

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemischer Nachweis von Lymphknotenmetastasen pN0(i+)
bei Prostatakarzinomen nach radikaler Prostatektomie
in der Bedeutung für Rezidive

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Therese Beate Pross

aus Magdeburg

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.2 <i>Ätiologie</i>	2
1.3 <i>Anatomie der Prostata</i>	3
1.3.1 Lage	3
1.3.2 Anatomische Unterteilung.....	3
1.3.3 Gefäßversorgung	4
1.3.4 Metastasierungswege	4
1.4 <i>Pathologie der Prostata</i>	5
1.5 <i>Klassifizierung</i>	6
1.5.1 Gleason Grading.....	6
1.5.2 Staging.....	8
1.6 <i>Prostata-spezifisches Antigen</i>	10
1.7 <i>Weitere Diagnostik</i>	13
1.8 <i>Therapie</i>	14
2 Herleitung der Fragestellung	16
3 Methodik	19
3.1 <i>Patientenkollektiv</i>	19
3.1.1 Datenbank.....	19
3.1.2 Einschlusskriterien / Ausschlusskriterien	19
3.2 <i>Schnittkontrolle</i>	20
3.3 <i>Vorbereitung für Histologie und Immunhistochemie</i>	21
3.4 <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>	21

3.5	<i>Immunhistochemische Färbungen</i>	21
3.5.1	MNF116	22
3.5.2	Andere Färbungen	22
3.6	<i>Flächenbestimmung</i>	22
3.7	<i>Statistik</i>	24
4	Ergebnisse	26
4.1	<i>Deskriptive Statistik</i>	26
4.2	<i>Färbungen</i>	28
4.3	<i>Schließende Statistik</i>	34
4.3.1	Vergleich des Alters bezüglich Lymphknotenstatus.....	34
4.3.2	Vergleich der Follow Up – Zeit bezüglich Lymphknotenstatus	35
4.3.3	Vergleich des Gleason Scores bezüglich Lymphknotenstatus	36
4.3.4	Vergleich der T-Stadien bezüglich Lymphknotenstatus.....	37
4.3.5	Vergleich der entfernten LK bezüglich Lymphknotenstatus.....	38
4.3.6	Vergleich der Tumorfläche bezüglich Lymphknotenstatus	39
4.3.7	Vergleich des PSA-Wertes bezüglich Lymphknotenstatus	41
4.3.8	Vergleich des Auftretens eines BCR bezüglich Lymphknotenstatus	42
4.3.9	Vergleich der Zeit in Monaten bis BCR bezüglich Lymphknotenstatus	43
4.3.10	Rezidivfreies Überleben	44
4.3.11	Vergleich der Tumorfläche bezüglich des Auftretens eines Rezidivs	46
4.3.12	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	47
4.4	<i>Auswertung der Testkriterien der Immunhistochemie</i>	47
5	Diskussion	49
5.1	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	49
5.1.1	Vergleich des Gleason Scores bezüglich Lymphknotenstatus	49
5.1.2	Vergleich der T-Stadien bezüglich Lymphknotenstatus.....	50
5.1.3	Vergleich der entfernten LK bezüglich Lymphknotenstatus.....	51
5.1.4	Vergleich der Tumorfläche bezüglich Lymphknotenstatus	52
5.1.5	Vergleich der Tumorfläche bezüglich des Auftretens eines BCR	53
5.1.6	Vergleich der präoperativen PSA-Werte bezüglich Lymphknotenstatus	54
5.1.7	Vergleich des Auftretens eines BCR bezüglich Lymphknotenstatus	56
5.1.8	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	59
5.2	<i>Limitierung der Studie</i>	62

<i>5.3 Ausblick</i>	63
Literaturverzeichnis	XIV
Eidesstattliche Versicherung	XX
Lebenslauf	XXI
Danksagung	XXII

Zusammenfassung

Hintergrund: 10% bis 30% der Patienten mit einem Prostatakarzinom (PCa), die nach radikaler Prostatektomie (RPE) als Lymphknotenmetastasen frei und damit als geheilt bezeichnet werden, entwickeln im Verlauf einen erneuten Anstieg des prostataspezifischen Antigens (PSA), ein sogenanntes biochemisches Rezidiv (BCR). Die Bedeutung von isolierten Tumorzellen (ITC) und Mikrometastasen im Hinblick auf das Auftreten eines BCR ist nicht abschließend geklärt.

Ziel: Die vorliegende Arbeit weist mittels immunhistochemischer Färbungen Lymphknotenmetastasen (N0(i+)) bei Prostatakarzinomen nach radikaler Prostatektomie mit R0-Resektion und initialer N0-Klassifizierung nach und untersucht deren Bedeutung für Rezidive.

Methodik: 1924 Patienten mit PCa aus der Datenbank der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Charité, die zwischen 1999 und 2014 mittels RPE therapiert wurden, wurden nach Lymphknotenstatus (N0), Zustand der Resektionsränder bei RPE (R0) und Vorhandensein von Metastasen (M0) selektiert. Die Lymphknotenpräparate von 197 Patienten wurden mittels immunhistochemischer Färbung (MNF116), bei positivem Ergebnis zusätzlich mittels PSMA-Färbung bearbeitet.

Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Mithilfe von bivariaten Korrelationsanalysen, t-Test, Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test sowie Kreuztabellen, Chi-Quadrat-Test bzw. dem Fisher-Exakt-Test wurden metrische und kategoriale Variablen analysiert und in Q-Q-, Streu-, Balkendiagrammen oder Box Plots dargestellt. Die Kaplan-Meier-Methode dient der Berechnung des rezidivfreien Überlebens (RFS). Abschließend wurden Testgütekriterien berechnet um einen Überblick über den Nutzen der untersuchten immunhistochemischen Färbungen zu erhalten.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 2352 Lymphknoten (LK) von 197 Patienten (12 LK pro Patient) mit PCa mittels HE-Färbung und Immunhistochemie (IHC) untersucht. Mittels IHC konnten in den Präparaten von 17 Patienten (8,6%) positive Reaktionen erkannt werden. In 10 Fällen waren ausschließlich ITC, in 3 Fällen Mikrometastasen und in 4

Fällen sowohl ITC als auch Mikrometastasen zu erkennen. Ein positiver Lymphknotenstatus war signifikant assoziiert mit einem höheren Gleason Score ($p=0,009$) und einer größeren Tumorfläche ($p<0,001$). Die Korrelationen mit dem T-Stadium ($p=0,143$) sowie mit dem präoperativen PSA-Wert ($p=0,369$) waren statistisch nicht signifikant. Ein BCR trat bei 45 von 195 Patienten (23,1%) auf. Das Auftreten eines BCR war signifikant mit einem positiven Lymphknotenstatus ($p<0,001$) und größerer Tumorfläche ($p=0,042$) assoziiert. Auch die Kaplan-Meier-Analyse beschreibt ein deutlich verringertes rezidivfreies Überleben für Patienten mit positivem Lymphknotenstatus ($p<0,001$). Die Zeit bis zum Auftreten eines BCR unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0,925$).

Schlussfolgerungen: Der Lymphknotenstatus zeigt prognostische Bedeutung für das Auftreten eines BCR. Ein Teil der BCR kann durch die Existenz von ITC und Mikrometastasen in Lymphknoten erklärt werden. Die zusätzliche Anwendung von immunhistochemischen Färbungen scheint daher insbesondere bei Patienten mit höherem Gleason Score (≥ 8), höherem T-Stadium ($\geq pT3a$) und größerer Tumorfläche ($\geq 10\text{cm}$) einen diagnostischen Zugewinn zu erbringen.

Abstract

Background: 10% - 30% of patients with prostate cancer (PCa) treated by radical prostatectomy (RPE) and diagnosed as lymph node (LN) negative will have a biochemical recurrence (BCR). Although the BCR etiology is multifactorial, a significant proportion of these recurrences might be attributed to LNmetastases undetected by routine pathologic examination. The significance of isolated tumor cells (ITC) and micrometastasis remains unclear.

Purpose: The purpose of this study is to determine the incidence and clinical significance of occult LN metastasis (N0(i+)) in patients with PCa who are initially considered node negative (N0) by histological evaluation.

Methods: Data comes from the department of urology at *Charité - University Hospital Berlin* with data of 1,924 patients diagnosed with PCa and treated with RPE between 1999 and 2014. The database was searched for cases with node negative status (N0), negative surgical margins (R0) and the absence of metastasis (M0). 197 patients' RPE specimen were stained with antibodies against cytokeratines (MNF 116) and if positive against prostate specific membrane antigen (PSMA).

Statistical significance was accepted at the $p < 0,05$ level. Bivariate correlation analyses, t-test, Mann-Whitney-U-test or Kruskal-Wallis-test, cross tables, chi-square-test or Fisher-exact test were used to analyse metric and categorical variables. Graphs were completed using Q-Q-diagrams, scatterplots, box plots and bar graphs. The biochemical free survival (RFS) rates were calculated with the Kaplan-Meier method. Test quality criteria were calculated to get an overview of the diagnostic gain of immunohistochemistry (IHC).

Results: A total of 2352 LN obtained from 197 patients (12 LN per patient) with PCa were analysed histologically and by IHC. LN of 17 Patients (8,6%) were found positive. In 10 cases only ITC and in 3 cases micrometastasis were present, both were present in 4 cases. Positive LNs were significantly associated with a higher Gleason Score ($p = 0,009$) and a bigger tumor area ($p < 0,001$). Correlation with T-stage ($p = 0,143$) and preoperative PSA-level ($p = 0,369$) was not significant. BCR was diagnosed in 45 of 195

patients (23,1%) and was significant associated with positive LN ($p < 0,001$) and higher tumor area ($p = 0,042$). Kaplan-Meier analysis showed decreased recurrence free survival for patients with positive LN ($p < 0,001$).

Conclusion: Lymph node status has a prognostic significance for developing a BCR. Some of the cases with BCR can be explained by ITC and micrometastasis. The additional use of IHC for patients with higher Gleason Score (≥ 8), higher T-stage ($\geq pT3a$) and bigger tumor area adds an important diagnostic gain to a routine histological evaluation.

Abkürzungsverzeichnis

BCR	Biochemisches Rezidiv
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CD31	Oberflächenantigen auf Endothelzellen
D2-40 (Podoplanin)	Oberflächenantigen auf lymphatischen Endothelzellen
DRU	Digitale rektale Untersuchung
GS	Gleason Score
H&E- Färbung	Hematoxylin- Eosin- Färbung
IHC	Immunhistochemie
ISUP	International society of urological pathology
ITC	Isolierte Tumorzellen
kDa	kiloDalton
LK-	Lymphknoten in der IHC negativ
LK+	Lymphknoten in der IHC positiv
MRT	Magnetresonanztomographie
NPV	Negativer prädiktiver Wert
OS	Gesamtüberleben (Overall survival)
PAP	Saure Phosphatase
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIN	Intraepitheliale Neoplasie
PPV	Positiver prädiktiver Wert
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RFS	Rezidivfreies Überleben (Recurrence free survival)
RPE	Radikale Prostatektomie
TG	Tertiärgrad
TNM	Tumor-Lymphknoten-Metastasen (von engl.: Tumor-node-metastasis)
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UICC	Union internationale contre le cancer (dt.: International Vereinigung gegen Krebs)
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Stadien des PCa.....	8
Tabelle 2: Schnittrandbeurteilung nach <i>UICC</i>	9
Tabelle 3: Stadieneinteilung nach <i>UICC</i>	9
Tabelle 4: Kodierung von immunhistochemischen und molekularpathologischen Befunden.....	10
Tabelle 5: Ein- und Ausschlusskriterien	19
Tabelle 6: Klinische Daten.....	26
Tabelle 7: Ergebnisse der Prostata- und Tumorflächenbestimmung	27
Tabelle 8: Assoziation des Alters mit Lymphknotenstatus	34
Tabelle 9: Assoziation der Follow up - Zeit in Monaten mit Lymphknotenstatus.....	35
Tabelle 10: Assoziation des Gleason Scores mit Lymphknotenstatus.....	36
Tabelle 11: Vergleich der IHC-Ergebnisse zwischen den Gleason Score-Gruppen	36
Tabelle 12: Vergleich der IHC-Ergebnisse zwischen pT-Stadien.....	37
Tabelle 13: Entfernte Lymphknoten während RPE	38
Tabelle 14: Tumorfläche des gesamten Patientenkollektiv und in den Gruppen LK- und LK+	40
Tabelle 15: PSA-Werte des gesamten Patientenkollektivs und in den Gruppen LK- und LK+	41

Tabelle 16: Übersicht für die Variablen Ergebnis der IHC und Auftreten eines BCR im Verlauf.....	42
Tabelle 17: Assoziation zwischen der Zeit in Monaten bis zum BCR und dem Lymphknotenstatus	43
Tabelle 18: Assoziation des rezidivfreien Überlebens mit dem Lymphknotenstatus.....	44
Tabelle 19: Aufschlüsselung der positiven Ergebnisse der IHC.....	47
Tabelle 20: Testkriterien für alle Patienten mit Daten zum Auftreten eines BCR.....	47
Tabelle 21: Testkriterien für die verschiedenen Gleason Score Gruppen.....	48
Tabelle 22: Testkriterien für die verschiedenen T-Stadien	48
Tabelle 23: Testkriterien für verschiedene Tumorflächenwerte.....	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zonale Gliederung der Prostata im Frontalschnitt nach Coakley	4
Abbildung 2: modifiziertes Gleason Grading nach Epstein	6
Abbildung 3: Markierung aller identifizierbaren Tumorloci unter dem Mikroskop	23
Abbildung 4: Rastergitterzählung	23
Abbildung 5: Anzahl der während RPE entfernten Lymphknoten	27
Abbildung 6: makroskopische Darstellung einer H&E-Färbung	28
Abbildung 7: PCa in Lymphspalte	29
Abbildung 8: PCa ohne stromale Reaktion.....	30
Abbildung 9: Pankeratinfärbung (MNF116).....	31
Abbildung 10: Pankeratinfärbung (MNF116) und PSMA-Färbung	32
Abbildung 11: Nachweis der lymphovaskulären Invasion, L1	33
Abbildung 12: Alter in den Gruppen LK- und LK+	34
Abbildung 13: Follow-up-Zeit in Monaten	35
Abbildung 14: Verteilung von LK+ und LK- auf die T-Stadien	37
Abbildung 15: Anzahl der in RPE entfernten Lymphknoten in den Gruppen LK- und LK+	38
Abbildung 16: Streudiagramm für Anzahl der in OP entfernten Lymphknoten (x-Achse) und Alter der Patienten (y-Achse)	39

Abbildung 17: Verteilung der Tumorfläche in den Gruppen LK- und LK+	40
Abbildung 18: Verteilung des PSA-Wertes in den Gruppen LK- und LK+	41
Abbildung 19: Verteilung der IHC-Ergebnisse in den Gruppen LK- und LK+	42
Abbildung 20: Darstellung der Zeiten bis zum BCR in den Gruppen LK- und LK+	43
Abbildung 21: Rezidivfreies Überleben in den Gruppen LK+ und LK-	44
Abbildung 22: Rezidivfreies Überleben der verschiedenen Gleason Score Gruppen ≤ 6 , 7a, 7b und ≥ 8	45
Abbildung 23: Rezidivfreies Überleben der verschiedenen T-Stadien pT2a, pT2b, pT2c, pT3a	45
Abbildung 24: Tumorfläche in den Gruppen " BCR im Verlauf" und "kein BCR im Verlauf"	46

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die zweithäufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Todesursache unter Männern weltweit(1,2). In Deutschland allein werden jährlich ca. 65.800 Männer mit einem PCa diagnostiziert(3). Dies entspricht einem ungefähren Anteil von 25% an allen diagnostizierten Krebserkrankungen (4). Damit ist das PCa in der Bundesrepublik die häufigste Krebserkrankung. Im Vergleich der Mortalität liegt das PCa jedoch deutlich hinter dem Lungenkarzinom und dem kolorektalen Karzinom (5).

Das mittlere Erkrankungsalter für das PCa liegt in Deutschland bei ca. 69 Jahren(4). Die Inzidenz des PCa ist seit den Neunzigern um 50% gestiegen. Hierfür werden zwei Ursachen angegeben(3):

1. Durch die Einführung der Kontrolle des prostataspezifischen Antigen (PSA) zu Beginn der 80er Jahre werden PCa entdeckt, die vorher länger oder sogar lebenslang unentdeckt blieben(6).

2. Der Anteil der Männer über 60 Jahren an der Gesamtbevölkerung stieg in den letzten Jahrzehnten stetig an und damit auch die Anzahl an PCa Neuerkrankungen. Im Jahre 1980 machten die über 60 Jährigen noch 19,5% der deutschen Bevölkerung aus, heute dagegen sind es bereits 26,6%(7).

Eine PSA-Kontrolle wird neben der digitalen rektalen Untersuchung (DRU) ab dem 50. Lebensjahr für die jährliche Vorsorgeuntersuchung empfohlen(8,9). Daraus ergibt sich auch, dass der Anteil der Neuerkrankungen im Altersbereich zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr enorm zugenommen hat. Vor dem 50. Lebensjahr kommt das PCa nur selten vor(3). Durch die Vorsorgeuntersuchungen werden zunehmend PCa in

frühen Tumorstadien entdeckt, die sich durch eine bessere Prognose mit einer längeren tumorfreien Lebenszeit und einer verlängerten Lebenserwartung auszeichnen (6).

1.2 Ätiologie

Die exakte Ätiologie des PCa ist bis heute nicht abschließend geklärt. Neben dem eindeutigen Zusammenhang des testosteronabhängigen Wachstums konnte das PCa auch mit genetischen(4,10), ethnographischen(4,10), diätetischen (11-14) Faktoren und der sexuellen Aktivität(15) in Zusammenhang gebracht werden.

Genetische Faktoren scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen. Das relative Risiko ein PCa zu entwickeln ist bei positiver Familienanamnese eindeutig erhöht (10). Weiterhin wird es durch ein jüngeres Alter betroffener Familienmitglieder, steigende genetische Übereinstimmung zum erkrankten Familienmitglied und steigende Anzahl individuell betroffener Familienmitglieder erhöht(4).

Die Inzidenz des PCa variiert innerhalb der Weltbevölkerung sehr stark. Insgesamt zeigt sich ein signifikant erhöhtes Auftreten im westlichen Teil der Welt, insbesondere in Australien und Neu Seeland (104,2 pro 100.000 Einwohner), Westeuropa (93,1 pro 100.000) und Nordamerika (85,6 pro 100.000). Sehr niedrige Inzidenzen herrschen in Nordafrika (8,1 pro 100.000) und Asien (7,2 pro 100.000) (4,10).

Auch innerhalb Europas ist ein deutliches Gefälle von Westen nach Osten zu erkennen, des Weiteren von Norden (73,1 pro 100.000) nach Süden (50 pro 100.000) (10). In zahlreichen Analysen werden diese Gefälle auf unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und sozioökonomische Faktoren zurückgeführt (11-14).

Giles et al. (15) konnten in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der sexuellen Partner und dem Auftreten von PCa feststellen. Dies spricht gegen eine Infektion als Risikofaktor für dessen Entwicklung. Die Studie stellte jedoch einen negativen Zusammenhang zwischen einer hohen Ejakulationsfrequenz, vor allem im Alter zwischen 20 und 40 Jahren, und der Inzidenz des PCa fest.

1.3 Anatomie der Prostata

1.3.1 Lage

Die Prostata, die so genannte Vorsteherdrüse, liegt im Becken kaudal der Harnblase und umgibt die Harnröhre. Nach laterokaudal reicht sie an den Beckenboden und M. levator ani heran. Ventral wird sie durch eine Bindegewebsfaszie und Stroma von der Symphyse getrennt, dorsal ist sie durch die Denonvillier'sche Faszie mit dem Rektum verbunden bzw. abgegrenzt. Dies macht die digitale Untersuchung via des Rektums möglich(16). Die Prostata besitzt eine muskulofibröse Kapsel und ist in bindegewebiges Stroma eingebettet. Dorsal liegen ihr die Samenblase und die Vasa deferentes auf. Die Prostata wird in der Literatur oft bildlich durch eine Esskastanie beschrieben, der sie in Größe und Form ähnelt. Bei der Geburt wiegt die Prostata ca. 2g und entwickelt bis hin zum 40. Lebensjahr ein Gewicht von ca. 40g(16).

1.3.2 Anatomische Unterteilung

Die histologische Gliederung in Zonen (Abbildung 1(17)) hat auch klinische Bedeutung, da die Zonen mit unterschiedlichen Pathologien verbunden sind(16,18). Die Einteilung nach McNeal hat heute größte Bedeutung (19):

- periphere Zone (70% der Organmasse, dorsal-kaudal-lateral)
- zentrale Zone (25% der Organmasse, kranial-keilförmig)
- Periurethralzone (schmaler Bereich um Urethra mit urethraeigenen Drüsen)
- Transitionalzone (Übergang zwischen Periurethral- und peripherer Zone)
- anteriore drüsenfreie Zone aus fibromuskulärem Stroma

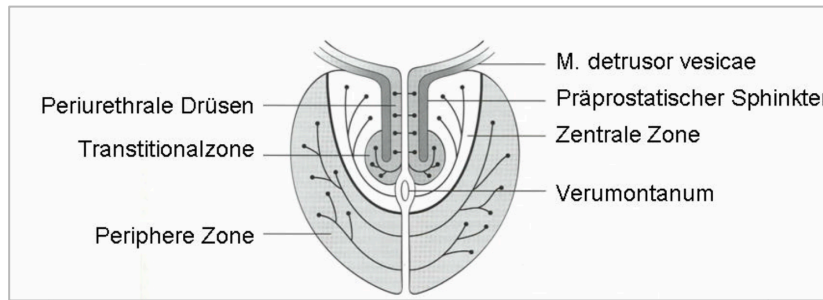


Abbildung 1: Zonale Gliederung der Prostata im Frontalschnitt nach Coakley

Das PCa entwickelt sich in der Mehrzahl der Fälle in der peripheren Zone, welche durch ihre dorsale Lage der DRU zugänglich ist. Für die benigne Prostatahyperplasie sind die Transitional- und Periurethralzone von großer Bedeutung(18,19).

1.3.3 Gefäßversorgung

Die arterielle Versorgung erfolgt über Rami prostatici aus der Arteria vesicalis inferior und der Arterie rectalis media. Das venöse Blut fließt über den Plexus venosus vesicales und prostatici in die Venae vesicales ab (16).

