

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UROLOGIE  
PROF. DR. MAXIMILIAN BURGER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE VON BIOPSIEZYLINDERN  
BEI PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN MIT LOKALREZIDIV NACH  
HOCHFOKUSIERTEM ULTRASCHALL (HIFU) RESPEKTIVE EXTERNER  
RADIOHOCHVOLT THERAPIE (EBRT)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
THOMAS WEISS

2014



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UROLOGIE  
PROF. DR. MAXIMILIAN BURGER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE VON BIOPSIEZYLINDERN  
BEI PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN MIT LOKALREZIDIV NACH  
HOCHFOKUSIERTEM ULTRASCHALL (HIFU) RESPEKTIVE EXTERNER  
RADIOHOCHVOLT THERAPIE (EBRT)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
THOMAS WEISS

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
1.Berichterstatter: PD Dr. Andreas Blana  
2.Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Kölbl  
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms .....	1
1.2 Ätiologie .....	1
1.2.1 Ethnographische Faktoren .....	2
1.2.2 Diätetische Faktoren.....	2
1.2.3 Genetische Faktoren .....	2
1.3 Pathologie des Prostatakarzinoms.....	3
1.3.1 Formen des Prostatakarzinoms.....	3
1.3.2 Klassifikation .....	3
1.4 Anatomie der Prostata .....	5
1.4.1 Makroskopische Anatomie .....	5
1.4.2 Histologie.....	5
1.5 Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	6
1.5.1 Digitale rektale Untersuchung: DRU.....	6
1.5.2 Transrektaler Ultraschall: TRUS.....	6
1.5.3 Labordiagnostik: Das prostataspezifische Antigen: PSA.....	7
1.5.4 transrektale, ultraschallgesteuerte Prostata-Biopsie.....	7
1.5.5 Computertomographie: CT .....	8
1.5.6 Magnetresonanztomographie: MRT .....	9
1.5.7 Skelettszintigraphie .....	9
1.6 Therapieformen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms .....	10
1.6.1 Radikale Prostatovesikulektomie.....	10
1.6.2 Strahlentherapie .....	11
1.7 Follow-Up.....	17
1.8 Ziel der Studie.....	18
2 Materialien und Methoden.....	19
2.1 Immunhistochemie.....	19
2.1.1 Prinzip der Immunhistochemie .....	19
2.2 Immunhistochemisch verwendete Marker.....	20
2.2.1 MIB-1/Ki-67 als Proliferationsmarker.....	20
2.2.2 Basalzellmarker 34-β-E-12 ( CK-HMW) .....	22
2.2.3 Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase, AMACR (P504S).....	23

2.3 Patienten.....	24
2.4 Materialverarbeitung .....	26
2.4.1 Aufbereitung der Paraffinblöcke .....	26
2.4.2 Vorbehandlung der Schnitte .....	26
2.4.3 Immunhistochemische Färbung .....	27
2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	28
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1 Patienten-Charakteristika.....	33
3.1.1 Patientencharakteristika der HIFU-Gruppe.....	34
3.1.2 Patientencharakteristik der EBRT-Gruppe .....	35
3.2 Tumormarker in Relation zu den histopathologischen Befunden .....	35
3.3. Statistische Analyse des Datensatzes HIFU .....	38
3.3.1 MIB-1 Färbeindex der Biopsieproben POST-HIFU.....	38
3.3.2 AMACR Färbeindex in den Biopsieproben POST-HIFU.....	39
3.3.3 PSA zum Zeitpunkt der Biopsie POST-HIFU.....	39
3.3.4 Sensitivität und Spezifität: der Färbungen von MIB und AMACR auf die Identifikation eines vitalem POST-HIFU Prostatakarzinomgewebes .....	40
3.3.5 Analyse: Besteht in der Gruppe der pathologisch gesicherten Prostatakarzinomen irgendeine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie nach HIFU und den klinischen Parametern PSA, MIB und AMACR?.....	41
3.3.6 Analyse: Haben die Parameter, die vor der HIFU gewonnen wurden, irgendeine prädiktive Aussagekraft für den Erfolg der Therapie? .....	41
3.3.7 34-β-E-12-Färbeintensität der Biopsieproben Post-HIFU.....	42
3.4 Statistische Auswertung der EBRT-Gruppe PRAE und POST.....	42
3.4.1 MIB-1 Färbeindex der Biopsieproben POST-EBRT.....	43
3.4.2 AMACR Färbeindex der Biopsieproben POST-EBRT .....	43
3.4.3 Sensitivität und Spezifität: der Färbungen von MIB und AMACR auf die Identifikation eines vitalem POST-EBRT Prostatakarzinomgewebes.....	44
3.4.4 Analyse: Besteht in der Gruppe der pathologisch gesicherten Prostatakarzinomen irgendeine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie nach EBRT und den klinischen Parametern PSA, MIB-1 und AMACR? .....	45
3.4.5 Analyse: Haben die Parameter, die vor EBRT gewonnen wurden, irgendeine prädiktive Aussagekraft für den Erfolg der Therapie? .....	45

4 Diskussion.....	46
5 Zusammenfassung.....	53
6 Literaturverzeichnis .....	54
7 Abbildungsverzeichnis .....	68
8 Tabellenverzeichnis .....	69
9 Abkürzungen.....	70
10 Danksagung.....	72
11 Lebenslauf .....	73

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industrieländern der am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor des älteren Mannes [34] [51].

Durch die hohe Anzahl an Neuerkrankungen rückt das Prostatakarzinom immer stärker in das öffentliche und medizinisch-wissenschaftliche Interesse.

Insbesondere in den USA hat die Inzidenz des Prostatakarzinoms ein epidemisches Niveau erreicht [1]. In Deutschland lässt sich seit Ende der 80er Jahre ebenfalls ein stetiger Anstieg der Inzidenz verzeichnen, jedoch im Vergleich zur USA weniger ausgeprägt. Erkrankten hier zu Lande 1991 etwa 16.000 Männer an einem Prostatakarzinom, waren es 1995 bereits 20.000 detektierte Neuerkrankungen [40]. Im Jahr 2006 wurden etwa 60.120 Prostatakarzinome diagnostiziert. Dadurch ist die Prostata mit ca. 20% inzwischen die häufigste Lokalisation maligner Neoplasien beim Mann und hat damit 1998 erstmals das Bronchialkarzinom als führenden Tumor der Männer abgelöst [69].

Der Anstieg der Erkrankungsraten beruht neben dem zunehmenden Alter der Patienten auch auf der Einführung und Anwendung neuer spezifischer Methoden in der Diagnostik, insbesondere der Bestimmung des prostataspezifischen Antigen (PSA) [73].

## 1.2 Ätiologie

Die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht abschließend geklärt.

Sowohl experimentelle als auch klinische Daten sprechen dafür, dass die Höhe des Testosteronspiegels im Serum nicht nur das Fortschreiten, sondern auch die Entstehung eines Prostatakarzinoms beeinflussen könnte [39].

Es ist von einer multifaktoriellen Erkrankung auszugehen, wobei folgende Einflussgrößen diskutiert werden:

## 1 Einleitung

### 1.2.1 Ethnographische Faktoren

Die Inzidenz der Prostatakarzinome ist weltweit sehr unterschiedlich. Afroamerikaner in den USA liegen mit 21% Prostatakarzinomen von allen männlichen Krebserkrankungen an der Spitze. Die Inzidenzrate für Weiße in den USA liegt bei 185 pro 100.000 Männer pro Jahr und für Afroamerikaner bei 234 pro 100.000 Männer pro Jahr [4].

Dagegen ist bei asiatischen Völkern die Inzidenzrate mit 1-7 pro 100.000 Männer pro Jahr sehr niedrig [87].

### 1.2.2 Diätetische Faktoren

Diese unterschiedliche Inzidenzrate bei den verschiedenen ethnischen Herkünften lässt aber auch den Verdacht zu, dass Umwelt- und Ernährungseinflüsse möglicherweise ebenso einen kausalen Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom aufweisen, wie z.B. Studien über Fast-Food und sojareiche Ernährung zeigten [61] [94]. In einer Studie konnte festgestellt werden, dass Männer mit asiatischem Ursprung nach Einwanderung in die USA und der damit veränderten Nahrungsaufnahme eine deutliche Erhöhung der Prostatakarzinominzidenz aufweisen [61].

### 1.2.3 Genetische Faktoren

Vergleichende Untersuchungen an Familien mit einer hohen Prostatakarzinominzidenzrate haben verdeutlicht, dass zumindest ein Teil der Prostatakarzinome autosomal-dominant vererbt wird.

Die Wahrscheinlichkeit für einen Mann selbst an einem Prostatakarzinom zu erkranken, erhöht sich signifikant, wenn ein oder mehrere Familienmitglieder, vor allem Verwandte ersten Grades, bereits am Prostatakarzinom erkrankt sind oder waren [76].

## **1.3 Pathologie des Prostatakarzinoms**

### **1.3.1 Formen des Prostatakarzinoms**

Bei den Prostatakarzinomen handelt es sich in 97% aller Fälle um ein Adenokarzinom mit tubuloalveolären oder azinösen Ursprungs. Zu den Charakteristika des Karzinoms zählen sowohl die Neigung zum multizentrischen Wachstum, als auch das Vorkommen verschiedener histologischer Wachstumsmuster.

Neben dem Adenokarzinom sind das Transitionalzellkarzinom und das kleinzellige neuroendokrine Prostatakarzinom mit 1-2% die häufigsten Neoplasien.

Seltener finden sich das adenoide Basalzellkarzinom, das sarkomatoides Karzinom, das muzinöses Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom [37].

### **1.3.2 Klassifikation**

Wie bei den anderen Neoplasien richtet sich die Stadieneinteilung beim Prostatakrebs auch nach der Ausbreitung bei der Diagnosestellung.

#### **1.3.2.1 TNM-STAGING**

Die Klassifikation des Ausbreitungsstadiums des Karzinoms wird über eine Einteilung nach den TNM-Kriterien durchgeführt.

Hier sei insbesondere auf das aktuelle TNM-STAGING nach UICC 6.Auflage 2002 [86] verwiesen.

Die „T“-Klassifikation umfasst die lokale Ausbreitung des Karzinoms in der Prostata selbst und kann von einem zufällig gefundenen kleinstem Befund, z.B. im Rahmen einer Prostataresektion, („T1a“) bis zur Infiltration benachbarter Organe, z.B. der Rektumvorderwand, („T4“) durch das Prostatakarzinom reichen.

Die lymphogene Metastasierung („N“ Stadium) erfolgt vor allem in die iliakalen und die obturatorischen Lymphknoten [86].

Die Fernmetastasierung (M-Stadium) betreffen primär das Skelettsystem, vornehmlich Becken und Wirbelsäule [86].

### 1.3.2.2 GLEASON-SCORE

Das Grading des Prostatakarzinoms hat das Ziel, den Malignitätsgrad des Karzinoms auf Grundlage des histologischen und zytologischen Aufbaus des Tumors zu bestimmen.

Es finden unterschiedliche Grading-Systeme Anwendung, wobei das Grading nach Gleason weltweit die größte Akzeptanz zeigt.

Bei dem Gleason-Grading wird der histomorphologische Aufbau des Tumors berücksichtigt. Den Veränderungen zur ursprünglichen Differenzierung des Drüsengewebes entsprechend, wird das Erscheinungsbild der Tumorzellen beschrieben und dem jeweiligen Gleasongrad zugeordnet [35].

Der Gleasongrad ist in fünf Stufen unterteilt, wobei Grad 1 und 2 gut differenziertes, Grad 3 ein mäßig differenziertes und Grad 4 und 5 ein schlecht differenziertes Tumorareal beschreibt.

Um den heterogenen Eigenschaften des Prostatakarzinoms Rechnung zu tragen, wird beim Gleason-Grading sowohl die häufigste als auch die zweithäufigste Tumordifferenzierung bestimmt. Die Summe aus beiden Wachstumsmustern kann demzufolge zwischen Gleason-Score zwei bis zehn variieren[35].

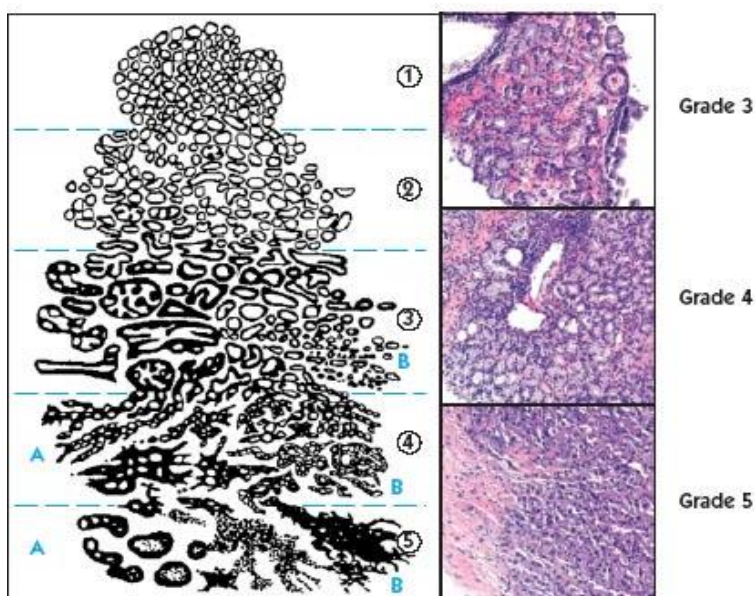


Abbildung 1: Gleason-Grading: [www.prostate-cancer.org](http://www.prostate-cancer.org)

## **1.4 Anatomie der Prostata**

### **1.4.1 Makroskopische Anatomie**

Die Prostata ist eine exokrine Drüse unterhalb der Harnblase, welche die männliche Harnröhre (Urethra) umschließt.

Sie ist ein ca. 3cm langes, 4cm breites und 2cm dickes, kompaktes kastaniengroßes Organ und wiegt bei ausgewachsenen jungen Männern etwa 20-30 Gramm [6]. Die Prostata besteht aus ca. 30-40 tubuloalveolären Drüsenläppchen mit etwa 15-30 Ausführungsgänge. Die Ausführungsgänge (Ductus Prostatici) münden in die Furche seitlich des Colliculus seminalis (Samenhügel) ein [48].

Das Gesamtorgan ist von einer derben bindegewebigen Kapsel umgeben [56]. Nach Mc NEAL wird eine Einteilung in 5 Segmente vorgenommen: die periphere, zentrale und transitionale Zone sowie eine anteriore fibromuskuläre Zone und eine präprostatistische Sphinkterzone. Dabei sind die Organachsen der Prostata durch die von kranial nach kaudal stumpfwinklig nach ventral geknickte Urethra und durch die Ductus ejaculatorii vorgegeben [57].

### **1.4.2 Histologie**

Die ausgereifte Prostata ist aus ihren 30-40 tubuloalveolären Drüsen aufgebaut, die in ein Stroma aus Fibrozyten und als besonders morphologisches Merkmal in viele glatte Muskelzellen eingebettet sind.

Die Drüsen werden von einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet, bestehend aus Basalzellen und Hauptzellen. Dessen innere Zylinderepithelschicht PSA und PAP (Prostataspezifische saure Phosphatase) produziert [70].

## **1.5 Diagnostik des Prostatakarzinoms**

### **1.5.1 Digitale rektale Untersuchung: DRU**

Die DRU ist Bestandteil der klinischen Routineuntersuchung der Prostata und sollte der S3-Leitlinie der DGU (Deutsche Gesellschaft für Urologie) zufolge fest in die urologische Vorsorgeuntersuchung bei Männern ab dem 40. Lebensjahr integriert sein [75].

Beurteilt werden dabei die Größe, Konsistenz, Abgrenzbarkeit und Druckschmerzhaftigkeit der Prostatadrüse. Als karzinomverdächtig gelten verhärtete, knotige Strukturen.

In Abhängigkeit von der Lage des Prostatakarzinoms ist die Veränderung erst ab einer bestimmten Größe tastbar. Da die meisten Karzinome in der peripheren Zonen der Drüse entstehen, können diese bereits ab einem Volumen von mindestens 0,2ml entdeckt werden [90].

Da nur etwa 60% der vorhandenen Tumore bei der DRU auffallen, sollte nach der aktuellen S3-Leitlinie von 2013 die alleinige DRU zur Früherkennung als unzureichend angesehen werden und sollte daher im Zusammenhang mit der PSA-Wert-Ermittlung erfolgen [75] [90].

### **1.5.2 Transrektaler Ultraschall: TRUS**

Von den sonographischen Untersuchungsmethoden kommt für die Primärdiagnose des Prostatakarzinoms hauptsächlich die TRUS in Frage.

Hierbei kann durch eine speziell der Anatomie angepasste Ultraschallsonde Größe und Dichte der Drüse beurteilt werden.

Das bildgebende Verfahren sollte aber wegen seiner geringen Sensitivität und Spezifität nur als Kombinationsverfahren mit der DRU und der PSA-Wert-Ermittlung verwendet werden und kommt hauptsächlich als Hilfsmittel bei der Biopsieentnahme zur Anwendung[75].

### **1.5.3 Labordiagnostik: Das prostataspezifische Antigen: PSA**

Das PSA wurde erstmals 1979 von Wang et al. isoliert. Dieses Antigen fanden Wang et al. sowohl in normalen, hypertrophen und malignem Prostatagewebe als auch in der Seminalflüssigkeit und im Blutserum, aber nicht in anderen menschlichen Geweben [85].

