

Aus dem Charite´ Centrum 10 für
Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Klinik für Urologie
Campus Benjam Franklin
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. K. Miller

Habilitationsschrift

Das lokoregionäre Prostatakarzinom: Untersuchungen zur Häufigkeit, Bedeutung und Therapie subklinischer Disseminate, sowie zur Auswirkung der endokrinen In- duktion auf den Lokalbefund.

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fachgebiet Urologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der medizinischen Fakultät
Charite´ - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jens Köllermann

Habilitation: 11.02.2008

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Jakse, RWTH Aachen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Hofstädter, Universität Regensburg

Abkürzungsverzeichnis:

ABC-Methode	Avidin Biotin Complex Methode
AK	Antikörper
APAAP	Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase
AR	Androgenrezeptor
ASAP	Atypical small acinar proliferation
Bx	Biopsie
CK	Cytokeratin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DES	Diethylstilbestrol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GNRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GS	Gleason Score
GSTP-1	Glutathion-S-Transferase P1
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HM	Hypermethylierung
IHC	Immunhistochemie
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
mAK	monoklonaler Antikörper
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MS-PCR	methylierungsspezifische Polymerase Kettenreaktion
NE	neuroendokrin
NHT	neoadjuvante Hormontherapie
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PPNET	prolongierte PSA-gesteuerte endokrine Therapie
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSMA	prostataspezifisches Membranantigen
Q-MS-PCR	Quantitative-methylierungsspezifische Polymerase Kettenreaktion
RG	Regressionsgrad
RNS	Ribonukleinsäure
RP	radikale Prostatektomie
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor

Gliederung:

1. EINLEITUNG	5
2. HISTOPATHOLOGIE DER PROSTATA NACH ENDOKRINER THERAPIE	12
2.1. ALLGEMEINE UND SPEZIELLE HISTOMORPHOLOGISCHE ASPEKTE	12
2.1.1. Stroma und benigne Drüsen	12
2.1.2. Prostatistische intraepitheliale Neoplasie:	13
2.1.3. Prostatakarzinom:	14
2.1.3.1. Verhalten des Malignitätsgrades unter endokriner Therapie	16
2.1.3.2. Neuroendokrine Tumordifferenzierung: Zunahme unter PPNET?	17
2.1.3.3. Das kleinzellig neuroendokrin differenzierte Prostatakarzinom	20
2.1.3.4. Das intraduktale Prostatakarzinom	20
2.2. pT0 NACH NEOADJUVANTER ENDOKRINER THERAPIE DES KLINISCH LOKAL BEGRENZTEN PROSTATAKARZINOMS	22
2.2.1. Vorbemerkungen	22
2.2.2. Häufigkeit von pT0 nach prolongierter, PSA-gesteuerter, neoadjuvanter endokriner Therapie (PPNET) bei Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom.	23
2.2.2.1. Einleitung:	23
2.2.2.2. Patienten und Methoden:	23
2.2.2.3. Ergebnisse	25
2.2.2.4. Diskussion	28
2.2.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	33
2.2.3. Bedeutung des pT0-Befundes	34
2.2.3.1. Einleitung	34
2.2.3.2. Material / Methoden	34
2.2.3.3. Ergebnisse	36
2.2.3.4. Diskussion	39
2.2.3.5. Zusammenfassung / Schlussfolgerung	41
2.2.4. Verlaufsbeobachtung von pT0-Patienten	42
2.2.4.1. Einleitung	42
2.2.4.2. Patienten, Material und Methoden	43
2.2.4.3. Ergebnisse	44
2.2.4.4. Diskussion	46
2.2.4.5. Zusammenfassung	47
2.2.5. Prognose des pT0-Befundes: Eine Matched-Pair Analyse	48
2.2.5.1. Einführung	48
2.2.5.2. Material / Methoden	48
2.2.5.3. Ergebnisse	49
2.2.5.4. Diskussion	52
2.2.5.5. Zusammenfassung /Schlussfolgerungen	53
2.2.6. Abschließende Bemerkungen zu pT0	54
3. UNTERSUCHUNGEN ZUR KNOCHENMARKBESIEDELUNG MIT DISSEMINIERTEN PROSTATAKARZINOMZELLEN	57
3.1. HÄUFIGKEIT DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK BEI UNVORBEHANDELTEN PATIENTEN MIT KLINISCH LOKALISIERTEM PROSTATAKARZINOM	57
3.1.1. Einführung	57
3.1.2. Patienten, Material und Methoden	57
3.1.3. Ergebnisse	59
3.1.4. Diskussion:	62
3.1.4.1. Zur Häufigkeit des Knochenmarkbefalls:	63
3.1.4.2. Korrelation des Knochenmarkbefalls mit etablierten Risikofaktoren:	68
3.1.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	72

3.2. Das Verhalten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom unter endokriner Vorbehandlung	74
3.2.1. Einleitung:	74
3.2.2. Patienten und Methoden:	74
3.2.3. Ergebnisse:	75
3.2.4. Diskussion:	76
3.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	81
4. HÄUFIGKEIT DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IN DEN REGIONALEN LYMPHKNOTEN BEI PATIENTEN MIT KLINISCH LOKALISIERTEM PROSTATAKARZINOM	83
4.1. UNTERSUCHUNGEN MITTELS HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	83
4.1.1. Einleitung	83
4.1.2. Patienten und Methoden	83
4.1.3. Ergebnisse	85
4.1.4. Diskussion	87
4.1.4.1. Häufigkeit des occulter LK-Befalls:	87
4.1.4.2. Vergleich occulter Lymphknoten- vs. Knochenmarkbefall	94
4.1.4.3. Korrelation des occulter Lymphknotenbefalls mit etablierten Risikofaktoren	98
4.1.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	99
4.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM OCCULTEN LYMPHKNOTENBEFALL MITTELS METHYLIERUNGSSPEZIFISCHER POLYMERASE-KETTENREAKTION:	101
4.2.1. Einführung	101
4.2.2. Patienten und Methoden	103
4.2.3. Ergebnisse	104
4.2.4. Diskussion	106
4.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	109
5. ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK	111
5.1. UNVOLLSTÄNDIGE ERADIKATION DES PRIMÄRTUMORS:	111
5.2. SUBKLINISCHE TUMORAUSSAATEN	113
5.3. BEZUG ZUR KLINIK	118
5.3.1. Diagnose subklinischer Tumorzellstreuungen	118
5.3.2. Therapie subklinischer Tumorzellstreuungen	121
5.4. FAZIT:	124
Literatur:	127
DANKSAGUNG	140
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	142

1. EINLEITUNG

Seit Einführung der breitflächigen Messung des prostataspezifischen Antigens (PSA), werden Prostatakarzinome in zunehmend früheren Entwicklungsstadien diagnostiziert. Dadurch gelingt es heute häufig, im Gegensatz zur Vergangenheit, die Tumorerkrankung zu erkennen, bevor sie, zumindest nach klinischen Gesichtspunkten, metastasiert hat. Dies hat zu einer geradezu explosionsartigen Zunahme lediglich lokal wirksamer Behandlungen mit dennoch kurativer Intention, wie der radikalen Prostatektomie, der perkutanen Bestrahlung und der Brachytherapie geführt. Trotz all dieser Fortschritte sind auch bei klinisch, vermeintlich lokal begrenztem Tumorwachstum Behandlungsmisserfolge keine Seltenheit. Rezidivraten zwischen 15 – 40% werden berichtet (*Hull et al. 2002; Han et al. 2001; Amling et al. 2000*). Das hat vor allem 2 Ursachen:

- Einerseits wird die lokale Ausdehnung der Geschwulst nicht selten unterschätzt. Die vollständige Eradikation ist deshalb nicht möglich. Es verbleiben Tumorreste. Lokale Rezidive sind die Folge.
- Andererseits verbleiben, ebenfalls nicht selten, klinisch stumme Aussaaten, die über Mikrometastasen dann zu Metastasen heranwachsen. Früher oder später führen auch sie zu einem Therapieversagen.

In den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die endokrine Behandlung von Patienten mit Prostatakarzinom eingeführt (*Huggins and Hodges 1941; Huggins et al. 1941; Huggins et al. 1941*). In ihrem Gefolge kommt es häufig zur deutlichen Größenreduktion des Primärtumors und auch seiner etwaigen Metastasen. Selbst komplette Remissionen sind keine Seltenheit. Leider sind sowohl die partiellen, als auch die kompletten Remissionen zeitlich begrenzt und somit die Hormontherapie offensichtlich ohne kurative Potenz. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Hormontherapie jedoch die wirksamste systemische Therapie des Prostatakarzinoms.

Angesichts der beiden oben bereits erwähnten Ursachen für das Versagen lokaler Therapiemaßnahmen, lag es auf der Hand diese mit der systemischen, also hormonellen Behandlung zu kombinieren. Das hat man auch schon sehr frühzeitig getan. *Vallet 1944* hat dieses Konzept erstmalig zur Anwendung gebracht. Damals wurden Prostatakarzinome zumeist erst in einem lokal sehr fortgeschrittenen

Stadium entdeckt und auch die Metastasendiagnostik stand noch am Anfang ihrer Entwicklung. Einer lokalchirurgischen Behandlung waren zu jener Zeit, schon aus technischen Gründen, enge Grenzen gesetzt. In dieser Situation versprach man sich von der endokrinen Vorbehandlung zunächst einmal durch Reduktion des Lokalbefundes Resektabilität zu schaffen. Da sich die endokrine Vorbehandlung hinsichtlich dieser Zielsetzung auch bewährte, fand sie rasch weitere Anhänger, die ihre Wirksamkeit auch bestätigten (*Gutierrez 1949; Scott 1964; Parlow and Scott 1949; Colston and Brendler 1947; Chute and Fox 1966; Scott and Boyd 1969; Cosgrove et al. 1973*). Die nachfolgende Entwicklung ließ diese Indikation der endokrinen Vorbehandlung aber in den Hintergrund treten. Mit der Verfeinerung der Metastasendiagnostik wurde klar, dass lokal sehr fortgeschrittene und deshalb nicht resektable Tumoren zumeist auch schon feststellbar gestreut haben und deshalb, selbst nach hormoneller Vorbehandlung, keiner lokalen Therapie mit kurativer Aussicht mehr zugänglich sind.

Nachdem, beginnend in der zweiten Hälfte der achtziger Jahre, die Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms möglich und zunehmend Realität geworden war, hatten sich auch die Behandlungsbedingungen erheblich gewandelt.

Jetzt waren die neu festgestellten Prostatakarzinome vorwiegend klein, die Resektabilität deshalb zumeist kein Thema mehr. Auch die modernsten bildgebenden Untersuchungsmethoden ließen häufig keine Metastasierung erkennen. Somit lagen bei den meisten Patienten vermeintlich ideale Voraussetzungen für lokale Therapiemaßnahmen, allen voran die radikale Prostatektomie vor.

Dennoch, die Häufigkeit der altbekannten Ursachen des Therapieversagens, die unvollständige lokale Tumoreradikation und die unbemerkte systemische Streuung, nahmen zwar drastisch ab, vollständig ausgeschaltet werden konnten diese Negativfaktoren jedoch auch durch die Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms nicht.

Sie traten jetzt allerdings in anderer Form auf: Statt makroskopisch unvollständiger Resektion (R2) nun mikroskopischer Schnittrandbefall (R1) und statt histologisch feststellbarer Metastasen, z. B. im regionalen Lymphadenektomiepräparat, nun der Verdacht auf das Vorliegen disseminierte Tumoreinzelzellen, die früher oder später zu Mikro- und Makrometastasen heranwachsen könnten.

In der folgenden Tabelle 1 wurden zur Illustration des Gesagten die Häufigkeit positiver Schnittrandbefunde mehrerer zeitgenössischer Prostatektomieserien aufgelistet.

Autor	n	Schnittrand +
Fair et al. 1997	92	36%
Pedersen et al. 1995	54	46%
Soloway et al. 1995	137	47%
Labrie et al. 1994	71	34%
Klotz et al. 1996	91	65%
Bellavance and Fradet 1996	275	39%
Debruyne et al. 1996	154	44%
Van Poppel et al. 1995	62	46%
Bono et al. 2001	107	51%
Summe/Mittel	1043	45%

Tab. 1: Schnittrandbefall bei radikaler Prostatektomie

Wie ersichtlich, ist der tumorbefallene Schnittrand, trotz aller Frühdiagnostik, ein immer noch sehr häufiger Befund und eine Vielzahl von Veröffentlichungen belegt, dass es sich dabei um einen Rezidivrisikofaktor handelt (*Ohori et al. 1995; Epstein et al. 1993; Epstein et al. 1996; Paulson et al. 1986; Obek et al. 1999*). Dies und bereits stattgehabte, jedoch unbemerkte Streuungen bedingen, dass auch in zeitgenössischen Prostatektomieserien die 5 und 10 Jahres Rezidivfreiheit nur bei 59-83% bzw. 47-74% liegt (*Trapasso et al. 1994; Zincke et al. 1994; Kupelian et al. 1997; Pound et al. 1999; Catalona and Smith 1994; Ohori et al. 1995; Iselin et al. 1998; Partin et al. 1993*). Dabei handelt es sich hier aber ganz vorwiegend um cT1-2 Karzinome, und selbst in dieser Gruppe schneiden die dedifferenzierten Tumore wesentlich schlechter als der Durchschnitt ab.

Noch ungünstiger stellt sich die Situation bei den Patienten mit cT3-Prostatakarzinomen dar. Zwar hat ihre Häufigkeit seit Einführung der flächenhaften PSA-Messungen von ehemals rund 30% auf ca. 10% deutlich abgenommen (*Amling et al. 1998*). Ein therapeutisches Dilemma stellt dieses Patientengut dennoch unverändert dar. Radikale Prostatektomie und Strahlentherapie stehen hier miteinander in enger Konkurrenz (*Aus et al. 2001*). Als Monotherapie lassen die Ergebnisse beider Therapieformen jedoch so oder so, erheblich zu wünschen. So

waren nach radikaler Prostatektomie von 242 cT3 Patienten einer multizentrischen Studie nach 10 Jahren nur noch 32 % metastasenfrem (Gerber et al. 1997). In der Patientenserie von van den Ouden et al. 1998 hatten 71 % bereits nach 5 Jahren eine biochemische Progression. In der großen perkutanen Bestrahlungsserie (551 Patienten) von Zagars et al. 1987 betrug das progressfreie Überleben nach 5 Jahren 59 und nach 10 Jahren 46%. Auch hier gilt, je desdifferenzierter der Tumor, desto schlechter die Prognose.

Unklar ist nach wie vor die klinische Bedeutung zunächst nicht fassbarer Tumorzellstreuungen, die sich früher oder später als Metastasen manifestieren.

Durch immunhistochemische und molekulare Untersuchungsmethoden in Blutproben, Lymphknoten und Knochenmark ist es seit geraumer Zeit möglich geworden Tumoreinzelzellen mit hinreichend hoher Sicherheit zu identifizieren.

Über die Häufigkeit dieser Disseminate und ihre Abhängigkeit von bekannt prognoserelevanten und sonstigen Faktoren liegen widersprüchliche Mitteilungen vor. Präzise Aussagen zu ihrer Bedeutung für den Krankheitsverlauf können derzeit ebenfalls nicht erfolgen. Dennoch ist davon auszugehen, dass disseminierte Tumoreinzelzellen unter gewissen Umständen zu weiteren Schritten in der metastatischen Kaskade führen.

Angesichts dieser allgemeinen Sachlage wäre neben der lokalen Therapie eine zusätzliche systemische Behandlung, welche die genannten Negativfaktoren beseitigt oder zumindest reduziert, nach wie vor in hohem Maße wünschenswert.

Die endokrine Behandlung drängte sich dazu, auch angesichts der frühen Erfahrungen mit ihr und mangels hinreichender Alternativen, geradezu auf. Zumal man jetzt nicht mehr nur auf die irreversible und psychologisch belastende Orchidektomie bzw. die nebenwirkungsreichen Östrogene angewiesen war, sondern auf gut verträgliche und vor allem in ihrer Wirkung reversible Medikamente zurückgreifen konnte.

Aus diesen Überlegungen entstand das Konzept der modernen, induktiven oder neoadjuvanten endokrinen Therapie.

Nachdem die Arbeitsgruppe von Labrie et al. 1985 die zumindest theoretischen Vorzüge der kompletten, gegenüber der partiellen Androgendeprivation herausgearbeitet hatten, wurde erstere in unterschiedlichen Formen von den meisten Autoren auch für die neoadjuvante Therapie übernommen.

Die frühen Pioniere der endokrinen Vorbehandlung hatten ein relativ klares Ziel vor Augen an dem sie die Dauer der Therapie ausrichteten: Resektabilität. Dieser Endpunkt wurde im Einzelfall nach sehr unterschiedlichen Zeitspannen erreicht. Sie konnte sich aber über 1 Jahr und länger erstrecken.

Nachdem es möglich geworden war das Prostatakarzinom zumeist in einem wesentlich früheren Stadium zu entdecken, konnte das vormals relativ einfach festzustellende Kriterium der Resektabilität nicht mehr als individuelles Behandlungsziel dienen. Den modernen Autoren war somit ein leicht zu erkennendes unmittelbares Behandlungsziel, an dem sie die Dauer der Therapie ausrichten konnten, abhanden gekommen. Deshalb legten die meisten die Dauer der neoadjuvanten Hormontherapie, jetzt völlig willkürlich, bei 3 Monaten fest. Damit verzichteten sie ganz auf eine individuelle Behandlung. Große und kleine, hoch, mäßig und niedrig differenzierte Tumoren mit den unterschiedlichsten initialen PSA-Werten wurden somit einem pauschalen Behandlungsregime unterzogen.

Obwohl dieses schematische Vorgehen bereits zu einer etwa 50 %-igen Reduktion tumorbefallener Schnittränder führte (*Fair et al. 1997; Pedersen et al. 1995; Soloway et al. 1997; Labrie et al. 1994; Klotz et al. 1996; Bellavance and Fradet 1996; Van Poppel et al. 1995; Bono et al. 2001*), konnte in den bisher vorliegenden Studienergebnissen keine Abnahme der Rezidivhäufigkeit nach radikaler Prostatektomie festgestellt werden (*Aus et al. 1998; Klotz et al. 1999; Witjes et al. 1997; Schulman et al. 2000; Baert et al. 1998; Soloway et al. 1997*).

Es lag nun aber nahe zu vermuten, dass die konventionelle 3 monatige endokrine Induktion die Möglichkeiten der neoadjuvanten Hormontherapie nicht bei allen Patienten ausschöpft. Da mit der PSA Bestimmung ein verlässliches Kontrollinstrument des Tumorverhaltens unter therapeutischen Bedingungen vorliegt, wurden die eigenen Patienten, beginnend 1992, einer prolongierten, PSA-gesteuerten, neoadjuvanten, endokrinen Therapie (PPNET) unterzogen. Dabei wurde von der bisher unwiderlegten These ausgegangen, dass die Behandlung wirkt, solange der PSA Wert abfällt (*Miller et al. 1992*). Der Vorbehandlungsendpunkt fällt somit mit dem individuell erreichbaren PSA Nadirwert zusammen. Durch dieses Vorgehen kann anstelle der pauschalisierten Vorbehandlung die Dauer der endokrinen Vorbehandlung patientenindividualisiert durchgeführt werden.

Die überlegene Wirksamkeit der prolongierten gegenüber der schematischen 3 monatigen Induktion auf den Primärtumor zumindest auf histomorphologischer

Ebene, konnte inzwischen durch eine Reihe von Veröffentlichungen belegt werden (*Köllermann et al. 1998; Gleave et al. 1996; Bellavance and Fradet 1996; van der Kwast et al. 1999; Meyer et al. 2001; Montironi et al. 1999*)

In der vorliegenden Arbeit wurde sich eingehend mit der Auswirkung der endokrinen Therapie auf den Primärtumor und subklinischer Disseminate auseinandergesetzt. Bezüglich des Primärtumors hat sich gezeigt, dass es unter prolongierter Induktion zu ausgeprägten regressiven Veränderungen am Tumor und erstmals auch zu pT0 Befunden in nennenswerter Anzahl kommt. Zur Häufigkeit, Bedeutung und Prognose, sowie zu den Voraussetzungen dieser Therapieergebnisse wurden eigenen Untersuchungen durchgeführt, deren Resultate hier vorgestellt und diskutiert werden.

Beginnend in den achtziger Jahren, mit der Entwicklung hoch empfindlicher Detektionstechniken, ist der Dissemination von Tumoreinzellen zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt worden. Es liegt nahe anzunehmen, dass dieses zuvor nicht fassbare Phänomen unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung später klinisch manifest werdender Metastasen ist. Wenngleich bereits Untersuchungen zur Häufigkeit von Tumorzellen im Blut, Knochenmark und in regionalen Lymphknoten von Patienten mit Prostatakarzinom vorliegen, sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich. Hinzu kommt, dass das Verhältnis zwischen Häufigkeit und Intensität der Disseminate einerseits und bekannten prognoserelevanten Faktoren wie Tumorstadium, initialem PSA-Wert und Differenzierungsgrad der Geschwulst andererseits sehr widersprüchlich beurteilt werden. Dasselbe gilt auch für die prognostische Bedeutung dieser Streuungen.

Um die Kenntnisse in diesem Bereich zu festigen, wird hier die zahlenmäßig größte Studie zum Thema Knochenmarkbesiedelung vorgelegt und die Zusammenhänge zwischen dieser und den genannten prognoserelevanten Faktoren ausführlich diskutiert.

In einer vorangehenden eigenen Untersuchung (*Köllermann et al. 1999*) wurde der Befall regionärer Lymphknoten mit Tumoreinzellen bei Prostatektomiepatienten mit immunhistochemischen Verfahren untersucht und mit dem Knochenmarkbefall verglichen. Inzwischen wurde im eigenen Labor mit der methylierungsspezifischen Polymerasekettenreaktion (MS-PCR) zum Nachweis der GSTP-1-Promotor Hypermethylierung ein praktikableres, deutlich sensibleres und spezifischeres Verfahren zur Detektion von Tumorzellen in Lymphknoten entwickelt. Die so gewon-

nenen Ergebnisse werden hier vorgestellt und diskutiert. Dabei wird ebenfalls auf Zusammenhänge zwischen Lymphknotenbefund und etablierten Prognosefaktoren eingegangen.

Weitgehend unbekannt ist das Verhalten der Tumorzelldisseminate unter und im Gefolge einer neoadjuvanten Hormontherapie. In der vorliegenden Arbeit werden die eigenen Untersuchungsergebnisse der ersten großen Studie zu diesem Thema anhand von über 200 Patienten, bei denen das Knochenmark vor und nach PPNET untersucht wurde, präsentiert.

Abschließend wird der Versuch unternommen, das vorliegende Ergebnismaterial und die daraus gezogenen, z.T. sehr widersprüchlichen Schlussfolgerungen, auch in Hinblick auf ihre prognostische Bedeutung, in einen theoretisch schlüssigen Kontext zu bringen und Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen aufzuzeigen.

2. HISTOPATHOLOGIE DER PROSTATA NACH ENDOKRINER THERAPIE

2.1. ALLGEMEINE UND SPEZIELLE HISTOMORPHOLOGISCHE ASPEKTE

Prinzipiell führt die endokrine Therapie am Primärorgan (Prostata) sowohl im benignen, als auch malignen Gewebe zu einem weiten Spektrum histomorphologischer Alterationen. Kenntnisse hiervon sind zur Beurteilung des Therapieeffektes als auch zur Initiation gezielter wissenschaftlicher weiterführender Untersuchungen unabdingbar. Die eigenen langjährigen diesbezüglichen Beobachtungen werden im Folgenden zusammengefasst (*Helpap und Köllermann 2004*).

2.1.1. Stroma und benigne Drüsen

Die endokrine Vorbehandlung führt generell zu einer glandulären Atrophie und zu Veränderungen der Drüsenarchitektur. Im Stroma findet sich häufig eine Hyperzellularität. Vereinzelt sind fokale lympho-/histiozytäre Infiltrate zu beobachten. Bei den nichtmalignen Drüsen ist zwischen Basalzellen und sekretorischem Epithel zu unterscheiden. Im Vergleich zur häufig atrophen zellulären Nachbarschaft wirkt die Basalzellschicht prominent, teils findet sich sogar eine Basalzellyperplasie. Dies wird als kompensatorischer Prozess zum Ausgleich des apoptotischen Verlustes von sekretorischem Epithel interpretiert (*Vailancourt et al. 1996*). Das den Androgenrezeptor exprimierende sekretorische Epithel zeigt atrophe Veränderungen im Sinne einer zytoplasmatischen Vakuolisierung und nukleären Verdichtungen bis hin zu Zelluntergängen. Dies führt zu einer Reduktion papillärer intraluminale Epithelaufwerfungen und insgesamt zu einer Größenreduktion der Drüsenschläuche. Die Drüsen zeigen zum Teil nur noch ein einschichtiges und atrophes Epithel. Selten findet sich eine Plattenepithelmetaplasie, die vermehrt auch nach Östrogen Therapie zu verzeichnen ist. Vereinzelt findet sich eine fokale Häufung von neuroendokrinen Zellen (*Köllermann und Helpap 2001*), (Abb. 1, 2, 3).

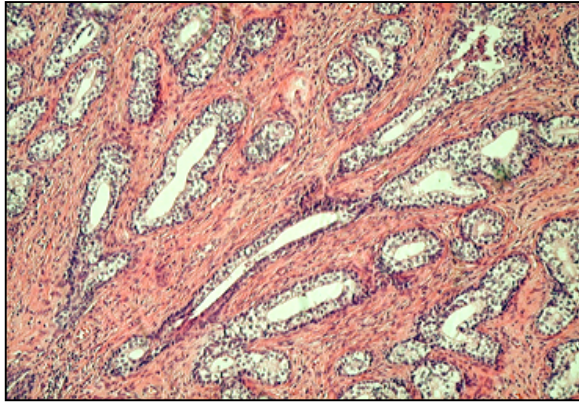


Abb. 1: Benignes Prostatagewebe nach anti-androgener Therapie: glanduläre Regression mit prominenter Basalzellschicht, hellzelligem, vakuolisiertem sekretorischem Drüsenepithel, vereinzelt Kernpyknoten. Stroma mit Hyperzellularität. Hämatoxylin-Eosin

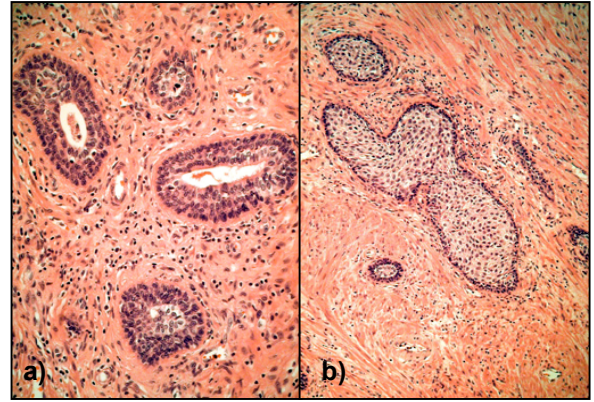


Abb 2: Benignes Prostatagewebe nach anti-androgener Therapie: a) glanduläre Basalzellhyperplasie, b) glanduläre Plattenepithelmetaplasie. Hämatoxylin-Eosin.

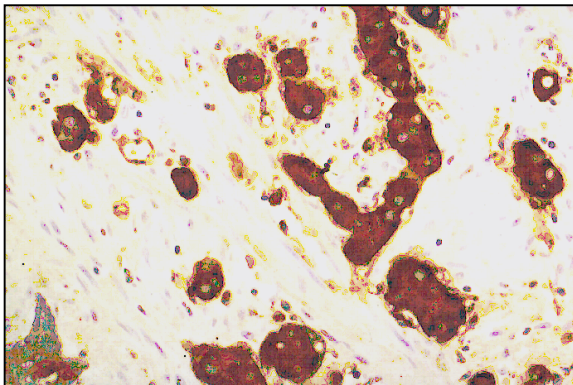


Abb. 3: Cluster neuroendokrin differenzierter Postataepithelzellen nach 3 monatiger endokriner Vorbehandlung. Chromogranin A Immunhistochemie, ABC-Methode).

2.1.2. Prostatistische intraepitheliale Neoplasie:

Die Androgendeprivation verursacht regressive Veränderungen wie beim benignen sekretorischen Drüsenepithel. Es kommt zu Vergrößerung und Vakuolisierung des Zytoplasmas, was zu einem klarzelligem Bild führt. Dysplastisches sekretorisches Epithel schilfert in das Drüsenlumen ab. Dadurch kommt es zu einem Rückgang der intraluminalen Epithelaufwerfungen und zu einer glandulären

Atrophie. Wie bei den benignen Drüsen findet sich eine prominente Basalzellschicht. Insgesamt kommt es durch die Behandlung zu einem Rückgang der Prävalenz und Ausdehnung von PIN Läsionen (*Ferguson et al. 1994; Montironi et al. 1994; Montironi et al. 1995*).

2.1.3. Prostatakarzinom:

Typische Veränderungen treten sowohl auf zellulärer als auch auf histoarchitektonischer Ebene auf. Zytologisch ist eine Schrumpfung der einzelnen Tumorzellen festzustellen. Ferner findet sich üblicherweise ein „klarzelliges“ Zytoplasma, einhergehend mit Vakuolisierungen. Die Zellkerne sind zumeist pyknotisch, es findet sich ein Verlust der nukleolären Prominenz.

Die Histoarchitektur ist gekennzeichnet durch ein Kontinuum an Strukturverlust. In bis zu 40% der Fälle finden sich weitgehend unverändert imponierende Tumoreareale, welches nach eigenen Beobachtung insbesondere für kribriforme Wachstumsmuster zutrifft (*Köllermann 1995*) (Abb. 4). Typisch für vorbehandelte Karzinome ist jedoch das Bild von kleinen Drüsen mit atrophem Epithel und dichten kompakten Kernen (Abb. 5). Ein weiteres, in ca. 30% der Fälle anzutreffendes Muster sind teils winzige, teils ausgedehnte, basophile Sekretextravasationen mit in das Stroma infiltrierendem Aspekt. Häufig können in diesem Sekret noch Tumorreste gefunden werden. Das Sekret ist PAS positiv, vereinzelt finden sich Panzytokeratin positive Einzelzellen im Stroma / Sekretübergang. Färbungen dieser Zellen mit hochmolekularen Zytokeratin 34βE12 sind negativ. Teilweise kann eine PSA Expression nachgewiesen werden (*Köllermann et al. 2000*). Zumeist ist die glanduläre Grundstruktur mit atropher Epithelauskleidung und fokalen Plasmavakuolisierungen noch zu erkennen (Abb. 6). In seltenen Fällen sind diese Veränderungen so ausgeprägt, dass ein als Pseudomyxoma ovarii beschriebenes Bild entstehen kann (*Tran et al. 1998*), (Abb 7). Weiterhin kann die ursprüngliche glanduläre Struktur derart gestört sein, dass z. T. nur noch mit großer Mühe Drüsenreste und verstreute Tumoreinzellen zu erkennen sind (Abb. 8, 9).

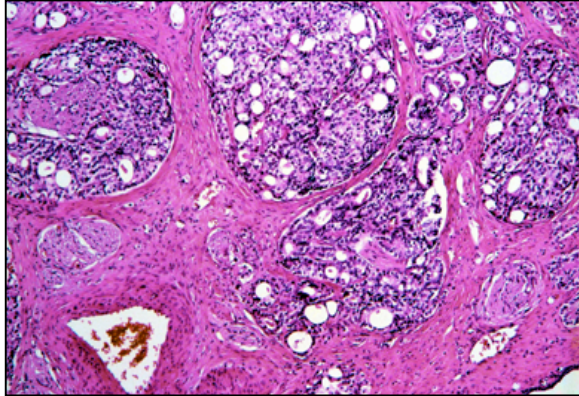


Abb. 4: Ausgedehnte kribriiforme Tumormassen nach antiandrogener Therapie ohne Regressionszeichen (Hämatoxylin-Eosin).

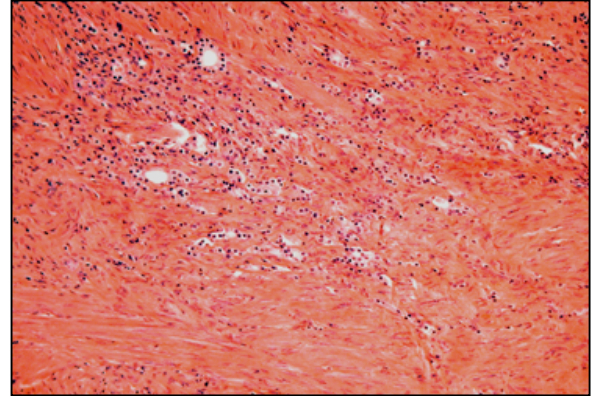


Abb. 5: Angedeutet Residuen von Tumordrüsen nach antiandrogener Therapie. Teils nur noch Tumoreinzelzellkomplexe mit pyknotischen Zellkernen nachweisbar (Hämatoxylin-Eosin).

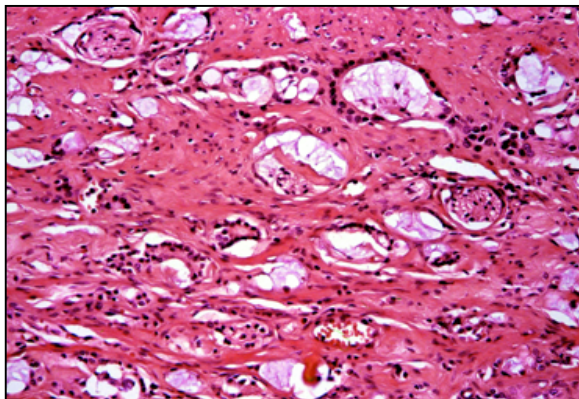


Abb. 6: Tumor mit ausgedehnten regressiven Veränderungen nach antiandrogener Therapie. Teils nur noch Spaltbildungen mit Zelldetritus und fokaler Schleimbildung (Hämatoxylin-Eosin).

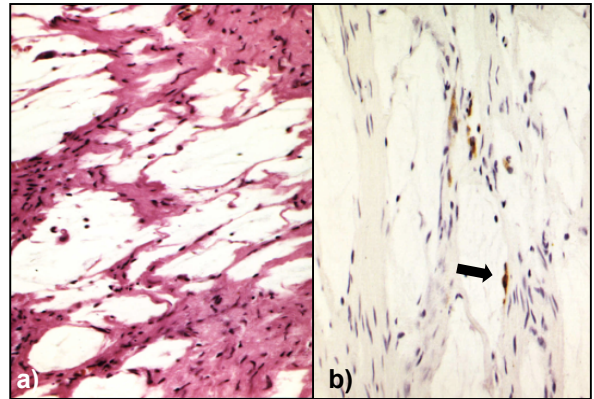


Abb. 7: a) Extreme Variante von Abb. 6, in der Literatur als Pseudomyxoma peritonei beschrieben (Hämatoxylin-Eosin) b) fokal PSA positive Zellreste nachweisbar (ABC-Methode).

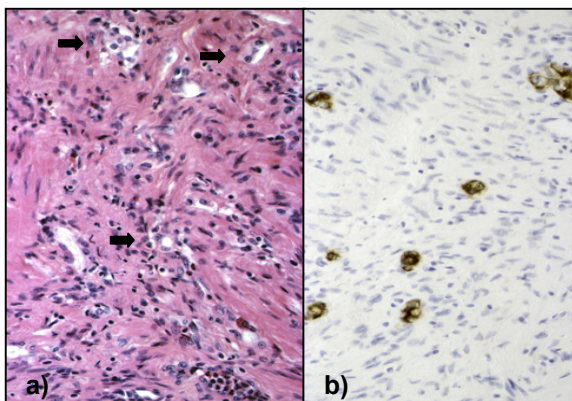


Abb. 8: a) Zelldichtes Stroma mit kaum identifizierbaren Tumordrüsen und Tumoreinzelzellen nach antiandrogener Therapie (Pfeile), b) Antizytokeratin KL-1 hebt Tumoresiduen deutlicher hervor (ABC-Methode).

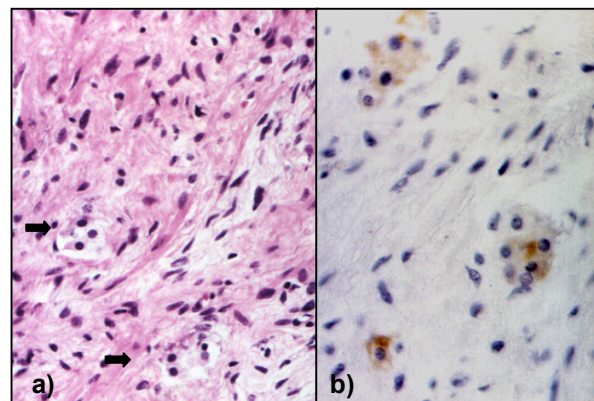


Abb. 9: a) Stark regressiv alterierte Tumordrüsenfragmente nach antiandrogener Therapie, b) Positive Reaktion für PSA hebt Tumoresiduen deutlicher hervor (ABC-Methode).

Immunhistochemie:

Immunhistochemische Untersuchungen sind aufgrund der teilweise ausgeprägten Tumordestruktion zur sicheren Diagnosestellung vielfach unumgänglich. Im wesentlichen gelangen Zytokeratinantikörper zum Einsatz. Zur Sicherung der epithelialen Herkunft tumorsuspekter Strukturen dienen niedermolekulare Zytokeratin Antikörper wie CAM 5.2 oder KL-1. Antikörper gegen Prostata spezifisches Antigen (PSA) belegen das Vorliegen von sekretorischem Drüsenepithel (Abb. 8, 9). Das Vorhandensein oder Fehlen der Basalzellschicht kann mittels hochmolekularen Zytokeratinantikörpern (34 β E12) und/oder p63 weiter untersucht werden (*Zhou et al. 2003*).

2.1.3.1. Verhalten des Malignitätsgrades unter endokriner Therapie

Aufgrund der zum Teil stark veränderten Tumorarchitektur wurde wiederholt die Möglichkeit einer Zunahme des Malignitätsgrades unter endokriner Therapie („Upgrading“) diskutiert. So berichteten *Kennedy et al. 1992* über eine Zunahme des Malignitätsgrades nach NHT bei 3 von 7 Patienten (43%), *Schulman und Sassiné 1993* in einer Serie von 40 Patienten über eine Rate von 32,5%. Nach aktuellen Konsensusbeschlüssen wird grundsätzlich von einer Bestimmung des Malignitätsgrades (Gleason-Summe) wegen der Gefahr der Überschätzung des Malignitätsgrades aufgrund der regressiven Tumorveränderungen abgeraten (*Carroll et al. 2002*) und somit eine eingehendere Beschäftigung mit dieser Fragestellung umgangen.

Nach eigenen Erfahrungen ist jedoch eine Bestimmung des Malignitätsgrades vielfach durchaus verlässlich durchführbar (*Köllermann und Helpap 2001*; *Köllermann 1995*). Diese Ansicht deckt sich mit den Erfahrungen anderer Autoren (*Civantos et al. 1995*; *Smith and Murphy 1994*), welche diesbezüglich insbesondere auf Parameter des Gleason-Gradings hinweisen, die unter Therapie verändert zu werten sind. Das Graduierungssystem basiert im wesentlichen auf dem Tumorwachstumsmuster (Pattern), der Separierbarkeit bzw. Konfluenz der einzelnen Tumordrüsen, dem Vorhandensein eines kribriformen Wachstumsmusters und dem Vorhandensein von infiltrierendem Tumorwachstum durch zunehmend aglanduläre Epithelstränge bis hin zu einem vornehmlich soliden Tumorwachstum.

Zwei dieser Parameter werden durch die endokrine Vorbehandlung deutlich beeinträchtigt: Abnahme der Drüsengröße, Zunahme des interglandulären Stromanteils. Für den in der Befundung endokrin vorbehandelter Prostatektomiepräparate Ungeübten wird dadurch leicht ein höherer Gleasongrad vorgetäuscht (Details hierzu siehe Kapitel 2.2). In einer Serie von 113 vorbehandelten Prostatektomiepräparaten fanden *Civantos et al. 1995* allein in 43% der Fälle Tumoreale, die histomorphologisch weitgehend unbeeinträchtigt imponierten. Beim Vergleich der Graduierungsunterschiede von präoperativer Stanzbiopsie und Prostatektomiepräparat fanden die Autoren keinen signifikanten Unterschied in den Graduierungsdifferenzen zwischen vorbehandelten und nichtvorbehandelten Patienten ($p=0.70$). Unter Anwendung eines wie oben beschriebenen modifizierten Gleason-Gradings sei daher ein Tumorgrading durchaus verlässlich möglich. Ausnahmen hiervon sind selbstverständlich Fälle mit nur winzigen Tumorresiduen. Zurückkehrend auf die eingangs gestellte Frage eines möglichen Upgradings unter NHT wurde in einem eigenen Kollektiv von 50 Prostatakarzinompatienten der Malignitätsgrad vor und nach 3 monatiger endokriner Therapie bestimmt (*Köllermann 1995*). Der Vergleich der initialen präinduktiven Stanzbiopsien mit dem endgültigen Prostatektomiepräparat nach induktiver Therapie ergab eine Zunahme des Malignitätsgrades in 14% der Fälle und deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (*Hellstrom et al. 1993*). Berücksichtigt man jedoch, dass der anhand der Stanzbiopsien ermittelte Malignitätsgrad nach Befundung des korrespondierenden Prostatektomiepräparates per se schon in bis zu 40% nach oben korrigiert werden muss (*Makhlouf et al. 2004, Egevad et al. 2001*), ist aufgrund dieser Datenlage nicht von einer Zunahme des Malignitätsgrades unter NHT auszugehen.

2.1.3.2. Neuroendokrine Tumordifferenzierung: Zunahme unter PPNET?

Ein weiterer histologischer Faktor, dessen vermeintlich negativer Einfluß auf die Prognose unter NHT zunehmen könnte, stellt das neuroendokrin (NE) differenzierte zelluläre Kompartiment der Prostata dar. Neuroendokrine Zellen sind Bestandteil des normalen zellulären Differenzierungsspektrums der Prostata und sind in variabler Häufigkeit auch in nahezu allen glandulär differenzierten Prostatakar-

zinomen anzutreffen. Durch die Produktion von verschiedenen zelluläre Wachstumsfaktoren wie Serotonin, Bombesin, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und parathormon ähnliche Peptiden (*Bologna et al. 1989; Harper et al. 1996; di Sant'Agnesse 1992*) nehmen diese Zellen Einfluß auf Prostatawachstum und -differenzierung, sowie auf die Homöostase der exokrinen sekretorischen Aktivität. In verschiedenen Studien konnte eine negative Korrelation zwischen dem Ausmaß der NE Differenzierung und der Prognose herausgearbeitet werden (*Weinstein et al. 1996, Cohen et al. 1991*). Da NE-Zellen keinen Androgenrezeptor exprimieren (*Krijnen et al. 1993, Bonkhoff et al. 1993*) wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression und insbesondere bei der Entwicklung von hormonresistenten Karzinomen unter endokriner Therapie zugeschrieben. Ferner liegen Berichte über Förderung der De novo neuroendokrinen Differenzierung luminaler oder intermediär differenzierter Prostataepithelzellen unter Hormonentzug vor (*Bang et al. 1994, Jongasma et al. 1999*). Auch dieser Prozeß könnte die Entwicklung hormonresistenter Tumorklone fördern (*Pinski et al. 1994*). Untersuchungen an fortgeschrittenen Prostatakarzinomen unter antiandrogener Dauertherapie stützen diese Überlegungen (*Guate et al. 1997*). *Jiborn et al. 1998* untersuchten serielle transurethrale Prostataresekte von 53 Patienten unter endokriner Langzeittherapie von im Mittel 4,5 Jahren Dauer. In 40% der Fälle konnte eine Zunahme der Anzahl an neuroendokrin differenzierten Zellen nachgewiesen werden. Eine Klärung der Situation im Kontext mit einer neoadjuvanten endokrinen Therapie erscheint aufgrund des Vorangesagten erforderlich. Da der Zuwachs an NE Zellen streng mit der Dauer der endokrinen Therapie zu korrelieren scheint, gilt es diese Frage für die Standard 3 Monatstherapie, als auch insbesondere für prolongierte Therapie-schemata zu beantworten.

