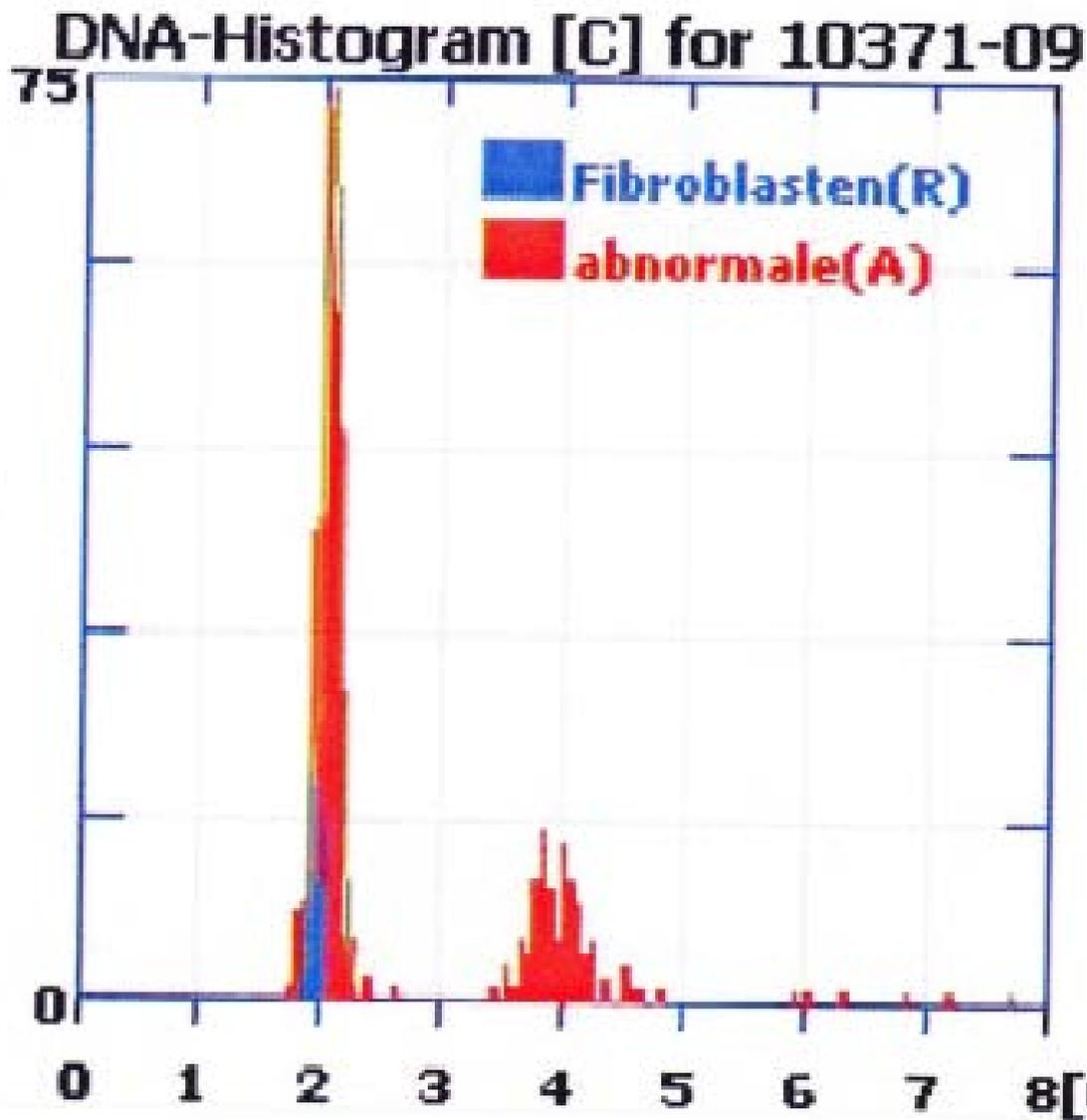
Peridiploide DNA – Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA – Grad I)

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

Euploide Polyploidie

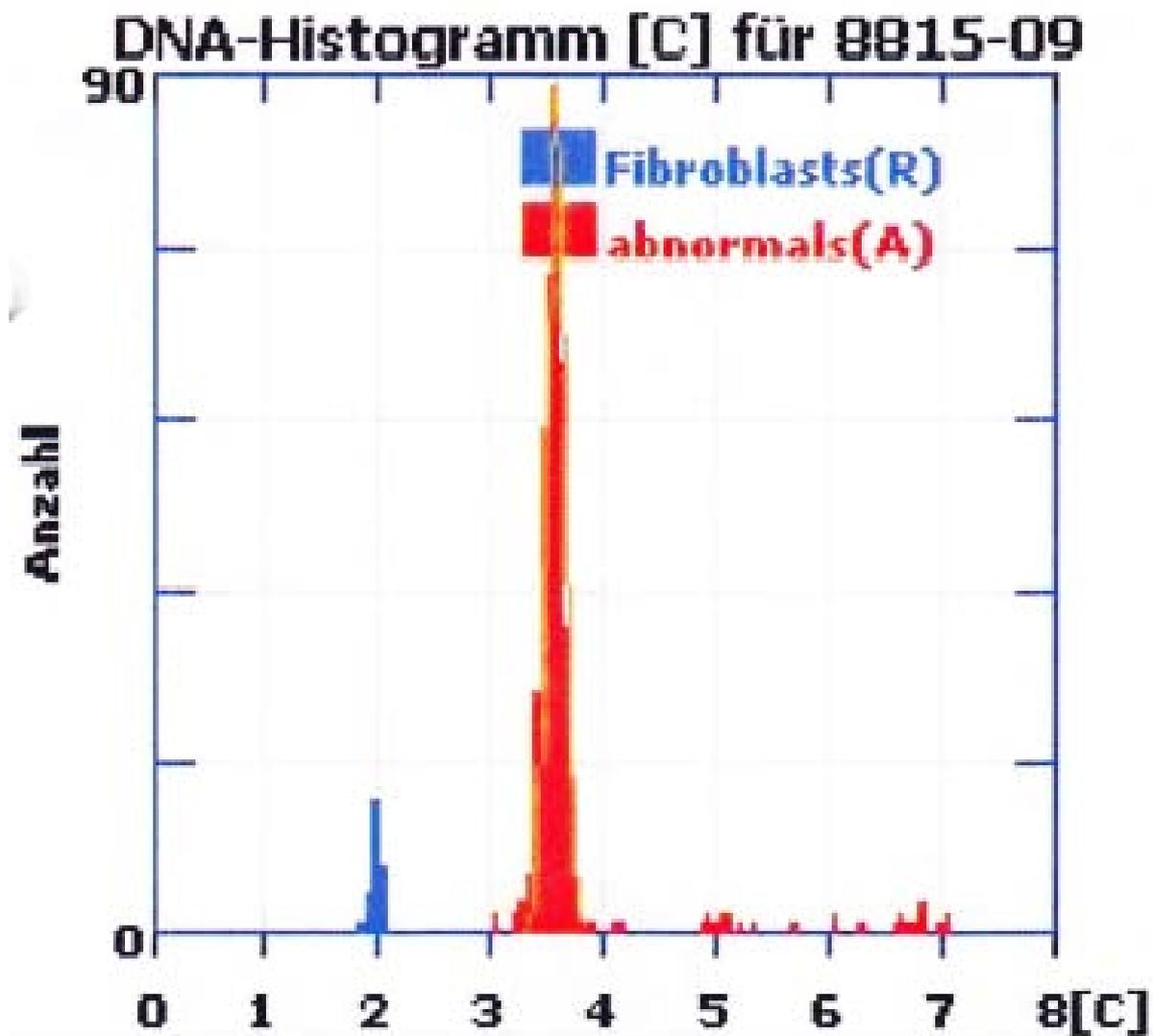
Eine Zelle mit tetraploidem Chromosomesatz,
 $n=92$