Seit Mitte der achtziger Jahre etablierte sich die PSA-Serumbestimmung als Maßnahme zur Tumordiagnostik. Die Halbwertszeit des Serum-PSA liegt bei 2.2 bis 3.2 Tagen [62].

Zum Nachweis des PSA-Wertes stehen in Deutschland ca. 60 verschiedene Assays zur Verfügung, die meist gering standardisiert sind. Somit sollten die Grenzwerte sowie Veränderungen des PSA-Wertes auch immer im Hinblick auf das jeweilige Testsystem betrachtet und beurteilt werden [51]. Das PSA ist zwar organspezifisch, jedoch nicht karzinomspezifisch. Erhöhte PSA-Werte sind ebenso bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) und auch bei entzündlichen Prozessen der Prostata zu finden. Allerdings ist festzuhalten, dass in Karzinomgewebe deutlich mehr PSA produziert wird als bei BPH. Ein Gramm Karzinomgewebe erhöht den Serum-PSA-Wert im Mittel um etwa 3.5 ng/ml, während im Gegensatz dazu ein Gramm BPH-Gewebe das Serum-PSA nur um 0.3 ng/ml erhöht [3]. Das präoperative PSA ist unverzichtbarer Bestandteil der Abschätzung der klinischen und pathologischen Situation im Rahmen von Nomogrammen wie z.B. den häufig verwendeten PARTIN-TABLES [64].

### **1.5.4 transrektale, ultraschallgesteuerte Prostata-Biopsie**

Liegt der Verdacht eines Prostatakarzinoms aufgrund erhöhter PSA-Werte und/oder einer auffälligen DRU vor, sollte diesem durch eine Prostatabiopsie nachgegangen werden.

Um eine Übertherapie zu vermeiden, sollte ein erstmals angestiegener PSA-Wert und eine gleichzeitig unauffällige DRU durch eine zeitlich versetzte PSA-Kontrolluntersuchung unter gleichen Parametern verifiziert werden [36].

Die transrektal, ultraschallgesteuert Stanzbiopsie gilt als Standardmethode zur Gewebegewinnung [75].

## 1 Einleitung

Hierbei wird nach erfolgter Antibiotikaprophylaxe, mit Hilfe einer transrektal eingeführten Ultraschallsonde unter sonographischer Kontrolle mittels einer Punktionskanüle, ein ca. 2cm langer Stanzzylinder des Prostatagewebes für die histopathologische Begutachtung entnommen.

In speziellen Fällen, z.B. Zustand nach Rektumamputation, kann die Biopsie auch von perineal vorgenommen werden [36].

Die ehemals als Goldstandard angesehen Sextantenbiopsie wurden in den letzten Jahren auf 10-12 Biopsieentnahmen erhöht [75].

Die Studie von Eichler et al. zeigte, dass durch eine Erhöhung der Biopsieanzahl von 6 auf 12 31% mehr Karzinomgewebe detektiert werden kann. Eine signifikante Verbesserung konnte durch eine weitere Erhöhung der Stanzanzahlen bis jetzt nicht erreicht werden [25].

Sollte das Biopsiegewebe keine Neoplasien enthalten, aber der Karzinomverdacht beispielsweise wegen auffälliger DRU oder erhöhtem PSA-Wert weiter bestehen, muss die Diagnostik fortgeführt werden [36].

Dies kann durch eine Saturationsbiopsie erfolgen, bei der mindestens 20 Gewebeproben entnommen werden [90].

Da die Biopsien nach standardisierten Schemata erfolgen und dabei evtl. suspektere Areale der Drüse nicht gestanzt werden, versucht man heutzutage durch meist bildgebende Verfahren die Entnahme in diesen suspekten Bereichen der Prostata zu erleichtern, z.B. mit Hilfe der Elastographie, der CT- oder MRT- unterstützte Biopsieentnahme, des Histoscannings oder auch dem computergestütztem Analysesystem ANNA-C-TRUS .

[88][90][91].

### **1.5.5 Computertomographie: CT**

In der urologischen Primärdiagnostik hat die alleinige CT einen eher untergeordneten Stellenwert.

Wegen seiner fehlenden Kontrastierung zwischen Karzinomherden und tumorfreien Prostataarealen ist die Abgrenzung pathologisch organbegrenzten von kapselüberschreitenden oder samenblaseninfiltrierenden Prostatakarzinomen ungenau [58].

## 1 Einleitung

Die CT kommt hauptsächlich mit einer Positronenemissionstomographie (PET) als PET/CT zum Einsatz.

Hierbei werden mit Hilfe einer Tracersubstanz, z.B. Fluor 18, C-11-Colin, suspekte Areale angezeigt [58].

Das PET/CT kommt heutzutage meist bei der Rezidivdiagnostik zum Einsatz [58].

### **1.5.6 Magnetresonanztomographie: MRT**

Erfolgsversprechender im Vergleich zum CT gilt die MRT.

Ausschlaggebend dafür ist ein technischer Mindeststandard für die MRT-Untersuchung: es sollte dabei ein Hochfeldgerät mit min. 1,5 Tesla und einer Endorektal-Spule verwendet werden, wodurch ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis gewährleistet wird. Die Schichtdicke sollte 3mm betragen [58][75].

Die MRT ist den Leitlinien zu Folge ein gutes Hilfsmittel zur weiteren Diagnostik nach negativer Biopsie und bestehendem Karzinomverdachts.

Wie oben bereits erwähnt können hierbei suspekte Bereiche der Prostata gezielt biopsiert werden. Es wird empfohlen, die MRT-Untersuchung sechs bis acht Wochen nach erfolgter Biopsie durchzuführen [75].

### **1.5.7 Skelettszintigraphie**

Um eine evtl. ossäre Metastasierung und die damit verbundenden abweichenden Therapiemaßnahmen zu diagnostizieren, ist die Skelettszintigraphie das Mittel der Wahl.

Die Skelettszintigraphie wird mit einer Tracersubstanz, z.B.  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertes Phosphonat, durchgeführt, um die karzinomverdächtigen Bereiche anzuzeigen.

Problematisch dabei ist, dass im frühen Stadium in kleinen Metastasen keine Traceraufnahme beobachtet werden kann oder auch in degenerativen Bereichen ein falsch-positiver Befund geliefert wird [45].

## **1.6 Therapieformen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms**

Bei der Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms steht dem Patienten und dem Therapeuten heute eine zunehmende Anzahl an Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung [81].

Bei der Entscheidung müssen allerdings verschiedenste Parameter wie Alter und Konstitution des Patienten sowie Tumorstadium, PSA-Kinetik, als auch Nebenwirkungen der Therapie berücksichtigt werden [75].

Neben der Therapie des Beobachtens, auch bezeichnet als Wait-Full-Watching, stehen einige mehr oder weniger invasive Behandlungsmöglichkeiten zur Auswahl [81].

### **1.6.1 Radikale Prostatovesikulektomie**

Die radikale Prostatektomie gilt heute als das etablierteste Therapieverfahren mit kurativem Ansatz beim lokal begrenzten Prostatakarzinom. Sie ist nach wie vor der Goldstandard, an dem sich alle andere Prozeduren messen lassen müssen [83].

Im Zuge der Weiterentwicklung sind zu der klassischen, retropubischen radikalen Prostatektomie noch die perineale und die laparoskopische Prostatektomie hinzugekommen [67][84].

Alle drei Operationsweisen besitzen hinsichtlich ihres Operationszugangs, postoperativen Komplikationen und Behandlererfahrung ihre Vor- und Nachteile [28].

Man versucht die Vorteile der endoskopischen-extraperitonealen radikalen Prostatektomie Bezug genommen auch auf geringere postoperative Beschwerden auszubauen, welches auch mit einer schnelleren Zurückführung des Patienten in den Alltag einhergeht. Aufgrund dessen wird vermehrt versucht, über roboterunterstützte Operationsvorgänge die Behandlung für den Operateur zu erleichtern [50].

Nach den „ Guidelines on Prostate Cancer“ der European Association of Urology (EAU) sollten die Grenzen der Prostatektomiebehandlung bis zu einem PSA-Level < 20ng/ml, das Staging ≤ T3a und der Gleasonscore ≤8 durchgeführt werden [36].

## **1.6.2 Strahlentherapie**

### **1.6.2.1 Externe perkutane Strahlentherapie (EBRT)**

Die EBRT ist eine anerkannte Therapiealternative zur radikalen Prostatektomie [36]. Die perkutane Strahlentherapie hat während der 1990er Jahre durch die Einführung der dreidimensionalen computertomographiegestützten Bestrahlungsplanung und verbesserter „3D-konformaler“ Bestrahlungstechnik bedeutende Fortschritte vollzogen. Durch diese technischen Modifikationen kann heute eine hohe Bestrahlungsdosis in der Prostata - bis maximal 78 Gy - unter Schonung von vitalen Strukturen wie Urethra, Rektum und Harnblase erreicht werden, bei noch akzeptablen Dosen und damit verbundenen Nebenwirkungen für die Nachbarstrukturen [72].

Als weitere EBRT-Methode gilt heute die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT). Im Gegensatz zur 3D-Konformationsstrahlentherapie mit homogenem Strahlenfeld, kann der Querschnitt des Strahlenfeldes bei der IMRT inhomogen in der Stärke moduliert werden. Somit kann die Bestrahlung nicht nur durch die Kollimatoren verändert werden, sondern auch durch die Intensitätsänderung im Strahlenfeld. Die IMRT bietet den Vorteil einer hochdosierten Bestrahlung bis 84 Gy mit einem akzeptablen Nebenwirkungspotential. Der Nachteil liegt im hohen technischen und personellen Aufwand [24].

Durch diese heutigen Modifikationen in der EBRT ist das Verfahren schonender bezüglich der Rate an Akut-(innerhalb 90 Tage nach Therapie) und Spättoxizität (mehr als 3 Monate nach Therapie) sowie effektiver hinsichtlich der lokalen Tumorkontrolle [24].

### **1.6.2.2 Brachytherapie**

Neben der EBRT stehen weitere strahlentherapeutische Verfahren zur Verfügung. Bei der LDR(low-dose-rate)-Brachytherapie wird die Strahlenquelle direkt durch Implantation von sog. „Seeds“ in den Tumor eingebracht.

Als Strahlenquelle stehen heute hauptsächlich Radioaktives Jod-125 und Palladium-103 zur Verfügung [23].

Die niedrige Photonenenergie der Seeds führt zu einer geringeren Ausdehnung der Strahlenwirkung im Gewebe, somit können sensible Organe wie Harnröhre und

## 1 Einleitung

Rektum geschont werden. Die Halbwertszeit der Strahlenwirkung beträgt 60 Tage für Jod-125 und 17 Tage für Palladium 103 [23].

Nach Implantation von Jod-125-Seeds werden über einen Zeitraum von einem Jahr Dosen von ca. 250 Gy in die Prostata abgegeben [23].

Nach den Empfehlungen der AMERICAN BRACHYTHERAPY SOCIETY (ABS) sind für diese Therapieform vor allem Patienten mit organbegrenztem Tumor (T<sub>2</sub>), PSA < 10 ng/ml und einem Gleason Score < 7 geeignet. Die Prostatagröße sollte weniger als 60 Gramm betragen [36].

Im Gegensatz dazu wird bei der HDR (high-dose-rate)-Brachytherapie mittels Hohlnadeln eine Strahlenquelle, z.B. Iridium-192, in die Prostata für 10-20 Minuten eingeführt und danach wieder entfernt. Diese Afterloading-Therapie erfolgt meist nach vorrangegangener perkutaner Bestrahlung und wird in 2 Sitzungen in 2-wöchigem Abstand durchgeführt. Durch diese Kombination von äußerer und interner Bestrahlung wird versucht, die Schäden an den Nachbarorganen bzw. der Haut im Vergleich zur alleinigen EBRT deutlich zu verringern.

Diese Therapie eignet sich hauptsächlich für im Wachstum aggressivere, aber noch organbegrenzte Karzinome [23].

### 1.6.3 Hochintensiver fokussierter Ultraschall: HIFU

Bei der HIFU-Therapie handelt es sich um ein vor über 10 Jahren eingeführtes transrektales Verfahren, das kontakt- und strahlungsfrei zu einer interprostatischen Koagulationsnekrose führt. Die Auswirkung auf Tumorgewebe wurde von Chaplon et al. bereits 1992 anhand in vivo Versuche an Ratten bewiesen [16].

Die ersten klinischen Erfolge erzielten Gelet et al. bei der Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms [29].

Für die HIFU-Therapie stehen derzeit zwei Apparaturen zur Verfügung.

Zum einen das Sonoblate500 (Focus Surgery Inc., Indianapolis, USA) und zum anderen das weitaus häufiger benutzte Gerät Ablatherm (EDAP, Lyon, Frankreich), welches auch in dieser Studie zur Anwendung kam und im Folgenden kurz erläutert wird. [89].

## 1 Einleitung



Abbildung 2: Ablatherm-HIFU-Gerät: [www.edap-hifu.de](http://www.edap-hifu.de)

Durch die Anwendung eines transrektal eingeführten, sphärischen, löffelförmigen Schallwandlers wird dabei ein hoch intensiver, konvergenter Ultraschallstrahl auf einen Brennpunkt projiziert. Durch maximale seitliche Schwenkung des Schallkopfes bis 45° kann der Fokus auch im peripheren Anteil der Prostata drüse exakt positioniert werden.

Um die rektale Schleimhaut über den gesamten Zeitraum der Behandlung zu schützen, wird ein ballonummantelter Schallkopf mit einem Kühlsystem verwendet.

Die Läsionsausdehnung liegt laut Hersteller etwa  $\frac{3}{4}$  vor dem Brennpunkt und  $\frac{1}{4}$  dahinter. Der Therapiebereich beschränkt sich auf eine Breite von 17mm und einer variablen Länge von 19-24 mm [89].

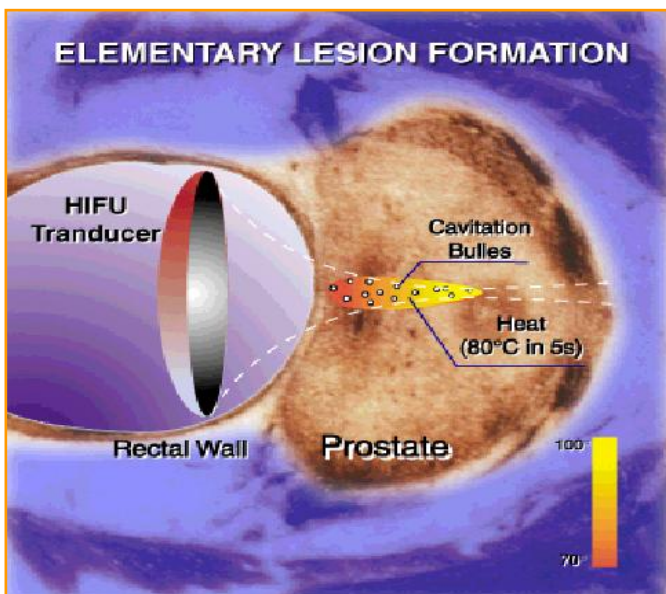


Abbildung 3: HIFU-Läsion: [www.edap-hifu.de](http://www.edap-hifu.de)

## 1 Einleitung

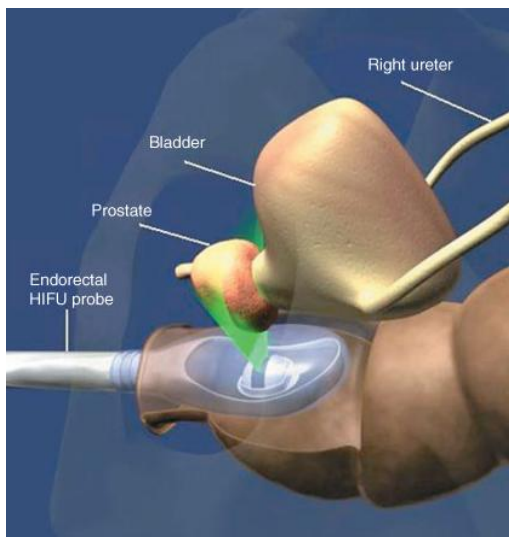
Während der Ultraschalleinwirkung sind für die Gewebeerstörung im Wesentlichen zwei Effekte verantwortlich: ein thermischer und ein mechanischer (Kavitations)-Effekt.

Der thermische Effekt wird durch die Absorption von Ultraschallwellen im Gewebe verursacht. Die Temperatursteigerung in Geweben hängt vom jeweiligen Absorptionskoeffizienten des Gewebes sowie von Größe, Form und Temperaturempfindlichkeit des erhitzten Bereiches ab. Infolge einer Gewebhyperthermie auf 85-100°C im Therapiebereich entsteht eine scharf begrenzte Koagulations-Nekrose im Prostataparenchym [79].

Für den mechanischen Effekt sind kleine Hohlräume im Gewebe verantwortlich, die temporär durch einen von den Schallwellen bedingten Unterdruck entstehen. Beim Kollaps dieser Kavitationen entstehen lokal sehr hohe Drücke, wodurch es durch das Freiwerden der Energie zur Gewebedestruktion kommt. Dieser Kavitationseffekt mit Zerreißung von Zellwandstrukturen scheint der entscheidende Faktor für die kontrollierte Zerstörung des Prostatagewebes zu sein [79].