Hirano et al. 2004 untersuchten 72 Prostatakarzinome in Prostataektomiepräparaten und 21 durch Obduktion gewonnene Prostatae von Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinomen semiquantitativ immunhistochemisch auf die Anzahl NE differenzierter Zellen. Dabei wurden drei Patientengruppen gebildet: Gruppe 1 entsprach Patienten ohne neoadjuvante Therapie, Gruppe 2 bestand aus Patienten die einer antiandrogenen neoadjuvanten Therapie für 3-6 Monate zugeführt wurden und Gruppe 3 bestand aus Patienten die nach mindestens einjähriger antiandrogener Therapie an einem hormonresistenten PCA verstarben und deren Prostatae nach Obduktion der Untersuchung zugeführt wurden. Es fand sich kein

statistisch signifikanter Unterschied im Ausmaß der NE Differenzierung zwischen der Gruppe der nicht vorbehandelten und der Gruppe der 3-6 Monate vorbehandelten Patienten. Lediglich in der Langzeitbehandelten Gruppe fanden sich signifikant mehr NE Zellen. Ähnliche Ergebnisse zeigten eigene Untersuchungen (Köllermann und Helpap 2001). Es wurde die NE-Zelldichte zwischen 20 unvorbehandelten und 20 über 3 Monate neoadjuvant vorbehandelten Prostatektomiepräparaten verglichen. Die NE Zelldichte im von Tumor infiltrierten Gewebe lag in unvorbehandelten Präparaten mit im Mittel 3,02 Zellen/mm² zwar etwas niedriger verglichen zu 4,08/mm² in den vorbehandelten Präparaten. Dieser Unterschied war mit $p=0,72$ jedoch nicht statistisch signifikant. Zusätzlich fand sich in der vorbehandelten Gruppe eine geringfügig erhöhte Anzahl von Patienten mit NE Zellclustern (≥ 40 NE Zellen / Gesichtsfeld bei 100 x Vergrößerung). Auch dieser Unterschied war mit $p=0,45$ statistisch nicht signifikant. Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde das zahlenmäßige Verhältnis von NE differenzierten zu nicht NE differenzierten Tumorzellen untersucht. Kenntnis hierzu erschien zur besseren Abschätzung einer möglichen prognostischen Relevanz der NE Differenzierung notwendig, da neuroendokrinen Prostataepithelzellen eine parakrine, wachstumsstimulierende Wirkung auf das unmittelbare Mikromilieu zugesprochen wird. Somit liegt es Nahe anzunehmen, dass diese Wirkung, soll sie nicht nur für das Mikromilieu, sondern auch für den Gesamttumor von Relevanz sein, abhängig vom prozentualen Anteil der NE Zellen am Gesamttumor ist. Mittels der herkömmlichen semiquantitativen immunhistologischen Analytik sind diesbezügliche Aussagen nicht möglich. Es wurden daher im Mittel ca. 1000 Tumorzellen/Fall aus repräsentativen Tumorarealen ausgezählt und der Anteil an NE differenzierten Zellen prozentual ermittelt. Hierbei fand sich in beiden Gruppen mit 1,47% in der nichtvorbehandelten Gruppe und 0,61% in der vorbehandelten Gruppe insgesamt ein sehr geringer Anteil an NE Zellen. Der geringe Unterschied zwischen beiden Gruppen war mit $p=0,99$ nicht signifikant.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass durch eine 3 bis 6 monatige NHT keine signifikante Induktion einer NE Differenzierung stattzufinden scheint. Bezüglich längerer Behandlungsprotokolle (z.B. 8 Monate) ist die Datenlage sehr spärlich und erlaubt diesbezüglich keine abschließende Beurteilung. In Anbetracht des jedoch äußerst niedrigen Anteils an NE differenzierten Tumorzellen von $< 1\%$ nach 3monatiger Vorbehandlung, sowie wissend um die üblicherweise sehr niedrige

Proliferationsrate von Prostatakarzinomen, scheint auch nach PPNET eine Prognoseverschlechterung durch Induktion einer NE Differenzierung äußerst unwahrscheinlich zu sein.

2.1.3.3. Das kleinzellig neuroendokrin differenzierte Prostatakarzinom

Eine gesicherte Kontraindikation jedweder NHT des Prostatakarzinoms stellt das kleinzellige, neuroendokrin differenzierte Prostatakarzinom dar. Hierbei handelt es sich um eine selten Unterform, die nur ca. 0,5 – 2% aller Prostatakarzinome ausmacht (*Helpap et al. 1999*). Aufgrund des aggressiven Wachstumsverhaltens und der damit verbundenen äußerst schlechten Prognose (*Rubenstein et al. 1997*, *Helpap and Köllermann 1999*) ist dieser Subtyp von großer klinischer Relevanz. Ein typisches Charakteristikum dieser Tumoren auf molekularer Ebene ist das Fehlen des Androgenrezeptors (*Helpap und Köllermann 1999*). Eine antiandrogene Therapie ist daher wirkungslos und würde den Einsatz wirksamerer Therapien (Operation, Chemotherapie) unnötig verzögern.

2.1.3.4. Das intraduktale Prostatakarzinom

Noch nicht abschließend geklärt ist, inwieweit das ausgedehnt kribriform und/oder intraduktal wachsenden Prostatakarzinom auf die endokrine Therapie anspricht. In eigenen Untersuchungen zur Ausprägung von regressiven Veränderungen nach 3 monatiger NHT (*Köllermann 1995*) von 50 Prostatakarzinomen zeigten 24 (48%) geringe bis fehlende Regressionszeichen. Von diesen wiederum wiesen 18 (75%) mehr oder weniger ausgedehnte kribriforme Strukturen auf, die größtenteils dem erstmals von *McNeal et al. 1986* beschriebenen Bild eines intraduktalen Karzinoms entsprachen (Abb 10 a/b).

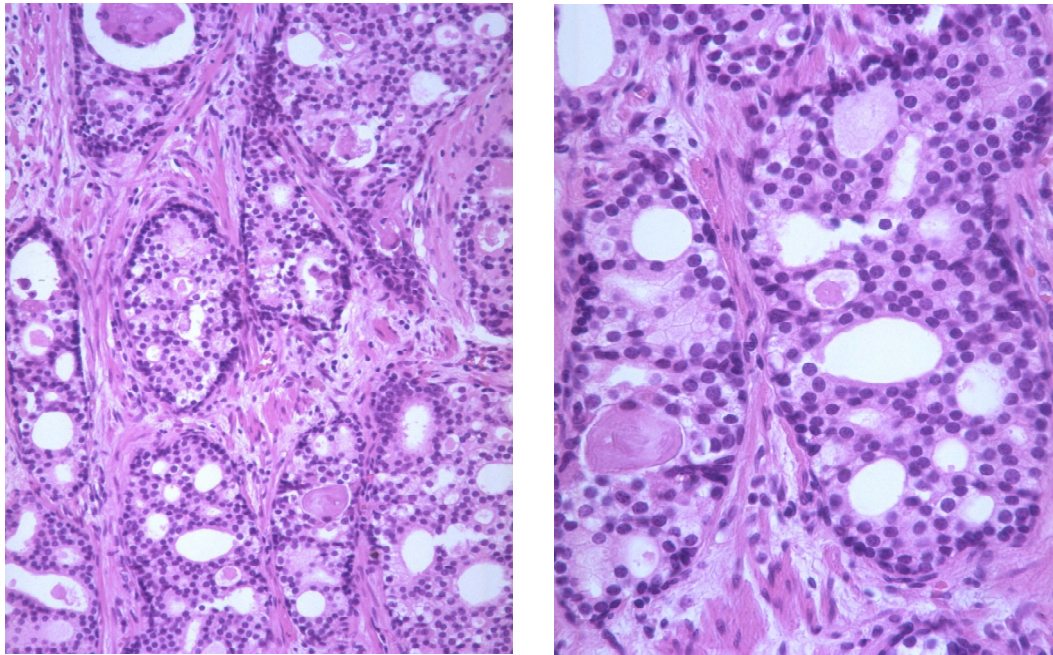


Abb. 10: Zustand nach 3 monatiger NHT a) Ausgedehnte kribriiforme Tumormassen, z.T. intraduktal wachsend b) Ausschnittsvergrößerung zeigt komplett fehlende Tumorregression bei komplett erhaltenen zytologischen Details (aus Köllermann 1995)

In mehreren Multivariatanalysen konnte ein unabhängiger negativer Einfluß des intraduktalen Tumorwachstums auf die Prognose gezeigt werden (*McNeal und Yemoto 1996; Rubin et al. 1998; Wilcox et al. 1998*), was durch den Nachweis eines deutlichen Heterozygotieverlustes (Loss of heterozygosity, LOH) in diesen Läsionen auch auf genetischer Ebene unterstrichen wurde (*Dawkins et al. 2000*). Eine mögliche Erklärung für die in den eigenen Untersuchungen beobachtete geringe Ansprechbarkeit der intraduktalen Läsionen könnte sich aus den Beobachtungen von *Cohen et al. 2000* ergeben. Sie untersuchten die Androgenrezeptorexpression von intraduktalen Karzinomen in 26 Prostatektomiepräparaten. Sechs der Fälle wiesen keine AR-Rezeptorexpression auf, in weiteren 12 Fällen wiesen nur die randwärts gelegenen, basalzellenahen Zellen der intraluminalen Neoplasie Androgenrezeptoren auf, wohingegen die zentral gelegenen Zellen keinen AR-Rezeptor exprimierten. In 70% der Fälle fand sich somit keine, oder nur eine marginäre zelluläre AR-Rezeptorexpression, was somit die vielfach fehlende Tumorregression dieser Läsionen erklären könnte. Hier wären sicherlich weiterführende Untersuchungen wünschenswert.

2.2. pT0 NACH NEOADJUVANTER ENDOKRINER THERAPIE DES KLINISCH LOKAL BEGRENZTEN PROSTATAKARZINOMS

2.2.1. Vorbemerkungen

Sehr selten kann der Pathologe im Prostatektomiepräparat eines unvorbehandelten Patienten kein Karzinom feststellen, auch wenn die präoperativen Biopsien eindeutig einen malignen Tumor ergeben hatten. Bei endokrin vorbehandelten Patienten ist das wesentlich häufiger und prima vista könnte der postinduktive pT0 Befund auch einen Maßstab für die Wirksamkeit der Vorbehandlung abgeben. Über den ersten pT0 Befund nach endokriner Behandlung berichtete *Gutierrez 1949* nur 5 Jahre nachdem *Vallet 1944* erstmals die neoadjuvante endokrine Therapie zum Einsatz gebracht hatte. Der Patient hatte ein histologisch gesichertes Prostatakarzinom und wurde von Januar 1945 bis September 1946 mit Stilbestrol behandelt. Er verstarb dann an einem rupturierten Aortenaneurysma. Die histologische Aufarbeitung der Prostata ließ kein Karzinom mehr erkennen. In der Folgezeit wurde immer wieder über derartige Fälle berichtet (*Parlow und Scott 1949; Chute und Fox 1966*). Erst aus den Studien der letzten Jahre lässt sich die Häufigkeit dieses Phänomens in Folge der üblichen 3 monatigen endokrinen Vorbehandlung quantifizieren. Sie liegt bei unter 5 %. Arbeitsgruppen, die längerer Vorbehandlungsintervalle auswählten, berichten über pT0-Rate von rund 15% (*Gleave et al. 2000; Noguchi et al. 2002*).

Angesichts dieser Häufung des pT0-Befundes erscheint es an der Zeit diesem Befund erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken. In den nachfolgenden Kapiteln dieses Abschnittes werden eigene Untersuchungsergebnisse unter folgenden Titeln dargelegt und diskutiert:

1. Zur Häufigkeit von pT0 nach prolongierter, PSA-gesteuerter, neoadjuvanter, endokriner Therapie (PPNET)
2. Zur Bedeutung des pT0 Befundes bei Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom nach PPNET
3. Zur Prognose von pT0 nach PPNET: Verlaufsbeobachtungen
4. Zur Prognose von pT0 nach PPNET: Eine Matched pair Analyse.

2.2.2. Häufigkeit von pT0 nach prolongierter, PSA-gesteuerter, neoadjuvanter endokriner Therapie (PPNET) bei Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom.

2.2.2.1. Einleitung:

Im Gefolge der Vorbehandlung unterschiedlicher, auch urologischer Malignome, wurde immer wieder über pT0 Befunde berichtet. D.h. nach stattgehabter induktiver Therapie konnte anlässlich der feingeweblichen Untersuchung des exstirpierten, vormals eindeutig befallenen Organes kein Tumorgewebe mehr festgestellt werden.

Prinzipiell scheint die Häufigkeit des postinduktiven pT0-Befundes ein guter unmittelbarer Maßstab für die Wirksamkeit der eingesetzten Therapie zu sein. Diesbezüglich sind die bislang für das Prostatakarzinom berichteten Ergebnisse allerdings enttäuschend. Nach 3 monatiger Vorbehandlung wird von pT0-Raten um 5% berichtet (*Soloway et al. 1995; Debruyne et al. 1996; Cookson et al. 1997; Lisle et al. 1999; Labrie et al. 1994*). Beim Blasenkarzinom nach MVAC-Chemotherapie hingegen werden pT0-Rate von bis zu 38% berichtet (*Grossman et al. 2003*), die Rate nach Polychemotherapie großer retroperitonealer Metastasen von Germinalzelltumoren nach PEB-Chemotherapie liegt ebenfalls bei rund 40% (*Law et al. 1994*). Somit scheint die endokrine Vorbehandlung des klinisch noch lokalisierten Prostatakarzinoms wesentlich weniger wirksam zu sein, als die neoadjuvante Chemotherapie des Harnblasen- und Hodenkarzinoms.

Der Erfolg medikamentöser Therapien wird nun aber von einer Vielzahl von Faktoren bestimmt. Dazu zählt zweifelsohne auch die Dauer der Behandlung. Da die Dauer der konventionellen endokrinen Induktion zumeist ganz willkürlich mit 3 Monaten angesetzt wurde, lag es zunächst einmal nahe zu überprüfen, ob mit längeren Vorbehandlungszeiträumen höhere pT0 Raten erreicht werden können. Dieser Frage wurde im Folgenden nachgegangen.

2.2.2.2. Patienten und Methoden:

Bei 227 konsekutiven Patienten mit lokoregionär begrenztem Prostatakarzinom im Stadium cT1-3N0M0 wurde nach prolongierter neoadjuvanter Hormonbehandlung eine radikale Prostatektomie durchgeführt.

Die Karzinomdiagnose erfolgte anhand von systematisch unter transrektaler Ultraschallführung entnommenen Oktantenbiopsien, wobei sonographisch suspekter (echoarme) Herde zusätzlich anpunktiert wurden.

Der Versand der Biopsate erfolgte mit Kennzeichnung der Entnahmestellen nach folgendem Schema:

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 8. = Samenblase links | 4. = Samenblase rechts |
| 7. = Basis links | 3. = Basis rechts |
| 6. = Mitte links | 2. = Mitte rechts |
| 5. = Apex links | 1. = Apex rechts |

Auch die histopathologische Befundung wurde entsprechend diesem Schema durchgeführt. Dadurch konnte die Tumorsuche im späteren Prostatektomiepräparat sehr gezielt erfolgen und erleichtert werden.

Nach getrennter Paraffineinbettung wurden von jeder Biopsie zunächst zwei Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbte Schnitte untersucht. Im Bedarfsfall folgten weitere Schnitte und immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern (Ak) gegen hochmolekulares Cytokeratin (CK) M903 zur Markierung von Basalzellen sowie dem Breitspektrum CK-Ak Lu5. Letzteres war Routine bei postinduktiven Stanzen, die in der H&E Färbung kein Karzinom oder lediglich suspekter Veränderungen erkennen ließen.

Die Ermittlung des cT-Stadium geschah durch rektale Palpation unter Berücksichtigung des transrektalen Ultraschallbefundes.

Zum Ausschluss von pelvinen Lymphknotenmetastasen wurde eine limitierte laparoskopische Lymphadenektomie durchgeführt, wenn folgende Voraussetzungen gegeben waren: PSA \geq 10 ng/ml, Gleason Punktwert \geq 7 sowie Nachweis eines palpatorisch organüberschreitenden Tumorwachstums. Knochenmetastasen wurden durch Skelettszintigraphie ausgeschlossen, wenn der Serum PSA Wert $>$ 10 ng/ml lag.

Die PSA Werte wurden initial und im weiteren Verlauf mit dem Immulite 3th generation assay [®] bestimmt. Es handelt sich dabei um eine supersensitive Bestimmungsmethode, mit der Werte bis 0,003 ng/ml zuverlässig gemessen werden können (*Witherspoon 1997*). Alle hierzu notwendigen Blutabnahmen erfolgten vor den rektalen Untersuchungen. Diese supersensitive PSA Bestimmungsmethode wurde gewählt, weil sie den tatsächlich erreichbaren PSA Nadirwerten wesentlich

näher kommt, als die konventionellen, für die Diagnostik und Verlaufskontrolle sehr wohl ausreichenden Untersuchungssysteme.

Nach Durchführung der beschriebenen Untersuchungen und Vorliegen der Befunde erfolgte ein ausführliches Informationsgespräch mit dem Patienten, falls gewünscht im Beisein und unter Beteiligung von Angehörigen.

Nach Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung des Patienten wurde dann die endokrine Vorbehandlung eingeleitet. Sie wurde im Sinne einer kompletten Androgendeprivation mit einem nichtsteroidalen Antiandrogen (Flutamid bzw. Bicalutamid) und einem GNRH Analogon (Leuprorelin oder Goserelin) durchgeführt.

Verlaufskontrollen erfolgten in etwa monatlichen Abständen. Dabei wurde jeweils ein ausführliches Gespräch mit dem Patienten geführt, der PSA-Wert bestimmt, sowie die Prostata mittels digital rektaler Untersuchung sowie per transrektalem Ultraschall untersucht.

Die endokrine Vorbehandlung (PPNET) wurde bis zum Erreichen des PSA Nadir durchgeführt. Dieser galt als erreicht, wenn es im Abstand von 1 Monat nicht zu einem weiteren PSA Abfall gekommen war.

Nach Abschluss der PPNET erfolgte eine erneute gründliche Untersuchung des Patienten, bestehend aus digital-rektaler Palpation, transrektaler Sonographie, Oktantenbiopsie der Prostata und einer Urethrozystoskopie. Nach gründlicher Besprechung der angefallenen Befunde mit dem Patienten wurde die radikale Prostatektomie durchgeführt.

Die histopathologische Aufarbeitung der Prostatektomiepräparate erfolgte routinemäßig in Anlehnung an das Stanford Protokoll (*Stamey et al. 1988*). Die Basisuntersuchung erfolgte am H&E gefärbten Präparat. Bei unklaren Befunden und wenn die Basisuntersuchung kein Karzinom erkennen ließ, wurden zusätzliche immunhistologische Untersuchungen mit den CK-Antikörpern M903 und Lu5 sowie gegen PSA durchgeführt.

2.2.2.3. Ergebnisse

Von den 227 Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom war nach PPNET in 38 Fällen (16%) kein Tumor mehr im radikalen Prostatektomiepräparat

nachweisbar (pT0). Bei den cT1-2 Fällen lag dieser Anteil sogar bei 29% (30/102 Patienten).

Tumorcharakteristika Gesamtkollektiv versus pT0-Patienten

Tabelle 2 stellt die ursprüngliche Verteilung von cT-Stadium, Malignitätsgrad (Gleason) und initialem PSA-Wert aller Tumoren dar.

cT-Stadium initial n (%)	T1	T2	T3
	31 (13,7%)	71 (31,3%)	125 (55%)
Gleason-Summenwert n (%)	< 7	≥ 7	
	107 (47%)	120 (53%)	
PSA (ng/ml) n (%)	< 10	10 – 20	> 20
	102 (45%)	77 (34%)	48 (21%)

Tabelle 2: Verteilung von klinischem Tumorstadium, Gleasongrading und PSA-Werten von 227 Prostatakarzinompatienten vor PPNET.

Wie ersichtlich, lag bei einem erheblichen Anteil der Patienten vor Einleitung der endokrinen Therapie bereits ein lokoregionär fortgeschrittenes Prostatakarzinom vor. Mehr als die Hälfte der Tumoren war niedrig differenziert (GS ≥ 7), ebenso wiesen mehr als die Hälfte der Patienten (55%) initiale PSA Werten ≥ 10 ng/ml auf. Somit lagen mehr als die Hälfte der Patienten im mittleren bzw. Hochrisikobereich der Tumorerkrankung.

Bei 38 der 227 Patienten dieser Studie konnte die feingewebliche Untersuchung des Prostatektomiepräparates kein Karzinom mehr nachweisen (pT0).

In der folgenden Tabelle 3 werden die 3 wesentlichen Risikofaktoren cT Stadium, Malignitätsgrad und initialer PSA Wert der pT0 Fälle aufgeführt.

cT-Stadium initial n (%)	T1	T2	T3
	11 (29%)	20 (52,5%)	7 (18,5%)
Gleason-Summenwert n (%)	< 7	≥ 7	
	29 (77,5%)	9 (22,5%)	
PSA (ng/ml) n (%)	< 10	10 – 20	> 20
	20 (52%)	14(38%)	4 (10%)

Tabelle 3: Präinduktive Verteilung von klinischem Tumorstadium, Gleasongrading und PSA-Werten von 38 pT0 Fällen nach PPNET.

Wie man sieht, setzte sich die pT0 Gruppe vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich, aus Patienten mit einem eher günstigen Risikoprofil zusammen (rund 80% mit klinisch organbegrenztem Tumorwachstum (cT1-2) und hoch bis mittelgradig differenzierten Tumoren, rund 50% mit einem PSA < 10 ng/ml). Immerhin rund 20 % derselben wurden initial aber als Hochrisikopatienten eingestuft (Stadium cT3, Gleason-Summenwert ≥ 7, PSA > 20ng/ml). In der folgenden Tabelle 4 ist der Anteil an Hochrisikopatienten des Gesamtkollektivs dem Anteil in der pT0 Gruppe gegenübergestellt.

	cT3		GS ≥ 7		PSA > 20 ng/ml	
Gesamtkollektiv (n=227)	125 (55%)	$p < 0.0001$	120 (53%)	$p = 0.008$	120 (53%)	$p < 0.0001$
pT0-Gruppe (n=38)	7 (18,5%)		9 (22,5%)		7 (18,5%)	

Tabelle 4: Gegenüberstellung des Anteils (%) an Hochrisikopatienten (Stadium cT3, GS ≥ 7, PSA-Wert > 20 ng/ml) im Gesamtkollektiv und der pT0-Kohorte nach PPNET.

Hier zeigt sich, dass das prätherapeutische Risikoprofil der pT0-Patienten im Vergleich zum Gesamtkollektiv deutlich günstiger war.

Behandlungsdauer Gesamtkollektiv versus pT0-Patienten

Keine wesentliche Unterschiede ergaben sich bezüglich der Induktionsdauer zwischen beiden Gruppen mit einer medianen Behandlungsdauer von jeweils 7 Mo-

naten (Schwankungsbreite von 3 – 35 Monaten im Gesamtkollektiv, 3 – 22 Monate in der pT0-Gruppe).

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, wie häufig der PSA Nadir die Marke von 0,1 ng/ml einerseits im gesamten Patientenkollektiv und andererseits bei den pT0 Fällen unterschritt. Mit 61% der Fälle im Gesamtkollektiv versus 60% in der pT0-Kohorte ergab sich diesbezüglich kein Unterschied.

2.2.2.4. Diskussion

pT0 ohne Vorbehandlung („vanishing carcinoma“):

pT0 Befunde wurden in radikalen Prostatektomiepräparaten in der Vergangenheit sowohl bei unvorbehandelten als auch bei neoadjuvant therapierten Patienten erhoben. Beim unvorbehandelten Patienten ist mit einer pT0-Rate von unter 2% zu rechnen (*Soloway et al. 1995; Schulman et al. 2000*).

Derartige pT0 Befunde können theoretisch 4 verschiedene Ursachen haben:

1. Die Karzinomdiagnose war falsch.
2. Das Karzinom war sehr klein und wurde deshalb bei der Aufarbeitung des Prostatektomiepräparates übersehen.
3. Das Karzinom wurde nicht entfernt sondern akzidentell in situ belassen
4. Es handelte sich um ein auf die Transitionalzone begrenztes T1a-b Karzinom, welches anlässlich einer transurethralen Elektroresektion vollständig entfernt wurde

Zu 1: Es kann kein Zweifel sein, dass gelegentlich abnorme Histologiebefunde fehlgedeutet werden. Das geschieht in beiden Richtungen: Maligne Läsionen werden als gutartig und gutartige, bzw. prä-maligne Veränderungen werden als karzinomatös eingestuft. Im eigenen Patientengut sind zwei derartige Fälle dokumentiert. Bei beiden hatte die initiale Befundung der Stanzbiopsate ein Karzinom ergeben. Bei einer, im Rahmen einer wissenschaftlichen Untersuchung durchgeführten Nachbefundung, mussten die Karzinomdiagnosen als atypische kleinazinäre Proliferationen (ASAP) revidiert werden. ASAP gilt als eine der schwer vom Prostatakarzinom abzugrenzenden Differentialdiagnosen (*Helpap et al. 2001*). *Guillonnet al. 2001* berichteten ebenfalls über eine Fehldiagnose. Statt eines Prostatakarzinoms lag bei diesem Patienten ein Herd mit einer prostatistischen intraepithelialen

Neoplasie vor. Aussagen über die Häufigkeit dieses Irrtums sind derzeit aus verständlichen Gründen nicht möglich. *Renshaw et al. 1998* führten zusammen mit dem Erstbefunder eine Nachbefundung der Prostatabiopsien von 47 Patienten durch, die initial zwar als atypisch, aber nicht als maligne beurteilt worden waren. Sie ergab dann im Konsens mit dem Erstuntersucher bei 13 Patienten (28%) ein Karzinom als ebenso vertretbare Diagnose.

Zu 2: Natürlich kann es schwierig sein, sehr kleine Karzinome im Prostatektomiepräparat wieder zu finden, zumal wenn die Prostata selber recht groß ist. *Goldstein et al. 1995* publizierten 13 derartige Fälle aus dem Prostatektomiematerial von 4 großen nordamerikanischen urologischen Kliniken und führten den Begriff des „vanishing carcinoma“ ein. Die weitere, sehr detaillierte histologische Aufarbeitung ihrer 13 (pT0) Prostatektomiepräparate ergab bei 11 dann doch noch ein sehr kleines (insignifikantes) Karzinom, das anlässlich der Routineuntersuchung (deren Technik allerdings nicht beschrieben wird) nicht gefunden worden war. Das „vanishing carcinoma“ kommt aber, wenn moderne Aufarbeitungsprotokolle der Prostata eingesetzt werden, nur sehr selten vor (*Stamey et al. 1988; Humphrey and Walther 1993; Epstein 1991; Sakr et al. 1996*). So berichten *Herkommer et al. 2004* in der bislang größten Serie von 3609 Prostatakarzinompatienten über eine pT0-Rate von lediglich 0,8%.

Zu 3: Theoretisch besteht auch die Möglichkeit, dass anlässlich der radikalen Prostatektomie das karzinomtragende Prostatagewebe belassen wurde, sodass sich dann im eigentlichen Op-Präparat tatsächlich auch kein Tumor befindet. Das kommt wahrscheinlich nur bei sehr kleinen Tumoren im Apex- oder Blasenhalbsbereich vor. Es ist bekannt, dass sich nach radikaler Prostatektomie fast immer noch PSA im Harn der Patienten nachweisen lässt (*DeVere White et al. 1992; Iwakiri et al. 1993; Takayama et al. 1994; Ferguson and Blute 1995*). Dieses Urin PSA nach radikaler Prostatektomie stammt zumeist aus benignen, PSA produzierenden Drüsen, die bei der radikalen Prostatektomie belassen wurden. Da einerseits die pro 24 Stunden ausgeschiedenen PSA Mengen ganz erheblich schwanken können (*Spitz et al., 1995*) und andererseits die PSA Produktion in einem direkt proportionalen Verhältnis zur Drüsenmasse steht (*Stamey and Kabalin 1989*), wird man davon ausgehen müssen, dass auch die Masse der belassenen Drüsen ganz er-

heblich differiert. Fraglos kann sich in diesen belassenen Drüsen auch Karzinomgewebe befinden und selten wohl auch der gesamte vorher diagnostizierte Tumor. Die folgende Kasuistik aus dem eigenen Patientengut könnte so gedeutet werden: Pat. B. E. hatte ein Prostatakarzinom cT1cN0M0G2a. Nach endokriner Induktion erfolgte eine radikale Prostatektomie. Die histopathologische Untersuchung ergab einen pT0 Befund. Nur 8 Monate später war das PSA im Serum auf 0,3 ng/ml angestiegen. Im Harn wurde ein Wert von 13,5 ng/ml gemessen. Die Paraanastomosenbiopsien ergaben ein Adenokarzinom der Prostata. Es folgte eine perkutane Bestrahlung der Prostataregion. Seit 6 Jahren befindet sich der Patient in kompletter Remission seiner Tumorerkrankung mit einem PSA Wert im Serum < 0,1ng/ml.

Zu 4: Natürlich kann ein T1b Karzinom anlässlich einer wegen Obstruktion durchgeführten transurethralen Elektroresektion der Prostata vollständig entfernt worden und deshalb im radikalen Prostatektomiepräparat nicht mehr nachweisbar sein. In einer der VACURG Studien berichtete *Byar 1972* über 22 Patienten mit „inzidentellem“ Prostatakarzinom, die nach mehr oder weniger lang dauernder Gabe eines Placebo oder Behandlung mit Oestrogenen, Orchidektomie + Placebo, bzw. Orchidektomie + Oestrogen verstarben und sezirt wurden. Nur in einem einzigen Präparat fand der Pathologe noch Karzinomgewebe. Der Autor kommentiert dies wie folgt: “Apparently then, for this group the transurethral resection itself removed the primary tumor or treatment with orchidectomy or DES or both was adequate in some cases to cause regression, in fact disappearance of any residual carcinoma.“ *Barnes 1964* hatte schon 8 Jahre zuvor auf eine ähnliche Fallserie hingewiesen.

Häufigkeit von pT0 nach 3 monatiger endokriner Vorbehandlung:

Wie auch immer der sehr seltene pT0 Befund ohne Vorbehandlung zustande kommen mag, nach der konventionellen 3 monatigen endokrinen Vorbehandlung nimmt seine Häufigkeit, zwar nicht erheblich, aber doch deutlich zu. In der nachfolgenden Tabelle 5 wurden diesbezügliche Daten aus der Literatur zusammengestellt.

Autor	cT Stadium	N	pT0
<i>Cookson et al. 1997</i>	T1-2	53	3 (5,6%)
<i>Labrie et al. 1993</i>	T1-2	75	6 (8,0%)
<i>Soloway et al. 1995</i>	T2b	138	6 (4,0%)
<i>Schulman et al. 2000</i>	T2	105	4 (3,8%)
Summe/Durchschnitt		371	19 (5%)

Tabelle 5: Häufigkeit von pT0 nach konventioneller (3 monatiger) endokriner Induktion bei Patienten mit klinisch organbegrenzten Prostatakarzinomen

Wie man sieht liegt die Häufigkeit von pT0 nach konventioneller, endokriner Induktion bei rund 5 %.

Neben den vorangehend bereits diskutierten 4 möglichen Ursachen eines pT0-Befundes kommt nach konventioneller endokriner Therapie noch eine 5. Ursache hinzu: Die hormonelle Vorbehandlung selber. Sie scheint die pT0-Rate im Vergleich zu nichtvorbehandelten Patienten um bis das Fünffache zu steigern.

Häufigkeit von pT0 nach prolongierter endokriner Vorbehandlung (PPNET):

Die vorliegende Studie an mit PPNET vorbehandelten Patienten hat mit 16% eine deutlich höhere pT0 Rate ergeben, als sie bei unvorbehandelten und konventionell (3 Monate) endokrin vorbehandelten Patienten zu erwarten gewesen wäre. Bei den cT1-2 Fällen lag diese Rate mit 29% sogar noch höher. Vorangehend wurde die Steigerung der pT0 Rate von den unvorbehandelten zu den konventionell endokrin vorbehandelten Patienten ganz vorwiegend auf die Hormontherapie zurückgeführt. Diese ursächliche Zusammenhangserklärung bietet sich auch für die nochmalige, erhebliche Steigerung der pT0 Rate nach PPNET an. Literaturangaben zur pT0 Rate nach prolongierter endokriner Induktion sind derzeit noch sehr spärlich. Die wenigen vorliegenden Veröffentlichungen bestätigen jedoch im wesentlichen die eigenen Befunde. So lag die pT0 Rate in der etwas kleineren Patientenserie von *Gleave et al. 2000* (156 Patienten über 8 Monate behandelt) bei 13 % . *Noguchi et al. 2002* fanden, unter allerdings nur 31 Langzeitbehandelten bei einer mittleren Behandlungsdauer von 5,2 Monate eine pT0-Rate von 16 % . Die hier vorgelegten eigenen pT0 Daten und auch die wenigen diesbezüglichen Angaben der Literatur sprechen sehr deutlich für die überlegene histomorphologische Wirksamkeit der prolongierten endokrinen Induktion im Vergleich zur kon-

ventionellen 3 monatigen Vorbehandlung. Zusätzliches Gewicht erhält diese Schlussfolgerung, wenn man ein weiteres, unmittelbares Wirkkriterium berücksichtigt: Den tumorbefallenen Schnittrand.

In der nachfolgenden Tabelle 6 wurde die Häufigkeit positiver Schnittränder von virginellen und 3 Monate endokrin vorbehandelten Patienten anhand von Phase III Studien gegenübergestellt.

Autor	Virginell		Vorbehandelt		p*
	Pat. No	Rand + (%)	Pat.No	Rand + (%)	
<i>Fair et al. 1996</i>	92	36	92	11	< 0.0001
<i>Pedersen et al. 1995</i>	54	46	60	24	0.01
<i>Soloway et al. 1995</i>	137	47	144	17	< 0.0001
<i>Labrie et al. 1993</i>	71	34	90	8	< 0.0001
<i>Klotz et al. 1996</i>	91	65	101	28	< 0.0001
<i>Bellavance and Fradet 1996</i>	275	39	165	24	0.002
<i>Debruyne et al. 1996</i>	154	44	136	26	0.001
<i>Van Poppel et al. 1995</i>	62	46	65	32	0.1
<i>Bono et al. 2001</i>	107	51	114	24	< 0.0001
Summe/Mittel	1043	45%	853	22%	< 0.0001

Tabelle 6: Schnittrandbefall bei virginellen und konventionell vorbehandelten Patienten (prospektive, randomisierte Studien), *Fishers Exact Test, zweiseitig

Wie ersichtlich, geht die konventionelle endokrine Vorbehandlung mit einer deutlichen Reduktion der positiven Schnittränder einher. Noch ausgeprägter erscheint dies nach prolongierter Induktion wie die nachfolgende Tabelle 7 zeigt.

Autor	Konventionell		Prolongiert		p*
	n	SR+	n	SR +	
<i>Bono et al. 2001</i>	114	30%	82	24%	0.43
<i>Bellavance and Fradet 1996</i>	165	24%	40	6%	0.007
<i>Gleave et al. 2001</i>	253	23%	247	12%	0.002
<i>Meyer et al. 2001</i>	129	29%	111	13%	0.003
<i>Ipse</i>	100	25%	103	9%	0.002

Tabelle 7: Schnittrandbefall (SR+) nach konventioneller vs. prolongierter endokriner Vorbehandlung. *Fishers Exact Test, zweiseitig

Die prolongierte Vorbehandlung verringert die Häufigkeit positiver Schnittränder also im Vergleich zur konventionellen Induktion noch einmal sehr deutlich.

2.2.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Selten (< 2%) wird bei Patienten ohne Vorbehandlung mit bioptisch gesichertem Prostatakarzinom im Prostataektomiepräparat kein Karzinom festgestellt (Vanishing carcinoma). Die Ursachen sind vielfältig. Nach konventioneller – 3 monatiger – endokriner Vorbehandlung ist dieser Befund mindestens doppelt so häufig (ca. 5%). Diese Steigerung ist zweifellos auf die induktive Therapie zurückzuführen. Nach prolongierter endokriner Vorbehandlung (5-8 Monate) oder PPNET steigt die Häufigkeit von pT0 noch einmal etwa um den Faktor 3. Das zeigt deutlich, daß die konventionelle Induktion die Möglichkeiten der Vorbehandlung nicht ausschöpft und PPNET ihr, zumindest was pT0 als unmittelbares Erfolgskriterium der Behandlung betrifft, deutlich überlegen ist. Diese Aussage wird auch durch die weitere Abnahme tumorbefallener Schnittränder bekräftigt. Wenngleich es vorwiegend bei cT1-2 Tumoren mit geringer bis mäßiger Differenzierung zu einem pT0 Befund kommt, ist dies bei fortgeschritteneren und dedifferenzierten Karzinomen keinesfalls ausgeschlossen. Bezüglich der pT0 Ergebnisse scheint die zeitfixierte 8 monatige Vorbehandlung der PPNET ebenbürtig zu sein. Die PSA geleitete Induktion erlaubt aber zweifellos eine Individualisierung der Behandlungsdauer und damit verbunden, bei vielen Patienten weniger Nebenwirkungen und Kosten, allerdings bei einigen auch deutlich längere Induktionszeiten um das Potenzial dieser Therapie voll auszunutzen.

2.2.3. Bedeutung des pT0-Befundes

2.2.3.1. Einleitung

Auch wenn der vermehrte Nachweis des pT0-Befundes für die gesteigerte Effektivität des PPNET-Konzeptes spricht, ist bislang unklar, ob es sich hierbei tatsächlich um eine komplette Tumorelimination handelt. Zur Klärung dieser Frage wurde eine sehr gründliche histopathologische Nachuntersuchung von 20 initial als pT0 befundenen Prostatektomiepräparaten durchgeführt (*Köllermann et al. 2000*).

2.2.3.2. Material / Methoden

Untersucht wurden 20 pT0-Prostatektomiepräparate von Patienten mit stanziobiologisch gesichertem Prostatakarzinom im Stadium cT1-3N0M0 nach prolongierten, PSA-gesteuerten neoadjuvanten endokrinen Therapie.

Die primäre histologische Aufarbeitung war nach dem Stanfordprotokoll (*Stamey et al. 1988*), dem gründlichsten in der Alltagsroutine verwendeten Aufarbeitungsprotokoll erfolgt. Die histologische Begutachtung der radikalen Prostatektomiepräparate (RP) erfolgte primär am H&E gefärbten Präparat. Bei karzinomsuspekten Läsionen wurde großzügig von immunhistochemischen Zusatzuntersuchungen Gebrauch gemacht. Alle Untersuchungen wurden von zwei, in der Befundung endokrin vorbehandelter Prostatektomiepräparate sehr erfahrenen Pathologen durchgeführt.

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Zusatzuntersuchungen erfolgten folgendermaßen: Zunächst wurden die Originalschnittpräparate histologisch nachbefundet. Konnte auch in der Nachbefundung kein Tumor nachgewiesen werden und der initiale stanziobiologische Nachweis des Karzinoms bestätigt werden, erfolgte die Anfertigung von Nachschnitten der RP-Präparate. In einer Multischnittebene-technik wurden 3 Schnitte / Schnittebene angefertigt. Begonnen wurde damit in der Prostataregion, in der initial stanziobiologisch Tumor nachgewiesen worden war. Der jeweils 3. Schnitt / Schnittebene wurde H&E gefärbt und histologisch befundet. Bei unklaren bzw. tumorsuspekten Befunden erfolgten an den zwei verbliebenen Schnittpräparaten der jeweiligen Schnittebene immunhistochemische Zusatzuntersuchungen. Zur Differenzierung benignen von malignen Drüsenstrukturen wurden Färbungen zum Nachweis von Basalzellen mit dem Antizytokeratin

Klon 34ßE12 durchgeführt (Loxo, Dossenheim, Germany, 1:1). Um die epitheliale und/oder prostatistische Herkunft von Drüsenresten oder versprengten Einzelzellen zu belegen, erfolgten Färbungen mit dem Pancytokeratin Antikörper KL-1 (Immunotech, France, unverdünnt) und /oder einem polyklonalen Antikörper gegen PSA (Biogenex, Hamburg, Germany, 1:70). Wurde der H&E Schnitt als unauffällig befundet, wurden auch die anderen 2 Schnittpräparate der entsprechenden Schnittebene H&E gefärbt und befundet. Nach diesem Schema wurde solange vorgegangen, bis entweder Tumor nachgewiesen werden konnte, oder das in Paraffin eingebettete Prostatagewebe aufgebraucht war.

Im Falle eines Tumornachweises wurden regressive Tumorveränderungen erfasst und entsprechend des von *Helpap et al. 1985* vorgeschlagenen Graduierungssystems in minimal, mäßig und stark ausgeprägt unterteilt (Tabelle 8).

Punkte	Morpholog.Charakteristika
10	Keine Regression
8	Noch große Tumorausbreitung, nur fokale Regression mit Vakuolisierung und Kernpyknose ohne Nukleolen.
6	Ansteigende Regression in allen Tumoranteilen bei noch breiter Ausdehnung
4	Wenige Tumornester mit deutlicher Regression
2	Wenige winzige Verbände von Zellen, kaum mehr als Zellen identifizierbar
0	Kein Tumor nachweisbar

Regressionsgrad:

- Regressionsgrad I: (8-10 Punkte) = keine oder nur geringe Regression
- Regressionsgrad II: (4-6 Punkte) = mäßiggradige aber deutliche Regression
- Regressionsgrad III: (2 Punkte) = starke Regression
- Regressionsgrad X: (0 Punkte) = kein Tumor nachweisbar

Tabelle.8: Histologische Graduierung der Tumorregression (Helpap et al. 1985).

Das Tumolvolumen wurde grob wie folgt bestimmt: 2 dimensionale Ausmessung des Tumorareals an den befallenen Schnittpräparaten x 0,3 cm (Schnittdicke) x 1,22 (Gewebschrumpfungsfaktor nach Formalinbehandlung) (*Partin et al. 1989*). Alle karzinomsuspekten Läsionen wurden von den 4 an der Studie teilnehmenden Pathologen befundet.