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

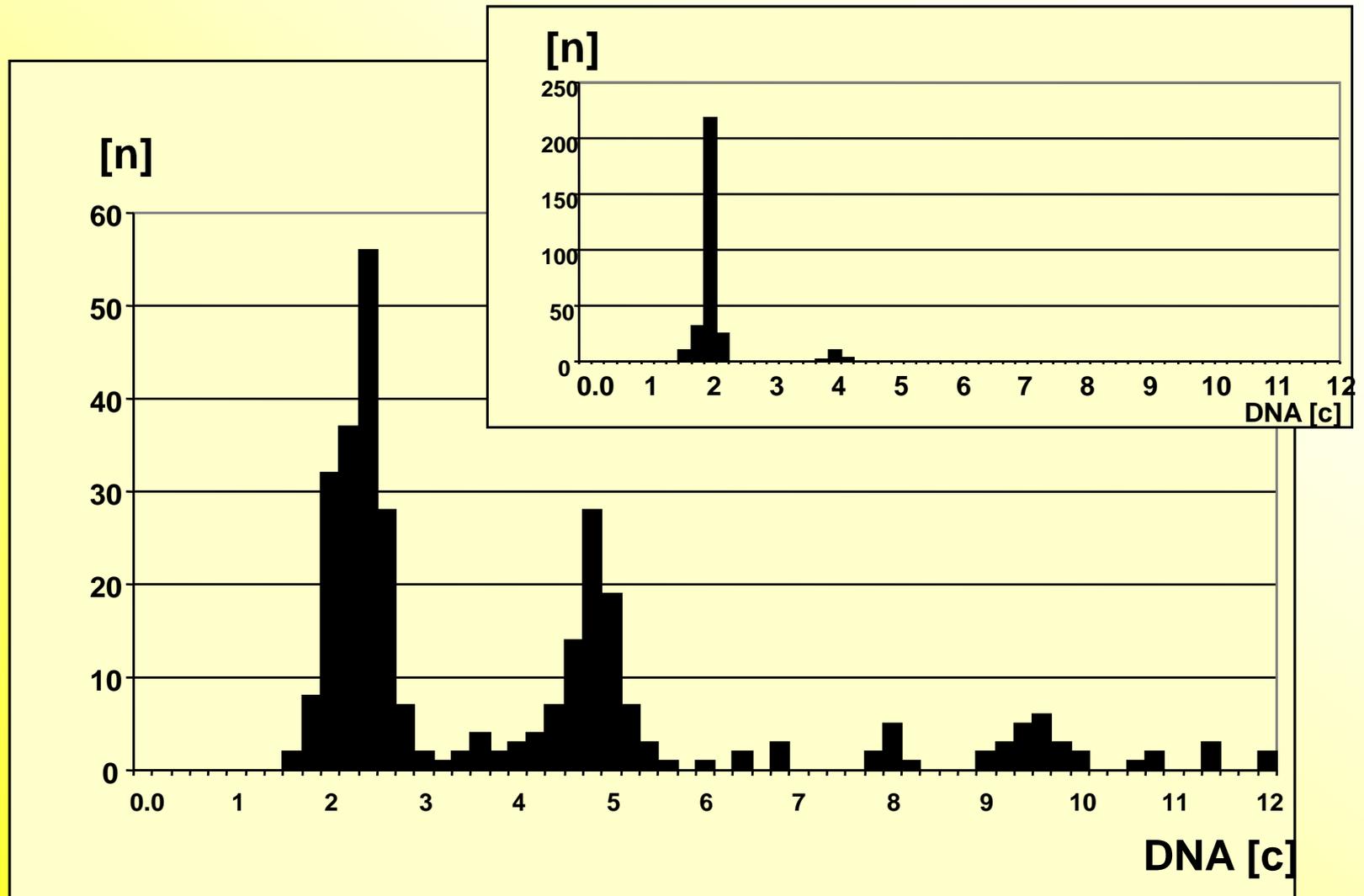
STL $>1,80c < 2,20c$ **und** $>3,60c < 4,40c$ **und** $>7,20c < 8,80c$

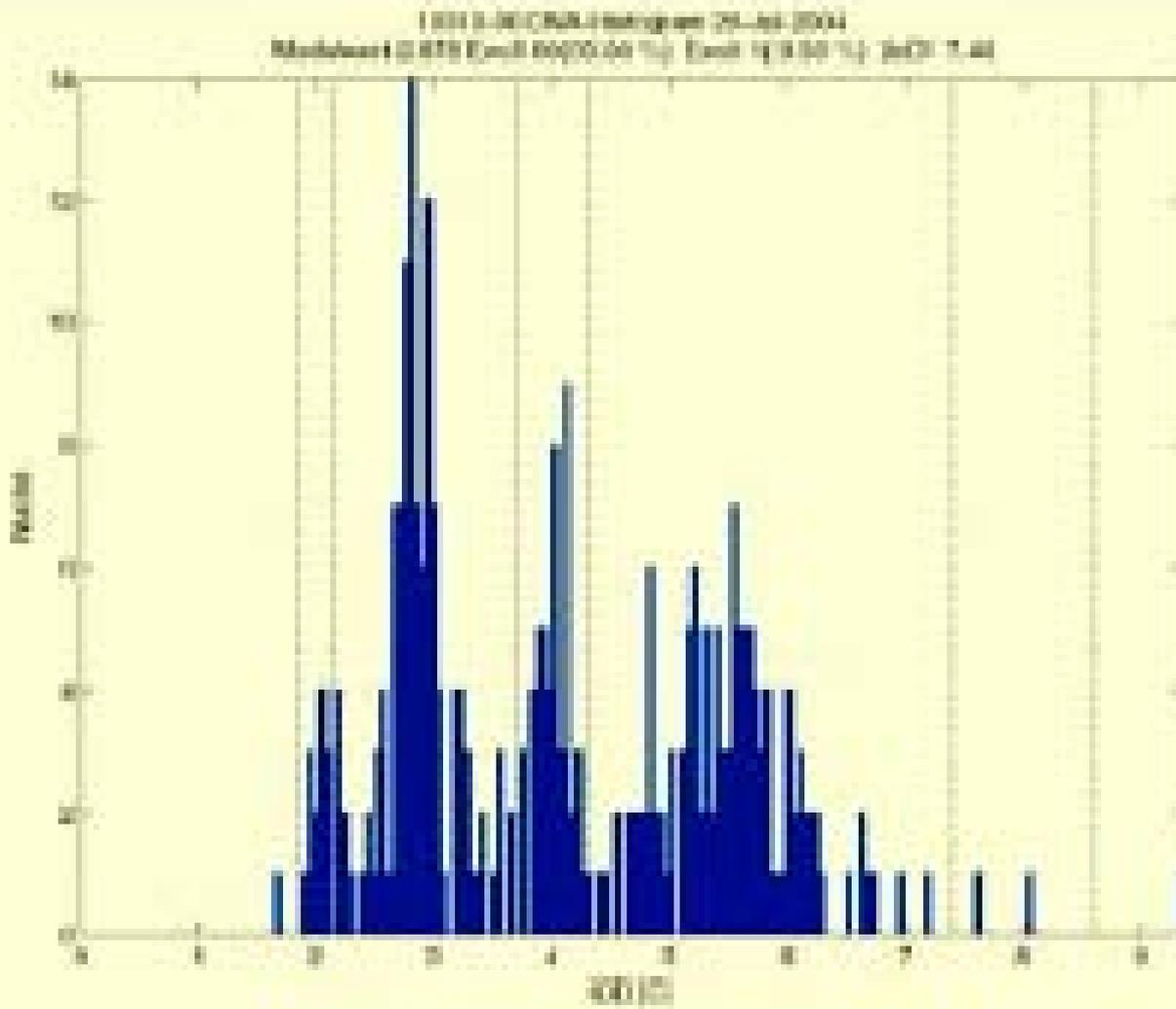


X -Ploide DNA- Verteilung eines Prostatakarzinoms (DNA – Grad III)