Die Behandlung erfolgt aus anatomischen Gründen endorektal mit 3,0 MHz.

Eine zusätzliche biplane 7,5 MHz-Ultraschall-Sonde ermöglicht eine präzise Bildgebung im Verlauf der Planung und der Therapie.



**Abbildung 4: HIFU-Therapie: [www.edap-hifu.de](http://www.edap-hifu.de)**

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Effektivität der HIFU-Therapie beim lokal begrenzten Prostatakarzinom beschäftigt.

## 1 Einleitung

Eine an der Urologischen Abteilung der Universität Regensburg durchgeführte Studie weist folgende Resultate der HIFU-Therapie auf:

So wurde bereits 2004 bei 146 Patienten bei einem Follow-Up von Median 22.5 Monaten bei 93,4% der Patienten eine negative Histologie und bei 87% aller Patienten ein konstanter PSA Wert < 1 ng/ml festgestellt [9].

Eine Studie von 2008, die die Langzeitdaten von 140 Patienten im Rahmen einer multizentrischen Studie evaluierte, zeigte bei 84,4% der Patienten nach einer Follow-Up-Zeit von  $6.6 \pm 1.1$  Jahren negative Kontrollbiopsien. Der PSA-Nadir lag in 68,4% unter dem Wert von 0,5 ng/ml, die rezidivfreie 5- und 7-Jahres-Überlebensrate war 77% und 69% [10].

Im Folgenden werden drei aktuelle Langzeitstudien, die unabhängig voneinander 2013 veröffentlicht wurden, aufgelistet.

In der Studie von Thüroff et al. wurden die Daten von Patienten, die im Zeitraum von 1996-2009 im Klinikum Harlaching München eine HIFU-Behandlung als Primärtherapie oder als Salvage-Therapie erhalten hatten, ausgewertet.

Kriterien für die Auswertung war ein Prostatakarzinom mit folgendem Staging: T1-2, N0, M0, PSA $\leq$ 50 ng/ml. Es konnte die Datenlage von n=704 Patienten für die Studie verwendet werden. Alle Patienten wurden ausschließlich mit dem HIFU-Gerät Ablatherm behandelt. Als Parameter für ein Therapieversagen wurde die Phoenix-Definition verwendet: PSA-Nadir +2 ng/ml.

In dieser Studie zeigte sich eine 10 Jahre Überlebensrate von 99% und eine 10 Jahre-Metastasenfreiheit von 95%.

Durch eine zusätzliche Einteilung der Kohorte nach der Risikobewertung nach D'Amico von 2003, zur Beurteilung der biologischen Aggressivität und dem damit folgendem Risiko einer frühzeitigen Metastasierung, konnten folgende Zahlen ermittelt werden.

In der Hoch-Risiko-Gruppe benötigte nach 5 Jahren 18% und nach 10 Jahren 32% eine erneute HIFU-Therapie, in der Mittleren-Risiko-Gruppe waren es 13% bzw. 28%.

Vergleichsweise dazu benötigten nur 2% der Niedrig-Risiko-Gruppe nach 10 Jahren eine erneute Therapie [80].

Die fast gleichzeitig veröffentlichte Langzeitstudie der Universität Regensburg zeigt folgende Resultate auf: hier wurde die Datenlage von n=538 Patienten, die zwischen 1997-2009 an der urologischen Abteilung der Universität Regensburg mit einer

## 1 Einleitung

HIFU-Behandlung therapiert wurden, statistisch erfasst. Auch hier wurde die HIFU-Therapie ausschließlich mit den verschiedenen Generationen der Ablatherm-Einheit durchgeführt.

In dieser Studie kamen auch die Risikoeinteilung nach D`Amico und die Phönix-Definition zur Anwendung.

Bei allen Patienten wurden im 3-monatigen Rhythmus nach der Therapie Kontrolluntersuchungen festgesetzt um den Therapieerfolg zu beobachten. Der Follow-up-Zeitraum betrug im Mittel 8.1 Jahre.

Der PSA-Nadir von 0,4 ng/ml wurde hier im Mittel nach 19.9 Wochen erreicht.

Auf Grundlage der Phönix-Definition und der D`Amico Einteilung konnte folgender Therapieerfolg festgesetzt werden: in der Niedrig-Risiko-Gruppe n=229 betrug die Tumorfreiheit nach 5 Jahren 88% und nach 10 Jahren 71%. In der Mittleren-Risiko-Gruppe n=211 waren es 83% bzw. 63% und der Hoch-Risiko-Gruppe n=91 48% bzw. 32%.

Insgesamt unterzogen sich 18% des Patientenkollektivs einer Salvage-Therapie.

Weitere Untersuchungsparameter befassten sich in dieser Studie auch mit der therapieinduzierten Impotenz und Inkontinenz und der dadurch erzeugten Lebensqualität [27].

In einer dritten Langzeitstudie wurden die Daten von n=1002 Patienten, die mit HIFU im Zeitraum von 1997-2009 therapiert wurden, ausgewertet.

Der Nachuntersuchungszeitraum war 6.4 Jahre und die Tumorfreiheit auf Grundlage der Phönix-Definition für 8 Jahre betrug 76%, 63% und 57% für die Niedrig-,Mittel- und Hoch-Risiko-Gruppe.

60% der Patienten benötigten nur eine HIFU-Behandlung, 38% zwei und 2% unterzogen sich drei Behandlungen.

Auch wurden in dieser Studie die Daten für Impotenz und Inkontinenz erfasst [21].

## 1.7 Follow-Up

Ist eine potentiell heilbare Tumorerkrankung primär kurativ behandelt worden, stellt sich aus medizinischer, aber auch aus Sicht des Patienten die Frage nach der Effektivität der Therapie.

Die EAU gibt in ihren GUIDELINES ON PROSTATE CANCER ebenso wie die DGU Leitlinien für die Behandlung und die Nachsorge vor [36][75].

Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom werden in der Regel lebenslang nachuntersucht [75].

Die Bestimmung des PSA zusammen mit der krankheitsspezifischen Anamnese sind die Eckpfeiler bei der Tumornachuntersuchung.

Der PSA-Wert verändert sich aufgrund der verschiedenen Therapien unterschiedlich, aber ein ansteigender PSA-Wert, ist unabhängig von der Vorbehandlung, immer ein Indiz für ein evtl. Rezidiv. Dabei sollte jedoch ein einmalig erhöhter PSA zeitlich versetzt überprüft werden [36].

Weitere Follow-Up Untersuchungen wie DRU, Biopsien, TRUS und andere bildgebende Verfahren sollten erst bei Rezidivverdacht aufgrund eines erhöhten PSA-Wertes und/oder suspekten Symptomen erfolgen [36].

Im Falle einer HIFU-Behandlung ist die Nachsorge insofern problematisch, als dass die Richtlinien der nationalen und internationalen Gesellschaften bei dieser Therapie bisher keine Stellung beziehen [36] [75].

Das einzige bisherige HIFU-spezifische Versagenskriterium für das Follow-Up stellt die *Stuttgart-Definition* dar: durch eine retrospektive Studie von Blana et al. wurden die Daten von 285 Patienten erfasst, die zwischen 1997-2006 in 2 medizinischen Zentren (Lyon, Frankreich und Regensburg) eine HIFU-Therapie erhalten hatten.

In dieser Studie wurde festgelegt, dass ein biochemisches Versagen bei einem posttherapeutischen PSA-Wert  $\geq$  PSA-Nadir+ 1,2 ng/ml angenommen werden kann. Der PSA-Nadir von 0,13 ng/ml wurde in dieser Studie im Mittel nach 12.9 Wochen erreicht [11].

Für die Notwendigkeit bzw. den Zeitraum einer Kontrollbiopsie nach erfolgter HIFU-Therapie stehen bis jetzt keine nationalen und internationalen Leitlinien zur Verfügung [36] [75].

## **1.8 Ziel der Studie**

Im Rahmen der Tumornachsorge nach HIFU-Therapie des Prostatakarzinoms wird bei bis zu 20% der behandelten Patienten mittels Prostatastanzbiopsie Karzinomgewebe in der Restdrüse detektiert [78].

Wobei in einer Studie von Thüroff et al. festgestellt werden konnte, dass sich die Tumormasse bei diesen Patienten bis zu 90% reduziert hatte [78].

Unter Berücksichtigung des synchron bestimmten, oft diskrepanten niedrigen PSA-Wertes stellt sich die Frage, ob es sich insbesondere in den früher häufig durchgeführten Kontrollbiopsien 3 Monate nach HIFU-Therapie immer um vitales Karzinomgewebe handelt, oder ob man vielmehr eine „Momentaufnahme“ im Prozess des Zellunterganges sieht.

Da diese Unterscheidung von noch vitalem Karzinomgewebe (insbesondere in Nekrosezonen) und reiner Tumornekrose unter Umständen auch für den erfahrenen Pathologen schwierig sein kann, ist ein Ziel dieser Studie, ob diese pathologische Begutachtung mittels Immunhistochemiemarker vereinfacht werden kann.

Des Weiteren ist im Sinne der Fragestellung folgender Parameter zu untersuchen, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Follow-Up Zeitraum zwischen Behandlung und erster positiver Kontrollbiopsie sowie der PSA-Wert (PSA-Post) zu diesem Zeitpunkt besteht.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Immunhistochemie

Immunzytochemische Färbemethoden dienen der Markierung eines Antigens im Zytoplasma, Zellmembran oder Zellkern. Somit lässt sich in Geweben eine Vielzahl von Zielstrukturen im histologischen Schnitt nachweisen.

Das Prinzip dieser Methode wurde erstmals 1965 von Beutner et al. für den Nachweis und die Quantifizierung humaner Autoantikörper in der Fluoreszenzmikroskopie angewandt und später durch Masson und Sammons in einem immunenzymatischen Verfahren wiederentdeckt [7][55].

#### 2.1.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die histologischen Gewebeschnitte werden mit einem Antikörper inkubiert, wobei sich besonders Antigene eignen, die spezifisch nur an bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmtem Gewebe auftreten. Um die Bindung des Antikörpers nachzuweisen, muss dieser erst sichtbar gemacht werden.

Es stehen dazu verschiedene Methoden, wie z.B. die Immunperoxidase-Technik, die Avidin-Biotin-Methoden, die APAAP-Methode, sowie das Immunfluoreszenzverfahren zur Verfügung.

Bei den hier beschriebenen Färbungen wurde die Avidin-Biotin-Methode angewandt, es handelt sich dabei um eine DREI-SCHRITT INDIREKTE METHODE, die in Abb. 5 kurz skizziert wird:

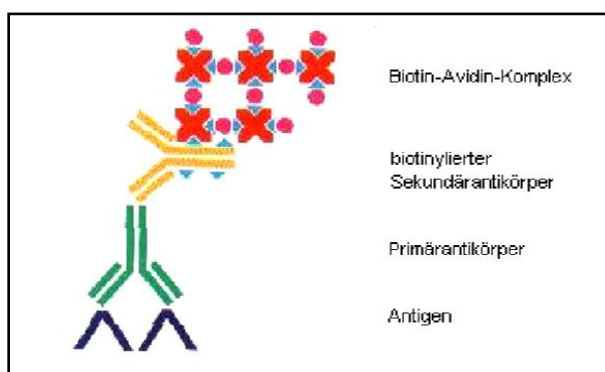


Abbildung 5: ABC-Methode: Immunhistochem. Färbemethoden, Dako Cytomation.

### **2.2 Immunhistochemisch verwendete Marker**

Ein grundsätzliches Problem immunhistochemischer Methoden ist die Subjektivität des untersuchenden Pathologen bei der Beurteilung des pathologischen Gewebes. Aus der Vielfalt der in jüngster Zeit neu beschriebenen immunhistochemischen Marker haben sich drei für diese Studie als besonders hoch spezifisch erwiesen: Der Proliferationsmarker MIB-1 [19][66], der Basalzellmarker 34- $\beta$ -E-12 [22][41] in Zusammenhang mit AMACR [14][42].

#### **2.2.1 MIB-1/Ki-67 als Proliferationsmarker**

Für die Tumorforschung ist die Untersuchung der Proliferation somatischer Zellen von bedeutendem Interesse. Zum einen da für die Tumorentstehung eine unkontrollierte Zellteilung zu Grunde liegt, zum anderen wird in der Routinediagnostik die quantitative Erfassung der Zellproliferation benötigt, um das Wachstumsverhalten von Neoplasien vorherzusagen [19].

Die Zellteilungsrate bzw. die Ermittlung der Wachstumsfraktion der Tumorzellen dient oft als Einschätzungskriterium für die Malignität eines Tumors. In der „klassischen“ histopathologischen Tumordiagnostik werden die Zellteilungsraten anhand der sich in Mitose befindlichen Zellen bestimmt. Da diese Bestimmung jedoch sehr zeitaufwendig ist, wurde nach einfach einzusetzenden Proliferationsmarkern gesucht. Einen solchen geeigneten Marker stellt der monoklonale Antikörper Ki-67 dar [19].

pKi-67 ist als proliferationsassoziiertes Antigen in Zellen zu finden, die sich in einer Phase der Zellteilung befinden. Seine Anwesenheit ist fest an bestimmte Zellzyklusphasen gebunden. Das Protein wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert, das heißt pKi-67 ist während der G1-, S-, G2-Phase sowie während der Mitose (M-Phase) nachweisbar, aber immer abwesend in der Ruhephase (G0) oder in apoptotischen Zellen [44] [71].

Genauer gesagt beginnt die Expression in der Mitte der G1-Phase, woraufhin der Spiegel im Laufe der S- und G2-Phase ansteigt, um seinen Höhepunkt in der M-Phase zu erreichen [33]. Das Antigen findet sich in aktiven Interphase-Zellen hauptsächlich im Bereich des wiederentstehenden Nukleus sowie an anderen Orten des Zellkerns, welche Zentromeren- und Teleomeren-Satelliten-DNA enthalten.

## 2 Materialien und Methoden

Während der S-Phase befindet sich praktisch das gesamte vorhandene Ki-67-Protein in der dichten fibrillären Komponente des Nukleus. Während der M-Phase lagert sich das Antigen um und nimmt eine perichromosomale Lokalisation ein [52][53].

Der ursprünglich zur Darstellung von pKi-67 verwendete monoklonale Antikörper Ki-67 hatte aber den entscheidenden Nachteil, dass er ausschließlich bei Gefrierschnitten anwendbar war. Aus diesem Grund wurde intensiv geforscht, um alternative mono- oder polyklonale Antikörper zu erhalten, die auch für routinemäßig in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe geeignet sind. Durch Klonierung des für pKi-67 kodierenden Gens konnten entsprechende isospezifische monoklonale Antikörper erstellt werden.

Mit den aus den Versuchen hervorgegangenen Antikörpern der MIB-Serie, wie z.B. MIB-1, konnte auch routinemäßig archiviertes Gewebe auf die Expression von pKi-67 untersucht werden [15].

In der histopathologischen Routine-Diagnostik ist es mittlerweile möglich, mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen schnell und reproduzierbar die Wachstumsfraktion einer humanen Zell-Population immunhistologisch zu bestimmen [34].

Die Beurteilung von benignen und malignen Zellverbänden wurde bereits unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht [32][33].

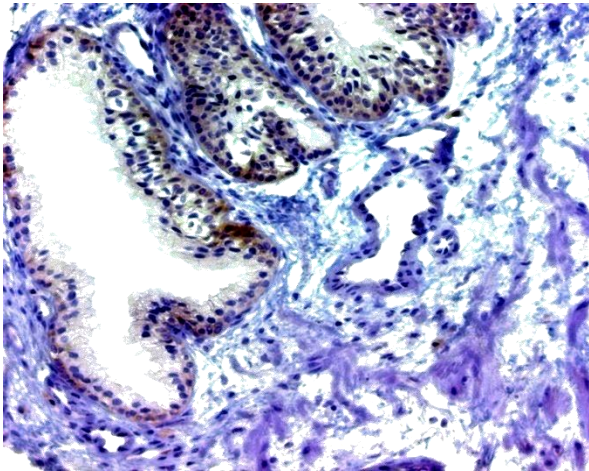
Die Proliferation des Prostatakarzinoms, die durch die Erfassung von Mitoserate mit Unterstützung des Ki-67 erfasst wurde, ist bereits in zahlreichen Studien zum klinischen Verlauf in Bezug gesetzt worden [19][46][66].

Eine Versuchsreihe von Stattin et al. bestätigte die schon von Bubendorf et al. aufgestellte These, dass Ki-67 einen unabhängigen prognostischen Marker für das Prostatakarzinom darstellt.

An 125 nicht vorbehandelten Prostatakarzinomen wurde jeweils der Anteil Ki-67-positiver Zellen bestimmt und zu der Überlebenszeit in Bezug gesetzt. Dabei korrelierte der Ki-67-Index mit dem Grading und mäßig mit dem Staging des Tumors. In dieser Untersuchung zeigte sich auch die bedeutsame Tatsache, dass jene Patienten mit einer Proliferationsrate von mehr als 3% eine um die Hälfte verringerte Lebenserwartung hatten [74].

Desweiteren konnte Coetzee et al. bei einer Versuchsreihe eine Korrelation zwischen Gleason-Score, T-Staging und Ki-67-Index herstellen [18].

Neuere Studien versuchten bereits mit Hilfe des Ki-67 Proteins als Angriffspunkt das Tumorwachstum zu beeinflussen [44].