1.3.4 Metastasierungswege

Das PCa metastasiert sowohl lymphogen, als auch hämatogen. Die hämatogene Metastasierung tritt in der Regel erst spät ein, führt dann jedoch oft erstmals zu klinischen Symptomen.

Die Prostataadrüse hat einen komplexeren Lymphabfluss als viele andere Organe, da die Lymphe nicht nur über eine Bahn drainiert wird, sondern über ein komplexes Netz. Zu diesem Netz gehören vor allem die Lymphknoten im Bereich der Fossa obturatoria und entlang der externen Iliakalgefäße, aber auch die pararektalen Lymphknoten und jene entlang der internen Iliakalgefäße (16). Diese komplexe Lymphdrainage erschwert diagnostische Möglichkeiten der Ausbreitungsdiagnostik im Sinne einer *sentinelnode*-Technik.

Der hämatogene Metastasierungsweg führt über die venösen Plexi im Bereich des Beckens zu ossären Metastasen, vor allem im Bereich der Wirbelsäule und der Beckenknochen. Hämatogene Fernmetastasen in Leber und Lunge sind seltener(18).

1.4 Pathologie der Prostata

Die Prostata ist eine exokrine Drüse, welche ein Sekret bildet und dieses während der Ejakulation abgibt. Die Drüsen der Prostata werden von einem zweischichtigen Epithel aus Basalzellen und Hauptzellen ausgekleidet. Je nach sekretorischer Aktivität sind diese kubisch oder zylindrisch. Zusätzlich befinden sich endokrine Zellen im Epithel. Charakteristisch sind außerdem zahlreiche glatte Muskelzellen im Stroma, die der Emission des Prostatasekretes dienen(19). Das dünnflüssige Prostatasekret enthält u.a. das prostataspezifische Antigen (PSA) und die saure Phosphatase (PAP). Ein erhöhter Nachweis von PSA und PAP im Serum ist bei Prostatakarzinomen häufig. Im klinischen Alltag ist die serologische Bestimmung von PAP durch die sensitivere aber weniger spezifische PSA-Bestimmung weitgehend komplett ersetzt worden. Auch bei Prostatitis kann der PSA-Wert im Serum ansteigen(19).

Das PCa entsteht vor allem in der peripheren Zone und ist in bis zu 80% (20)multifocal(18). Histologisch handelt es sich fast immer um Adenokarzinome (18), welche in 2 Typen eingeteilt werden. Das azinäre Adenokarzinom ist der häufigste Typ, das duktales Adenokarzinom tritt in ca. 5% in reiner Form und häufig periurethral auf. Deutlich seltener findet man histologische Sonderformen wie Urothelkarzinome, Plattenepithelkarzinome und das kleinzellig-neuroendokrine Karzinom(18). Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) stellt die Vorläuferläsion des PCa dar. Mehrschichtiges Epithel aus dysplastischen Zellen mit prominenten zentralständigen Nukleolen bei intakter Basalmembran und eine reduzierte Anzahl von Basalzellen sind kennzeichnend für die PIN (18).

Klinisch kann weiter das latente, das inzidentelle und das okkulte PCa unterschieden werden. Das latente PCa wird klinisch nicht manifest und erst bei einer Autopsie entdeckt. Bei bis zu 80% der Autopsien von über 80 Jährigen wird ein latentes PCa entdeckt(18). Das inzidentelle PCa wird zufällig bei einer histologischen Untersuchung

entdeckt, z.B. bei einer transurethralen Resektion wegen benigner Prostatahyperplasie. Das okkulte PCa wird aufgrund von Metastasen diagnostiziert, während der Primärtumor in der Prostata bis zu diesem Zeitpunkt unentdeckt bleibt.

1.5 Klassifizierung

1.5.1 Gleason Grading

Das Gleason Grading dient zur Einschätzung des Malignitätsgrades des diagnostizierten Tumors und hat entscheidende therapeutische Bedeutung.

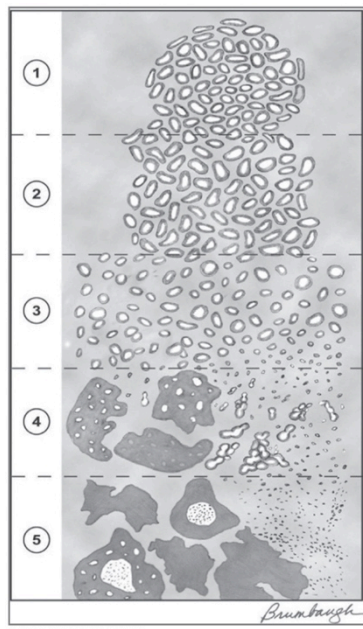


Abbildung 2: modifiziertes Gleason Grading nach Epstein

Donald Gleason begann in den Sechziger Jahren nach einem Schema zu suchen, um das PCa histologisch zu klassifizieren. Seit seiner Einführung ist der Gleason Score (GS) stetig modifiziert worden, um den aktuellen Standards gerecht zu werden, und ist bis heute der Standard für das Grading eines PCa. Der GS unterteilt allein anhand der Drüsenarchitektur, zytologische Kriterien werden nicht berücksichtigt. Wachstumsmuster des PCa werden nach Gleason in fünf Gruppen unterteilt, wobei die PCa mit Muster 1 und 2 den normalen Prostatadrüsen ähnlicher sind, als PCa mit Muster 4 und 5 (Abbildung 2(21)). Da die Prostatakarzinome zumeist unterschiedliche

Wachstumsmuster aufweisen, wird zwischen dem prädominanten (primäres Muster) und dem zweithäufigsten Wachstumsmuster (sekundäres Muster) unterschieden. Zählt man die Werte des primären und sekundären Wachstumsmusters zusammen, so erhält man den GS, der einen Wert zwischen 2 und 10 annimmt. Ein höherer GS entspricht einer stärkeren Entdifferenzierung und somit einer schlechteren Prognose (18,22). 2005 hat die *international society of urological pathology (ISUP)* den GS vollständig überarbeitet und aktualisiert.

Die vollständige Angabe des Tumorgradings nach Gleason erfolgt wie folgt: primäres Muster + sekundäres Muster = GS (z.B.: 3+4=7).

Falls das prädominante Wachstumsmuster mehr als 95% der Gesamttumormasse ausmacht, spricht man von einem einheitlichem Wachstumsmuster des PCa und die Werte für das primäre und sekundäre Muster sind gleich (z.B.: 3+3=6).

Mit dieser Regelung werden schlecht differenzierte Tumoranteile, die weniger als 5% der Gesamttumormasse ausmachen, ignoriert. Doch auch kleine, sehr wenig differenzierte Areale können klinische Relevanz besitzen. Daher wird seit der Überarbeitung des Gleason Grading durch die *ISUP(23)2005* empfohlen bei RPE-Präparaten einen Tertiärgrad (TG) anzugeben, falls ein Wachstumsmuster mit weniger als 5% Anteil an der Gesamtmasse eine geringere Differenzierung aufweist als das primäre und sekundäre Wachstumsmuster (z.B.: 3 + 4 = 7, mit TG 5) (21).

Für die Anwendung des GS bei Stanzbiopsien ist ebenfalls eine Sonderregelung zu beachten (23,24). Neben dem prädominanten Wachstumstyp sollte für die Stenzen nicht der zweithäufigste Wachstumstyp angegeben werden, sondern der Wachstumstyp mit der geringsten Differenzierung (z.B.: Beispiel: Gleason 3 + 5 = 8) (21). Eine weitere Neuerung ist, dass verschiedenen Stenzen verschiedenen GS zugeordnet werden sollen, wenn diese sich unterscheiden.

Die Existenz des GS 1+1=2 für ein PCa wurde über Jahre von vielen Pathologen angezweifelt und soll seit 2005 als atypische adenomatöse Hyperplasie beschrieben werden (21,23,24). Das Grading eines PCa beginnt daher bei einem GS 3.

Nach den S3-Leitlinien für die Diagnostik und Therapie des PCa kann ergänzend zum GS das Grading System der WHO (nach Mostofi) genutzt werden (4). Dabei werden zusätzlich zur Drüsenstruktur auch zytologischen Kriterien wie nukleäre Atypien beachtet. Beim WHO Grading werden Punkte von 1 bis 5 nach zunehmender Entdifferenzierung der Drüsen vergeben. Dazu werden Punkte von 1 bis 3 nach zunehmenden Zellkernabweichungen addiert. Es ergibt sich als Summe ein WHO Grad von 2 bis 8. Insgesamt ist das WHO-Grading-System klinisch deutlich unbedeutender als das Gleason Grading.

1.5.2 Staging

Die Beurteilung des Tumorstadiums erfolgt nach dem TNM-System der *Union internationale contre le cancer (UICC)*, das weltweit angewandt wird. Es werden die örtliche Ausdehnung des Tumors (T), die Lymphknoten (N; von englisch: node) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Diese Informationen sind entscheidend für Therapie und Prognose.

Für die Prostata gilt laut *UICC* folgende Einteilung (25):

Tabelle 1: TNM-Stadien des PCa

TX	Es kann keine Aussage zur Ausdehnung des Primärtumors getroffen werden.
T1	Der Tumor ist nicht sich- oder tastbar. Er wird zufällig im Rahmen einer Prostataoperation wegen BPH oder erhöhter PSA-Werte gefunden (inzidentelles PCa).
T1a	Der Tumor befällt weniger als 5% des Gewebes.
T1b	Der Tumor befällt mehr als 5% des Gewebes.
T1c	Der Tumor wurde durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert.
T2	Der Tumor liegt noch innerhalb der Prostatakapsel.
T2a	Der Tumor befällt weniger als 50% eines Seitenlappens.
T2b	Der Tumor befällt mehr als 50% eines Seitenlappens.
T2c	Der Tumor befällt beide Seitenlappen.
T3	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel hinaus ausgebreitet.
T3a	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet ohne die Samenblasen zu befallen.
T3b	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet und befällt die Samenblasen.

T4	Der Tumor hat Nachbarstrukturen infiltriert oder ist fixiert .
NX	Es kann keine Aussage zu regionären Lymphknotenmetastasen getroffen werden.
N0	Keine Metastasen in den regionären Lymphknoten.
N1	Metastasen in den regionären Lymphknoten.
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar.
M1	Der Tumor hat Fernmetastasen gebildet.
M1a	Metastasen in anderen Lymphknoten (nicht regionäre Lymphknoten).
M1b	Metastasen in den Knochen
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

Anmerkung: Die regionären Lymphknoten sind die Lymphknoten des kleinen Beckens, d.h. vor allem die Lymphknoten unterhalb der Bifurkation der AA. Iliacai communes.

Eine zusätzliche Einteilung befasst sich mit dem Ausmaß der nach der Operation verbliebenen Tumormasse an den Schnittträgern des Resektionspräparates(25).

Tabelle 2: Schnitttrandbeurteilung nach UICC

RX	Die Schnittträger können nicht beurteilt werden.
R0	Negativer Schnitttrand
R1	Mikroskopisch positiver Schnitttrand
R2	Makroskopisch positiver Schnitttrand

Zur besseren Handhabung werden die PCa aufgrund ihrer TNM-Klassifikation in vier klinische Stadien mit unterschiedlichen Prognosen eingeteilt (Tabelle 3)(25). Die Stadien I und II werden als lokal begrenztes PCa zusammengefasst und weisen eine sehr gute Prognose ohne Verminderung der Lebenserwartung auf. Das Stadium III und Stadium IV ohne Metastasen werden als lokal fortgeschrittenes PCa klassifiziert. Im Stadium IV mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen wird das PCa als fortgeschrittenes oder metastasiertes PCa bezeichnet (4).

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach UICC

Stage I	T1, T2a	N0	M0
Stage II	T2b, T2c	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
Stage IV	T4	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Die Lymphknotenmetastasen können aufgrund ihrer Größe weiter unterteilt werden. Metastasen, die größer als 0,2mm sind und die Größe von 2mm nicht überschreiten, werden Mikrometastasen genannt und mit pN1mi kodiert(26). Isolierte Tumorzellen (ITC) sind einzelne Tumorzellen oder Tumorzellverbände, die eine Größe von 0,2mm nicht überschreiten(26). Sie zeigen häufig keine für Metastasen typische Aktivität wie Stromareaktion, Proliferation oder Invasion von Gefäßen(25). Nach UICC sind isolierte Tumorzellen als pN0 und M0 zu klassifizieren(Tabelle 4). Empfohlen wird ein Zusatz wie z.B. (i+) oder (mol+), abhängig davon, ob der Nachweis immunhistochemisch oder molekularbiologisch (z.B. mittels PCR) erfolgt ist(26).

Tabelle 4: Kodierung von immunhistochemischen und molekularpathologischen Befunden

pN0	pM0	negative histologische Untersuchung, keine immunhistochemische Untersuchung, keine molekularbiologische Untersuchung
pN0(i-)	pM0(i-)	negative histologische Untersuchung, negative immunhistochemische Untersuchung
pN0(i+)	pM0(i+)	negative histologische Untersuchung, positive immunhistochemische Untersuchung
pN0(mol-)	pM0(mol-)	negative histologische Untersuchung, negative molekularbiologische Untersuchung
pN0(mol+)	pM0(mol+)	negative histologische Untersuchung, positive molekularbiologische Untersuchung

1.6 Prostata-spezifisches Antigen

Das PSA ist seit seiner Entdeckung der wesentliche Bestandteil in der Früherkennung des PCa. Weiterhin dient es zur Prognoseabschätzung, Therapieempfehlung, Überwachung des Fortschrittes des PCa und Therapiekontrolle (27). Das PSA wird androgenreguliert von den luminalen Epithelzellen der Prostata gebildet und durch Kontraktion der glatten Muskelzellen im Stroma der Prostata als Bestandteil des Ejakulates in die Harnröhre abgegeben. Das PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease mit einem Molekulargewicht von ca. 28,4 kDa. Die physiologische Hauptaufgabe des PSA ist die Verflüssigung des Ejakulats (28). Das PSA ist ein organspezifischer, jedoch nicht karzinomspezifischer Marker. Zur Erhöhung des PSA können neben dem PCa u.a. auch führen:

- benigne Prostatahyperplasie (BPH)
- Prostatitis
- Adenom
- Prostatainfarkt
- Manipulation (DRU, Rad fahren, Zystitis, Katheterisierung)
- sexuelle Aktivität

Der initiale PSA-Wert entscheidet über das weitere Vorgehen. Serum-PSA-Werte $<2\text{ng/ml}$ sollten in einem Intervall von 2 Jahren untersucht werden(4). Bei Werten $>2\text{ng/ml}$ hingegen sollte mindestens jährlich untersucht werden (4,9). Besonders der "Graubereich" zwischen $4\text{-}10\text{ng/ml}$ bereitet Schwierigkeiten in Diagnose und Therapieentscheidung(8). In diesem Bereich befinden sich ca. 20% der Patienten mit BPH (28), aber auch ca. 25% mit organbezogenem PCa(21). Werte $>2\text{ng/ml}$ sollten in einem 1-Jahresintervall kontrolliert und $>4\text{ ng/ml}$ sollten daher durch Feinnadelbiospien abgeklärt werden (4,29). PSA-Werte $>10\text{ng/ml}$ sind grundsätzlich karzinomverdächtig(8,9).

Seit der Einführung des PSA-Screenings zu Beginn der 80er Jahre werden vermehrt PCa im frühen Tumorstadium und bei jüngeren Patienten diagnostiziert. Dies führte zu einem Ansteigen der Inzidenz des PCa mit einem verringerten mittleren Erkrankungsalter und einer verlängerten mittleren Überlebenserwartung (6). Dennoch ist die Bestimmung des PSA-Wertes umstritten und es gibt große Bemühungen spezifischere Methoden zur sicheren Diagnostik eines PCa zu finden. Dazu zählen neben verschiedenen Subformen des PSA und altersentsprechenden Referenzgrenzen auch die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, die PSA-Verdopplungszeit und die PSA-Dichte. Die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit, auch *PSAvelocity* genannt, korreliert positiv mit der Aggressivität des Rezidivs. Ein Anstieg $>0.75\text{ng/ml}$ pro Jahr soll laut Epstein et al. (21) als kritische Grenze betrachtet werden, unabhängig vom absoluten PSA-Wert. Eine PSA-Verdopplungszeit <6 Monate weist auf ein BCR oder eine Metastasierung hin (28). Die PSA-Dichte beschreibt den PSA-Wert bezogen auf das Prostatavolumen. Eine erhöhte Dichte ($>0.15\text{ ng/ml/cm}^3$) spricht dabei für ein Karzinom⁽³⁰⁾, da eine entartete Zelle im Vergleich zu einer gesunden Prostatadrüsenzelle mehr PSA sezerniert. Da vor allem der PSA-Wertebereich von 4ng/ml bis 10 ng/ml Schwierigkeiten in der Diagnose und Therapie des PCa bereitet,

kann die Bestimmung der PSA-Dichte besonders in diesem Bereich zur verbesserten Diagnostik beitragen. So haben laut Wang et al.(31) bei gleichem PSA Wert Patienten mit einem geringeren Prostatavolumen ein höheres Karzinomrisiko.

Weitere Werte, die zur genauere Beurteilung eines PCa herangezogen werden, sind bestimmte Subformen des PSA. Das totale (gesamte) PSA (tPSA) setzt sich im Blut aus verschiedenen Fragmenten zusammen, zu denen u.a. das freie PSA gehört. In zahlreichen Studien (32-35)konnte im Vergleich zum tPSA eine genauere Aussage des fPSA für das Auftreten eines PCa getroffen werden. Auch der PSA-Quotient aus fPSA zu tPSA ist ein guter Indikator. Sowohl das fPSA als auch der fPSA/tPSA-Quotient weisen laut der zuvor genannten Studieneine höhere Spezifität als die alleinige Bestimmung des tPSA auf. Noch besser eignet sich laut zahlreichen neueren Studien (36-38)der Prostatic Health Index (PHI). Für diesen muss zusätzlich zu den oben genannten Werten das [-2]-proPSA bestimmt werden(39). Zusammengefasst werden das tPSA, fPSA und [-2]-proPSA im PHI, der wie folgt berechnet wird: $PHI = ([-2]proPSA / fPSA) * \sqrt{tPSA}$. Bisher gibt es keinen einheitlichen Geltungsbereich für PHI. In verschiedenen Studien wurde Phi für unterschiedlichenPSA-Werte validiert, beispielhaft waren diese in der Arbeit von Houlgatte et al. (40) im Bereich von 1,6-8 ng/ml nach WHO-Standardisierung. Catalona et al.(41) zeigten eine verbesserte Sensitivität von PHI gegenüber der alleinigen PSA-Wert Bestimmung in einem Bereich von 2-10 ng/ml.

Als Reaktion auf die Unklarheit bezüglich der Effektivität eines Prostatascreening mittels PSA-Bestimmung wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika die PLCO-Studie und in Europa die ERSPC-Studie konzipiert(42). In den USA konnte bei jährlicher PSA-Kontrolle und einer Follow-up-Zeit von 13 Jahren ein deutlicher Anstieg der PCa vermerkt werden. Die PCa-Sterblichkeit hingegen unterschied sich zwischen gescreenten und nicht gescreenten Patienten nicht(43). In der europäischen Studie ERSPC konnten nach 11 Jahren Follow-up in der Gruppe mit jährlichen PSA-Wert-Kontrollen deutlich mehr PCa verzeichnet werden. Hier war die PCa-bezogene Sterblichkeit in der Gruppe mit jährlichen Kontrollen signifikant reduziert(42).

Trotz all der Bemühungen hat sich bisher keine der beschriebenen zusätzlichen diagnostischen Methoden als erfolgreich flächendeckend durchgesetzt.

1.7 Weitere Diagnostik

Die digitale rektale Untersuchung (DRU) ist ab dem 50. Lebensjahr als Bestandteil der Krebsvorsorge empfohlen (4). Bei familiärer Belastung sollte sie bereits ab dem 45. Lebensjahr durchgeführt werden (4,29). Die Untersuchung sollte dabei stets nach der Blutabnahme zur PSA-Bestimmung erfolgen, um eine Verfälschung durch Manipulation am Organ zu verhindern. Form, Lage, Konsistenz, Abgrenzbarkeit und Druckschmerzhaftigkeit der Prostata können beschrieben werden. Typisch für ein PCa sind steinharte knotige Veränderungen. Auch bei negativem PSA gilt bei positivem Tastbefund der Verdacht auf ein PCa (4). Eine Metaanalyse ergab für die DRU eine Sensitivität von durchschnittlich 59% und eine Spezifität von durchschnittlich 94% (44). Eine endgültige Dignitätsbeurteilung lässt sich durch die DRU nicht durchführen.

Die bildgebende Untersuchung der ersten Wahl ist der transrektale Ultraschall (TRUS). Jedoch ist die Aussage dieser diagnostischen Methode allein sehr eingeschränkt und dient daher eher als ergänzende Diagnostik. Auf Malignität deuten Lappenasymmetrien und Veränderung im Bereich der Prostatakapsel hin. Die TRUS ist sehr nützlich zur Volumetrie der Prostata und wird außerdem zur ultraschallgesteuerten Feinnadelbiopsie verwendet (4).

Die Indikation zur Prostatastanzbiopsie ergibt sich bei positiver DRU oder erhöhtem Serum-PSA-Wert. Nach aktuellem Standard sollen zehn bis zwölf, mindestens jedoch sechs Stanzzyylinder, nach dokumentiertem Schema aus Apex, Mitte und Basis der Prostata entnommen werden. Das Volumenmissverhältnis zwischen Biopsiematerial und Prostatagröße kann zu einem falsch-negativen Ergebnis führen (4).