2.2.3.3. Ergebnisse

Nachbefundung der Originalpräparate:

615 H&E gefärbte Schnittpräparate (Mittel 30,75 Schnitte / Fall) und 166 immunhistochemisch gefärbte Schnittpräparate (Mittel 8,3 / Fall) wurden nochmals sehr gründlich durchmustert. In 5 der 20 Fälle konnten allein dadurch doch noch winzige Tumorreste nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Patient	Histologische Routineaufarbeitung						
	Blöcke (n)	Schnitte (n)		Anzahl tumorbefallener Prostatalappen	Anzahl tumorbefallener Gewebsblöcke	Größe Tumor (cm ³)	RG
		H&E	IHC				
10	36	40	4	2	2	0.07	1
12	24	24	2	1	1	0.15	3
14	46	47	15	1	1	0.8	3
16	22	22	25	1	1	0.15	3
20	40	46	12	1	2	0.07	1

Tabelle 9: Untersuchungsergebnisse der durch Nachuntersuchung der Original Prostatektomiepräparate entdeckten Residualtumore. (RG = Regressionsgrad)

Von den verbliebenen 15 pT0 Präparaten wurden 3616 Nachschnitte (inclusive 44 Immunfärbungen) angefertigt. Dadurch konnten in weiteren 8 Fällen noch Tumorreste aufgedeckt werden (Tabelle 10).

Patient	histolog. Routineaufarbeitung			Zusatzuntersuchungen					
	Blöcke (n)	Schnitte (n)		Nachschnitte (n)		Anzahl tumorbefalle- ner Prostatalappen	Anzahl tumorbefal- lener Gewebsblöcke	Größe Tumor (cm ³)	RG
		H&E	IHC	H&E	IHC				
2	26	26	5	225	6	2	2	1.0	2
3	23	24	10	72	2	1	1	0.1	1
7	25	25	10	111	3	1	1	0.04	2
8	35	35	4	17	5	1	2	0.07	1
11	18	18	12	100	4	1	1	0.03	2
15	37	38	10	246	1	1	1	0.1	1
17	30	33	6	90	9	1	1	0.02	1
19	22	24	9	124	6	1	1	0.05	2

Tabelle 10: Untersuchungsergebnisse der erst nach Anfertigung von Nachschnitten aufgedeckten Residualtumore. (RG=Regressionsgrad)

Charakteristika der Residualtumore:

Sieben der 13 Tumore wiesen ein glanduläres Wachstumsmuster, in 5 Fälle fand sich lediglich Drüsenreste und/oder im Stroma versprengte Tumoreinzelnzellen (Abb. 9). In einem weiteren Fall stellte sich der Resttumor mit einem Pseudomyxoma ovarii ähnlichem Wachstumsmuster dar (Abb. 7).

Die Residualtumorgroße betrug im Mittel 0,2 ml (0,02 – 1 ml).

Eine starke, mäßige und geringe bis fehlende Tumorregression fand sich in 3, 4 bzw. 6 Fällen. Interessanterweise stellte sich bei einem Fall mit 2 Tumorherden im OP Präparat der eine Herd weitgehend ohne, der andere mit starken regressiven Veränderungen dar (Abb. 11).

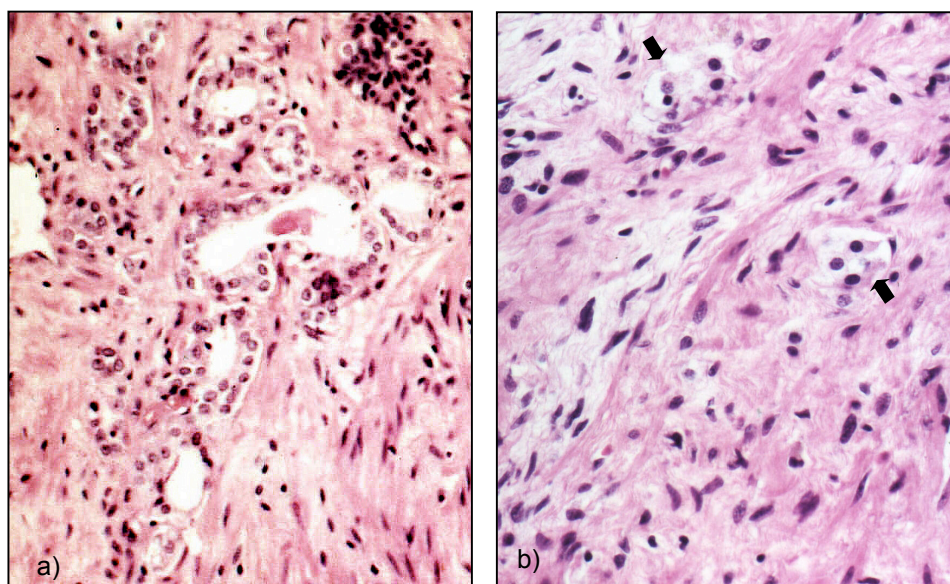


Abb. 11 a/b: RP Präparat nach PPNET mit zwei Tumorfoci: a) gut differenziertes glanduläres Karzinom mit minimalen regressiven Veränderungen. b) Karzinomresiduen mit stark ausgeprägter Regression (Pfeile). Weitgehende Destruktion der glandulären Architektur, Zytoplasmavakuolisierungen und Kernpyknosen. (H&E, 40X)

Trotz der Anfertigung zahlreicher Nachschnitte (2956 Schnittpräparate, im Mittel 422.3 Schnitte / Fall, Tabelle 11) konnte in den verbliebenen 7 pT0 Präparaten weiterhin histologisch kein Tumor nachgewiesen werden.

Patient	Histolog. Routineaufarbeitung		Zusatzuntersuchungen		Schnittpräparate gesamt	
	Blöcke (n)	Schnitte (n)		Nachschnitte (n)		
		H&E	IHC	H&E		ICH
1	22	22	5	240	1	268
4	25	25	16	574	1	616
5	39	39	6	233	2	380
6	47	40	7	524	4	575
9	31	31	3	324	0	358
13	37	37	5	258	0	300
18	19	19	0	4340	0	459
Total						2956
Schnitte / Fall (Mittel)						422.3

Tabelle 11: Prostatektomiepräparate ohne Tumornachweis auch nach Anfertigung zahlreicher Nachschnitte. IHC = Immunhistochemie

2.2.3.4. Diskussion

Schon in der Einleitung wurde erwähnt, dass ein posttherapeutischer pT0 Befund immer die Frage aufwerfen muß, ob eine detailliertere Untersuchung nicht doch noch Tumorreste zutage gefördert hätte. Dass diese Frage bei keinem Tumor mit einem eindeutigen Nein beantwortet werden kann, zeigen die Verläufe solcher Patienten. Die Tatsache, dass die sehr detaillierte Nachuntersuchung der eigenen pT0 Patienten dann auch tatsächlich fündig wurde, war insofern auch nicht überraschend. Das gilt insbesondere für die bei Nachschnitten festgestellten neoplastischen Veränderungen. Unerwartet war aber die Häufigkeit mit der anlässlich der Erstuntersuchung Tumorherde übersehen worden waren. Dies obwohl routinemäßig ein sehr aufwendiges Aufarbeitungsprotokoll der Op-Präparate zum Einsatz kam und schon routinemäßig reichlich von immunhistologischen Zusatzuntersuchungen Gebrauch gemacht worden war. Und dies auch, obwohl die Erstbefundung von Pathologen mit großer Erfahrung in der Beurteilung endokrin behandelte Prostatae erfolgte. Der eingangs erwähnte Generalverdacht, dass die unmittelbaren Erfolgsparameter (Tumorstadium und Schnitttrand) der endokrinen Vorbehandlung ein zu optimistisches Bild von der tatsächlichen Wirksamkeit dieser Therapie zeichnen, wird durch die vorliegenden Ergebnisse scheinbar bestätigt.

In der Literatur wurde bisher lediglich über einzelne pT0 Fälle berichtet, die einer gründlichen histologischen Nachkontrolle unterzogen wurden. So berichteten *Bazinet et al. 1997* über 2 Fälle bei denen der Resttumor im H&E Präparat übersehen und erst durch immunhistochemische Zusatzuntersuchungen entdeckt werden konnte. Bei beiden Patienten war eine konventionelle endokrine Induktion vorausgegangen. *Gleave et al. 1996* erwähnen in ihrer Publikation 4 pT0 Fälle nach prolongierter Vorbehandlung: Bei 2 derselben konnten ebenfalls mittels Immunhistochemie Tumorreste identifiziert werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht also zunächst einmal hervor, dass pT0 nach endokriner Induktion nicht im Sinne einer Eradikation des Primärtumors gedeutet werden darf. Bei den meisten derartigen Fällen (65% in der eigenen Untersuchung) können mit Hilfe einer mehr oder weniger aufwendigen Ergänzungsuntersuchung sehr wohl noch kleine und kleinste Tumorherde festgestellt werden. Etwa die Hälfte derselben weist jedoch mehr oder weniger ausgeprägte regressive Veränderungen auf, so dass ein weiterhin bestehendes malignes Potential dieser Residuen angezweifelt werden kann. Auch kann man vermuten, dass sie bei längerer Behandlung noch vollends verschwunden wären. Bei der anderen Hälfte kamen aber nur geringe oder überhaupt keine regressiven Veränderungen zur Darstellung. An deren malignem Potenzial wird man kaum zweifeln. Vermutlich wären sie auch bei längerer Therapiedauer größer geworden.

Nach sorgfältiger Nachbefundung der Originalpräparate sowie der extensiven Anfertigung von Nachschnitten konnte aber bei den restlichen 7 Fällen dieser Serie weiterhin kein Tumor nachgewiesen werden. Hier könnte eine komplette Tumoreradikation durch die PPNET tatsächlich vermutet werden. Gegen diese Annahme sprechen jedoch gewichtige Argumente:

- Selbst nach der extensiven Anfertigung von Nachschnitten, wie in der vorliegenden Studie geschehen, kann, allein aufgrund der unvermeidlichen Produktion von Gewebsabfall während der Schnittpräparatherstellung, niemals das gesamte Gewebematerial der mikroskopischen Untersuchung zugeführt werden.
- Auch bei profunder Kenntnis der therapieinduzierten histomorphologischen Alterationen ist auch für den geübten Histopathologen ein „Übersehen“ von Karzinomherden niemals 100% auszuschließen.

2.2.3.5. Zusammenfassung / Schlussfolgerung

Die Möglichkeiten der neoadjuvanten endokrinen Therapie des Prostatakarzinoms sind mit der üblichen dreimonatigen Behandlungsdauer nicht ausgeschöpft. Die prolongierte Therapie bis zum Erreichen des PSA Nadirs scheint die Effektivität der Therapie deutlich zu steigern, wie die weiter reduzierte positive Schnitttrandraterate (Köllermann et al. 1998), sowie die um das Dreifache erhöhte pT0 Quote zeigen. Wie die vorliegende Arbeit demonstriert, ist der pT0-Befund zumeist jedoch nicht im Sinne einer Eradikation des Primärtumors zu verstehen. Bei der Mehrzahl der Fälle können durch eine sorgfältige weitere Aufarbeitung doch noch kleine neoplastische Herde mit unterschiedlich ausgeprägten regressiven Veränderungen festgestellt werden. Aufgrund dieser Befunde wird man pT0 als den z.Zt. maximal erreichbaren morphologischen Therapieeffekt anzusehen haben. Über die prognostische Bedeutung dieses Befundes kann jedoch derzeit nur spekuliert werden, da valide Daten zu diesem Thema nicht vorliegen.

2.2.4. Verlaufsbeobachtung von pT0-Patienten

2.2.4.1. Einleitung

Wie im vorangehenden Kapitel dargelegt, ist pT0 nach PPNET von klinisch lokoregionär begrenzten Prostatakarzinomen nicht mit einer Tumoreradikation gleichzusetzen. Bei den meisten Patienten (13 von 20 = 65%) fanden sich entweder bereits im Rahmen der sorgfältigen mikroskopischen Reevaluation des Op-Präparates, oder spätestens nach der sehr detaillierten histologischen Nachbearbeitung desselben persistierende, sehr kleine Tumorherde. Bei 7 Patienten (35%) konnte jedoch auch nach der detaillierten histologischen Nachbefundung kein Tumorgewebe mehr festgestellt werden.

Der Versuch diese Ergebnisse zu interpretieren gestaltet sich schwierig, wie die folgenden Fragen verdeutlichen:

1. Entsprechen die 35% ohne endgültigen Tumornachweis einer tatsächlichen Tumoreradikation?
2. Bedeutet das geringe Volumen der Residualtumoren (Median 0,2 ml), dass es sich hierbei um klinisch insignifikante Tumorreste handelt?
3. Wenn den Tumorresten überhaupt klinische Bedeutung zukommt, spielt das Vorhandensein von mehr oder weniger ausgeprägten, therapeutisch bedingten regressiven Veränderungen dabei eine Rolle?

Antworten auf diese Fragen kann nur die Langzeitbeobachtung von pT0 Patienten liefern. Die diesbezüglichen Mitteilungen der Literatur sind ausserordentlich spärlich. Einen Hinweis dafür, dass das Stadium pT0 nach endokriner Vorbehandlung mit einer Prognoseverbesserung einhergehen könnte, ergibt sich aus den Untersuchungen von *Kitagawa et al. 2003*. Die Autoren stellten Verlaufsbeobachtungen von 100 neoadjuvant endokrin behandelten Patienten an. Hierbei fanden sie eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der therapiebedingten Tumorregression und der Prognose. So zeigten Patienten mit einem Hochrisikoprofil (GS>7, PSA>20ng/ml) und starker Tumorregression nach NHT eine 5 Jahres Rezidivfreiheitsrate von 100%, wohingegen bei Patienten gleichen Risikoprofils ohne Zeichen einer Tumorregression die Rezidivfreiheitsrate nur bei 32,9% lag. Da der pT0

Befund als maximale morphologische Tumorschädigung anzusehen ist, liegt es nahe zu vermuten, daß sich diese positiven Befunde auch in pT0-Kollektiven nach NHT niederschlagen.

Bei anderen epithelialen urologischen Tumoren liegen bereits Verlaufsdaten größerer pT0-Serien nach neoadjuvanter Therapie vor. So berichteten *Grossman et al. 2003* über Verlaufsbeobachtungen von 307 Patienten mit lokal fortgeschrittenen Blasenkarzinomen mit und ohne M-VAC Chemotherapie vor radikaler Zystektomie. Hierbei fand sich für die Zystektomiegruppe ohne neoadjuvante Therapie ein 33% höheres Risiko an dem Karzinom zu versterben, als in der Vergleichsgruppe mit NHT. Am deutlichsten zeigte sich ein prognostischer Benefit bei Patienten bei denen im Zystektomiepräparat kein Tumor mehr nachweisbar war (pT0). Dieser Befund fand sich in 48 von 126 (38%) der neoadjuvant behandelten Patienten. Die 5-Jahresüberlebensraten lagen bei 85%. Im Vergleich dazu lagen die 5-Jahresüberlebensraten der Nicht-pT0 Gruppen (mit und ohne neoadjuvante Therapie) nur bei 46% und 39%.

Nachfolgend wird über den Verlauf der eigenen pT0-Fälle berichtet (*Köllermann et al. 2003*). Mit 38 pT0 Patienten und einem zwischenzeitlich medianen Beobachtungszeitraum von 6 Jahren ist dies die bisher größte und am längsten beobachtete Serie von pT0 Patienten mit Prostatakarzinom.

2.2.4.2. *Patienten, Material und Methoden*

38 Patienten mit einem pT0-Befund nach PPNET trotz gründlicher histologischer Routineuntersuchung (Stanford-Protokoll) wurden verlaufsbeobachtet. Zunächst erfolgten dreimonatige Kontrollen u.a mittels digital-rektaler Untersuchung und PSA-Bestimmung. Nach dem 1. postoperativen Jahr erfolgten die Kontrollen halbjährlich. Vom Vorliegen eines biochemischen Progresses wurde ab einem PSA-Anstieg auf Werte $\geq 0,2$ ng/ml in zwei aufeinanderfolgenden Messungen ausgegangen. Die Patienten mit biochemischer Progression wurden, wenn möglich, weiteren Zusatzuntersuchungen zugeführt um die PSA Quelle zu identifizieren. Dazu gehörten: Röntgen-Thoraxübersicht, abdominaler Ultraschall, Computertomographie des Beckens und Abdomens, Knochenszintigraphie, 4 systematische TRUS gesteuerte Biopsien der vesico-urethralen Anastomosenregion sowie zusätzliche Biopsien von etwaig suspekten Läsionen .

2.2.4.3. Ergebnisse

Die Nachsorge erfolgte median über einen Zeitraum von 6 Jahren (3 – 10 Jahre, Mittelwert 6,4 Jahre). Der einzige Patient, der nur 3 Jahre lang kontrolliert werden konnte, verstarb 47 Monate nach der radikalen Prostatektomie an einem Nierenversagen bei Plasmocytom in kompletter Remission seines Prostatakarzinomes. Alle anderen Patienten konnten mindestens über einen Zeitraum von 4 Jahren und 34 über mindestens 5 Jahre nachkontrolliert werden.

Ein PSA Relaps entwickelte sich bei 7 der 38 Patienten (18%). Die Zeit bis zum Relaps betrug median 14 Monate (4-20 Monate).

Die initialen Tumorcharakteristika, sowie die Ergebnisse der lokalisationsdiagnostischen Untersuchungen bei den 7 Patienten mit biochemischer Progression wurden in Tabelle 12 aufgelistet.

Patient	cT Stadium	Gleason score	PSA initial (ng/ml)	Lokalisation / Dignität PSA Relaps
4	2	6	18,0	Lokal / benigne
33	1	5	17,2	Lokal / benigne
3	3	6	6,1	Lokal / maligne
35	1	6	5,6	Lokal / maligne
12	3	8	208,0	Lokal+systemisch / maligne
28	2	6	15,1	Lokal / unbekannt**
6	1	6	13,5	Lokal / unbekannt***

Tabelle 12: Präinduktives cStadium ,Gleason-Summe, und PSA sowie Ergebnisse der Rezidivlokalisationsdiagnostik der pT0-Patienten mit biochemischem Rezidiv.

** PSA Abfall nach lokaler Radiatio. Eine Biopsie wurde nicht durchgeführt.

*** PSA Abfall nach lokaler Radiatio. Biopsie ohne Aussagekraft (Bindegewebe).

Von den pT0 Patienten mit PSA Relaps hatten zwei initial Karzinome im Stadium cT3, davon einer mit einem Gleason-Summenwert von 8. Präinduktive PSA Werte ≥ 10 fanden sich bei 5 Patienten (71,4%).

Bei 2 Patienten (Patient 4 und 6 der Tabelle 12) hatte die im vorangehenden Kapitel beschriebene, detaillierte histologische Nachbearbeitung der Prostatektomiepräparate noch Tumoreinzelzellen ergeben. Die restlichen 5 Fälle konnten dieser Nachbearbeitung nicht unterzogen werden.

Bei 6 der 7 Patienten mit PSA-Relaps konnte eine weitergehende Rezidivdiagnostik durchgeführt werden, mit dem Ziel Lokalisation und Dignität der PSA-Quelle näher zu bestimmen. Der 7. Patient wurde ohne weitere Diagnostik von seinem behandelnden Urologen einer externen lokalen Strahlentherapie zugewiesen.

Ergebnisse der Lokalisationsdiagnostik:

Bei 3 der 6 Patienten konnte ein lokales Tumorrezidiv histologisch nachgewiesen werden. Alle drei Patienten wurden einer percutanen Radiatio (65 Gy) zugewiesen. Bei 2 der Patienten kam es im Gefolge der Radiatio zur einer kompletten PSA Remission auf Werte $< 0,1$ ng/ml. Der 3. Patient entwickelte nach einem anfänglichen PSA Abfall von 4,88 ng/ml auf 1,52 ng/ml einen erneuten PSA Anstieg. In einem 7 Monate später angefertigten Knochenszintigramm ergab sich der hochgradige Verdacht auf das Vorliegen von Knochenmetastasen.

Bei zwei der sechs Patienten ließen sich stanzbioptisch lediglich benigne Prostatadrüsen nachweisen. Zwischenzeitlich wurden beide Patienten 44 bzw. 67 Monate nachbeobachtet. In dieser Zeit kam es bei beiden Patienten zu einem spontanen PSA Abfall (Patient 1 von 1,08 auf 0,75 ng/ml; Patient 2 von 0,5 auf 0,42 ng/ml). Besonders erwähnenswert erscheint hier Patient 4 der Tabelle 11. Bei ihm waren anlässlich der im vorangehenden Kapitel beschriebenen histologischen Nachbearbeitung des Prostatektomiepräparates noch einzelne im Stroma verstreute Tumorzellen nachgewiesen worden. Nachdem es zum PSA Relaps gekommen war, wurden bei ihm im Abstand von einem Jahr jeweils 4 Paraanastomosenbiopsien entnommen, die jedoch lediglich als benigne beurteiltes Drüsengewebe ergaben.

Bei einem der sechs biopsierten pT0 Patienten fand sich in der Biopsie nur Bindegewebe. Dieser Patient wurde einer lokalen perkutanen Radiatio zugeführt, die zu

einem PSA Abfall auf Werte $< 0,1$ ng/ml führte. Dies deutet auf eine lokale PSA Quelle, von allerdings unklarer Dignität hin.

2.2.4.4. Diskussion

Die Datenlage zur Prognose eines pT0 Befundes nach radikaler Prostatektomie ist insgesamt sehr spärlich. Das gilt in ganz besonderem Maße für pT0 nach endokriner Vorbehandlung.

Ohne Induktion ist der pT0 Befund mit $< 2\%$ außerordentlich selten (*Soloway et al. 1995; Schulman et al. 2000*). *Herkommer et al. 2004* berichteten erstmals über Verlaufsdaten einer Patientenserie (13 Fälle) ohne Vorbehandlung. Dabei handelte es sich nicht um eigene, sondern durch eine landesweite Umfrage ermittelte Kasuistiken. Bei all diesen Patienten war präoperativ ein T2 Karzinom festgestellt worden und keiner hatte einen niedrig differenzierten Tumor. Die Prostatektomiepräparate dieser Veröffentlichung wurden, im Gegensatz zu den eigenen, nicht einer detaillierten histologischen Nachbearbeitung unterzogen. *Goldstein et al. 1995* haben dies aber bei ebenfalls 13 Fällen aus 4 großen amerikanischen Kliniken durchgeführt. Sie konnten nur in 2 Prostatektomiepräparaten auch tatsächlich kein Karzinomgewebe identifizieren. In den Prostatae der anderen 11 Patienten (85%) fanden sie jedoch sehr kleine (0,003-0,038 ml) Tumorfoci. Es ist daher anzunehmen, dass eine derartige Nachbearbeitung in der Herkommer Serie ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle einen Karzinomnachweis erbracht hätte. Wie zu erwarten war die Prognose dieser pT0 Fälle sehr gut. In einem mittleren Nachbeobachtungszeitraum von 62 Monaten (19-150) kam es in keinem Fall zu einer biochemischen Progression.

Vor allem nach prolongierter endokriner Induktion ist der pT0-Befund wesentlich häufiger (16%), als bei nicht vorbehandelten Patienten. Wie im Kapitel 2.3.3. gezeigt (Tab 3), überwogen bei den postinduktiven pT0 Fällen zwar die T1-2 Tumoren, aber immerhin 18 % hatten zu Beginn ein Karzinom im Stadium T3 und bei 22 % war der Primärtumor niedrig differenziert. Die Nachbearbeitung der eigenen Prostatektomiepräparate hat in 65 % noch Tumorreste ergeben, die ebenfalls sehr klein waren.

Angesichts dieser Unterschiede konnte nicht überraschen, dass die biochemische Progressionsrate der eigenen postinduktiven pT0-Fälle mit 18% schlechter ist, als

die der Serie von *Herkommer et al. 2004* mit 0% innerhalb eines vergleichbaren Beobachtungszeitraumes. Unerwartet war dahingegen, dass die PSA-Quelle bei allen pT0-Patienten der eigenen Serie mit biochemischer Progression, zumindest auch in der ehemaligen Prostataregion angesiedelt war. Noch überraschender war die Tatsache, dass bei 3 der 7 Patienten eindeutig ein lokales Tumorrezidiv festgestellt werden konnte.

2.2.4.5. Zusammenfassung

pT0 Befunde werden ohne und nach endokriner Vorbehandlung klinisch noch lokalisierter Prostatakarzinome angetroffen. Insbesondere nach prolongierter endokriner Induktion ist der pT0-Befund keine Seltenheit (16 % im eigenen Krankengut). Die minutieuse histologische Nachbearbeitung der pT0-Prostatektomiepräparate von unvorbehandelten wie vorbehandelten Patienten ergibt bei deutlich über 50 % der Fälle noch kleine, anlässlich der Routineuntersuchung nicht festgestellte Tumorfoci. Im Gegensatz zu den unvorbehandelten Patienten zeigen diese kleinen Tumorherde nach vorangegangener endokriner Therapie vielfach erhebliche regressive Veränderungen. Dennoch sind biochemische Progressionen bei den vorbehandelten Patienten häufiger zu verzeichnen (18%), als bei den unvorbehandelten pT0 Patienten (0%). Die Erklärung hierfür dürfte in den unterschiedlichen initialen Eigenschaften des Primärtumors liegen. Während die unvorbehandelten Karzinome sämtlich organbegrenzt und hochdifferenziert waren, befanden sich unter den vorbehandelten, neben T3 Fällen, auch geringdifferenzierte Tumore.

Bei allen pT0-Fällen mit biochemischer Progression der eigenen Serie konnte zumindest auch eine lokale PSA-Quelle identifiziert werden. Hinzu kommt, dass bei 3 Patienten auch ein Lokalrezidiv des Prostatakarzinomes bioptisch gesichert werden konnte. Dies legt nahe, dass selbst kleine und regressiv veränderte Tumorstadien bei pT0 Patienten nach PPNET durchaus noch ein malignes Potenzial haben können.

2.2.5. Prognose des pT0-Befundes: Eine Matched-Pair Analyse

2.2.5.1. Einführung

Die vorangehende Untersuchung hat gezeigt, dass es nach PPNET trotz eines pT0 Befundes sowohl zu lokalen, als auch systemischen Rezidiven der Tumorerkrankung kommen kann. Damit bleibt aber folgende Frage unbeantwortet: Hat ein Patient mit pT0-Befund nach PPNET eine bessere Prognose, als ein Patient mit ähnlichen Tumorcharakteristika, bei dem die Routineaufarbeitung des Prostatektomiepräparates aber noch deutlich erkennbaren Tumor ergab? Anders ausgedrückt: Ist bei nachweislich maximalem Therapieeffekt mit besseren Ergebnissen zu rechnen, als bei partiellem Erfolg? Die Beantwortung dieser Frage erscheint von Bedeutung, weil dies im positiven Falle ein gewichtiges Argument für PPNET wäre, aber auch weil pT0 dadurch zum unmittelbaren Therapieziel aller neoadjuvanten therapeutischen Bemühungen würde.

Im Folgenden wird über die eigenen Untersuchungsergebnisse zur skizzierten Problematik berichtet (*Köllermann et al. 2004*).

2.2.5.2. Material / Methoden

Es wurde ein Gesamtkollektiv von 174 Patienten mit Prostatakarzinom, initial im klinischen Stadium cT1-3, ausgewertet. Alle diese Patienten wurden nach vorangegangener PPNET der radikalen Prostatektomie zugeführt. Bei 138 derselben hatte die routinemäßige histologische Untersuchung der RP-Präparate noch Tumor ergeben. Bei den restlichen 36 Patienten konnte dahingegen kein Tumor mehr nachgewiesen werden (pT0). Im Rahmen der Nachsorge der Patienten wurde ein PSA Anstieg auf Werte $\geq 0,2$ ng/ml als biochemischer Progress gewertet. Statistik: Um sicherzustellen dass bezüglich prognostisch relevanter Risikofaktoren zwischen beiden Gruppen eine homogene Verteilung vorliegt, wurden zunächst entsprechende kategorische Variablen mit dem Fisher Test (zweiseitig) oder dem Chi-Quadrat test (bei mehr als zwei Variablen) untersucht. Bei numerischen Daten wurde der Mann-Whitney Test angewandt. Aufgrund signifikanter Unterschiede zwischen beiden Gruppen erfolgte zunächst eine Paarbildung, um diese Unterschiede aufzuheben. Kriterien der Paarbildung waren:

- Initialer PSA Wert ($<$ vs ≥ 10 ng/ml)

- Anzahl der tumorbefallener Biopsien (Mittel)
- Gleasonsumme im Prostatektomiepräparat ($<$ vs ≥ 7)
- cT-Stadium
- Nachbeobachtungszeit

Die gesamte Paarbildung wurde ohne Wissen des postoperativen Verlaufes durchgeführt. Fanden sich mehrere, diesbezüglich identische Patientenpaare, wurde eines davon blind ausgewählt. Insgesamt konnten so 30 Patientenpaare gebildet werden (=60 Patienten), entsprechend 30 Patienten aus der pT0 und ebenfalls 30 aus der nicht pT0-Gruppe. In einem zweiten Schritt erfolgte dann die Matched-pair Analyse. Dabei wurde die Wahrscheinlichkeit einen PSA-Relaps zu entwickeln für die jeweilige Patientengruppe nach der Kaplan-Meier Methode berechnet. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der beiden so zusammengestellten Gruppen wurden nach dem Log rank Test ermittelt.

2.2.5.3. Ergebnisse

Die PSA Progressionsrate der Nicht-pT0 Gruppe betrug 31,9% (44/138) im Vergleich zu 19,4% (7/36) in der pT0 Gruppe. In der erstgenannten Gruppe betrug die mediane Zeit bis zum Relaps 14,0 (5 – 41) Monate, in der zweiten bei 15,1 Monaten (4 – 20). Wie jedoch in Tabelle 13 dargestellt fanden sich signifikante Unterschiede bezüglich klinischer und histopathologischer Charakteristika, die keinen sinnvollen Vergleich der Verläufe ermöglichten. So war in der pT0-Gruppe die Anzahl der tumorbefallenen Stanzbiopsien / Patient zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant niedriger (1,3 vs 2,67, $p < 0.0001$), es fand sich ein signifikant höherer Anteil an Tumoren mit einem Gleason score < 7 (77,8% vs. 34,1%, $p < 0.0001$) und auch der Anteil von Tumoren im klinischen Stadium T1-2 war signifikant höher (85,6% vs. 58,0%, $p < 0.0001$). Dies unterstützt die bereits weiter oben gemachte Feststellung, dass primär kleine und gut bis mäßig differenzierte Tumoren in pT0 umgewandelt werden. Des Weiteren zeigten sich signifikante Unterschiede in der medianen Nachbeobachtungszeit zwischen beiden Gruppen (31 Monate in der pT0 Gruppe versus 47 Monate in der Nicht-pT0 Gruppe, $p = 0.0185$).

	Nicht pT0 (n=138)	pT0 (n=36)	
Patientencharakteristika	n (%)	n (%)	<i>p</i>
Initiales PSA (ng/ml)			
< 10	61 (45,2)	18 (51,4)	<i>0.5705</i>
≥ 10	74 (54,8)	17 (48,6)	
Anzahl Bx/Patient (Mittel)	6,58	6,88	<i>0.5166</i>
Anzahl positiver Bx/Patient(Mittel)	2,67	1,3	<i><0.0001</i>
Gleason Summenwert (Bx)			
< 7	45 (34,1)	28 (77,8)	<i><0.0001</i>
≥ 7	87 (65,9)	8 (22,2)	
Gleason Summenwert (RP)			
< 7	18 (13,0)	n.d.	<i>n.d.</i>
≥ 7	64 (46,4)		
nicht bestimmbar	56 (40,6)		
cT-Stadium			
T1	19 (13,8)	11 (30,6)	<i><0.0001</i>
T2	39 (28,3)	20 (55,6)	
T3	80 (57,9)	5 (13,8)	
pT-Stadium			
T0	0 (0,0)	36 (100)	<i><0.0001</i>
T2	95 (68,8)	0 (0,0)	
T3	34 (24,6)	0 (0,0)	
T4	9 (6,5)	0 (0,0)	
Dauer PPNET (Median, Monate)	6,4	8,3	<i>0.03</i>
Nachbeobachtungszeit (Median, Monate)	31	47	<i>0.0185</i>

Tabelle 13: Übersicht über die klinischen und histopathologischen Charakteristika der nicht-pT0 und pT0 Patienten mit cT1-3 Prostatakarzinom nach PPNET. Bx=Biopsie.

Wie Tabelle 14 zeigt, konnte durch Paarbildung entsprechend den aufgeführten Kriterien Vergleichbarkeit hergestellt werden.

	Nicht gepaart			Gepaart		
	Nicht pT0 (n=138)	pT0 (n=36)		Nicht pT0 (n=30)	pT0 (n=30)	
	n (%)	n (%)	<i>p</i>	n (%)	n (%)	<i>p</i>
Initiales PSA (ng/ml)						
< 10	61 (45,2)	18 (51,4)	<i>0.5705</i>	19 (63,3)	19 (63,3)	<i>1.20</i>
≥ 10	74 (54,8)	17 (48,6)		11 (36,7)	11 (36,7)	
Anzahl Bx/Patient (Mittel)	2,67	1,3	<i><0.0001</i>	1,6	1,357	<i>0.40</i>
Gleason Summenwert (Bx)						
< 7	45 (34,1)	28 (77,8)	<i><0.0001</i>	22 (73,3)	22 (73,3)	<i>1.23</i>
≥ 7	87 (65,9)	8 (22,2)		8 (26,7)	8 (26,7)	
cT-Stadium						
T1	19 (13,8)	11 (30,6)	<i><0.0001</i>	6 (20,0)	6 (20,0)	<i>1.00</i>
T2	39 (28,3)	20 (55,6)		20 (66,7)	20 (66,7)	
T3	80 (57,9)	5 (13,8)		4 (13,3)	4 (13,3)	
Nachbeobachtung (Median, Monate)	31	47	<i>0.0185</i>	37,9	46,0	<i>0.12</i>

Tabelle 14: Klinische und histopathologische Charakteristika der pT0- und Nicht-pT0-Patienten nach Paarbildung für cT-Stadium und Gleason Summenwert. Bx=Biopsie

Abb.12 zeigt die kumulative PSA progressionsfreie Überlebenswahrscheinlichkeit für beide Gruppen. Die 12 Monate PSA progressionsfreie Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt 89,8% (95% Konfidenzintervall (KI): 78,8 – 100) für die pT0 Gruppe und 89,0% (95% KI: 77,2 – 100) für die Nicht-pT0-Gruppe. Die entsprechende Rate nach 24 Monaten beträgt 79,0 % (95% KI: 64,0 – 94,0) und 89,0% (95% KI: 77,2 – 100), nach 36 Monaten betrug sie 79,0 % (95% KI: 64,0 – 94,0) und 76,3% (95% KI: 57,1 – 95,5). Die Unterschiede zwischen beiden Kurven erreichten bis zu diesem Zeitpunkt jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0.78$).

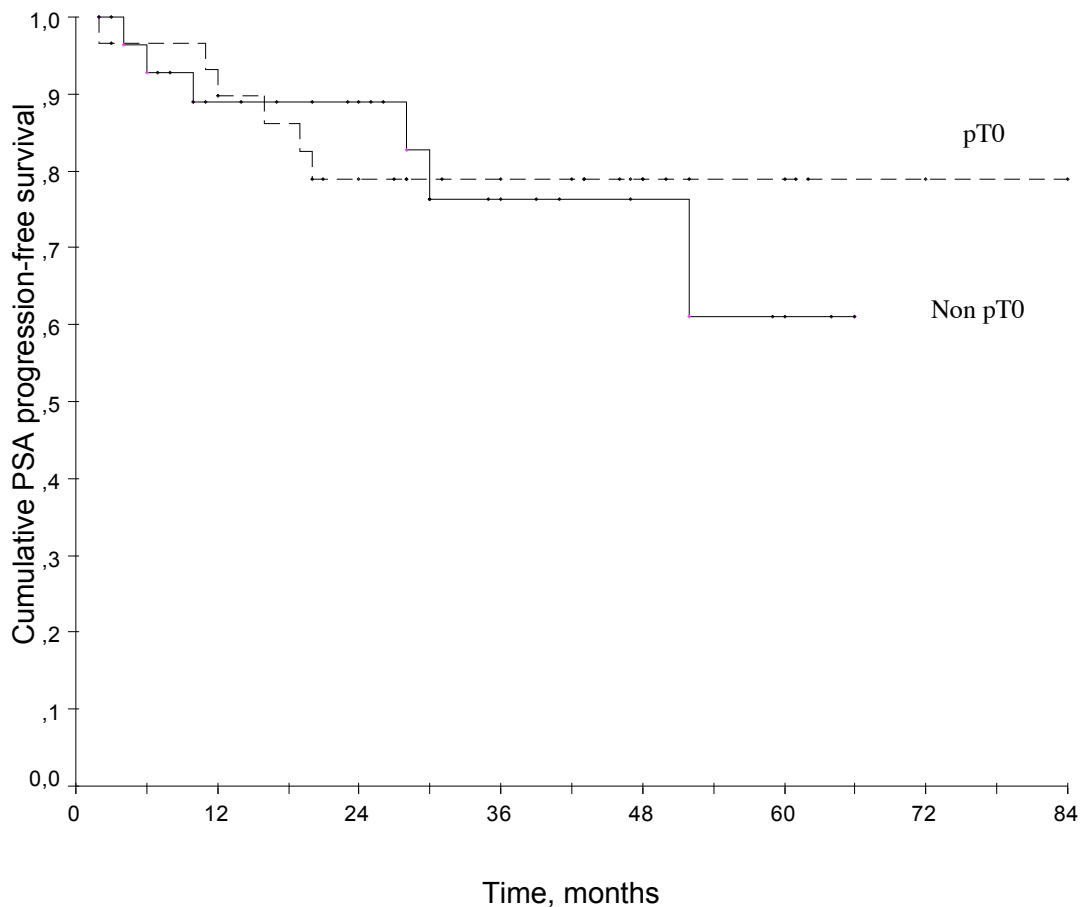


Abb. 12: Kumulatives, PSA progressfreies Überleben von 30 pT0-Patienten im Vergleich zu einer Kohorte von 30 Nicht-pT0-Patienten (Paar-Analyse) ($p=0.78$)

2.2.5.4. Diskussion

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Datenlage zur Prognose von pT0-Patienten nach endokriner Induktion insgesamt mangelhaft ist. Daten zur Prognose des pT0-Befundes nach konventioneller (3 monatiger) Vorbehandlung liegen bislang nicht. Das liegt wahrscheinlich an der Seltenheit des Ereignisses bei dieser Form der Vorbehandlung. Für die Situation nach prolongierter Induktion sind die bisherigen Informationen ebenfalls spärlich. Obwohl pT0 nach dieser Art von Vorbehandlung wesentlich häufiger ist, dürfte die Knappheit der Daten hier auf die Seltenheit mit der solche Therapieschemata eingesetzt werden zurückzuführen sein. *Noguchi et al. 2002* fanden in Ihrer pT0-Serie von allerdings nur 5 Fällen, nach einer mittleren Verlaufsbeobachtung von 41 Monaten keine biochemische

Progression. Die mittlere Vorbehandlungsdauer betrug 11 Monate (4 – 19 Monate). Der mediane initiale PSA-Wert der pT0 Patienten lag bei 7,1 ng/ml (5,2-194 ng/ml). Die Gleason-Summe (GS) betrug 2 x GS 6, 2 x GS 7 und 1 x GS 8, das klinische Tumorstadium wurde 1x mit T1c, 3 x mit T2b und 1 x mit T3a verschlüsselt. In dieser kleinen pT0 Patientenserie befanden sich also durchaus Fälle mit einem erheblichen Rezidivrisiko. Die Autoren schlussfolgern, dass die Lebenserwartung von Patienten mit einem pT0 Befund nach NHT der von gleichalten Patienten ohne Prostatakarzinom entspricht. Diese Aussage dürfte aber wohl kaum einer Kritik standhalten.

Gleave et al. 2000 berichten über 20 pT0-Fälle unter 156 Prostatakarzinompatienten nach radikaler Prostatektomie, die 8 Monate endokrin vorbehandelt wurden. Über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 5 Jahren entwickelte auch hier keiner der pT0 Patienten ein Tumorrezidiv (PSA-Schwellenwert von 0,3 ng/ml). Aufgeschlüsselt nach pT-Stadium ergab die Kaplan-Meier Analyse das günstigste PSA freie 5 Jahres Überleben mit 100% für die pT0 Kohorte. Somit scheint auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit der pT0 Befund nach Langzeitinduktion mit einer besonders günstigen Prognose einherzugehen. Leider ist eine weitergehende Analyse dieser pT0 Patienten bezüglich der präinduktiven Risikosituation nicht möglich, da der Schwerpunkt der Arbeit auf anderen Fragestellungen beruht.

Meyer et al. 2001 berichteten über ein deutlich verbessertes PSA progressfreies Überleben von Patienten nach prolongierter im Vergleich zu der dreimonatigen oder gar keiner endokrinen Vorbehandlung. Dieser Unterschied machte sich allerdings erst 3 Jahre postoperativ bemerkbar und erreichte sein Maximum nach 4 Jahren. Demnach trat die pT0 Gruppe der eigenen Untersuchung mit einer medianen Verlaufsbeobachtung von 37,9 Monaten gerade in die prognostisch relevante Phase ein. Ein längeres Follow-up könnte daher noch zu einer positiven Verschiebung der Ergebnisse führen. Diese Annahme wird durch die weiter oben zitierten Fremdergebnisse gestützt.

2.2.5.5. Zusammenfassung /Schlussfolgerungen

In der Einführung zur vorliegenden Studie wurde die Frage gestellt, ob ein Patient mit pT0-Befund nach PPNET eine bessere Prognose hat, als ein ebenfalls mit PPNET Behandelter mit vergleichbaren Tumorcharakteristika, bei dem es jedoch

nicht zu pT0 kam. Die durchgeführte Matched-pair Analyse hat diese Frage leider nicht klar beantworten können. Die relativ kurzen Kontrollzeiten und die Tatsache, dass die Arbeitsgruppe *Meyer et al. 2001* den maximalen rezidivfreien Überlebensvorteil von prolongiert vorbehandelten Patienten erst beginnend im 3 Jahr post operationem feststellen konnten, gibt Anlaß zur Annahme, dass sich dies auch in den Verläufen des eigenen Patientengutes niederschlagen könnte. Unzweifelhaft sind zu diesem Thema aber weitere Untersuchungen erforderlich. Unabhängig davon ist die eigene Auffassung die, dass der pT0-Befund nach neoadjuvanter Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms, neben dem Schnittrandbefund, einen bedeutsamen unmittelbaren Messparameter für die Wirksamkeit der Behandlung darstellt.

2.2.6. Abschließende Bemerkungen zu pT0

Die vorgelegten eigenen Arbeiten, sowie die zitierte und z.T. kommentierte Literatur haben gezeigt, dass pT0 im Prostatektomiepräparat eines Patienten mit Prostatakarzinom mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit angetroffen wird und auch sehr unterschiedliche Ursachen haben kann. Die neoadjuvante endokrine Therapie ist ohne Zweifel ein potenter Verursacher von pT0 Befunden. Schon die konventionelle 3 monatige Vorbehandlung hatte die Häufigkeit gegenüber unvorbehandelten Patienten mit etwa 5% nahezu verdreifacht. Eine weitere Steigerung darüber hinaus, ebenfalls um den Faktor 3, verursacht die prolongierte Induktion, darunter auch PPNET. Wie aufgezeigt, bedeutet pT0 allerdings weder bei unvorbehandelten noch bei neoadjuvant therapierten Patienten Karzinomfreiheit der Prostata. Eine äußerst aufwendige, im Rahmen der Routinediagnostik nicht realisierbare, feingewebliche Aufarbeitung der Op-Präparate kann in den meisten Fällen dann doch noch Tumorfoci nachweisen.

Im Kapitel "Zur Bedeutung des pT0 Befundes" wurde darauf hingewiesen, dass die histologische Befundung von endokrin behandelten Prostatae unter dem Generalverdacht steht ein zu optimistisches Bild der tatsächlichen Situation zu liefern. Der Vergleich unvorbehandelter mit vorbehandelten pT0-Prostatae nach minutieuser Nachbearbeitung bestätigt diesen Verdacht jedoch nicht, da in beiden Konstellationen zumeist noch kleinste Tumorfoci festgestellt werden können.