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

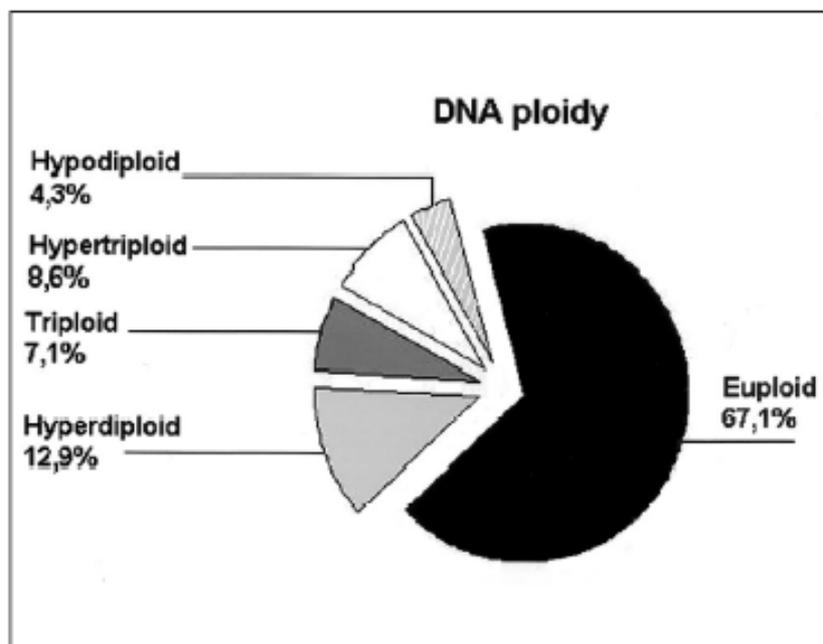


Fig. 3 - The distribution of DNA ploidy for the entire group.

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

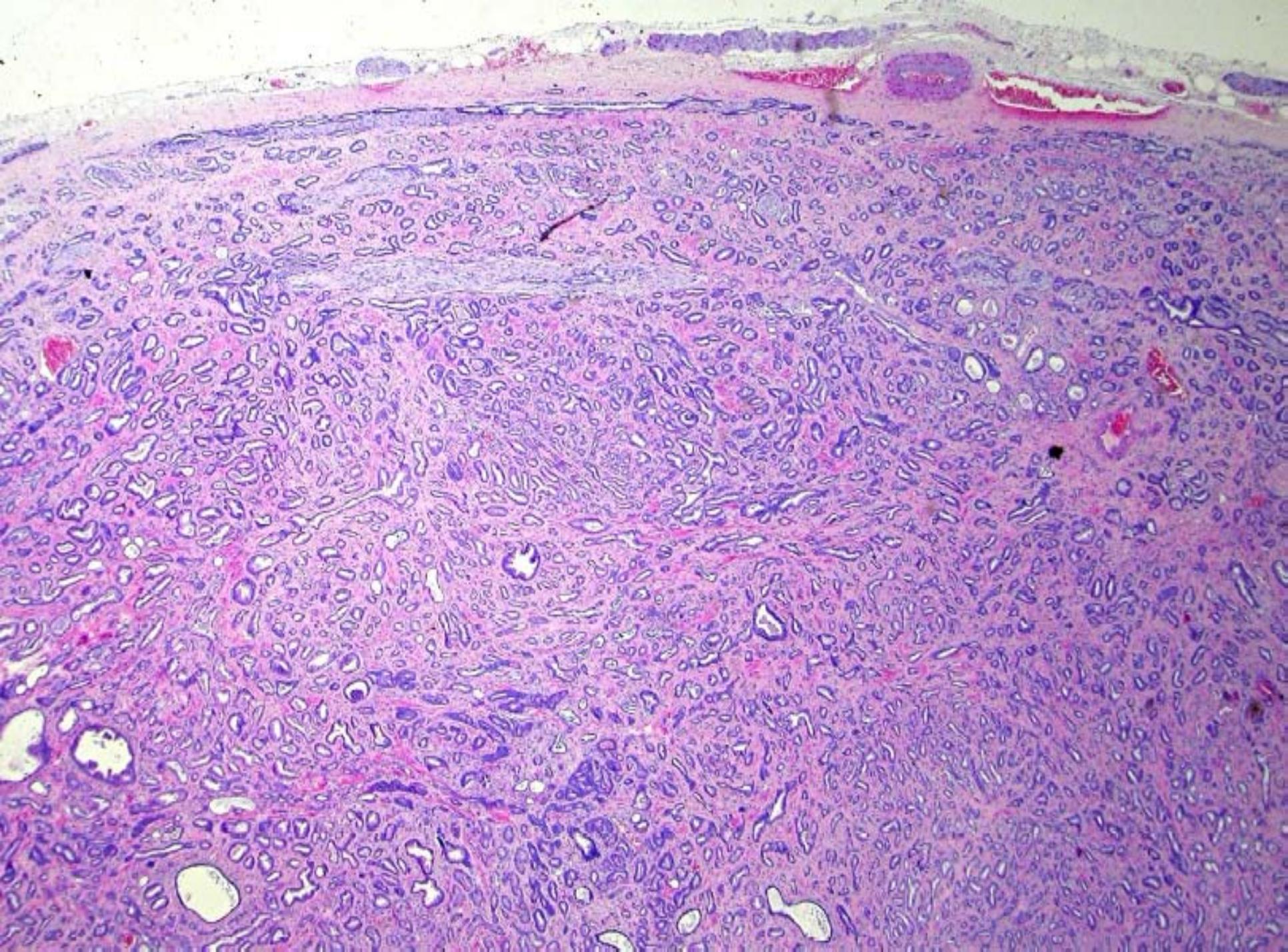
Die DNA Zytometrie hat eine gute Vorhersage über extraprostatischer Ausbreitung, Rezidiv und Metastasen an der Stanzbiopsien (Isherwall, Epstein, 2009).

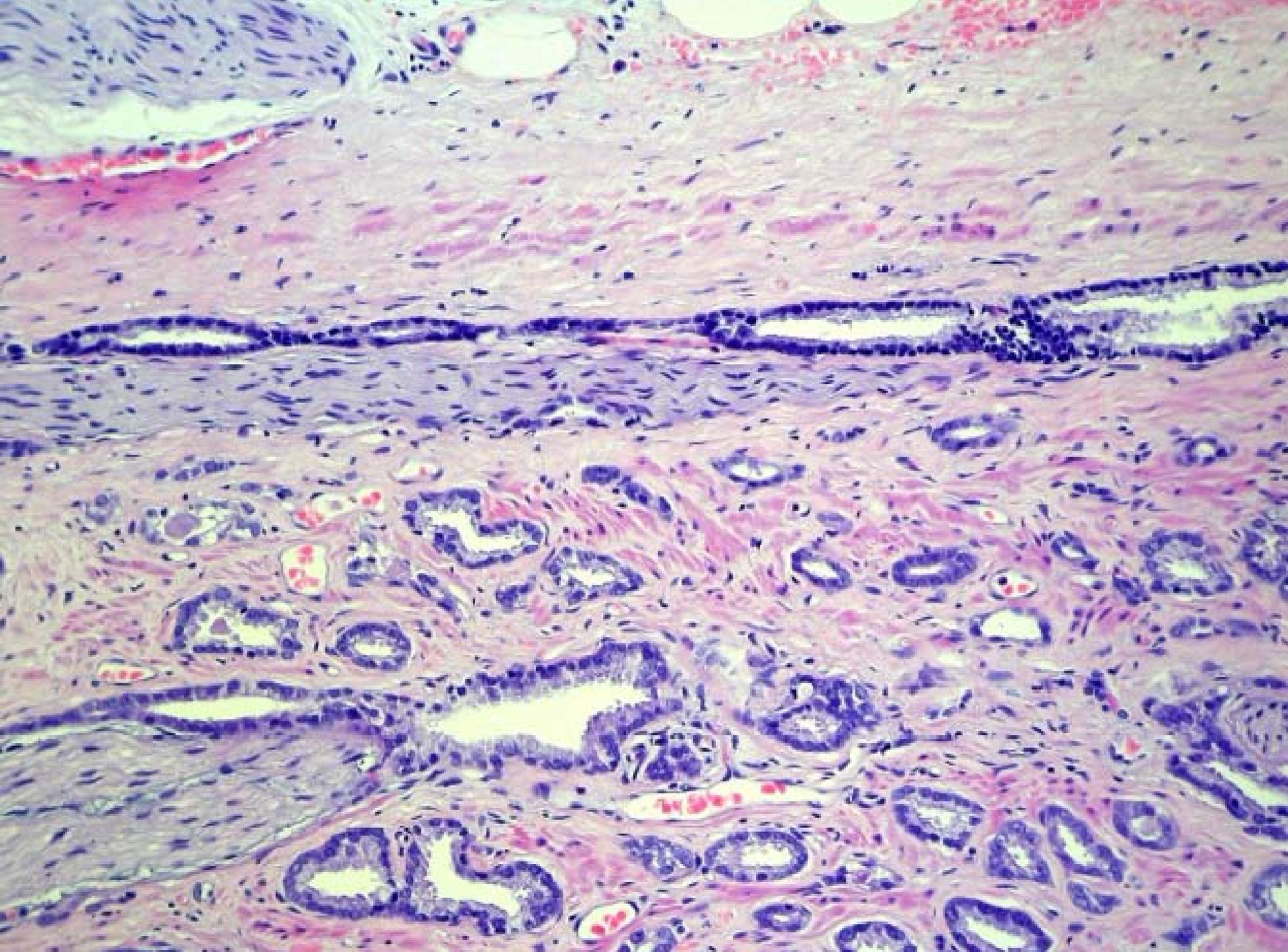
370 had complete information
281 organ-confined (75 %) and
89 nonorgan-confined (25 %) PCa cases