Zur Beurteilung des Skelettes als häufigster Metastasierungsort des PCa (18) wird eine Szintigrafie mit Technetium-markierten Phosphonaten durchgeführt. Unklare szintigraphische Befunde werden in der Regel durch eine Magnetresonanztomographie (MRT) abgeklärt. Indikationen zu einer Szintigrafie sind ein PSA-Wert $>10\text{ng/ml}$ mit histologisch gesichertem PCa, ein $\text{GS} \geq 8$, ein T-Stadium ab cT3 sowie Knochenschmerzen (4,45). Die MRT wird sowohl in den Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft als auch international bislang nicht zur primären Diagnostik eines PCa empfohlen (4). Bei Verdacht auf PCa und negativer Stanzbiopsie spielen

funktionelle MRT-Techniken, wie die diffusionsgewichtete oder dynamische kontrastmittelangehobene MRT eine Rolle (4,45). Eine neuere Methode, welche bei mehrfach negativen Stanzbiopsien und weiterhin bestehendem Karzinomverdacht an einzelnen Kliniken durchgeführt wird, ist die MRT-Ultraschall-Fusions-Biopsie. Durch die Einarbeitung von zuvor aufgenommenen MRT-Bildern in das Ultraschallprogramm, kann die Biopsie gezielter erfolgen. Der Erfolg der Methode muss noch mittels Studien überprüft werden. Erste Ergebnisse weisen auf eine erhöhte Detektionsrate des PCa in Stanzbiopsien hin. Bei Verdacht auf ein lokal-fortgeschrittenes Karzinom sollte zudem vor Strahlentherapie und ab einem cT3 klassifizierten Karzinomeine MRT des Beckens erfolgen(4,45).

1.8 Therapie

Grundsätzlich besteht die Therapie des PCa aus mehreren Säulen:

- der aktiven Überwachung (*Active Surveillance*)
- dem lokalen kurativen Therapieansatz
- der palliativen Therapie (u.a. *Watchful Waiting*).

Als Voraussetzung für eine aktive Überwachungmittels regelmäßiger PSA-Kontrollen müssen laut Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft folgende Kriterien erfüllt sein (4):

- PSA-Wert <10ng/ml
- GS≤6
- cT1c und cT2a
- Tumor in ≤2 Stanzen
- ≤ 50 % Tumor pro Stanze

Abweichend von den genannten Kriterien der S3 Leitlinie für das PCa (4) richten sich Kliniker zunehmend nach erweiterten Einschlusskriterien für die *Active Surveillance*. Die neuesten Erkenntnisse werden sich in der überarbeiteten Version der Leitlinie, welche im kommenden Jahr publiziert wird, widerspiegeln.

Wenn eines der oben genannten Merkmale nicht (mehr) den angegebenen Grenzen entspricht, sollte direkt zu den kurativen Therapieansätzen übergegangen werden. Zu diesen gehören

- die (nervenerhaltende) radikale Prostatektomie
- die externe perkutane Strahlentherapie
- die Brachytherapie

Die radikale Prostatektomie kann als offenes Verfahren über einen retropubischen oder perinealen Zugang oder als laparoskopische RPE mit oder ohne Roboter-Assistenz bzw. als endoskopisch-extraperitoneales Verfahren durchgeführt werden. Je nach Risikostratifizierung anhand des GS (>6), des klinischen Stadiums (ab cT1c) und des PSA-Wertes ($>10\text{ng/ml}$) wird über die Durchführung und das Ausmaß der Lymphadenektomie entschieden. Bei einer Durchführung sollten mindestens 10(4,46,47), besser 20 Lymphknoten entfernt werden, da eine vermehrte Anzahl von entfernten Lymphknoten eine höhere Wahrscheinlichkeit eines positiven Befundes aufweist und so ein zuverlässigeres Staging und damit eine verbesserte Therapieanpassung ermöglicht(48,49).

Das *Watchful Waiting* bezeichnet ein Prinzip, bei dem eine palliative Therapie nicht bereits nach Diagnose, sondern erst beim Auftreten von Beschwerden begonnen wird. Diese ist vor allem bei Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren in Betracht zu ziehen (4).

Beim fortgeschrittenen und metastasiertem PCa kommen die Strahlentherapie oder die Hormontherapie mit Orchiektomie oder Gabe von antiandrogenen Medikamenten zum Einsatz um dem Tumor so den Wachstumsreiz zu entziehen(4).

2 Herleitung der Fragestellung

Die hohe und steigende Inzidenz des PCa hat zwei dominante Ursachen. Zum einen werden durch verbesserte Diagnostik Tumore eher und in früheren Stadien entdeckt. Zum anderen steigt der Anteil der Männer über 50 Jahren an der Gesamtbevölkerung stetig an. Der Stellenwert des PCa und dessen Diagnostik und Therapie werden aus diesen Gründen zunehmend bedeutender und spielen auch finanziell für das Gesundheitssystem eine immer größer werdende Rolle(6).Die vermehrte Diagnose des PCa, v.a. in frühen Tumorstadien, führte zu einer vermehrten Diagnostik und Behandlung von Patienten, jedoch insgesamt nicht zu einer signifikanten Senkung der Mortalität(4,50). Daraus ergibt sich in der heutigen Literatur die Frage der Überdiagnostizierung und Übertherapie des PCa. Das Wort Überdiagnostizierung bezeichnet dabei die Diagnose eines Karzinoms, welches die Lebenserwartung des Patienten nicht verändert. Eine Therapie dieser nennt man Übertherapie(4).Auf einen verhinderten Todesfall kommen aktuell 48 Überbehandlungen(51).1410 Patienten müssen gescreent werden um einen PCa bezogenen Todesfall zu verhindern(50,51).Ein Schritt in die Richtung zur Vermeidung dieser Übertherapien, damit auf der einen Seite zur Vermeidung unnötiger Beschwerden für den Patienten, auf der anderen Seite aber auch zur Vermeidung unnötiger Kosten für das Gesundheitssystem, ist eine verbesserte präoperative Diskrimination zwischen behandlungsbedürftigen und nichtbehandlungsbedürftigen Patienten.

Die Routine-Hematoxylin-Eosin-(H&E)-Diagnostik, mit der die Operationspräparate der Prostata und der entfernten Lymphknoten standardmäßig untersucht werden, hat mehrere Schwächen. Vom gesamten Präparat werden nur einzelne Schnitte in unterschiedlichen Höher der Prostata und der Lymphknoten untersucht. So bleibt ein großer Teil des Gewebes unberücksichtigt und kleine Tumoren können leicht übersehen werden. Vor allem Lymphknoten können so fälschlicherweise als tumorfrei bezeichnet und als pN0 klassifiziert werden. Bei 10 %(52) bis zu 30 %(53-55) der Patienten, die nach RPE als Lymphknotenmetastasen frei und damit als geheilt bezeichnet wurden, ist ein erneuter PSA-Anstieg nachgewiesen.

Ein biochemisches Rezidiv (BCR) wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Es existiert die Angabe von 0,2 ng/ml als Grenzwert(4,45), aber auch 0,4 ng/ml(21,28,55,56) wird genannt. Das Auftreten eines BCR kann einen lokalen Fortschritt zum Beispiel in regionären Lymphknoten, aber auch zeitlich versetzt die Entwicklung von Fernmetastasen bedeuten(21,57). Patienten mit BCR zeigen eine deutlich verminderte Lebenserwartung gegenüber rezidivfreien Patienten (mit BCR: 10 Jahresüberlebenserwartung von 88%, ohne BCR: 10 Jahresüberlebenserwartung 93%)(57).

Eine mögliche Ursache für das Auftreten von Rezidiven bei Patienten mit RPE ohne Lymphknotenmetastasen können isolierten Tumorzellen (ITC) und Mikrometastasen darstellen(58,59). Die Theorie beschreibt Absiedlungen von Tumorzellen in die regionären Lymphknoten, die aufgrund der geringen Größe und der fehlenden Gewebereaktion der Routinediagnostik mittels HE-Färbung nicht erkannt werden, sodass Patienten nach RPE mit pN0, L0, V0 R0 als geheilt bezeichnet werden. Nach einer Latenzzeit jedoch entwickeln sich diese ITC und Mikrometastasen zu einem BCR oder klinisch apparenten Rezidiv. In zahlreichen Studien wurde das Auftreten von Rezidiven bei genannten Patienten bereits in Verbindung mit ITC und Mikrometastasen durch Nachweis von Tumorzellen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) gebracht(52,60-63). Bei diesen Patienten wurden die Zellabsiedlungen in den Lymphknoten in der HE-Routine Diagnostik übersehen. Viele Patienten, die durch ein Rezidiv nur noch palliativ therapierbar sind, hätten bei korrekter primärer Diagnostik und zusätzlicher adjuvanter Therapie eine verbesserte Lebenserwartung.

Obwohl die genauere Differenzierung nach dem Vorhandensein von ITC und Mikrometastasen im allgemeinen Staging des PCa von der *UICC* bereits beschrieben wird, ist dies noch nicht flächendeckend in die Routinediagnostik aufgenommen worden, obgleich auch Experten wie Schilling et al.(48) dazu raten. Bisher werden für die Prognose des PCa der Gleason-Score, die TNM-Kategorie und die chirurgischen Resektionsränder betrachtet.

Die PCR wird als wesentlich sensitiver als die H&E-Färbung beschrieben, ist jedoch wegen eines schlechten Kosten-Nutzen-Verhältnisses nicht für die Routinediagnostik geeignet(64). Eine weitere Möglichkeit Mikrometastasen in Lymphknoten zu

diagnostizieren, sind immunhistochemische Spezialfärbungen, zu denen neben der Färbung von PSA auch die Pankeratinfärbung MNF116 zählt.

Ziel der Studie von Schilling et al.(48) war es, die Sensitivität einer Keratinfärbung gegenüber der Standard-H&E-Färbung zu überprüfen. Die Ergebnisse lieferten keinen Hinweis auf eine verbesserte Diagnostik. Deng et al.(56) beschreiben eine sehr geringe (1%) Rate an okkulten Metastasen, die durch eine zusätzliche immunhistochemische Färbung nach HE-Färbung entdeckt werden konnten und empfehlen die Immunhistochemie daher nicht für die Routineuntersuchung. Pagliarulo et al.(58) und Freeman et al.(64) hingegen konnten für das Tumorstadium pT3N0 eine deutlich verbesserte Diagnostik von okkulten Lymphknotenmetastasen mithilfe der Immunhistochemie gegenüber der Routine-H&E-Färbung nachweisen. Des Weiteren beschreiben sie einen Zusammenhang zwischen okkulten Lymphknotenmetastasen und einem deutlich erhöhten Rezidivrisiko des PCa und einer verminderten Lebenserwartung. Ähnliche Ergebnisse werden auch in der Arbeit von Miyake et al.(59) beschrieben.

Insgesamt sind die Aussagen sehr uneinheitlich und weitere Untersuchungen auf diesem Feld sind nötig, um in Zukunft besser zwischen den verschiedenen Stadien des PCa zu unterscheiden und jedem Patienten somit die bestmögliche Therapie zukommen zu lassen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs, definiert als PSA Anstieg $>0,1$ ng/ml, und dem Nachweis von Tumorzellen mithilfe der Pankeratinfärbung MNF116 in histologischen Lymphknotenschnitten von ursprünglich nach RPE als frei von Tumorgewebe (N0, M0, R0) klassifizierten Patienten herzustellen. Es soll der Anteil von Patienten mit okkulten Lymphknotenmetastasen bestimmt werden, der fälschlicherweise als N0 klassifiziert wurde. Des Weiteren soll die Sensitivität und Durchführbarkeit der immunhistochemischen Färbung innerhalb der Routinediagnostik beurteilt werden.

3 Methodik

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Datenbank

Die vorliegende Dissertation ist in enger Kooperation des Instituts für Pathologie und der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Charité (Standorte Campus Mitte und Campus Benjamin-Franklin) angefertigt worden. Die prä- und postoperativen inklusive Follow-up Daten von 1924 Männern, bei denen zwischen 1999 und 2014 ein PCa diagnostiziert wurde und die in der hiesigen Klinik mittels RPE therapiert wurden, wurden in einer pseudonymisierten Datenbank der Klinik für Urologie nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission erfasst. Die histologische Beurteilung der Prostatektomie- und Lymphknotenpräparate erfolgte im Institut für Pathologie der Charité entsprechend der nationalen (S3(4)) und internationalen (*ISUP(23)*) Leitlinie bzw. Empfehlung.

3.1.2 Einschlusskriterien /Ausschlusskriterien

Die Patienten wurden anhand des pathologischen Befundberichtes und der klinischen Befunde wie folgt selektiert:

Tabelle 5: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
pT2, pT3	pT4
R0	R1/R2
pN0	pN1
M0	M1
	Nicht-azinäre PCa's (siehe 3.2)
	Unvollständigkeit der Datensätze
	Gewebeverfügbarkeit
	Andere Malignitätsdiagnose im Studienzeitraum

Nach Bereinigung der Datensätze mit Schwerpunkt auf vollständigen Datensätzen (Pathologiebericht, klinischer Verlauf, PSA-Wertkontrollen) und Prüfung der Gewebeverfügbarkeit konnten die Daten von 197 Patienten in dieser Studie betrachtet werden.

3.2 Schnittkontrolle

Zur Verifizierung der histopathologischen Diagnose und zum Ausschluss von histologischen Subtypen, die mit einem anderen klinischen Verlauf und nicht mit einer PSA-Erhöhung einhergehen können (z.B.: Urothel-, Plattenepithel-, Basalzellkarzinom), wurden alle originären Schnitte erneut durch einen Uropathologen begutachtet. Auch das duktales Karzinom wurde wegen der möglichen biologischen Unterschiede zu den gewöhnlichen azinären Karzinomen ausgeschlossen. Die Überprüfung des Nodal- und Resektionsrandstatus an den Archivschnitten erfolgte unter Nachahmung der Routinediagnostikbedingungen, d.h. insbesondere auf eine zeitlich und in der Auflösung übertriebene Mikroskopie der Lymphknoten wurde verzichtet. Nach histologischer Verifizierung konnten alle 197 Patienten in die Studie eingeschlossen werden.

Mindestens zwei karzinomtragende Blöcke in der Prostata wurden erneut geschnitten und mittels H&E-Färbung gefärbt. Für weitere immunhistochemische Untersuchungen wurden zusätzlich jeweils 6 Leerschnitte angefertigt.

Die Beurteilung der gefärbten Schnitte erfolgte am Lichtmikroskop durch die Verfasserin der Arbeit (T. Pross) betreut durch den Pathologen Dr. med. E. Kilic. Lymphknotenschnitte wurden als Metastasen-positiv betrachtet, wenn innerhalb des Lymphknotens immunoreaktive Zellen mit den morphologischen Charakteristika einer Tumorzelle zu erkennen waren. Tumorzellen in den Sinus der Lymphknoten ohne Stromainvasion wurden ebenfalls als LK-Metastasen bewertet.

3.3 Vorbereitung für Histologie und Immunhistochemie

Paraffinblöcke aus dem Archiv der Pathologie wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM235) in 3µm dicke Schnitte auf unbeschichtete Objektträger für die H&E-Färbung oder auf beschichtete SuperFrost/Plus® Objektträger für die anschließende Immunhistochemie (jeweils der Firma R. Langenbrinck) aufgezogen. Vor der Entparaffinierung wurden die Objektträger 10min bei 80 Grad gebacken.

3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Entparaffinierung, Rehydrierung, H&E-Färbung und Entwässerung erfolgte automatisiert mit dem linearen Färbeautomaten „medite tissue stainer COT20“. Nach automatisiertem Eindeckeln der Objektträger mit dem „DAKO coverslipper“ waren die Schnitte mikroskopierbereit.

3.5 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden automatisiert mit der „Benchmark XT IHC/ISH®“ der Firma Ventana durchgeführt. Alle Chemikalien für die Vorbereitung und eigentliche Durchführung der Färbungen wurden von der Firma Ventana bezogen. In dem geschlossenen System wurden die Präparate mit EZPrep. Lösung entparaffiniert und wässrige Reagenzien mit der „Coverslip Lösung LCS“ isoliert. Die Antigendemaskierung wurde mittels „Protease 1“ durchgeführt. Der jeweilige Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung manuell appliziert. Die DAB (Diaminobenzidin) Farbdarstellung mit braunem Endprodukt erfolgte mit dem „biotinfreien Kit ultraView Universal DAB Detection Kit“, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Nach-Gegenfärbung mit Bluing Reagenz. Die Eindeckelung wurde automatisiert durch den „DAKO coverslipper“ ausgeführt.

3.5.1 MNF116

Der monoklonale, von der Maus stammende Antikörper MNF116 (DAKO, M0821) ist ein sogenannter Pan-Keratinmarker und erkennt Keratine von 40kD-58kD, entsprechend der Keratine 5, 6, 8, 17 und 19. Karzinometastasen lassen sich mit MNF116 daher positiv darstellen. Tumorfremie Lymphknoten hingegen bleiben unmarkiert, da physiologisch keine Epithelzellen in Lymphknoten vorkommen. Allerdings lassen sich fibroblastische Retikulumzellen in Lymphknoten schwach mit MNF116 darstellen, die es gilt von Metastasen abzugrenzen (siehe 3.5.2). Der Antikörper gegen MNF116 wurde in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt.

3.5.2 Andere Färbungen

Exemplarisch und bei Fällen, bei denen in der MNF116-Immunfärbung nicht sicher zwischen einer Metastase und Retikulumzellen unterschieden werden konnte, wurde eine Immunfärbung gegen das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) in einer Verdünnung 1:50 (DAKO, M3620) durchgeführt. PSMA-Immunhistochemie ist hoch spezifisch und ist faktisch beweisend für ein Prostatakarzinom.

Ebenfalls exemplarisch wurden Färbungen gegen CD31 (DAKO, M0823, Verdünnung: 1:40) als Blutgefäßmarker und von Podoplanin (Klon D2-40, DAKO, M3619, Verdünnung: 1:200) als Lymphgefäßmarker zur Fragestellung eines lymphovaskulären Tumoreinbruchs durchgeführt.

3.6 Flächenbestimmung

Für die Bestimmung der Fläche von Prostata (ohne Samenblase und umgebendes Weichgewebe) und PCa wurden nach Markierung des Karzinoms unter dem Mikroskop und Kennzeichnung des umgebenden Weichgewebes ein Rastergitter mit einer Kantenlänge von 3mm auf die histologischen Schnitte gelegt, sodass die entsprechenden Kästchen ausgezählt werden konnten. Die Anzahl von gezählten Kästchen wurde auf dem Objektträger in folgender Form notiert: Anzahl Kästchen der

Prostata / Anzahl Kästchen PCa. Abbildung 3 und Abbildung 4 stellen dabei beispielhaft die verschiedenen Arbeitsschritte dar.



Abbildung 3: Markierung aller identifizierbaren Tumorloci unter dem Mikroskop

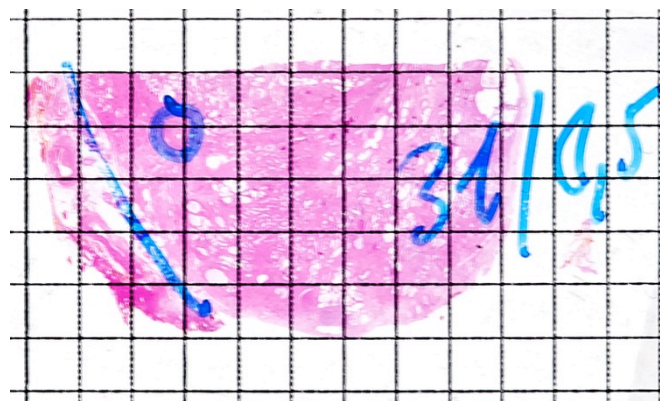


Abbildung 4: Rastergitterzählung

links: Kennzeichnung der Grenze zwischen Prostata- und Weichgewebe, mittig: zirkuläre Umrandung des Prostatakarzinoms, rechts: Ergebnis der Kästchenzählung Prostata/PCa

Die Berechnung der Fläche der Prostata und des PCa wurde anschließend mit folgender Formel durchgeführt: Tumurlänge (in mm) x Tumorbreite (in mm).

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde eigenständig durchgeführt und erfolgte mithilfe der Programme Microsoft Excel 2011 für Mac und IBM SPSS Statistics 22 für Windows. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in allen Tests mit p bezeichnet und statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen.

Für alle metrischen Variablen wurde die Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Z-Tests und graphischer Darstellung im Q-Q-Diagramm überprüft. Um zwei metrische Variablen auf einen Zusammenhang zu überprüfen, wurde die bivariate Korrelationsanalyse durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson r gibt das Ausmaß der Korrelation an. Zur Visualisierung wurden die Daten mithilfe eines Streudiagramms dargestellt (65).

Bei Analyse einer metrischen Variable und einer kategorialen Variable konnte im Falle normalverteilter Werte der Levene-Test auf Varianzgleichheit und anschließend ein Mittelwertevergleich mit dem T-Test durchgeführt werden. Waren die Stichproben nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test (2 Kategorien) oder der Kruskal-Wallis-Test (>2 Kategorien) für einen Mittelwertevergleich angewandt. Die graphische Darstellung erfolgte in diesem Fall aufgeschlüsselt nach der kategorialen Variable mithilfe von Boxplots (66,67). Um zweikategoriale Variablen zu analysieren wurden Kreuztabellen, der Chi-Quadrat-Test bzw. bei zu geringer Fallzahl der exakte Test nach Fisher verwendet. Häufigkeiten werden aufgeschlüsselt nach der kategorialen Variable mithilfe von Balkendiagrammen dargestellt. Die Kaplan-Meier-Methode dient der Berechnung einer Assoziation zwischen dem Ergebnis der IHC und einem rezidivfreien Überleben (RFS) und stellt dies graphisch dar. Immer dann, wenn für einen Fall ein Rezidiv auftritt, werden die Wahrscheinlichkeiten für ein rezidivfreies Überleben bzw. das Gesamtüberleben für die restlichen Fälle neu berechnet. Fälle, in denen bis zum Zeitpunkt dieser Studie kein Rezidiv aufgetreten ist, werden zensiert. Der Log-Rank-Test gehört zu den nicht-parametrischen Verfahren und ist der Standard für Gruppenvergleiche der Überlebenszeitanalyse. Er untersucht, ob die Überlebenszeiten in zwei Gruppen gleich lang sind. Hierzu wird nicht nur ein bestimmter Zeitpunkt, wie zum Beispiel die 1-Jahres-Überlebensrate betrachtet, sondern der gesamte Beobachtungszeitraum. Bei Erweiterung auf den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wird

mithilfe des Testes berechnet, ob mindestens eine der Gruppen sich signifikant unterscheidet(66,67).

