

**Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. C. Stief**

**Untersuchungen zur Fluoreszenz – in – situ –  
Hybridisierung (FISH) beim Urothelkarzinom des oberen  
Harntrakts**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**

**an der Medizinischen Fakultät der**

**Ludwigs-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von**

**Armin Will**

**aus**

**Landshut**

**2011**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk Zaak

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Willibald Permanetter

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Thomas Hofmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

**Für  
meine Frau Rosemarie**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumore des oberen Harntraktes.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie .....	1
1.1.3	Pathogenese .....	3
1.1.4	Klassifikationen .....	4
1.1.5	Symptomatik.....	8
1.1.6	Diagnostik.....	8
1.1.7	Therapie .....	11
1.1.8	Nachsorge .....	13
1.2	Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung (FISH) .....	15
1.2.1	Anwendungsgebiete.....	15
1.2.2	Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	15
1.2.3	Bisherige Untersuchungen zur FISH bei Tumoren im oberen Harntrakt.....	16
1.3	Zielsetzung und Fragestellung.....	17
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Patienten .....	19
2.2	Studienablauf.....	22
2.3	Untersuchungsmaterial und Zytospinpräparation.....	24
2.4	Urinzytologie .....	24
2.4.1	Anfertigung der Präparate .....	24
2.4.2	Beurteilung der Präparate .....	25
2.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	26
2.5.1	Geräte und Reagenzien .....	26
2.5.2	Vorbereitung der Zytospinpräparate zur Hybridisierung .....	29

2.5.3	Hybridisierung .....	29
2.5.4	Waschvorgänge und Färbung nach erfolgter Hybridisierung.....	29
2.5.5	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung .....	30
2.5.6	DAPI-Fluoreszenzfilter .....	30
2.5.7	Rot-Grün-, Aqua-, Gold-Fluoreszenzfilter .....	30
2.5.8	Interpretation der Ergebnisse der Fluoreszenzsignale .....	31
2.6	Statistische Auswertung .....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Sensitivitäten und PPW der Testverfahren.....	39
3.1.1	Aufschlüsselung der Sensitivität nach T-Stadium und Grading.....	39
3.1.2	Verteilung der Chromosomenaberrationen in der FISH.....	40
3.1.3	FISH Ergebnisse bei Tumorpatienten mit suspekter Zytologie.....	41
3.2	Spezifitäten und NPW der Testverfahren.....	42
3.2.1	Falsch positive Befunde in der Kontrollgruppe.....	42
4	Diskussion .....	44
5	Zusammenfassung .....	51
6	Literaturverzeichnis .....	54
7	Danksagung .....	62
8	Lebenslauf.....	63

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Auswertebogen FISH Studie.....	23
Abbildung 2: Patient 16: FISH negativ .....	33
Abbildung 3: Patient 56: FISH positiv .....	35

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach dem UICC TNM-System (UICC 2002).....	5
Tabelle 2: WHO Klassifikation der Nierenbecken- und Harnleitertumore.....	7
Tabelle 3: Differenzialdiagnosen von Nierenbecken- und Harnleitertumoren .....	9
Tabelle 4: Nachsorgeempfehlungen für Tumore im oberen Harntrakt .....	14
Tabelle 5: Übersicht FISH Studien bei Tumoren im oberen Harntrakt .....	17
Tabelle 6: Patienten der Kontrollgruppe .....	20
Tabelle 7: Patienten mit endoskopisch auffälligem Befund und negativer Histologie .....	21
Tabelle 8: Patienten mit histologisch gesichertem Tumor im oberen Harntrakt.....	21
Tabelle 9: Durchführung der Färbung nach Papanicolaou.....	25
Tabelle 10: Auswertung FISH Patient 16 .....	32
Tabelle 11: Auswertung FISH Patient 56 .....	34
Tabelle 12: Übersicht der Zytologie- und FISH Auswertung der Tumorpationen. ....	37
Tabelle 13: Übersicht der Zytologie- und FISH Auswertung der Kontrollgruppe. ....	38
Tabelle 14: Sensitivität in Abhängigkeit von Tumorstadium und Grading .....	40
Tabelle 15: Chromosomenaberration in Bezug auf T-Stadium und Grading .....	41
Tabelle 16: Gegenüberstellung FISH Ergebnisse und suspekter Zytologie .....	41
Tabelle 17: Spezifitäten der Testverfahren .....	42
Tabelle 18: Falsch positive Befunde in der Kontrollgruppe .....	43
Tabelle 19: Gegenüberstellung der Studien zur FISH im oberen Harntrakt .....	46