Das wesentliche morphologische Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden pT0-Typen sind die regressiven Veränderungen. Man findet sie in den meisten, jedoch keineswegs in allen Tumorfoci vorbehandelter Patienten, aber natürlich nicht bei den unvorbehandelten Fällen.

Obwohl die prognostische Bedeutung von pT0, wegen der geringen bisher publizierten Fallzahlen noch nicht abschließend geklärt ist, zeichnet sich ab, dass pT0 nach neoadjuvanter Therapie eine schlechtere Prognose hat, als pT0 ohne Vorbehandlung. Wie gezeigt, gilt das auch für den Lokalbefund. Dies nährt die Vermutung, dass die regressiven Veränderungen nicht unbedingt mit einer Beeinträchtigung der neoplastischen Vitalität einhergehen.

Die hohen pT0-Raten unter prolongierter Induktion und PPNET beweisen nach der eigenen Auffassung die Überlegenheit dieser Vorbehandlungsformen gegenüber den konventionellen, 3 monatigen Therapieschemata zumindest auf morphologischer Ebene. Gleichzeitig zeigen sie aber wahrscheinlich auch erstmals die Grenzen der endokrinen Vorbehandlung auf. Es ist nämlich nicht damit zu rechnen, dass längere endokrine Vorbehandlungszeiten noch zu einer weiteren Steigerung der pT0 Raten führen.

Vorangehend wurde schon darauf hingewiesen, dass in einer ganzen Reihe von prospektiven, randomisierten Studien im Gefolge der konventionellen endokrinen Induktion, zwar einer drastische Senkung der Rate tumorbefallener Schnittränder, aber keine Steigerung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden konnte. Dies auch, obwohl dabei zu einem deutlichen Anstieg der pT0-Rate auf 5 % kommt.

Ein endgültiges Urteil über die Möglichkeiten der prolongierten Induktion kann z. Zt. noch nicht gefällt werden. Fraglos hat diese Vorbehandlungsform die Häufigkeit positiver Schnittränder noch einmal drastisch gesenkt. Wie aufgezeigt, kam es auch zu einer weiteren, deutlichen Steigerung der pT0 Rate. Die bisher vorliegenden Zwischenergebnisse von *Gleave et al. 2003* lassen jedoch bezüglich des entscheidenden Endparameters, dem progressionsfreien Überleben, keinen spektakulären Durchbruch erwarten. Die Autoren verglichen die PSA Rezidivrate von 499 Patienten nach 3 vs. 8 Monaten neoadjuvanter Hormontherapie und konsekutiver radikaler Prostatektomie bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 3 Jahren. Trotz gleicher Stratifizierung der beiden Patientengruppen nach T-Stadium, Glea-

songrad und initialem PSA-Wert fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der biochemischen Rezidivrate zwischen beiden Gruppen.

Wahrscheinlich muss eine in diesem Sinne wirksame Vorbehandlung die pT0 Rate auf 20, 30 oder sogar einen noch höheren Prozentsatz anheben können.

Pettaway et al. 2000 veröffentlichten erste Ergebnisse einer Studie, in der sie neoadjuvant über 3 Monate bei 33 Patienten eine kombinierte endokrin/ zytostatische Behandlung durchführten. Unmittelbares Behandlungsziel war eine pT0-Rate von 20 %. Ein pT0-Befund wurde allerdings bei keinem einzigen Patienten dieser Serie erreicht.

Im Lichte der aufgeführten Argumente, wird man schon angesichts der bisher negativen pT0-Quote dieser Studie, kaum ein Ergebnis erwarten dürfen, welches die Resultate der konventionellen endokrinen Induktion, bezüglich rezidivfreiem Überleben, übertrifft. Aber selbst wenn die anvisierten pT0-Rate von 20 % erreicht worden wäre, hätte die wahrscheinlich nicht ausgereicht um einen klaren prognostischen Vorteil für die Patienten zu erreichen.

Derzeit gibt es, wenn man pT0 als Meßlatte benutzt, keine neoadjuvante Therapieform, die der prolongierten endokrinen Vorbehandlung überlegen wäre. Angesichts dieser Tatsache ist ein Verbesserung der Ergebnisse auf diesem Gebiet nur durch die Kombination der endokrinen mit zusätzliche Behandlungsformen, welche zu einer weiteren Steigerung der pT0-Rate führen, zu erwarten.

3. UNTERSUCHUNGEN ZUR KNOCHENMARKBESIEDELUNG MIT DISSEMINIERTEN PROSTATAKARZINOMZELLEN

3.1. HÄUFIGKEIT DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK BEI UNVORBEHANDELTEN PATIENTEN MIT KLINISCH LOKALISIERTEM PROSTATAKARZINOM

3.1.1. Einführung

In den vergangenen Jahren ist es mit sehr unterschiedlichen Untersuchungsmethoden gelungen einzelne Tumorzellen zu identifizieren. Dabei zeigte sich rasch, dass man auch bei, nach herkömmlichen Maßstäben lokal begrenzten Tumoren, nicht selten bereits eine Tumorzell dissemination sowohl im Blut, als auch im Knochenmark und den regionären Lymphknoten feststellen kann. Das Prostatakarzinom macht davon keine Ausnahme. Wenngleich die prognostische Bedeutung solcher Befunde nicht abschließend geklärt ist, kann nicht angezweifelt werden, daß eine später auch klinisch manifeste Metastasierung von wesentlich früher disseminierten Tumorzellen ihren Ausgang nimmt. In der vorliegenden Untersuchung ist der Frage nachgegangen worden, wie häufig bei virginellen, klinisch noch örtlich begrenzten Prostatakarzinomen bereits eine Tumorzell dissemination ins Knochenmark vorkommt und in wieweit dieses Vorkommnis mit bekannten Prognosefaktoren wie Tumorstadium, Differenzierungsgrad und dem initialen PSA-Wert korreliert.

3.1.2. Patienten, Material und Methoden

Insgesamt wurden 327 Patienten mit klinisch noch lokalisiertem und unvorbehandeltem Prostatakarzinom auf Tumorzellen im Knochenmark untersucht.

Die Diagnose Prostatakarzinom wurde anhand von systematisch unter transrektaler Ultraschallkontrolle entnommenen Sextantenbiopsien gestellt. Der Differenzierungsgrad des Tumors wurde nach dem von *Gleason 1966* vorgeschlagenen System bestimmt. Die Festlegung des Tumorstadium erfolgte entsprechend dem TNM System (1987). Zum Ausschluss von Lymphknoten und Knochenmetastasen erfolgten eine laparoskopische Lymphadenektomie bzw eine Knochenszintigraphie bei PSA Werten > 10ng/ml und/oder klinisch organüberschreitendem Tumor-

wachstum bzw. einem Gleason score ≥ 7 . Vor dem Beginn jedweder Behandlung erfolgte nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis des Patienten die Entnahme von Knochenmark aus beiden Darmbeinschäufeln. Dabei wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen: In örtlicher Betäubung, bzw in Allgemeinnarkose, wenn danach ein operativer oder diagnostischer Eingriff dies notwendig machte, wurden aus beiden Cristae iliacae 6-10 ml Knochenmark, entsprechend $6-10 \times 10^7$ Zellen, mittels Spritze aspiriert. Die weitere Verarbeitung der Präparate erfolgte dann im Institut für Immunologie der Maximilian Universität München. Nach Zentrifugation über einen Ficoll-Hypaque Dichtegradienten (Pharmacia; Freiburg, Deutschland; Dichte 1,077 g/mol) bei 900 g für 30 Minuten, wurden die mononukleären Interphasezellen bei Raumtemperatur auf Glasobjektträger zentrifugiert (150 g für 5 Minuten). Zur Identifizierung der Tumorzellen kam der monoklonale Antikörper (mAk) CK 2 gegen das Cytokeratin Polypeptid No. 18 zur Anwendung. CK 2 setzt an allen Zellen epithelialen Ursprungs unabhängig von ihrer Dignität an (*Debus et al. 1982*). Der mAk kam in der optimalen Konzentration von 2,5 ng/ml zum Einsatz. Entsprechende Verdünnungen von Maus Myeloma Protein dienten als IgG1 Isotyp Kontrolle (MOPC21 Sigma, Deidenhofen, Deutschland). Die Antikörperreaktion wurde durch die alkalische Phosphatase/anti alkalische Phosphatase (APAAP) Technik in Kombination mit der Neufuchsin Methode sichtbar gemacht (*Cordell et al. 1984*). Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurden ein polyvalentes Kaninchen anti Maus Ig Antiserum (259 Dako, Hamburg), präformierte alkalische Phosphatase Komplexe und monoklonale anti-alkalische Phosphatase Antikörper (D651, Dako, Hamburg) in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung zugesetzt. Die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase wurde durch Inkubation mit Levamisole blockiert. Um ein rasches Screening auf mAb positive Zellen zu ermöglichen, wurde auf eine Gegenfärbung der Präparate verzichtet.

Die Verteilung des klinischen Tumorstadiums, des Gleason Gratings sowie des initialen PSA-Wertes der Patienten ist in Tabelle 15 dargestellt.

cT-Stadium initial	T1	T2	T3
N (%)	54 (16,5%)	78 (24%)	195 (59,5%)
Gleason-Summenwert	2-4	5-6	≥ 7
N (%)	40 (12%)	97 (30%)	190 (58%)
PSA (ng/ml)	< 10	10 – 20	> 20
N (%)	144 (44%)	99 (30%)	84 (26%)

Tabelle 15: Verteilung von klinischem Tumorstadium, Gleasongrading und PSA-Werten von 327 Patienten mit lokal begrenztem virginellen Prostatakarzinom vor Knochenmark-Punktion.

3.1.3. Ergebnisse

Von den 327 untersuchten Patienten mit klinisch noch lokalisiertem Prostatakarzinom wiesen 93 (28,4%) bereits einen positiven Knochenmarkbefund auf (Abb. 13).



Abb. 13: CK2-positive Einzelzelle im Knochenmark (APAAP Methode)

Im Median fanden sich 2 CK-positive Zellen / 2×10^6 Knochenmarkzellen (Range 1 – 38 Zellen/ 2×10^6 Knochenmarkzellen).

In der folgenden Tabelle 16 wurde die Häufigkeit des KM-Befalls dem cT-Stadium, dem Malignitätsgrad, sowie dem initialen PSA-Wert gegenüber gestellt.

	N	KM+	KM-
CT-Stadium			
T1-2	132	29 (22%)	103 (78%)
T3	195	64 (33%)	131 (67%)
Malignitätsgrad			
GS 2-4	40	5 (12,5%)	35 (87,5%)
GS 5-6	97	42 (43%)	55 (57%)
GS ≥ 7	190	46 (24%)	144 (76%)
PSA (ng/ml)			
< 10	144	36 (25%)	108 (75%)
10 – 20	99	29 (29%)	70 (71%)
> 20	84	28 (33%)	57 (67%)

Tab. 16: Häufigkeit des Knochenmark-Befalls (KM) getrennt aufgeschlüsselt für klinisches Tumorstadium (cT-Stadium), Malignitätsgrad (Gleason-Summe=GS) und initialem PSA-Wert.

Tabelle 16 zeigt: Bei Patienten mit klinisch noch auf das Organ beschränkten Tumoren (cT1+cT2) fanden sich seltener (22%) ein KM-Befall als bei klinisch bereits organüberschreitendem Wachstum (cT3=34%). Der Unterschied zwischen beiden Häufigkeiten ist statistisch signifikant ($p=0.02$; *Fisher's Exact Test*).

Widersprüchlich sind die Daten für den Malignitätsgrad: Patienten mit hochdifferenzierten Karzinomen (GS 2-4) wiesen signifikant seltener einen KM-Befall auf als Patienten mit mittelgradig differenzierten Karzinomen (GS 5-6) (12,5% vs 43%; $p=0.0006$; *Fisher's Exact Test*). Verglichen mit erstgenannter Patientengruppe wiesen auch die Patienten mit niedrig differenziertem Karzinom häufiger einen KM-Befall auf, der Unterschied war aber deutlich geringer (12,5 vs 24%) und erreichte kein Signifikanzniveau ($p=0.14$; *Fisher's Exact Test*). Aufgrund dieses Widerspruchs erfolgte ein erneuter Vergleich nach Umgruppierung der Patienten in solche mit hoch bis mäßiggradig (GS 2-6) vs. solche mit niedrig differenzierten Karzinome (GS ≥ 7). Hiernach zeigte das Häufigkeitsverhältnis sogar in die entgegengesetzte Richtung. In der Gruppe mit GS 2-6 Karzinomen fand sich ein positives Knochenmark bei 34,4% der Patienten, in der Gruppe mit GS ≥ 7 Karzinomen lag die Rate lediglich bei 24% ($p=0.048$).

Bezüglich des PSA-Wertes wiesen die Patienten mit einem PSA-Wert im Niedrigrisikobereich (< 10 ng/ml) im Vergleich zur Hochrisikogruppe (> 20 ng/ml) seltener

einen KM-Befall auf (25 vs. 33%). Der Unterschied zwischen beiden Häufigkeiten erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0.22$).

In einer weitergehenden Analyse wurde die Intensität des Knochenmarkbefalls auf eine mögliche Korrelation mit dem cT-Stadium, dem Malignitätsgrad und dem PSA-Wert hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt:

	CK-positive Zellen / 2×10^6 KM-Zellen	
	Median	Mittelwert
cT Stadium		
T1	1	1,76
T2	3	3,37
T1+2	2	2,71
T3	2	3,91
Malignitätsgrad		
GS < 7	2	2,89
GS \geq 7	2	3,04
PSA (ng/ml)		
< 10	2	3,5
10-20	3	3,64
>20	2	3,51

Tabelle 17: Intensität/Dichte der Knochenmarkbesiedelung mit Tumorzellen im Verhältnis zum cT-Stadium, Malignitätsgrad und initialem PSA-Wert des Tumors

Keine Korrelation fand sich zwischen der Intensität des KM-Befalls (Anzahl Tumorzellen im KM/Patient) und dem cT-Stadium, dem Malignitätsgrad oder dem initialen PSA-Wert.

In Anlehnung an *Partin et al. 1997* erfolgte eine weitere Unterteilung der Patienten durch Kombination von cT-Stadium, Malignitätsgrad und PSA-Wert in eine Niedrigrisiko- (cT1-2, GS < 7, PSA < 10 ng/ml) und eine Hochrisikogruppe (cT-Stadium > 2, GS \geq 7, PSA \geq 20 ng/ml). In der folgenden Tabelle 18 wurden Häu-

figkeit und Intensität des Knochenmarkbefalles diesen Risikogruppen gegenübergestellt.

Prognosefaktoren	n	KM positiv		Intensität KM-Befall		
		%	p^*	Mittelwert	Median	p^{**}
Günstig	49	14	0.14	3,2	2	0.58
Ungünstig	61	26		3,9	2	

Tab. 18: Gegenüberstellung von Häufigkeit und Intensität des Knochenmarkbefalles bei niedrig und Hochrisikopatienten. * Fishers Exact Test, ** unpaired t test

Obwohl bei den Patienten mit ungünstigen Prognosefaktoren der Knochenmarkbefall häufiger (26% vs. 14%) und intensiver (im Mittel 3,9 vs. 3,2 Zellen) als bei den Patienten mit günstigen Prognoseparametern ausfiel, sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p = 0,14$, bzw. $p = 0,58$).

3.1.4. Diskussion:

Die hier vorgelegten Daten zur Tumorzellbesiedelung des Knochenmarkes wurden an der bisher größten veröffentlichten Patientenserie erhoben. Zusammengefasst fanden sich die folgenden Ergebnisse:

1. 28,4% der Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom wiesen CK-positive Zellen im Knochenmark auf, die als disseminierte Tumoreinzellen gedeutet wurden.
2. Von den etablierten Prognosefaktoren T-Stadium, Malignitätsgrad und PSA-Wert korrelierte in der getrennten Analyse der Faktoren lediglich das Tumorstadium positiv mit der Häufigkeit des KM-Befalls. Nach Kombination aller drei Faktoren und Unterteilung in solche mit Niedrig- und Hochrisikoprofil fand sich kein Unterschied im KM-Befall zwischen beiden Gruppen. Auch für das Ausmaß des Knochenmarkbefalls fand sich keine Korrelation mit den genannten Risikofaktoren. Somit ist davon auszugehen, dass die KM-Besiedlung weitgehend unabhängig von den drei Prognosefaktoren stattfindet.

3.1.4.1. Zur Häufigkeit des Knochenmarkbefalls:

In der nachfolgenden Tabelle 19 werden Angaben zur Häufigkeit des immunhistochemisch nachgewiesenen occulteren KM-Befalls aus der Literatur zusammengestellt.

Autor	n	KM +	
		n	%
Ipse	327	93	28
Weckermann et al. 1999	219	53	24
Melchior et al. 1997	48	5	10
Oberneder et al. 1994	84	28	33
Mansi et al. 1988	15	2	13
Bretton et al. 1994	9	2	22
Summe	702	199	28,3

Tab. 19: Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit disseminierten Tumorzellen festgestellt durch Immunhistochemie bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom.

Wie ersichtlich schwankt die Nachweisrate okkulter disseminierter Tumorzellen zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen erheblich (10 - 33%). Das mag z. T. auf die zahlenmäßig, aber auch bezüglich der klinischen Parameter sehr unterschiedlich zusammengesetzten Patientenkollektive zurückzuführen sein. Zum anderen sind die Unterschiede jedoch sicherlich auch durch die angewandte Untersuchungstechnik zu erklären. So wurden die eigenen, sowie die Patienten von *Oberneder et al. 1994* und auch die von *Weckermann et al. 1999*, die zusammen mit 630 der 702 aufgelisteten Fälle, die große Mehrheit bilden, mit der gleichen immunhistologischen Technik und dem gleichen monoklonalen Antikörper gegen Cytokeratin 18 untersucht. In dieser Gruppe fiel die Schwankungsbreite der Ergebnisse ganz wesentlich geringer aus – sie erstreckte sich zwischen 24 und 33%. Abgesehen von der Verwendung anderer monoklonaler Antikörper (CAM, AE/1, AE/3 und Keratin 8/18/19) wertete die Arbeitsgruppe *Melchior et al. 1997* nur solche Zellen als positiv, die auch morphologisch maligne erschienen. Das könnte die geringe immunhistochemische Ausbeute im Krankengut dieser Autoren erklären. Von Pathologen wurde immer wieder bemerkt es sei wünschenswert

zytomorphologische Kriterien in die Beurteilung einzubeziehen. Dem muß allerdings entgegengehalten werden, dass auch schon initiale und sehr hoch differenzierte Karzinome streuen können (wie auch die vorliegende Arbeit zeigt). Hier sind zytomorphologische Kriterien als diagnostische Parameter weitgehend ungeeignet.

Dass die verwendete Untersuchungsmethode ganz erheblichen Einfluss auf die Nachweisrate disseminierter Tumorzellen im Knochenmark hat, geht auch aus der nachfolgenden Tabelle 20 hervor. Hier werden die Ergebnisse nach molekularer KM-Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) dargestellt.

Autor	n	KM +	
		n	%
Wood et al. 1994	43	19	44%
Melchior et al. 1997	85	54	64%
Gao et al. 1999	116	51	44%
Corey et al. 1997	63	45	71%
Cher et al. 1999	204	47	23%
Bianco et al. 2001	244	78	32%
Summe	755	294	39%

Tab. 20: Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit disseminierten Tumorzellen festgestellt durch PSA RT-PCR bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom

Es zeigt sich, dass mittels PSA RT-PCR häufiger Tumorzellen im Knochenmark festgestellt werden können, als mit immunhistochemischen Untersuchungsmethoden. Dies wird auch durch Studien bestätigt, die vergleichende Knochenmarkuntersuchungen mittels PSA-Immunhistochemie und PSA RT-PCR durchgeführt haben. Bei *Wood et al. 1994* lag die Positivrate bei 79% vs. 100% ($p=0.02$), bei *Melchior et al. 1997* zeigte sich ebenfalls in der PCR-Untersuchung eine deutlich höhere Nachweisrate (62% vs. 10%, $p < 0.0001$).

Deutlich ersichtlich ist allerdings auch die erhebliche Schwankungsbreite der Nachweisrate der molekularen Diagnostik (23% - 100%). Den Einfluß des verwendeten Primers auf die Nachweisrate macht Tabelle 21 deutlich.

Autor	HK2*-RT-PCR		PSA-RT-PCR		PMSA-RT-PCR**		p
	N	Tu+	N	Tu +	N	Tu+	
Cama et al. 1995	-	-	100	43%	100	29%	0.0551*
Corey et al. 1997	76	16%	76	24%	-	-	0.3082*
Israeli et al. 1995	-	-	30	7%	30	63%	< 0.0001*
Millon et al. 1999	-	-	127	18%	103	81%	< 0.0001*
Grasso et al. 1998	-	-	136	17%	136	46%	< 0.0001*
Zhang et al. 1997	-	-	48	13%	48	23%	0.2848*
Summe	76	16%	517	22%	417	49%	< 0.0001**

Tabelle 21: RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Venenblut: Abhängigkeit der Nachweisrate vom verwendeten Primer. *human glandular kallikrein, **Prostata Spezifisches Membran Antigen *Fisher`s Exact Test, ** Chi Quadrat Test

Wie ersichtlich variiert die Nachweisrate abhängig vom verwendeten Primer vielfach erheblich. *Israeli et al. 1995* bspw. erreichten mittels PSA-RT-PCR eine Nachweisrate von 7%. Die Untersuchung der gleichen Blutproben mittels PSMA-RT-PCR hingegen erbrachte eine Rate von 63%.

Im Knochenmark fielen die Ergebnisse ähnlich aus. So untersuchten *Corey et al. 1997* die KM-Proben von 63 Patienten zunächst mittels HK2-RT-PCR. Hierbei ergab sich eine Nachweisrate okkult disseminierter Tumorzellen von 41%. Die Untersuchung der gleichen Proben mittels PSA-RT-PCR hingegen ergab eine Nachweisrate von 71%.

Die große Varianz der Ergebnisse ist neben der unterschiedlichen Sensitivität der Fahndungsmethoden sicherlich auch darauf zurück zu führen, dass nicht alle disseminierten Tumorzellen alle Fahndungsmerkmale besitzen. So ist beispielsweise bekannt, dass die PSA-Expression der Tumorzellen sehr unterschiedlich ausgeprägt ist und bei desdifferenzierten Zellen gänzlich verloren gehen kann. Die Arbeitsgruppe *Mueller et al. 1998* konnte beispielsweise nur bei 12 % ihrer Knochenmarkpräparate mit Cytokeratin positiven Zellen auch eine PSA-Positivität feststellen.

Die unterschiedliche Sensitivitäten der verschiedenen Untersuchungsmethoden legt wiederum die Vermutung nahe, dass die Kombination verschiedener Tests die Detektionsrate (Praevalenz) erhöhen könnte. Die zur Beantwortung dieser

Frage vorliegenden Ergebnisse sind sehr spärlich, weisen aber in eben diese Richtung. So untersuchten *Corey et al. 1997* das Knochenmark von 63 Patienten mittels hK2 und PSA RT-PCR. Während die Einzeluntersuchung Tumorzellen bei 41 bzw 71 % feststellte, ergab die Kombination beider Methoden eine Nachweisrate von 83%. Auch im Blut gibt es hierfür Hinweise. Die entsprechenden Daten wurden in der nachfolgenden Tabelle 22 zusammengestellt.

Autor	n	Primer 1	Nachweisrate	Primer 2	Nachweisrate	Nachweisrate kombiniert
Corey et al. 1997	76	HK2	12%	PSA	19%	25%
Israeli et al. 1995	30	PSA	7%	PSMA	63%	63%
Grasso et al. 1998	136	PSA	17%	PSMA	46%	51%
Zhang et al. 1997	48	PSA	13%	PSMA	23%	29%
Thomas et al. 2002	141	PSA	8%	PSMA	44%	52 %

Tab.22: Nachweisrate von Tumorzellen im Blut bei Anwendung eines einzelnen vs. der Nachweisrate nach kombinierter Anwendung von 2 verschiedenen Primern.

Es kann kein Zweifel sein, dass die Besiedlung des Knochenmarks mit Tumorzellen auf hämatogenem Weg erfolgen muss. Leider liegen nur sehr wenige Studien vor, die die Häufigkeit von disseminierten Tumorzellen in Blut und Knochenmark direkt miteinander vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 dargestellt.

Autor	n	Untersuchungsmethode	Nachweisrate Blut	Nachweisrate KM
Melchior et al. 1997	71	PSA RT-PCR	20%	62%
Corey et al. 1997	63	PSA RT-PCR	19%	71%
Corey et al. 1997	63	Hk2 RT-PCR	12%	41%

Tabelle 23: Häufigkeit von disseminierten Tumorzellen im Blut im Vergleich zur gleichzeitig bestimmten Häufigkeit im Knochenmark

Wie ersichtlich, scheint der Tumorzellbefund im Knochenmark erheblich häufiger als im Blut zu sein. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Tumorzellen im Blut durch Zerstörung dortselbst oder Verlassen der Blutbahn, rasch und spurlos verschwinden, dahingegen im Knochenmark nach jeder Einschwemmung mehr

oder weniger längere Zeit überdauern. Der im Vergleich zum Knochenmark deutlich seltenere Tumorzellfund im Blut wäre dann nicht auf unterschiedliche Kontaminations- oder Befallhäufigkeiten, sondern auf andere Überlebenschancen der Zellen hier im Vergleich zum KM zurückzuführen. In der Vergangenheit wurde auch gelegentlich die Ansicht vertreten Blut und Knochenmarkuntersuchung auf Tumorzellen seien gleichwertig, denn die aus dem Knochen entnommenen Proben bestünden vornehmlich aus venösem Blut. Somit wäre die aufwendigere und für den Patienten lästigere Knochenmarkentnahme überflüssig. Davon kann aber angesichts der in Tabelle 23 aufgeführten Ergebnisse keine Rede sein. Mit der Untersuchung des Knochenmarkes kann man wahrscheinlich auch in der Vergangenheit stattgehabte und im Blut nicht mehr nachweisbare Tumorzelldisseminationen nachträglich feststellen.

Zusammenfassend geht aus den eigenen Untersuchungen und den Literaturangaben hervor:

- Bei Patienten mit klinisch noch lokal begrenzten Prostatakarzinomen können relativ häufig bereits Tumorzellaussaaten im Knochenmark festgestellt werden.
- Die Häufigkeit ist in hohem Maße abhängig von der eingesetzten Untersuchungsmethode, wobei die molekularbiologischen Untersuchungen (u.a. die PSA RT-PCR) deutlich empfindlicher sind als die Immunhistochemischen.
- Unabhängig von der unterschiedlichen Sensitivität der eingesetzten Untersuchungsmethoden, fahnden diese nach unterschiedlichen Zellmerkmalen, die jedoch nicht alle Tumorzellen besitzen oder exprimieren.
- Infolge dessen scheint die kombinierte Untersuchung auf mehrere Zellmerkmale eine Steigerung der Nachweisrate disseminierter Tumorzellen zu ergeben.
- Disseminierte Tumorzellen werden im Knochenmark der Patienten deutlich häufiger angetroffen als im peripheren Venenblut. Das Knochenmark scheint daher ein Spiegel für bereits in der Vergangenheit stattgehabte Tumorzellaussaaten zu sein.

3.1.4.2. Korrelation des Knochenmarkbefalls mit etablierten Risikofaktoren:

3.1.4.2.1. T-Stadium:

In der nachfolgenden Tabelle 24 sind Literaturangaben zur Häufigkeit des KM-Befalls aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Tumorstadium wiedergegeben.

Autor	T1-2		T3		p
	n	KM +	n	Tu-Zellen	
Ipse	132	29 (22%)	195	64 (34%)	0.034
Weckermann et al. 1999	138	39 (28%)	57	10 (18%)	0.15
Melchior et al. 1997	31	3 (10%)	17	2 (12%)	1.00
Mueller et al. 1998	21	8 (38%)	9	5 (56%)	0.45
Oberneder et al. 1994	41	8 (20%)	43	22 (51%)	0.003

Tabelle 24: Vergleich der Häufigkeit von Tumorzellen im Knochenmark (KM) bei verschiedenen T-Stadien (Immunhistochemie)

Hier finden sich zwei überraschende Ergebnisse:

1. Schon bei niedrigem T-Stadium kann es zu einer Tumorzell dissemination kommen.
2. Eine Korrelation des KM-Befalls mit dem Tumorstadium ist nicht eindeutig belegbar.

Alle Untersucher, mit Ausnahme der Arbeitsgruppe von *Weckermann et al. 1999*, stellten bei T3 Tumoren häufiger Tumorzellen im Knochenmark fest, als bei T1-2 Tumoren. Sowohl bei *Oberneder et al. 1994*, als auch in der eigenen Untersuchung war der Unterschied auch statistisch signifikant. Bei den anderen Arbeiten erreichten die Unterschiede jedoch keine Signifikanz. Bei *Weckermann et al. 1999* zeigte das Häufigkeitsverhältnis sogar in die entgegengesetzte Richtung. Somit ist aufgrund der vorliegenden Daten zumindest keine enge Korrelation zwischen Tumorzellbefall des Knochenmarks und dem Tumorstadium abzuleiten. Auch die wenigen Arbeiten zu PCR-basierten Untersuchungen des Knochenmarks zeigen diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse (s. Tabelle 25).

Autor	T1-2		T3		p
	n	KM +	n	KM +	
Wood et al. 1994	44	13 (29%)	42	26 (62%)	0.005
Melchior et al. 1997	43	24 (56%)	26	18 (70%)	0.20
Gao et al. 1999	57	25 (44%)	59	26 (44%)	1.00
Summe	144	62 (43%)	127	71 (56%)	0.04

Tabelle 25: Gegenüberstellung von Häufigkeit des Knochenmarkbefalls und T Stadium (PSA RT-PCR).

Zusammenfassend geht aus den eigenen Untersuchungen und den Literaturangaben hervor:

- Schon in einem sehr frühen Tumorstadium kann es zur Aussaat von Tumorzellen ins Knochenmark kommen.
- Es liegt allenfalls eine schwache positive Korrelation Eine Korrelation zwischen T-Stadium und Knochenmarkbefall vor.
- Die Untersuchung des Knochenmarkes kann somit keinen wesentlichen Beitrag zur Bestimmung des Tumorstadium („Molecular staging“) leisten.

3.1.4.2.2. Malignitätsgrad:

Im eigenen Patientenkollektiv konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Malignitätsgrad des Tumors und der Häufigkeit sowie Intensität der Besiedlung des Knochenmarkes mit Tumorzellen gefunden werden. In der nachfolgenden Tabelle 26 sind die eigenen und Literaturdaten zu diesem Thema zusammengestellt.

Autor	Hoch-mässig diff.		Niedrigdiff.		p
	n	KM+ (%)	n	KM+ (%)	
Gao et al. 1999	68	49%	38	39%	0.42
Wood et al. 1994	20	40%	35	60%	0.17
Oberneder et al. 1994	61	26%	23	52%	0.04
Mansi et al. 1988	18	44%	12	42%	1.00
Ipse	137	34%	190	24%	0.048
Weckermann et al. 1999	171	23%	41	27%	0.68
Summe	471	35%	339	38%	0.42

Tabelle 26: Häufigkeit von Tumorzellen im Knochenmark im Verhältnis zum Differenzierungsgrad des Tumors

Auch in den großen Untersuchungsserien von *Weckermann et al. 1999* und *Gao et al. 1999*, sowie in der kleinen Gruppe von *Mansi et al. 1988* konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad des Primärtumors und Häufigkeit der Markbesiedelung festgestellt werden.

Dennoch wurden hierzu, zumindest an kleineren Serien, auch widersprüchliche Befunde veröffentlicht. Sowohl *Oberneder et al. 1994*, als auch *Wood et al. 1994* fanden einen statistisch signifikant häufigeren Markbefall bei dedifferenzierten Karzinomen ($p=0.002$ bzw 0.02). Die Arbeitsgruppe Wood hat diese Aussage allerdings in einer später erschienen Veröffentlichung revidiert (*Wood und Banerjee 1997*). Eine plausible Erklärung für diese diskrepanten Ergebnisse kann derzeit nicht gegeben werden. Am wahrscheinlichsten spielen die erheblichen Größenunterschiede der Studien hier eine Rolle. Von Bedeutung könnten aber auch die unterschiedliche Art des untersuchten Tumormaterials (Biopsate bzw. Ekto-miepräparate) und die Verwendung unterschiedlicher Graduierungssysteme zur Malignitätsgradbestimmung (Gleason, WHO, Helpap) sein. Hinzu kommt, dass die Grenzen zwischen hoch und mässiggradig, bzw undifferenziert zum Teil unterschiedlich definiert wurden. So wurden Tumoren mit dem Gleasonsummenwert 7 von einigen Autoren zu den mässiggradig differenzierten und von anderen zu den gering differenzierten Tumoren gezählt. Um diese Fehlerquelle zu umgehen, wurde in der folgenden Tabelle 27 aus den eigenen und den zur Verfügung stehenden Literaturdaten die Grenzfälle – also Tumore mit dem Gleasonsummenwert 7 eliminiert und nur die Patienten mit den Gleasonsummenwerten 2-6 den 8-10 bezüglich des Knochenmarkbefalles gegenübergestellt.

Autor	n	Knochenmark positiv		p
		Hochdiff.	Niedrigdiff.	
Ipse	178	37/133=28%	12/45=27%	1.00
Weckermann et al. 1999	127	19/86=22%	11/41=27%	0.66
Gao et al. 1999	69	24/55=44%	6/14=43%	1.00
Summe	374	80/274=29%	29/100=29%	1.00

Tabelle 27: Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit disseminierten Tumoreinzelzellen im Verhältnis zum Differenzierungsgrad des Tumors nach Elimination der G7 bzw. G2b Fälle

Wie man sieht, wurde bei den hier als hoch und niedrigdifferenziert bezeichneten Tumoren mit gleicher Häufigkeit ein Knochenmarkbefall beobachtet.

Zusammenfassend geht aus den eigenen Untersuchungen und den Literaturangaben hervor:

- Die zu diesem Thema vorliegenden Untersuchungsergebnisse sind widersprüchlich.
- Die deutlich überwiegende Zahl der Befunde spricht jedoch gegen einen Zusammenhang von Differenzierungsgrad des Primärtumors einerseits, sowie Häufigkeit und Intensität/Dichte des Knochenmarkbefalles andererseits.

3.1.4.2.3. PSA:

Im eigenen Patientenkollektiv fanden sich bei einem initialen PSA über 20 ng/ml häufiger (33%) Tumorzellen im Knochenmark, als bei Werten unter 10 ng/ml. Hier lag die Prävalenz bei nur 25%. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Auch bezüglich der Intensität/Dichte der Besiedelung fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PSA Gruppen.

Gleiches wird auch durch die große Untersuchung von *Weckermann et al. 1999*, als auch durch kleinere Serien (*Melchior et al. 1997*; *Oberneder et al. 1994*; *Gao et al. 1999*; *Mueller et al. 1998*) bestätigt. Lediglich *Wood et al. 1994* fanden in einer Serie von 86 Patienten einen direkten, mit $p=0.001$ statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den PSA Werten und der Prävalenz von Tumorzellen. Somit geht aus den eigenen Untersuchungen und den Literaturangaben hervor:

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Serum PSA-Wert und der Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit Tumorzellen konnte in den weitaus meisten und größten Studien nicht festgestellt werden. Nur die Befunde der Arbeitsgruppe von *Wood et al. 1994* widersprechen dem.

3.1.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die vorliegenden eigenen Untersuchungsergebnisse sowie die zitierten und kommentierten Veröffentlichungen aus der Literatur zeigen, dass Prostatakarzinome schon in einem sehr frühen Entwicklungsstadium Tumorzellen über die Blutbahnen ausstreuen. Auf diesem Wege gelangen sie auch in das Knochenmark. Die Tatsache, dass Tumorzellen im Knochenmark wesentlich häufiger als im Blut angetroffen werden, spricht dafür, daß das medulläre Milieu einerseits die besseren Siedlungschancen bietet und andererseits auch als Spiegel für bereits stattgehabte hämatogene Streuungen anzusehen ist. Somit scheint der Untersuchung des Knochenmarkes eine wesentliche Rolle in der weiteren Metastasierungsforschung zuzukommen, die nicht durch die alleinige Untersuchung des peripheren Venenblutes ersetzt werden kann.

Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Häufigkeit des Knochenmarkbefalles bei Patienten mit klinisch noch lokalisiertem Prostatakarzinom schwanken ganz erheblich (10% - 81%). Sie sind in hohem Maße abhängig von der angewandten Untersuchungsmethode. So ergibt die PSA RT-PCR etwa doppelt so häufig einen Befall wie immunhistochemische Techniken. Durch die Verwendung von Primerkombinationen kann die Nachweisrate weiter gesteigert werden. Das Gleiche gilt auch für wiederholte Untersuchungen (*Ellis et al. 1998*). Es ist daher davon auszugehen, dass es schon sehr frühzeitig bei fast allen Patienten mit Prostatakarzinom zu einer Streuung ins Knochenmark kommt. Unterstützung findet diese Annahme durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (*Solakoglu et al. 2002*). In einer kleinen Gruppe von 46 Prostatakarzinompatienten fanden sich zunächst nur bei 11 Patienten (24%) CK-positiven Zellen im Knochenmark. Nach Kultur des Punktates konnten sie jedoch bei nahezu allen Patienten (93,5%) festgestellt werden.

Neben der Feststellung einer im Verlauf der Erkrankung überraschend frühzeitigen Tumorzell dissemination fand sich als weiterer überraschender Befund, dass die

Dissemination im weiteren Verlauf der Erkrankung sowohl in Häufigkeit, als auch Intensität weitgehend konstant blieb. Es fand sich nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg an Tumorzelldisseminaten bei Tumorprogression (Zunahme des Tumorstadium, der PSA Werte und der Desdifferenzierung). Dies zeigt zunächst einmal, dass die Untersuchung des Knochenmarkes keinen wesentlichen Beitrag zur Stadiumbestimmung erbringen kann. Es ist zudem ein weiterer Hinweis dafür, dass es wie im Blut, auch im Knochenmark Mechanismen zur Beseitigung gestreuter Tumorzellen gibt. Diese müssen zwar so effektiv sein, dass Häufigkeit und Intensität des Knochenmarkbefalls über weite Wegstrecken der Tumorentwicklung nicht kumulieren, sie reichen aber augenscheinlich nicht aus den Befall rückgängig zu machen oder gänzlich zu beseitigen, solange der Primärtumor als Streuquelle persistiert.

3.2. Das Verhalten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom unter endokriner Vorbehandlung

3.2.1. Einleitung:

Wie bereits erwähnt, wurde schon beginnend in den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts versucht die Ergebnisse lokalthérapeutischer Maßnahmen durch endokrine Vorbehandlung zu verbessern. Dabei hatte man schon immer die Hoffnung die Induktion würde sich, neben den Auswirkungen auf den Primärtumor, auch günstig auf eine gegebenenfalls schon stattgehabte, jedoch klinisch noch nicht nachweisbare Mikrometastasierung auswirken.

Während der Vergleich der Schnittrandbefunde von vorbehandelten mit virginell operierten Prostatakarzinomen seit geraumer Zeit den Nachweis lokaler Wirksamkeit der neoadjuvanten endokrinen Therapie erbrachte, steht dieser für den systemischen Aspekt, eben die Mikrometastasierung noch aus. Das liegt vorrangig an der Tatsache, dass bislang kein Messwert verfügbar ist, an dem die systemische Wirkung der Vorbehandlung erkennbar wäre.

Die Untersuchung des Knochenmarkes vor und nach endokriner Induktion könnte helfen diese Lücke zu schließen. Zwar sind disseminierte Tumoreinzellen im Knochenmark nicht mit Mikrometastasierung gleichzusetzen. Davon wird man erst sprechen können wenn sie auch proliferieren und Gefäßanschluss gefunden haben. Dennoch sind disseminierte Tumoreinzellen ohne Zweifel eine unabdingbare Voraussetzung für die Entstehung von Mikro- und Makrometastasen. Die frühzeitige Elimination von Tumoreinzellen würde daher einen logischen Behandlungsansatz in der Pathogenese des Metastasierungsprozesses darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob die PPNET, als bislang effektivste Form der endokrinen Vorbehandlung, hierzu einen Beitrag leisten kann.

3.2.2. Patienten und Methoden:

Bei insgesamt 204 Patienten mit virginellem Prostatakarzinom im Stadium cT1-3N0M0 erfolgte im Rahmen der initialen Diagnostik, nach gründlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis, die Entnahme von Knochenmark in Lokalanästhesie (Methodik s. Kapitel 3.1.2.). Nach endokriner Induktion bis zum Erreichen

des PSA-Nadirs (PPNET) wurden die Patienten radikal prostatektomiert. Intraoperativ wurde bei allen Patienten eine erneute Knochenmarkpunktion vorgenommen. Die Aufarbeitung der KM-Aspirate erfolgte entsprechend der im Kapitel 3.1.2 beschriebenen Methodik.

3.2.3. Ergebnisse:

Vor PPNET fand sich bei 37% der Patienten (75/204) ein positiver KM-Befund. In den KM-Verlaufsuntersuchungen nach Abschluß der PPNET war die Nachweisrate mit 22,5% (46/204) signifikant niedriger ($p=0.0023$, Tab. 28).

Betrachtet man nur die Gruppe der initial KM positiven Patienten (n=75) fand sich eine noch deutliche höhere Negativkonversionsrate: 59 der 75 Patienten (79%) wiesen nach Abschluß der PPNET keine Tumorzellen mehr im KM auf.

Demgegenüber steht allerdings eine Positivkonversionsrate von 23%: 30 der 129 initial KM negativen Patienten wiesen nach Abschluß der PPNET disseminierte Tumoreinzelzellen im KM auf.

	Negativ		Positiv		<i>p</i>
	n	%	n	%	
KM vor PPNET	129	63	75	37	0.0023
KM nach PPNET	158	77,5	46	22,5	

Tabelle 28: Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit disseminierten Tumorzellen vor und nach endokriner Behandlung (PPNET-Schema).

Neben den Gesamtkonversionsraten wurde ein möglicher Einfluß des Malignitätsgrades auf die Konversionsraten untersucht.

Von den 75 Patienten mit positivem KM-Punktat vor PPNET hatten je 35 Patienten ein hoch- bis mäßiggradig differenziertes ($GS \leq 6$) bzw. ein niedrig differenziertes Karzinom ($GS \geq 7$). Von 5 der 75 Patienten fehlen diesbezügliche Daten.

Nach Beendigung der endokrinen Vorbehandlung waren die Tumorzellen bei 28 (80%) der 35 Patienten mit desdifferenzierten und bei 27 (77%) der Patienten mit differenzierten Karzinomen nicht mehr nachweisbar ($p=1.0$; Fisher exact test).

Signifikante Unterschiede in der Negativkonversionsrate fanden sich somit nicht.

Die Disseminate desdifferenzierter Tumoren verschwanden fast genauso häufig, wie die differenzierter Karzinome.

Von den 30 Patienten mit initial negativem KM und Neubesiedelung desselben (Positivkonversion) nach PPNET wiesen je 15 Patienten einen hoch- bis mäßiggradig differenzierten Tumor ($GS \leq 6$) bzw. einen niedrig differenzierten Tumor ($GS \geq 7$) auf. Demzufolge scheint der Malignitätsgrad auch keinen Einfluss auf die Neubesiedelung des Knochenmarkes zu haben.