Testgütekriterien werden berechnet um einen Überblick über den Nutzen eines Testverfahrens zu erhalten. In dieser Arbeit wird das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten eines Rezidivs als Grundlage der Berechnungen verwendet. Die Sensitivität bezeichnet wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Kranker von einem Test als krank erkannt wird. Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass tatsächlich Gesunde auch im Test als gesund erkannt werden. Für den klinischen Alltag bedeutender jedoch sind der positive und negative prädiktive Wert. Der positive prädiktive Wert (PPV) zeigt an, wie viel Patienten mit einem positiven Testergebnis auch wirklich erkrankt sind. Der negative prädiktive Wert (NPV) hingegen gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass man bei einem negativen Testergebnis auch wirklich gesund ist.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

Aus der Datenbank der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Charité (Standorte Campus Mitte und Benjamin-Franklin) ergeben sich nach Kontrolle der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 3.1.2) und Prüfung der Gewebeverfügbarkeit insgesamt 197 Patienten für diese Studie. Die klinischen Daten aller in die Studie eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Das Alter aller Patienten verteilte sich zwischen 51 und 87 Jahren mit einem Median von 74 Jahren. Um Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen gezielter betrachten zu können, wurde der Gleason Score (GS) in dieser Arbeit in vier verschiedene Gruppen gegliedert. Am häufigsten kam der GS 7 vor (61,5%). 7a=3+4 (44,2%) wurde deutlich häufiger diagnostiziert. Zur Gruppe der besonders gut differenzierten PCa's (GS≤6) gehören 22,3% der Tumore, 16,2% wurden als besonders schlecht differenziert (GS≥8) eingestuft. 68,1% der PCa sind auf die Grenzen der Prostatadrüsen beschränkt (pT2), wovon in 37,6% Karzinome in beiden Lappen auftraten (pT2c). In 32,0% der PCa konnte ein extraprostatatisches Tumorwachstum in das periprostatatische Fettgewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Klinische Daten

	alle Patienten n=197	
	n	%
Alter in Jahren		
Mittelwert	72	
Min-Max	51-87	
25%-75%	69-77	
IQR	8	
Gleason Score		
≤6	44	22,3
7a=3+4	87	44,2
7b=4+3	34	17,3
≥8	32	16,2
pT		
pT2a	20	10,2
pT2b	40	20,3
pT2c	74	37,6
pT3a	63	32,0

Entfernte Lymphknoten

pro Patient

Mittelwert	12
Min-Max	1-31
25%-75%	8-16
IQR	8

n: Anzahl, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand

Insgesamt wurden 2352 Lymphknoten von 197 Patienten entfernt. Daraus ergibt sich, dass pro Patient durchschnittlich 12 Lymphknoten entfernt wurden. Am häufigsten enthielten die Lymphadenektomiepräparate 11 und 12 Lymphknoten pro Patient (Tabelle 6, Abbildung 5).

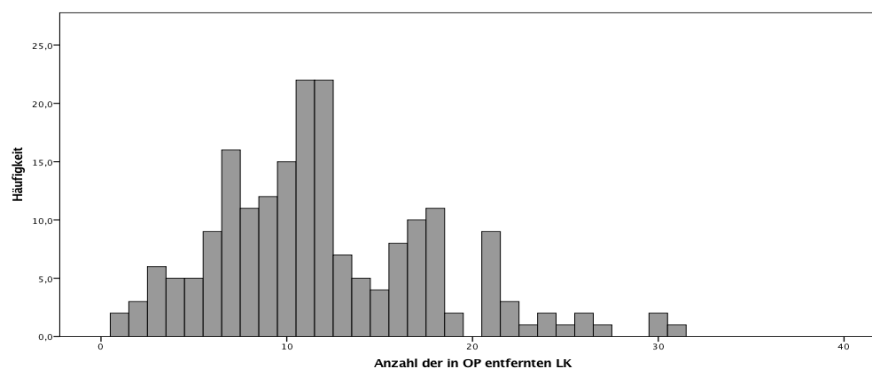


Abbildung 5: Anzahl der während RPE entfernten Lymphknoten

Für insgesamt 84 Patienten wurde mittels Rastergitterzählung (siehe 3.6) die Fläche der Prostata und des Tumors bestimmt. Die Prostatapräparate waren im Mittel 70,6cm² groß. Die Fläche der Karzinome verteilte sich zwischen 0,1cm² bis 29,2cm² mit einem Mittelwert von 5,5cm². Die Berechnung der Flächen aller vermessenen Prostata- und der Karzinompräparate sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 7: Ergebnisse der Prostata- und Tumorflächenbestimmung

Patienten n=84			
	Prostatafläche in cm ²	Tumorfläche in cm ²	Quotient Tumorfläche / Prostatafläche
Fläche			
Mittelwert	70,6	5,5	0,9
Min-Max	0,1-160,8	0,1-29,2	0,01-0,42
25%-75%	47,5-88,1	2,2-6,5	0,03-0,12
IQR	40,6	4,3	0,09

n: Anzahl, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand

4.2 Färbungen

Abbildung 6 stellt zwei Ausschnitte von Prostatapräparaten in H&E-Färbung nach Markierung der karzinomatösen Areale mittels Tinte dar. Die Markierung wurde wie in Absatz 3.6 beschrieben zur Vereinfachung der Volumenbestimmung des Karzinoms mittels Rastergitterzählung durchgeführt.

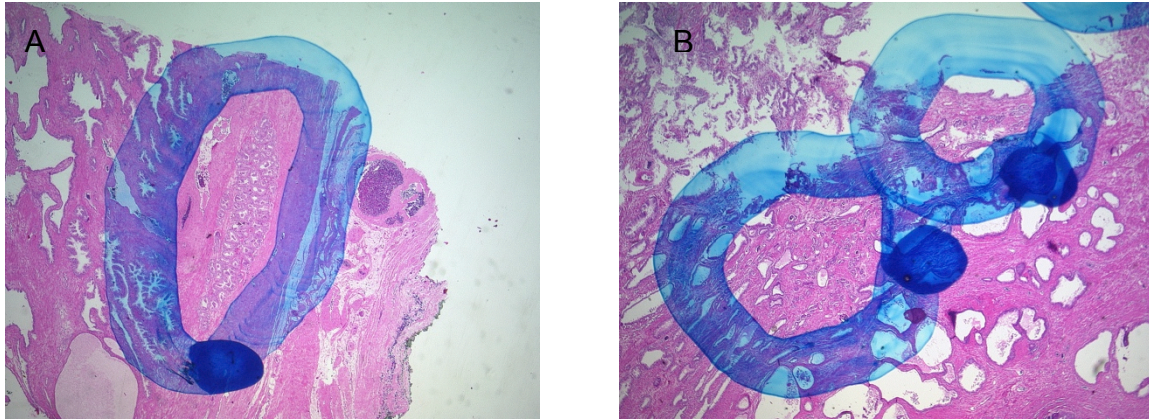


Abbildung 6: makroskopische Darstellung einer H&E-Färbung
nach Markierung der karzinomatösen Areale mittels Tinte von zwei verschiedenen Präparaten (A und B)

Abbildung 7 zeigt einen Ausschnitt eines Lymphknotenpräparates in H&E-Färbung. Nur schwer ist hier ein malignes Muster zu erkennen. Die Pankeratinfärbung (MNF116) erleichtert das Erkennen der karzinomatösen Zellen, welche sich im Bereich der Lymphspalten befinden.

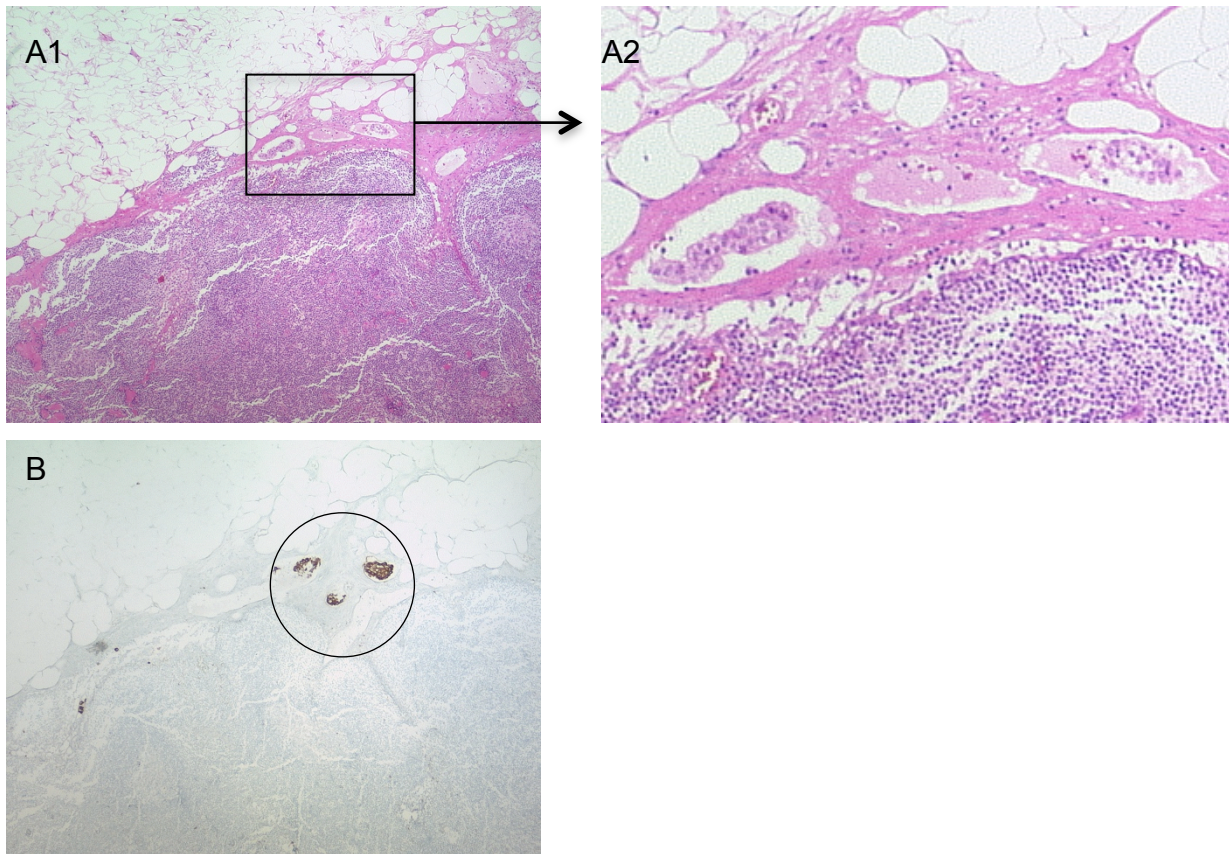


Abbildung 7: PCa in Lymphspalte

A1: Übersicht H&E-Färbung, A2: Ausschnittvergrößerung, B: Pankeratinfärbung (MNF116)

Abbildung 8 zeigt die H&E-Färbung eines weiteren Lymphknotenpräparates. Auch hier ist es sehr schwer, den karzinomatösen Bereich zu erkennen. Es sind weder starke Malignitätszeichen der Zellen noch eine Stromareaktion des umliegenden Gewebes auszumachen. Erst in der Pankeratinfärbung (MNF116) kann der maligne Bereich zweifelsfrei erkannt werden.

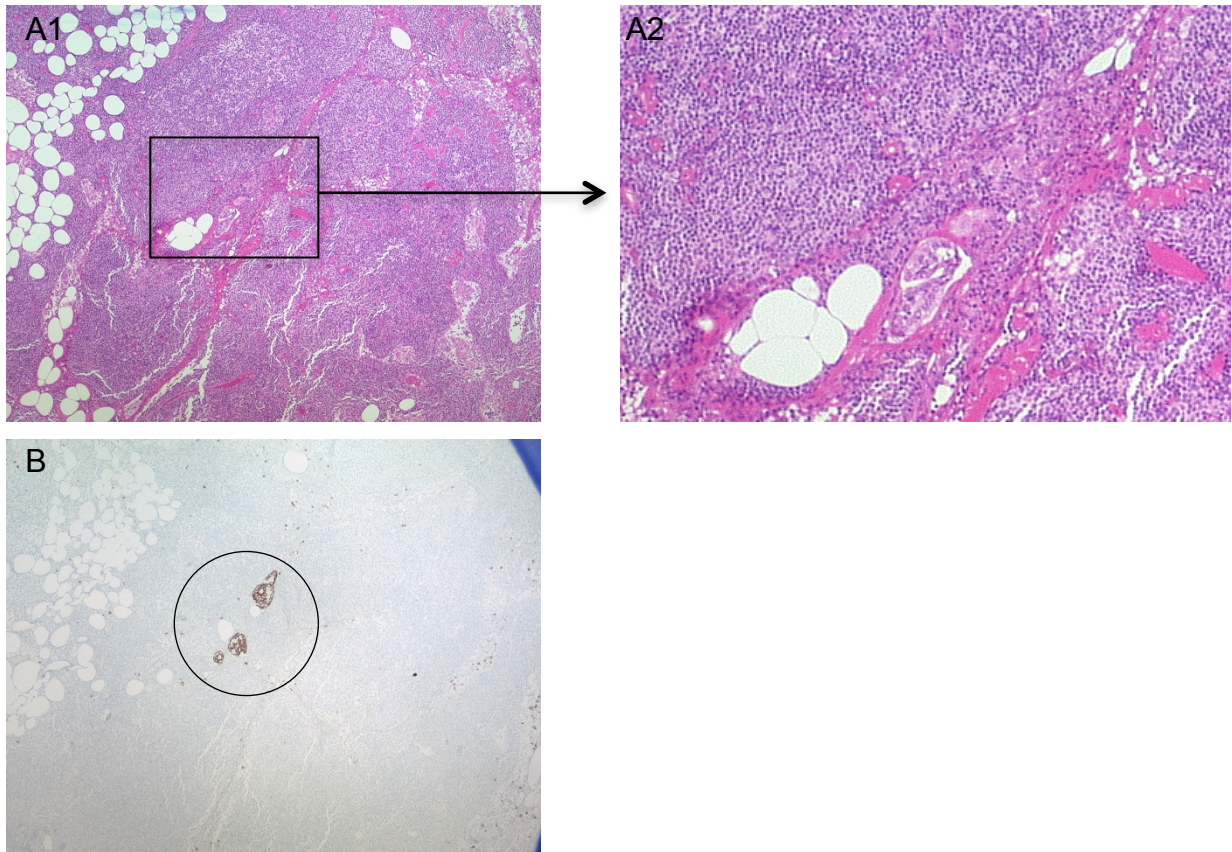


Abbildung 8: PCa ohne stromale Reaktion

A1: Übersicht H&E-Färbung, A2: Ausschnittvergrößerung, B: Pankeratinfärbung (MNF116)

Beispielhaft werden in Abbildung 9 zwei verschiedene Pankeratinfärbungen dargestellt, in denen man ITC und Mikrometastasen erkennen kann. Die Skalierung in der Aufnahme der Mikrometastasen macht eine Größenbestimmung von 250µm x 350 µm möglich.

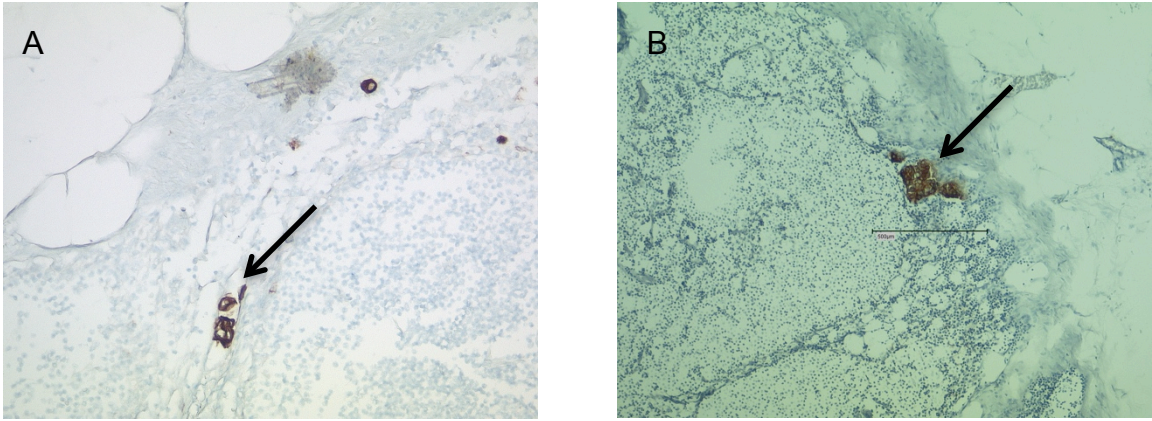


Abbildung 9: Pankeratinfärbung (MNF116)
A: ITC, B: Mikrometastasen

Anschließend wurde bei immunoreaktiven Präparaten eine Färbung gegen das prostataspezifische PSMA durchgeführt um die Prostata als Ursprung der Zellen nachzuweisen.

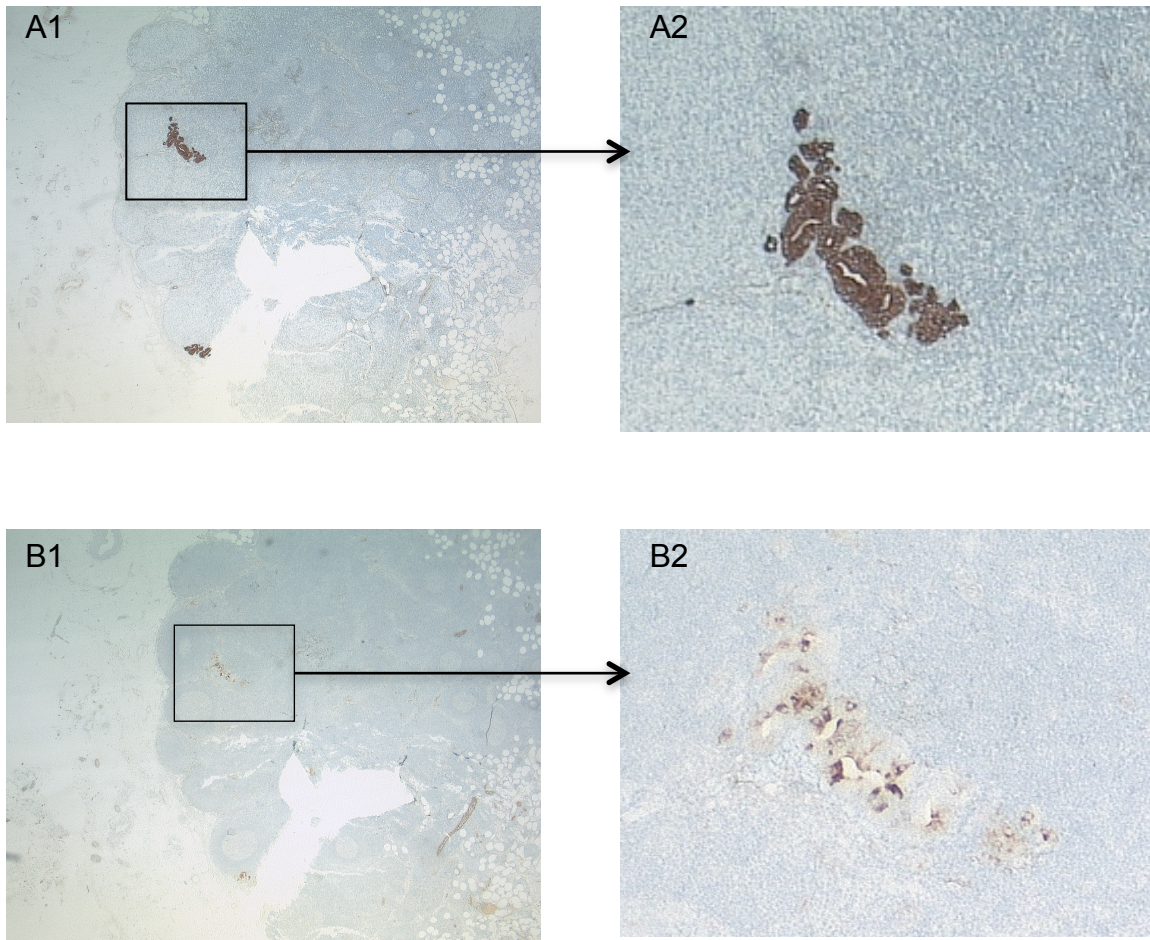


Abbildung 10: Pankeratinfärbung (MNf116) und PSMA-Färbung
A1: positive MNf116-Färbung mit A2 Ausschnittvergrößerung,
B1: schwach positive PSMA-Färbung mit B2 Ausschnittvergrößerung

Bezüglich der Fragestellung, ob in der Prostata bereits ein Einbruch der Karzinomzellen in die Lymphgefäße nachzuweisen ist, wurden exemplarisch Färbungen gegen CD31 zur Darstellung von Blutgefäßen und Färbungen gegen Podoplanin (D2-40) zur Darstellung von Lymphgefäßen durchgeführt. Im HE-Präparat der Abbildung 11 ist eine sichere Abgrenzung von Karzinomzellen wegen des durch Formalinfixierung bedingten Schrumpfspaltes nicht möglich. In der CD31- und in der Podoplanin-Färbung hingegen ist deutlich zu erkennen, dass es sich um Tumorzellen in einem Gefäßspalt handelt.