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Tumore des oberen Harntraktes

### 1.1.1 Epidemiologie

Etwa 5-6% der urothelialen Tumoren der Harnwege betreffen den oberen Harntrakt. 25% der Urothelkarzinome betreffen die Ureteren, 75 % sind im Nierenbecken zu finden. Mehr als 90% der bösartigen Tumoren sind Übergangszellkarzinome und entsprechen in ihrem Aufbau den Tumoren die in der Harnblase anzutreffen sind (Oosterlinck et al. 2004; Krogh et al. 1991; Das et al. 1990).

Etwa 1.600 neue Nierenbeckentumore werden pro Jahr in den USA geschätzt (Guinan et al. 1992). In Schweden und Norwegen liegt die Inzidenz für Männer bei 1,2 bzw. 0,6 pro 100.000 Einwohnern. Bei den Frauen mit 0,9 bzw. 0,4 pro 100.000 etwas niedriger (Ehrenberg et al. 1990). Daraus ergibt sich eine Mann: Frau Relation von 2: 1 für Schweden bzw. 1,5: 1 für Norwegen. Diese Inzidenzen sind wahrscheinlich auf die meisten anderen westlichen Länder zu übertragen.

Etwa 65% der Tumore des oberen Harntraktes treten im Alter von 60-80 Jahren auf. Unter 40 Jahren sind bösartige Neubildungen des Nierenbeckens und Ureters eine Seltenheit. Es besteht kein Unterschied in der Inzidenz von rechts und links. Etwa 1-5% der Tumore sind synchron und bilateral (Holmäng, Johansson 2004; Kang et al. 2004). Zwischen 30-75% der Tumoren entstehen primär oder sekundär aus Harnblasentumoren (Craig M 1998).

### 1.1.2 Ätiologie

Für die Entstehung von Tumoren des oberen Harntraktes sind überwiegend die gleichen Faktoren verantwortlich wie für die Entstehung des Blasenkarzinoms (Jensen et al. 1988). Trotzdem ist bisher nicht geklärt, warum Nierenbecken- und Harnleiterkarzinome im Vergleich zum Blasenkarzinom seltener auftreten. Kürzere Expositionsdauer, hydrolysierende Enzyme und geringere Oberfläche werden diskutiert, sind aber nie bewiesen worden (Gittes 1976).

Bei 90% der Patienten sind Rauchen oder die berufliche Exposition mit Kanzerogenen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich. Bei der beruflichen Exposition sind vor allem Beschäftigte der chemischen, petrochemischen und Plastikindustrie betroffen. Eine weitere

Risikogruppe sind Personen im Umgang mit Kohle, Koks, Teer und Asphalt. Das führende Kanzerogen in diesen Berufsgruppen stellen die aromatischen Amine dar (Ross et al. 1989; Jensen et al. 1988; Sorahan, Sole 1990). Zigarettenkonsum stellt einen noch größeren Risikofaktor für die Tumorentstehung im oberen Harntrakt dar als bereits beim Urothelkarzinom der Harnblase. Das Risiko korreliert signifikant mit den Zigarettenpackungen pro Jahr und der Dauer der Exposition. Tumore treten bei 7 von 20 Männern und 4 von 10 Frauen mit Nikotinabusus auf (McLaughlin et al. 1992).

Bei den Medikamenten steht das Phenacetin als Auslöser von Tumoren des oberen Harntraktes analog zum Blasenkarzinom an erster Stelle. Das Risiko bei Phenacetin-Abusus ist 150-fach erhöht. Die Latenzzeit beträgt 20-25 Jahre und ist Dosis abhängig. Obwohl die Metaboliten des Phenacetins (Orthoaminophenole) den aromatischen Aminen ähnlich sind, ist ihre kanzerogene Wirkung ungeklärt. Bei 57% der Patienten mit Phenacetin-Abusus findet sich eine p53 Mutation wie sie auch an Untersuchungen von Harnblasentumoren auftreten. Dies stellt eine mögliche Ursache der kanzerogenen Wirkung dar (Petersen et al. 1993).