3.2.4. Diskussion:

Die hier vorgelegten Daten zur Tumorzellbesiedelung des Knochenmarkes vor und nach endokriner Induktion wurden anhand der bislang größten Patientenserie erhoben. Desweiteren ist es die erste Untersuchung, die über die entsprechenden Ergebnisse nach PPNET berichtet.

Die Analyse der Daten ergab:

1. Im Gesamtkollektiv der untersuchten Patienten kam es nach PPNET zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Reduktion der Knochenmarkbesiedelung (37 auf 23%; $p=0.0023$). Noch deutlicher fiel die Negativkonversionsrate bei Patienten mit initialem KM-Befall aus. Bei 79% dieser Patienten konnten nach PPNET keine Tumorzellen im KM mehr nachgewiesen werden.
2. Von 129 Patienten mit initial als tumorzellfrei befundetem Knochenmark wiesen aber 30 (23 %) nach PPNET einen Tumorzellbefall des KM auf.
3. Die initiale KM-Besiedelung mit Tumorzellen ist unabhängig vom Malignitätsgrad des Primärtumors
4. Sowohl die Negativ- als auch die Positivkonversionsrate des KM nach PPNET ist unabhängig vom Malignitätsgrad des Primärtumors.

Zu 1.: Dass es im Gefolge von PPNET zu einem deutlichen und statistisch signifikanten Abfall des Knochenmarkbefalls mit disseminierten Tumorzellen kommt, konnten schon vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an einer kleinen Serie von 21 Patienten vor und nach Induktion zeigen (*Pantel et al. 1997*).

In die gleiche Richtung deuten Ergebnisse von *Cher et al. 1999*. Die Autoren fanden bei endokrin vorbehandelten Patienten signifikant weniger cytokeratinpositive

Zellen im Knochenmark als bei Patienten mit unvorbehandelten Prostatakarzinomen (0,4 vs 0,9/10⁵ Knochenmarkzellen; p=0.01). Bestätigung fanden die Ergebnisse auch durch *Wood et al. 1998*. Die Autoren untersuchten Knochenmarkspunktate von 29 Prostatektomiepatienten ohne Vorbehandlung und 31 Patienten nach endokriner Induktion mittels PSA-RT-PCR. Von den Unvorbehandelten hatten 63 % ein befallenes Knochenmark. Von den endokrin Vortherapierten waren es nur 35% (p=0.004). Folgende Kritikpunkte an dieser Studie sind allerdings zu berücksichtigen: a) Die Fallzahlen sind sehr klein. b) Die Patienten wurden nicht randomisiert. c) Die PSA Expression könnte sich unter der endokrinen Behandlung verändern und daher die Ergebnisse der PSA-RT-PCR beeinträchtigen. Die genannten Schwachpunkte gelten nicht für die vorgestellte eigene Untersuchung. Es wurde eine deutlich größeren Fallzahl untersucht. Die eingesetzte Untersuchungsmethode (Cytokeratin-Immunzytologie) ist in ihrer Sensitivität unabhängig von der hormonellen Vorbehandlung. Dies stützt zusätzlich die Validität der eigenen Ergebnisse. Als Manko muss jedoch das Fehlen einer unvorbehandelten Vergleichsgruppe angesehen werden.

Neben der Untersuchung des Knochenmarkes sprechen auch die spärlichen, zum Thema vorliegenden Blutuntersuchungen für eine auf die Tumorzell dissemination hemmende Wirkung der hormonellen Therapie. Die Angaben hierzu wurden in der folgenden Tabelle 29 aufgeführt.

Autor	Primer	Prä NHT		Post NHT	
		n gesamt	Blut +	n gesamt	Blut +
Ogawa et al. 1999	PSA	13	69%	10	20%
Su et al. 1997	PSMA	21	38%	17	12%
Ellis et al. 1998	PSA	4	75%	53	32%
Summe		38	54%	80	26%

Tabelle 29: Tumorzellen im Blut ohne und unter bzw. nach endokriner Vorbehandlung (RT-PCR)

Zu 2: Bei einem nicht unerheblichen Anteil der Patienten (23%) mit initial negativem Knochenmark konnten im Gefolge der endokrinen Vorbehandlung Tumorzellen im KM nachgewiesen werden. Diesbezügliche Daten anderer Autoren liegen bislang nicht vor.

Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise in der vergleichsweise geringen Sensitivität der verwendeten immunzytologischen Untersuchungsmethode zu sehen. So wiesen 53% der Patienten mit Positivkonversion des KM lediglich 1 Tumorzelle pro 2×10^6 kernhaltigen Zellen auf. Hier liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise bereits vor der endokrinen Behandlung eine Tumorzellbesiedlung des KM gleicher Größenordnung vorlag, diese jedoch nicht erkannt wurde.

Die vorangehende Erklärung erscheint jedoch weniger plausibel für die andere Hälfte der Patienten mit ausgeprägterem postinduktivem KM-Befall. Zur Wertung der postinduktiven KM-Befunde mag die folgende theoretische Überlegung hilfreich sein:

Bei vorhandenem Primärtumor ist von einer mehr oder weniger kontinuierlich stattfindenden Tumorzellstreuung in das KM auszugehen. Demgegenüber steht die Selbstreinigungskapazität desselben. Die Tatsache, dass es im Gefolge der endokrinen Vorbehandlung (PPNET) bei fast allen Patienten mit initial befallenem Knochenmark zur Beseitigung des Disseminates kam, legt die Vermutung nahe, dass die endokrine Therapie den Beseitigungsmechanismus der Tumorzellen aus dem Knochenmark stärkt. Der Neunachweis disseminierter Tumorzellen im KM nach endokriner Therapie andererseits zeigt, dass bei Persistenz des Primärtumors, trotz der hormonellen Behandlung weiter eine Tumorzellstreuung in das KM stattfinden kann.

Zu 3. und 4.: Wie im vorangehenden Kapitel ausgeführt, führt nicht jedes Knochenmarkdisseminat zur Bildung von Mikro- und konsekutiven Makrometastasen. Eine wesentliche Voraussetzung zur Metastasenbildung ist zweifelsohne das proliferative Potenzial des Tumorzelldisseminats. Die Disseminate dedifferenzierter Tumoren sind daher als weitaus gefährlicher, als solche geringen Malignitätsgrades einzustufen. Bei einer systemischen Vorbehandlung kommt es also vor allem darauf an, dass sie in der Lage ist, die Disseminate niedrig differenzierter Primärtumoren zu beseitigen. Dazu ist die PPNET fraglos in der Lage. Postinduktiv waren Disseminate von 80% der dedifferenzierten Primärtumore nicht mehr nachweisbar.

Es war zu befürchten, dass der postinduktive Nachweis von disseminierten Tumorzellen im KM vor allem auf die Streuung dedifferenzierter Primärtumoren zurückzuführen ist. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass dies nicht der Fall ist.

Mit nahezu gleicher Häufigkeit fanden sich Tumorzelldisseminate sowohl von hoch bis mäßig differenzierten, als auch von niedrig differenzierten Karzinomen.

Somit lässt sich schlussfolgern:

Die PPNET resultiert in einer deutlich gesteigerten Eliminationsrate von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, unabhängig vom Malignitätsgrad des Primärtumors.

Dennoch behält der Primärtumor unter PPNET, ebenfalls unabhängig vom Malignitätsgrad, seine Fähigkeit zur Tumorzelldissemination.

Vorangehend wurden bewusst Veränderungen des postinduktiven KM-Status nicht kausal mit der endokrinen Vorbehandlung verknüpft, sondern lediglich als solche beschrieben. Grund hierfür sind Berichte, die zeigen, dass es auch ohne jegliche Therapie zu einer spontanen Elimination der Tumorzellen aus dem KM kommen kann. So berichteten *Melchior et al. 1997* von 24 Patienten mit positivem KM-Status vor radikaler Prostatektomie. In KM-Kontrollen nach der Operation wiesen nur noch 6 der Patienten (25%) einen positiven KM-Status auf. Angaben zum Malignitätsgrad der Tumoren sind der Veröffentlichung jedoch nicht zu entnehmen.

Bereits aus diesen wenigen Daten kann man schlussfolgern, dass der spontane Eliminationsmechanismus, zumindest nach operativer Entfernung des Streuherdes (Primärtumor), bei vielen Patienten zum Verschwinden der Knochenmarkdisseminate führt. Er hat deshalb auch sicher die eigenen postinduktiven Ergebnisse positiv beeinflusst, wobei der Anteil derzeit noch spekulativ bleiben muss. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Weiterhin wurde das spontane und postinduktive Verschwinden von Tumorzellstreuungen aus dem Knochenmark pauschal auf einen „Eliminationsmechanismus“ zurückgeführt, über den nur sehr wenig bekannt ist. Sicherlich sind an dem Vorgang aber sowohl die gestreute Zelle, als auch das Milieu in die sie eingestreut wurde beteiligt.

Die endokrine Vorbehandlung führt, wie eingangs ausführlich beschrieben, zu mehr oder weniger ausgeprägten Schäden der Prostatakarzinomzellen, die bis hin zum apoptotischen Zelluntergang führen können (*Civantos et al. 1995; Tetu et al. 1991; Montironi et al. 1994; Hellstrom et al. 1993; Smith and Murphy 1994; Helpap and Köllermann 2004; Köllermann 1995*). Es ist deshalb davon auszugehen, dass

sie den erwähnten Eliminationsmechanismus primär durch eben diese Schädigung verstärkt. Sollte dies so sein, werden vermutlich auch die postinduktiven Konversionen vorwiegend aus bereits angegriffenen und mehr oder weniger vital vorgeschädigten Karzinomzellen bestehen, deren Überlebenschancen deshalb wahrscheinlich reduziert sind.

Für das Zustandekommen von Mikrometastasen aus disseminierten Einzelzellen ist neben der proliferativen Aktivität auch ein zeitgerechter Gefäßanschluss (Neoangiogenese) unabdingbar. Androgene fördern und Androgenentzug hemmt die Proliferation des normalen Sekretionsepithels der Prostata (*Isaacs 1984*). Das trifft auch für Prostatakarzinomzellen unter experimentellen (auf der Nacktmaus) (*Kyprianou et al. 1990*) und klinischen Bedingungen inklusive der prolongierten Induktion zu (*Tsuji et al. 1998; Matsushima et al. 1999; Gleave et al. 1996; Paterson et al. 1999*).

Auch die Neoangiogenese steht unter hormonellem Einfluss (*Joseph et al. 1997, Franck-Lissbrant et al. 1998*). Joseph and Isaacs 1997 fanden an auf die Nacktmaus transplantierten humanen Prostatakarzinomen nach Kastration eine deutliche Abnahme (>60%) des *vascular endothelial growth factors* (VEGF), einem der potentesten, hochselektiven Angiogenesefaktoren. Auf der anderen Seite kam es bei den Tieren unter langwährender Androgendeprivation, schon 1 Woche nach Androgensubstitution zu einem 8 fachen Anstieg von VEGF. *Stewart et al. 2001* stellten in Ergänzung dieser Befunde, im Gefolge der Kastration eine deutlich reduzierte und gestörte Neoangiogenese fest. *Ennis et al. 1996* konnten dies auch an Prostatakarzinomen endokrin vorbehandelter Patienten beobachten. Neben der direkt die Neoangiogenese stimulierenden Wirkung lassen eigene Untersuchungen zusätzlich auch einen direkten wachstumsstimulierenden Effekts des VEGF / VEGF-Rezeptors 1-Systems auf Prostatakarzinomzellen annehmen, da der VEGF-Rezeptor 1 nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von Prostatakarzinomzellen selbst exprimiert wird (autokrine Stimulation) (*Köllermann und Helpap 2001*, s. Abb. 14, 15).

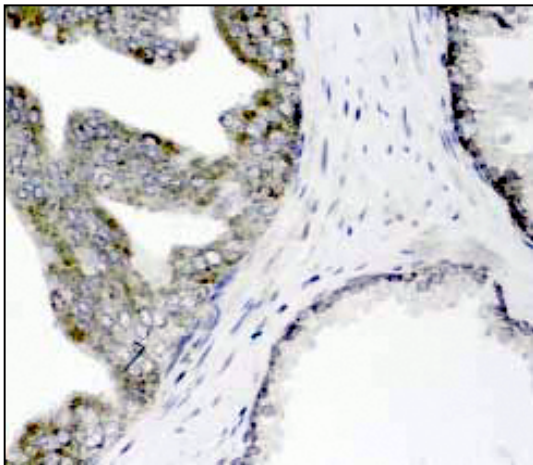


Abb. 14: Linke Bildhälfte: High grade PIN Läsion mit kräftige VEGF-Rezeptor-1-Expression sämtlicher neoplastischer Zellen. Rechte Bildhälfte: angrenzende benignes Drüsenepithel mit ausschließlich auf die Basalzellenlage (proliferatives Zellkompartiment) begrenzte VEGF Rezeptor-1 Expression. Anti VEGF-R1-IHC, ABC Technik.

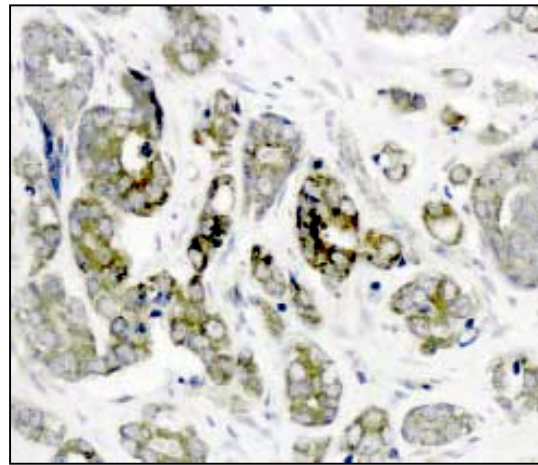


Abb. 15: Gleason score 7 Prostatakarzinom. Kräftige VEGF-Rezeptor-1-Expression. Anti VEGF-R1-IHC, ABC Technik.

Somit scheint die antiandrogene Drosselung der VEGF-Produktion ihre antitumoröse Wirkung sowohl über eine Hemmung der Neoangiogenese, als auch über eine direkte Drosselung der Tumorzellproliferation zu entfalten. Eine hemmende Wirkung auf die Mikrometastasenbildung ist somit anzunehmen.

3.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass es im Gefolge der endokrinen Induktion in Form von PPNET zu einer deutlichen Reduktion einer prätherapeutisch feststellbaren Knochenmarkbesiedelung mit Tumorzellen kommen kann.

Dabei werden gleichermaßen die Disseminate hoch bis mäßiggradig differenzierter sowie dedifferenzierter Tumoren beseitigt. Letzteres erscheint von besonderer Bedeutung, da mit großer Wahrscheinlichkeit nur oder vorwiegend die Disseminate undifferenzierter Tumoren mit ihrem hohen Proliferationspotenzial in der Lage sind die Bildung von Mikrometastasen einzuleiten.

Der nachhaltigen Reduktion präexistenter Streuungen stehen allerdings auch postinduktive Neubesiedelungen (Positivkonversionen) gegenüber. Dennoch bleibt ein statistisch signifikanter reduktiver Nettoeffekt erhalten.

Die Knochenmarkbesiedelung mit Tumoreinzellen ist wohl in erster Linie die Resultante von Tumorzell dissemination und -elimination. Der Faktor Proliferation scheint im hier gewählten Studiendesign keine größere Rolle zu spielen, da im eigenen Patientengut immer nur Einzelzellen und nie Cluster gefunden wurden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich die Vorbehandlung vornehmlich auf die Tumorzellelimination auswirkt. Die Fähigkeit des Primärtumors zur Tumorzell dissemination wird jedoch offensichtlich deutlich weniger beeinträchtigt.

Man wird die Elimination eingestreuter Tumorzellen bei den eigenen Patienten nicht allein auf die endokrine Vorbehandlung zurückführen können, da dieser Prozess auch spontan und ohne therapeutisches Dazutun stattfindet.

Aufgrund der schädigenden Wirkung der PPNET auf den Primärtumor (s. Kapitel 2.1.3.) liegt die Annahme nahe, dass dies im Falle eine KM-Positivkonversion unter Therapie auch für die Disseminate des Tumors zutrifft. Berücksichtigt man ferner den antiproliferativen als auch antineoangiogenetischen Effekt der Therapie, lässt sich ein fehlendes oder zumindest deutlich abgeschwächtes Malignitätspotential dieser Disseminate postulieren. Hierzu stehen derzeit jedoch weitere Untersuchungen noch aus.

4. HÄUFIGKEIT DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IN DEN REGIONALEN LYMPHKNOTEN BEI PATIENTEN MIT KLINISCH LOKALISIERTEM PROSTATAKARZINOM

4.1. UNTERSUCHUNGEN MITTELS HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE

4.1.1. Einleitung

Zum Nachweis von Tumorzellstreuungen in die regionären Lymphknoten von Patienten mit klinisch lokalbegrenztem Prostatakarzinom stehen, wie beim Knochenmark, im wesentlichen zwei Untersuchungsmethoden zur Verfügung: Immunhistochemie (IHC) und auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierte Verfahren.

Angesichts der eigenen Erfahrungen mit der IHC bei der Untersuchung von Knochenmarkproben, wurde diese Technik zunächst auch bei der Untersuchung von regionalen Lymphknoten eingesetzt (*Köllermann et al. 1999*). Dadurch wurde ein direkter Vergleich zwischen Knochenmark und Lymphknoten möglich, über den in der Literatur noch nicht berichtet worden war. Hinzu kommt: Ein prinzipieller Vorteil der IHC gegenüber der PCR liegt darin, dass bei ersterer eine zytomorphologische Beurteilung der identifizierten Einzelzellen bzw. Zellkomplexe möglich ist. Ferner ist die immunhistochemische Untersuchung auch nach Paraffineinbettung des Untersuchungsmaterials ohne größere Schwierigkeiten darstellbar und behindert daher nicht eingefahrene Arbeitsabläufe. Die PCR-Technologie erschien hier zunächst problematischer, da dabei zumeist RNS Primer verwendet werden. Durch die im Rahmen der Paraffineinbettung stattgehabte Formalinfixierung findet eine RNS Degradierung statt, die vielfach die Untersuchung des Material mittels RT-PCR wesentlich erschwert bzw. unmöglich macht.

4.1.2. Patienten und Methoden

Untersucht wurden die in Paraffin eingebetteten, initial als tumorfrei befundeten Lymphknoten sowie die Knochenmarkaspirate von 45 Patienten mit nicht vorbehandelten, klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom (cT1-3). Die Verteilung von

klinischem T-Stadium und Gleason-Grad und initialem PSA-Wert ist in Tabelle 30 dargestellt.

CT-Stadium initial	T1	T2	T3
n (%)	10 (22,2%)	10 (22,2%)	25 (55,6%)
Gleason-Summenwert	2-4	5-6	≥ 7
n (%)	8 (17,8%)	13 (28,9%)	22 (48,9%)
PSA (ng/ml)	< 10	10 – 20	> 20
n (%)	21 (46,7%)	18 (40,0%)	6 (13,3%)

Tabelle 30: Verteilung von klinischem Tumorstadium, Gleasongrading und PSA-Werten von 45 Patienten mit lokal begrenztem virginalen Prostatakarzinom.

Die histologische Routineuntersuchung der Lymphknoten erfolgte am Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Präparat. Sie bestand aus der Untersuchung von 2 Schnitten pro LK aus zwei verschiedenen Schnittebenen und hatte in allen Fällen keinen Tumornachweis (pN₀) erbracht. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung wurden insgesamt 521 Lymphknoten mit im Mittel 14 LK/Patient immunhistochemisch nachuntersucht. Pro Patient wurden im Mittel 28 Schnittpräparate angefertigt. Dazu wurden alle LK enthaltenden Paraffinblöcke seriell in 2 – 3 Schnittebenen aufgearbeitet. Von jeder Schnittebene wurde je ein Präparat für die Cytokeratin- (CK), PSA- und BerEp4 Immunhistochemie angefertigt. Als primärer Marker wurde der monoklonale Cytokeratinbreitspektrumantikörper KL-1 (Immunotech, Marseille, France) verwendet. Nach einer Verdünnung von 1:100 erfolgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und Farbstoffmarkierung mittels der Avidin-Biotin Peroxidase Methode (ABC). Im Falle eines positiven CK-Befundes erfolgte zum sicheren Ausschluß eines falsch-positiven Befundes (Anfärbung interstitieller Reticulumzellen) stets eine Zusatzuntersuchung mit AK gegen Prostata spezifisches Antigen (PSA) und dem monoklonalen AK BerEp4 gegen ein epitheliales Glykoprotein (Dako, Hamburg) an den unmittelbar folgenden Schnittpräparaten der gleichen Schnittebene. Die PSA-Reaktion erfolgte nach AK-Verdünnung auf 1:100 und Inkubation von 60 Min bei Raumtemperatur mittels der ABC-Methode. Die BerEp4 Markierung erfolgte auf identische Weise bei einer Verdünnung von 1:150. Vorab erfolgte eine enzymatische Epitopdemaskierung mittels 15 minütiger Pronasevorbehandlung. Haut und die Lymphknotenmetastasen eines Prostatakarzinoms dienten als Positivkontrollen. Ersatz des primären

Antikörpers durch TRIS-HCL Puffer diene als Negativkontrolle.

Zur Technik der KM-Gewinnung und weiteren Aufarbeitung siehe Kapitel 3.1.2.

4.1.3. Ergebnisse

Aufgrund der möglichen Verwechslung CK markierter Tumoreinzelnzellen mit ebenfalls CK positiven interstitiellen Retikulumzellen wurden lediglich die PSA und/oder BerEp4 positiven LKs als tumorbefallen interpretiert.

Bei 8 der 45 Patienten (18%) fanden sich Tumorzeldisseminate in den Lymphknoten, bei 13 Patienten (29%) war das Knochenmark befallen. Der Häufigkeitsunterschied zwischen den beiden Zielorganen war aber statistisch nicht signifikant ($p=0.31$). Insgesamt fanden sich bei 17 der 45 Patienten (38%) in den Lymphknoten und/oder dem Knochenmark disseminierte Tumorzellen. Bei nur 3 Patienten waren beide Zielorgane gleichzeitig befallen.

Die CK-, PSA- und BerEp4-positiven Zellen stellten sich stets als Einzelzellen dar (Abb. 16). Lediglich in 3 Fällen fanden sich zusätzlich kleinste Zellcluster in den Lymphknoten (Abb. 17). Bezüglich der intranodalen Lage der markierten Zellen ließ sich die Mehrzahl in den Randsinus lokalisieren, seltener in den corticalen und paracorticalen Regionen. In keinem Fall fanden sich markierte Zellen in der Medulla oder den Follikeln. In 3 Fällen konnten Zellen zusätzlich im sinusoidalen System und in postkapillären Venolen lokalisiert werden. Somit erfolgte die Dissemination in die Lymphknoten wahrscheinlich vorwiegend auf lymphogenem Wege. Nur in 3 Fällen schien die Besiedlung zusätzlich auf hämatogenem Wege zustande gekommen zu sein. Nur in 2 Fällen wiesen die Zellen zytomorphologische Malignitätszeichen auf. Einige der CK-positiven Zellen ähnelten interstitiellen Retikulumzellen, was bei den BerEp4 und PSA-positiven Zellen nicht der Fall war. In den immunhistochemisch positiven Fällen waren jeweils nur einzelne, nie alle rezezierten LKs des jeweiligen Patienten betroffen.

Wie in den Lymphknoten fanden sich auch im Knochenmark vorwiegend Einzelstreuungen. Lediglich bei einem einzigen Patienten konnte auch ein Tumorzellcluster festgestellt werden.

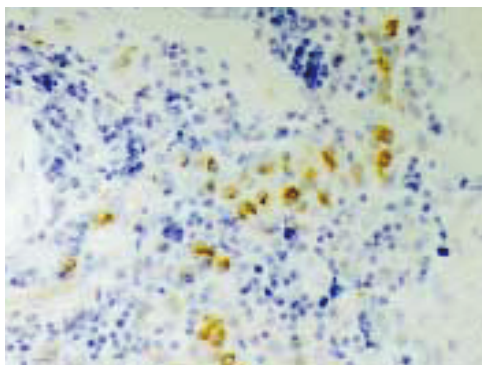


Abb. 16: Cytokeratin-positive Einzelzellen in einem initial als tumorfrei befundenen Lymphknoten. CK-Antikörper KL-1, ABC-Methode.

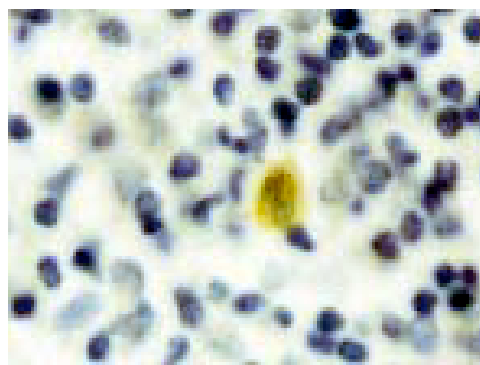


Abb. 17: PSA-positiver Zellcluster in einem initial als tumorfrei befundenen Lymphknoten. ABC-Methode.

Die Zahl der CK positiven Disseminate im Knochenmark schwankte zwischen 1 und 37 pro 2×10^6 kernhaltigen Zellen.

Der Nachweis disseminierter okkultes Tu-Zellen in LK und/oder KM korrelierte nicht mit den üblichen, prognostisch relevanten Risikofaktoren wie cT-Stadium, Malignitätsgrad und initialem PSA-Wert. Wie in Tabelle 31 dargestellt, fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieser Parameter zwischen der Patientengruppe mit nachgewiesenen disseminierten Tu-Einzelzellen im Vergleich zu IHC negativen Patienten. Auch die gesonderte Analyse der LK positiven Patienten ohne Berücksichtigung des KM Befundes ergibt im Vergleich zur IHC negativen Patientengruppe keine Unterschiede bezüglich der 3 Parameter.

	IHC positiv (LK und/oder KM)		IHC positiv LK		IHC negativ	
	n	%	n	%	n	%
≤ cT2	7/18	38,9	4/8	50,0	12/26	53,8
cT3	11/18	61,1	4/8	50,0	14/26	46,2
GS ≤ 6	8/18	44,4	4/8	50,0	12/26	46,2
GS ≥ 7	10/18	55,6	4/8	50,0	14/26	53,8
PSA < 10	9/18	50,0	3/8	37,5	11/26	42,3
PSA ≥ 10	9/18	50,0	5/8	62,5	15/26	57,7

Tabelle 31: Häufigkeit von Tumoreinzelzellen aufgedgliedert nach den Risikofaktoren cT-Stadium, Gleason-Summenwert (GS) und initialem PSA-Wert.

Auch nach Kombination der Faktoren in je eine prognostisch günstige und eine ungünstige Gruppe (günstige Gruppe: \leq cT2, GS \leq 6, PSA $<$ 10 vs. ungünstige Gruppe: cT3, GS \geq 7, PSA \geq 10) fand sich kein Unterschied in der Häufigkeit des Nachweises disseminierter Tumorzellen. In der Gruppe mit günstigem Risikoprofil wies 25% der Patienten disseminierte Tumorzellen auf. Bei den Patienten mit ungünstiger Risikofaktorkonstellation betrug die Rate mit 2/8 Patienten ebenfalls 25%.

4.1.4. Diskussion

Die vorgelegte Untersuchung zum histochemischen Nachweis von disseminierten Tumoreinzelzellen in Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit unvorbehandeltem, klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom ergab:

1. Tumorzellen konnten bei insgesamt 38 % (17 von 45) der Patienten in den Lymphknoten und/oder im Knochenmark identifiziert werden. Ein Lymphknotenbefall (mit oder ohne gleichzeitigen Knochenmarkbefall) fand sich bei 8 Patienten (18%).
2. Das Knochenmark war häufiger befallen als die Lymphknoten (28 vs. 18%). Der Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($p=0.31$)
3. Ein gleichzeitiger Befall von Lymphknoten und Knochenmark ließ sich nur bei 3 der 45 Patienten (7%) erkennen.
4. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Tumorzellbefall der Lymphknoten und/oder des Knochenmarkes und den klassischen prognoserelevanten Faktoren festgestellt werden.

4.1.4.1. Häufigkeit des occulteren LK-Befalls:

Obwohl die hier untersuchte Patientengruppe klein ist, zeigt sich erwartungsgemäß, dass die gleichzeitige Untersuchung von regionalen Lymphknoten und Knochenmark eine insgesamt größere Befallhäufigkeit (38%) ergibt, als die eines jeden der beiden Zielorgane für sich genommen (18 bzw 28%).

Die generelle Eignung des Breitspektrum CK Ak KL-1 zum Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen in LKs wurde bereits beim Mammakarzinom ge-

zeigt (Trojani et al. 1987). Während allerdings im KM der Nachweis CK positiver Einzelzellen als spezifischer Nachweis von epithelialen Tumorzellen gelten kann (Pantel et al. 1994), gilt dies nur begrenzt für die LKs. Differentialdiagnostisch müssen hier die auch in tumorfreien LKs nachweisbaren CK positiven interstitiellen Retikulumzellen abgegrenzt werden (Gould et al. 1995). In den untersuchten Lymphknoten wurden daher nur die BerEp4 und oder PSA exprimierende Zellen als tumorös gewertet. Der mAK BerEp4 reagiert (im Gegensatz zum mAK gegen Cytokeratin KL-1) ausschließlich mit Zellen epithelialen Ursprungs (Latza et al. 1990) und die PSA Expression beschränkt die Ursprungsquelle im wesentlichen auf die Prostata.

In der nachfolgenden Tabelle 32 sind die eigenen und in der Literatur berichtete Nachweisraten von disseminierten Tumorzellen in den regionären Lymphknoten von Patienten mit unvorbehandeltem, klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom zusammengestellt. Dabei wurden jedoch nur die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen berücksichtigt.

Autor	n	Marker	LK +
Martinez-Pineiro et al. 2003	145	PSA, CK AE1/AE3	0%
Moul et al. 1994	32	PSA, CK SB-3	3,1%
Gomella et al. 1993	32	PSA, PAP, CK AE1/AE3	3,1%
Clobes et al. 2000	92	PSA, CK AE1/AE3	4,4%
Shariat et al. 2003	199 (164*)	PSA, CK AE1/AE3 (hK2*)	7% (2%*)
Freeman et al. 1995	95	PSA, CK CAM 5.2/AE1	16%
Köllermann et al. 1999	45	PSA, BerEp4, CK KL-1	18%
Summe	640 (605*)		6,6% (5,3%*)

Tabelle 32: Häufigkeit des Lymphknotenbefalls mit disseminierten Tumorzellen festgestellt durch Immunhistochemie bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom

Wenn man alle veröffentlichten Serien zusammen nimmt, kommt man auf eine Prävalenz von etwa 7 %. Deutlich ersichtlich sind aber in Tabelle 32 auch die erheblichen Unterschiede: Von 0% bei *Martinez-Pineiro et al. 2003* bis 18 % bei den eigenen Patienten. Wesentliche Unterschiede im verwendeten Antikörperspektrum sowie in der histologischen Aufarbeitung der Präparate, scheinen zwischen den Studien nicht zu bestehen. Einige Serien sind aber sehr klein. Sie unterscheiden

sich auch bezüglich der T-Stadien, dem Differenzierungsgrad und dem initialen PSA Wert. Weiterhin zeigten sich deutliche Unterschiede in der Anzahl der extirpierten und untersuchten LK/Patient (s. Tabelle 33).

	Köllermann et al. 1999*	Freeman et al. 1995**	Gomella et al. 1993**	Moul et al. 1994	Clobes et al. 2000*	Shariat et al. 2003**	Martinez-Pineiro et al. 2003**
LK pos.	18%	16%	3,1%	3,1%	4,4%	7%	0%
T1-2	44,5%	0%	72%	k.A.	0%	0%-	66%
T3	55,5%	100%	28%	k.A.	100%	100%	34%)
GS < 7	47%	38%	k.A.	k.A.	83%	32%	57%
GS ≥ 7	53%	62%	k.A.	k.A.	17%	68%	43%
PSA < 10 ng/ml	44%	k.A.	k.A.	41%	k.A.	k.A.	66%
PSA ≥ 10 ng/ml	56%	k.A.	k.A.	59%	k.A.	k.A.	34%
Anzahl LK/Fall#	14	21	k.A. ?	k.A. ?	12	9,6	12

Tabelle 33: Verteilung prognostisch relevanter Risikofaktoren der in Tabelle 32 zitierten Studien im Vergleich. * cT-Stadien, ** pT-Stadien ,
*** Mittelwert

Wie schon im Kapitel 3.1.4.1. dargelegt, sind PCR basierte Untersuchungsmethoden zur Detektion von Einzelzelldisseminaten wesentlich empfindlicher als immunhistochemische Verfahren. In der nachfolgenden Tabelle 34 sind die diesbezüglichen, in der Literatur mittels PCR erhobenen Daten zum occulteren LK-Befall zusammengestellt.

Autor	n	LK positiv
Gao et al. 1997	19	84%
Ferrari et al. 1997	29	79%
Edelstein et al. 1996	36	44%
Martinez-Pineiro et al. 2003	145	39%
Shariat et al. 2003	199	20%
Okegawa et al. 2000	38	18%
Deguchi et al. 1993	18	11%
Potter et al. 2000	99	3%
Summe	583	28%

Tabelle 34: Häufigkeit von durch RT-PCR festgestellten Tumorzell-disseminaten in die regionalen Lymphknoten von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom

Ein Vergleich der Summenzeilen von Tabelle 32 und 34 zeigt, dass mittels RT-PCR ein Lymphknotenbefall deutlich häufiger (28%) entdeckt wurde, als das mit immunhistochemischen Techniken (7%) möglich war.

Die Detailanalyse der Tabelle 34 ergibt desweiteren, dass auch die RT-PCR Ergebnisse ganz erheblich (zwischen 3 und 84 % Befall) schwanken. Die Schwankungsbreite ist hier aber deutlich größer als bei den immunhistologischen Ergebnissen (zwischen 0 und 18 % Befall). Als Erklärung hierfür könnten, neben Unterschieden in der Zusammensetzung der untersuchten Patientengruppen bezüglich Tumorstadium, Differenzierungsgrad und PSA Wert sowie die Zahl der extirpierten LKs auch die Art des Untersuchungsmaterials (Frischgewebe vs. formalinfixiertes Paraffinmaterial), die differenten Primer (erhebliche Unterschiede zwischen PSA und PSMA) und ihre Kombination und nicht zuletzt auch die technische Durchführung der Untersuchung und ihre Deutung dienen. Soweit den jeweiligen Veröffentlichungen zu entnehmen, wurden diese Unterschiede in der nachfolgenden Tabelle 35 aufgeführt.

	Gao et al. 1997	Ferrari et al. 1997	Edelstein et al. 1996	Martinez- Pineiro et al. 2003	Shariat et al. 2003	Okegawa et al. 2000	Deguchi et al. 1993	Potter et al. 2000
Primer	PSA/PSMA	PSA/PSMA	PSA	PSA	HK2	PSA/PSMA	PSA	PSA/PSMA
Material	Frisch	Frisch	Paraffin	Frisch	Paraffin	Frisch	Frisch	Paraffin
Anzahl LK/Fall [#]	?	5	k.A.	12	9,6	?	?	k.A.
T1-2	a)	b)	38,9% **	65,6%**		100% ^{d)}	f)	95%
T3-4	a)		61,1%**	34,4%**	100%**	-	f)	5%
GS < 7		b)	69,4%	56,6%	32%	k.A. ^{e)}	k.A.	19%
GS ≥ 7			30,6%	43,4%	68%	k.A. ^{e)}	k.A.	81%
PSA < 10 ng/ml		b)	c)	66,2%	k.A.	34%	k.A.	49%
PSA ≥ 10 ng/ml			c)	33,8%	k.A.	66%	k.A.	51%

Tabelle 35: Verwendete Primer, Art des Untersuchungsmaterials sowie Verteilung prognostisch relevanter Risikofaktoren der zitierten Studien im Vergleich. * cT-Stadien, ** pT-Stadien, k.A.: keine Angaben

a) nur Hochrisikopatienten (≥ cT2b, GS ≥ 7, PSA ≥ 10 ng/ml)

b) nur Hochrisikopatienten (≥ cT2b, PSA ≥ 20 ng/ml oder GS ≥ 7)

c) Nur Angabe des medianen PSA-Wertes für LK positiv - und LK negativ Gruppe

d) Nur pT2 a/b Fälle

e) Autoren verwenden andere Gruppierung des Gleasonscores: GS 2-4: 6 (16%), GS 5-7: 23 (51%), GS 8-10: 9 (23%);

f) klinisch lokal begrenzte Karzinom

Wie im Knochenmark, ist die Nachweisrate disseminierter Tumorzellen mittels PCR auch in den Lymphknoten u. a. abhängig vom verwendeten Primer. Auch in den Lymphknoten scheint durch Kombination verschiedener Primer eine Steigerung der Nachweisrate möglich. So stellten *Ferrari et al. 1997* mit der Kombination von PSMA und PSA als Primer einen sehr häufigen Lymphknotenbefall (79%) bei ihren Patienten fest. Dabei war die PSMA RT-PCR bei 8 Patienten, die PSA RT-PCR bei 2 und die Kombination von beiden bei 13 Patienten fündig geworden. Die technischen Schwierigkeiten PCR basierter Untersuchungen von fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material mittels RNA Markern lassen sich gut an den folgenden Untersuchungsergebnissen aufzeigen: So waren bei *Shariat et al. 2003* die RT-PCR Ergebnisse von 79 ihrer 199 Patienten (40%) wegen RNS Degradierung nicht verwertbar. *Potter et al. 2000* bemerken in Ihrer Veröffentlichung, dass die Untersuchung von formalinfixiertem Gewebe mittels RT-PCR problematisch sei. So konnten die Autoren auch nur bei 7 ihrer 102 Patienten verwertbare RNA nachweisen. Demnach ist eigentlich auch nur bei diesen Patienten eine valide Aussage zum molekularen Lymphknotenstatus möglich. Bei 4 dieser 7 Patienten fiel dann die PSA/PSMA RT-PCR der Lymphknoten positiv aus. Das würde einer tatsächlichen Nachweisrate von 57 % und nicht 4 %, wie von den Autoren angegeben, entsprechen.

Zu den technisch bedingten Unwägbarkeiten gehört auch, dass die Zahl der entfernten regionalen Lymphknoten erheblich schwankte. Wie in Tabelle 35 gezeigt, schwankt die im Mittel pro Patient untersuchte Anzahl an Lymphknoten zwischen 5 und 12. Desweiteren wurden nicht alle Patienten beiderseits lymphadenektomiert. Hinzu kommt, dass von keinem der Autoren das gesamte entfernte Lymphknotenmaterial untersucht wurde. So asservierten beispielsweise *Deguchi et al. 1993* jeweils nur die Hälfte eines Lymphknoten für RT-PCR Untersuchung. *Martinez-Pineiro et al. 2003* untersuchten jeweils nur einen 1-2mm dicken Schnitt aus der Zentralregion des Lymphknotens. Unter Berücksichtigung all Dessen, wird man davon ausgehen müssen, dass eine Tumorzell dissemination in die regionalen Lymphknoten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit deutlich häufiger als bislang angenommen stattfindet. Hierfür sprechen beispielsweise die Daten von *Ferrari et al. 1997*: Von 19 Patienten die beiderseits pelvin lymphadenektomiert wurden, wiesen 90% einen Tumorzellbefall auf (PSA und PSMA-RT-PCR).

Von 8 Patienten, bei denen der Eingriff nur einseitig erfolgte war dies nur 4 mal (50%) der Fall. *Heidenreich et al. 2002* verglichen die Inzidenz von LK-Metastasen zwischen der üblichen, auf die obturatorischen und externen iliakalen Lymphknoten beschränkten pelvinen Lymphadenektomie und einer über diese Grenzen hinausgehenden Lymphadenektomie. Während nach dem Standardverfahren nur in 12% der Fälle LK-Metastasen nachweisbar waren, war dies nach erweiterter Lymphadenektomie bei 27% der Patienten der Fall ($p < 0.03$).

Zusammenfassend geht aus den eigenen Untersuchungen und den Literaturangaben hervor:

1. Bei Patienten mit klinisch noch lokal begrenztem Prostatakarzinomen werden immunhistologisch relativ selten (etwa 7%) Tumorzellaussaatungen in die regionären Lymphknoten festgestellt.
2. Die RT-PCR mit unterschiedlichen Primern erbringt deutlich höhere Prävalenzen (etwa 30%)
3. Die molekularbiologischen Ergebnisse schwanken aber ganz erheblich (zwischen 4 und 84%)
4. Neben anderen Faktoren ist die erhebliche Schwankungsbreite der RT-PCR Ergebnisse auch auf unterschiedliche Primer, sowie methodische und interpretatorische Schwierigkeiten zurück zu führen.
5. Auch bei der molekularbiologischen Aufarbeitung von Lymphknoten scheint die Untersuchung mit Primerkombinationen (z.B. PSA+PSMA) höhere Detektionsraten zu erbringen.
6. Wahrscheinlich wird aber mit allen Untersuchungstechniken die tatsächliche Häufigkeit des regionären Lymphknotenbefalls erheblich unterschätzt, da bisher immer nur Bruchteile des jeweiligen Regionalsystems untersucht werden konnten.

4.1.4.2. Vergleich occulter Lymphknoten- vs. Knochenmarkbefall

Zu 2. Die eigenen vergleichenden immunhistochemischen Untersuchungen konnten disseminierte Tumorzellen häufiger im Knochenmark als in den Lymphknoten nachweisen (29% vs 18%), wenngleich der Unterschied kein Signifikanzni-

veau erreichte ($p=0.32$). Die Durchsicht der Literatur stützt jedoch die eigenen Ergebnisse (Tabelle 36)

Autor	KM		LK	
	n	KM pos n (%)	n	LK pos n (%)
Moul et al. 1994	-	-	32	1 (3)
Freeman et al. 1995	-	-	95	15 (16)
Martinez-Pineiro et al. 2003	-	-	145	0 (0)
Gomella et al. 1993	-	-	32	1 (3)
Shariat et al. 2003	-	-	199	13 (7)
Clobes et al. 2000	-	-	92	4 (4)
Köllermann et al. 1999	45	13 (29)	45	8 (18)
Weckermann et al. 1999	219	53 (24)	-	-
Melchior et al. 1997	48	5 (10)	-	-
Oberneder et al. 1994	84	28 (33)	-	-
Ipse (nicht publiziert)	327	95 (29)	-	-
Summe	723	194 (27)	640	42 (7)

Tabelle 36: Häufigkeit immunhistochemisch festgestellter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom

Demnach ist der KM-Befall rund viermal häufiger als der LK-Befall ($p < 0.0001$). Auch die Auswertung PCR-basierter Untersuchungen zeigt im KM signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen 39% vs 30%, $p=0.0004$; Tabelle 37)

Autor	Primer	KM		LK	
		n	KM pos n (%)	n	LK pos n (%)
Wood et al. 1994	PSA	43	19 (44)	-	-
Melchior et al. 1997	PSA	85	54 (64)	-	-
Gao et al. 1999	PSA	116	51 (44)	-	-
Corey et al. 1997	PSA	63	45 (71)	-	-
Cher et al. 1999	PSA	204	46 (23)	-	-
Bianco et al. 2001	PSA	244	79 (32)	-	-
Edelstein et al. 1996	PSA	-	-	36	16 (44)
Ferrari et al. 1997	PSA/PSMA	-	-	29	23 (79)
Okegawa et al. 2000	PSA/PSMA	-	-	30	11 (37)
Shariat et al. 2003	HK2	-	-	199	40 (20)
Potter et al. 2000	PSA/PSMA	-	-	102	4 (4)
Gao et al. 1997	PSA/PSMA	-	-	19	16 (84)
Deguchi et al. 1993	PSA	-	-	21	4 (20)
Summe		755	294 (39)	590	175 (30)

Tabelle 37: Häufigkeit molekularbiologisch festgestellter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom

Angesichts der technischen Probleme formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material per RT-PCR zu untersuchen, sind die diesbezüglichen Lymphknotendaten jedoch mit Unsicherheiten behaftet. Eine endgültige Aussage über die Prävalenzen in diesem Zielorgan der Dissemination ist daher zur Zeit nicht möglich. Zusammenfassend geht aus den eigenen Daten und den Literaturangaben hervor:

- wenn man von den immunhistologischen Untersuchungen ausgeht, wird das Knochenmark deutlich häufiger von gestreuten Tumorzellen befallen als die regionalen Lymphknoten.
- wenn man von den molekularbiologischen Untersuchungen (RT-PCR) ausgeht, ist der Unterschied weniger deutlich, jedoch immer noch vorhanden.