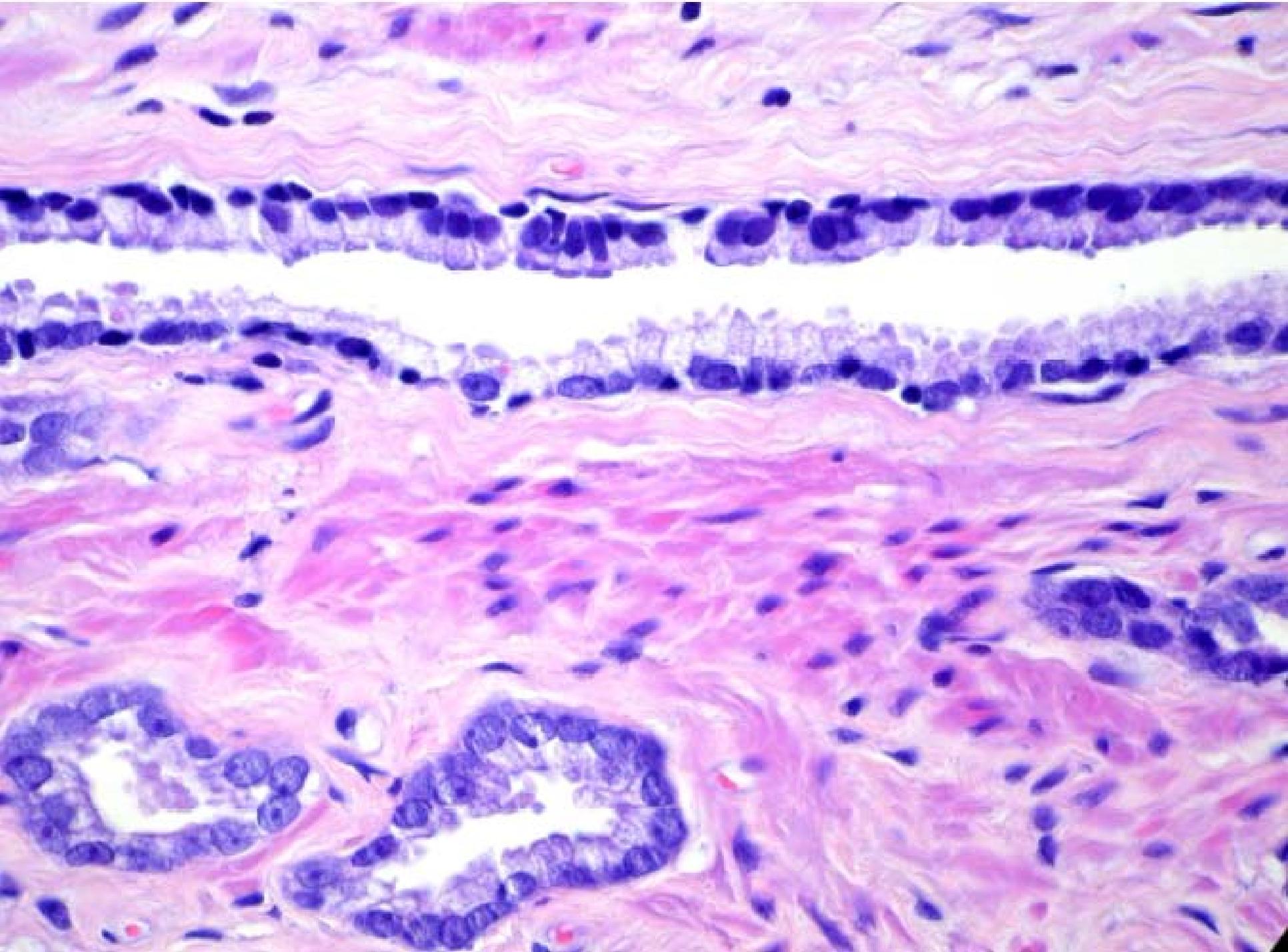
The use of **DNA ploidy in lieu of the biopsy Gleason score** in each preoperative model evaluated resulted in equivalent or improved organ- vs nonorgan-confined PCa prediction.

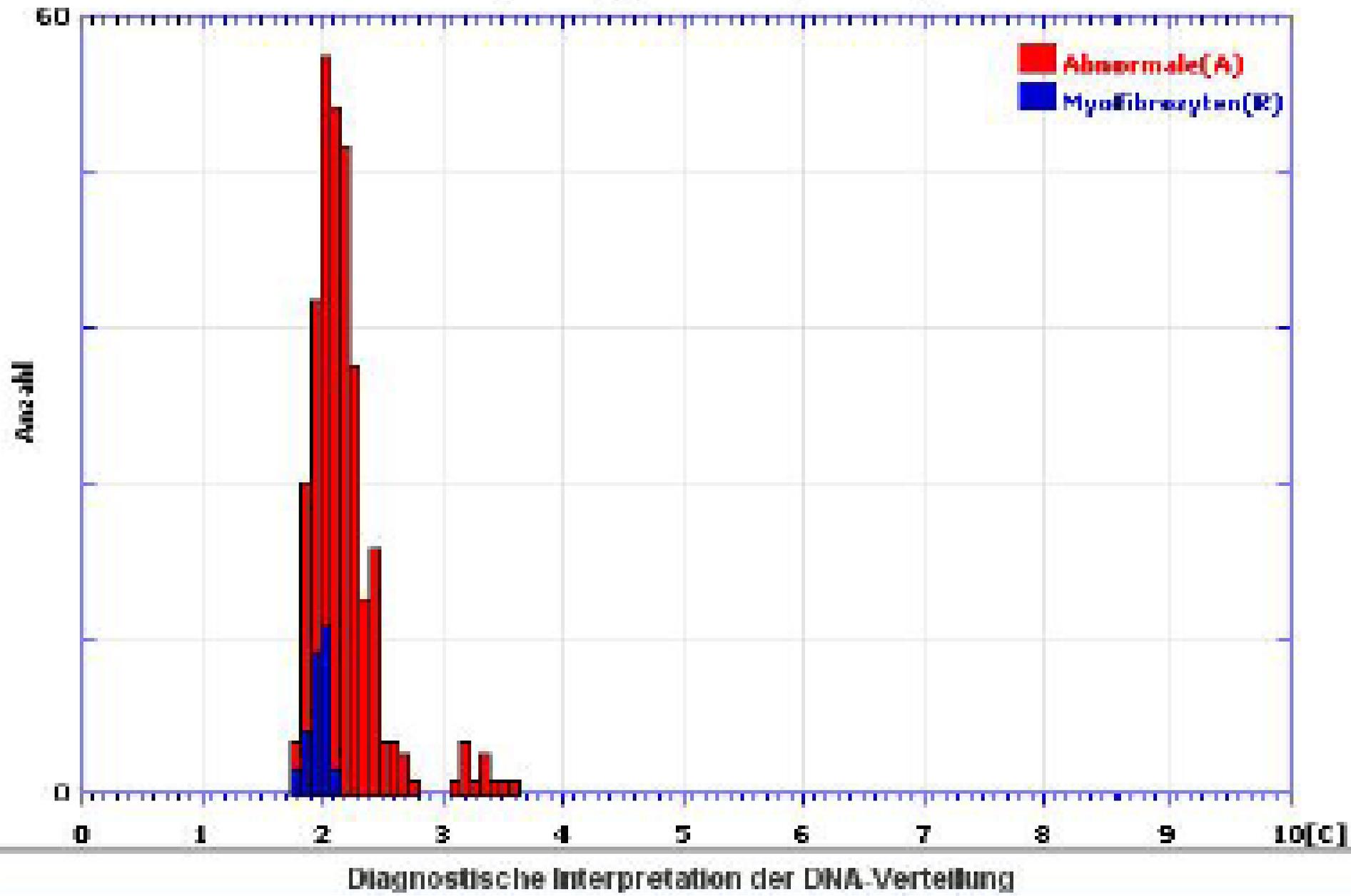
The results of our study have shown that nuclear morphometric alterations provide an **objective and reproducible** quantitative measurement of nuclear structure