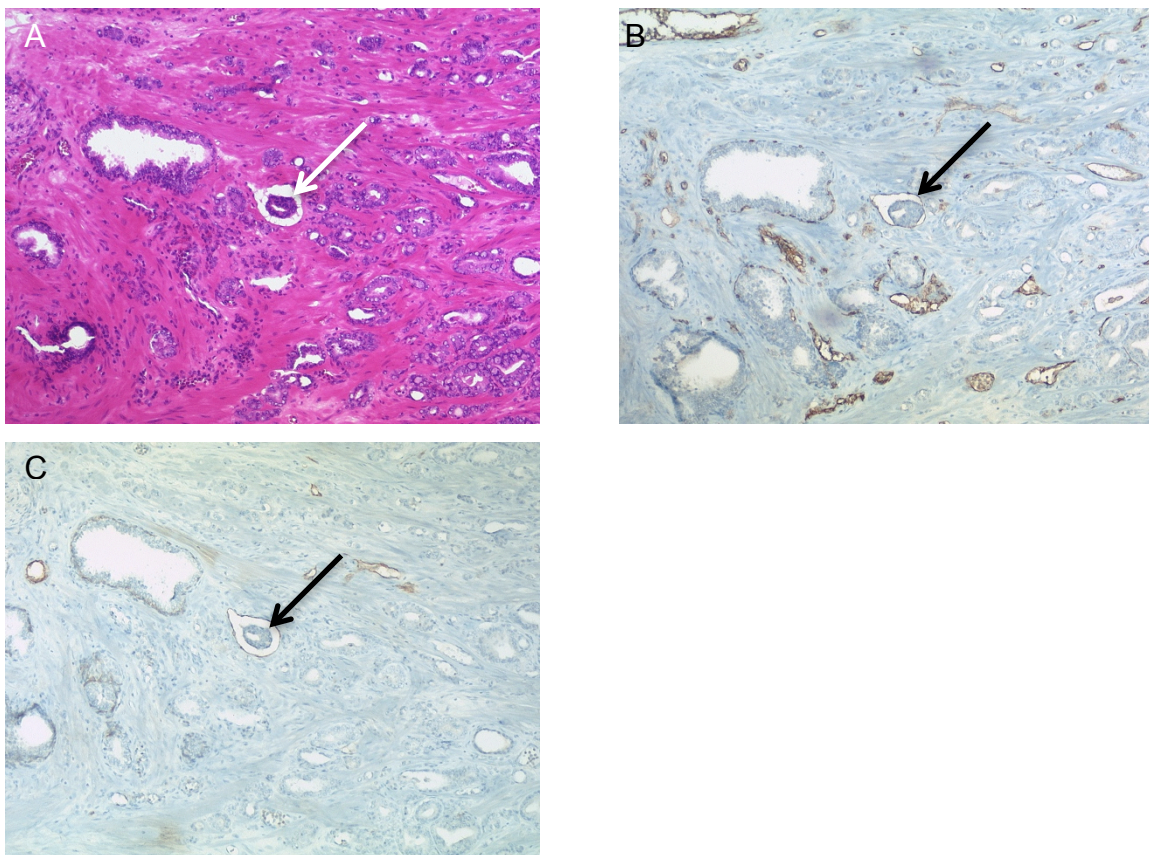


Abbildung 11: Nachweis der lymphovaskulären Invasion, L1
Pfeile zeigen auf immunoreaktive Zellen und Karzinomzellen im Gefäßspalt
A: HE-Färbung, B: CD 31-Färbung, C:D2-40-Färbung

4.3 Schließende Statistik

4.3.1 Vergleich des Alters bezüglich Lymphknotenstatus

In der Gruppe LK- (Lymphknoten in der Immunhistochemie negativ) war der Altersmittelwert 72 Jahre, der jüngste Patient 51 und der älteste Patient 87 Jahre alt. In der Gruppe LK+ (Lymphknoten in der Immunhistochemie positiv) variierte das Alter zwischen 61 und 85 Jahren mit einem Mittelwert von 75 Jahren.

Tabelle 8: Assoziation des Alters mit Lymphknotenstatus

	alle n=197	LK- n=180	LK+ n=17	p
	n	n	n	LK- vs. LK+
Alter in Jahren				
Mittelwert	72	72	75	0,146
Min-Max	51-87	51-87	61-85	
25%-75%	69-77	68-77	71-79	
IQR	8	9	8	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test

Bei einem Wert von $p < 0,001$ im Kolmogorow-Smirnow-Test kann keine Normalverteilung angenommen werden. Ein Ergebnis von $p = 0,146$ im Mann-Whitney-U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied des Alters zwischen den Gruppen LK+ und LK-. Die graphische Darstellung der Altersverteilung in den Gruppen LK+ und LK- erfolgte mittels BoxPlot (Abbildung 12).

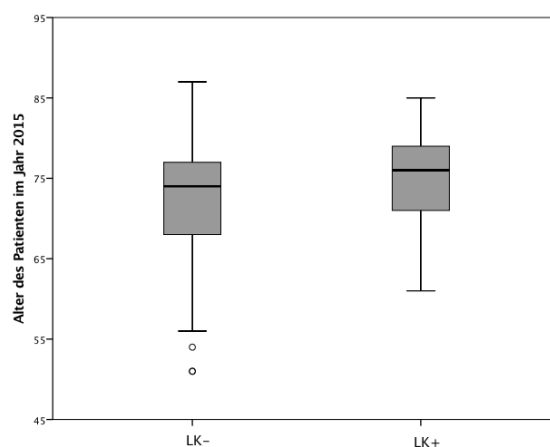


Abbildung 12: Alter in den Gruppen LK- und LK+

LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

4.3.2 Vergleich der Follow Up – Zeit bezüglich Lymphknotenstatus

In 2 Fällen fehlte eine Datumsangabe zum Zeitpunkt der zuletzt durchgeführten PSA-Bestimmung oder dem Todesdatum. Die restlichen 195 Patienten wurden durchschnittlich 79 Monate lang regelmäßig nachuntersucht. Die kürzeste Follow-up Zeit betrug 5 Monate, der längste postoperative Untersuchungszeitraum betrug 160 Monate.

Tabelle 9: Assoziation der Follow up - Zeit in Monaten mit Lymphknotenstatus

	alle n=195	LK- n=180	LK+ n=17	p
	n	n	n	LK- v. LK+
Follow up in Monaten				
Mittelwert	79	80	60	0,114
Min-Max	5-160	5-160	8-158	
25%-75%	30-135	31-135	24-68	
IQR	105	104	44	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test

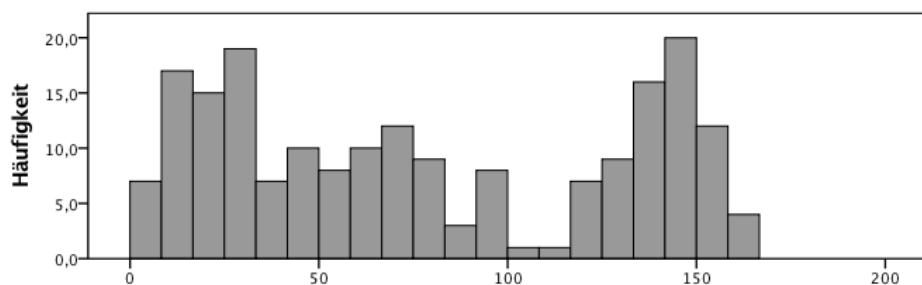


Abbildung 13: Follow-up-Zeit in Monaten
als Differenz zwischen OP-Datum und letzter PSA-Wert Bestimmung bzw. Todesdatum

Bei einem Wert von $p < 0,001$ im Kolmogorow-Smirnow-Test kann keine Normalverteilung angenommen werden. Ein Ergebnis von $p = 0,114$ im Mittelwertevergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied der Dauer der Follow-up-Untersuchungen zwischen den Gruppen LK- und LK+ gibt.

4.3.3 Vergleich des Gleason Scores bezüglich Lymphknotenstatus

In der Gruppe LK- wurde bei der Mehrheit der Patienten (45,6%) ein GS von 3+4=7a diagnostiziert (Tabelle 10). In der Gruppe LK+ war der GS von ≥ 8 am häufigsten vertreten (41,2%).

Tabelle 10: Assoziation des Gleason Scores mit Lymphknotenstatus

Gleason Score	alle n=197		LK- n=180		LK+ n=17	
	n	%	n	%	n	%
≤ 6	44	22,3	42	23,3	2	11,8
7a=3+4	87	44,2	82	45,6	5	29,4
7b=4+3	34	17,3	31	17,2	3	17,6
≥ 8	32	16,2	25	13,9	7	41,2

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der Fisher-Exakt-Tests für die Vergleiche der GS-Gruppen bezüglich der IHC-Ergebnisse. Dabei unterscheidet sich die Gruppe GS ≥ 8 signifikant von den Gruppen GS ≤ 6 , 7a und 7a+b, nicht jedoch von der Gruppe GS 7b. Auch unterscheidet sich die Gruppe GS ≥ 8 signifikant zu allen anderen Gruppen, wenn diese zusammengefasst sind (7b+7a+ ≤ 6). Fasst man GS 7b und ≤ 8 zusammen, unterscheiden sich diese signifikant von der Kohorte GS ≤ 6 +7a.

Tabelle 11: Vergleich der IHC-Ergebnisse zwischen den Gleason Score-Gruppen

Gruppenvergleich	n	n LK+	p
≥ 8 vs. ≤ 6	76	7 vs. 2	0,026*
≥ 8 vs. 7a+b	153	7 vs. 8	0,017*
≥ 8 vs. 7a	119	7 vs. 5	0,016*
≥ 8 vs. 7b	66	7 vs. 3	0,128
7b vs. 7a	121	3 vs. 5	0,399
7b vs. ≤ 6	78	3 vs. 2	0,378
7a vs. ≤ 6	131	5 vs. 2	0,565
≥ 8 vs. 7b + 7a + ≤ 6	197	7 vs. 10	0,009*
≥ 8 + 7b vs. 7a + ≤ 6	197	10 vs. 7	0,023*
≥ 8 + 7b + 7a vs. ≤ 6	197	15 vs. 2	0,221

n: Gesamtanzahl aller Patienten in den zu vergleichenden Gruppen, n LK+: Anzahl der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus in der Immunhistochemie in den zu vergleichenden Gruppen, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, *: Ergebnis ist statistisch signifikant; Testverfahren: Fisher-Exakt-Test

4.3.4 Vergleich der T-Stadien bezüglich Lymphknotenstatus

Die Verteilung der positiven und negativen Immunhistochemie-Ergebnisse bezogen auf die kategoriale Variable „T-Stadium“ wird in Abbildung 14 gezeigt.

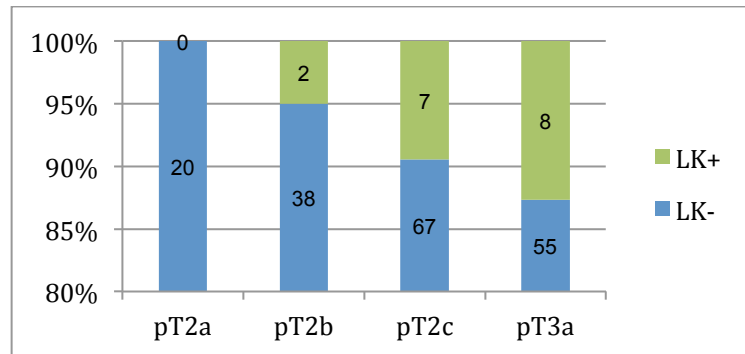


Abbildung 14: Verteilung von LK+ und LK- auf die T-Stadien

LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Gruppenvergleiche mittels Fisher-Exakt-Test zwischen den kategorialen Variablen LK in IHC positiv oder negativ und dem T-Stadium wiedergegeben. Mit Ergebnissen $>0,05$ lässt sich feststellen, dass sich keine der Gruppen signifikant von einer anderen Gruppe unterscheidet.

Tabelle 12: Vergleich der IHC-Ergebnisse zwischen pT-Stadien

Gruppenvergleich	n	n LK+	p
pT 2a vs 3a	85	0 vs. 8	0,092
pT 2b vs 3a	103	2 vs. 8	0,191
pT 2c vs 3a	137	7 vs. 8	0,392
pT 2 vs 3a	197	9 vs. 8	0,143
pT 2a vs 2b	60	0 vs. 2	0,419
pT 2a vs 2c	94	0 vs. 7	0,159
pT 2b vs 2c	112	2 vs. 7	0,333

n: Gesamtanzahl aller Patienten in den zu vergleichenden Gruppen, n LK+: Anzahl der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus in der Immunhistochemie in den zu vergleichenden Gruppen, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, *: Ergebnis ist statistisch signifikant; Testverfahren: Fisher-Exakt-Test

4.3.5 Vergleich der entfernten LK bezüglich Lymphknotenstatus

Pro Patient wurden in der RPE zwischen 1-31 Lymphknoten entfernt(Tabelle 13). Der Mittelwert in der Gruppe LK- ist etwas größer als der Mittelwert der Gruppe LK+, so auch das Verhältnis der Mediane (11vs.9).

Tabelle 13: Entfernte Lymphknoten während RPE

	Alle n=197	LK- n=180	LK+ n=17	p
	n	n	n	LK- v. LK+
Entfernte LK				
Mittelwert	12	12	11	0,201
Min-Max	1-31	1-31	3-27	
25%-75%	8-16	8-16	6-16	
IQR	8	8	10	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test

Bei einem Wert von $p < 0,001$ im Kolmogorow-Smirnow-Test kann keine Normalverteilung angenommen werden. Ein Ergebnis von $p = 0,201$ im Mittelwertevergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied der Anzahl der entfernten Lymphknoten in den Gruppen LK- und LK+ gibt. Die Verteilung und der Vergleich der Anzahl der entfernten Lymphknoten in den Gruppen LK- und LK+ kann in Abbildung 15 mithilfe eines BoxPlots betrachtet werden.

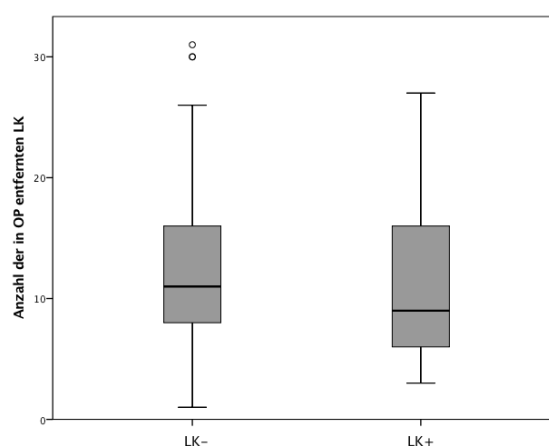


Abbildung 15: Anzahl der in RPE entfernten Lymphknoten in den Gruppen LK- und LK+
LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

Um eine eventuell vorhandene Verzerrung der Anzahl der entfernten Lymphknoten hinsichtlich älterer und kränkerer Patienten auszuschließen und damit den Vergleich

bezüglich des IHC-Ergebnisses zu verfälschen, wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Eine bivariate Korrelation konnte eine Verzerrung hinsichtlich des Alters ausschließen. Ein p-Wert von 0,399 und ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,06 machen deutlich, dass zwischen der Anzahl der entfernten Lymphknoten und dem Alter kein Zusammenhang besteht. Dies wird auch graphisch als Streudiagramm in Abbildung 16 dargestellt.

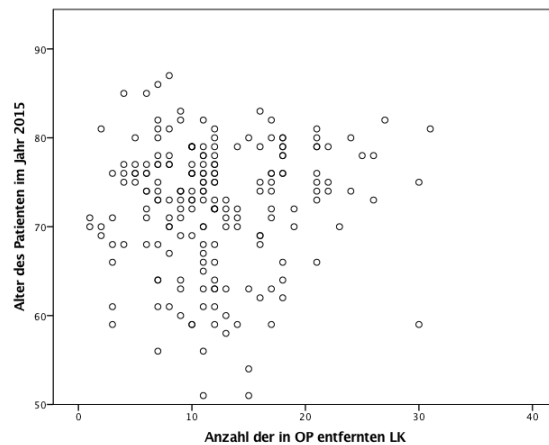


Abbildung 16: Streudiagramm für Anzahl der in OP entfernten Lymphknoten (x-Achse) und Alter der Patienten (y-Achse)

Eine Verzerrung der Anzahl der entfernten Lymphknoten zwischen den GS-Gruppen wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test ausgeschlossen. Ein Ergebnis von 0,619 zeigt, dass es zwischen den Gruppen $GS \leq 6$, 7a, 7b und ≥ 8 keinen signifikanten Unterschied der Anzahl der entfernten Lymphknoten gibt.

Um eine Verzerrung der Anzahl der entfernten Lymphknoten hinsichtlich des T-Stadiums aufzudecken, wurde ebenfalls ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Ein Ergebnis von 0,716 zeigt, dass es zwischen den Gruppen pT2a, pT2b, pT2c und pT3a keinen signifikanten Unterschied der Anzahl der entfernten Lymphknoten gibt.

4.3.6 Vergleich der Tumorfläche bezüglich Lymphknotenstatus

Die Tumorfläche aller Patienten ergab als Mittelwert einen Wert von $5,5 \text{ cm}^2$ und verteilte sich zwischen $0,1 \text{ cm}^2$ und $29,2 \text{ cm}^2$. In der Gruppe LK+ waren sowohl der Mittelwert ($10,8 \text{ cm}^2$) als auch das Minimum ($4,4 \text{ cm}^2$) deutlich größer.

Tabelle 14: Tumorfläche des gesamten Patientenkollektiv und in den Gruppen LK- und LK+

	alle n=84 in cm ²	LK- n=73 in cm ²	LK+ n=11 in cm ²	p LK+ v. LK-
Tumorfläche				
Mittelwert	5,5	4,6	10,8	<0,001
Min-Max	0,1-29,2	0,1-29,2	4,4-28,2	
25%-75%	2,2-6,5	2,2-5,3	5,7-16,3	
IQR	4,3	3,1	10,6	
Tumorfläche PCa/Prostata				
Mittelwert	0,9	0,07	0,19	<0,001
Min-Max	0,01-0,42	0,01-0,3	0,07-0,42	
25%-75%	0,03-0,12	0,02-0,1	0,09-0,29	
IQR	0,09	0,08	0,2	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; PCa/Prostata: Quotient aus Tumorfläche durch Prostatafläche; Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test

Bei einem Wert von $p < 0,001$ im Kolmogorow-Smirnow-Test kann keine Normalverteilung angenommen werden. Ein Ergebnis von $p < 0,001$ im Mittelwertevergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt, dass die mittlere Tumorfläche von Patienten mit positivem Lymphknotenstatus größer ist als die Tumorfläche von Patienten mit negativem Lymphknotenstatus. Auch der Vergleich des Quotienten aus Tumorfläche durch Prostatafläche zeigt, dass Tumore bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus signifikant größer waren als bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus.

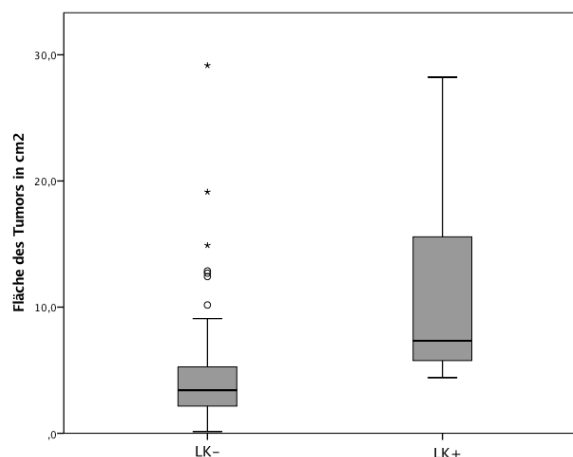


Abbildung 17: Verteilung der Tumorfläche in den Gruppen LK- und LK+
LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

4.3.7 Vergleich des PSA-Wertes bezüglich Lymphknotenstatus

Der präoperative PSA Wert aller Patienten wurde im Labor Berlin nach WHO-Kriterien bestimmt. Die Werte verteilten sich zwischen 0,25ng/ml und 66,53ng/ml mit einem Mittelwert von 7,16ng/ml. In der Gruppe LK- war der PSA-Mittelwert deutlich niedriger als der Mittelwert der Gruppe LK+ (6,73ng/ml vs. 11,80ng/ml).

Tabelle 15: PSA-Werte des gesamten Patientenkollektivs und in den Gruppen LK- und LK+

	alle n=197 in ng/ml	LK- n=180 in ng/ml	LK+ n=17 in ng/ml	p LK+ v. LK-
PSA				
Mittelwert	7,16	6,73	11,8	0,369
Min-Max	0,25-66,53	0,25-31,46	1,2-66,53	
25%-75%	3,65-7,67	3,66-7,44	3,49-11,29	
IQR	4,02	3,78	7,8	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test

Bei einem Wert von $p < 0,001$ im Kolmogorow-Smirnow-Test konnte keine Normalverteilung angenommen werden. Ein Ergebnis von $p = 0,369$ im Mittelwertevergleich mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den PSA-Wertverteilungen in den Gruppen LK- und LK+ gibt.

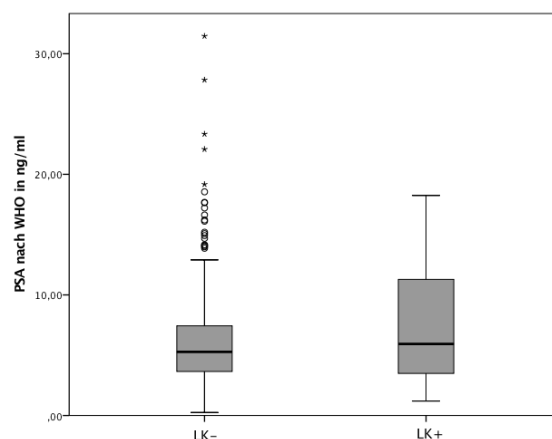


Abbildung 18: Verteilung des PSA-Wertes in den Gruppen LK- und LK+
LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

4.3.8 Vergleich des Auftretens eines BCR bezüglich Lymphknotenstatus

Als BCR wurde nach postoperativem Abfall unter die Nachweisgrenze ein Anstieg des Serum-PSA-Wertes nach WHO auf über 0,1 ng/ml definiert. Von den 197 Patienten fehlten in 2 Fällen Angaben zum postoperativen PSA-Wert, sodass diese für die Analyse nicht beachtet werden konnten. Bei 45 von 195 Patienten (23,1%) wurde im Verlauf ein BCR diagnostiziert. In 150 Fällen (76,9%) waren die PSA-Werte bis zum Ende der Untersuchungen für diese Arbeit (06/2015) unauffällig.

Tabelle 16: Übersicht für die Variablen Ergebnis der IHC und Auftreten eines BCR im Verlauf

		BCR im Verlauf		Gesamt
		Kein Rezidiv	Rezidiv	
LK-	Anzahl	144	34	178
LK+	Anzahl	6	11	17
Gesamt	Anzahl	150	45	195

LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, BCR: biochemisches Rezidiv

Ein Ergebnis von $p < 0,001$ im Fisher-Exakt-Test lässt schlussfolgern, dass der Anteil von immunhistochemisch positiven Fällen in der Gruppe „kein Rezidiv“ und „Rezidiv“ signifikant verschieden ist. Auch eine graphische Darstellung dieses Sachverhaltes wie in Abbildung 19 lässt dies erkennen.