Zu 3. Nur bei 3 von 17 Patienten mit Disseminaten waren Lymphknoten und Knochenmark gleichzeitig befallen. In Zusammenschau mit den Angaben aus der Literatur (s. Tabelle 36 und 37) ist somit von einer unterschiedlichen Befallsprävalenz zwischen beiden Organsystemen auszugehen.

Gleiches gilt für den Vergleich von Knochenmark und peripherem Blut. Wie im Detail im Kapitel 3.1.4.1., ausgehend von RT-PCR Untersuchungen aufgezeigt, ist ein KM-Befall mit disseminierten Tumorzellen wesentlich häufiger nachweisbar (etwa um den Faktor 3,4), als ein Befall des peripheren Blutes. Diese Ergebnisse unterstützen Untersuchungen zu organspezifischen Milieuunterschieden, die zu einer bevorzugten Besiedelung des Knochenmarks führen („Homing“) (Sikes et al. 2004).

In der folgenden Tabelle 38 sind Literaturangaben zur Häufigkeit disseminierter Tumorzellen in Blut, Knochenmark und Lymphknoten gegenübergestellt.

Autor	Lymphknoten		Blut		Knochenmark	
	n	positiv n (%)	n	positiv n (%)	n	positiv n (%)
Okegawa et al. 2000	30	10 (33)	30	12 (40)	-	-
Martinez-Pineiro et al. 2003	154	66 (43)	200	86 (43)	-	-
Shariat et al. 2003	199	40 (20)	224	54 (24)	-	-
Melchior et al. 1997	-	-	71	14 (20)	71	44 (62)
Corey et al. 1997	-	-	63	12 (19)	63	26 (41)
Summe	383	116 (30)	588	178 (30)	134	70 (52)

Tabelle 38: Häufigkeitsvergleich von Disseminaten in Lymphknoten, Blut und Knochenmark (PSA-RT-PCR)

Wie ersichtlich, sind die Prävalenzen in Lymphknoten und Blut identisch (30 vs 30%). Dahingegen scheint das Knochenmark deutlich häufiger befallen zu sein (52 vs 30%, $p < 0.0001$).

Zusammenfassend geht aus den eigenen Untersuchungen und der Angaben der Literatur hervor:

- Ein Lymphknotenbefall scheint deutlich seltener als ein Knochenmarkbefall mit disseminierten Tumorzellen zu sein.

- Während im Blut deutlich seltener Tumorzellen festgestellt werden können als im Knochenmark, sind Blut und Lymphknoten gleich häufig befallen.
- Obwohl die Prävalenzen in Lymphknoten und Blut identisch sind, muß der Befall keineswegs simultan sein.
- Auch der häufigere Knochenmarkbefall geht keineswegs immer auch mit einem gleichzeitigen Lymphknotenbefall einher.
- Keine Untersuchung kann daher die andere vollständig substituieren. Die Ertragreichste bleibt aber das Knochenmark.

4.1.4.3. Korrelation des occulter Lymphknotenbefalls mit etablierten Risikofaktoren

In der vorgestellten kleinen immunhistochemischen Studie konnte keine Korrelation von Lymphknotenbefall und/oder Knochenmarkbesiedelung einerseits und den etablierten Risikofaktoren (PSA, Tumorstadium, Differenzierungsgrad) andererseits festgestellt werden. Das bestätigt die in Kapitel 3, aufgrund einer sehr großen Untersuchungsserie gemachte Aussage, dass, wenn überhaupt, nur ein geringer Zusammenhang zwischen der Tumorzell dissemination und den genannten Risikofaktoren besteht. In der nachfolgenden Tabelle 39 wurden diesbezüglich verwertbare Angaben aus der Literatur zusammengestellt.

Autor	n	Stadium	Malignitätsgrad	PSA
Edelstein et al. 1996	57	Ja	Nein	Nein
Ferrari et al. 1997	29	Trend	Ja	Trend
Martinez-Pineiro et al. 2003	154	Trend	Ja	Nein
Shariat et al. 2003	199	Nein	nein	k.A.
Shariat et al. 2003	120	Nein	nein	k.A.
Potter et al. 2000	102	Nein	Nein	Nein
Okegawa et al. 2000	38	Nein	Ja	Ja
Gomella et al. 1993	32	Nein	Nein	Nein
Clobes et al. 2000	92	Nein	Nein	Nein
Freeman et al. 1995	95	Trend	Trend	k.A.

Tabelle 39: Korrelation von Lymphknotenbefall mit Tumorstreuzellen einerseits sowie T-Stadium, Differenzierungsgrad und PSA Wert andererseits. K.A.: keine Angabe

Wie ersichtlich bestätigen die meisten Autoren die eigenen Feststellungen.

4.1.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die vorliegenden eigenen Untersuchungsergebnisse, sowie die zitierten und kommentierten Literaturangaben zeigen, dass bei Patienten mit klinisch noch lokalisiertem Prostatakarzinom mehr oder weniger häufig und auch schon sehr frühzeitig Tumorzellstreuungen in die regionären Lymphknoten festgestellt werden können. Die Prävalenzen schwanken ganz erheblich und liegen bei den immunhistologischen Untersuchungen deutlich niedriger (rund 7%) als die RT-PCR Ergebnisse (rund 30%). Letztere sind in hohem Masse abhängig vom Ausgangsmaterial (frisches bzw. gefrorenes vs fixiertes und eingebettetes Archivmaterial) aber auch den eingesetzten Primern. So war die Ausbeute bei Verwendung der PSMA-RT-PCR deutlich höher als mit der PSA-RT-PCR. Wie im Knochenmark so wurden auch in den regionären Lymphknoten die höchsten Prävalenzen durch Primerkombinationen festgestellt. In kleinen Patientenserien konnte so in bis zu 84% der Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom disseminierte Tumorzellen in den regionären Lymphknoten nachgewiesen werden. Berücksichtigt man ferner, dass fast immer nur einzelne und nie alle regionären Lymphknoten befallen sind, in den allermeisten Fällen nur eine limitierte pelvine Lymphadenektomie durchgeführt wird, bei der maximal ein Drittel der regionären Lymphknoten entfernt werden und von diesem Gewebsmaterial wiederum nur ein Bruchteil der weiteren histologischen und/oder molekularbiologischen Untersuchung zugeführt wird, wird deutlich, dass alle bisher veröffentlichten Ergebnisse die wirkliche Häufigkeit des Lymphknotenbefalls durch gestreute Tumorzellen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit unterschätzen. Wie bereits nach der Auswertung der Knochenmarkuntersuchungen diskutiert, ist daher anzunehmen, dass es wahrscheinlich bei allen Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom eher früher als später zu einer Tumorzelldissemination auch mit Befall der regionären Lymphknoten kommt. Bei Patienten mit Prostatakarzinom können disseminierte Tumorzellen im Blut, den regionalen Lymphknoten und im Knochenmark nachgewiesen werden. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint das Knochenmark am häufigsten befallen (etwa 52%). Es wird gefolgt von Blut und den regionalen Lymphknoten

(beide etwa 30%). Obwohl im Blut und den regionale Lymphknoten etwa gleich häufig Tumorzellen festgestellt werden können, muß keineswegs ein simultan nachweisbarer Befall der Organsysteme vorliegen. Um sich ein Bild vom tatsächlichen Ausmaß der Dissemination machen zu können, müssten daher alle 3 Quellen untersucht werden. Sicherlich ist aber das Knochenmark das wichtigste und aussagekräftigste Untersuchungsziel.

Wie beim Knochenmark, konnte auch bei den Lymphknoten kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Befall und den klassisch prognoserelevanten Faktoren wie T- Stadium, Differenzierungsgrad und PSA-Wert festgestellt werden.

Aus der Tatsachenkombination, dass der Knochenmarkbefall mit Tumorstreuzellen schon in sehr frühen Tumorstadien festgestellt werden kann, der Befall mit zunehmendem T-Stadium, PSA-Wert und Malignitätsgrad nur wenig zunimmt und Kontrolluntersuchungen nach radikaler Prostatektomie in vielen Fällen ein spontanes Verschwinden der Disseminate gezeigt haben, wurde geschlossen, dass es dort einen spontanen Eliminationsmechanismus für gestreute Tumorzellen geben müsse.

Für die regionalen Lymphknoten ist diese Hinweiskette nicht ganz so beweiskräftig. Auch hier konnten die vorliegenden Untersuchungen einen frühzeitigen Befall aufzeigen. Die weit gehende Unabhängigkeit des Lymphknotenbefalls von den erwähnten Prognosefaktoren spricht auch hier für spontane Elimination. Andernfalls müsste es mit der Zeit unweigerlich zu einer Kumulierung des Befalls kommen. Jedoch ist ein direkter Beweis durch Kontrolluntersuchungen des regionalen Lymphknotensystem nicht möglich.

Der Schwerpunkt der bis hierhin gemachten Ausführungen zur okkulten Tumorzell dissemination bezog sich vor allem auf den Nachweis derselben in verschiedenen Organsystemen (einschließlich der Erörterung damit verbundener wichtiger technischer Aspekte). Fragen zur klinischen Relevanz der erhobenen Befunde wurden an dieser Stelle bewusst ausgeklammert. Diese Thematik wird gesondert ausführlich im Kapitel 5: „Abschließende Bemerkungen und Ausblick“ erörtert.

4.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM OCCULTEN LYMPHKNOTENBEFALL MITTELS METHYLIERUNGSSPEZIFISCHER POLYMERASEKETTENREAKTION:

4.2.1. Einführung

Mittels Immunhistochemie lässt sich zwar eine lymphonoduläre Dissemination von Tumorzellen nachweisen, die festgestellten Prävalenzen sind aber bei Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom überraschend gering. Der notwendige Arbeitsaufwand ist dahingegen ganz erheblich. Das veranlasste u. a. *Potter et al. 2000* zu der Schlussfolgerung der Aufwand lohne sich nicht.

Eine empfindlichere und mit weniger Arbeitsaufwand verbundene Untersuchungsmethode war und ist daher wünschenswert. Mit der weiten Verbreitung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) steht ein solches Verfahren jetzt vielerorts zur Verfügung und hat für die hier diskutierte Fragestellung die Immunhistologie weitgehend in den Hintergrund gedrängt. Die wesentlichen PCR-basierten Untersuchungsergebnisse wurden vorangehend erörtert. Es zeigte sich eine hohe Nachweisrate okkult disseminierter Tumorzellen in den regionären Lymphknoten von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom. Die deutlich höhere Sensitivität dieser Untersuchungstechnik hat die Nachweisrate disseminierter Tumorzellen in den regionären Lymphknoten von Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom etwa um den Faktor 4 emporschnellen lassen. Bislang sind die PCR-basierten Untersuchungen jedoch mit mehreren Problemen behaftet, die den Einzug der Methodik in die klinische Routine der urologischen Onkologie verhindert haben:

1. Die ermittelten Ergebnisse schwanken enorm: Zwischen 4 und 84%. Das legt a priori den Verdacht nahe, dass die erhöhte Empfindlichkeit der Untersuchung auch mit einer erhöhten Störanfälligkeit erkauft wurde.
2. Alle bislang verwendeten Primer sind zwar weitgehend organ-, aber keineswegs karzinomspezifisch (PSA, PSMA und hK2). Hinzu kommt, dass deren Expression sowohl im Primärtumor als auch in seinen Disseminaten variiert.
3. Die Expression der genannten Primer ist androgenabhängig. Während die PSA Expression unter endokriner Behandlung abnimmt, nimmt die PSMA

Expression unter der gleichen Behandlung zu (*Wright et al. 1996*). Auch die hK- 2 Expression ist androgenabhängig.

4. Gelegentlich scheint PSMA auch von normalen Leukocyten exprimiert zu werden (*Lintula and Stenman 1997*). Auch PSA wird nicht nur von Prostatazellen, sondern manchmal auch von normalen Blutzellen exprimiert (*Smith et al. 1995*).
5. Die erwähnten Primer sind RNS basiert. Die Fixierung des Gewebes durch Formalin denaturiert aber häufig die RNS. Somit ist die Untersuchung zu- meist verlässlich nur an unfixiertem Frischgewebe mit intakter RNS mög- lich. Die Gewinnung von frischem Untersuchungsmaterial stellt jedoch ei- nen störenden Eingriff in eingespielte Arbeitsabläufe dar. Vor allem ent- zieht es der histopathologischen Standarduntersuchung, die ja die Basis für alle weiteren therapeutischen Entscheidungen ist Material.

Mit dem zuerst von *Herman et al. 1996* für das Prostatakarzinom beschriebenen Nachweis der Promotorhypermethylierung des Glutathion-S-Transferase P 1 Gens (GSTP1) mittels methylierungsspezifischer PCR liegt erstmals eine molekulare Markermethode vor, welche vielen der genannten Probleme Rechnung trägt. Das GSTP1 Gen ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert und für intrazelluläre Detoxifikationsvorgänge verantwortlich. Die Promotor Hypermethylierung stellt die häufigste DNS-Veränderung des Prostatakarzinoms dar und geht mit einer nahezu 100 % Tumorspezifität einher (*Eng et al. 2000; Bastian et al. 2004*). Seine Eig- nung als Prostatakarzinommarker konnte bereits an Prostatagewebe und Körper- flüssigkeiten von Prostatakarzinompatienten von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (*Goessl et al. 2000*). Da es sich dabei um einen DNS-basierten Marker handelt, ist die Möglichkeit gegeben verlässliche Untersuchungen auch an fixier- ten und in Paraffin eingebetteten Lymphknoten durchzuführen. Eine Androgenab- hängigkeit des Markers ist bisher nicht bekannt.

Angeht dieser Vorteile wurden in der vorliegenden Pilotstudie erstmalig Lymphknoten von Prostatakarzinompatienten auf Tumorzellstreuungen mit der methylierungsspezifischen Polymerase Kettenreaktion (MSP) untersucht (*Köllermann et al. 2003*).

4.2.2. Patienten und Methoden

Primär wurden die im Rahmen einer radikalen Prostatektomie gewonnenen, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten LKs von 20 Patienten mit Prostatakarzinom im Stadium pT2pN0M0R0 untersucht. Trotz vermeintlich kurativer Operation entwickelten alle Patienten ein biochemisches Rezidiv, definiert als PSA-Anstieg auf über 0,1 ng/ml. Die PSA-Messung erfolgte mit dem PSA Immulite 3rd generation assay®, bei einer unteren Nachweisgrenze von 0.003 ng/ml. Von 18 Patienten dieser Gruppe konnten auch Paraffinproben des Primärtumors (Biopsie und/oder radikale Prostatektomie) untersucht werden. Bei 19 Patienten konnten präoperativ Knochenmarkaspirate beider Darmbeinschaufeln zur immunzytologischen Untersuchung mit dem mAk A45-B/B3 gewonnen werden. Der mAk A45-B/B3 reagiert mit den Epitopen einer Vielzahl von Cytokeratinproteinen, u.a. den Heterodimeren CK 8/18 und CK 8/19 (*Solakoglu et al. 2002*). Als Negativkontrolle dienten im Rahmen einer Obduktion gewonnene Lymphknoten von 9 verstorbenen Patienten (3 Frauen, 6 Männer). Eine maligne Grunderkrankung konnte bei allen Patienten nach Prüfung der klinischen Unterlagen und durch die Obduktion weitgehend ausgeschlossen werden. Die Lymphknoten entstammten verschiedenen Regionen (1 x inguinal, 1 x präaortal, 3 x tracheobronchial, 1x hepato-portal, 3 x pelvin).

Die initiale histologische Routineuntersuchung der Lymphknoten (H&E) bestand aus der mikroskopischen Untersuchung von 2 Schnitten pro LK aus zwei verschiedenen Schnittebenen und erbrachte in keinem Fall einen Tumornachweis (pN₀). Zur vorliegenden Untersuchung wurden dann von jedem Paraffinblock mehrere, je 5 µm dicke Nachschnitte angefertigt. Von diesen wurden zunächst wiederum je zwei Schnitte pro Block aus verschiedenen Schnittebenen H&E gefärbt und sorgfältig mikroskopisch untersucht, um einen eventuell im Rahmen der vorangegangenen Routinediagnostik nicht diagnostizierten LK-Befall aufzudecken. Die verbliebenen ungefärbten Nachschnitte sowie Schnitte des jeweiligen Primärtumors wurden dann der DNS Extraktion wie folgt zugeführt: Zunächst Entparaffinisierung in 100% Xylen, gefolgt von einem kurzen vortexen in 100% Ethanol. Resuspensionierung des Gewebepellets in Proteinase K haltigem Lysepuffer. Die DNS Isolierung erfolgte mit dem DNS QIAamp DNS Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Die DNS Bisulfittierung zum Nachweis methylierter CpG Inseln erfolgte mit dem CpGe-

nome DNS Modification Kit (Intergen, Oxford, UK) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Eine etwaige *GSTP1* Promotorhypermethylierung, sprich das Vorhandensein methylierter CpG Sequenzen in der Promotorregion, wurde quantitativ mittels methylierungsspezifischer PCR ermittelt (Goessl *et al.* 2000). Die Zielregion der MSP liegt innerhalb des *GSTP1* Promotors. Zum Nachweis der Methylierungsreaktion wurden *GSTP1* Promotorsequenzen verwendet. Zum Nachweis methylierter (Tumor) DNS kam ein mit blauem Fluoreszenzfarbstoff markiertes 92-Basenpaar großes Produkt zum Einsatz (forward primer: 5`-6FAM-TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC-3`; reverse primer: 5`-GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G-3`) Zum Nachweis unmethylierter (normaler) DNS wurde ein mit grünem Fluoreszenzfarbstoff markiertes 99-Basenpaar großes Produkt verwendet (forward primer: 5`-HEX-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3`; reverse primer: 5`-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3`) (Esteller *et al.* 1999). Die MSP (15 Minuten bei 95 °C; 35 Zyklen bei 59.°C für 30 Sek.; 72 °C für 30 Sek.; und 95 °C für 30 Sek.) wurde in einem 10-µl großen Reaktionsvolumen unter Verwendung des HotStar Taq Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany) durchgeführt. Die MSP Produkte der unmethylierten und methylierten Reaktion wurden mittels Laserfluoreszenz durch einen automatischer Gensequenzierer unter Verwendung der Gene Scan Software durchgeführt (Goessl *et al.* 2000). Negativ- (Wasser) und Positivkontrollen (DNS von LNCaP Zellen mit bekannter *GSTP1* Promotor HM) wurden jedem PCR Lauf beigefügt

4.2.3. Ergebnisse

Karzinompatienten: Die relevanten klinischen Patientendaten, die Ergebnisse der Primärtumor- und Lymphknotenuntersuchungen mittels MSP, sowie die Ergebnisse der KM-Untersuchungen sind in Tabelle 40 dargestellt.

Fallnr.	PSA (ng/ml)	Gleason Summe	Tu GSTP1	LK GSTP1	KM
1	k.D.	6	pos	neg	n.d.
2	44.0	8	pos	pos	Pos
3	63,7	7	pos	pos	Pos
4	k.D.	7	pos	pos	Neg
5	6,5	7	k.M.	pos	Neg
6	18,3	8	pos	pos	Pos
7	8,3	6	pos	pos	Pos
8	15,7	8	pos	pos	Neg
9	12,2	7	pos	pos	Neg
10	9,94	6	pos	pos	Neg
11	6,4	6	pos	pos	Neg
12	13.0	6	pos	pos	Neg
13	36,4	8	k.M.	pos	Neg
14	21,7	6	pos	pos	Neg
15	16,3	7	pos	pos	Neg
16	10,5	7	pos	pos	Pos
17	139.0	8	pos	pos	Pos
18	30,5	6	pos	neg	Neg
19	7,4	6	pos	pos	Pos
20	9,97	7	pos	pos	Pos

Tabelle 40: Darstellung der klinisch relevanten Tumorparameter (PSA, Malignitätsgrad (Gleason-Summe) sowie der GSTP1 Untersuchungen von Primärtumor und der Lymphknoten.
k. D. = keine Daten, k.M. = kein Material

Bei 8 Patienten wurde ein Gleason Summenwert 5-6 diagnostiziert, bei 12 Patienten ein Wert ≥ 7 . Das mediane PSA zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei 14,4 ng/ml (Mittelwert 26,1 ng/ml, range 6,4-139 ng/ml). Die Zeit bis zum biochemischen Rezidiv betrug im Median 13,5 Monate (Mittel 20,6 Monate, range 2 – 64 Monate).

Tumor DNS konnte in allen Proben der Primärtumore nachgewiesen werden (Abb. 18 a/b). Die Befundung der H&E gefärbten Nachschnitte der Lymphknoten zeigte konventionell histologisch keinen Tumor und bestätigte somit den initialen pN0-Befund. Die DNS-Analyse der Lymphknoten zeigte in 18/20 Fällen (90%) eine

GSTP1 Hypermethylierung (Abb. 19 a/b). In 8 dieser Fälle (44,4%) fanden sich gleichzeitig Tumorzellen im Knochenmark.

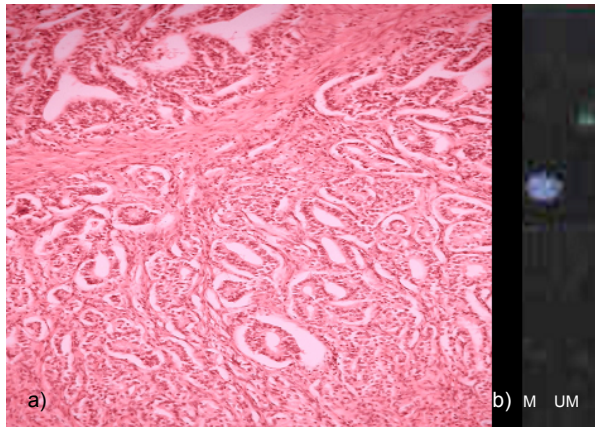


Abb.18. a) Prostatakarzinom Gleasonsummenwert 3+4=7 (Prostatektomiepräparat, H&E Färbung) b) *GSTP1* Untersuchung des Tumors zeigt sowohl methylierte (M, 92-92-Basenpaar (bp) großes PCR Produkt, blaue Fluoreszenz = Tumor-DNA) als auch unmethylierte (UN, 99 bp großes PCR-Produkt, grüne Fluoreszenz = benigne DNA) *GSTP1*-Promotorsequenzen.

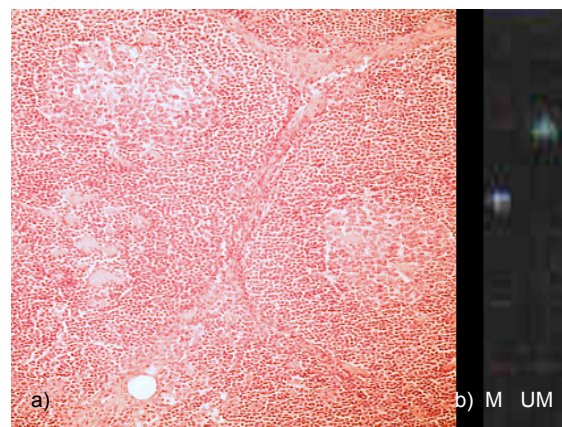


Abb. 19 a) Konventionell histologisch als tumorfrei befundeter Lymphknoten (gleicher Patient wie in Abb 12; H&E Färbung) b) *GSTP1* Untersuchung des Lymphknotens zeigt sowohl methylierte (M, 92-Basenpaar (bp) großes PCR Produkt, blaue Fluoreszenz = Tumor-DNA) als auch unmethylierte (UN, 99 bp großes PCR-Produkt, grüne Fluoreszenz = benigne DNA) *GSTP1*-Promotorsequenzen.

Kontrollgruppe: Lediglich bei einem der neun tumorfrei verstorbenen Patienten fand sich eine *GSTP1* HM in den untersuchten Lymphknoten (11%). Die Detektionsrate unterschied sich somit signifikant von der der Karzinompatienten ($p < 0.0001$). Der *GSTP1* positive LK entstammte einem 29 Jahre alten männlichen Patienten, der an einem reflektorischen Herzversagen verstarb. Ein Prostatakarzinom sowie das Vorhandensein einer prostatistischen intraepithelialen Neoplasie konnte im Rahmen der Autopsie histologisch ausgeschlossen werden.

4.2.4. Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Untersuchung wurde erstmals die mittels MSP nachgewiesene *GSTP1*-CpG-Insel-Hypermethylierung zur molekularen N-Stadiumbestimmung eingesetzt. Die Ergebnisse lauten wie folgt:

1. Alle Proben aus den Primärtumoren wiesen eine *GSTP1* Hypermethylierung

auf.

2. Bei 18 der 20 Patienten (90%) gelang auch in den regionären Lymphknoten der Nachweis von GSTP1 Hypermethylierung.

Zu 1. Auch andere Autoren haben die GSTP1 Hypermethylierung bei einem sehr hohen Prozentsatz primärer Prostatakarzinome feststellen können. Die diesbezüglichen Angaben der Literatur schwanken jedoch erheblich. In der nachstehenden Tabelle 41 sind die entsprechenden Ergebnisse hierzu aufgelistet.

Autor	n	Nachweis	positiv
Lee et al. 1994	20	Southern blot	20 (100%)
Santourlidis et al. 1999	32	RT-PCR	24 (75%)
Goessl et al. 2000	17	MS-PCR	16 (94%)
Cairns et al. 2001	28	MS-PCR	22(79%)
Jeronimo et al. 2002	69	Q-MS-PCR	63 (91%)
Nakayama et al. 2003	33	MS-PCR	30 (91%)
Tokumaru et al. 2004	39	Q-MS-PCR	29 (75%)
Summe	339		240 (71%)

Tabelle 41: Häufigkeit der GSTP1-CpG-Insel Hypermethylierung im Primärtumor von Patienten mit Prostatakarzinom

Die Methode hat also augenscheinlich eine hohe Sensitivität. Während die meisten Autoren über eine Spezifität von 100 % berichten (*Santourlidis et al. 1999; Goessl et al. 2000; Cairns et al. 2001; Nakayama et al. 2003; Tokumaru et al. 2004*), konnten andere die Promotorhypermethylierung, wenngleich selten, auch in normalem Prostatagewebe feststellen. Die Angaben schwanken hier zwischen 3 % bei *Lee et al. 1994* und 8 % bei *Maruyama et al. 2002*. Im Gegensatz zu allen anderen Autoren wurden Jeronimo et al. 2002 auch bei 9 von 31 (29%) Patienten mit Prostatahypertrophie fündig.

Das GSTP1 Gen spielt eine Rolle bei der zellulären Detoxifikation von Oxidantien und verhindert dadurch deren Schädlichkeit für das Genom. Es wird normalerweise in allen Basalzellen der normalen und hypertrophierten Prostata, zumeist aber

nicht in Prostatakarzinomzellen exprimiert (*Lee et al. 1994*). Die fehlende GSTP1 Expression im Karzinom geht mit einer Hypermethylierung der Promotorregion des Gens einher (GSTP1-HM). Durch diese GSTP1-HM wird das Gen inaktiviert und verliert seine Expression. Diese Veränderung wurde in fast allen Krebszellen von primären Prostatakarzinomen festgestellt (*Lin et al. 2001*) und ist die häufigste DNS-Veränderung dieses Tumors. Sie scheint schon in einem sehr frühen Stadium der Prostatakarzinomgenese aufzutreten. So wurde sie bereits bei rund 70% der PIN-Läsionen und auch in einigen PIA Herden (prostate inflammatory atrophy), also Vorstufen des Karzinomes nachgewiesen (*Brooks et al. 1998; Nakayama et al. 2003*). Die GSTP1 Hypermethylierung wurde allerdings auch bei mehr als 80% der Leberkarzinome, bei etwa 30% der Mammakarzinome und bei weniger als 10 % anderer Karzinome (z.B. Nierenzellkarzinom) beschrieben (*Tchou et al. 2000; Esteller et al. 2001*). Wenngleich in hohem Maße karzinomspezifisch, ist sie also nicht prostatakarzinomspezifisch. Die Tatsache, dass bei allen hier untersuchten Patienten die Promotorhypermethylierung im Primärtumor nachgewiesen werden konnte, ist ein gewichtiges Argument für die Vermutung, dass auch die Streuzellen dieser Tumoren den Marker aufwiesen. Weiteres Gewicht erhält diese Vermutung auch dadurch, dass er sowohl im Blut, als auch im Urin von Prostatakarzinompatienten nachgewiesen werden konnte (*Goessl et al. 2000; Cairns et al. 2001; Goessl et al. 2001; Jeronimo et al. 2002; Gonzalzo et al. 2003*)

Zu 2. Bei fast allen untersuchten Patienten (90%) konnte die GSTP1 Hypermethylierung in den anlässlich der radikalen Prostatektomie entfernten und nach Fixierung in Paraffin eingebetteten, regionären Lymphknoten festgestellt werden. Folgende Argumente sprechen dafür, dass es sich hierbei tatsächlich um Tumorzelldisseminate handelt:

1. alle Primärtumoren wiesen eine GSTP1-HM auf
2. rund 40% der LK-positiven Patienten wiesen gleichzeitig auch disseminierte Tumorzellen im KM auf

Weiterhin konnten wir in einer vorangegangenen vergleichenden immunhistochemischen Einzelfalluntersuchung den positiven GSTP1-LK Befund auch einem histologischen Korrelat gegenüberstellen (*Köllermann et al. 2003*). Hierzu wurde konventionell histologisch als tumorfrei befundetes Lymphknotengewebe eines

Patienten mit Prostatakarzinom sowohl immunhistologisch als auch mittels GSTP1-MSP untersucht. Einer der Lymphknoten wies eine eindeutige GSTP1-HM auf. Die immunhistochemische Untersuchung der korrespondierenden Schnittpräparate konnte Tumorzellen nachweisen und bestätigte somit den molekularen Befund (Abb. 20).

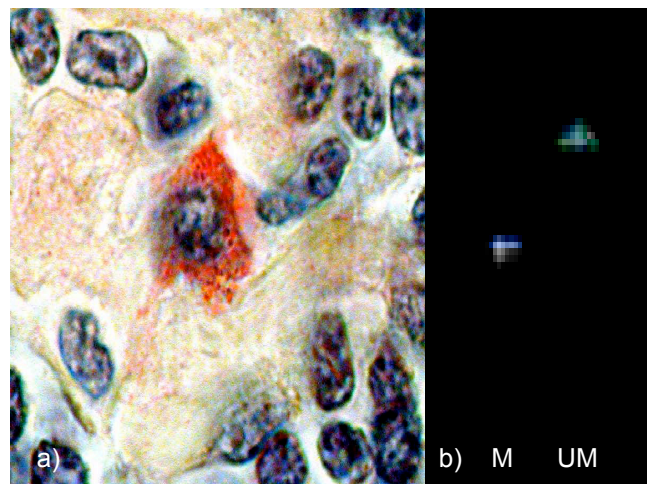


Abb 20 a/b: Konventionell histologisch tumorfreier Lymphknoten: a) Nachweis einer Ber-Ep4 positiven Tumoreinzelzelle (Immunhistochemie, APAAP-Methode) b): MS-PCR des gleichen LK mit Nachweis methylierter (M) als auch unmethylierter (UM) GSTP1-Promotorsequenzen (blaue Fluoreszenz = Tumor-DNA, 92-Basenpaar (bp) großes PCR Produkt; grüne Fluoreszenz = benigne DNA, 99 bp großes PCR-Produkt.

Die außerordentlich hohe Prävalenz der GSTP1-HM in den hier untersuchten LK ist sicherlich, neben der Sensitivität der Untersuchungsmethode, auch auf das spezielle Selektionskriterium – biochemische Progression – zurückzuführen. Die nahe liegende Frage, ob ein positiver GSTP1 LK-Status von prognostischer Relevanz ist, kann jedoch die vorgelegte Untersuchung angesichts des Fehlens einer Negativkontrollgruppe (Patienten ohne PSA-Rezidiv) nicht beantworten.

4.2.5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit verwendete erstmalig den Nachweis der GSTP1-Promotor Hypermethylierung mittels MSP zum Nachweis occulter Tumorzellen in Lymphknoten von Prostatakarzinompatienten. Der Vorteil dieser Untersuchungstechnik

ist zum einen, dass ihr eine sehr hohe Karzinomspezifität zukommt. Dies unterscheidet sie von allen anderen PCR-Techniken die Primer wie PSA, PSMA oder hK2 einsetzen. Diese sind allenfalls organ- aber nicht karzinomspezifisch. Hinzu kommt, dass ihre Expression, im Gegensatz zur Hypermethylierung sehr unterschiedlich ausgeprägt und z. T. auch therapieabhängig ist. Zum anderen ist die Untersuchung DNS und nicht wie die letztgenannten Marker RNS basiert. DNS-Veränderungen gehen mit einer wesentlich höheren Stabilität des gesuchten Merkmals einher. Aus diesem Grunde ist auch die nachträgliche Untersuchung von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material verlässlich möglich. Sowohl die eigene Untersuchung als auch die andere Arbeitsgruppen (*Edelstein et al. 1996; Ferrari et al. 1997; Gao et al. 1997*) konnte zeigen, dass Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom sehr häufig bereits eine okkulte lymphnoduläre Tumorzell dissemination aufweisen. Wie im Falle des Knochenmarks, scheint es somit auch in den regionalen Lymphknoten sehr frühzeitig zu einer Einstreuung von Tumorzellen zu kommen. Wie im Knochenmark entwickeln sich auch in den Lymphknoten längst nicht alle Tumorzellen zu Mikrometastasen fort. Das scheint im wesentlichen Disseminaten von dedifferenzierten Tumoren, bzw. Tumoranteilen vorbehalten zu bleiben. Da Disseminate im Knochenmark häufiger nachgewiesen wurden als in den regionalen Lymphknoten, wird man zu meist davon ausgehen müssen, dass bei Befall der Lymphknoten sehr häufig auch das Mark betroffen ist.

5. ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die beiden großen und allgemeinen Ursachen des Versagens örtlicher Behandlungen des klinisch noch lokalisierten Prostatakarzinomes hingewiesen:

1. Die unvollständige Eradikation des Primärtumors durch radikale Prostatektomie oder Bestrahlung.
2. Mit den konventionellen Untersuchungsmethoden noch nicht erkennbare Tumoraussaaten.

Diese beiden entscheidenden Hindernisse auf dem Wege zur Heilung konnten in den letzten Jahren durch immer frühere Diagnose zum Teil umgangen werden. Es gelang aber nicht, sie direkt anzugehen oder gar zu beseitigen. Das ist umso bedauerlicher, als es trotz aller Frühdiagnostik und abgesehen von verspätet festgestellten Karzinomen, immer noch viele Patienten gibt, deren Schicksal eben durch sie entschieden wird. Dennoch scheinen Arbeitsergebnisse der letzten Jahre erstmals auch Hebelwerkzeuge mit direktem oder mittelbarem Ansatz an diesen Hindernissen zu liefern.

5.1. UNVOLLSTÄNDIGE ERADIKATION DES PRIMÄRTUMORS:

Die sorgfältige histologische Untersuchung des Schnittrandes von Prostatektomiepräparaten kann sicherlich sehr konkrete Hinweise auf eine unvollständige Eradikation des Primärtumors ergeben. Sowohl positive als und vor allem auch negative Schnittrandbefunde können jedoch trügen, da die histopathologische Beurteilung der marginalen Zonen des Op-Präparates häufig mit erheblichen Unsicherheiten behaftet ist. Sie ist sehr arbeitsaufwendig, setzt vor allem nach endokriner Vorbehandlung viel Erfahrung voraus und über die Beurteilungskriterien besteht kein Konsens (Epstein 1996). Es ist daher nicht verwunderlich, dass der Schnittrandbefund als hinreichend sicheres Merkmal einer vollständigen oder unvollständigen lokalen Tumoreradikation und damit auch als unabhängiger Prognosefaktor umstritten ist (Stamey *et al.* 2000; Graefen *et al.* 2003). Das gilt geradezu exemplarisch für endokrin vorbehandelte Patienten. Hier wurde der Schnittrandbefund aber sogar als Meßlatte des unmittelbaren Behandlungserfolges einge-

setzt. Trotz einer vielfach dokumentierten Reduktion tumorbefallener Schnittränder, geht dieser Effekt nicht mit einer Reduktion der biochemischen Progressionsrate einher (*Klotz et al. 1999; Aus et al. 1998; Witjes et al. 1997; Schulman et al. 2000; Baert et al. 1998; Soloway et al. 1997*).

Hinzu kommt, dass der Schnittrandstatus per se keine Beurteilung eines Therapieeffektes beim individuellen Patienten ermöglicht. Somit ist die Wertigkeit des negativen Schnittrandes als unmittelbares Erfolgskriterium einer wie auch immer gearteten Vorbehandlung sehr in Frage zu stellen.

Die eigenen Untersuchungen nach PPNET konnten dem Schnittrandstatus als unmittelbarem Beurteilungsparameter einer neoadjuvanten Therapie einen weiteren histologischen Parameter hinzufügen: den pT0-Befund. Auch wenn wie gezeigt dieser Befund in den allermeisten Fällen nicht im Sinne einer Eradikation des Primärtumors zu verstehen ist, so muss der pT0-Befund als der z.Zt. maximal erreichbaren morphologischen Therapieeffekt angesehen werden. Dieser war bei einem nicht unerheblichen Anteil der Patienten (rund 16%) nachweisbar. Wie beim Urothelkarzinom der Harnblase (*Schultz et al. 1994; Fair et al. 1990*) und den Germinalzelltumoren (*Einhorn 2002*) zeigt dieser histologische Befund, im Gegensatz zum Schnittrandbefund, zweifelsfrei, auch beim individuellen Patienten, dass die vorangegangene Behandlung tatsächlich wirksam war.

Ein großer Nachteil beider histologischer Parameter ist, dass sie nur am Op-Präparat, also erst nach Abschluss der Therapie erhoben werden können. Die Vorbehandlungsphase erfolgt somit bislang unkontrolliert nach einem willkürlich festgelegten Zeitschema. Durch die Vorbehandlung nach dem PPNET Konzept konnte diese Lücke erstmals durch einen objektiven, reproduzierbaren Messwert geschlossen werden: den PSA-Nadir.

Solange der PSA-Wert fällt (Zeit bis zum PSA-Nadir), muss beim derzeitigen Wissensstand auch von der Wirksamkeit der eingesetzten Behandlung ausgegangen werden. Eine endokrine Vorbehandlung bis zum Erreichen des PSA-Nadirs ist daher plausibel. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass der PSA-Nadir in Abhängigkeit vom initialen PSA-Wert, der Tumormasse sowie dem Ansprechen auf die Behandlung nach sehr unterschiedlichen Behandlungszeiträumen erreicht wird. Ferner ist der erreichbare Tiefstwert von Patient zu Patient unterschiedlich und liegt vielfach deutlich unter der Nachweisgrenze konventioneller PSA-Meßsysteme. Daher sollte zur Therapiesteuerung unbedingt eines der supersensitiven Bestim-

mungsverfahren, wie beispielsweise der Immulite 3th generation assay (untere Nachweisgrenze von 0,003 ng/ml) verwendet werden (*Witherspoon 1997*). Zusammenfassend ist der PSA-Nadirwert ein sehr objektiver Parameter, mit dessen Hilfe man, im Gegensatz zum Schnittrandbefund, individuell den rationalen Endpunkt der Vorbehandlung bestimmen kann.

Aus den genannten Gründen sollte in zukünftigen Studien über die Wirksamkeit wie auch immer gearteter neoadjuvanter Behandlungen bei Patienten mit Prostatakarzinom nicht mehr der Schnittrandbefund als alleiniges unmittelbares Beurteilungskriterium eingesetzt werden, sondern der PSA-Nadir einerseits und der pT0-Befund andererseits hinzu gefügt werden. *Pettaway et al. 2000* haben zwischenzeitlich erstmalig den pT0 Befund als unmittelbares Erfolgskriterium einer chemohormonellen, neoadjuvanter Behandlungsstudie eingesetzt. Interessanterweise kam es aber bei keinem ihrer Patienten dazu. Offensichtlich wird die Wirkung von PPNET auf den Primärtumor derzeit von keiner anderen medikamentösen Behandlung übertroffen.

5.2. SUBKLINISCHE TUMORAUSSAATEN

Was die subklinischen Tumoraussaaten betrifft, sind zunächst 2 Begriffe klar zu unterscheiden:

- Tumorzellstreuungen (Disseminate)
- Mikrometastasen

In der Literatur werden diese beiden Begriffe häufig nicht deutlich unterschieden, was zu Missverständnissen in der Diagnostik, Prognostik und Therapie geführt hat und führt.

Als Tumorzellstreuungen (Disseminate) sollten ins Blut, Lymphknoten oder Knochenmark disseminierte Tumoreinzelzellen bezeichnet werden.

Die Bezeichnung Mikrometastase sollte dahingegen nur Tumorzellansammlungen (Konglomeraten) vorbehalten bleiben, die durch Proliferation von disseminierten Einzelzellen entstanden sind und durch Neoangiogenese eine eigene Blutversorgung aufgebaut haben.

Diese Unterscheidung erscheint von Bedeutung, weil sich anhand der eigenen Untersuchungsergebnisse in Zusammenschau mit der Literatur die folgenden Grundaussagen für Diagnose, Prognose und Therapie ergeben:

- Tumorzellstreuungen sind leicht, Mikrometastasen dahingegen schwierig zu diagnostizieren.
- Die Prognose von Disseminaten ist variabel, die von Mikrometastasen wahrscheinlich immer schlecht.
- Disseminate sind wirksam behandelbar, inwieweit Mikrometastasen therapierbar sind, ist bislang unklar.

Die weiteren Ausführungen erläutern die gemachten Aussagen näher:

In den vorangehenden Kapiteln wurden die eigenen Ergebnisse der intensiven Beschäftigung mit der Detektion von Tumorzellstreuungen in Lymphknoten und Knochenmark dargestellt. Dabei zeigte sich, dass es im langen Verlauf der Prostatakarzinomerkrankung schon sehr frühzeitig zu Tumorzellstreuungen in die genannten Zielgebiete kommen kann. Eine Erklärung für diesen Befund liefern tierexperimentellen Untersuchungen, die zeigen konnten, dass Tumorzellausstreuungen ins Blut stattfinden erst und sobald eine Gruppe von Tumorzellen Gefäßanschluss durch Neoangiogenese gefunden hat (Liotta et al. 1974; Folkman 1995). Dies geschieht sehr frühzeitig im Verlauf der Tumorentwicklung und ist schon bei einem Tumolvolumen von nur $0,4\text{-}3\text{mm}^3$ absolute Voraussetzung des weiteren Wachstums.