Eine Korrelation für die Entwicklung von Uretertumoren und dem hereditären, kolorektalen Karzinom zeigte Lynch et al. 1990. Ca. 8% aller oberen Harntrakttumore sind mit dem Lynch-Syndrom assoziiert und das Risiko einen Tumor im oberen Harntrakt zu entwickeln ist 14-fach höher als in der Normalbevölkerung (Sijmons et al. 1998). Ca. 20% der sporadischen Tumore des oberen Harntraktes zeigen Mikrosatelliteninstabilitäten wie sie bei Patienten mit hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrom (HNPCC) auftreten (Hartmann et al. 2002). Familiär gehäuftes Auftreten von oberen Harntrakttumoren unabhängig von HNPCC ist eine Rarität (Kiemeneij et al. 1997).

Eine weitere Risikogruppe stellen Dialysepatienten und Nierentransplantierte dar. Die Karzinominzidenz bei Nierentransplantierten ist bis zu 100-mal höher als in der Normalbevölkerung. Karzinome der Haut stehen im Vordergrund, aber auch Tumore des Nierenbeckens, Harnleiters und der Blase werden beschrieben. Bei Dialysepatienten beträgt das Tumorrisiko etwa 10%, dabei werden vor allem Harntrakttumore beobachtet (Pecqueux et al. 1990; Hannibal et al. 1991).

Bei initialem Urothelkarzinom der Harnblase entwickeln sich in 3-13% Tumore im oberen Harntrakt. Sie sind Folge einer panurothelialen Erkrankung oder Folge einer Implantationsmetastasierung durch vesiko-ureteralen Reflux (Hafner et al. 2001). Bei oberflächlichen Blasentumoren finden sich gleichzeitig in etwa 2% simultane Nierenbecken- und Harnleitertumore. Patienten mit multiplen Tumoren und Lokalisation im Trigonumbereich



haben dabei das höchste Risiko (Palou et al. 2005). Nach Primärtherapie des Blasen Tumors werden im Rahmen der Nachsorge in 1,7-26% der Fälle Tumore im oberen Harntrakt entdeckt (Herr et al. 1996). Zystektomierte Patienten mit oberflächlichem Tumor haben dabei ein höheres Risiko als bei muskelinvasivem Wachstum. (Millán-Rodríguez et al. 2000; Huguet-Pérez et al. 2001).

### 1.1.3 Pathogenese

Man unterscheidet primäre und sekundäre Neubildungen des Nierenbeckens und Harnleiters. Sekundäre Tumore stellen eine Rarität dar. 95% der primären Tumore des oberen Harntraktes sind Urothelkarzinome (Mazeman 1976). Andere Entitäten wie das kleinzellige Karzinom, Plattenepithel- und das Adenokarzinom sind Raritäten (Jakse, Marberger 1985).

Analog zum Blasenkarzinom besteht beim Nierenbeckentumor eine enge Korrelation zwischen Tumordifferenzierung und Infiltrationstiefe. Die Invasion des Nierenhilus hat einen höheren Voraussagewert bezüglich einer Metastasierung als eine Invasion der Gefäße oder des Nierenparenchyms (Davis et al. 1987). Im Vergleich zum Blasenkarzinom zeigen Tumore im oberen Harntrakt ein fortgeschrittenes Tumorstadium (33% pT2-4) und einen höheren Grading (35% G3 Stadium) (Stewart et al. 2005). 23-46% der Nierenbeckenkarzinome sind bei Diagnosestellung multizentrisch. Das multizentrische Auftreten korreliert mit dem Tumorgrad und der histologischen Struktur. Anaplastische Tumore sind meist solitär, während hochdifferenzierte, papilläre Tumore in bis zu 35% eine Multizentrität aufweisen (Yousem et al. 1988). Bei 29-52% der Patienten mit Nierenbeckenmalignom treten simultane Ureter- und Blasenkarzinome auf, während asynchrone Blasentumore in 15% zu beobachten sind (Mazeman 1976). Das Carcinoma in situ (Cis) stellt eine Sonderform des Urothelkarzinoms dar. Makroskopisch weist das Cis nur uncharakteristische Veränderungen der Mukosa wie Rötung und lachsfarbene Verfärbung und/oder leichte Verdickung auf und stellt damit eine besondere Herausforderung für die Diagnostik dar. Carcinoma in situ des Nierenbeckens und Harnleiters können unabhängig und synchron mit anderen Urothelkarzinomen der Harnblase auftreten (Hellsten et al. 1980).