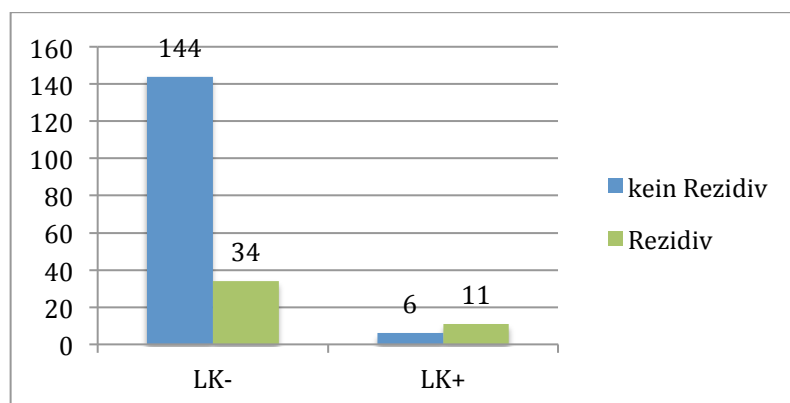


Abbildung 19: Verteilung der IHC-Ergebnisse in den Gruppen LK- und LK+
 LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

4.3.9 Vergleich der Zeit in Monaten bis BCR bezüglich Lymphknotenstatus

Von den 45 Patienten, die im Verlauf der Untersuchungen ein BCR entwickelten, fehlen in 4 Fällen die Angaben über den Zeitpunkt des PSA-Anstieges. Die Zeit bis zum BCR wurde in SPSS als Funktion aus „Zeitpunkt der Rezidivs – Zeitpunkt der Operation“ in Monaten berechnet.

Tabelle 17: Assoziation zwischen der Zeit in Monaten bis zum BCR und dem Lymphknotenstatus

	alle n=41	LK- n=31	LK+ n=10	p
	in Monaten	in Monaten	in Monaten	LK+ v. LK-
Zeit bis BCR				
Mittelwert	26,1	25,9	26,9	0,925
Min-Max	0-132	0-132	1-104	
25%-75%	9-38	9-38	4-40	
IQR	29	29	36	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, Min: Minimum, Max: Maximum, IQR: Interquartilsabstand; Testverfahren: t-Test

Ein Ergebnis von $p=0,200$ im Kolmogorow-Smirnow-Test weist auf Normalverteilung hin. Bei angenommener Varianzgleichheit ergibt sich im t-Test ein p-Wert von 0,925. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich die Zeit in Monaten vom Operationsdatum bis zum BCR in den Gruppen LK- und LK+ nicht signifikant unterscheidet. Eine graphische Darstellung des Sachverhaltes erfolgte mittels Boxplot (Abbildung 20).

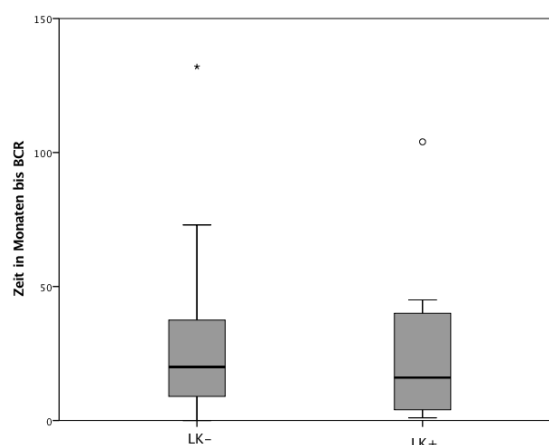


Abbildung 20: Darstellung der Zeiten bis zum BCR in den Gruppen LK- und LK+
BCR: Biochemisches Rezidiv, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie,
LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie

4.3.10 Rezidivfreies Überleben

Eine Kaplan-Meier-Analyse wurde hinsichtlich der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in den Gruppen LK+ und LK- durchgeführt. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die statistischen Merkmale des rezidivfreien Überlebens (*recurrence free survival, RFS*). Sowohl Median und Mittelwert der rezidivfreien Überlebenszeit als auch die 3- und 5-Jahresüberlebensrate sind in der Gruppe LK+ deutlich geringer. Ein Ergebnis von $p < 0,001$ im Log Rank-Test zeigt, dass es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den Gruppen LK+ und LK-. Eine graphische Darstellung des Sachverhaltes erfolgt in Abbildung 21. Auch hier lässt sich anhand der Kurven eine klare Überlegenheit der Kurve erkennen, welche das Überleben von Patienten mit negativem Lymphknotenstatus darstellt.

Tabelle 18: Assoziation des rezidivfreien Überlebens mit dem Lymphknotenstatus

	alle n=195	LK- n=178	LK+ n=17	p
	in Monaten	in Monaten	in Monaten	LK+ v. LK-
RFS				
Median	69	71	53	<0,001
Mittelwert	130	135	75	
CI	122-137	127-143	47-104	
3-Jahres-ÜR		93,4%	71,8%	
5-Jahres-ÜR		88,5%	39,9%	

n: Anzahl, LK-: Lymphknoten negativ in Immunhistochemie, LK+: Lymphknoten positiv in Immunhistochemie, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, RFS: Recurrence free Survival (Rezidivfreies Überleben), CI: Konfidenzintervall, ÜR: Überlebensrate; Testverfahren: Log Rank (Mantel-Cox)

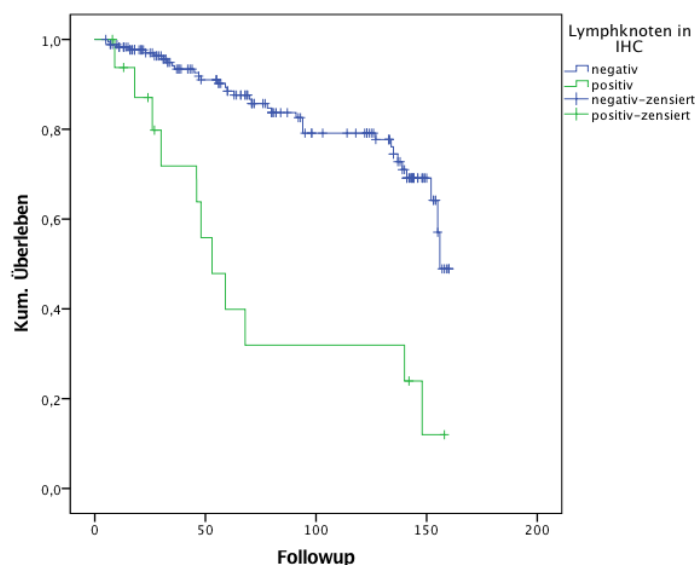


Abbildung 21: Rezidivfreies Überleben in den Gruppen LK+ und LK-
RFS: rezidivfreies Überleben (von engl.: recurrence free survival)

Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen die graphische Darstellung der Kaplan-Meier-Analyse des Auftretens eines BCR in den verschiedenen Gleason Score Gruppen und den verschiedenen T-Stadien. Ein Ergebnis von $p < 0,001$ im Log Rank Test für den Vergleich der verschiedenen GS und ein Ergebnis von $p = 0,002$ im Log Rank Test für den Vergleich der verschiedenen T-Stadien zeigt, dass auch zwischen diesen verschiedenen Gruppen jeweils ein signifikanter Unterschied im rezidivfreien Überleben besteht.

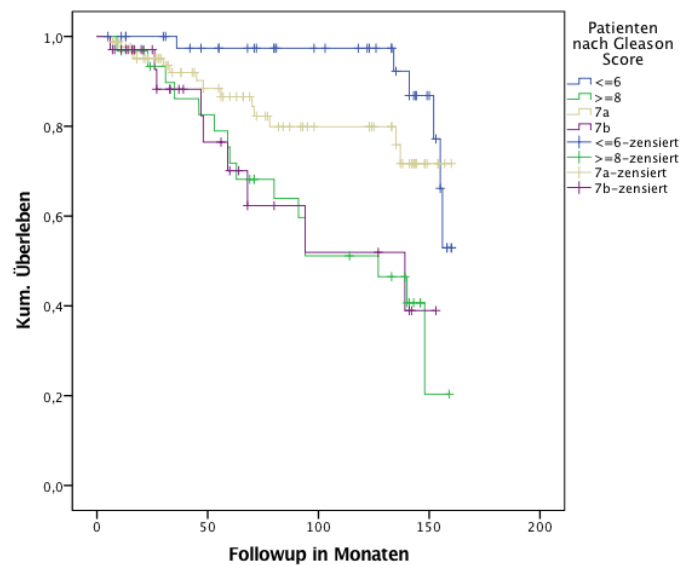


Abbildung 22: Rezidivfreies Überleben der verschiedenen Gleason Score Gruppen ≤ 6 , 7a, 7b und ≥ 8

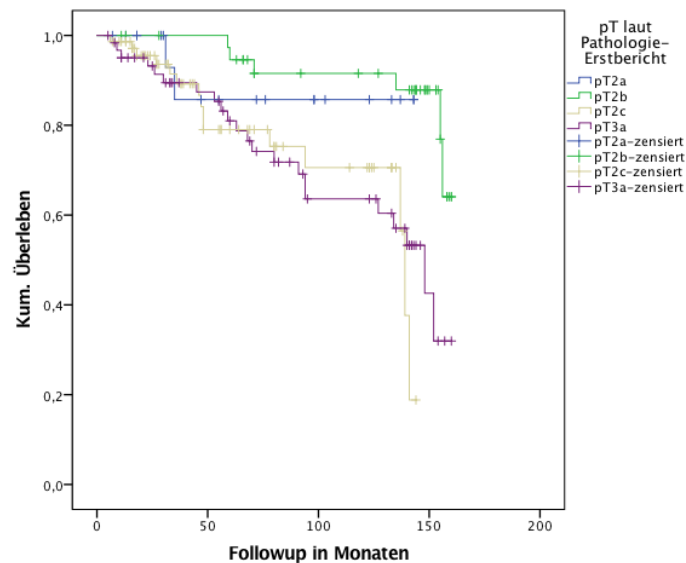


Abbildung 23: Rezidivfreies Überleben der verschiedenen T-Stadien pT2a, pT2b, pT2c, pT3a

Eine Analyse bezüglich des Gesamtüberlebens (*Overall Survival*, OS) in den Gruppen LK+ und LK- wurde in der vorliegenden Arbeit bei zu geringer Anzahl von Ereignissen (Exitus letalis, n=4) nicht durchgeführt.

4.3.11 Vergleich der Tumorfläche bezüglich des Auftretens eines Rezidivs

Weiterhin wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Fläche des Tumors in cm^2 und dem Auftreten eines BCR im Verlauf gibt. Ein Ergebnis von 0,042 im Mann-Whitney-U-Test zeigt, dass es einen signifikanten Unterschied der Tumorfläche zwischen den Gruppen „BCR im Verlauf“ und „kein BCR im Verlauf“ gibt. Es konnten signifikant größere Tumorflächen bei Patienten bestimmt werden, bei denen im Verlauf ein BCR aufgetreten ist. Abbildung 24 zeigt die Verteilung der Tumorfläche unterteilt nach der kategorialen Variable „BCR im Verlauf“.

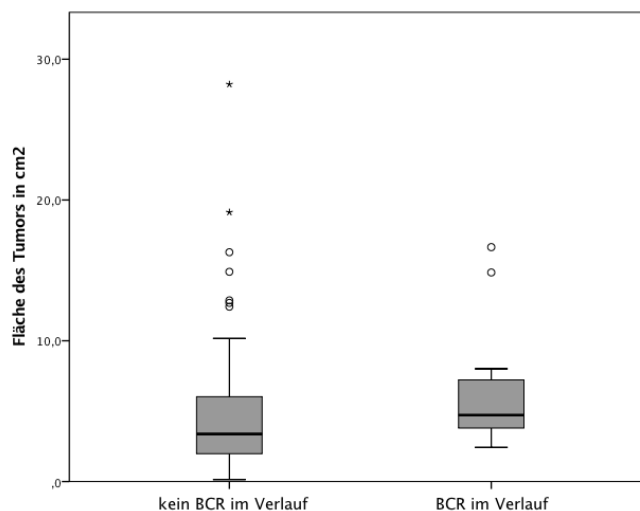


Abbildung 24: Tumorfläche in den Gruppen " BCR im Verlauf" und "kein BCR im Verlauf"

4.3.12 Ergebnisse der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung zeigte in den Präparaten von 17 Patienten positive Reaktionen. Anhand der TNM-Klassifikation wurde in ITC und Mikrometastasen eingeteilt (Tabelle 4). Insgesamt konnten 17 okkulte Lymphknotenmetastasen (8,6%) entdeckt werden, die zuvor in der Routine-HE-Färbung nicht erkannt wurden (Tabelle 19). Davon waren in 10 Fällen ausschließlich ITC und in 3 Fällen ausschließlich Mikrometastasen erkennbar. In 4 Fällen konnten sowohl ITC als auch Mikrometastasen in den Präparaten eines Patienten erkannt werden. Damit ergeben sich 14 Lymphknoten mit ITC und 7 Lymphknoten mit Mikrometastasen. Ein N1 Befund wurde in dieser Studie nicht erkannt. Bezogen auf alle 2352 entfernten Lymphknoten zeigte sich bei 32 Lymphknoten eine positive Reaktion in der IHC (1,4%).

Tabelle 19: Aufschlüsselung der positiven Ergebnisse der IHC

	Anzahl Patienten n=17	Anzahl positive LK n=32
ITC	14	24
pN1mi	7	8
pN1	0	0

4.4 Auswertung der Testkriterien der Immunhistochemie

Da ein positives Testergebnis im Verlauf der Diagnostik eine therapeutische Konsequenz bedeutet, sind zur Analyse dieses Testverfahrens vor allem der PPV und zusätzlich die Sensitivität von großer Bedeutung. Tabelle 20 lässt erkennen, dass die Testgütekriterien für die immunhistochemische Untersuchung der Lymphknotenpräparate nicht gut genug sind, um eine Implementierung der Methode in die Routinediagnostik für alle Präparate zu rechtfertigen. Bei guter Spezifität beträgt die Sensitivität nur 24% und der PPV nur 65%.

Tabelle 20: Testkriterien für alle Patienten mit Daten zum Auftreten eines BCR

	n=195
Sensitivität	=0,24
Spezifität	=0,96
PPV	=0,65
NPV	=0,81

In Tabelle 21 wurden die berechneten Testgütekriterien für die verschiedenen GS gegenübergestellt. Man kann mit ansteigendem GS einen deutlichen Anstieg der Sensitivität und des PPV bei annähernd gleichbleibender Spezifität erkennen.

Tabelle 21: Testkriterien für die verschiedenen Gleason Score Gruppen

	6	7a	7b	8
Sensitivität	=0,14	=0,21	=0,22	=0,38
Spezifität	=0,97	=0,97	=0,96	=0,93
PPV	=0,5	=0,6	=0,67	=0,86
NPV	=0,86	=0,86	=0,77	=0,58

Tabelle 22 zeigt die berechneten Testgütekriterien für die verschiedenen T-Stadien. Auch hier wird ein deutlicher Anstieg des PPV deutlich. Die Sensitivität für immunhistochemische Färbungen ist im Stadium pT2c deutlich höher als in geringen Stadien. Für das Stadium pT3a jedoch kann man einen Abfall der Sensitivität erkennen.

Tabelle 22: Testkriterien für die verschiedenen T-Stadien

	pT2a+b	pT2c	pT3a
Sensitivität	=0,13	=0,6	=0,32
Spezifität	=0,98	=0,93	= 0,975
PPV	=0,5	=0,42	=0,875
NPV	=0,88	=0,81	=0,72

In Tabelle 23 werden die Testgütekriterien für verschiedene Tumorflächen dargestellt. Die Cut-offs wurden dabei willkürlich gesetzt. Ein Wert von 6cm² entspricht dabei ungefähr dem Flächenmittelwert aller Patienten. Ein Wert von 10cm² entspricht dem Flächenmittelwert der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus.

Tabelle 23: Testkriterien für verschiedene Tumorflächenwerte

	<6cm²	≥6cm²	<10cm²	≥10cm²
Sensitivität	=0,27	=0,6	0,29	1,0
Spezifität	=0,98	=0,76	0,95	0,75
PPV	=0,75	=0,43	0,57	0,5
NPV	=0,86	=0,87	0,85	1,0

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit weist mittels immunhistochemischer Färbungen Lymphknotenmetastasen (N0(i+)) bei Prostatakarzinomen nach radikaler Prostatektomie mit initialer pN0 und R0-Resektion nach und untersucht deren Bedeutung für Rezidive.

Die hohe und steigende Inzidenz des PCa verdeutlicht den Stellenwert der Diagnostik und Therapie des PCa. Auch die zunehmende finanzielle Belastung des Gesundheitssystems macht eine verbesserte Diskrimination zwischen behandlungsbedürftigen und nichtbehandlungsbedürftigen Patienten notwendig. Bei 10% (52) bis zu 30% (53-55) der Patienten, die nach RPE als Lymphknotenmetastasen frei und damit als geheilt bezeichnet wurden, wird ein erneuter PSA-Anstieg nachgewiesen. Da das PSA ein organspezifischer Marker ist, ist dies mit einem Rezidiv des PCAs gleichbedeutend. Eine Erklärung, die das Auftreten von Rezidiven bei Patienten mit RPE ohne Lymphknotenmetastasen (initialer pN0 Befund) beschreibt, ist das Vorkommen von isolierten Tumorzellen (ITC) und Mikrometastasen (58,59). Als sensitives diagnostisches Verfahren wird in der Literatur die PCR beschrieben. Sie ist jedoch wegen eines schlechten Kosten-Nutzen-Verhältnisses nicht für die Routinediagnostik geeignet (64). Eine weitere Möglichkeit Mikrometastasen in Lymphknoten zu diagnostizieren, sind immunhistochemische Spezialfärbungen.

5.1.1 Vergleich des Gleason Scores bezüglich Lymphknotenstatus

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass ein GS von ≥ 8 signifikant häufiger mit einem positiven Ergebnis in der IHC einhergeht als ein $GS < 8$ ($p=0,009$). Auch zeigt sich, dass ein GS von $7=4+3$ häufiger als $7=3+4$ mit einem positiven Ergebnis assoziiert ist. Hierfür konnte eine Signifikanz jedoch nicht nachgewiesen werden ($p=0,399$). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit denen in der Literatur überein. Shariat et al. (61), Miyake et al. (63) und Martinez-Pineiro (55) zeigten

ebenfalls ein häufigeres Auftreten der höheren GS bei Patienten mit einer positiven Reaktion in der IHC oder der PCR. Shariat et al. untersuchten 1864 Lymphknoten von 199 Patienten mit dem Tumorstadium pT3N0M0 ohne präoperative Therapie immunhistochemisch und molekularpathologisch. Die Immunhistochemie zeichnete sich durch eine höhere Spezifität als die PCR bezüglich des Auftretens eines BCR aus, die PCR jedoch war sensitiver. Auch Miyake et al. nutzten in ihrer Studie sowohl die IHC als auch die Molekularpathologie zur Untersuchung von 2215 Lymphknoten von 120 Patienten. Sowohl für Patienten mit ausschließlichem Tumorzellnachweis in der Routine-H&E-Färbung, als auch Patienten mit positiver IHC und PCR konnten durchschnittlich höhere GS als für Patienten ohne Tumorzellnachweis gezeigt werden. Martinez-Pineiro et al (55) untersuchten Lymphknoten von 154 Patienten mit HE-Färbung, IHC und PCR und konnten eine Korrelation zwischen dem Auftreten eines $GS \geq 8$ mit einem positiven Ergebnis in allen Färbungen nachweisen. In der Studie von Pagliarulo et al. (58) konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der HE-Färbung und IHC von 274 Patienten mit dem Tumorstadium pT3N0M0 ließen dennoch eine Tendenz hinsichtlich höherem GS bei positiven Tumorzellnachweis erkennen.

5.1.2 Vergleich der T-Stadien bezüglich Lymphknotenstatus

Zwischen den verschiedenen T-Stadien (pT2a, pT2b, pT2c, pT3a) konnte hinsichtlich der IHC-Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreicht werden. Allerdings lässt sich tendenziell erkennen, dass ein positives Ergebnis in der IHC häufiger bei einem Tumorstadium pT3 als bei pT2 auftritt ($p=0,143$). Miyake et al. (63) untersuchten 120 Patienten mit einem Tumorstadium zwischen pT2 und pT4. Ein positives Ergebnis der IHC und PCR trat signifikant häufiger bei einem Tumorstadium pT3 im Vergleich zu einem Tumorstadium pT2 auf. Nur 2 Patienten mit einem Tumorstadium pT4 wurden untersucht. Beide Patienten hatten ein positives Ergebnis in der IHC und PCR, der statistische Vergleich zur Gruppe pT2 zeigt daher ein signifikantes Ergebnis. Die geringe Fallzahl von zwei Patienten in dieser Gruppe sollte jedoch bei der Wertung dieses Ergebnisses beachtet werden. Martinez-Pineiro et al. (55) untersuchten 154 Patienten mit den Tumorstadien T1-T4. Sie verglichen die Gruppe pT1-2 mit pT3-4. Statistische Signifikanz konnte nicht erreicht werden. Von 53 Patienten in den

Tumorstadien pT3-4 waren 28 mit positivem Lymphknotenstatus und 25 mit negativem Lymphknotenstatus diagnostiziert. Im Vergleich dazu konnten von 101 Patienten in den Tumorstadien pT0-2 bei 38 Patienten Tumorzellen in den Lymphknoten nachgewiesen werden. 63 Patienten waren ohne Nachweis von Tumorzellen. Patienten mit einem Tumorstadium pT3-4 hatten im Vergleich zu Patienten im Tumorstadium pT0-2 prozentual häufiger einen positiven Lymphknotenstatus (53% vs. 38%). In der Studie von Pagliarulo et al. (58) werden nur Patienten mit einem Tumorstadium pT3 betrachtet und ein Vergleich zwischen pT3a und pT3b gemacht. In den als ursprünglich N0 klassifizierten Lymphknoten von 24 Patienten konnten mittels Immunohistochemie Tumorzellen entdeckt werden. Ein positives Ergebnis in der IHC tritt dabei signifikant häufiger bei Patienten mit einem Tumorstadium pT3b auf (pT3a 9/24 vs. pT3b 15/24; $p < 0,001$). Insgesamt kann bezüglich der Tumorstadien gesagt werden, dass die bisher bestehende Literatur einheitlich eine Assoziation zwischen höheren Tumorstadien (pT3-4) und einem positivem Lymphknotenstatus sieht, auch wenn in der vorliegenden Studie wie auch in einigen anderen keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte.