Im Knochenmark konnten Tumoreinzelzellen deutlich häufiger als im Blut, aber auch häufiger als in den regionalen Lymphknoten festgestellt werden. Ersteres scheint also eine gewisse Filterfunktion zu besitzen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung scheint die Häufigkeit des Knochenmarkbefalls, wenn überhaupt, nur wenig zuzunehmen. Das erklärt zwanglos warum T-Stadium, Differenzierungsgrad und PSA-Wert ebenfalls nicht oder kaum mit der Häufigkeit des Knochenmarkbefalls korrelieren.

Die relative Konstanz der Knochenmarkbesiedelung über weite Strecken der Tumorentwicklung ließ vermuten, dass es einen recht effektiven, spontanen Eliminationsmechanismus der gestreuten Tumorzellen geben muss. Gäbe es ihn nicht, müsste es mit der Zeit eine deutliche Kumulierung der Disseminate geben. Dieser spontane Eliminationsmechanismus konnte in Wiederholungsuntersuchungen auch direkt nachgewiesen werden. So führten *Mansi et al. 1989* bei 21 Patientinnen mit Brustkrebs, bei denen initial Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen wurden, postoperative Kontrollpunktionen durch. Alle Patientinnen befanden sich

zu diesem Zeitpunkt (4 - 56 Monate postoperativ) in kompletter Tumorremission. Disseminierte Tumorzellen konnten nur noch bei 2 der ursprünglich 21 Frauen mit Befall festgestellt werden. Bei 90 % dieser kleinen Patientenserie war es also zu einer spontanen Elimination der Disseminate gekommen. Sowohl die vorgestellten eigenen Untersuchungsergebnisse (s. Kapitel 3.2.) als auch andere Autoren (*Melchior et al. 1997*) konnten diesen Eliminationsmechanismus auch bei Prostatakarzinompatienten aufzeigen, wenngleich er hier nicht so ausgeprägt zu sein scheint.

Somit sind im wesentlichen zwei Tatsachenkomplexe in Einklang zu bringen:

1. Ohne Tumorzellausstreuerungen können keine Mikrometastasen entstehen
2. Viele Tumorzellausstreuerungen, wahrscheinlich sogar die meisten, führen nie zu Mikrometastasen.

Die scheinbare Widersprüchlichkeit dieser beiden Fakten kann nur durch die Annahme beseitigt werden, dass es Streuzellen unterschiedlicher „Virulenz“ gibt. Manche sind „avirulent“ und andere sind „hoch virulent“. Die avirulenten Streuzellen werden folgenlos beseitigt oder verbleiben und verhalten sich stumm. Die Virulenten nisten sich ein, vermehren sich, führen zu Gefäßneubildungen, der Entwicklung von Mikrometastasen, die wiederum streuen, weiter wachsen und sich zu Makrometastasen entwickeln.

Schon die klinische Beobachtung gibt weitere Hinweise zur tatsächlichen Existenz dieser beiden Zelltypen. So müssen die sehr frühen Ausstreuerungen (bei kleinen Tumoren und niedrigem Tumorstadium) vorwiegend aus „avirulenten“ Zellen bestehen, die folgenlos wieder eliminiert werden oder zumindest in einem inaktiven Zustand verharren. Anders wären die guten Ergebnisse der Lokalbehandlung früh erkannter Karzinome nicht zu erklären.

Dagegen müssen sich die im Verlauf der Tumorerkrankung späteren Disseminate (bei größeren Tumoren und fortgeschrittenerem Tumorstadium) in weit höherem Maße aus „virulenten“ Zellen rekrutieren, die sehr wohl in der Lage sind die metastatische Kaskade anzuwerfen. So berichteten *van den Ouden et al. 1998* bei Patienten die wegen cT3 Tumoren radikal prostatektomiert wurden über 31 bzw 50 % Fernmetastasen nach 5 und 10 Jahren.

Damit stellt sich die Frage, warum die früh ausgestreuten Zellen zumeist weniger „virulent“ sind als ihre spät ausgesäten Nachfolger.

Die folgenden Einzelbeobachtungen liefern in ihrer Zusammenschau eine schlüssige Erklärung:

1. Die Tumordifferenzierung nimmt mit zunehmender Tumorgöße und ansteigendem klinischem Tumorstadium ab. Das geht u.a, sehr eindrucksvoll aus den sehr großen Datensammlungen von *Hull et al. 2002* (1000 T-2 Fälle) und *Morgan et al. 1993* (232 T3 Fälle) hervor (Tabelle 42).

cT-Stadium	Gleasonsumme 7-10
T1a	0 %
T1b	18,2 %
T1c	24%
T2a	24%
T2b	31%
T2c	40%
T3	44%

Tabelle 42: Häufigkeit undifferenzierter Primärtumoren (Gleasonsumme 7-10) in Relation zum cT Stadium

2. Die Zellen initialer und daher kleiner, sowie vorwiegend differenzierter Tumoren haben zumeist ein niedriges Proliferationspotenzial. Die Zellen fortgeschrittener und daher ausgedehnter sowie vorwiegend niedrig differenzierter Karzinome sind dahingegen mit einem hohen Proliferationspotenzial ausgestattet (*Harper et al. 1992; Borre et al. 1998*).
3. Das unter den Punkten 1 und 2 Gesagte gilt auch für die jeweiligen Disseminate. *Cher et al. 1999* untersuchten das Proliferationsverhalten (Mib-1) von in das Knochenmark gestreuten Prostatakarzinomzellen bei 46 Patienten. Bei einem erheblichen Anteil (32%) konnte keine einzige proliferierende Zelle festgestellt werden. Bei den restlichen Patienten (68%) schwankte der Anteil proliferierender Zellen zwischen nur 9% einerseits und 100 % andererseits. Hinzu kommt, dass die Häufigkeit proliferierender Zellen in einem direkten Verhältnis zur Gleasonsumme stand ($p=0.038$). Die Disseminate niedrig differenzierter Primärtumoren (Gleasonsumme ≥ 7) waren mit einem deutlich

höheren Proliferationspotenzial ausgestattet, als die besser differenzierter Tumore (Gleasonsumme ≤ 6)

4. Inzwischen stellten *Bianco et al. 2001* fest, dass es bei ihren Patienten mit nachweislich proliferierenden Streuzellen im Knochenmark schon im Verlauf eines sehr kurzen Beobachtungszeitraumes (Median 23,6 Monate – zwischen 6-45 Monate) deutlich häufiger (24%) zur biochemischen Progression kam, als bei Patienten mit Streuung ohne Proliferation (3%; $p=0,02$). Bevor man weiter reichende Schlüsse aus dieser Arbeit zieht, müssen die Ergebnisse jedoch durch weitere Veröffentlichungen bestätigt werden.
5. Es ist aber nicht nur die Zellproliferation, die mit zunehmender Desdifferenzierung des Primärtumors sowohl in diesem, als auch seinen Disseminaten zunimmt. *Kuniyasu et al. 2000* stellten einen engen und direkten Zusammenhang zwischen der Gleasonsumme und der Expression metasenförderlicher Gene wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und VPF (*vascular permeability factor*) (Neoangiogenese), MMP 2 und 9 (*Matrix Metalloproteinasen*) (Invasion) fest.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Im langen Verlauf der Prostatakarzinom-erkrankung scheint sich die Häufigkeit von Tumorzellstreuungen ins Knochenmark nicht wesentlich zu ändern. Einhergehend mit der zunehmenden Tumorgroße und dem zunehmendem Malignitätsgrad bei fortschreitender Erkrankung, ändert sich jedoch die „Virulenz“ der Tumorzell-disseminate. Sowohl ihr proliferatives als auch ihr neoangiogenetisches Potenzial nehmen zu. Das ermöglicht und erleichtert die Bildung von Mikrometastasen, wodurch im Kreisschluss das Fortschreiten der Krankheit wiederum beschleunigt wird.

Die vorangehend aufgestellte Theorie beseitigt die Widersprüchlichkeit vieler Arbeitsergebnisse. Ihre Validierung bedarf aber weiterer Fakten. Hinzu kommt: der hier postulierte Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad, ausgedrückt in der Gleasonsumme und der „Virulenz“, der Disseminate, bedarf sicherlich einer weiteren Präzisierung auch auf der histopathologischen Seite. *Stamey et al. 1999* konnten an einer großen Serie radikal prostatektomierter Patienten ($n=379$), die über einen Zeitraum von mindestens 3 Jahre beobachtet wurde feststellen, dass die Bestimmung des Prozentsatzes des Gleason Grad 4/5 Anteils am Gesamt-

mor die prognostische Aussagekraft des Befundes ganz erheblich verbessert. Bei Patienten ohne Gleasonmuster 4/5 Anteil lag die Quote biochemischer Progressionen bei nur 5,6% von 72 Patienten. Mit ansteigendem prozentualen Anteil stieg auch die Progressionshäufigkeit linear an. Bei einem Gleason 4/5 Anteil von 31-40% entwickelten bereits deutlich mehr als die Hälfte der Patienten einen Progress. Diese Rezidivquote stieg sogar auf 87 % bei noch höheren G4/5 Anteilen. Solche Informationen gehen bei der lediglichen Angabe des Gleasonsummenwertes verloren. So können Tumoren mit der Gleasonsumme 7 von 5 bis 95 % G4/5 Anteile enthalten und deshalb eine ganz wesentlich unterschiedliche Prognose haben.

Die Beobachtung, dass T1c Karzinomen bereits einen medianen Gleason 4/5 Anteil von 10 % haben, der sich bei T2b Tumoren auf 20% verdoppelt hat (Stamey et al. 1998) könnte auch erklären, warum manche Tumoren, obwohl sie sich noch in einem sehr frühen Stadium befinden, bereits metastasieren.

5.3. BEZUG ZUR KLINIK

5.3.1. Diagnose subklinischer Tumorzellstreuungen

Tumorzellstreuungen lassen sich, wie dargelegt, mit unterschiedlichen Methoden im Blut, Lymphknoten und Knochenmark zweifelsfrei nachweisen. Insbesondere die derzeit zumeist verwendeten molekularbiologischen Methoden erlauben jedoch nicht die Unterscheidung zwischen disseminierten Tumoreinzellen und Mikrometastasen.

Der definitive Nachweis von Mikrometastasen bei Prostatakarzinompatienten ist derzeit, wenn überhaupt, nur nach äußerst aufwendiger histologischen Untersuchung des Lymphadenektomiepräparates möglich. Es gibt jedoch weitere klinische Konstellationen bei denen von einer okkulten Mikrometastasierung auszugehen ist:

- Bei radikal prostatektomierten Patienten mit PSA-Persistenz nach Ausschluß von lokalen Tumorresiduen.
- Wenn im Lymphadenektomiepräparat Metastasen festgestellt wurden. Angesichts dieses Befundes gehen die meisten Autoren bereits von einer syste-

mischer Ausbreitung der Erkrankung in Gestalt von Mikrometastasen aus (Übersicht bei *Huland 1998*).

- Bei radikal prostatektomierten Patienten mit biochemischer Progression, wenn: a) ein lokales Rezidiv durch Biopsie bzw. Bestrahlung ausgeschlossen werden konnte, b) der Primärtumor über 5% Gleasongrad 4/5 Anteile enthielt. c) die biochemische Progression frühzeitig (innerhalb von 6 Monaten nach der Operation) auftritt und die PSA-Verdoppelungszeit unter 6 Monaten liegt (*Partin et al. 1994*)
- Bei positiver PSA RT-PCR im Blut oder Knochenmark nach radikaler Prostatektomie, wenn der Eingriff einige Monate zurückliegt, vor allem, wenn präoperativ keine Disseminate festgestellt werden konnten.

In einer Untersuchung von *Shariat et al. 2003* war die präoperativ positive PSA-RT-PCR im Blut kein negativer Prognosefaktor. Fiel sie jedoch 6 – 8 Wochen nach radikaler Prostatektomie positiv aus, war das sehr wohl der Fall. Bei den Patienten mit negativer postoperativer PSA-RT-PCR lag die Rezidivquote bei 18%. Bei den Patienten mit postoperativ positivem Befund hingegen lag die biochemische Rezidivrate bei 45% ($p=0.022$). Gleichzeitige Untersuchungen mittels Serum-PSA Messungen ergaben interessanterweise selbst bei Verwendung einer hypersensitiven Meßmethode (Immulite third generation assay®) nur bei einem der PSA-RT-PCR positiven Patienten einen suspekten Wert. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass die PSA-RT-PCR im Blut 6-8 Wochen nach radikaler Prostatektomie Patienten mit hohem Rezidivrisiko zu erkennen vermag und zwar bevor selbst hypersensitive PSA Bestimmungsmethoden diesbezügliche Hinweise geben können.

Nicht ganz so eindrucksvoll sind die von *Ellis et al. 2003* publizierten Daten. Von 14 Patienten in kompletter Remission nach mindestens 5 Jahren hatten 4 (29%) ein befallenes Knochenmark. Bei immerhin 2 derselben kam es im weiteren Verlauf zu einer biochemischen Progression. *Braun et al. 2000* untersuchten immunzytologisch Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen 3 Wochen nach Abschluss der Primärtherapie (Operation + Radiatio + adjuvante Chemotherapie). Auch hier zeigte sich, dass Patientinnen mit positivem Befund eine deutlich schlechtere Prognose als Patientinnen mit unauffälligem KM aufwiesen. Von 23 Patientinnen mit nach Primärtherapie befallenen Knochenmark bekamen 57%

Knochenmetastasen. Bei unauffälligem KM-Befund lag die Rate nur bei 13% ($p=0.0005$). In erstgenannter Gruppe verstarben im weiteren Verlauf 43 % der Patientinnen am Tumor. In der Patientengruppe mit unauffälligem KM-Befund lag die Rate nur bei 9% ($p=0.0033$).

Während aus den Zitaten hervorgeht, dass Tumorzelldisseminate sowohl im Blut als auch im Knochenmark nach Entfernung des Primärtumors eine sehr negative prognostische Bedeutung haben, erscheint die pathogenetische Interpretation der Tumorzelldisseminate unbefriedigend.

Sowohl *Shariat et al. 2003* als auch *Braun et al. 2000* vermuten, dass es sich um persistierende Disseminate des Primärtumors handelt, die aufgrund besonderer Eigenschaften häufig zu Rezidiven führten.

Die Persistenztheorie mag für manche Fälle zutreffen. Plausibler erscheint jedoch eine andere Erklärung: Disseminate nach Entfernung des Primärtumors, ob im Blut oder Knochenmark, sind mit Ausnahme der unmittelbar postoperativen Situation nicht als Residuen präoperativ stattgehabter Streuungen aus dem Primärtumor anzusehen. Vielmehr stammen sie zu einem erheblichen Anteil bereits aus Mikrometastasen, also Tumorzellansiedelungen mit Gefäßanschluss oder anlässlich der Operation lokal belassener Tumorreste.

Diese Theorie würde ganz zwanglos die wesentlich schlechtere Prognose postoperativer im Vergleich zu präoperativen Disseminaten erklären. Von streuenden Mikrometastasen sollte man in der postoperativen Situation wahrscheinlich vor allem ausgehen wenn:

1. präoperativ keine Streuung festgestellt werden konnte.
2. Der Primärtumor desdifferenziert war bzw. desdifferenzierte Anteile enthielt.

Weitere Untersuchungen zur Mikrometastasendiagnostik sind dringend erforderlich. Je früher sie festgestellt werden können, desto größer werden wahrscheinlich die therapeutischen Chancen sein.

Der PCR-basierten Diagnostik könnte hier möglicherweise eine Schlüsselrolle zukommen. Bereits ab einer Tumormasse von 0,4 mg ist vom Vorliegen von Mikrometastasen auszugehen (*Liotta et al. 1974*). Basierend auf den Berechnungen von *Stamey et al. 1989* würde von dieser Tumormenge ein PSA-Wert von ca. 0,001 ng/ml produziert. Hier stoßen selbst supersensitive PSA-Meßsysteme an ihre

Nachweisgrenze. Diese Überlegung wird auch von den Untersuchungsergebnisse von *Shariat et al. 2003*, wie bereits weiter oben ausführlicher diskutiert, gestützt. Unklar ist bislang der optimale Zeitpunkt des Beginns von derartigen Kontrollen. Drei Monate nach der radikalen Prostatektomie erscheint a priori sinnvoll. Als Untersuchungsmedium bieten sich primär Blutuntersuchungen an, da sie für den Patienten minimal belastend sind und somit unbegrenzt Verlaufskontrollen möglich sind. Dringend benötigt wird hierzu ein karzinomspezifischer Marker. Die Sensitivität der Untersuchungen könnte durch die Kombination von Primern sicherlich erhöht werden (s. Tabelle 22). Eine höhere Spezifität ließe sich wahrscheinlich durch den Einsatz der MSP zum Nachweis der GSTP1-CpG-Insel Hypermethylierung erzielen. Erfahrungen aus unserer Arbeitsgruppe liegen hierzu bereits vor (*Köllermann et al. 2003; Goessl et al. 2000*). Untersuchungen des Knochenmarks wären aufgrund der anzunehmenden Filterfunktion desselben wohlmöglich ertragreicher. Die größere Invasivität der Untersuchung dürfte ihrer allgemeinen Akzeptanz allerdings im Wege stehen.

5.3.2. Therapie subklinischer Tumorzellstreuungen

In den vorangegangenen Ausführungen wurde aufgezeigt, dass Tumorzellstreuungen bei Patienten mit Prostatakarzinom nicht in jedem Falle behandlungsbedürftig sind. Behandlungsbedürftigkeit besteht wahrscheinlich entsprechend der oben aufgestellten Theorie nur bei „virulenten“, also aus desdifferenzierten Tumoren stammenden Disseminaten. Wie im Kapitel 3.1. ausgeführt, schwanken die Häufigkeitsangaben über Disseminate ausserordentlich stark und es wurde der Verdacht ausgesprochen, dass es wahrscheinlich bei den meisten, wenn nicht allen Patienten, eher früher als später, zu einer Streuung kommt. Aus dieser Überlegung heraus scheint es beim derzeitigen Stand des Wissens sinnvoll bei allen Patienten mit desdifferenzierten Tumoren oder Tumoranteilen, unabhängig davon ob eine Dissemination nachgewiesen werden kann oder nicht, von einem systemischen Behandlungsbedarf auszugehen. Dies umso mehr als in dieser Situation auch eine bereits stattgehabte Mikrometastasierung nie ausgeschlossen werden kann. Diese sehr weit gefasste Indikation setzt aber eine möglichst exakte Bestimmung des Differenzierungsgrades der Geschwulst voraus. Die schon zitierten

Untersuchungen von Stamey et al. 1999 zeigen, dass es dabei besonders auf die möglichst exakte Bestimmung des Anteils von Gleason 4/5 ankommt.

Im Gegensatz zu den Tumorzellstreuungen sind Mikrometastasen, soweit sie fundiert vermutet, bzw. tatsächlich diagnostiziert werden können, auf jeden Fall behandlungsbedürftig.

Zwischen Behandlungsbedürftigkeit und Behandlungsmöglichkeit liegt allerdings ein tiefer Graben. Das Wissen über die Behandlungsmöglichkeiten von Tumorzellstreuungen und Mikrometastasen ist derzeit außerordentlich spärlich und von Widersprüchlichkeiten geprägt.

Braun et al. 2000 untersuchten bei 59 Patientinnen mit Brustkrebs die Auswirkung der adjuvanten Chemotherapie (unterschiedlicher Regime) auf Disseminate im Knochenmark. Vor Beginn der Behandlung wiesen 49 % der Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark auf. Danach waren es immer noch 42%. Bei den Patientinnen mit primärem Befall (n=29) konnte die Häufigkeit desselben zwar um fast die Hälfte (auf 52%) deutlich reduziert werden; von den initial virginellen Markproben (n=30) wiesen aber 11 (37%) einen Befall nach Abschluss der Therapie auf. Die Autoren betiteln ihre Arbeit daher :“Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high risk breast cancer patients.”

In den eigenen Untersuchungen zeigen nur noch 21% der initial KM-positiven Patienten ein KM-Befall. Im Vergleich zu *Braun et al. 2000* fand sich auch eine deutlich geringere Positivkonversionrate (23% vs. 37%), obwohl der Primärtumor der eigenen Patienten im Gegensatz zu den Patientinnen von *Braun et al. 2000* noch nicht entfernt worden war.

Die Autoren führen die relativ geringe Wirksamkeit der Chemotherapie mit Anthracyclinen und Taxanen bei ihren Patientinnen auf die geringe Proliferationsrate der gestreuten Zellen zurück.

Wie dem auch sei, zusammenfassend bleibt festzuhalten: Im Vergleich zur Chemotherapie scheinen disseminierte Tumorzellen besser auf die endokrine Therapie anzusprechen. Zusätzlich scheint das Wirkspektrum breiter zu sein, da die eigenen Untersuchungen ein gleich gutes Ansprechen disseminierter Tumorzellen von hoch- bis mäßig differenzierten Tumoren als auch gering differenzierten Tumoren ergaben. Allerdings musste auch in den eigenen Untersuchungen nach

Abschluss der endokrinen Induktion eine relativ hohe Positivkonversionsrate (prä negativ – post positiv) von 23 % festgestellt werden. Somit wird deutlich, dass die endokrine Vorbehandlung zwar in einem hohen Prozentsatz der Patienten (rund 80% in der eigenen Untersuchung) disseminierte Tumorzellen im KM eliminiert, der Primärtumor dennoch als permanente Streuquelle auch unter Therapie fungiert. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen auch *Ogawa et al. 1999* anhand von Blutuntersuchungen.

Diese Daten lassen es zunächst sinnvoll erscheinen die präoperative, endokrine Behandlung auch postoperativ (adjuvant) über einen gewissen Zeitraum fortzusetzen. In der radiologischen Behandlung scheint sich dieses Vorgehen bewährt zu haben (*Pilepich et al. 2001; Hanks et al. 2003; Laverdiere et al. 2004*).

Leider liegen derzeit keine direkten Daten zum Thema Behandlung von Mikrometastasen vor. Auf die Schwierigkeiten, aber auch eventuellen Möglichkeiten Mikrometastasen zu diagnostizieren wurde ausführlich hingewiesen: Patienten mit Metastasen im Lymphadenektomiepräparat sowie mit biochemischer Progression nach radikaler Prostatektomie und solche mit postoperativ nachgewiesenen Disseminaten. In der erstgenannten Gruppe konnten *Messing et al. 1999* sehr konkrete indirekte Hinweise für die Wirksamkeit der endokrinen Therapie erarbeiten. Sie berichteten über eine Gruppe von radikal prostatektomierten Patienten (n=98), bei denen die histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen. Siebenundvierzig Patienten bekamen, beginnend unmittelbar nach dem Eingriff, eine endokrine Behandlung. Einundfünfzig wurden lediglich beobachtet. In einem medianen Beobachtungszeitraum von 7 Jahren starben 7 (15%) der adjuvant Therapierten. In der unbehandelten Kontrollgruppe waren es 18 (35%) ($p=0,02$). Zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung befanden sich 77% der behandelten und nur 18% unbehandelten Patienten in kompletter Remission ($p=0,001$).

Aufgrund der allgemeinen Erfahrung mit der endokrinen Behandlung von Patienten mit Prostatakarzinom liegt es auf der Hand zu vermuten, dass die endokrine Behandlung von Mikrometastasen ebenfalls nur einen zeitlich begrenzten suppressiven Effekt hat, aber nicht in der Lage ist mikrometastatische Tumorfoci tatsächlich zu beseitigen.

Dennoch liegen auch Ergebnisse vor, die für letzteres sprechen könnten. So berichten *Schulman et al. 2000*, dass in der großen (402 Patienten), europäischen,

prospektiven, randomisierten Studie - 3 Monate neoadjuvante endokrine Therapie vs. sofortige Prostatektomie – sowohl bei den cT2 als auch bei den cT3 Fällen mit endokriner Vorbehandlung seltener Lymphknotenmetastasen festgestellt wurden als bei den unvorbehandelten Patienten. Bei den cT2 Fällen war der Unterschied statistisch signifikant ($p=0.01$).

Gleave et al. 2001 verglichen in einer ebenfalls sehr großen (547 Patienten), prospektiven, randomisierten Studie – 3 Monate vs 8 Monate neoadjuvante endokrine Therapie. Bei den 8 Monate vorbehandelten Patienten lag die Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen ebenfalls deutlich niedriger (0,4%) als in der konventionell therapierten Gruppe (3,1%). Auch hier war der Unterschied statistisch signifikant ($p=0.016$). In beiden Studien scheint es zu einer Abnahme von Lymphknotenmetastasen unter endokriner Behandlung gekommen zu sein. Wäre dies tatsächlich der Fall, könnte auch mit der Elimination von Mikrometastasen im Gefolge dieser Therapie gerechnet werden. Gewicht bekommt diese Vermutung auch durch die Tatsache, dass es im Gefolge von PPNET zu pT0 Befunden im Prostatektomiepräparat kommen kann.

Die aufgeführten Daten zur zytostatischen und endokrinen Behandlung von Disseminaten, vor allem aber von Mikrometastasen lassen erkennen, dass keine der beiden Therapiemöglichkeiten von optimaler Wirksamkeit ist. Eine Kombination beider wird daher z. Zt. in einer Reihe von prospektiven, neoadjuvanten Studien geprüft. Überzeugende Ergebnisse liegen derzeit jedoch nicht vor (Yu and Oh 2003). Größere Hoffnungen werden auch auf zielgerichtete molekulare Therapien gesetzt. Angesichts der zentralen Bedeutung der Angiogenese für die Entstehung von Mikrometastasen erscheinen antiangiogenetische Therapieansätze besonders vielversprechend (*Uehara 2003, Ng et al. 2004, Blackledge 2003*).

5.4. FAZIT:

Die vorliegende Arbeit hat sich mit 3 Themenkreisen beschäftigt:

- der prolongierten, neoadjuvanten endokrinen Therapie
- Tumorzelldisseminaten
- der Entstehung von Mikrometastasen und ihrer Verhütung, Diagnostik und gegebenenfalls Behandlung bei Patienten mit klinisch lokalisierten Prostatakarzinom

Die Tatsache, dass es im Gefolge der prolongierten, neoadjuvanten, endokrinen Behandlung (hier PPNET) erstmals zu nennenswerten pT0-Quoten kommt und häufig auch die Disseminate im Knochenmark verschwinden zeigt, dass die endokrine Behandlung nach wie vor die effektivste medikamentöse Therapie im Einsatz gegen die Rezidivrisiken bei Patienten mit klinisch noch lokalisiertem Prostatakarzinom ist. Da diese Risiken bei vielen Patienten erheblich sind, wird weiterhin versucht ihnen durch neoadjuvante, adjuvante und kombinierte Behandlungen zu begegnen. Hier wird man, zumindest in naher Zukunft, neben neuen Medikamenten nicht auf die Kombination mit der Hormonbehandlung verzichten können.

Die Detektion von Disseminaten in Blut, Knochenmark und Lymphknoten hat in den letzten beiden Jahrzehnten erhebliche Fortschritte gemacht. Von immunhistologischen über PCR-basierte Techniken konnte die Sensitivität erheblich erhöht werden. Die Etablierung der methylierungsspezifischen PCR (MSP) zum Nachweis der GSTP1-Promotor Hypermethylierung hat auch der Spezifität dieser Untersuchung einen erheblichen Schub vermittelt. Erste eigene Untersuchungen konnten die Anwendbarkeit der Methode auch unter antiandrogener Therapie zeigen (*Köllermann et al. 2006*). Im Gegensatz zur androgenabhängigen PSA Expression wäre somit der Nachweis der GSTP1-Promotor Hypermethylierung auch zum molekularen Therapiemonitoring des mikroresiduellen Prostatakarzinoms in der adjuvanten Situation von Interesse.

Die einschlägigen Studien haben gezeigt, dass Tumorzellstreuungen schon in einem sehr frühen Stadium der Tumorentwicklung auftreten. Wahrscheinlich kommt es bei allen Patienten mit Prostatakarzinom schon frühzeitig dazu. Die Frage, ob bei einem bestimmten Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom präoperativ eine Dissemination nachgewiesen werden kann oder nicht, erscheint daher zumindest für den Kliniker nicht von großer Bedeutung (siehe hierzu auch *Slovin und Scher 1998*). Ganz wichtig scheint es aber nach wie vor auszuloten, welche Bedeutung dieser Untersuchung postoperativ in der Mikrometastasendiagnostik zukommt.

Es hat sich gezeigt, dass vor allem die Disseminate undifferenzierter Tumoren „angehen“ und Mikrometastasen bilden. Das Risiko einer „virulenten“ Streuung wird also durch das Vorhandensein eines dedifferenzierten Tumors bzw. Tumorteiles bestimmt. Es gilt daher vor allem diesen zu erkennen. Die langjährigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe aus Stanford (*Stamey et al. 1999*) haben ge-

zeigt, dass der absolute oder prozentuale Anteil von Gleasongrad 4/5 im Primärkarzinom von entscheidender prognostischer Bedeutung ist. Diese Untersuchung präzisiert die Aussage der Gleasonsumme erheblich.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass es schon früh in der Entwicklung des Prostatakarzinomes zu einer Tumorzell dissemination kommt. Dieser Prozeß ist die Voraussetzung für die Entwicklung von Mikrometastasen sind.

Hierbei kommt den Disseminaten von dedifferenzierten Tumoren bzw. Tumoran teilen eine besondere Bedeutung zu. Dennoch ist das Wissen über den tatsächlichen Ablauf der Mikrometastasenentstehung nach wie vor sehr lückenhaft. Aus eben diesem Forschungsbereich sind aber die entscheidenden Hinweise zur Therapieoptimierung des Prostatakarzinoms zu erwarten.

Literatur:

- Amling, C. L., Blute, M. L., Lerner, S. E., Bergstrahl, E. J., Bostwick, D. G. and Zincke, H. (1998) Influence of prostate-specific antigen testing on the spectrum of patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy at a large referral practice. *Mayo Clin Proc*, 73: 401-6
- Amling, C. L., Blute, M. L., Bergstrahl, E. J., Seay, T. M., Slezak, J. and Zincke, H. (2000) Long-term hazard of progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: continued risk of biochemical failure after 5 years. *J Urol*, 164: 101-5
- Aus, G., Abrahamsson, P. A., Ahlgren, G., Hugosson, J., Lundberg, S., Schain, M., Schelin, S. and Pedersen, K. (1998) Hormonal treatment before radical prostatectomy: a 3-year followup. *J Urol*, 159: 2013-6
- Aus, G., Abbou, C. C., Pacik, D., Schmid, H. P., Van Poppel, H., Wolf, J. M. and Zattoni, F. (2001) EAU Guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*, 40: 97-101
- Baert, L. V., Goethuys, H. J., de Ridder, D. J., Werbrouck, P., Ackaert, K., Decoster, M. I. and van Poppel, H. P. (1998) Neoadjuvant treatment before radical prostatectomy decreases the number of positive margins in cT2-3 but has no impact on PSA progression or survival in stage cT2-3. *J Urol*, 157 (Suppl): A 619
- Bang, Y. J., Pirnia, F., Fang, W. G., Kang, W. K., Sartor, O., Whitesell, L., Ha, M. J., Tsokos, M., Sheahan, M. D., Nguyen, P., Niklinski, W.T., Myers, C.E. and Trepel, J.B. (1994) Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 5330-4
- Barnes, R. W. (1964) Nonoperative treatment of operative carcinoma of the prostate. *Proc Natl Cancer Conf*, 5: 323-6
- Bastian, P. J., Nakayama, M., De Marzo, A. M. and Nelson, W. G. (2004) GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular marker of prostate cancer. *Urologe A*, 43: 573-9
- Bazinet, M., Zheng, W., Begin, L. R., Aprikian, A. G., Karakiewicz, P. I. and Elhilali, M. M. (1997) Morphologic changes induced by neoadjuvant androgen ablation may result in underdetection of positive surgical margins and capsular involvement by prostatic adenocarcinoma. *Urology*, 49: 721-5
- Bellavance, G. and Fradet, Y. (1996) Influence of neoadjuvant hormone therapy on PSA response and pathological stage at radical prostatectomy. *J Urol*, 155: 651A
- Bianco, F. J., Jr., Wood, D. P., Jr., Gomes de Oliveira, J., Nemeth, J. A., Beaman, A. A. and Cher, M. L. (2001) Proliferation of prostate cancer cells in the bone marrow predicts recurrence in patients with localized prostate cancer. *Prostate*, 49: 235-42
- Blackledge, G. (2003) Growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; clinical development and potential for prostate cancer therapy. *J Urol*, 170: 77-83
- Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L. and Ciomei, M. (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, 63: 1714-20
- Bonkhoff, H., Stein, U. and Remberger, K. (1993) Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 423: 291-4
- Bono, A. V., Pagano, F., Montironi, R., Zattoni, F., Manganelli, A., Selvaggi, F. P., Comeri, G., Fiaccavento, G., Guazzieri, S., Selli, C., Lembo, A., Cosciani-Cunico, S., Potenzoni, D., Muto, G., Diamanti, L., Santinelli, A., Mazzucchelli, R. and Prayer-Galletti, T. (2001) Effect of complete androgen blockade on pathologic stage and resection margin status of prostate cancer: progress pathology report of the Italian PROSIT study. *Urology*, 57: 117-21
- Borre, M., Bentzen, S. M., Nerstrom, B. and Overgaard, J. (1998) Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol*, 159: 1609-14
- Braun, S., Kenterich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H. and Pantel, K. (2000) Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 18: 80-6
- Bretton, P. R., Melamed, M. R., Fair, W. R. and Cote, R. J. (1994) Detection of occult micrometastases in the bone marrow of patients with prostate carcinoma. *Prostate*, 25: 108-14
- Brooks, J. D., Weinstein, M., Lin, X., Sun, Y., Pin, S. S., Bova, G. S., Epstein, J. I., Isaacs, W. B. and Nelson, W. G. (1998) CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 531-6
- Byar, D. P. (1972) Survival of patients with incidentally found microscopic cancer of the prostate: results of a clinical trial of conservative treatment. *J Urol*, 108: 908-13

- Cairns, P., Esteller, M., Herman, J. G., Schoenberg, M., Jeronimo, C., Sanchez-Cespedes, M., Chow, N. H., Grasso, M., Wu, L., Westra, W. B. and Sidransky, D. (2001) Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*, 7: 2727-30
- Cama, C., Olsson, C. A., Raffo, A. J., Perlman, H., Buttyan, R., O'Toole, K., McMahon, D., Benson, M. C. and Katz, A. E. (1995) Molecular staging of prostate cancer. II. A comparison of the application of an enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate specific antigen versus prostate specific membrane antigen. *J Urol*, 153: 1373-8
- Carroll, P. R., Kantoff, P. W., Balk, S. P., Brown, M. A., D'Amico A, V., George, D. J., Grossfeld, G. D., Johnson, C. S., Kelly, W. K., Klotz, L., Lee, W. R., Lubeck, D. P., McLeod, D. G., Oh, W. K., Pollack, A., Sartor, O., Smith, M. R. and Hart, C. (2002) Overview consensus statement. Newer approaches to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Urology*, 60: 1-6
- Catalona, W. J. and Smith, D. S. (1994) 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*, 152: 1837-42
- Cher, M. L., de Oliveira, J. G., Beaman, A. A., Nemeth, J. A., Hussain, M. and Wood, D. P., Jr. (1999) Cellular proliferation and prevalence of micrometastatic cells in the bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5: 2421-5
- Chute, R. and Fox, B. M. (1966) Non-resectable carcinoma of the prostate rendered resectable by endocrine therapy. *J Urol*, 95: 577-9
- Civantos, F., Marcial, M. A., Banks, E. R., Ho, C. K., Speights, V. O., Drew, P. A., Murphy, W. M. and Soloway, M. S. (1995) Pathology of androgen deprivation therapy in prostate carcinoma. A comparative study of 173 patients. *Cancer*, 75: 1634-41
- Clobes, H., Fossa, S. D., Waehre, H., Jocham, D. and Berner, A. (2000) The immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases in patients with T3pN0M0 prostate cancer before definitive radiotherapy. *BJU Int*, 85: 270-5
- Cohen, R. J., Gleason, G. and Haffejee, Z. (1991) Neuro-endocrine cells--a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol*, 68: 258-62
- Cohen, R. J., McNeal, J. E. and Baillie, T. (2000) Patterns of differentiation and proliferation in intraductal carcinoma of the prostate: significance for cancer progression. *Prostate*, 43: 11-9
- Colston, J. A. C. and Brendler, M. (1947) Endocrine therapy in carcinoma of the prostate. *JAMA*, 134: 848-53
- Cookson, M. S., Sogani, P. C., Russo, P., Sheinfeld, J., Herr, H., Dalbagni, G., Reuter, V. E., Begg, C. B. and Fair, W. R. (1997) Pathological staging and biochemical recurrence after neoadjuvant androgen deprivation therapy in combination with radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer: results of a phase II study. *Br J Urol*, 79: 432-8
- Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H. and Mason, D. Y. (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem*, 32: 219-29
- Corey, E., Arfman, E. W., Oswin, M. M., Melchior, S. W., Tindall, D. J., Young, C. Y., Ellis, W. J. and Vessella, R. L. (1997) Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. *Urology*, 50: 184-8
- Cosgrove, M. D., George, F. W., 3rd and Terry, R. (1973) The effects of treatment on the local lesion of carcinoma of the prostate. *J Urol*, 109: 861-5
- Dawkins, H. J., Sellner, L. N., Turbett, G. R., Thompson, C. A., Redmond, S. L., McNeal, J. E. and Cohen, R. J. (2000) Distinction between intraductal carcinoma of the prostate (IDC-P), high-grade dysplasia (PIN), and invasive prostatic adenocarcinoma, using molecular markers of cancer progression. *Prostate*, 44: 265-70
- Debruyne, F. M. J., Forster, G., Schulman, C. C., Van Cangh, P. J. and Witjes, W. P. J. (1996) European study of neoadjuvant combined androgen therapy in T2-3 prostatic carcinoma. *J Urol*, 155: 645 A
- Debus, E., Weber, K. and Osborn, M. (1982) Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues. *Embo J*, 1: 1641-7
- Deguchi, T., Doi, T., Ehara, H., Ito, S., Takahashi, Y., Nishino, Y., Fujihiro, S., Kawamura, T., Komeda, H., Horie, M. and et al. (1993) Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 53: 5350-4

- DeVere White, R. W., Meyers, F. J., Soares, S. E., Miller, D. G. and Soriano, T. F. (1992) Urinary prostate specific antigen levels: role in monitoring the response of prostate cancer to therapy. *J Urol*, 147: 947-51
- di Sant'Agnes, P. A. (1992) Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer*, 70: 254-68
- Edelstein, R. A., Zietman, A. L., de las Morenas, A., Krane, R. J., Babayan, R. K., Dallow, K. C., Traish, A. and Moreland, R. B. (1996) Implications of prostate micrometastases in pelvic lymph nodes: an archival tissue study. *Urology*, 47: 370-5
- Egevad, L., Norlen, B. J. and Norberg, M. (2001) The value of multiple core biopsies for predicting the Gleason score of prostate cancer. *BJU Int*, 88: 716-21
- Einhorn, L. H. (2002) Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 4592-5
- Ellis, W. J., Vessella, R. L., Corey, E., Arfman, E. W., Oswin, M. M., Melchior, S. and Lange, P. H. (1998) The value of a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging and followup of patients with prostate cancer. *J Urol*, 159: 1134-8
- Ellis, W. J., Pfitzenmaier, J., Colli, J., Arfman, E., Lange, P. H. and Vessella, R. L. (2003) Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. *Urology*, 61: 277-81
- Eng, C., Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2000) A bird's eye view of global methylation. *Nat Genet*, 24: 101-2
- Ennis, R. D., Katz, A. E. and DaSilva, M. (1996) Tumor angiogenesis in prostate tumors is decreased by preoperative hormonal deprivation. *Proc. Ann. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 15: 603 A
- Epstein, J. I. (1991) The evaluation of radical prostatectomy specimens. Therapeutic and prognostic implications. *Pathol Annu*, 26 Pt 1: 159-210
- Epstein, J. I., Pizov, G. and Walsh, P. C. (1993) Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*, 71: 3582-93
- Epstein, J. I. (1996) Incidence and significance of positive margins in radical prostatectomy specimens. *Urol Clin North Am*, 23: 651-63
- Epstein, J. I., Partin, A. W., Sauvageot, J. and Walsh, P. C. (1996) Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*, 20: 286-92
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (1999) Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 59: 67-70
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. and Herman, J. G. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61: 3225-9
- Fair, W. R., Scher, H., Herr, H., Morse, M., Sogani, P., Bosi, G., Dershaw, D., Reuter, V., Curley, T., Bosh, G. and et al. (1990) Neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer: the MSKCC experience. *Semin Urol*, 8: 190-6
- Fair, W. R., Cookson, M. S., Stroumbakis, N., Wang, Y., Aprikian, A. G., Cohen, D., Solowaz, S. M., Russo, P., Dalbagni, G., Sheinfeld, J., Herr, H., Reuter, V. and Sogani, P. C. (1996) Update on neoadjuvant androgen deprivation therapy and radical prostatectomy in localized prostate cancer. *J Urol*, 155: 667
- Fair, W. R., Cookson, M. S., Stroumbakis, N., Cohen, D., Aprikian, A. G., Wang, Y., Russo, P., Soloway, S. M., Sogani, P., Sheinfeld, J., Herr, H., Dalgabni, G., Begg, C. B., Heston, W. D. and Reuter, V. E. (1997) The indications, rationale, and results of neoadjuvant androgen deprivation in the treatment of prostatic cancer: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center results. *Urology*, 49: 46-55
- Ferguson, J., Zincke, H., Ellison, E., Bergstrahl, E. and Bostwick, D. G. (1994) Decrease of prostatic intraepithelial neoplasia following androgen deprivation therapy in patients with stage T3 carcinoma treated by radical prostatectomy. *Urology*, 44: 91-5
- Ferguson, J. K. and Blute, M. L. (1995). What is the significance of PSA production by male periorthral glands following RPR? *AUA Today*: 12-18.
- Ferrari, A. C., Stone, N. N., Eyler, J. N., Gao, M., Mandeli, J., Unger, P., Gallagher, R. E. and Stock, R. (1997) Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1498-504
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1: 27-31