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)

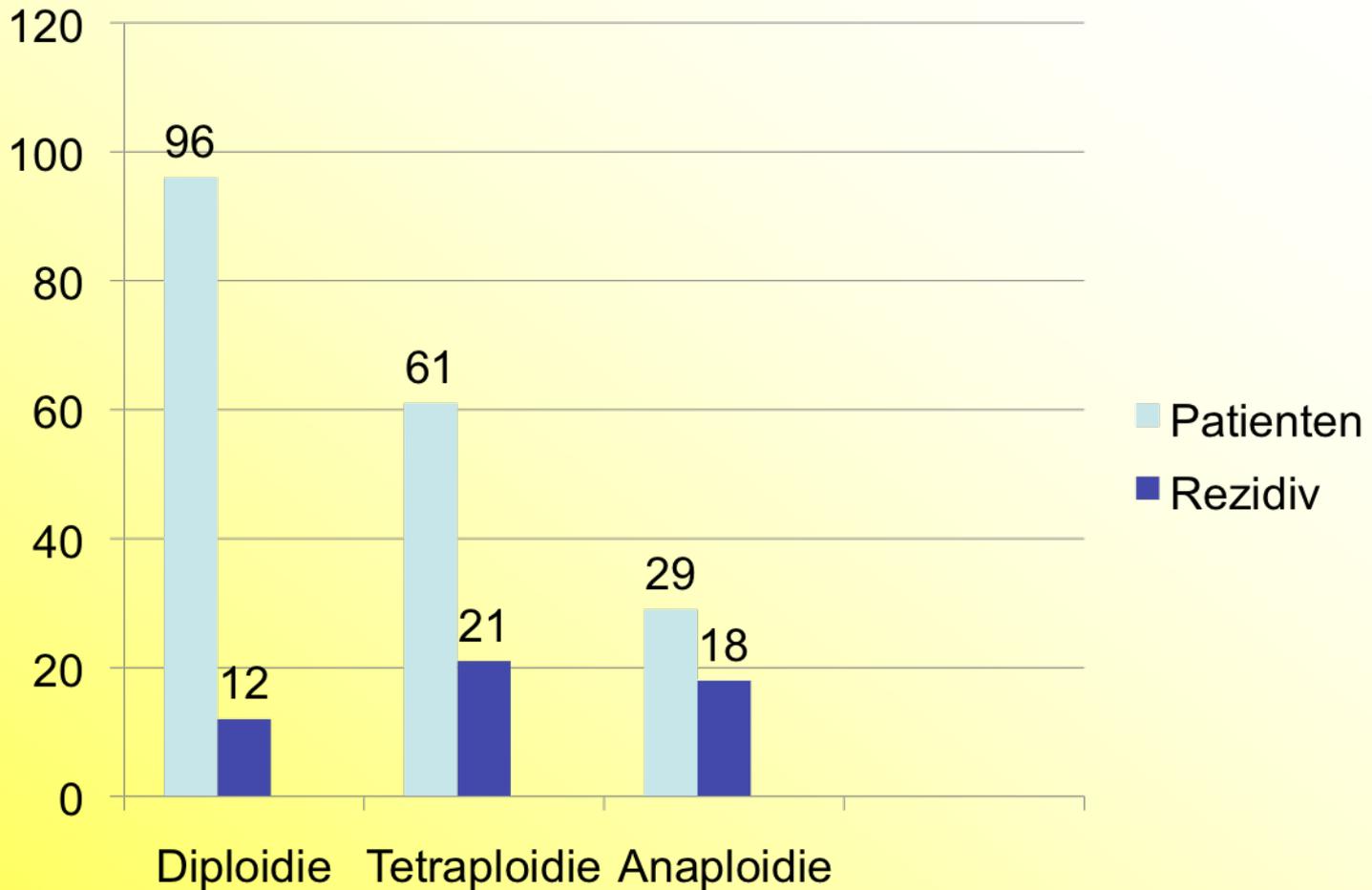
DNA-Malignitätsgrading des Prostatakarzinoms