5.1.3 Vergleich der entfernten LK bezüglich Lymphknotenstatus

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 2352 Lymphknoten von 197 Patienten untersucht. Daraus ergibt sich, dass pro Patient durchschnittlich 12 Lymphknoten während der RPE entfernt und anschließend histopathologisch untersucht wurden. Die S3-Leitlinie(4) empfiehlt mindestens 10 Lymphknoten zu entfernen. Die Literatur hingegen weist einheitlich daraufhin, dass eine größere Anzahl von Lymphknoten eine bessere Diagnostik durch verbesserte Sensitivität ermöglicht. Demnach sollten mindestens 20 Lymphknoten pro Patient während der RPE entfernt werden (59,63,68,69). Lediglich eine einzige Studien mit einer ähnlichen Fragestellung beschreibt ein Patientenkollektiv, bei dem diese Angabe mit durchschnittlich 21,7 entfernten Lymphknoten pro Patient erfüllt wird (58). Miyake et al. (59), Wawroschek et al. (70) und Miyake et al. (63) untersuchten in ihren Studien 18,5-19 Lymphknoten pro Patient. Mit 12 Lymphknoten pro Patient liegt diese Studie wie die von Martinez-Pineiro (55) immer noch deutlich über der von Shariat et al. (61) mit 9 Lymphknoten pro Patient,

der von Schilling et al. (48) mit 4,2 Lymphknoten und der von Liu et al. (68) mit 3 Lymphknoten pro Patient.

Es gibt Studien, die die Anzahl der entfernten Lymphknoten in Bezug auf klinische Kriterien betrachten. Dabei haben Kluth et al. (69) in ihrer Studie festgestellt, dass eine höhere Anzahl von entfernten Lymphknoten mit einem höheren Alter ($p=0.002$), einem höheren GS ($p<0.001$), einem fortgeschritteneren T-Stadium ($p<0.001$) und einem höheren präoperativem PSA-Wert ($p<0.001$) einhergeht. Weiterhin stellte Kluth et al. die Frage nach einem therapeutischen Effekt der Lymphadenektomie. Es konnte statistisch nicht nachgewiesen werden, dass die Entfernung von einer größeren Anzahl Lymphknoten mit einer verminderten Auftretenswahrscheinlichkeit eines BCR im Verlauf assoziiert ist ($p=0.021$; HR: 1,02). Keine andere bisher zu diesem Thema veröffentlichte Studie beschäftigt sich mit einer Assoziation der Anzahl der entfernten Lymphknoten und klinischen Merkmalen. Um die vorliegende Studie mit der von Kluth et al. zu vergleichen und eine Verzerrung der Daten auszuschließen, wurde innerhalb der verschiedenen Gruppen die Anzahl der entfernten Lymphknoten verglichen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der entfernten Lymphknoten und dem Alter festgestellt werden ($p=0,399$). Auch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen GS ($p=0,619$) oder T-Stadien ($p=0,716$) sowie bezüglich des Lymphknotenstatus ($p=0,201$).

5.1.4 Vergleich der Tumorfläche bezüglich Lymphknotenstatus

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Tumorfläche nachgewiesen werden. Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus haben eine deutlich größere Tumorfläche ($p<0,001$). Die Flächenbestimmung von Tumor und Prostata erscheint auf den ersten Blick in dieser Arbeit außergewöhnlich große Werte zu zeigen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Fläche umso größer ist, umso geringer der Abstand zwischen den untersuchten Mikroskopierschnitten gewählt wird. Bei geringerem Abstand und einer größeren Anzahl von Schnitten werden so größere Flächen bestimmt. Um einen Vergleich zu vereinfachen wurde zusätzlich der Quotient aus Tumorfläche zu Prostatafläche bestimmt. Ein Vergleich dieses Quotienten zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit positivem und

negativem Lymphknotenstatus ($p < 0,001$). Bei Patienten mit positivem Lymphknotenbefund zeigt das pCa einen größeren Anteil am Gesamtvolumen der Prostata. Wenige Studien haben sich bisher ausführlich mit dieser Fragestellung beschäftigt. Die zu vergleichenden Arbeiten von Miyake et al., Deng et al. und Shariat et al. haben ausschließlich das Tumolvolumen in cm^3 bestimmt. Miyake et al. (63) konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass ein positives Ergebnis in der IHC mit einem höheren Tumolvolumen in cm^3 assoziiert ist. Die Studie zeigt eine ähnliche Patientenanzahl, bei denen das Tumolvolumen bestimmt wurde und eine ähnliche Verteilung auf die Gruppen IHC positiv oder negativ verglichen mit der vorliegenden Arbeit. Ein direkter Vergleich der Werte ist wegen der unterschiedlichen Dimensionen Fläche und Volumen jedoch nicht möglich. Miyake et al. zeigten, dass Tumore von Patienten mit positivem Lymphknotenstatus im Durchschnitt größer als 2 cm^3 sind, Tumore von Patienten mit negativem Lymphknotenstatus einen Größenmittelwert von $0,92 \text{ cm}^3$ aufweisen. Diese Ergebnisse stehen trotz der unterschiedlichen Dimensionen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch die Arbeit von Deng et al. (56) weist eine Assoziation zwischen einem positiven Lymphknotenstatus und einem höheren Tumolvolumen nach. Deng et al. untersuchten im Unterschied zu allen anderen Studien nicht pelvine Lymphknoten, sondern periprostatiche Lymphknoten. Ein genauere Vergleich der Daten ist wegen fehlender Aufführung der Werte in der veröffentlichten Studie nicht möglich. Eine weitere Arbeit, die den Zusammenhang der immunhistochemischen Ergebnisse und der Tumorgröße betrachtet, ist die von Shariat et al. (61). Als einzige bisher zu diesem Thema veröffentlichte Arbeit konnte keine Assoziation zwischen Lymphknotenstatus und Tumolvolumen nachgewiesen werden. Eine genauere Analyse und ein Vergleich der Werte waren auch hier nicht möglich, da die Daten in der Studie nicht exakt aufgeführt werden.

5.1.5 Vergleich der Tumorfläche bezüglich des Auftretens eines BCR

Klinisch relevanter als ein Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der IHC und der Tumorfläche ist die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Tumorfläche und dem Auftreten eines BCR im Verlauf gibt. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Patienten mit größeren Tumoren erleiden deutlich häufiger ein BCR im Verlauf ($p = 0,042$). Keine der bisher

veröffentlichten Studien hat bisher eine Assoziation zwischen der Tumorfläche oder dem Tumolvolumen und dem Auftreten eines BCR im Verlauf untersucht. Es wurde bisher lediglich wie oben genauer beschrieben von einem Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und dem Ergebnis der pathologischen Untersuchung berichtet. Die Arbeit von Ferrari et al. (54) sollte in diesem Kontext nicht unerwähnt bleiben. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und lymphovaskulärer Invasion (LVI). Es wurde festgestellt, dass Patienten mit LVI einen signifikant größeren Primärtumor aufweisen als Patienten ohne LVI (5,1 cm³ vs. 2,38 cm³; p<0,0001). Insgesamt gibt die Literatur nicht ausreichend Daten für einen ausführlichen Vergleich her. Es sind weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv notwendig, um die Richtigkeit der hier dargestellten Ergebnisse für einen Zusammenhang zwischen der Tumorfläche und dem Auftreten eines BCR im Verlauf zu überprüfen.

5.1.6 Vergleich der präoperativen PSA-Werte bezüglich Lymphknotenstatus

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle 197 Patienten die präoperativen PSA-Werte nach WHO bestimmt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen Lymphknotenstatus positiv und negativ nicht festgestellt werden (Mittelwerte: 11,8 ng/ml. vs. 6,73ng/ml, p = 0,369). Auch eine statistische Tendenz ist in diesem Fall nicht klar zu erkennen. Es lässt sich jedoch feststellen, dass der Mittelwert der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus über dem der Patienten mit negativem Lymphknotenstatus liegt. Im Literaturvergleich ist dieser Befund nicht ungewöhnlich und bei zahlreichen anderen Studien wiederzuentdecken. Auch Martinez-Pineiro et al. (55) konnten in ihrer Studie, in der 154 Patienten mittels PCR der pelvinen Lymphknoten als positiv erkannt wurden, keinen Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem präoperativen mittleren PSA-Wert herstellen (LK+: 11,6ng/ml vs. LK-:11,2 ng/ml, p= 0,903). Shariat et al. (61) konnten in ihrer Arbeit zum Vergleich zwischen der IHC und der PCR ebenfalls keine Assoziation zwischen Lymphknotenstatus und präoperativem PSA-Wert feststellen. Es wurde in der zuletzt genannten Arbeit eine ähnliche Anzahl von Patienten und Lymphknoten wie in der vorliegenden Arbeit untersucht. Ein direkter Vergleich der Werte ist dennoch nicht möglich, da konkrete Werte nicht veröffentlicht sind. Deng et al. (56) konnten in ihrer Studie ebenfalls keinen signifikanten Unterschied

des durchschnittlichen PSA-Wertes zwischen Patienten mit positivem und negativem Lymphknotenstatus feststellen. Der mittlere PSA-Wert der Gruppe mit positiven Lymphknotenstatus war sogar niedriger als der Wert der Patienten mit negativem Lymphknotenstatus (6,88 vs. 10,95 ng/ml, $p = 0,11$). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Deng et al. periprostatiche Lymphknoten von nur 21 Patienten untersucht haben. Dies schränkt die Aussagekraft deutlich ein und schwächt einen Vergleich zu anderen Studien. Auch Pagliarulo et al. (58) konnten in ihrer Arbeit keine Assoziation zwischen dem Lymphknotenstatus und dem präoperativen PSA-Wert feststellen. Allerdings sind für einige Patienten des Kollektivs keine Daten vorhanden (104 von 274 Patienten), sodass die Aussagekraft der Daten deutlich gemindert ist und keine statistische Signifikanz erreicht wird. Tendenziell lässt sich erkennen, dass ein erhöhter präoperativer PSA-Wert mit einem positiven Lymphknotenstatus einhergeht.

Im Kontrast zu den bisher genannten Studien konnten Liu et al. (68) in ihrer Arbeit zu Mikrometastasen in pelvinen Lymphknoten bei PCa einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des präoperativen PSA-Wertes für Patienten mit positivem (H&E-Färbung und/oder PCR) und negativem Lymphknotenstatus zeigen ($p < 0,001$). Es werden drei verschiedene Gruppen unterteilt. Der mittlere PSA-Wert der Gruppe, welcher nur in der histopathologischen Untersuchung als positiv erkannt wurde, war $31,14 \pm 11,6$ ng/ml. Der mittlere PSA-Wert der Gruppe, welche zusätzlich in der PCR als positiv erkannt wurde, war mit $20,78 \pm 8,15$ ng/ml geringer. Deutlich darunter lag der Wert der Gruppe mit negativem Lymphknotenstatus mit $9,21 \pm 6,07$ ng/ml. Auch andere Studien unterteilten das Patientenkollektiv wie zuvor beschrieben. Miyake et al. (59) konnten in ihrer Arbeit zur Bedeutung von Mikrometastasen mit 52 Patienten auch einen signifikanten Unterschied zwischen den oben genannten Gruppen zeigen (H&E+: $21,8 \pm 7,4$ ng/ml, PCR+: $20,1 \pm 9,7$ und LK-: $10,2 \pm 6,1$; H&E+ vs. LK- $p = 0,001$, PCR+ vs. LK- $p < 0,001$). Auch eine weitere Arbeit um Miyake (63), in der die Lymphknoten von 120 Patienten mittels RT-PCR untersucht wurden, zeigte ein ähnliches Ergebnis. Auch hier wurde ein signifikanter Unterschied des präoperativen PSA-Wertes zwischen den drei Gruppen „H&E-Färbung positiv“, „PCR positiv“ und „Lymphknotenstatus negativ“ genannt. ($25,3 \pm 24,7$ ng/ml, $20,2 \pm 18,7$ ng/ml, $9,8 \pm 6,9$; $p < 0,0001$). Weiterhin lassen sich zwei Studien anführen, die einen Zusammenhang zwischen dem präoperativen PSA-Wert und vaskulärer Invasion untersuchten. May et al. (53) konnten in ihrer Studie von 412 Patienten zum prognostischen Einfluss von LVI feststellen, dass zwischen LVI

und einem erhöhten präoperativen PSA-Wert sowie einer erhöhten PSA-Dichte ein Zusammenhang besteht. Deutlich häufiger konnte eine LVI bei Patienten mit erhöhten PSA-Werten diagnostiziert werden. Weder präoperativer PSA-Wert noch die PSA-Dichte eignen sich jedoch als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines BCR im Verlauf. Ferrari et al.(54) untersuchten in ihrer Studie mit 620 Patienten zur prognostischen Bedeutung von vaskulärer Invasion für das Auftreten von Rezidiven bei PCa auch eine Assoziation bezüglich des präoperativen PSA-Wertes. Der PSA-Wert war bei Patienten mit VI signifikant höher als bei Patienten ohne VI (10,3 ng/ml vs. 7,3 ng/ml, $p < 0,0001$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über den Zusammenhang des Lymphknotenstatus und des präoperativen PSA-Wertes bei initial N0 klassifizierten Patienten in der Literatur bisher keine einheitlichen Aussagen getroffen wurden. Die genannten Studien untersuchen unterschiedlich große Patientenkollektive (21-620 Patienten) und in den wenigsten Fällen werden genauere Angaben über Verfahren und Kriterien der präoperativen PSA-Wert-Bestimmung gemacht. Sowohl in den Studien mit statistischer Signifikanz als auch in den Studien ohne Signifikanz mit Ausnahme der Arbeit von Deng et al.(56) fällt auf, dass die präoperativen PSA-Werte von nodal positiven Patienten über denen von nodal negativ Patienten liegen. Werden die Werte von Patienten verglichen, die in unterschiedlichen pathologischen Untersuchungen als nodal positiv erkannt wurden, fällt auf, dass Patienten, die in der Routine-HE-Färbung als positiv erkannt wurden, höhere PSA-Werte haben, als Patienten, die erst in der sensitiveren PCR als nodal positiv diagnostiziert wurden. Eine mögliche Begründung wäre, dass größere Tumore eher in der HE-Färbung erkannt werden und wegen einer größeren Anzahl maligner Zellen mehr PSA produzieren und so zu einem erhöhten präoperativem PSA-Wert führen. Weitere Untersuchungen diesbezüglich sind nötig.

5.1.7 Vergleich des Auftretens eines BCR bezüglich Lymphknotenstatus

Bis zum letzten Nachsorge-Zeitpunkt dieser Studie trat in 23,1% der 197 untersuchten Patienten ein BCR auf. BCR Patienten weisen signifikant häufiger einen positiven Lymphknotenstatus auf. Auch die Kaplan-Meier-Analyse beschreibt ein deutlich

verringertes rezidivfreies Überleben für Patienten mit positiven Lymphknotenbefunden ($p < 0,001$). Für 4 der 45 Patienten mit BCR gab es keine genauere Angabe zum Zeitpunkt des Auftretens des BCR. Für die restlichen 41 Patienten ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Zeit bis zum Auftreten des BCR zwischen den Gruppen LK+ und LK- ($p = 0,925$).

Pagliarulo et al. (58) berichteten, dass in ihrer Arbeit bei 141 der 274 Patienten (51,5%) ein Rezidiv auftrat. Der Lymphknotenstatus war signifikant mit dem Auftreten eines BCR assoziiert (H&E+ vs LK-: $p < 0,001$; IHC+ vs. LK-: $p = 0,004$). Der größte Anteil an Patienten mit BCR im Verlauf befand sich in der Gruppe mit histopathologisch positivem Befund. Patienten mit positivem Lymphknotenstatus haben laut Pagliarulo et al. ein um den Faktor 2,25 erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens ein Rezidiv zu entwickeln. Die Wissenschaftler untersuchten ferner, ob sich die Zeit bis zum BCR hinsichtlich des Lymphknotenstatus unterscheidet. 61% der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus erleiden ihr Rezidiv innerhalb von zehn Jahren, bei Patienten mit negativem Lymphknotenstatus sind es nur 36% ($p = 0,004$).

In der Arbeit von Liu et al. (68) werden Patienten hinsichtlich ihres Lymphknotenstatus sowohl mittels H&E-Färbung und als auch mittels PCR untersucht. Patienten, die eine positive Reaktion in der H&E-Färbung zeigten, unterschieden sich hinsichtlich des Auftretens eines BCR und der Zeit bis zum BCR nicht signifikant von den Patienten, die in der PCR als positiv erkannt wurden ($p = 0,26$). Liu et al. fassten zusätzlich die Patienten zusammen, die in der H&E-Färbung und/oder der PCR eine positive Reaktion zeigten und verglichen sie mit Patienten mit negativem Lymphknotenstatus. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens eines BCR (58,3% vs. 11,1%, $p = 0,002$) und der Zeit bis zum Auftreten eines BCR (21,3 vs. 10,9 Monate, $p < 0,001$). Mit den zwei zuvor beschriebenen Studien konkordante Ergebnisse konnten auch Miyake et al. (59) zeigen. Sie beschreiben eine Rezidivrate von 23,1% (12 von 52 Patienten). Der größte Anteil der Patienten mit BCR im Verlauf war durch histopathologisch positive Befunde charakterisiert. In geringerem Anteil traten BCR auch in den Gruppen mit molekularpathologischen Befunden und in noch geringerem Anteil bei Patienten mit negativen Befunden auf. Die Zeit bis zum Auftreten eines BCR war signifikant geringer für Patienten mit positiven Lymphknotenstatus (H&E+ vs. LK-: $p = 0,003$; PCR+ vs. LK-: $p = 0,006$).

Eine Studie mit vergleichbarer Anzahl von untersuchten Patienten ist die Studie von Shariat et al. (61). Sie beschreiben, dass bei 68 der 199 (34%) untersuchten Patienten ein BCR auftritt. Ein deutlich geringere Rezidivrate von 16,5% (68 von 412 Patienten) berichteten May et al. (71) in ihrer Arbeit über LVI. Das rezidivfreie Überleben war für Patienten mit LVI signifikant geringer als für Patienten ohne LVI ($p < 0,001$). Nach 5 Jahren waren 87,3% der Patienten ohne LVI ohne BCR, im Vergleich zu 58,7% der Patienten mit LVI.

Nach Begutachtung der zu diesem Thema publizierten Studien lässt sich feststellen, dass die Rezidivrate von 23,1% vergleichsweise gering ist (16,5-51,5%). Dies spricht für eine gute präoperative Diagnostik, eine gute chirurgische Durchführung und auch für eine gute histopathologische Erstbeurteilung. Anzuführen ist außerdem, dass in der vorliegenden Studie der Grenzwert für die Definition eines BCR bei einem postoperativem PSA-Wert im Blut von $>0,1$ ng/ml festgelegt wurde. Alle anderen Studien haben einen Grenzwert von 0,2 oder 0,4 ng/ml genannt. Damit ergibt sich mit der Berechnung einer Rezidivrate von 23,1% gegebenenfalls sogar ein leicht erhöhter Wert im Vergleich zu anderen Studien. Widersprüchlich zur angeführten Literatur ist, dass sich die Zeit bis zum Auftreten eines BCR zwischen den Gruppen LK+ und LK- nicht signifikant unterscheidet. Eine Erklärung dafür, könnte die deutlich kürzere Follow-up-Zeit der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den meisten anderen Studiensein. Mit einer durchschnittlichen Follow-up-Zeit von $78,58 \pm 51,8$ Monaten (Min: 5 Monate, Max: 160 Monate) ohne signifikanten Unterschied in den Gruppen LK+ und LK- liegt die Follow-up-Zeit deutlich unter der anderer Studien, wie z.B. 99,3 Monate in der Arbeit von Shariat et al.(61) oder 155 Monaten in der Studie von Pagliarulo et al. (58). Der lange Beobachtungszeitraum in zuletzt genannter Studie könnte auch eine Erklärung für die hohe Rezidivrate von 55% sein. Nur in der Arbeit von Liu et al. (68) ist die Follow-up-Zeit mit durchschnittlich 36 Monaten kürzer als die der vorliegenden Arbeit. Bezüglich der Wahrscheinlichkeit eines rezidivfreien Überlebens lässt sich im Einklang mit der genannten Literatur ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen LK+ und LK- bestätigen ($p < 0,001$). Abschließend zu dieser Fragestellung lässt sich feststellen, dass die kürzere Follow-up-Zeit nicht nur den Blick auf die Zeit bis zum Auftreten eines BCR verzerren könnte, sondern auch auf die absolute und relative Rezidivrate.

5.1.8 Ergebnisse der Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 8,63% der Patienten okkulte Metastasen entdeckt. Insgesamt waren in 32 der 2352 entfernten Lymphknoten (1,4%) ITC oder Mikrometastasen zu erkennen. ITC wurden doppelt so häufig wie Mikrometastasen diagnostiziert (14 vs. 7).

Die bislang veröffentlichten Studien, die sich mit dem Nutzen der IHC bei der Diagnostik von Lymphknotenmetastasen bei PCa im lokalisierten Stadium befassen, sind insgesamt sehr uneinheitlich. Miyake et al. (59) konnten in ihrer Arbeit über die Bedeutung von Mikrometastasen bei PCa in 44% (23 von 52) ihrer Patienten okkulte Lymphknotenmetastasen entdecken. In 4 Fällen waren die Metastasen in der HE-Färbung zu erkennen und in 19 weiteren in der PCR, von denen 11 auch in der IHC zu erkennen waren. Miyake et al. untersuchten in ihrer Studie 52 Patienten mit klinisch lokalisiertem PCa, die eine neoadjuvante Hormontherapie vor RPE erhalten haben. Die Wissenschaftler äußerten wie bereits Autoren anderer Studien (48,68) den Verdacht, dass präoperative antiandrogene Hormontherapie die histologische Diagnostik von Lymphknoten durch Atrophie der malignen Zellherde wesentlich erschwert. Patienten würden so in der Routine-HE-Färbung häufiger fehlerhaft als nodal negativ diagnostiziert werden. Nach antiandrogener Hormontherapie ist die IHC daher wesentlich aussagekräftiger hinsichtlich der Diagnostik von Mikrometastasen als die HE-Färbung allein. In der vorliegenden Arbeit wurde keiner der Patienten mittels antiandrogener Therapie behandelt.