**Abbildung 6: IHC-MIB-1**

### **2.2.2 Basalzellmarker 34- $\beta$ -E-12 ( CK-HMW)**

Im Jahr 1968 wurden elektronenmikroskopisch die stabilsten Strukturen des Cytoskeletts (CK) entdeckt, die Intermediärfilamente [49].

Alle Cytokeratine zeichnen sich durch positive Reaktionen mit den Antikörpern gegen epidermale  $\alpha$ -Keratin-Proteine aus. So kam die Klassifizierung und Namensgebung der Cytokeratinfamilie zustande [60].

Cytokeratine sind wasserunlösliche Intermediärefilament-Zytoskelettproteine, die für die Entwicklung und Differenzierung von Epithelzellen bedeutsam sind.

Ungefähr zwanzig unterschiedliche Cytokeratine sind bis heute identifiziert und klassifiziert worden. Sie wurden ihrem Molekulargewicht und ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend nummeriert [60].

Da die Basalzellen in den Routinefärbungen, vor allem posttherapeutisch, oft nur schwer oder gar nicht erkennbar sind, ist ihre immunhistochemischer selektive Darstellbarkeit mit einem Antikörper gegen hochmolekulares Zytokeratin von großer Bedeutung [12].

In allen gutartigen Prostataläsionen werden die Basalzellen in den Drüsen mit diesem Marker zytoplasmatisch gefärbt. Bei Karzinomen ist diese Reaktion negativ, da die Basalzellen in Karzinomdrüsen fehlen.

## 2 Materialien und Methoden

Da aber bei suspekten Prostataläsionen, wie atypische mikroglanduläre Proliferationen, HGPIN oder auch der atypischen adenomatösen Hyperplasie (AAH) Basalzellen vorhanden sein können, deren Zelllagen fragmentiert sind oder Zellen ganz fehlen, wodurch eine entsprechende positiv oder negativ immunhistochemische Reaktionen ersichtlich werden, muss die alleinige Beurteilung durch den Zytokeratinmarker kritisch beurteilt werden. Bei der Beurteilung dieser suspekten Drüsenläsionen kann der Tumormarker P504S hilfreich sein [42].

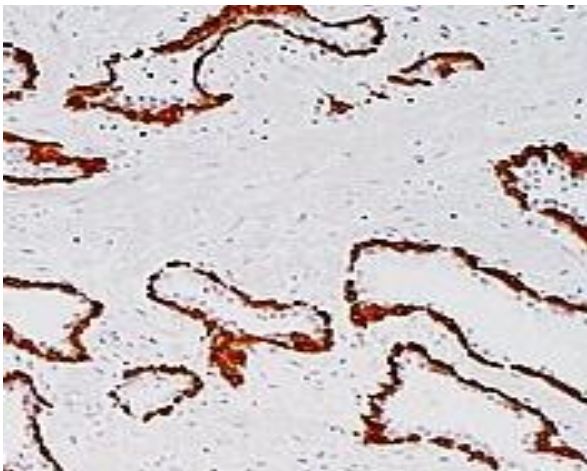


Abbildung 7: IHC-34-β-E-12

### 2.2.3 Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase, AMACR (P504S)

P504S ist ein zytoplasmatisches Protein, das als humanes Enzym - Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase identifiziert wurde. Dieses Enzym spielt eine Rolle bei der  $\beta$ -Oxidation verzweigter Fettsäuren und ist involviert in Gallensäurestoffwechsel [59].

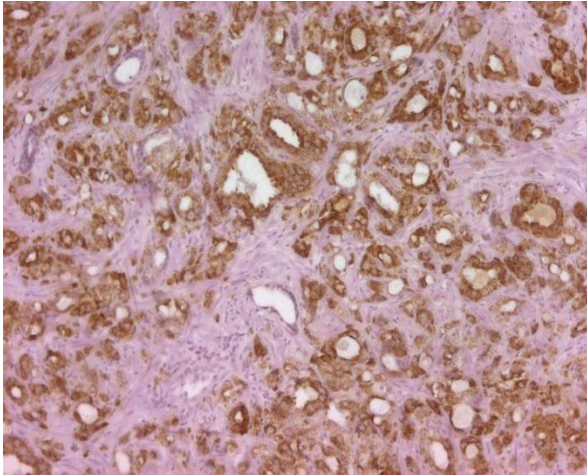
Durch eine Studie von Xu et al. wurde in einer quantitativen mRNA-Analyse eine Überexpression des Enzyms im Prostatakarzinom gegenüber benignen Prostatazellen gezeigt [92].

Dies führte dazu, dass ein AMACR-spezifischer Antikörper entwickelt wurde.

Dieser monoklonale Kaninchen-Antikörper gegen P504S zeigt somit eine bevorzugte Bindung an Prostatakarzinomgewebe und nur eine sehr geringe oder keine Bindung an gesundes Prostatagewebe bzw. Gewebe von gutartigen Prostata-Hyperplasien, das Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet wurde [5].

## 2 Materialien und Methoden

Man kann so mit Hilfe dieses Antikörpers kanzeröses und normales Drüsenepithel gut differenzieren, da diese Antikörper basalzellunabhängig sind und dadurch eine Diagnostiklücke des zytokeratinbasierten immunhistochemischen Marker 34- $\beta$ -E-12 schließt [41].



**Abbildung 8: IHC-AMACR**

### **2.3 Patienten**

Aus der Regensburger HIFU-Datenbank - Zeitraum Oktober 1998 bis Dezember 2004 - wurden die diejenigen Patienten extrahiert, bei denen im Rahmen des Follow-Up histopathologisch der Verdacht auf ein Lokalrezidiv geäußert wurde. Alle HIFU-Behandlungen erfolgten an der Urologischen-Klinik St. Josef in Regensburg. Vor Oktober 2000 kam dabei die zweite Generation des Ablatherm Prototyps zur Anwendung, seitdem wurde die HIFU-Therapie mit der Ablatherm-Maxis®-Apparatur (EDAP, Lyon France) durchgeführt.

Es konnten repräsentative HE-Schnitte mit „positiven“ POST-HIFU Biopsien von insgesamt 58 Patienten gefunden werden, die allesamt nochmals von einem erfahrenen Uropathologen detailliert auf Karzinombefall begutachtet wurden.

## 2 Materialien und Methoden

Zur Abschätzung der therapieinduzierten Gewebeveränderung wurden die Biopsien der jeweiligen unbehandelten Prostaten herausgesucht. Bei 51 dieser 58 Patienten konnten die paraffineingebetteten Biopsiezylinder vor der HIFU-Therapie ermittelt werden.

Um die Effektivität und Vorgehensweise der einzelnen zu verwendenden Immunhistochemie-Färbemethoden einschätzen zu können und zu erlernen, wurde eine vergleichbare Patientenkohorte von bereits bestrahlten Patienten-Prostaten verwendet, da die immunhistochemische Aufbereitung vorbestrahlter Prostaten bereits seit über 10 Jahren erforscht und angewandt wird.

Dieses zweite Patientenkollektiv umfasste 32 Patienten, die sich einer EBRT-Behandlung unterzogen hatte, wobei hier nur bei 4 Patienten die Biopsien vor der kurativen Behandlung zur Verfügung standen.

Im Zuge der Auswahl der meist multiplen Biopsien – sowohl vor der Therapie als auch im Rahmen des Follow-Up - wurden daraufhin jeweils die am aussagekräftigsten, d.h. am stärksten karzinombefallenen Biopsien ausgesucht und für die weitere Aufarbeitung asserviert.

Um den hohen Fallzahlen der HIFU-Patienten aus Regensburg eine entsprechende Anzahl an Patienten, die bestrahlt wurden, gegenüberstellen zu können, musste auf andere Urologische Abteilungen und mit denen kooperierenden pathologischen Instituten zurückgegriffen werden: Klinikum Deggendorf, Dr. Mandl Amberg, Klinikum Rechts der Isar, Pathologisches Institut Aurich, Klinikum Lippe-Detmold GmbH, Krankenhaus München Harlaching, Krankenhaus München Bogenhausen.

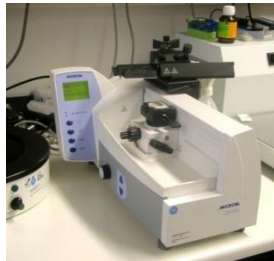
Alle Patienten standen zum Zeitpunkt der Biopsien unter keinerlei medikamentöser Therapie.

### **2.4 Materialverarbeitung**

#### **2.4.1 Aufbereitung der Paraffinblöcke**

Zur Anwendung kamen ausschließlich routinemäßig fixierte, paraffineingebettete Prostatabiopsien. Zunächst wurden von jedem Biopsieblock mit einem Mikrotom 4 in 3µm dicke Schnitte erstellt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Superfrost-Objektträger(OT) fixiert.

3 der jeweiligen OT wurden für die 3 Färbungen benötigt, der vierte OT wurde zur Reserve aufbewahrt.



**Abbildung 9: Zuschnitt**

#### **2.4.2 Vorbehandlung der Schnitte**

##### **2.4.2.1 Entparaffinisierung**

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur mussten die Schnitte nach Protokoll entparaffinisiert und hydratisiert werden. Durch diese Behandlung wurde das gelöste Paraffin ausgewaschen und Wasser wieder ins Gewebe aufgenommen.

##### **2.4.2.2 Antigendemaskierung**

Durch die Einwirkung des Formalins kam es bei dem Gewebe zu einer Vernetzung (Cross-Links) der Proteine, wodurch ein Verlust der Immunreaktivität der benötigten Antigene entstanden ist, benannt auch als „Maskierung“ des Epitops. Der zur hitzeinduzierten Demaskierung benötigte Citratpuffer, Retrieval-Lösung, bestand aus:

## 2 Materialien und Methoden

Stammlösung: A: 0.1 M Zitronensäure , Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat  
Gebrauchslösung: 2ml Lsg A + 98ml Lsg B auf 1ml dest. Wasser => pH 7,2.

### 2.4.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Bestimmung der Expression von MIB-1, 34-β-E-12 und AMACR wurde ein immunhistochemisches Verfahren nach Standardmethode durchgeführt.

Durch die Anwendung von 3 vollautomatischen Färbemaschinen konnte eine vergleichbare und reproduzierbare Immunhistochemiefärbung erstellt werden.

Für die Prozessabläufe wurden jeweils in Dispensern der Firma Cell Marque vorgefertigte Reagenzien verwendet. Um die Konstanz und die Effektivität des Färbeprozesses sicherzustellen, wurde bei jedem Zyklus, ein für den immunhistochemischen Marker typische positiv Kontrolle mitbehandelt:

MIB-1: Tonsillengewebe

34βE12: Hautgewebe

AMACR: Prostata

#### **MATERIALIENLISTE:**

Mikrotom: MICROM HM 450

Objektträger: POLY-L-LYSIN Firma THERMO SCIENTIFIC

Brutschrank: MEDITE TDO 66

Färbegerät: AUTOSTAINER Firma VENTANA NeXES ICH Staining System

Waschpuffer: VENTANA, APK-Wash-solution

Dispenser: CELL MARQUE

AMACR: monoklonaler Ak von Kaninchen. Firma: BioLogo

MIB-1: monoklonaler Ak aus Maus-Zellüberstand. Firma: DakoCytomation

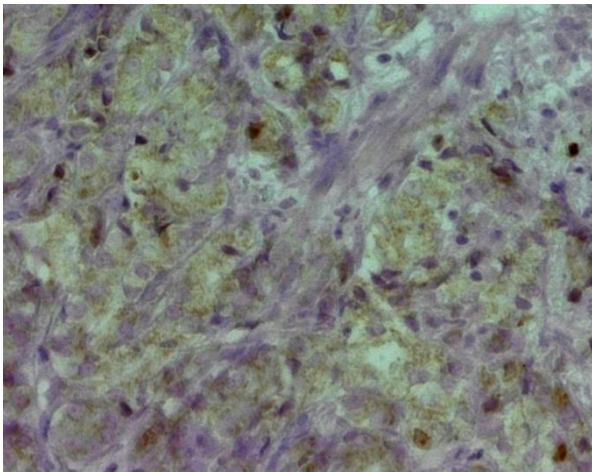
34-β-E-12: monoklonaler AK aus Maus-Zellkulturüberstand. Firma: CELLMARQUE

## **2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

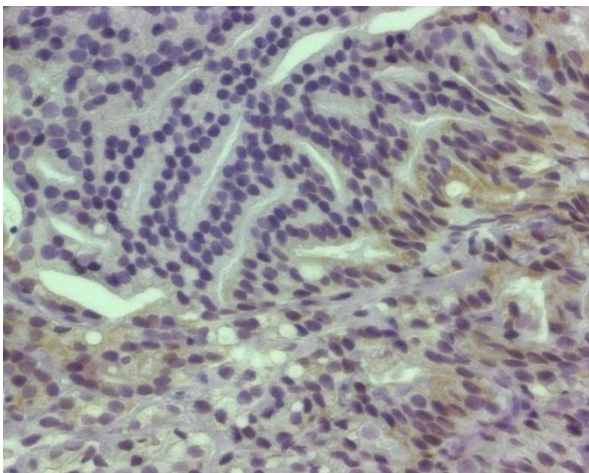
Die histologische Auswertung der immunhistochemischen Schnitte wurde ausschließlich durch zwei erfahrene Uro-Pathologen durchgeführt.

### **MIB-1:**

Auswertung analog der Ermittlung des prozentualen Kernzahlindex, auf 1000 gezählten Zellkernen. Alle MIB-1 positiv gefärbten Zellen wurden unabhängig von der Intensität als positiver Karzinombefund gewertet.



**Abbildung 10: IHC-MIB-1 PRAE-Therapeutisch**



**Abbildung 11: IHC-MIB-1 POST-HIFU-Therapie**

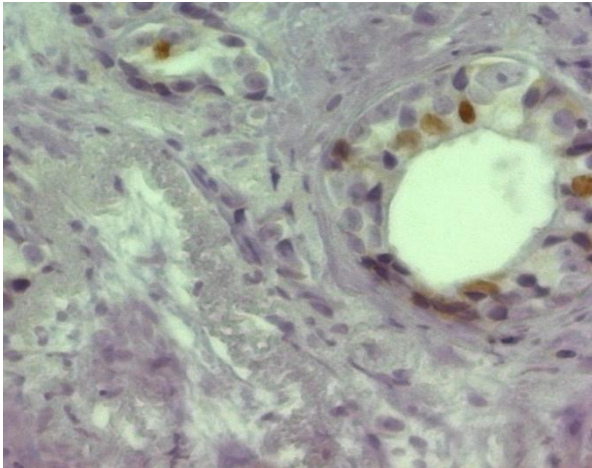


Abbildung 12: IHC-MIB-1 POST-EBRT-Therapie

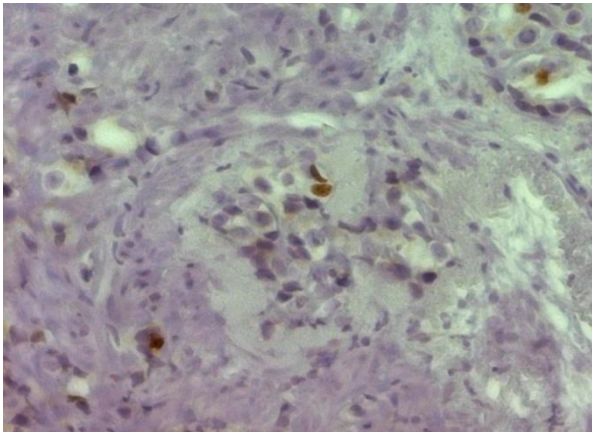


Abbildung 13: IHC-MIB-1 POST-HIFU-THERAPIE: Nicht-Tumor-Gewebe

**AMACR:**

TUMOR: prozentual. Anfärbung des Tumors

INTENSITÄT: (TUMOR)

0= keine Tumor Anfärbung

1= schwach positiv => <50% positive Zellen

2= mittel => 50% - 70% positive Zellen

3= starke Färbung, stark positiv => > 70% positive Zellen

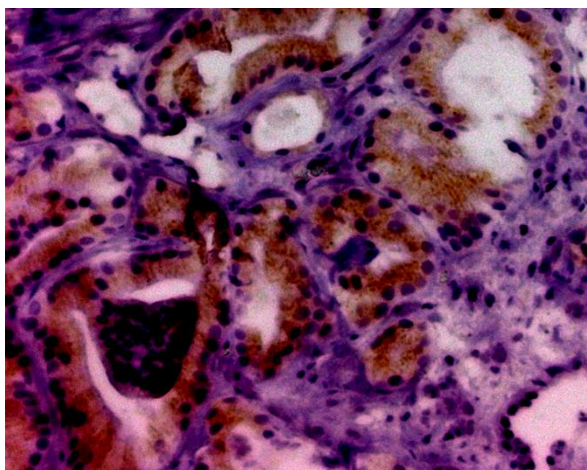
NICHT-TUMOR-GEWEBE:

0=Nicht-Tumorgewebe keine Färbung

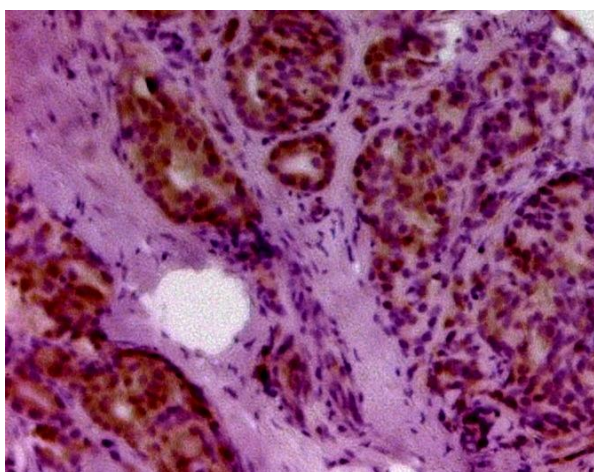
1= Nicht-Tumorgewebe weist Färbung auf

9= kein Nicht-Tumorgewebe vorhanden

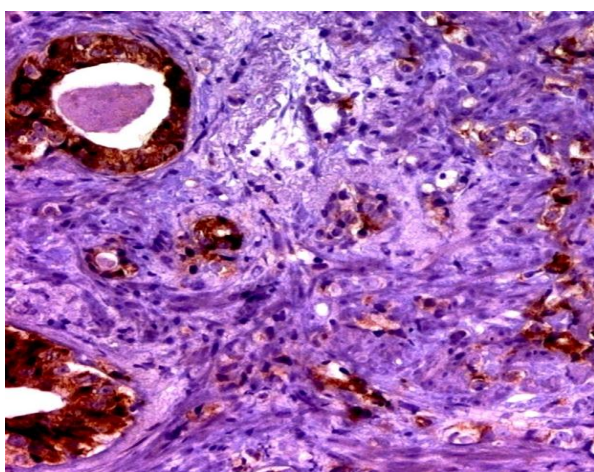
## 2 Materialien und Methoden



**Abbildung 14: IHC-AMACR PRAE-therapeutisch**



**Abbildung 15: IHC-AMACR POST-HIFU-Therapie**



**Abbildung 16: IHC-AMACR POST-EBRT-Therapie**

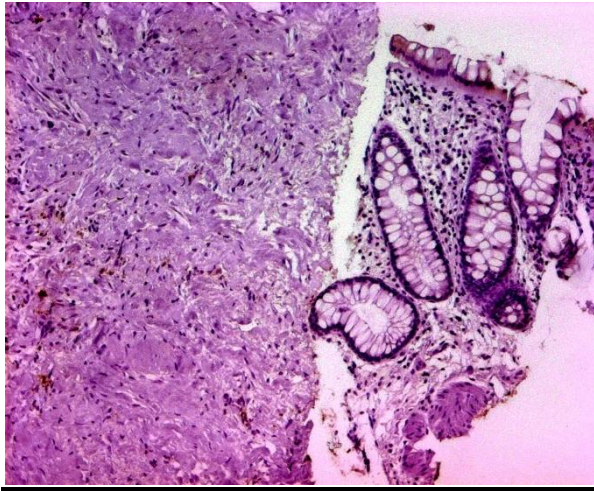


Abbildung 17: ICH-AMACR POST-HIFU-Therapie: Nicht-Tumor-Gewebe

**34-β-E-12:**

NICHT-TUMOR-GEWEBE:

0= keine Tumor Anfärbung

1= schwach positiv => <50% positive Zellen

2= mittel => 50% - 70% positive Zellen

3= starke Färbung, stark positiv => > 70% positive Zellen

9= Kein Nicht-Tumor-Gewebe vorhanden

TUMOR:

0= Tumorgewebe negativ

1= Tumorgewebe positiv

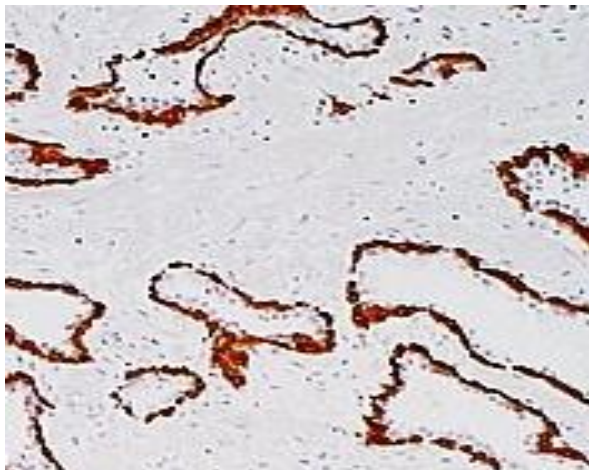
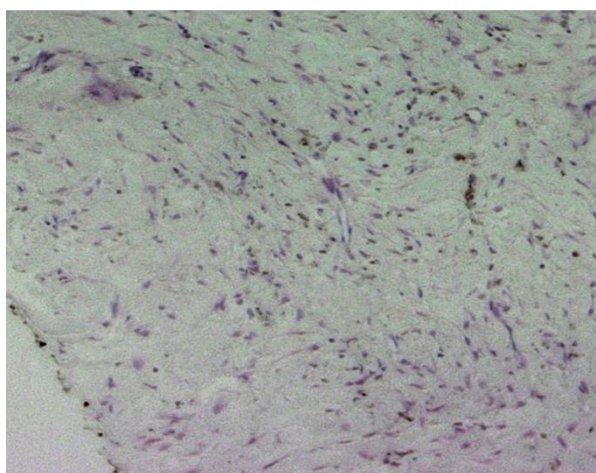
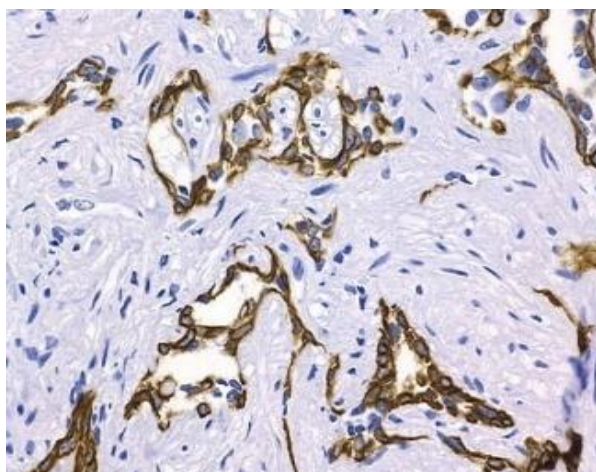


Abbildung 18: IHC-34-β-E-12 PRAE-therapeutisch

## 2 Materialien und Methoden



**Abbildung 19: IHC-34-β-E-12 POST-HIFU-Therapie**



**Abbildung 20: IHC-34-β-E-12 POST-EBRT-Therapie**

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patienten-Charakteristika

Für diese Studie konnten die Daten und histologischen Befunde inklusive der Paraffinblöcke von insgesamt 58 Patienten, die durch HIFU behandelt worden sind, und von 32 Patienten, die eine EBRT-Therapie erhalten haben, ausgewertet werden. Bei der HIFU-Gruppe konnten 51 (87,9 %) Blöcke und von der EBRT-Gruppe nur 4 (12,5 %) Blöcke von den jeweiligen Biopsien vor der kurativen Behandlung ermittelt werden.

Patienten insgesamt	PRAE-operativ	POST-operativ
HIFU	51	58
EBRT	4	32

**Tabelle 1: Patienten insgesamt**

Da die Marker MIB-1, AMACR und 34- $\beta$ -E-12 im Follow-Up von Prostatagewebe nach EBRT bereits validiert sind, wurde die POST-EBRT Gruppe als „Positiv-Kontrolle“ im Vergleich zu den bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen möglichen HIFU-bedingten immunhistochemischen Alterationen der drei Marker angesehen.

Die PRAE HIFU-Gruppe sollte eine genügend hohe Fallzahl aufweisen, um die Veränderungen der einzelnen immunhistochemischen Färbungen infolge der Therapie zu kontrollieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1.1 Patientencharakteristika der HIFU-Gruppe

PAT.-CHARAKT. HIFU-GRUPPE	MEDIANWERT (MIN-MAX)
ALTER	67 (52-79)
PROSTA.-VOL. ccm	23,6 (3-45,3)
GLEASON-SCORE	6 (4-9)
PSA (ng/ml) PRAE	9,90 (2,5-23,2)
GRADING	2,5 (2-3)
HIFU-LESION	658 (328-1187)
BEHANDL.VOL. ccm	27,08 (6,9-58,2)
FOLLOW-UP Wochen	40 (8-208)
PSA (ng/ml) POST	1,92 (0-11,7)

**Tabelle 2: Patientencharakteristika HIFU**

Für alle Patienten der HIFU-Gruppe konnten vor der HIFU-Therapie folgende Parameter ermittelt werden: Alter der Männer bei Diagnose des Prostatakarzinoms, Größe der Prostata in ccm und PSA-Wert (PSA-PRAE).

Es wurde von den jeweiligen Parametern der Medianwert errechnet, um mögliche größere Abweichungen zu kompensieren.

### 3.1.2 Patientencharakteristik der EBRT-Gruppe

PAT.-CHARAKT. EBRT-GRUPPE	MEDIANWERT (MIN-MAX)
ALTER	69 (50-78)
PROSTA.-VOL. ccm	k.A
GLEASON-SCORE	k.A
PSA (ng/ml) PRAE	27,1 (6,9-49)
GRADING	2,4 (2-3)
DOSIS Gy	61,06 (45-72)
FOLLOW-UP Wochen	199.6 (38-520)
PSA (ng/ml) POST	4,58 (0,01-14)

**Tabelle 3: Patientencharakteristika EBRT**

Bei der EBRT-Gruppe war es trotz schlechter Akteneinsicht möglich, zumindest die wichtigsten Parameter wie Alter, PSA-PRAE, PSA-POST, Gesamtdosis der externen, konformierten Bestrahlung sowie Follow-Up-Zeitraum zu ermitteln.

### 3.2 Tumormarker in Relation zu den histopathologischen Befunden

Die immunhistochemischen Färbungen der Biopsien konnte für MIB-1, AMACR, 34-β-E-12 erfolgreich durchgeführt

Tabelle 4 zeigt die prozentuale Anfärbung und Intensität der Marker MIB-1, AMACR und 34-β-E-12 in Relation zu der Tumorgroße.

### 3 Ergebnisse

IHC- AUSWERTUNG HIFU	PRAE-HIFU	POST-HIFU
	MEDIANWERT (MIN- MAX)	MEDIANWERT (MIN-MAX)
MIB % im Tumor	11,40 (2-30)	6,1 (0-40)
AMACR		
in % im Tumor	84,69 (20-100)	50,73 (0-100)
Intensität	2,1 (0-3)	0,9 (0-3)
Nicht-Tumor- Gewebe	0	0
34-β-E-12		
Tumor	0	0
Nicht-Tumor- Gewebe/ Intensität	1,8 (0-3)	1,15 (0-3)

**Tabelle 4: IHC-Auswertung HIFU**

### 3 Ergebnisse

IHC-AUSWERTUNG EBRT	PRAE-EBRT	POST-EBRT
	MEDIANWERT (MIN-MAX)	MEDIANWERT (MIN-MAX)
MIB % im Tumor	10,5 (0-20)	9,19 (0-80)
AMACR		
In % im Tumor	100	38,75 (0-100)
Intensität	2 (1-3)	2 (0-3)
Nicht-Tumor-Gewebe	0	0
34-β-E-12		
Tumor	0	0
Nicht-Tumor-Gewebe/ Intensität	1,25 (1-2)	1 (0-1)

**Tabelle 5: IHC-Auswertung EBRT**

Im Rahmen des pathologischen Reviews durch einen erfahrenen Uropathologen wurden 16 der 58 post-HIFU Tumorbiopsien mittels HE-Schnitte revidiert, retrospektiv als „ongoing necrosis“ (Zellen die sich in der Apoptose befinden) eingestuft und in der Folge auch als Nekrose-Gruppe bezeichnet.

Diese Differenzierung zwischen vitalem Karzinom und „ongoing necrosis“, die histopathologisch durch unterbrochene Zellkonturen, homogene zytoplasmatische Eosinophilie bei erhalten Kernfärbung gekennzeichnet sind, stellt die grundlegende Information im Rahmen des pathologischen Reviews dieser Studie dar.

Demzufolge werden im weiteren Teil dieser Studie diese beiden Gruppen untereinander in ihrer immunhistochemischen Anfärbbarkeit und Parametern wie Follow-Up Zeitraum und PSA-Wert verglichen.

Pat.-Verteilung	Vitales Karzinom	Nekrose
HIFU-POST	42 (72,4 %)	16 (27,6%)
EBRT-POST	28 (87,5%)	4 (12,5 %)

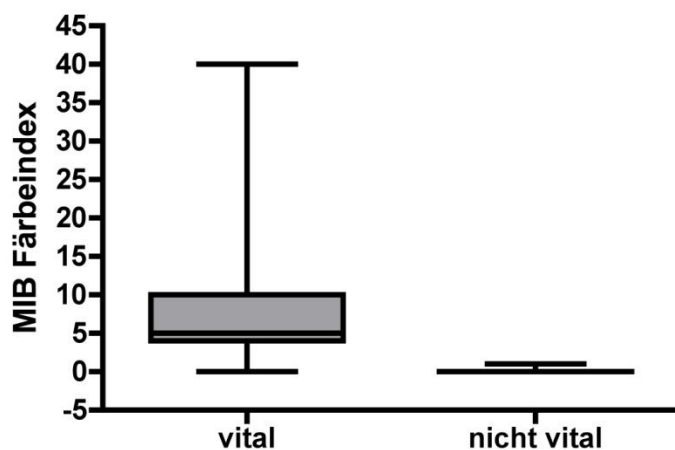
**Tabelle 6: Pat.-Verteilung**

### 3.3. Statistische Analyse des Datensatzes HIFU

	POST-HIFU Vital	POST-HIFU Nekrose
	MEDIANWERT (MIN-MAX)	MEDIANWERT(MIN-MAX)
FOLLOW-UP Wochen	51.17 (12-208)	10.75 (8-16)
MIB % im Tumor	8,21 (0-40)	0,06 (0-1)
AMACR % im Tumor	68,05 (0-100)	0
PSA (ng/ml) POST	2,41(0.01-11,67)	0,55 (0-3,95)

Tabelle 7: IHC-Aufteilung HIFU

#### 3.3.1 MIB-1 Färbeindex der Biopsieproben POST-HIFU

Tabelle 8: MIB-1 POST-HIFU: Signifikanzen bei  $P < 0.05$ 

Hier besteht ein signifikanter Unterschied im MIB-1 Färbeindex von Patienten mit vitalem und „ongoing necrosis“ Prostatakarzinom in der Biopsieprobe ( $p < 0.0001$  Mann-Whitney). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der POST-HIFU NEKROSE Gruppe um Karzinomgewebe handelt, welches keine proliferatorische Aktivität zum Zeitpunkt der Kontrollbiopsie besitzt und sich gerade im Zustand der Apoptose befindet.

### 3.3.2 AMACR Färbeindex in den Biopsieproben POST-HIFU

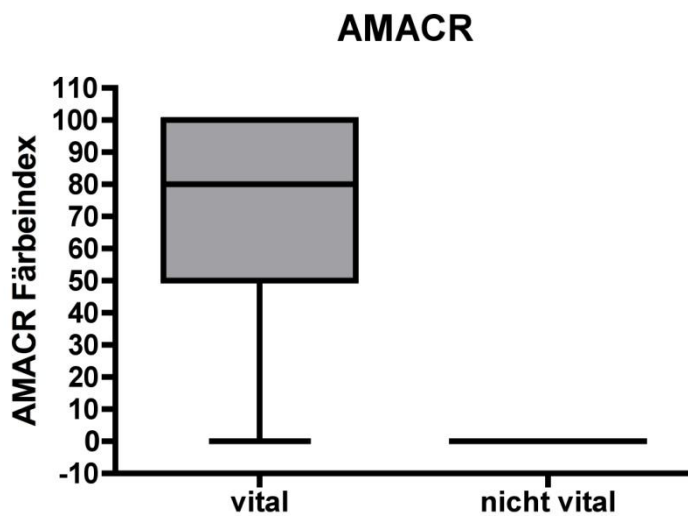


Tabelle 9: AMACR POST-HIFU: Signifikanzen  $P < 0.05$

Noch evidenter war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der AMACR –Immunhistochemie (Wilcoxon signed rank sum  $p=0.0001$ ).

Alle von dem Pathologen als „ongoing necrosis“ revidierten Follow-Up Biopsien wiesen keine AMACR-Färbung auf.

### 3.3.3 PSA zum Zeitpunkt der Biopsie POST-HIFU

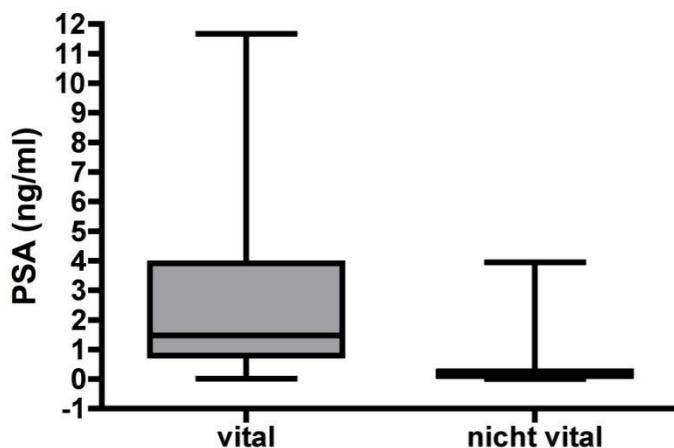


Tabelle 10: PSA POST-HIFU: Signifikanzen  $P < 0.05$

### 3 Ergebnisse

Es besteht ein signifikanter Unterschied in den PSA-Werten von Patienten mit vitalem und „ongoing necrosis“ Prostatakarzinom zum Zeitpunkt der Biopsie ( $p=0,0027$  Students t), wodurch unsere Fragestellung über die Aktivität des „Karzinomgewebes“ unterstrichen wird.