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

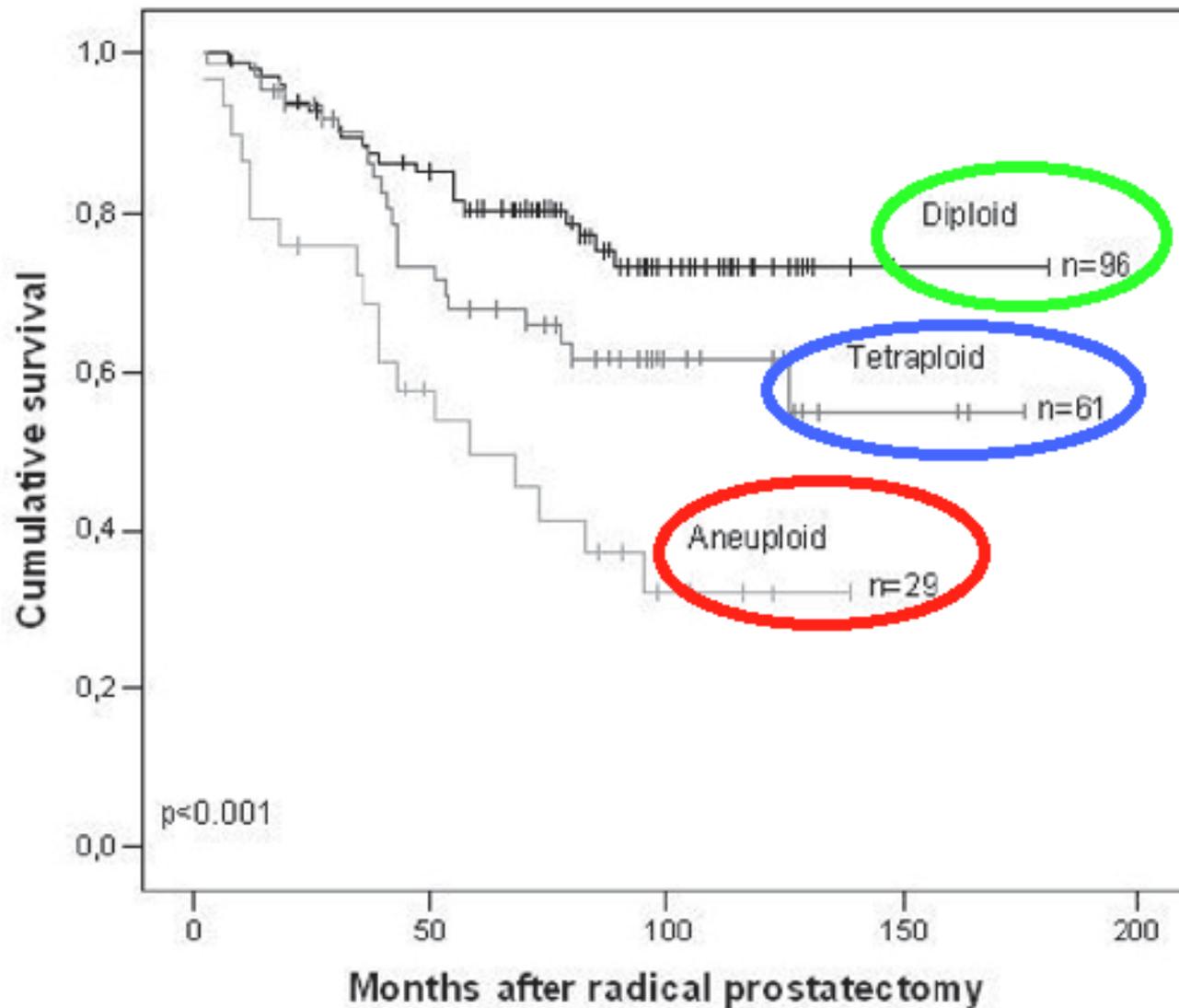


Figure 1a Disease free survival according to DNA Ploidy

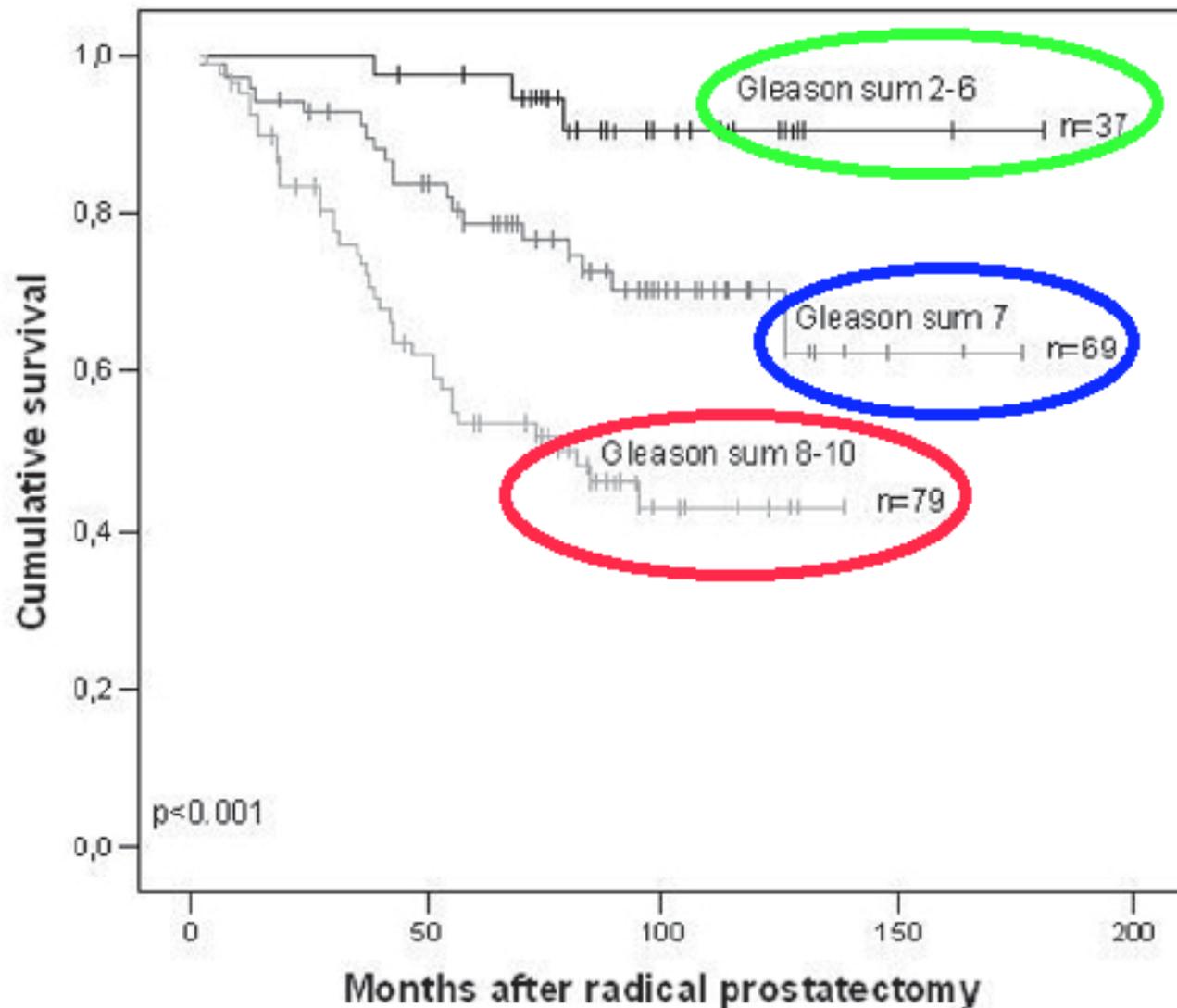


Figure 1b Disease free survival according to Gleason score

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

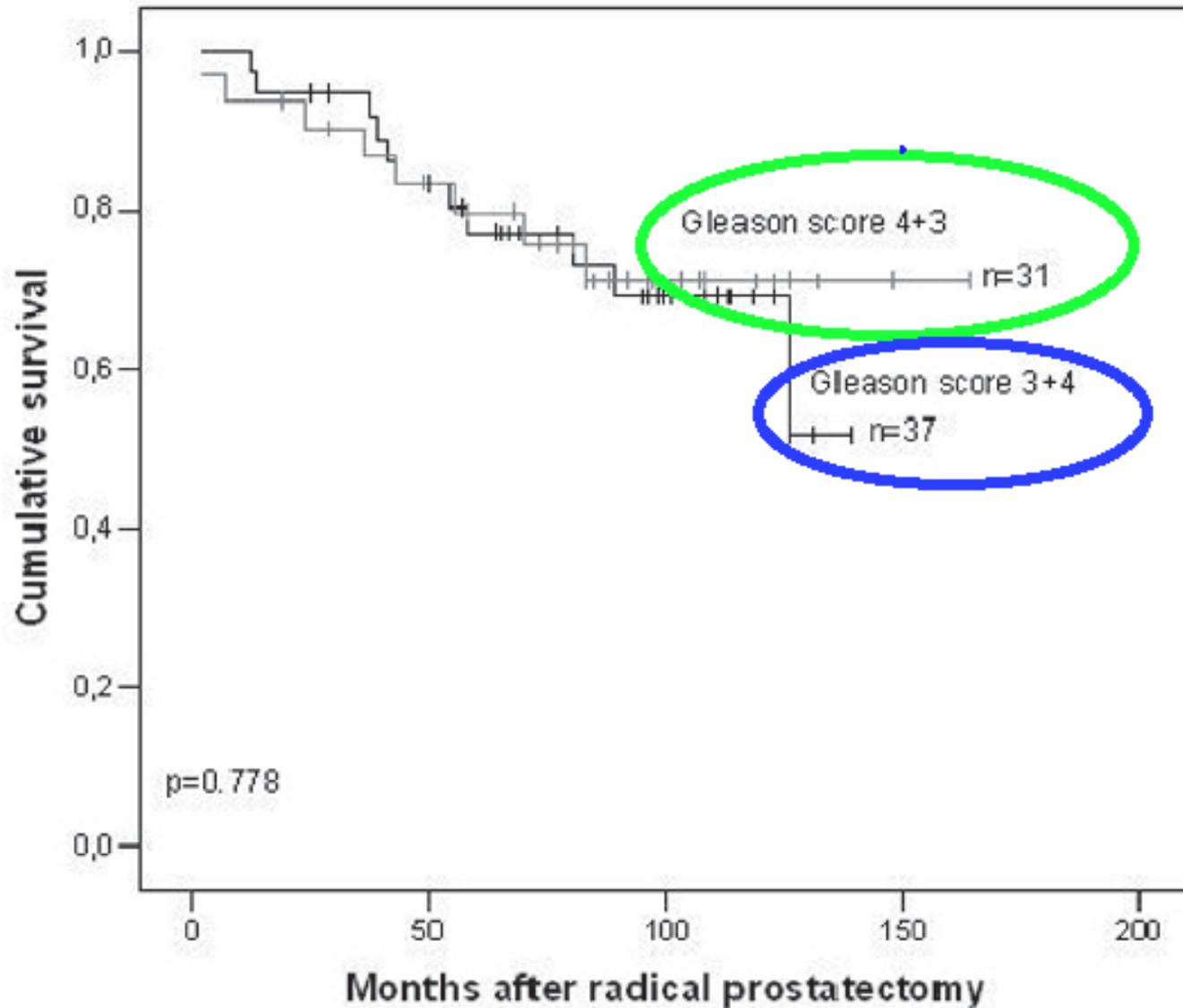