Pagliarulo et al. (58) konnten in ihrer Arbeit bei 24 von 274 (13,3%) als ursprünglich pN0 diagnostizierten Patienten Mikrometastasen mittels IHC (AE1 und CAM5.2) feststellen. Insgesamt waren 30 von 3914 Lymphknoten (0,77%) betroffen. Die Wissenschaftler konnten eine höhere 10 Jahres-Mortalität für Patienten mit positivem Lymphknotenstatus (HE und IHC) im Vergleich zu Patienten mit negativem Lymphknotenbefund feststellen. Das Risiko zu sterben war für Patienten mit positivem Befund in der IHC 2-fach erhöht, für Patienten mit positivem Befund in der HE-Färbung um den Faktor 1,4 erhöht. Pagliarulo et al. nannten als mögliche Erklärung für diesen Überlebensvorteil, dass Patienten mit positivem Befund in der Routinehistologie möglicherweise frühzeitiger eine systematische Therapie begonnen hätten. Patienten,

deren Lymphknotenmetastasen in der Routinehistologie übersehen wurden, konnten so nicht davon profitieren. Freeman et al. (64) konnten stadienabhängig eine deutlich verbesserte Diagnostik von okkulten Lymphknotenmetastasen mithilfe der Immunhistochemie gegenüber der Routine-HE-Färbung nachweisen. In 16% aller Patienten (15 von 95) und in 0,8% der Lymphknoten (17 von 1995) ergab die IHC ein positives Ergebnis. Freeman et al. (64) stellten fest, dass der größte Nutzen der IHC für das Tumorstadium pT3c gilt. In diesem Stadium wurden anteilig wesentlich mehr Patienten als nodal positiv diagnostiziert als in geringeren Stadien. Liu et al. (68) untersuchten 54 Patienten in ihrer Studie mittels HE-Färbung und RT-PCR. Insgesamt konnten in 33,3% (18 von 54) der Fälle Mikrometastasen erkannt werden.

Deng et al. (56) untersuchten in ihrer Arbeit die periprostatistischen und pelvinen Lymphknoten getrennt mittels H&E-Färbung und IHC (AE1/AE3). Okkulte Metastasen der pelvinen Lymphknoten konnten in <1% entdeckt werden, der periprostatistischen Lymphknoten in 12%. Fast alle Fälle der positiven pelvinen Lymphknoten konnten in der H&E-Färbung erkannt werden. Deng et al. empfehlen die IHC wegen fehlendem Informationsgewinn daher nicht für die Routinediagnostik. Schilling et al. (48) setzten sich in ihrer Studie zum Ziel, die Sensitivität einer immunhistochemischen Keratinfärbung gegenüber der Standard-H&E-Färbung zu überprüfen. In 10,9% der Patienten konnten okkulte Lymphknotenmetastasen bei Reevaluation in der H&E-Routinefärbung entdeckt werden. Eine immunhistochemische Untersuchung konnte keine weiteren okkulten Metastasen aufdecken. Im Vergleich zur Routine-H&E-Färbung verursache die IHC einen ca. 18-fachen Zeitaufwand und steigerte die Kosten ca. 23-fach. Da diese Ergebnisse keinen Hinweis auf eine verbesserte Diagnostik der IHC im Vergleich zur H&E-Färbung lieferten, raten Schilling et al. von der Integration der IHC in die Routinediagnostik ab. Auch Martinez-Pineiro et al. (55) stehen der IHC kritisch gegenüber. Sie untersuchten 154 Patienten mittels H&E-Färbung, IHC (AE1/AE3) und PCR. Die H&E-Färbung konnte in 5,8% der Patienten (9 von 154) einen Lymphknotenbefall aufdecken. Die IHC konnte darüberhinaus keine zusätzlichen Patienten als nodal positiv diagnostizieren. Die PCR hingegen war in 40% der Patienten (57 von 145) positiv, 34,2 Prozentpunkte mehr.

Wawroschek et al. (70) konnten in 26,8% der untersuchten Patienten (52 von 194) Lymphknotenmetastasen mittels H&E-Färbung und IHC diagnostizieren. Der

Schwerpunkt der Arbeit lag nicht im Vergleich verschiedener histopathologischer Untersuchungsmethoden, sondern in der Bestimmung des Ausmaßes der Lymphadenektomie und dessen Einfluss auf die Diagnostik von Lymphknotenmetastasen. Wawroschek et al. schlossen aus ihren Daten, dass die IHC einen deutlich geringeren Nutzen für die Diagnostik von Lymphknotenmetastasen erbringt als die Erweiterung der Lymphadenektomie. Umso mehr Lymphknoten man entfernt, auch außerhalb der empfohlenen primären Lymphabflusswege, umso höher sei die Wahrscheinlichkeit Lymphknoten mit Tumorzellbefall zu entdecken. Die Maßnahme der erweiterten Lymphadenektomie ist laut Wawroschek et al. sensitiver als die zusätzliche immunhistochemische Untersuchung der Präparate. Sie empfehlen die IHC daher nicht für die Routinediagnostik.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IHC im Vergleich zur PCR in der Mehrzahl der Studien hinsichtlich der Sensitivität schlechtere Ergebnisse zeigt und in einigen Studien auch im Vergleich zur Routine-H&E-Färbung keine zusätzlichen Metastasen erkennen lässt. In zahlreichen Arbeiten ist jedoch ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Standard-H&E-Färbung beschrieben. Laut Shariat et al. (61) korreliert die IHC sogar besser als die PCR mit den klinisch bedeutsamen Tumoren in Hinblick auf das Auftreten eines BCR und der PCa assoziierten Mortalität. Die Spezifität der PCR wurde bereits in zahlreichen Studien angezweifelt und auf Verunreinigung und minimale Expression von PSA und PSMA extraprostatischer Körperzellen zurückgeführt. Positive PCR-Befunde sollten daher zusätzlich nachkontrolliert werden. Im Vergleich zur PCR ist die IHC spezifischer für den Nachweis von Zellen mit prostaticem Ursprung und erlaubt darüber hinaus eine zytomorphologische Beurteilung der Präparate. Alle genannten Studien sind einstimmig zu dem Ergebnis gekommen, dass unabhängig von der Art der Diagnostik Patienten mit positivem Lymphknotenstatus eine signifikant höhere Auftretenswahrscheinlichkeit eines Rezidivs, einen signifikant verkürzten Zeitraum bis zum Auftreten des Rezidivs und eine deutlich erhöhte PCa bezogene Mortalität aufweisen. Jeder Patient, der fälschlicherweise als nodal negativ diagnostiziert wird, steht vor diesen Konsequenzen und kann nicht vom Nutzen einer adäquaten Therapie im Sinne einer frühzeitigen systemischen Therapie profitieren (siehe S. 14, 1.8.).

Die vorliegende Studie gibt einen Überblick über den zusätzlichen Nutzen der IHC. Um dies weiter zu verdeutlichen, wurden Testkriterien für die IHC bezogen auf verschiedene klinische Kriterien berechnet. Bei sehr guter Spezifität ergibt sich eine gute Sensitivität und ein guter positiver prädiktiver Wert vor allem bei Patienten mit höherem GS (≥ 8), höherem T-Stadium (pT3a) und größerer Tumorfläche (≥ 10 cm). Um noch genauere Angaben bezüglich Untergruppen in der Kombination aus T-Stadium und Gleason Score zu machen, war das Patientenkollektiv (n=197) nicht ausreichend groß. Zur Integration in die Routine-Diagnostik sollten weitere Untersuchungen gemacht werden um bessere Aussagen über das Kosten-Nutzen-Verhältnis treffen zu können.

5.2 Limitierung der Studie

Die vorliegende Studie weist verschiedene Limitierungen auf. Zunächst einmal die limitierte Patientenzahl und das unizentrische Studiendesign: Die RPE der 197 Patienten wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Charité, Campus Mitte durch verschiedene Operateure durchgeführt. Pro Patient sind im Durchschnitt 12 Lymphknoten während der RPE entfernt und anschließend pathologisch untersucht worden. Die in der Literatur geforderte Mindestanzahl von 20 Lymphknoten pro Patient konnte nicht erreicht werden. Die pathologische Erstsichtung wurde zudem innerhalb der Routinediagnostik von verschiedenen Pathologen durchgeführt. Es wurde auch keine Analyse der Krankheitsverläufe bezüglich der Operateure und Pathologen durchgeführt. Auch wurde eine eventuell durchgeführte präoperative Therapie nicht in die Analysen einbezogen.

Die Lymphknoten wurden in der Routinediagnostik und auch in den Untersuchungen für diese Studie nicht vollständig untersucht. Es wurden nur einzelne Schnitte für die verschiedenen Färbungen angefertigt, da eine vollständige Untersuchung sowohl aus finanziellen als auch strukturellen Gründen nicht durchführbar war. Vor allem kleine Metastasen konnten so leicht übersehen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Präparate jeweils von einem Pathologen und der Verfasserin der Arbeit gesichtet. Dies vermindert die Subjektivität der Einschätzung der histologischen und immunohistochemischen Färbungen, vermindert jedoch gleichzeitig die Validität der Untersuchungen. Die Färbungen selbst wurden durch geschultes Personal des Instituts

für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin nach oben beschriebenen Protokollen durchgeführt. Geringe Unterschiede in der Färbedauer und exakten Durchführung der Färbungen können nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5.3 Ausblick

Die hohe und steigende Inzidenz des PCa verdeutlicht den Stellenwert der Diagnostik und Therapie des PCa. Auch die zunehmende finanzielle Belastung des Gesundheitssystems macht es notwendig, sich genauer mit diesem Thema auseinander zu setzen. Trotz der zahlreichen Erkenntnisse dieser Arbeit bleiben weiterführende Fragen offen. Welche Bedeutung haben Mikrometastasen überhaupt? Verschlechtern sie wirklich die Prognose des Patienten? Entwickeln sich Mikrometastasen immer zu einem klinisch apparenten Rezidiv? Hat die Entfernung von Mikrometastasen neben dem diagnostischen auch einen therapeutischen Effekt? Hat die Größe der Metastasen im Lymphknoten eine klinische Bedeutung? Wenn ja, lohnt es sich mittels IHC und PCR kleinere Metastasen zu entdecken, um so das klinische Outcome der Patienten zu verbessern? Ist die geringe Sensitivität der IHC und der PCR eventuell darauf zurückzuführen, dass andere Mechanismen wie z.B. die hämatogene Metastasierung eine größere Rolle spielen als bisher angenommen?

Um Antworten auf die oben genannten Fragen zu finden, sollte zukünftig eine möglichst prospektive, multizentrische Studie mit einer wesentlich größeren Patientenzahl durchgeführt werden, bei der pro Patient möglichst mehr als 20 Lymphknoten entfernt und untersucht werden. Falls die Operationen durch verschiedene Chirurgen durchgeführt werden, sollten sie nach einem festgelegten Schema ausgeführt werden. Die Lymphknoten sollten möglichst vollständig und nach festgelegtem Protokoll gefärbt und doppelblind von mehreren Pathologen untersucht werden. Eine langfristige Nachsorge der Patienten sollte außerdem gewährleistet sein.

Literaturverzeichnis

1. Deutsches Krebsforschungszentrum: Häufigste Krebstodesursachen. (Accessed 21.05.2015, 10Uhr, at https://http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_6.html - inhalt2.)
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer Journal international du cancer 2010;127:2893-917.
3. Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten; Prostatakrebs (Prostatakarzinom) (Accessed 21.05.2015, 10 Uhr, at http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html;jsessionid=C5B1CF88DF53643105FC070810AF6150.2_cid292.)
4. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Leitlinienprogramm Onkologie, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 3.1, 2014 AWMF Registernummer: 043/022OL. (Accessed 21.05.2015, 11Uhr, at <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html.>)
5. WHO: Cancer Mortality Database. (Accessed 21.05.2015, 11:30Uhr, at <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm.>)
6. Farkas A, Schneider D, Perrotti M, Cummings KB, Ward WS. National trends in the epidemiology of prostate cancer, 1973 to 1994: evidence for the effectiveness of prostate-specific antigen screening. Urology 1998;52:444-8; discussion 8-9.
7. Statistisches Bundesamt Deutschland, Zahlen und Fakten: Bevölkerung. (Accessed 26.02.2013, 2013, at <https://http://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Indikatoren/LangeReihen/Bevoelkerung/lrbev01.html.>)
8. Early Detection of Prostate Cancer. (Accessed 06.12.2015, at <https://http://www.auanet.org/education/guidelines/prostate-cancer-detection.cfm.>)
9. Guidelines on Prostate Cancer. (Accessed 06.12.2015, at [https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/.](https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>.))
10. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. European urology 2012;61:1079-92.
11. Thomas JA. Diet, micronutrients, and the prostate gland. Nutrition reviews 1999;57:95-103.

12. Graham S, Haughey B, Marshall J, et al. Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland. *Journal of the National Cancer Institute* 1983;70:687-92.
13. Morton RA, Jr. Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North American men. *Urology* 1994;44:637-45.
14. Giles G, Ireland P. Diet, nutrition and prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1997;Suppl 10:13-7.
15. Giles GG, Severi G, English DR, et al. Sexual factors and prostate cancer. *BJU international* 2003;92:211-6.
16. Aumüller G, Aust G, Doll A, et al. *Anatomie*. Stuttgart: Thieme Georg Verlag; 2010.
17. Fergus V, Coakley HH. *RADIOLOGIC ANATOMY OF THE PROSTATE GLAND: A CLINICAL APPROACH*. Radiologic Clinics of North America: Elsevier; 2000.
18. Riede UN, Schäfer HE, Werner MUHbgdbiGoy. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme Georg Verlag; 2004.
19. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme; 2006.
20. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology* 2012;60:87-117.
21. Epstein JI, Netto GJ. *Biopsy Interpretation of the Prostate*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
22. J.I. Epstein LWW. *The Gleason Grading System: A Complete Guide for Pathologists and Clinicians*. 1. Har/Psc ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
23. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2005;29:1228-42.
24. Montironi R, Cheng L, Lopez-Beltran A, et al. Original Gleason system versus 2005 ISUP modified Gleason system: the importance of indicating which system is used in the patient's pathology and clinical reports. *European urology* 2010;58:369-73.
25. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*: Wiley; 2009.

26. Ch. Wittekind H-JM, F. Bootz. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Berlin: Springer; 2003.
27. Unger HA, Kane RD, Fox KM, et al. Relative importance of PSA in prostate cancer treatment. *Urologic oncology* 2005;23:238-45.
28. Verghe DC, Heine K, Wolff JM. [The role of PSA in diagnosis of prostate cancer and its recurrence]. *Der Pathologe* 2005;26:473-8.
29. Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, et al. Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 2011;117:1210-9.
30. Ohori M, Wheeler TM, Dunn JK, Stamey TA, Scardino PT. The pathological features and prognosis of prostate cancer detectable with current diagnostic tests. *The Journal of urology* 1994;152:1714-20.
31. Wang MC, Papsidero LD, Kuriyama M, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *The Prostate* 1981;2:89-96.
32. Bangma CH, Rietbergen JB, Kranse R, Blijenberg BG, Petterson K, Schroder FH. The free-to-total prostate specific antigen ratio improves the specificity of prostate specific antigen in screening for prostate cancer in the general population. *The Journal of urology* 1997;157:2191-6.
33. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *Jama* 1998;279:1542-7.
34. Van Cangh PJ, De Nayer P, De Vischer L, et al. Free to total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) in the diagnostic gray zone of 1.8 to 10 ng/mL total PSA. *Urology* 1996;48:67-70.
35. Catalona WJ. Clinical utility of measurements of free and total prostate-specific antigen (PSA): a review. *The Prostate Supplement* 1996;7:64-9.
36. Lepor A, Catalona WJ, Loeb S. The Prostate Health Index: Its Utility in Prostate Cancer Detection. *The Urologic clinics of North America* 2016;43:1-6.
37. Loeb S, Sanda MG, Broyles DL, et al. The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *The Journal of urology* 2015;193:1163-9.
38. Fuchsova R, Topolcan O, Windrichova J, et al. PHI in the Early Detection of Prostate Cancer. *Anticancer research* 2015;35:4855-7.

39. Loeb S, Sokoll LJ, Broyles DL, et al. Prospective multicenter evaluation of the Beckman Coulter Prostate Health Index using WHO calibration. *The Journal of urology* 2013;189:1702-6.
40. Houlgatte A, Vincendeau S, Desfemmes F, et al. [Use of [-2] pro PSA and phi index for early detection of prostate cancer: a prospective of 452 patients]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie* 2012;22:279-83.
41. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *The Journal of urology* 2011;185:1650-5.
42. Kim EH, Andriole GL. Prostate-specific antigen-based screening: controversy and guidelines. *BMC medicine* 2015;13:61.
43. Stone NN, Crawford ED. To screen or nor to screen: the prostate cancer dilemma. *Asian journal of andrology* 2015;17:44-5.
44. Hoogendam A, Buntinx F, de Vet HC. The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis. *Family practice* 1999;16:621-6.
45. Hallscheidt PH, Axel. *Urogenitale Bildgebung*. 1 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
46. Briganti A, Chun FK, Salonia A, et al. Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion among patients undergoing radical prostatectomy and an extended pelvic lymphadenectomy. *European urology* 2006;49:1019-26; discussion 26-7.
47. Joslyn SA, Konety BR. Impact of extent of lymphadenectomy on survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Urology* 2006;68:121-5.
48. Schilling D, Hennenlotter J, Gakis G, et al. Prospective assessment of histological serial sectioning of pelvic lymph nodes in prostate cancer: a cost-benefit analysis. *BJU international* 2012;110:E166-71.
49. Touijer K, Rabbani F, Otero JR, et al. Standard versus limited pelvic lymph node dissection for prostate cancer in patients with a predicted probability of nodal metastasis greater than 1%. *The Journal of urology* 2007;178:120-4.
50. Sandhu GS, Andriole GL. Overdiagnosis of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2012;2012:146-51.

51. Djulbegovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, et al. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed)* 2010;341:c4543.
52. Fujisawa M, Miyake H. Significance of micrometastases in prostate cancer. *Surgical oncology* 2008;17:247-52.
53. May M, Kaufmann O, Hammermann F, Loy V, Siegsmund M. Prognostic impact of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU international* 2007;99:539-44.
54. Ferrari MK, McNeal JE, Malhotra SM, Brooks JD. Vascular invasion predicts recurrence after radical prostatectomy: stratification of risk based on pathologic variables. *Urology* 2004;64:749-53.
55. Martinez-Pineiro L, Rios E, Pastor T, et al. Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for PSA in peripheral blood and lymph nodes. Comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000;3:S28-S9.
56. Deng FM, Mendrinis SE, Das K, Melamed J. Periprostatic lymph node metastasis in prostate cancer and its clinical significance. *Histopathology* 2012;60:1004-8.
57. Darwish OM, Raj GV. Management of biochemical recurrence after primary localized therapy for prostate cancer. *Frontiers in oncology* 2012;2:48.
58. Pagliarulo V, Hawes D, Brands FH, et al. Detection of occult lymph node metastases in locally advanced node-negative prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:2735-42.
59. Miyake H, Kurahashi T, Hara I, Takenaka A, Fujisawa M. Significance of micrometastases in pelvic lymph nodes detected by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy after neoadjuvant hormonal therapy. *BJU international* 2007;99:315-20.
60. Deguchi T, Doi T, Ehara H, et al. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer research* 1993;53:5350-4.
61. Shariat SF, Roudier MP, Wilcox GE, et al. Comparison of immunohistochemistry with reverse transcription-PCR for the detection of micrometastatic prostate cancer in lymph nodes. *Cancer research* 2003;63:4662-70.

62. Haas CJ, Wagner T, Wawroschek F, Arnholdt H. Combined application of RT-PCR and immunohistochemistry on paraffin embedded sentinel lymph nodes of prostate cancer patients. *Pathology, research and practice* 2005;200:763-70.
63. Miyake H, Hara I, Kurahashi T, Inoue TA, Eto H, Fujisawa M. Quantitative detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients with clinically localized prostate cancer by real-time reverse transcriptase-PCR. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:1192-7.
64. Freeman JA, Esrig D, Grossfeld GD, et al. Incidence of occult lymph node metastases in pathological stage C (pT3N0) prostate cancer. *The Journal of urology* 1995;154:474-8.
65. Krentz H. *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin: Band 1: Beschreibende Statistische Analysen (Berichte aus der Statistik)*: Shaker; 2008.
66. Krentz H. *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin: Band 2: Schließende Statistische Analysen (Berichte aus der Statistik)*: Shaker; 2008.
67. Krentz H. *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin: Band 3: Grafische Darstellung statistischer Kennwerte (Berichte aus der Statistik)*: Shaker; 2008.
68. Liu DY, Xia WM, Tang Q, et al. Detection of pelvic lymph node micrometastasis by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in prostate cancer patients after hormonal therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140:235-41.
69. Kluth LA, Xylinas E, Rieken M, et al. Does increasing the nodal yield improve outcomes in contemporary patients without nodal metastasis undergoing radical prostatectomy? *Urologic oncology* 2014;32:47 e1-8.
70. Wawroschek F, Wagner T, Hamm M, et al. The influence of serial sections, immunohistochemistry, and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *European urology* 2003;43:132-6; discussion 7.
71. May M, Siegsmond M, Hammermann F, Loy V, Gunia S. Visual estimation of the tumor volume in prostate cancer: a useful means for predicting biochemical-free survival after radical prostatectomy? *Prostate cancer and prostatic diseases* 2007;10:66-71.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Marie Therese Beate Pross, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Immunhistochemischer Nachweis von Lymphknotenmetastasen pN0(i+) bei
Prostatakarzinomen nach radikaler Prostatektomie in der Bedeutung für Rezidive

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (*siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich möchte hiermit allen danken, durch deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit zustande kommen konnte.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Busch für die tatkräftige und stets freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. med. Kilic für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation sowie seine umfassende Unterstützung und Anleitung vom Beginn der Arbeit bis zu fertigen Dissertation.

Zuletzt möchte ich auch allen Angestellten des Instituts für Pathologie der Charite-Universitätsmedizin Berlin danken, ohne die die technische Umsetzung der praktischen Arbeiten und damit die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.