#### 3.3.4 Sensitivität und Spezifität: der Färbungen von MIB und AMACR auf die Identifikation eines vitalem POST-HIFU Prostatakarzinomgewebes

##### MIB-1 >0 als Kriterium für vitales PCa

		Pathologie	
		Vital	Nekrose
MIB Färbung	>0	37	1
	0	5	15

Sensitivität: 88,1% Spezifität: 93,7%

Tabelle 11: Sensitivität/Spezifität MIB-1 POST-HIFU

##### AMACR >0 als Kriterium für vitales PCa

		Pathologie	
		Vital	Nekrose
AMACR Färbung	>0	34	0
	0	8	16

Sensitivität: 81,0% Spezifität: 100%

Tabelle 12: Sensitivität/Spezifität AMACR POST-HIFU

Beide Marker besitzen eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität, wobei in dieser Studie MIB-1 die höhere Sensitivität aufweist und AMACR die bessere Spezifität erreicht.

**3.3.5 Analyse: Besteht in der Gruppe der pathologisch gesicherten Prostatakarzinomen irgendeine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie nach HIFU und den klinischen Parametern PSA, MIB und AMACR?**

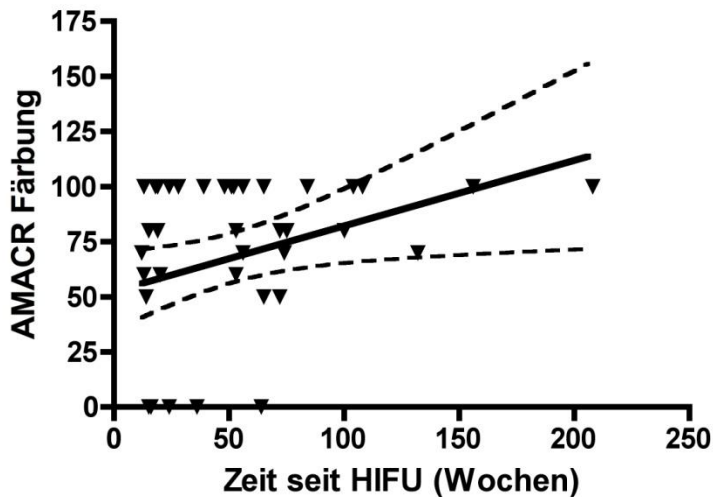


Tabelle 13: Korrelation der Parameter: Signifikanzen  $P < 0.05$

Nur der AMACR Färbeindex korreliert mit dem Zeitpunkt der Biopsie: ( $p=0,038$  Spearman Korrelation). Das bedeutet, je später ein Patient nach Therapie mit vitalem Karzinomgewebe biopsiert wurde, desto höher war der AMACR Färbeindex.

PSA:  $p=0,66$  Pearson Korrelation

MIB:  $p=0,22$  Spearman Korrelation

**3.3.6 Analyse: Haben die Parameter, die vor der HIFU gewonnen wurden, irgendeine prädiktive Aussagekraft für den Erfolg der Therapie?**

PSA-, MIB-1- und AMACR-Werte der Prae-HIFU Untersuchung wurde verglichen mit Patienten mit vitalem und „ongoing necrosis“ Tumorgewebe.

Es konnte hier leider zwischen den einzelnen Parametern keine prädiktive Aussage festgestellt werden

PSA:  $p=0,91$  students t Test

MIB:  $p=0,28$  Mann-Whitney U Test

AMACR:  $p=0,73$  Mann-Whitney U Test

### 3.3.7 34-β-E-12-Färbeintensität der Biopsieproben Post-HIFU

Der Marker 34-β-E-12 weist keinerlei Färbung im Tumorbereich auf.

Es kann jedoch festgestellt werden, dass der Zytokeratinmarker 34-β-E-12 das peritumorale, nicht neoplastische Epithel regelmäßig färbt, unabhängig ob es unbehandelt oder HIFU alteriert war.

### 3.4 Statistische Auswertung der EBRT-Gruppe PRAE und POST

	POST-EBRT Vital	POST-EBRT Nekrose
	MEDIANWERT (MIN-MAX)	MEDIANWERT (MIN-MAX)
FOLLOW-UP Wochen	205.4 (38-520)	143.3 (127-172)
MIB% im Tumor	10,14 (0-80)	0
AMACR% im Tumor	42,8 (0-100)	0
PSA (ng/dl)	4,58 (0.01-14)	0

Tabelle 14: IHC-Aufteilung EBRT

### 3 Ergebnisse

#### 3.4.1 MIB-1 Färbeindex der Biopsieproben POST-EBRT

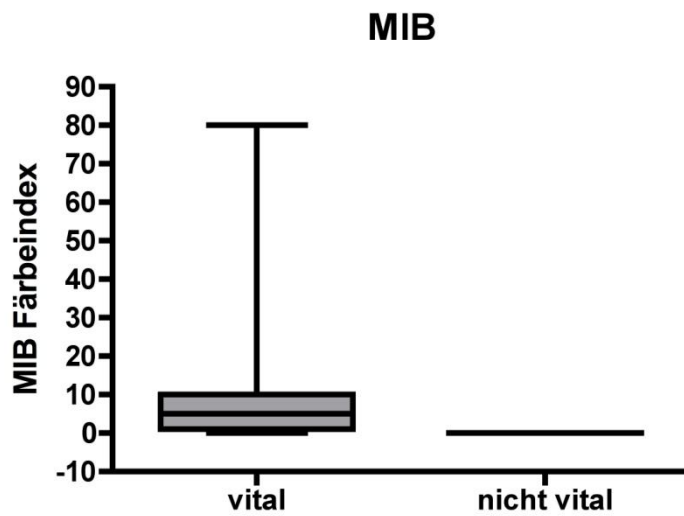


Tabelle 15: MIB-1 POST-EBRT: Signifikanzen  $P < 0.05$

#### 3.4.2 AMACR Färbeindex der Biopsieproben POST-EBRT

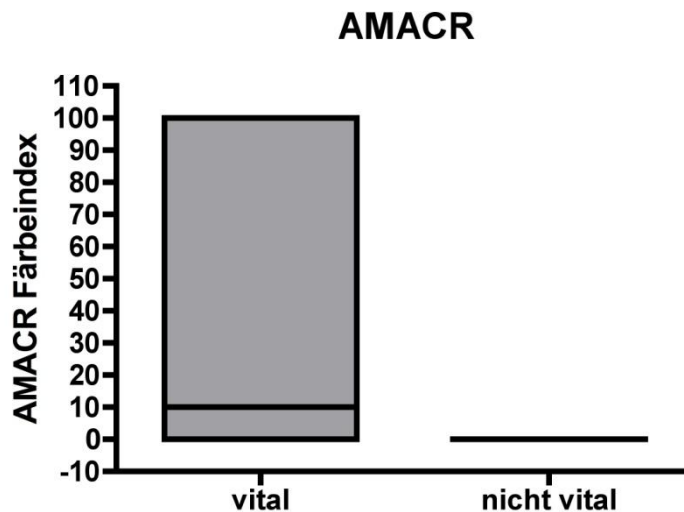


Tabelle 16: AMACR POST-EBRT: Signifikanzen  $p < 0,05$

Eine vergleichende statistische Analyse der Parameter der Patienten mit vitalem und „ongoing necrosis“ Karzinom war leider mit keiner der zur Verfügung stehenden Analysemethoden – es sind nur 4 Patienten mit nekrotischem Karzinomgewebe

### 3 Ergebnisse

vorhanden und bei allen 4 Patienten waren sowohl MIB-1 als auch AMACR Färbeindizes negativ- sinnvoll durchführbar.

#### 3.4.3 Sensitivität und Spezifität: der Färbungen von MIB und AMACR auf die Identifikation eines vitalem POST-EBRT Prostatakarzinomgewebes

##### MIB-1 >0 als Kriterium für vitales PCa

		Pathologie	
		Vital	Nekrose
MIB Färbung	>0	24	0
	0	4	4

**Sensitivität: 85,7% Spezifität: 100%**

**Tabelle 17: Sensitivität/Spezifität MIB-1 POST-EBRT**

##### AMACR >0 als Kriterium für vitales PCa

		Pathologie	
		Vital	Nekrose
AMACR Färbung	>0	15	0
	0	13	4

**Sensitivität: 53,6% Spezifität: 100%**

**Tabelle 18: Sensitivität/Spezifität AMACR POST-EBRT**

Beide Färbeindizes weisen eine sehr hohe Spezifität auf, wobei es noch anzumerken bleibt, dass dieses Kollektiv ziemlich klein ist und nur 4 Patienten enthält, bei denen kein vitales Karzinom angezeigt wurde. Die Zahlenwerte müssen in diesem Kontext betrachtet werden.

Auffallend ist die geringe Sensitivität der IHC-AMACR-Färbung von 53,6 % in vorbestrahlten Gewebe.

**3.4.4 Analyse: Besteht in der Gruppe der pathologisch gesicherten Prostatakarzinomen irgendeine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie nach EBRT und den klinischen Parametern PSA, MIB-1 und AMACR?**

Es kann hier keine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Biopsie und den Färbeindizes für MIB oder AMACR hergestellt werden: Signifikanzen  $P < 0.05$

MIB-1:  $p=0,23$  Spearman Korrelation

AMACR:  $p=0,44$  Spearman Korrelation

**3.4.5 Analyse: Haben die Parameter, die vor EBRT gewonnen wurden, irgendeine prädiktive Aussagekraft für den Erfolg der Therapie?**

Hier ist keine prädiktive Aussage möglich, da nur von 4 Patienten PRAE-EBRT Daten vorhanden sind und alle ein pathologisch gesichertes vitales Prostatakarzinomgewebe aufweisen.

## 4 Diskussion

Das Prostatakarzinom stellt heute europaweit das am häufigsten diagnostizierte Karzinom des Mannes dar und hat dadurch einen sehr hohen Stellenwert in der Gesundheitsvorsorge und Therapie, aber insbesondere auch in der Tumornachsorge [36].

Aufgrund der verstärkten Tumurvorsorge und der dadurch möglichen Früherkennung des Malignoms mittels PSA und DRU ist heute ein früher, meist kurativer Therapiebeginn möglich [75].

Dies hat aber auch zur Folge, dass die Häufigkeit der Tumornachsorge zunimmt und dadurch die Eckpfeiler des Follow-Up – PSA-Wert und Biopsie - in ihrem Stellenwert steigen.

Grundsätzlich sollte bei der Tumornachsorge des Prostatakarzinoms zwischen den einzelnen Therapieverfahren unterschieden werden [75].

Eine wichtige Komponente in der Tumornachsorge ist die Beurteilung des PSA-Wertes. Die Definition für einen Erfolg oder Misserfolg einer Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms wird in vielen Studien auf der Grundlage des PSA-Wertes definiert.

In den Anfangszeiten der HIFU-Behandlung wurde als Therapieerfolg eine negative Kontrollbiopsie sowie ein PSA-Wert  $< 4\text{ng/ml}$  angesehen [17] [29] [30].

Gelet et al. definierten bereits 2000 in einer Studie strengere Kriterien für den Erfolg einer HIFU-Therapie. Die Kriterien für ein Therapieversagen postulierte er an 82 Patienten mit lokalisierten Prostatakarzinom und einem PSA  $< 15\text{ ng/ml}$  in jeder positiven Follow-Up Biopsie oder drei aufeinander folgenden Anstiegen des PSA-Wertes um  $0,75\text{ ng/ml}$  pro Jahr. Die progressionsfreie Überlebensrate während des durchschnittlichen Nachuntersuchungszeitraumes von 17.6 Monaten betrug 62% [31].

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, wurde bis zu diesem Zeitpunkt kein valider „Zeitplan“ für das HIFU-Follow-Up definiert. Die oben erwähnten neu postulierten *Stuttgart-Definition* von Blana et al. gelten derzeit als richtungweisende Parameter bei der Beurteilung des posttherapeutischen PSA-Wertes bei der HIFU-Behandlung:  $\text{PSA} \geq \text{PSA-Nadir} + 1,2\text{ ng/ml}$ . Der PSA-Nadir wurde in dieser Studie im Mittel nach 12.9 Wochen erreicht und betrug  $0,13\text{ ng/ml}$  [11].

## 4 Diskussion

Da das PSA-Follow-Up bereits für Patientengruppen nach Bestrahlungstherapie etabliert ist, liegt es nahe diese Kriterien zusätzlich als Grundlage zu betrachten.

In der Tumornachsorge eines bestrahlten Prostatakarzinoms ist die Interpretation des gemessenen PSA-Wertes ebenso schwierig wie bei den POST-HIFU-Patienten. Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung und das Punktionstrauma durch die brachytherapeutischen Verfahren verursachen durch die Entzündungsreaktionen im Gewebe vor allem in der frühen Phase zunächst einen deutlichen PSA-Anstieg. Erst mit Abklingen der unmittelbaren Bestrahlung sinkt der PSA-Wert langsam ab. Der PSA-Nadir wird in der Folge häufig erst in einem Zeitraum von bis zu 12 Monaten erreicht. Dabei sollte ein PSA-Wert unter 1,0 ng/ml erreicht werden [77].

Als Kriterium für das biochemische Versagen des vorbestrahlten Prostatakarzinoms gilt nach der Phoenix-Definition ein PSA-Anstieg von mindestens 2 ng/ml über den PSA-Nadir mit oder ohne Kurzzeit-Hormonsubstitution [68].

Ebenso gelten Patienten als Therapieversager, die sich eine Salvagentherapie unterziehen mussten oder bei denen eine positive Kontrollbiopsie festgestellt wurde [68].

In unserer retrospektiven Studie haben wir die PSA-Werte unserer Patienten durch Aktenlage an den bereits angeführten medizinischen Fakultäten ermittelt.

Es konnte diesbezüglich ein PRAE-PSA-Wert vor der primären HIFU-Therapie und ein POST-PSA-Wert zum Zeitpunkt der positiven Kontrollbiopsie sowie der POST-PSA-Wert bei EBRT-Follow-Up von allen Patienten evaluiert werden.

Um Rückschlüsse über das Verhalten des PSA-Wertes nach erfolgter HIFU-Therapie zu erhalten, wurden bereits einige Studien an der Universität Regensburg unternommen.

In einer Studie von Ganzer et al. wurden die Parameter von 103 Patienten, die durch eine HIFU-Therapie aufgrund ihres Prostatakarzinoms behandelt wurden, nachuntersucht. Dabei kamen die ASTRO-Kriterien (PSA $\geq$ 2ng/ml über den PSA-Nadir, positive Biopsie nach Therapie) zur Anwendung [2].

Die Patienten wurden in drei PSA-Nadir Gruppen eingeteilt (1:  $\leq$  0,2 ng/ml; 2: 0,21-1 ng/ml; 3:  $\geq$ 1 ng/ml). Der mittlere Nachuntersuchungszeitraum betrug 4.9 Jahre und der PSA-Nadir wurde im Mittel nach 6.4 Monaten erreicht. Die Studie zeigt im Laufe des Follow-Up ein Behandlungsmisserfolg auf Grundlage des PSA-Nadirs von Gruppe 1: 4,5%, 2: 30,4%, 3: 100%.

#### 4 Diskussion

Dadurch konnte festgelegt werden, dass der PSA-Nadir ein unabhängiger Wert für die Nachsorgediagnostik bei der HIFU-Therapie darstellt [26].

In unserer Studie konnte ebenso festgestellt werden, dass die Höhe des PSA-Wertes ein guter Parameter für die Beurteilung eines Rezidives sein kann. Es wurde deutlich, dass bei den Biopsien, die „nur“ nekrotisches Gewebe enthalten, ein sehr niedriger PSA-Wert zu finden war (PSA-Post= 0.55 ng/ml) und dadurch den Rückschluss zulässt, dass der PSA vor einer evtl. Kontrollbiopsie über einen längeren Zeitraum ermittelt werden sollte.

Es konnte leider kein direkter Vergleich herangezogen werden, ob die Höhe des PRAE-PSA-Wertes eine Prognose für die Risikowahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu entwickeln, zulässt.

Um eine Übertherapie zu vermeiden, sollte vor erneuter Therapie die Diagnose eines Lokalrezidivs mittels transrektaler Stanzbiopsie verifiziert werden. Das histologische Präparat sollte von einem Pathologen befundet werden, der mit den pathomorphologischen Veränderungen durch die unterschiedlichen Therapien vertraut ist, um falsch-positiv Befunde zu vermeiden.

Dieser Anspruch ist nicht leicht zu erfüllen, da bei der Nachsorgeuntersuchung von vorbehandeltem Gewebe immer das grundsätzliche Problem der Gewebeänderung infolge der aktinischen oder thermischen Therapie berücksichtigt werden muss [13] [20][65].

Das Untersuchungsgewebe hat sich durch die verschiedenen Therapien unterschiedlich verändert und muss daher nach den jeweiligen Auswirkungen der Behandlungsmaßnahme auf das Gewebe differenziert beurteilt werden.