Figure 2a Disease free survival according to DNA Ploidy for Gleason 7 patients

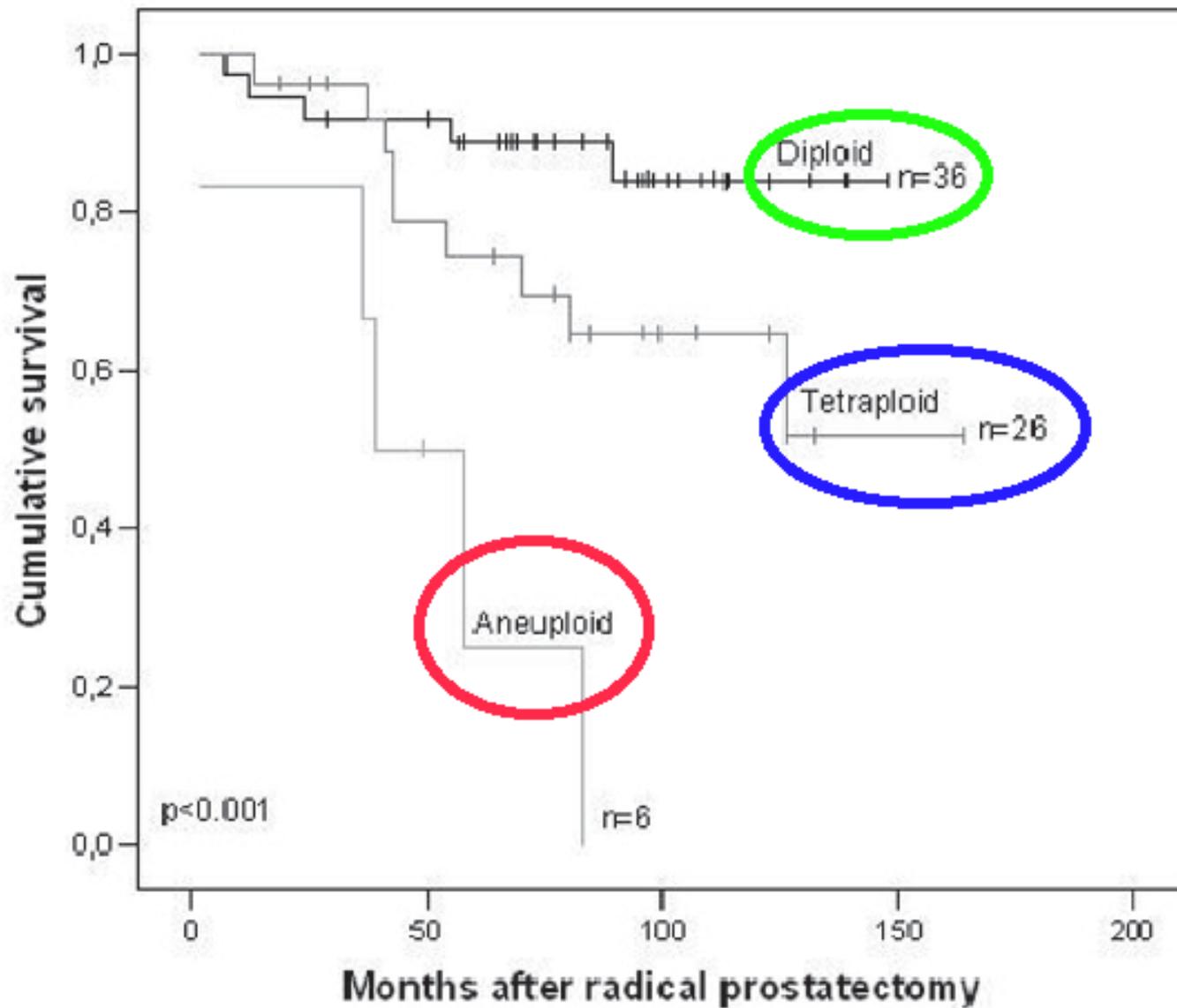
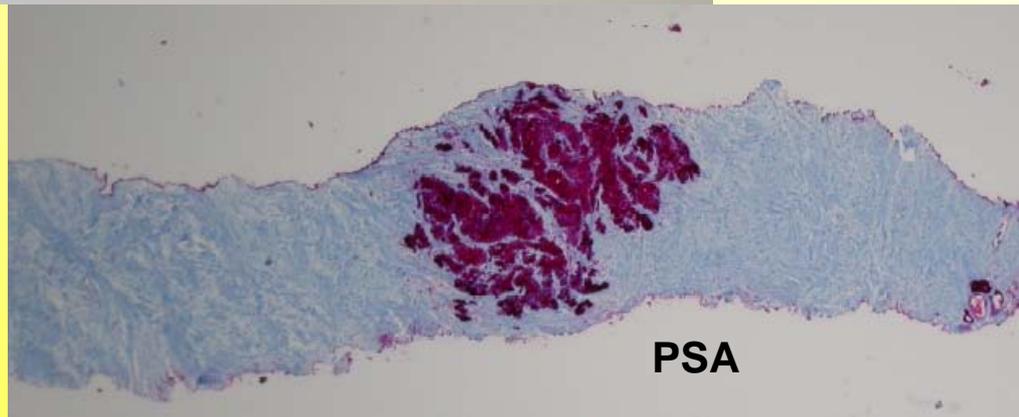
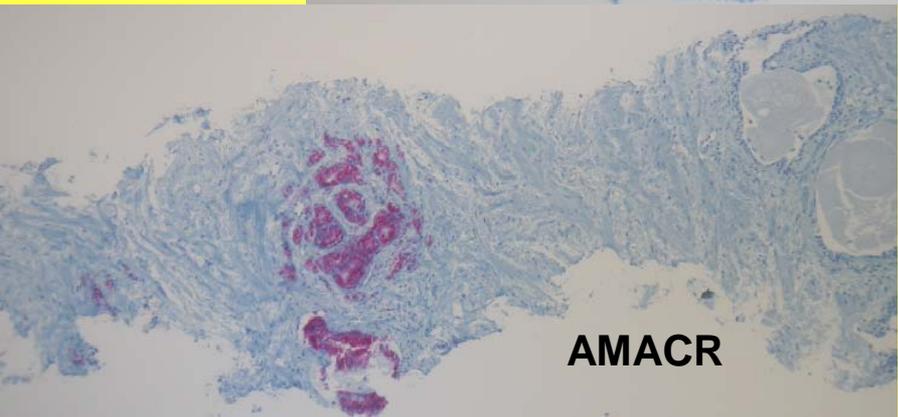
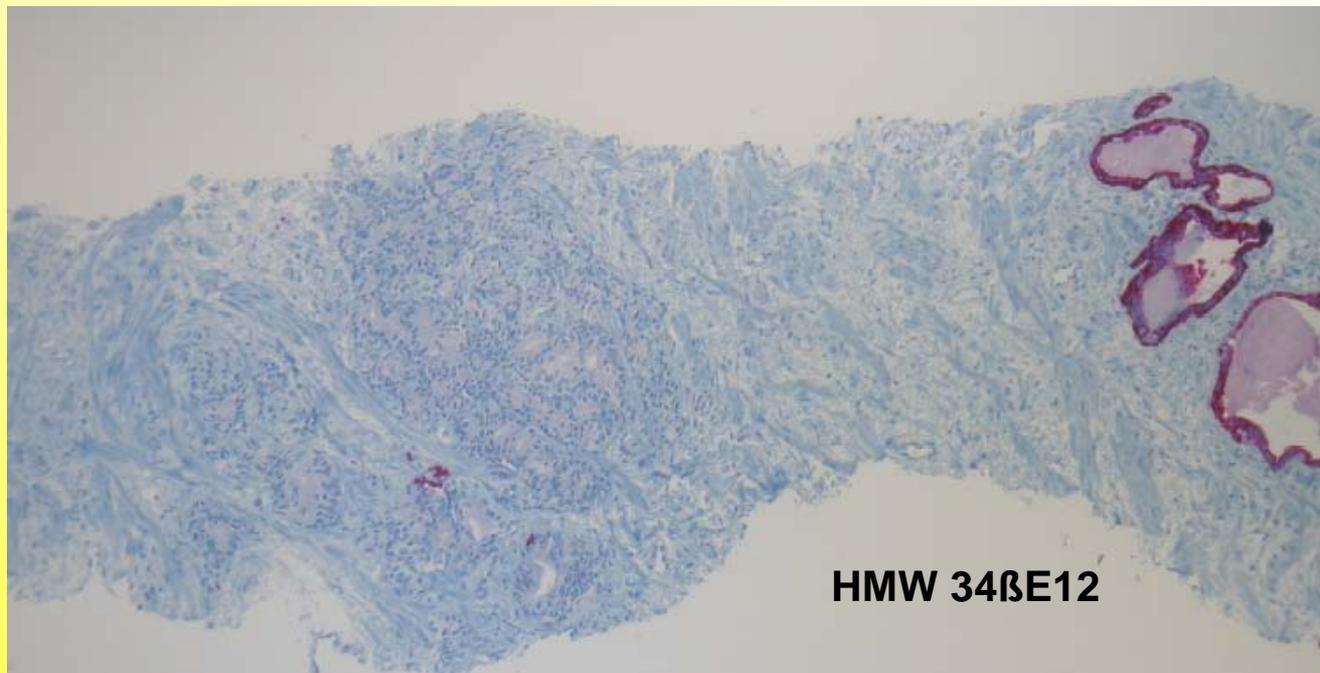
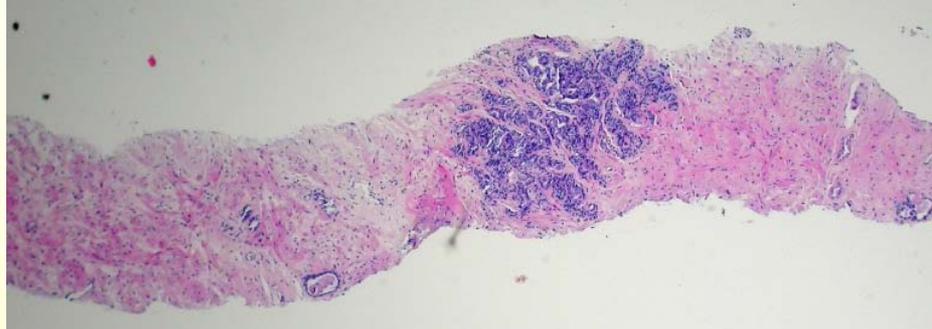
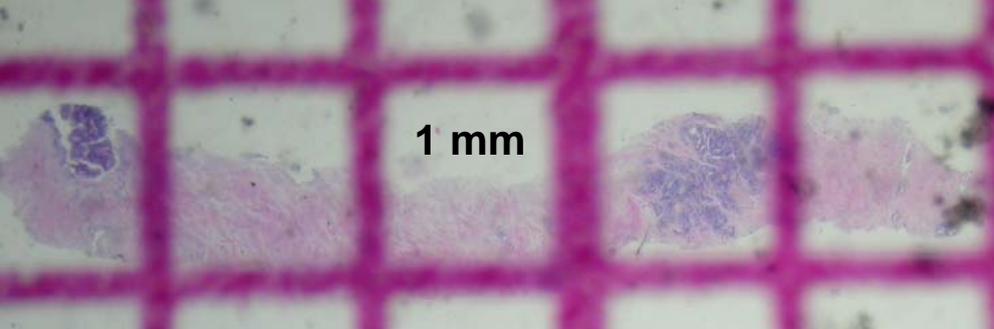