- Franck-Lissbrant, I., Haggstrom, S., Damber, J. E. and Bergh, A. (1998) Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology*, 139: 451-6
- Freeman, J. A., Esrig, D., Grossfeld, G. D., Stein, J. P., Chen, S. C., Young, L. L., Taylor, C. R., Skinner, D. G., Lieskovsky, G. and Cote, R. J. (1995) Incidence of occult lymph node metastases in pathological stage C (pT3N0) prostate cancer. *J Urol*, 154: 474-8
- Gao, C. L., Dean, R. C., Pinto, A., Mooneyhan, R., Connelly, R. R., McLeod, D. G., Srivastava, S. and Moul, J. W. (1999) Detection of circulating prostate specific antigen expressing prostatic cells in the bone marrow of radical prostatectomy patients by sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Urol*, 161: 1070-6
- Gao, M. G., Eyler, J. N., Stock, R., Unger, R., Gallagher, R. E., Stone, N. N. and Ferrari, A. C. (1997) Molecular staging of pelvic lymph nodes (PLN) by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for prostate specific antigen (PSA) and prostate specific membrane antigen (PSM): comparison to frozen and permanent histopathology (abstract). *J Urol*, 157: 444, 1734 A
- Gerber, G. S., Thisted, R. A., Chodak, G. W., Schroder, F. H., Frohmuller, H. G., Scardino, P. T., Paulson, D. F., Middleton, A. W., Jr., Rukstalis, D. B., Smith, J. A., Jr., Otori, M., Theiss, M. and Schellhammer, P. F. (1997) Results of radical prostatectomy in men with locally advanced prostate cancer: multi-institutional pooled analysis. *Eur Urol*, 32: 385-90
- Gleason, D. F. (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother*, 50: 125-30
- Gleave, M. E., Goldenberg, S. L., Jones, E. C., Bruchovsky, N. and Sullivan, L. D. (1996) Biochemical and pathological effects of 8 months of neoadjuvant androgen withdrawal therapy before radical prostatectomy in patients with clinically confined prostate cancer. *J Urol*, 155: 213-9
- Gleave, M. E., La Bianca, S. E., Goldenberg, S. L., Jones, E. C., Bruchovsky, N. and Sullivan, L. D. (2000) Long-term neoadjuvant hormone therapy prior to radical prostatectomy: evaluation of risk for biochemical recurrence at 5-year follow-up. *Urology*, 56: 289-94
- Gleave, M. E., Goldenberg, S. L., Chin, J. L., Warner, J., Saad, F., Klotz, L. H., Jewett, M., Kassabian, V., Chetner, M., Dupont, C. and Van Rensselaer, S. (2001) Randomized comparative study of 3 versus 8-month neoadjuvant hormonal therapy before radical prostatectomy: biochemical and pathological effects. *J Urol*, 166: 500-6
- Gleave, M. E., Goldenberg, S. L., Chin, J. L., Warner, J., Saad, F., Klotz, L., Jewett, M., Kassabian, V., Chetner, M. and Dupont, C. (2003) Randomized comparative study of 3 vs 8 months of neoadjuvant hormonal therapy prior to radical prostatectomy: 3 year PSA recurrence rates. *J. Urol.*, 169: 690A
- Goessl, C., Krause, H., Müller, M., Heicappell, R., Schrader, M., Sachsinger, J. and Miller, K. (2000) Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res*, 60: 5941-5
- Goessl, C., Krause, H., Müller, M., Heicappell, R., Schrader, M., Sachsinger, J. and Miller, K. (2000) Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res*, 60: 5941-5
- Goessl, C., Müller, M., Heicappell, R., Krause, H., Straub, B., Schrader, M. and Miller, K. (2001) DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology*, 58: 335-8
- Goldstein, N. S., Begin, L. R., Grody, W. W., Novak, J. M., Qian, J. and Bostwick, D. G. (1995) Minimal or no cancer in radical prostatectomy specimens. Report of 13 cases of the "vanishing cancer phenomenon". *Am J Surg Pathol*, 19: 1002-9
- Gomella, L. G., White, J. L., McCue, P. A., Byrne, D. S. and Mulholland, S. G. (1993) Screening for occult nodal metastasis in localized carcinoma of the prostate. *J Urol*, 149: 776-8
- Gonzalzo, M. L., Pavlovich, C. P., Lee, S. M. and Nelson, W. G. (2003) Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res*, 9: 2673-7
- Gould, V. E., Bloom, K. J., Franke, W. W., Warren, W. H. and Moll, R. (1995) Increased numbers of cytokeratin-positive interstitial reticulum cells (CIRC) in reactive, inflammatory and neoplastic lymphadenopathies: hyperplasia or induced expression? *Virchows Arch*, 425: 617-29
- Graefen, M., Hammerer, P. G., Haese, A. and Huland, H. (2003) Indikationsstellung und Ergebnisse der radikalen Prostatektomie. *Urologe A*, 42: 1203-11
- Grasso, Y. Z., Gupta, M. K., Levin, H. S., Zippe, C. D. and Klein, E. A. (1998) Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage. *Cancer Res*, 58: 1456-9

- Grossman, H. B., Natale, R. B., Tangen, C. M., Speights, V. O., Vogelzang, N. J., Trump, D. L., deVere White, R. W., Sarosdy, M. F., Wood, D. P., Jr., Raghavan, D. and Crawford, E. D. (2003) Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*, 349: 859-66
- Guate, J. L., Escaf, S., Menendez, C. L., del Valle, M. and Vega, J. A. (1997) Neuroendocrine cells in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: effect of hormonal treatment. *Urol Int*, 59: 149-53
- Guillonneau, B., Rozet, F., Barret, E., Cathelineau, X. and Vallancien, G. (2001) Laparoscopic radical prostatectomy: assessment after 240 procedures. *Urol Clin North Am*, 28: 189-202
- Gutierrez, R. (1949) New horizons in the surgical management of carcinoma of the prostate. *Am J Surg*, 78: 147-69
- Han, M., Partin, A. W., Piantadosi, S., Epstein, J. I. and Walsh, P. C. (2001) Era specific biochemical recurrence-free survival following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 166: 416-9
- Hanks, G. E., Pajak, T. F., Porter, A., Grignon, D., Brereton, H., Venkatesan, V., Horwitz, E. M., Lawton, C., Rosenthal, S. A., Sandler, H. M. and Shipley, W. U. (2003) Phase III trial of long-term adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytoreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: the Radiation Therapy Oncology Group Protocol 92-02. *J Clin Oncol*, 21: 3972-8
- Harper, M. E., Goddard, L., Wilson, D. W., Matanhelia, S. S., Conn, I. G., Peeling, W. B. and Griffiths, K. (1992) Pathological and clinical associations of Ki-67 defined growth fractions in human prostatic carcinoma. *Prostate*, 21: 75-84
- Harper, M. E., Glynn-Jones, E., Goddard, L., Thurston, V. J. and Griffiths, K. (1996) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumours and its relationship to neuroendocrine cells. *Br J Cancer*, 74: 910-6
- Heidenreich, A., Varga, Z. and von Knobloch, R. (2002) Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol*, 167: 1681-6
- Hellstrom, M., Haggman, M., Brandstedt, S., de la Torre, M., Pedersen, K., Jarlsfeldt, I., Wijkstrom, H. and Busch, C. (1993) Histopathological changes in androgen-deprived localized prostatic cancer. A study in total prostatectomy specimens. *Eur Urol*, 24: 461-5
- Helpap, B., Bocking, A., Dhom, G., Faul, P., Kastendieck, H., Leistenschneider, W. and Muller, H. A. (1985) Classification, histologic and cytologic grading and regression grading of prostate cancer. *Urologe A*, 24: 156-9
- Helpap, B. and Köllermann, J. (1999) Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. *Virchows Arch*, 434: 385-91
- Helpap, B., Köllermann, J. and Oehler, U. (1999) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas: histogenesis, biology, clinical relevance, and future therapeutical perspectives. *Urol Int*, 62: 133-8
- Helpap, B., Köllermann, J. and Oehler, U. (2001) Limiting the diagnosis of atypical small glandular proliferations in needle biopsies of the prostate by the use of immunohistochemistry. *J Pathol*, 193: 350-3
- Helpap, B. and Köllermann, J. (2004) Therapy induced regressive changes of prostate cancer. *Pathologe*, 25: 461-8
- Herkommer, K., Kuefer, R., Gschwend, J. E., Hautmann, R. E. and Volkmer, B. G. (2004) Pathological T0 prostate cancer without neoadjuvant therapy: clinical presentation and follow-up. *Eur Urol*, 45: 36-41
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 9821-6
- Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y. and Nemoto, N. (2004) Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol*, 45: 586-92; discussion 92
- Huggins, C. and Hodges, C. V. (1941) Studies on prostatic cancer. I: The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res*, 1: 293-97
- Huggins, C., Scott, W. W. and Hodges, C. V. (1941) Studies on prostatic cancer. III: The effects of fever, of desoxycorticosterone and of estrogen on clinical patients with metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol*, 46: 997-1006

- Huggins, C., Stevens, R. E. j. and Hodges, C. V. (1941) Studies on prostatic cancer. II: The effect of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg*, 43: 209-23
- Huland, H. (1998) Welchen Stellenwert hat die radikale Prostatektomie beim lymphknotenpositiven Prostatakarzinom? *Urologe (A)*, 37: 138-40
- Hull, G. W., Rabbani, F., Abbas, F., Wheeler, T. M., Kattan, M. W. and Scardino, P. T. (2002) Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, 167: 528-34
- Humphrey, P. A. and Walther, P. J. (1993) Adenocarcinoma of the prostate. I. Tissue sampling considerations. *Am J Clin Pathol*, 99: 746-59
- Isaacs, J. T. (1984) Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate*, 5: 545-57
- Iselin, C. E., Box, J. W., Vollmer, R. T., Layfield, L. J., Robertson, J. E. and Paulson, D. F. (1998) Surgical control of clinically localized prostate carcinoma is equivalent in African-American and white males. *Cancer*, 83: 2353-60
- Israeli, R. S., Miller, W. H., Jr., Su, S. L., Samadi, D. S., Powell, C. T., Heston, W. D., Wise, G. J. and Fair, W. R. (1995) Sensitive detection of prostatic hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol*, 153: 573-7
- Iwakiri, J., Granbois, K., Wehner, N., Graves, H. C. and Stamey, T. (1993) An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol*, 149: 783-6
- Jeronimo, C., Usadel, H., Henrique, R., Silva, C., Oliveira, J., Lopes, C. and Sidransky, D. (2002) Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology*, 60: 1131-5
- Jiborn, T., Bjartell, A. and Abrahamsson, P. A. (1998) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment. *Urology*, 51: 585-9
- Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van Weerden, W. M., Martens, G. J., van der Kwast, T. H., Schroder, F. H. and van Steenbrugge, G. J. (1999) Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol*, 154: 543-51
- Joseph, I. B. and Isaacs, J. T. (1997) Potentiation of the antiangiogenic ability of linomide by androgen ablation involves down-regulation of vascular endothelial growth factor in human androgen-responsive prostatic cancers. *Cancer Res*, 57: 1054-7
- Joseph, I. B., Nelson, J. B., Denmeade, S. R. and Isaacs, J. T. (1997) Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res*, 3: 2507-11
- Kennedy, T. J., Sonneland, A. M., Marlett, M. M. and Troup, R. H. (1992) Luteinizing hormone-releasing hormone downstaging of clinical stage C prostate cancer. *J Urol*, 147: 891-3
- Kitagawa, Y., Koshida, K., Mizokami, A., Komatsu, K., Nakashima, S., Misaki, T., Katsumi, T. and Namiki, M. (2003) Pathological effects of neoadjuvant hormonal therapy help predict progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Int J Urol*, 10: 377-82
- Klotz, L. H., Goldenberg, L. S., Bullock, M. J., Shrigley, J. R. and Lapalante, S. (1996) Neoadjuvant cyproterone acetate therapy prior to radical prostatectomy reduced tumor burden and margin positivity without altering 6 and 12 months post treatment PSA: Results of a randomized trial. *J Urol*, 155: 399 A
- Klotz, L. H., Goldenberg, S. L., Jewett, M., Barkin, J., Chetner, M., Fradet, Y., Chin, J. and Lapalante, S. (1999) CUOG randomized trial of neoadjuvant androgen ablation before radical prostatectomy: 36-month post-treatment PSA results. *Canadian Urologic Oncology Group. Urology*, 53: 757-63
- Krijnen, J. L., Janssen, P. J., Ruizeveld de Winter, J. A., van Krimpen, H., Schroder, F. H. and van der Kwast, T. H. (1993) Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry*, 100: 393-8
- Kuniyasu, H., Troncoso, P., Johnston, D., Bucana, C. D., Tahara, E., Fidler, I. J. and Pettaway, C. A. (2000) Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 6: 2295-308
- Kupelian, P. A., Katcher, J., Levin, H. S. and Klein, E. A. (1997) Stage T1-2 prostate cancer: a multivariate analysis of factors affecting biochemical and clinical failures after radical prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 37: 1043-52
- Kyprianou, N., English, H. F. and Isaacs, J. T. (1990) Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res*, 50: 3748-53

- Köllermann, J., Heseding, B., Helpap, B., Köllermann, M. W. and Pantel, K. (1999) Comparative immunocytochemical assessment of isolated carcinoma cells in lymph nodes and bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Int J Cancer*, 84: 145-9
- Köllermann, J., Feek, U., Müller, H., Kaulfuss, U., Oehler, U., Helpap, B. and Köllermann, M. W. (2000) Nondetected tumor (pT0) after prolonged, neoadjuvant treatment of localized prostatic carcinoma. *Eur Urol*, 38: 714-20
- Köllermann, J. and Helpap, B. (2001) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol*, 116: 115-21
- Köllermann, J. and Helpap, B. (2001) Neuroendocrine differentiation and short-term neoadjuvant hormonal treatment of prostatic carcinoma with special regard to tumor regression. *Eur Urol*, 40: 313-7
- Köllermann, J., Caprano, J., Budde, A., Weidenfeld, H., Weidenfeld, M., Hopfenmüller, W. and Helpap, B. (2003) Follow-up of nondetectable prostate carcinoma (pT0) after prolonged PSA-monitored neoadjuvant hormonal therapy followed by radical prostatectomy. *Urology*, 62: 476-80
- Köllermann, J., Goessl, C., Müller, M. and Müller, K. (2003) Methylation-specific polymerase chain reaction for the detection of occult lymphatic prostate tumor cell dissemination. Correlation with immunohistochemical findings. *J Urol*, 169: 1154A
- Köllermann, J., Hopfenmüller, W., Caprano, J., Budde, A., Weidenfeld, H., Weidenfeld, M. and Helpap, B. (2004) Prognosis of stage pT0 after prolonged neoadjuvant endocrine therapy of prostate cancer: a matched-pair analysis. *Eur Urol*, 45: 42-5
- Köllermann, J. W. (1995). Das Prostatakarzinom im Stadium C. Das Verhalten des Malignitäts- und Regressionsgrades unter induktiver Therapie. Inauguraldissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Köllermann, J., Kempkensteffen, C., Helpap, B., Schrader, M., Krause, H., Müller, M., Müller, K and Schostak, M. (2006) Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P I gene (GSTP I) in prostate cancer. *BMC Urol*. 6: 15
- Köllermann, M. W., Pantel, K., Enzmann, T., Feek, U., Köllermann, J., Kossiwakis, M., Kaulfuss, U., Martell, W. and Spitz, J. (1998) Supersensitive PSA-monitored neoadjuvant hormone treatment of clinically localized prostate cancer: effects on positive margins, tumor detection and epithelial cells in bone marrow. *Eur Urol*, 34: 318-24
- Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Giguere, M., Lacoursiere, Y., Emond, J., Monfette, G. and Bergeron, V. (1985) Combination therapy with flutamide and castration (LHRH agonist or orchiectomy) in advanced prostate cancer: a marked improvement in response and survival. *J Steroid Biochem*, 23: 833-41
- Labrie, F., Dupont, A., Cusan, L., Gomez, J., Diamond, P., Koutsilieris, M., Suburu, R., Fradet, Y., Lemay, M., Tetu, B. and et al. (1993) Downstaging of localized prostate cancer by neoadjuvant therapy with flutamide and luproin: the first controlled and randomized trial. *Clin Invest Med*, 16: 499-509
- Labrie, F., Cusan, L. and Gomez, J. L. (1994) Downstaging of early stage prostate cancer before radical prostatectomy: the first randomized trial of neoadjuvant combination therapy with flutamide and a luteinizing hormone releasing hormone agonist. *Urology*, 4: 29-33
- Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, H. and Stein, H. (1990) Ber-EP4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelial from mesothelial. *J Clin Pathol*, 43: 213-9
- Laverdiere, J., Nabid, A., De Bedoya, L. D., Ebacher, A., Fortin, A., Wang, C. S. and Harel, F. (2004) The efficacy and sequencing of a short course of androgen suppression on freedom from biochemical failure when administered with radiation therapy for T2-T3 prostate cancer. *J Urol*, 171: 1137-40
- Law, T. M., Motzer, R. J., Bajorin, D. F. and Bosl, G. J. (1994) The management of patients with advanced germ cell tumors. Seminoma and nonseminoma. *Urol Clin North Am*, 21: 773-83
- Lee, W. H., Morton, R. A., Epstein, J. I., Brooks, J. D., Campbell, P. A., Bova, G. S., Hsieh, W. S., Isaacs, W. B. and Nelson, W. G. (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 11733-7
- Lin, X., Tascilar, M., Lee, W. H., Vles, W. J., Lee, B. H., Veeraswamy, R., Asgari, K., Freije, D., van Rees, B., Gage, W. R., Bova, G. S., Isaacs, W. B., Brooks, J. D., DeWeese, T. L., De Marzo, A. M. and Nelson, W. G. (2001) GSTP1 CpG island hypermethylation is responsi-

- ble for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol*, 159: 1815-26
- Lintula, S. and Stenman, U. H. (1997) The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. *J Urol*, 157: 1969-72
- Liotta, L. A., Kleinerman, J. and Saidel, G. M. (1974) Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 34: 997-1004
- Lisle, T. C., Ziada, A. M., Andros, E. A. and Crawford, E. D. (1999) Neoadjuvant Hormonal Therapy in Stage C Adenocarcinoma of the Prostate and Incidence of Biochemical Recurrence. *Mol Urol*, 3: 263-68
- Makhlouf, A. A., Krupski, T. L., Kunkle, D. and Theodorescu, D. (2004) The effect of sampling more cores on the predictive accuracy of pathological grade and tumour distribution in the prostate biopsy. *BJU Int*, 93: 271-4
- Mansi, J. L., Berger, U., Wilson, P., Shearer, R. and Coombes, R. C. (1988) Detection of tumor cells in bone marrow of patients with prostatic carcinoma by immunocytochemical techniques. *J Urol*, 139: 545-8
- Mansi, J. L., Berger, U., McDonnell, T., Pople, A., Rayter, Z., Gazet, J. C. and Coombes, R. C. (1989) The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol*, 7: 445-9
- Martinez-Pineiro, L., Rios, E., Martinez-Gomariz, M., Pastor, T., de Cabo, M., Picazo, M. L., Palacios, J. and Perona, R. (2003) Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. *Eur Urol*, 43: 342-50
- Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Virmani, A. K., Zochbauer-Muller, S., Farinas, A. J., Minna, J. D., McConnell, J., Frenkel, E. P. and Gazdar, A. F. (2002) Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, 8: 514-9
- Matsushima, H., Goto, T., Hosaka, Y., Kitamura, T. and Kawabe, K. (1999) Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. *Cancer*, 85: 1822-7
- McNeal, J. E., Reese, J. H., Redwine, E. A., Freiha, F. S. and Stamey, T. A. (1986) Cribriform adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, 58: 1714-9
- McNeal, J. E. and Yemoto, C. E. (1996) Spread of adenocarcinoma within prostatic ducts and acini. Morphologic and clinical correlations. *Am J Surg Pathol*, 20: 802-14
- Melchior, S. W., Corey, E., Ellis, W. J., Ross, A. A., Layton, T. J., Oswin, M. M., Lange, P. H. and Vessella, R. L. (1997) Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res*, 3: 249-56
- Melchior, S. W., Ellis, W., Vessella, R. L. and Lange, P. H. (1997) Klinische Relevanz zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom. *Urologe A*, 36: S74
- Messing, E. M., Manola, J., Sarosdy, M., Wilding, G., Crawford, E. D. and Trump, D. (1999) Immediate hormonal therapy compared with observation after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy in men with node-positive prostate cancer. *N Engl J Med*, 341: 1781-8
- Meyer, F., Bairati, I., Bedard, C., Lacombe, L., Tetu, B. and Fradet, Y. (2001) Duration of neoadjuvant androgen deprivation therapy before radical prostatectomy and disease-free survival in men with prostate cancer. *Urology*, 58: 71-7
- Miller, J. I., Ahmann, F. R., Drach, G. W., Emerson, S. S. and Bottaccini, M. R. (1992) The clinical usefulness of serum prostate specific antigen after hormonal therapy of metastatic prostate cancer. *J Urol*, 147: 956-61
- Millon, R., Jacqmin, D., Muller, D., Guillot, J., Eber, M. and Abecassis, J. (1999) Detection of prostate-specific antigen- or prostate-specific membrane antigen-positive circulating cells in prostatic cancer patients: clinical implications. *Eur Urol*, 36: 278-85
- Montironi, R., Magi-Galluzzi, C., Muzzonigro, G., Prete, E., Polito, M. and Fabris, G. (1994) Effects of combination endocrine treatment on normal prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 47: 906-13
- Montironi, R., Magi-Galluzzi, C. and Fabris, G. (1995) Apoptotic bodies in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma following total androgen ablation. *Pathol Res Pract*, 191: 873-80
- Montironi, R., Diamanti, L., Santinelli, A., Galetti-Prayer, T., Zattoni, F., Selvaggi, F. P., Pagano, F. and Bono, A. V. (1999) Effect of total androgen ablation on pathologic stage and resection

- limit status of prostate cancer. Initial results of the Italian PROSIT study. *Pathol Res Pract*, 195: 201-8
- Morgan, W. R., Bergstralh, E. J. and Zincke, H. (1993) Long-term evaluation of radical prostatectomy as treatment for clinical stage C (T3) prostate cancer. *Urology*, 41: 113-20
- Moul, J. W., Lewis, D. J., Ross, A. A., Kahn, D. G., Ho, C. K. and McLeod, D. G. (1994) Immunohistologic detection of prostate cancer pelvic lymph node micrometastases: correlation to preoperative serum prostate-specific antigen. *Urology*, 43: 68-73
- Mueller, P., Carroll, P., Bowers, E., Moore, D., 2nd, Cher, M., Presti, J., Wessman, M. and Pallavicini, M. G. (1998) Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer*, 83: 538-46
- Nakayama, M., Bennett, C. J., Hicks, J. L., Epstein, J. I., Platz, E. A., Nelson, W. G. and De Marzo, A. M. (2003) Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol*, 163: 923-33
- Ng, S. S., MacPherson, G. R., Gutschow, M., Eger, K. and Figg, W. D. (2004) Antitumor effects of thalidomide analogs in human prostate cancer xenografts implanted in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 10: 4192-7
- Noguchi, M., Noda, S., Nakashima, O. and Kojiro, M. (2002) No residual tumor in a radical prostatectomy specimen after neoadjuvant hormonal therapy for localized prostate cancer. *Oncol Rep*, 9: 1075-80
- Obek, C., Sadek, S., Lai, S., Civantos, F., Rubinowicz, D. and Soloway, M. S. (1999) Positive surgical margins with radical retropubic prostatectomy: anatomic site-specific pathologic analysis and impact on prognosis. *Urology*, 54: 682-8
- Oberneder, R., Riesenberger, R., Kriegmair, M., Bitzer, U., Klammert, R., Schneede, P., Hofstetter, A., Riethmuller, G. and Pantel, K. (1994) Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Urol Res*, 22: 3-8
- Ogawa, O., Iinuma, M., Sato, K., Sasaki, R., Shimoda, N., Satoh, S. and Kato, T. (1999) Circulating prostate-specific antigen mRNA during radical prostatectomy in patients with localized prostate cancer: with special reference to neoadjuvant hormonal therapy. *Urol Res*, 27: 291-6
- Ohuri, M., Wheeler, T. M., Kattan, M. W., Goto, Y. and Scardino, P. T. (1995) Prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 154: 1818-24
- Okegawa, T., Noda, H., Kato, M., Miyata, A., Nutahara, K. and Higashihara, E. (2000) Value of reverse transcription polymerase chain reaction assay in pathological stage T3N0 prostate cancer. *Prostate*, 44: 210-8
- Okegawa, T., Nutahara, K. and Higashihara, E. (2000) Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction is predictive of biochemical recurrence in pathological stage T2 prostate cancer. *J Urol*, 163: 1183-8
- Pantel, K., Schlimock, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B., Izbicki, J. R. and Riethmüller, G. (1994) Methodological analysis of immunocytological screening for disseminated epithelial tumour cells in bone marrow. *J. Hematother.*, 3: 165-73
- Pantel, K., Enzmann, T., Kollermann, J., Caprano, J., Riethmuller, G. and Kollermann, M. W. (1997) Immunocytochemical monitoring of micrometastatic disease: reduction of prostate cancer cells in bone marrow by androgen deprivation. *Int J Cancer*, 71: 521-5
- Parlow, A. L. and Scott, W. W. (1949) Hormone control therapy as a preparation for radical perineal prostatectomy in advanced carcinoma of the prostate. *NY State J Med*, 49: 629 - 49
- Partin, A. W., Epstein, J. I., Cho, K. R., Gittelsohn, A. M. and Walsh, P. C. (1989) Morphometric measurement of tumor volume and per cent of gland involvement as predictors of pathological stage in clinical stage B prostate cancer. *J Urol*, 141: 341-5
- Partin, A. W., Pound, C. R., Clemens, J. Q., Epstein, J. I. and Walsh, P. C. (1993) Serum PSA after anatomic radical prostatectomy. The Johns Hopkins experience after 10 years. *Urol Clin North Am*, 20: 713-25
- Partin, A. W., Pearson, J. D., Landis, P. K., Carter, H. B., Pound, C. R., Clemens, J. Q., Epstein, J. I. and Walsh, P. C. (1994) Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radi-

- cal prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology*, 43: 649-59
- Partin, A. W., Kattan, M. W., Subong, E. N., Walsh, P. C., Wojno, K. J., Oesterling, J. E., Scardino, P. T. and Pearson, J. D. (1997) Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277: 1445-51
- Paterson, R. F., Gleave, M. E., Jones, E. C., Zubovits, J. T., Goldenberg, S. L. and Sullivan, L. D. (1999) Immunohistochemical Analysis of Radical Prostatectomy Specimens After 8 Months of Neoadjuvant Hormonal Therapy. *Mol Urol*, 3: 277-86
- Paulson, D. F., Stone, A. R., Walther, P. J., Tucker, J. A. and Cox, E. B. (1986) Radical prostatectomy: anatomical predictors of success or failure. *J Urol*, 136: 1041-3
- Pedersen, K. V., Lundberg, S., Hugosson, J., Aus, G., Schlin, S., Schain, S. and Ahlgren, G. (1995) Neoadjuvant hormonal treatment with triptorelin versus no treatment prior to radical prostatectomy: A prospective, randomized, multicenter trial. *J Urol*, 153: 391A
- Pettaway, C. A., Pisters, L. L., Troncoso, P., Slaton, J., Finn, L., Kamoi, K. and Logothetis, C. J. (2000) Neoadjuvant chemotherapy and hormonal therapy followed by radical prostatectomy: feasibility and preliminary results. *J Clin Oncol*, 18: 1050-7
- Pilepich, M. V., Winter, K., John, M. J., Mesic, J. B., Sause, W., Rubin, P., Lawton, C., Machtay, M. and Grignon, D. (2001) Phase III radiation therapy oncology group (RTOG) trial 86-10 of androgen deprivation adjuvant to definitive radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50: 1243-52
- Pinski, J., Reile, H., Halmos, G., Groot, K. and Schally, A. V. (1994) Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res*, 54: 169-74
- Potter, S. R., Mangold, L. A., Shue, M. J., Taylor, D. C., Lecksell, K. L., Epstein, J. I., Walsh, P. C. and Partin, A. W. (2000) Molecular and immunohistochemical staging of men with seminal vesicle invasion and negative pelvic lymph nodes at radical prostatectomy. *Cancer*, 89: 2577-86
- Pound, C. R., Partin, A. W., Eisenberger, M. A., Chan, D. W., Pearson, J. D. and Walsh, P. C. (1999) Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*, 281: 1591-7
- Renshaw, A. A., Santis, W. F. and Richie, J. P. (1998) Clinicopathological characteristics of prostatic adenocarcinoma in men with atypical prostate needle biopsies. *J Urol*, 159: 2018-21
- Rubenstein, J. H., Katin, M. J., Mangano, M. M., Dauphin, J., Salenius, S. A., Dosoretz, D. E. and Blitzer, P. H. (1997) Small cell anaplastic carcinoma of the prostate: seven new cases, review of the literature, and discussion of a therapeutic strategy. *Am J Clin Oncol*, 20: 376-80
- Rubin, M. A., de La Taille, A., Bagiella, E., Olsson, C. A. and O'Toole, K. M. (1998) Cribriform carcinoma of the prostate and cribriform prostatic intraepithelial neoplasia: incidence and clinical implications. *Am J Surg Pathol*, 22: 840-8
- Sakr, W. A., Wheeler, T. M., Blute, M., Bodo, M., Calle-Rodrigue, R., Henson, D. E., Mostofi, F. K., Seiffert, J., Wojno, K. and Zincke, H. (1996) Staging and reporting of prostate cancer--sampling of the radical prostatectomy specimen. *Cancer*, 78: 366-8
- Santourlidis, S., Florl, A., Ackermann, R., Wirtz, H. C. and Schulz, W. A. (1999) High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate*, 39: 166-74
- Schulman, C. C. and Sassine, A. M. (1993) Neoadjuvant hormonal deprivation before radical prostatectomy. *Eur Urol*, 24: 450-5
- Schulman, C. C., Debruyne, F. M., Forster, G., Selvaggi, F. P., Zlotta, A. R. and Witjes, W. P. (2000) 4-Year follow-up results of a European prospective randomized study on neoadjuvant hormonal therapy prior to radical prostatectomy in T2-3N0M0 prostate cancer. European Study Group on Neoadjuvant Treatment of Prostate Cancer. *Eur Urol*, 38: 706-13
- Schultz, P. K., Herr, H. W., Zhang, Z. F., Bajorin, D. F., Seidman, A., Sarkis, A., Fair, W. R., Scherr, D., Bosl, G. J. and Scher, H. I. (1994) Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: prognostic factors for survival of patients treated with M-VAC with 5-year follow-up. *J Clin Oncol*, 12: 1394-401
- Scott, W. W. (1964) An Evaluation of Endocrine Therapy Plus Radical Perineal Prostatectomy in the Treatment of Advanced Carcinoma of the Prostate. *J Urol*, 91: 97-102

- Scott, W. W. and Boyd, H. L. (1969) Combined hormone control therapy and radical prostatectomy in the treatment of selected cases of advanced carcinoma of the prostate: a retrospective study based upon 25 years of experience. *J Urol*, 101: 86-92
- Shariat, S. F., Kattan, M. W., Erdamar, S., Nguyen, C., Scardino, P. T., Spencer, D. M., Wheeler, T. M. and Slawin, K. M. (2003) Detection of clinically significant, occult prostate cancer metastases in lymph nodes using a splice variant-specific rt-PCR assay for human glandular kallikrein. *J Clin Oncol*, 21: 1223-31
- Shariat, S. F., Kattan, M. W., Song, W., Bernard, D., Gottenger, E., Wheeler, T. M. and Slawin, K. M. (2003) Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer Res*, 63: 5874-8
- Shariat, S. F., Roudier, M. P., Wilcox, G. E., Kattan, M. W., Scardino, P. T., Vessella, R. L., Erdamar, S., Nguyen, C., Wheeler, T. M. and Slawin, K. M. (2003) Comparison of immunohistochemistry with reverse transcription-PCR for the detection of micrometastatic prostate cancer in lymph nodes. *Cancer Res*, 63: 4662-70
- Sikes, R. A., Nicholson, B. E., Koeneman, K. S., Edlund, N. M., Bissonette, E. A., Bradley, M. J., Thalmann, G. N., Cecchini, M. G., Pienta, K. J. and Chung, L. W. (2004) Cellular interactions in the tropism of prostate cancer to bone. *Int J Cancer*, 110: 497-503
- Slovin, S. F. and Scher, H. I. (1998) Detectable tumor cells in the blood and bone marrow: smoke or fire? *Cancer*, 83: 394-8
- Smith, D. M. and Murphy, W. M. (1994) Histologic changes in prostate carcinomas treated with leuprolide (luteinizing hormone-releasing hormone effect). Distinction from poor tumor differentiation. *Cancer*, 73: 1472-7
- Smith, M. R., Biggar, S. and Hussain, M. (1995) Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. *Cancer Res*, 55: 2640-4
- Solakoglu, O., Maierhofer, C., Lahr, G., Breit, E., Scheunemann, P., Heumos, I., Pichlmeier, U., Schlimok, G., Oberneder, R., Kollermann, M. W., Kollermann, J., Speicher, M. R. and Pantel, K. (2002) Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2246-51
- Soloway, M., Sharifi, R., Wajsman, Z., McLeod, D., Wood, D. and Puras-Baez, A. (1997) Radical prostatectomy alone vs. radical prostatectomy preceded by androgen blockade in cT2b prostate cancer: 24 months results. *J Urol*, 157 (Suppl): A 619
- Soloway, M. S., Sharifi, R., Wajsman, Z., McLeod, D., Wood, D. P., Jr. and Puras-Baez, A. (1995) Randomized prospective study comparing radical prostatectomy alone versus radical prostatectomy preceded by androgen blockade in clinical stage B2 (T2bNxM0) prostate cancer. The Lupron Depot Neoadjuvant Prostate Cancer Study Group. *J Urol*, 154: 424-8
- Spitz, J., Bickel, T., Köllermann, M. (1995) Technical and Physiological Aspects of PSA Estimation in Urin. *Klin Lab*. 41: 449-55
- Stamey, T. A., McNeal, J. E., Freiha, F. S. and Redwine, E. (1988) Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies. *J Urol*, 139: 1235-41
- Stamey, T. A. and Kabalin, J. N. (1989) Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol*, 141: 1070-5
- Stamey, T. A., Kabalin, J. N., McNeal, J. E., Johnstone, I. M., Freiha, F., Redwine, E. A. and Yang, N. (1989) Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. II. Radical prostatectomy treated patients. *J Urol*, 141: 1076-83
- Stamey, T. A., Sözen, T. S., Yemoto, C. M. and McNeal, J. (1998) Classification of localized untreated prostate cancer based on 791 men treated only with radical prostatectomy: Common ground for therapeutic trials and TNM subgroups. *J Urol*, 159: 2009-12
- Stamey, T. A., McNeal, J. E., Yemoto, C. M., Sigal, B. M. and Johnstone, I. M. (1999) Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA*, 281: 1395-400
- Stamey, T. A., Yemoto, C. M., McNeal, J. E., Sigal, B. M. and Johnstone, I. M. (2000) Prostate cancer is highly predictable: a prognostic equation based on all morphological variables in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 163: 1155-60
- Stewart, R. J., Panigrahy, D., Flynn, E. and Folkman, J. (2001) Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol*, 165: 688-93
- Su, S. L., Heston, W. D., Perrotti, M., Cookson, M. S., Stroumbakis, N., Huyrk, R., Edwards, E., Brander, B., Coke, J., Soloway, S., Lewis, A., Fair, W. R. and Perrotti, M. (1997) Evaluating

- neoadjuvant therapy effectiveness on systemic disease: use of a prostatic-specific membrane reverse transcription polymerase chain reaction. *Urology*, 49: 95-101
- Takayama, T. K., Vessella, R. L., Brawer, M. K., True, L. D., Noteboom, J. and Lange, P. H. (1994) Urinary prostate specific antigen levels after radical prostatectomy. *J Urol*, 151: 82-7
- Tchou, J. C., Lin, X., Freije, D., Isaacs, W. B., Brooks, J. D., Rashid, A., De Marzo, A. M., Kanai, Y., Hirohashi, S. and Nelson, W. G. (2000) GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*, 16: 663-76
- Tetu, B., Srigley, J. R., Boivin, J. C., Dupont, A., Monfette, G., Pinault, S. and Labrie, F. (1991) Effect of combination endocrine therapy (LHRH agonist and flutamide) on normal prostate and prostatic adenocarcinoma. A histopathologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, 15: 111-20
- Thomas, J., Gupta, M., Grasso, Y., Reddy, C. A., Heston, W. D., Zippe, C., Dreicer, R., Kupelian, P. A., Brainard, J., Levin, H. S. and Klein, E. A. (2002) Preoperative combined nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen does not correlate with pathologic stage or biochemical failure in patients with localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol*, 20: 3213-8
- Tokumar, Y., Harden, S. V., Sun, D. I., Yamashita, K., Epstein, J. I. and Sidransky, D. (2004) Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10: 5518-22
- Tran, T. A., Jennings, T. A., Ross, J. S. and Nazeer, T. (1998) Pseudomyxoma ovarii-like post-therapeutic alteration in prostatic adenocarcinoma: a distinctive pattern in patients receiving neoadjuvant androgen ablation therapy. *Am J Surg Pathol*, 22: 347-54
- Trapasso, J. G., deKernion, J. B., Smith, R. B. and Dorey, F. (1994) The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*, 152: 1821-5
- Trojani, M., de Mascarel, I., Coindre, J. M. and Bonichon, F. (1987) Micrometastases to axillary lymph nodes from invasive lobular carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br J Cancer*, 56: 838-9
- Tsuji, M., Murakami, Y., Kanayama, H., Sano, T. and Kagawa, S. (1998) Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and Bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect of neoadjuvant hormonal therapy. *Br J Urol*, 81: 116-21
- Uehara, H. (2003) Angiogenesis of prostate cancer and antiangiogenic therapy. *J Med Invest*, 50: 146-53
- Vailancourt, L., Ttu, B., Fradet, Y., Dupont, A., Gomez, J., Cusan, L., Suburu, E. R., Diamond, P., Candas, B. and Labrie, F. (1996) Effect of neoadjuvant endocrine therapy (combined androgen blockade) on normal prostate and prostatic carcinoma. A randomized study. *Am J Surg Pathol*, 20: 86-93
- Vallet, B., S. (1944) Radical perineal prostatectomy subsequent to bilateral orchiectomy. *Delaware Med J*, 16: 18-20
- van den Ouden, D., Hop, W. C. and Schroder, F. H. (1998) Progression in and survival of patients with locally advanced prostate cancer (T3) treated with radical prostatectomy as monotherapy. *J Urol*, 160: 1392-7
- van der Kwast, T. H., Tetu, B., Candas, B., Gomez, J. L., Cusan, L. and Labrie, F. (1999) Prolonged neoadjuvant combined androgen blockade leads to a further reduction of prostatic tumor volume: three versus six months of endocrine therapy. *Urology*, 53: 523-9
- Van Poppel, H., De Ridder, D., Elgamal, A. A., Van de Voorde, W., Werbrouck, P., Ackaert, K., Oyen, R., Pittomvils, G. and Baert, L. (1995) Neoadjuvant hormonal therapy before radical prostatectomy decreases the number of positive surgical margins in stage T2 prostate cancer: interim results of a prospective randomized trial. The Belgian Uro-Oncological Study Group. *J Urol*, 154: 429-34
- Weckermann, D., Muller, P., Wawroschek, F., Krawczak, G., Riethmuller, G. and Schlimok, G. (1999) Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *J Clin Oncol*, 17: 3438-43
- Weckermann, D., Wawroschek, F., Krawczak, G., Haude, K. H. and Harzmann, R. (1999) Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time to biochemical relapse after radical prostatectomy? *Urol Res*, 27: 285-90
- Weinstein, M. H., Partin, A. W., Veltri, R. W. and Epstein, J. I. (1996) Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: enhanced prediction of progression after radical prostatectomy. *Hum Pathol*, 27: 683-7

- Wilcox, G., Soh, S., Chakraborty, S., Scardino, P. T. and Wheeler, T. M. (1998) Patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia associated with clinically aggressive prostate cancer. *Hum Pathol*, 29: 1119-23
- Witherspoon, L. R. (1997) Early detection of cancer relapse after prostatectomy using very sensitive prostate-specific antigen measurements. *Br J Urol*, 79 Suppl 1: 82-6
- Witjes, W. P., Schulman, C. C. and Debruyne, F. M. (1997) Preliminary results of a prospective randomized study comparing radical prostatectomy versus radical prostatectomy associated with neoadjuvant hormonal combination therapy in T2-3 N0 M0 prostatic carcinoma. The European Study Group on Neoadjuvant Treatment of Prostate Cancer. *Urology*, 49: 65-9
- Wood, D. P., Jr., Banks, E. R., Humphreys, S., McRoberts, J. W. and Rangnekar, V. M. (1994) Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer*, 74: 2533-40
- Wood, D. P., Jr., Banks, E. R., Humphreys, S. and Rangnekar, V. M. (1994) Sensitivity of immunohistochemistry and polymerase chain reaction in detecting prostate cancer cells in bone marrow. *J Histochem Cytochem*, 42: 505-11
- Wood, D. P., Jr. and Banerjee, M. (1997) Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol*, 15: 3451-7
- Wood, D. P., Jr., Beaman, A., Banerjee, M., Powell, I., Pontes, E. and Cher, M. L. (1998) Effect of neoadjuvant androgen deprivation on circulating prostate cells in the bone marrow of men undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*, 4: 2119-23
- Wright, G. L., Jr., Grob, B. M., Haley, C., Grossman, K., Newhall, K., Petrylak, D., Troyer, J., Konchuba, A., Schellhammer, P. F. and Moriarty, R. (1996) Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology*, 48: 326-34
- Yu, E. Y. and Oh, W. K. (2003) Neoadjuvant therapy for high-risk localized prostate cancer. *Curr Oncol Rep*, 5: 250-7
- Zagars, G. K., von Eschenbach, A. C., Johnson, D. E. and Oswald, M. J. (1987) Stage C adenocarcinoma of the prostate. An analysis of 551 patients treated with external beam radiation. *Cancer*, 60: 1489-99
- Zhang, Y., Zippe, C. D., Van Lente, F., Klein, E. A. and Gupta, M. K. (1997) Combined nested reverse transcription-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in detecting circulating prostatic cells. *Clin Cancer Res*, 3: 1215-20
- Zhou, M., Shah, R., Shen, R. and Rubin, M. A. (2003) Basal cell cocktail (34betaE12 + p63) improves the detection of prostate basal cells. *Am J Surg Pathol*, 27: 365-71
- Zincke, H., Oesterling, J. E., Blute, M. L., Bergstralh, E. J., Myers, R. P. and Barrett, D. M. (1994) Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer. *J Urol*, 152: 1850-7

DANKSAGUNG

Prof . Dr. K. Miller für die Möglichkeit der Habilitation. Die großzügige Freistellung vom klinischen Alltag zur Arbeit im klinikeigenen Forschungslabor, sowie die Schaffung forschungsfreundlicher Rahmenbedingungen waren entscheidende Hilfestellungen zur Realisierung der Arbeit

Prof. Dr. B. Helpap für das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und Denken und die intensive Schulung in der histopathologischen Prostatadiagnostik.

Prof. Dr. M. Müller für die langjährige freundschaftliche und großzügige Unterstützung in der konkreten Umsetzung meiner wissenschaftlichen Vorhaben

Dr. rer. nat . H. Krause für die geduldige und freundschaftliche Unterstützung in allen molekularbiologischen und EDV bezogenen Fragestellungen.

PD Dr. med. M. Schostak für die freundschaftliche, intensive und konstruktive gemeinsame wissenschaftliche Arbeit

Prof. Dr. W. Remmele für das Erwecken meiner Begeisterung für die Uropathologie

Prof. Dr. K. Pantel für die Einführung in den Forschungsbereich der Tumorzell-dissemination und die stete Unterstützung bei diesbezüglichen Fragestellungen im eigenen Forschungsbereich.

PD Dr. Carsten Goessl für meine Einführung in den von ihm in unserer Klinik etablierten Forschungsbereich der GSTP1 Promotorhypermethylierung beim Prostatakarzinom. Nur so war die Fortführung und Weiterentwicklung der Thematik für den eigenen Forschungsbereich möglich

Frau Petra v. Kwiatkowski , MTA und **Frau Antonia Maaß**, MTA für die stets prompte und verlässliche Zuarbeit und die gegebenen Anregungen in der alltäglichen Laborarbeit

Meiner Ehefrau Petra für die langjährige Unterstützung und Übernahme meiner während der Zeit der Habilitation vernachlässigten familiären Aufgaben. Ohne Ihren steten „sanft“ zunehmenden Druck, wäre die Arbeit nie fertig geworden.

Meinen Eltern für Alles!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift.....