Bei der Strahlentherapie kommt es zu verschiedenen Veränderungen im benignen Gewebe und im Karzinombereich, welche abhängig von der Dosis, Intensität und Intervallen der Radiatio sind. Typische Veränderungen im benignen Prostatagewebe sind glanduläre Atrophie, Prominenz oder Hyperplasie der Basalzellen. Histomorphologische Alterationen des Karzinomgewebes sind klarzelliges Zytoplasma durch Kernpyknosen und auch komplette Apoptosen [13].

Ein großes Problem laut Bostwick et al. ist die Feststellung, dass das Prostatakarzinom sehr langsam in seinem Wachstum ist, daher ebenso sehr langsam die Apoptose durchläuft und dadurch erst ca. 12 Monate nach Bestrahlung eine aussagekräftige Biopsie erfolgen kann [13].

## 4 Diskussion

Im Gegensatz zur Bestrahlung kommt es bei der HIFU-Therapie, hauptsächlich durch die Ultraschall-induzierte Hyperthermie, zur Koagulationsnekrose. Diese wandelt sich mit der Zeit in Granulationsgewebe um [13].

Als Resultat dieser Nekrotisierung konnte nach 6 Monaten mittels MRT in einer Studie eine Volumenschrumpfung der Prostata um 61% beobachtet werden [47].

Zur therapieinduzierten Gewebsalterationen in den Follow-Up Biopsien nach erfolgter HIFU-Behandlung liegen jedoch derzeit noch sehr wenige aussagekräftigen Studien oder Empfehlungen vor.

In einer kürzlich erschienen Studie wurden die Prostatagewebe von 25 Patienten im Rahmen des Follow-Up nach HIFU-Therapie histologisch aufgearbeitet.

Die Biopsien wurden in einem Zeitraum von Mittel 180 Tagen post-therapeutisch entnommen. Ebenso wie in der oben erwähnten Studie von Bostwick von 2007 konnten in den Behandlungsarealen hauptsächlich Koagulationsnekrosen, akute und chronische Entzündungen, stromale Fibrosen und Basalzellhyperplasien detektiert werden. Leider wurde in diesem Zusammenhang keine immunhistochemischen Färbungen erstellt [8].

Es steht weiterhin die Frage im Raum, in welchem Zeitraum sich diese apoptotische Umdifferenzierung des vitalen Karzinomgewebes in nekrotisches Gewebe vollzieht und ob die früher üblichen Drei-Monats-posttherapeutischen Kontrollbiopsien nicht evtl. zu früh angesetzt waren.

Infolge dieser möglichen Schwierigkeiten der Biopsieinterpretation können immunhistochemische Färbungen dem Pathologen zusätzliche Informationen liefern. Da die pathologischen Veränderungen rund um die Bestrahlungstherapie des Prostatakarzinoms seit zwei Jahrzehnten intensiv erforscht werden, haben wir uns in der aktuellen Studie auf etablierte immunhistochemische Marker beschränkt, die sich bei vorbestrahltem Prostatagewebe bereits bewährt hatten.

In erster Linie war der Proliferationsmarker MIB-1 von Interesse, um eine mögliche Aussage über eine potentielle Vitalität des vorbehandelten Tumorgewebes treffen zu können. Die Effektivität von MIB-1 auf bestrahltes Gewebe wurde bereits durch etliche Studien nachgewiesen [19] [66].

Auch konnten wir durch unsere PRAE-HIFU und PRAE-EBRT Biopsien feststellen, dass unsere IHC-Färbungen effektiv waren.

In einer HIFU-Studie von Van Leenders et al. mit 9 Patienten kam der Proliferationsmarker MIB-1 zur Anwendung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die

## 4 Diskussion

behandelten Tumorareale einen deutlich niedrigeren MIB-1 Färbeindex aufwiesen als die des unbehandelten Karzinoms. Infolge der kurzen Zeitspanne von 7-12 Tagen zwischen HIFU und radikaler Prostatektomie kann leider kein deutlicher Rückschluss auf die zeitliche Abfolge der apoptotische Gewebsänderung gezogen werden [82].

In unserer Studie differenziert der Marker MIB-1 überzeugend zwischen den beiden Gruppen „ongoing necrosis“ und vitalem Karzinomgewebe nach HIFU-Therapie.

15 (93,7%) der „ongoing necrosis“ Biopsien konnten auch im Sinne der IHC-Färbung als proliferatorisch-inaktiv ausgewertet werden.

Auch auf Grundlage der Sensitivität (88,1 %) und Spezifität (93,7 %) des Markers und Bezug genommen auf den Nachuntersuchungszeitraum der „ongoing necrosis“ Tumoren von median 10.75 Wochen und der fehlenden proliferatorischen Anfärbbarkeit des Tumors zu diesem Zeitpunkt, kann angenommen werden, dass sich das therapierte Gewebe noch im Umbau, scheinbar Apoptose, befindet.

Auch in unserer Kontrollgruppe POST-EBRT „ongoing necrosis“ war diese proliferatorische Inaktivität wieder auffindbar, jedoch aufgrund der geringen Anzahl (n=4) nicht sehr aussagekräftig.

Der von uns zusätzlich verwendete immunhistochemische Marker AMACR hat ebenso bereits breiten Einzug in die Routinediagnostik des bestrahlten Prostatakarzinoms erhalten.

Die Effektivität dieses Markers auf bereits vorbestrahltes Gewebe wurde bereits hinreichend erforscht [41] [42] [54] [93].

In unserer Studie differenzierte der IHC-Marker AMACR noch deutlicher zwischen den POST-HIFU-Nekrose und POST-HIFU-vital. Die IHC-Auswertung ergab eine 100% Spezifität gegenüber dem untersuchten Gewebe und eine Sensitivität von 80,9%. Bezogen auf die Differentialdiagnostik von vitalem Karzinomgewebe scheint AMACR dem Proliferationsmarker MIB-1 überlegen zu sein.

Unsere Beobachtung wird durch eine kürzlich erschienene Studie bekräftigt. In dieser Untersuchung wurden HIFU-vorbehandelte Prostatatumorgewebe immunhistochemisch untersucht. Hier wurden die 6 Monats post-HIFU-Biopsien (bzw. TUR-P Exzidate) von 36 Patienten beurteilt und bei 11 Patienten ein Residualtumor durch HE-Färbung festgestellt. Die Gewebeproben wurden nachfolgend mit den Immunhistochemiemarkern AMACR, p63, 34-β-E-12, Cytokeratin 5, Cytokeratin 8-18, PSAP, PSA, Chromogranin und CD-56 nachuntersucht.

## 4 Diskussion

Auch hier wies AMACR eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität in der Identifizierung der Biopsien mit Residualtumor auf [22].

Unsere Studie lieferte zudem eine zusätzliche Information im Sinne einer „AMACR-Kinetik“: Je später eine Biopsie vorgenommen wurde, umso intensiver war der AMACR-Färbeindex im vitalen Tumorgewebe.

Im Gegensatz dazu fiel unsere Post-EBRT durch eine vergleichsweise niedrige AMACR Sensitivität (53,6 %) im vitalen Karzinom auf.

In diesem Kontext kann eine bereits 2005 publizierte Studie herangezogen werden, in der gezeigt werden konnte, dass circa 18% der post-EBRT Lokalrezidive AMACR negativ sind [38].

Wie bereits erwähnt, bewirkt die aktinische Behandlung von Prostatagewebe fast immer histopathologisch sichtbare Veränderungen. Oft sind im benignen Prostatagewebe mehr Alterationen festzustellen als im Karzinomareal selbst [54].

Unabhängig von atypischen Drüsen und Kernatypien ist vor allem das Fehlen der Basalmembran in der HE-Färbung ein wichtiger Hinweis für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms. Problematisch ist dabei, dass einige benigne Veränderungen in der Prostata ebenfalls zu einer Kontinuitätsunterbrechung der Basalmembran führen können. Umgekehrt können einige Varianten des Prostatakarzinoms, z.B. duktales Karzinom, die Anwesenheit einer Basalzellmembran simulieren [63]. Infolge dieser Problematik wird von einigen Autoren empfohlen, den Zytokeratinmarker 34- $\beta$ -E-12 grundsätzlich - synchron - zum Basalmembranmarker AMACR zu verwenden [22] [38] [54].

Bezugnehmend auf unsere Studie konnte 34- $\beta$ -E-12 in der POST-HIFU-Gruppe wie auch in der POST-EBRT-Gruppe - unabhängig von der Vorbehandlung – effektiv zwischen Tumorgewebe und Nicht-Tumor Prostatagewebe differenzieren und dadurch als therapieunabhängiger Negativmarker für das Prostatakarzinom überzeugen.

Limitierend für unsere Studie ist, dass der Marker 34- $\beta$ -E-12 zwar in den benignen Randbereichen der POST-HIFU Biopsiezylindern signifikant färbte, die Zuverlässigkeit von 34- $\beta$ -E-12 aber auf der immunhistochemischen Untersuchung eines unabhängigen zweiten Biopsiezylinders- welcher ausschließlich Hautgewebe enthält - beruht. Eine interne positive Kontrolle mit erhaltener 34- $\beta$ -E-12-Expression im (benignem) Randbereich des ein und desselben Biopsiezylinders – wie in unserer Studie – ist grundsätzlich als nicht valide anzusehen. Die aufwendige „Positivkontrolle“ - d.h. eine H&E sowie die immunhistochemische Untersuchung

#### 4 Diskussion

eines benachbarten Biopsiezylinders mit nicht neoplastischem Prostatagewebe - wurde im Rahmen unserer Studie nicht durchgeführt.

## 5 Zusammenfassung

Unsere Studie konnte demonstrieren, dass die Immunhistochemiemarker MIB-1 und AMACR im Kontext von Kontrollbiopsien in ultraschallbehandeltem Prostatagewebe überzeugend zwischen vitalem Karzinomgewebe und Tumornekrose differenzieren. Beide Marker weisen für vitales Karzinomgewebe nach HIFU-Therapie eine hohe Sensitivität und ebenso hohe Spezifität auf und können bei unklaren histopathologischen Fällen zur Anwendung kommen.

Auf der Basis unserer Auswertungen lässt sich folgern, dass ein erheblicher zeitlicher Unterschied zwischen Gewebeuntergang nach HIFU und EBRT besteht.

Offensichtlich ist nach HIFU bereits nach 12 Wochen der Vorgang der „ongoing necrosis“ vollständig abgeschlossen. Dieser Prozess dauert nach EBRT bis zu 12 Monate.

Eine Kontrollbiopsie nach HIFU-Behandlung kann somit grundsätzlich schon ab dem vierten Monat nach Therapie durchgeführt werden.

Um den therapeutischen Erfolg der HIFU-Therapie des Prostatakarzinoms diagnostizieren zu können, benötigt man eine zeitlich engmaschige Kontrolle des posttherapeutischen PSA-Wertes. Bei steigendem PSA-Wertes sollte eine Kontrollbiopsie des Prostatagebietes erfolgen.

Bei unklarer histopathologischen Auswertbarkeit des entnommenen Gewebes können die immunhistochemischen Marker MIB-1, AMACR und 34-β-E-12 als Hilfsmittel zur Differenzierung von vitalem Karzinomgewebe und von in der therapieinduzierten Apoptose befindlichem Tumorgewebe herangezogen werden.

Dies erleichtert nicht nur die klinische Diagnostik, sondern ist auch vor allem für den Patienten von großer Bedeutung, um eine erneute unnötige Behandlung zu vermeiden.

## 6 Literaturverzeichnis

[1] **ALTWEIN JE**: *Prostatakarzinom. Epidemiologie, Ätiologie, Pathologie, Diagnostik, prognostische Faktoren.* Uroonkologie, Springer 2001; Aufl 3.

[2] **AMERICAN SOCIETY FOR THERAPEUTIC RADIOLOGY AND ONCOLOGY CONSENSUS PANEL (ASTRO)**: *Consensus statement: Guidelines for PSA following radiation therapy.* Int J Radiation Oncology 1997; 37(5), 1035-1041.

[3] **ARMBRUSTER DA**: *Prostate specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application.* Clin Chem 1993; 39(2), 181-195.

[4] **ASHFORD AR, ALBERT SM, HOKE G, CUSHMAN LF, MILLER DS, BASSETT M**: *Prostate carcinoma knowlege, attitudes and screening behavior among African-American men in Central Harlem, New york City.* Cancer 2001; 91, 164-172.

[5] **BEACH R, GOWEN A, FOLPE A, YAZIJI H, SALLES P**: *P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies.* Am J Surg 2002; 26, 1588-1596.

[6] **BENNINGHOFF A, DRENCKHAHN D**: *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.* Band 1, 16.Auflage, Urban&Fischer Verlag München und Jena 2002, 824-827.

**[7]BEUTNER EH, HOLBOROW EJ, JOHNSON GD:***A new fluorescent antibody method: mixed anti-globulin immunofluorescence or labeled antigen indirect immunofluorescence staining.* Nature 1965; 208, 353-355.

**[8]BIERMANN K, MONTIRONI R, LOPEZ-BELTRAN A, ZHANG S, CHENG L:***Histopathological findings after treatment of prostate cancer using high-intensity focused ultrasound (HIFU).* Prostate 2010; 70, 1196-1200.

**[9]BLANA A, WALTER B, ROGENHOFER S, WIELAND W:***High-intensity ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: 5-year experience.* Urology 2004; 63, 297-300.

**[10]BLANA A, MURAT FJ, WALTER B, THÜROFF S, WIELAND WF, CHAUSSY C, GELET A:***First analysis of the long-term results with transrectal HIFU in patients with localised prostate cancer.* European Urology 2008; 53, 1194-1203.

**[11]BLANA A, BROWN SC, CHAUSSY C, CONTI GN:***High-intensity focused ultrasound for prostate cancer: comparative definitions of biochemical failure.* BJU Int. 2009; 104(8), 1058-1062.

**[12]BRAWER MK, NAGLE RB, PITTS W, FREIHA F:***Keratin immunoreactivity as an aid to the diagnosis of persistent adenocarcinoma in irradiated human prostates.* Cancer 1989; 63, 454-460.

[13] **BOSTWICK D, MEIERS I:** *Diagnostic of prostatic carcinoma after therapy.* Arch Pathol Lab Med 2007; 131, 360-371.

[14] **CARSWELL BM, WODA BA, WANG X:** *Detection of prostate cancer by alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) in needle biopsy specimens previously reported as negative for malignancy.* Histopathology 2006; 48, 668-673.

[15] **CATTORETTI G, BECKER MH, KEY G, DUCHROW M, SCHLÜTER C:** *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.* J Pathol 1992; 168, 357-363.

[16] **CHAPELON JY, MARGONARI J, VERNIER F, GORRY F, GELET :** *In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma Dunning R3327.* Cancer Res 1992; 52, 6353-6357.

[17] **CHAUSSY CG, THÜROFF S:** *High-intensive focused ultrasound in localized prostate cancer.* J Endourol 2000; 14, 293-299.

[18] **COETZEE LJ, LAYFIELD LJ, HARS V, PAULSEN DF:** *Proliferative index determination in prostatic carcinoma tissue: Is there any additional prognostic value greater than that of gleason score, ploidy and pathological stage?* J Urol 1997; 157, 214-218.

[19] **COWEN D, TRONCOSO P, KHOO VS:** *Ki-67 staining is an independent correlate of biochemical failure in prostate cancer treated with radiotherapy.* Clin Cancer Res 2002; 8, 1148-1154.

**[20]COOK J, MALONE S, PERRY G:***Postradiotherapy prostate biopsies: What do they really mean? Results 498 patients.* Int J Rad Oncol Biol Phys 2000; 48, 355-367.

**[21]CROUZET S, CHAPLON J, ROUVIERE O:** *Whole-gland Ablation of Localized Prostate Cancer with High-intensity Focused Ultrasound: Oncologic Outcomes and Morbidity in 1002 Patients.* European Urology 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2013.03.039>.

**[22]DALFIOR D, DELAHUNT B, BRUNELLI M, PARISI A, FICARRA V, NOVARA G:***Utility of Racemase and other immunomarkers in the detection of adenocarcinoma in prostatic tissue damaged by high-intensity focused ultrasound therapy.* Pathology 2010; 42(1), 1-5.

**[23]DEGER S, BÖHMER D, ROIGAS J:***Brachtherapy of local prostatic carcinoma.* Urologe 2001; 3, 181-184

**[24]DIDINGER B, SCHULZ-ERTNER D, WANNENMACHER M:***Moderne Techniken in der Radiotherapie des Prostatakarzinoms.* Radiologe 2003; 43, 448-454.

**[25]EICHLER K, HEMPEL S, WILBY J:** *Diagnostic Value of Systematic Biopsy Methods in the Investigation of Prostate Cancer: A Systematic Review.* J Urol 2006; 175, 1605-1612.

**[26]GANZER R, ROGENHOFER S, WALTER B, LUNZ J, SCHOSTKA M, WIELAND W, BLANA A:***PSA Nadir is a significant predictor of treatment failure after high-intensity focussed ultrasound ( HIFU) treatment of localised prostate cancer.* Europ Urology 2008; 53, 547-553.

**[27]GANZER R, FRITSCH H, BRANDTNER B, BRÜNDL J, KOCH D, WIELAND W, BLANA A:***Fourteen-year oncological and functional outcomes of hodgh-intensity focused ultrasound in localized prostate cancer.* BJU Inter; 112, 322-329.

**[28]GASSER T, SUBER T, FICHTNER J:***Radikale Prostatektomie. Welcher Zugang für welchen Patienten?* Deutsches Ärzteblatt 2004; Heft 28-29, 2055-2057.