Figure 2b Disease free survival according to Gleason score for Gleason 7 patients

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***

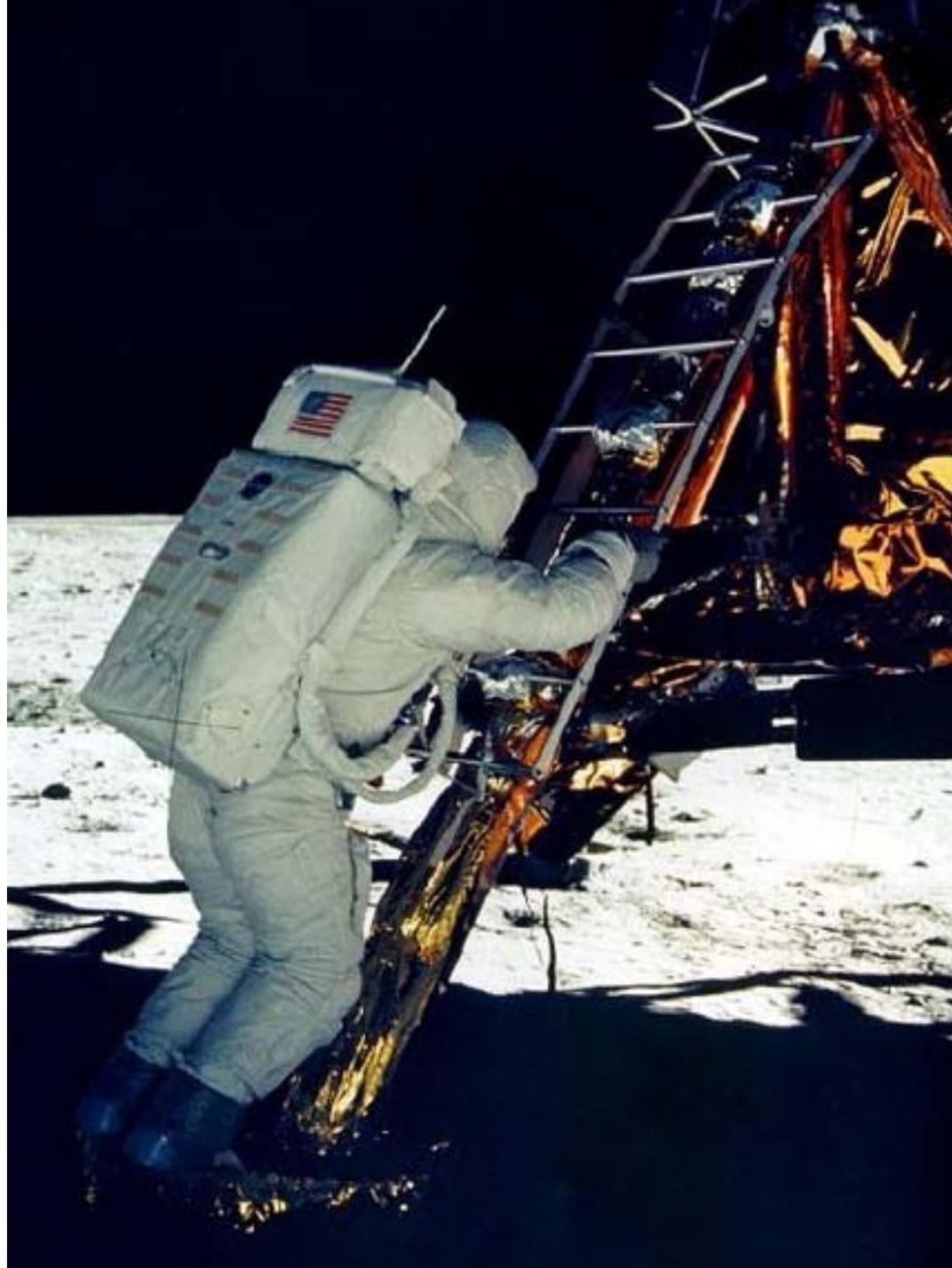
Pathologenkongress in Mai 2010, Berlin, Prof. Helpap

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**