**[29]GELET A, CHAPELON JY, BOUVIER R, SOUCHON R:***Treatment of prostate cancer with transrectal focused ultrasound: early clinical experience.* Euro Urol 1996; 29, 174-183.

**[30]GELET A, CHAPELON JY, BOUVIER R :***Local control of prostate cancer by transrectal high intensity focused ultrasound therapy: preliminary results.* J Urol 1999; 161, 156-162.

**[31]GELET A, CHAPELON JY, BOUVIER R, ROUVIER O:***Transrectal high-intensity focused ultrasound: minimally invasiv therapy of localized prostate cancer.* J Endourol 2000; 14, 519-528.

**[32]GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H:***Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.* Int J Cancer 1983; 31, 13-20.

**[33]GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER H, SCHWAB U, STEIN H:***Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.* J Immunol 1984; 133, 1710-1715.

**[34]GERDES J:***Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies.* Semin Cancer Biol 1990; 1, 199-206.

**[35]GLEASON DF, MELLINGER GT:***Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging 1974.* J Urol 2002; 167, 953-958.

**[36]HEIDENREICH A, AUS G, ABOU C, BOLLA M:***Guidelines on Prostate Cancer.* European Association of Urology 2009.

**[37]HELPAP B, BOSTWICK D, MONTIRONI R:***The significance of atypical adenomatous hyperplasia and prostatic interepithelial neoplasia for the development of prostate carcinoma.* Virch Arch 1995; 426, 425-434.

**[38]HELPAP B:***Neue Tumormarker für mehr Sicherheit.* Uro News 2005; 6, 31-43.

**[39]HENDERSON RJ, EASTHAM JA, CULKIN DJ, KATTAN MW, WHATLEY T, MATA J, VENABLE D, SARTOR O:***PSA and PSA density: racial differences in men without prostate cancer.* J Natl Cancer Inst 1997; 89, 134-138.

**[40]HÖLZEL D:***Prostatakarzinom-Ist die Früherkennung in einer Sackgasse?* Deutsches Ärzteblatt 1995;92, 1353-1363.

**[41]JIANG Z, WODA B, ROCK K, XU Y:***P504S: A new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. Am J Surg Path 2001; 25, 1397-1404.*

**[42]JIANG Z, WU C, WODA B, DRESSER K:** *P504S/ $\alpha$ -Methylacyl-CoA Racemase: A useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. Am J Surg Path 2002; 26, 1169-1174.*

**[43]JEMAL A, SIEGEL R, WARD E:***Cancer statistics 2009. CA Cancer J Clin 2009; 59, 225-249.*

**[44]KAUSCH I, LINGNAU A, ENDL E:***Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. Int J Cancer 2003; 105, 710-716.*

**[45]KETELSEN D, RÖTHKE M, ASCHOFF P:***Nachweis ossärer Metastasen des Prostatakarzinoms: Vergleich der Leistungsfähigkeit der Ganzkörper-MRT und der Skelettszintigrafie. Fortschritt Röntgenstrahlen 2008 Thieme; 180, 746-752.*

**[46]KHOO VS, POLLACK A, COWEN D:***Relationship of Ki-67 labling index to DNA-ploidy, S-Phase fraction and outcome in prostate cancer treated with radiotherapy. Prostate 1999, 41, 166-172.*

**[47]KIRKHAM AP, EMBERTON M, HOH IM, ILLING RO, FREEMAN AA, ALLEN C:***MR imaging of prostate after treatment with high-intensity focused ultrasound. Radiology 2008;246(3), 833-844.*

**[48]LIPPERT H:***Lehrbuch Anatomie*. 5. Auflage, Urban&Fischer Verlag München und Jena 2000, 422.

**[49]LÖFLER G, PETRIDES P:***Zelluläre Organellen und Strukturen*. 5-Auflage 1997, Springer Verlag; 175-201.

**[50]LOWRANCE W, ELKIN E, JACKS L:***Comparatives effectiveness of Surgical Treatments for Prostate Cancer: A Population-Based Analysis of Postoperative Outcomes*. J Urol 2010; 183(4), 1366-1372.

**[51]LUBOLDT H-J, RÜBBEN H:***PSA-Früherkennung des Prostatakarzinoms*. Urologe [A] 2000; 39, 22-26.

**[52]MacCALLUM DE, HALL PA:** *Biochemical characterization of pKl67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding*. Exp Cell Res 1999; 252, 186-198.

**[53]MacCALLUM DE, HALL PA:***The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKl67*. J Pathol 2000; 191, 286-298.

**[54]MARTENS MB, KELLER JH:** *Routine immunohistochemical staining for high-molecular weight cytokeratin 34- $\beta$  and  $\alpha$ -methylacyl CoA acetylase (P504S) in postirradiation prostate biopsies*. Modern Pathol 2006; 19, 287-290.

**[55]MASON DY, SAMMONS RE:***The labeled-antigen method of immunoenzymatic staining*. J Histochem Cytochem 1979; 27, 832-840.

**[56]McNEAL JE:***Anatomy of the prostate: a historical survey of divergent views.* Prostate 1980; 1, 3-13.

**[57]McNEAL JE:***The prostate gland, morphology and pathobiology.* Monogr Urol 1983; 4, 3-33.

**[58]MILLER K:***Praxis der Urologie. Band II.* Thieme 3.Auflage.

**[59]MOBLEY JA, LEAV I, ZIELIE P, WOTKOWITZ C, EVAN J:***Branched fatty acids in dairy and beef products markedly enhance alpha-methylacyl-CoA racemase expression in prostate cancer cells in vitro.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12, 775-783.

**[60]MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL:***The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.* Cell 1982; 31, 11.

**[61]MUIR CS, NECTOURX J, STASZEWSKI J:***The epidemiology of prostatic cancer.Geographical distribution and timetrends.* Acta Oncologica 1991; 30, 133-140.

**[62]OESTERLING JE:** *Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate.* J Urol 1991; 145(5), 907-923.

**[63]OLIAI BR, KATHANE H, EPSTEIN J:***Can basal cells seen in adenocarcinoma of the prostate?: an immunohistochemical study using high molecular weight cytokertin(clone 34betaE12) antibody.* Am J surg pathol 2002; 26, 1151-1160.

**[64]PARTIN AW, MANGOLD LA, LAMM DM, EPSTEIN JI, PEARSON JD:***Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millenium.* Urology 2001; 58, 843-848.

**[65]PETRAKI CD, SFIKAS CP:***Histopathological changes induced by therapies in the benigne prostate and prostate adenocarcinoma.* Histol Histopathol 2007; 22, 107-118.

**[66]POLLACK A, COWEN D, TRONCOSO P:***Molecular Markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma/ Ki67, bcl-2, bax and bcl-x.* Cancer 2003; 97, 1630-1638.

**[67]REINER WG, WALSH PC:***An anatomical approach to the surgical managment of the dorsal vein and Santorini`s plexus during radical retropubic surgery.* J Urol 1979; 121, 198-200.

**[68]ROACH M, HANKS G, THAMES JR:***Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; 65, 965-974.

**[69]ROBERT-KOCH-INSTITUT:***Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.*Berlin 2010.

**[70]SCHIEBLER TH:***Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* 4. Auflage, Springer Verlag; 1996, 640-642.

**[71]SCHOLZEN T, GERDES J:***The Ki67 protein: From the know and the unknow.*J Cell Physiol 2000; 182(3), 311-322.

**[72]SCHWARZ R:***Kurative Radiotherapie des lokalisierten Prostatakarzinoms.* Urologe A 2003; 42, 1212-1220.

**[73]SMART CR:***The results of prostate carcinoma screening in the U.S. as reflected in the surveillance, epidemiology, and end results program.* Cancer 1997; 80, 1835-1844.

**[74]STATTIN P, DAMBER JE, KARLBERG L, BERGH A:***Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer.* J Urol 1997; 157, 219-222.

**[75]S3-LEITLINIEN:***Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.*Version 2.0. DGU 2011.

**[76]STEINBERG GS, CARTER BS, BEATY TH, CHILDS B, WALSH PC:***Family history and the risk of prostate cancer.* Prostate 1990; 17, 337.

**[77]STEPHAN-ODENTHAL M:***Tumornachsorge beim Prostatakarzinom im Rahmen der integrierten Versorgung.* Blickpunkt d. Mann 2008; 6, 18-21.

**[78]THÜROFF S, CHAUSSY C:***Therapie des lokalen Prostatakarzinoms mit hoch intensive fokussiertem Ultraschall (HIFU). Ergebnisse und Nebenwirkungen.* Der Urologe A 2001; 40(3), 191-194.

**[79]THÜROFF S, CHAUSSY C:***HIFU in der Uro-Onkologie.* Urologe 2008; 47, 431-440.

**[80]THÜROFF S, CHAUSSY C:***Evolution and Outcomes of 3MHz High Intensity Focused Ultrasound Therapy for Localized Prostate Cancer During 15 Years.* J Urol 2013; 190, 702-710.

**[81]THOMPSON IM:***Counseling patients with newly diagnosed prostate cancer.* Oncology 2000; 14, 119-126.

**[82]VAN LEENDERS GJ, BEERLAGE HP, RUIJTER ET, DE LA ROSETTE JJ, VAN DE KAA CA:***Histopathological changes associated with high intensity focused ultrasound (HIFU) treatment for localised adenocarcinoma of the prostate.* J Clin Pathol; 53, 391-394.

**[83]VILLERS A, PROMMIER P, BATAILLARD A, FREVERS B:***Summary of the standards, options and recommendations for the management of patients with non-metastatic prostate cancer(2001).* Br J Canc 2003; 89, 50-58.

**[84]WALSH PC, DONKER PJ:***Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention.* J Urol 1982; 128, 492-497.

**[85]WANG MC, VALENCUELA LA, MURPHY GP, CHU TM:** *Prurification of a human prostate specific antigen.* Invest Urol 1979;17(2), 159-163.

**[86]WITTKIND CH, SOBIN LH:** *UICC:TNM classification of malignant tumors 6th. ed.* Wiley and Sons, New York 2002.

**[87]WU AH, WHITTEMORE AS, KOLONEL LN, JOHN EM, GALLAGHER RP, WEST DW, HANKIN J:** *Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4(7), 735-741.

**[88]**[www.anna-ctrus.de](http://www.anna-ctrus.de)

**[89]**[www.edap-hifu.de](http://www.edap-hifu.de)

**[90]**[www.prostata.de](http://www.prostata.de)

**[91]**[www.prostatascanning.de](http://www.prostatascanning.de)

**[92]XU J, STOLK JA, ZHANG X, SILVA SJ, REED SG:** *Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray.* Cancer Res 2000; 69, 1677-1682.

**[93]YANG XJ, LAVEN B, TRETIAKOVA M, WODA B:** *Detection of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in postradiation prostatic adenocarcinoma.* Urology 2003; 62, 282-286.

**[94]ZARDIZE DG, BOYLE P:***Cancer of the prostate: Epidemiology and Aetiology.* Brit J Urol 1987; 59, 493-502.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gleason-Grading: <a href="http://www.prostate-cancer.org">www.prostate-cancer.org</a> .....	4
Abbildung 2: Ablatherm-HIFU-Gerät: <a href="http://www.edap-hifu.de">www.edap-hifu.de</a> .....	13
Abbildung 3: HIFU-Läsion: <a href="http://www.edap-hifu.de">www.edap-hifu.de</a> .....	13
Abbildung 4: HIFU-Therapie: <a href="http://www.edap-hifu.de">www.edap-hifu.de</a> .....	14
Abbildung 5: ABC-Methode: Immunhistochem. Färbemethoden, Dako Cytomation.	19
Abbildung 6: IHC-MIB-1 .....	22
Abbildung 7: IHC-34-β-E-12 .....	23
Abbildung 8: IHC-AMACR .....	24
Abbildung 9: Zuschnitt .....	26
Abbildung 10: IHC-MIB-1 PRAE-Therapeutisch .....	28
Abbildung 11: IHC-MIB-1 POST-HIFU-Therapie .....	28
Abbildung 12: IHC-MIB-1 POST-EBRT-Therapie .....	29
Abbildung 13: ICH-MIB-1 POST-HIFU-THERAPIE: Nicht-Tumor-Gewebe .....	29
Abbildung 14: IHC-AMACR PRAE-therapeutisch .....	30
Abbildung 15: IHC-AMACR POST-HIFU-Therapie.....	30
Abbildung 16: IHC-AMACR POST-EBRT-Therapie.....	30
Abbildung 17: ICH-AMACR POST-HIFU-Therapie: Nicht-Tumor-Gewebe.....	31
Abbildung 18: IHC-34-β-E-12 PRAE-therapeutisch.....	31
Abbildung 19: IHC-34-β-E-12 POST-HIFU-Therapie.....	32
Abbildung 20: IHC-34-β-E-12 POST-EBRT-Therapie .....	32

Abbildungen 6-20 Eigenanfertigung mit Foto-Mikroskop der Uropathologie der Universität-Regensburg.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patienten insgesamt .....	33
Tabelle 2: Patientencharakteristika HIFU .....	34
Tabelle 3: Patientencharakteristika EBRT .....	35
Tabelle 4: IHC-Auswertung HIFU .....	36
Tabelle 5: IHC-Auswertung EBRT .....	37
Tabelle 6: Pat.-Verteilung .....	37
Tabelle 7: IHC-Aufteilung HIFU .....	38
Tabelle 8: MIB-1 POST-HIFU: Signifikanzen bei $P < 0.05$ .....	38
Tabelle 9: AMACR POST-HIFU: Signifikanzen $P < 0.05$ .....	39
Tabelle 10: PSA POST-HIFU: Signifikanzen $P < 0.05$ .....	39
Tabelle 11: Sensitivität/Spezifität MIB-1 POST-HIFU .....	40
Tabelle 12: Sensitivität/Spezifität AMACR POST-HIFU.....	40
Tabelle 13: Korrelation der Parameter: Signifikanzen $P < 0.05$ .....	41
Tabelle 14: IHC-Aufteilung EBRT .....	42
Tabelle 15: MIB-1 POST-EBRT: Signifikanzen $P < 0.05$ .....	43
Tabelle 16: AMACR POST-EBRT: Signifikanzen $p < 0,05$ .....	43
Tabelle 17: Sensitivität/Spezifität MIB-1 POST-EBRT .....	44
Tabelle 18: Sensitivität/Spezifität AMACR POST-EBRT .....	44

## 9 Abkürzungen

AAH = adenomatöse Hyperplasie

AG = Antigen

AK = Antikörper

ASTRO = American Society for Therapeutic Radiology and Oncology

BPH = benigne Prostatahyperplasie

bzw = Beziehungsweise

C = Celsius

CA = Karzinom

ccm = Kubikzentimeter

CK = Cytoskelett

D = Dalton

d.h. = das heißt

DRU = digital rectale Untersuchung

EAU = European Association of Urology

EBRT = Externe perkutane Strahlentherapie/ external beam radiotherapy

Gy = Gray

HIFU = Hochintensiver fokussierter Ultraschall

ICH = Immunhistochemie

IMRT = Intensitäts-modulierte Radiotherapie

k.A. = keine Angaben

Lsg = Lösung

M = Moll

max = maximal

MHz = Mega-Hertz

min = minimal

ml = Milliliter ng/ml = nanogramm/milliliter

mm = Millimeter  $\mu\text{m}$  = Mikrometer

MRT = Magnetresonanztomographie

n = Anzahl

OT = Objektträger

PAP = Prostataspezifische saure Phosphatase

POST- = Nach Therapie

PRAE- = Vor Therapie

## 9 Abkürzungen

PSA = Prostataspezifisches Antigen

TNM = Staging nach UICC

TRUS = Transrektaler Ultraschall

UICC = Union Internationale Contre le Cancer

USA = Vereinigte Staaten von Amerika

Vol = Volumen

vs = Versus

z.B. = zum Beispiel

3D = 3 Dimensional

## **10 Danksagung**

Bei PD Dr. Andreas Blana und Dr. Bernhard Walter möchte ich mich für die Überlassung des Promotionsthemas bedanken. Und für ihre geduldige Unterstützung und hervorragende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich jederzeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Evelyn, die mir in jeder Lebenslage den Rücken stärkt und vorantreibt. Herzliches Dankeschön

## 11 Lebenslauf

**Name:** Thomas Weiß

**Geburtsdatum:** 20.April.1980

**Geburtsort:** Rotthalmünster

**Eltern:** Hildegard Weiß (geb. Schödermaier), Diplom-Braumeisterin  
Dr. med. dent. Maximilian Weiß, Zahnarzt

**Geschwister:** Dr. med. dent. Marianne Rothbauer  
Martina Weiß

**Familienstand:** verheiratet

**Wohnort:** Bad Griesbach

**Schullaufbahn:** 1986-1991: Grund- und Hauptschule Bad Griesbach  
1991-2000: Maristengymnasium Fürstenzell  
Abitur: Juni 2000

**Studium:** 2001-2007: Zahnmedizin an der Universität Regensburg  
2002: naturwissenschaftliche Vorprüfung  
2004: zahnärztliche Vorprüfung  
2007: Staatsexamen  
25.Juli.2007: Approbation als Zahnarzt

**Beruf:** 2007-2009: Ausbildungsassistent bei Dr. Schraml Rainer  
2010-dato: Selbstständig in Gemeinschaftspraxis  
Weiß-Rothbauer