Bei Diagnosestellung haben 30% der Patienten Metastasen der regionären Lymphknoten. Etwa 50% haben zum Diagnosezeitpunkt oder entwickeln im weiteren Verlauf Metastasen, bevorzugt in Lunge, Knochen und Leber (Davis et al. 1987; Das et al. 1990).

## 1.1.4 Klassifikationen

### 1.1.4.1 TNM-Klassifikation

Die Nierenbecken und Harnleiterkarzinome werden heute wie auch alle anderen Malignome nach dem UICC-TNM-System in der derzeit gültigen Fassung von 2002 klassifiziert (UICC 2002). Durch eine weltweite Verbreitung und Akzeptanz des TNM-Systems ist eine Vergleichbarkeit von Therapieergebnissen möglich. Die Definition der verschiedenen Kategorien wird in regelmäßigen Abständen durch die UICC überarbeitet. Das System teilt den Tumor in folgende Kategorien ein:

- organbegrenzt, organüberschreitend, Nachbarorgane infiltrierend (T-Kategorie)
- ohne/mit Lymphknotenmetastasen (N-Kategorie)
- ohne/mit Fernmetastasen (M-Kategorie)

Die Festlegung der klinischen TNM-Kategorien (Staging) erfolgt prätherapeutisch mit klinischen und bildgebenden Untersuchungsverfahren und ist für die Therapie von ausschlaggebender Bedeutung. Die Bestimmung der pathohistologischen TN-Kategorie erfolgt nach Entfernung des tumortragenden Organs bzw. der regionalen Lymphknoten und wird durch das Präfix „p“ gekennzeichnet. Diese Klassifizierung ist für die Prognose der Tumorerkrankung wesentlich.

Das TNM-System für das Nierenbecken- und Harnleiterkarzinom ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 1 Stadieneinteilung nach dem UICC TNM-System (UICC 2002)**

**T-Primärtumor**

**TX** Primärtumor kann nicht beurteilt werden

**T0** Kein Anhalt für Primärtumor

**Ta** Nichtinvasives papilläres Karzinom

**Tis** Carcinoma in situ

**T1** Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe

**T2** Tumor infiltriert Muskularis

**T3**

Nierenbecken: Tumor infiltriert peripelvines Fettgewebe oder Nierenparenchym

Harnleiter: Tumor infiltriert periureterales Fettgewebe

**T4** Tumor infiltriert Nachbarorgane oder durch die Niere das perirenale Fettgewebe

**N- Regionale Lymphknoten**

**NX** Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden

**N0** Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

**N1** Metastase in einem einzelnen Lymphknoten 2cm oder weniger im größten Durchmesser

**N2** Metastase in einem einzelnen Lymphknoten (> 2 cm, aber < 5 cm) im größten Durchmesser oder multiple Lymphknoten, keiner > 5 cm im größten Durchmesser

**N3** Metastase in Lymphknoten > 5 cm in größtem Durchmesser

**M- Fernmetastasen**

**MX** Fernmetastasen können nicht erfasst werden

**M0** Keine Fernmetastasen

**M1** Fernmetastasen

#### 1.1.4.2 WHO-Klassifikation

1999 veröffentlichte die WHO ein Klassifikationssystem, das sowohl das biologische Verhalten der Tumoren, als auch die zytogenetischen und molekularbiologischen Veränderungen berücksichtigt. Hinsichtlich der Tumorbiologie und des daraus resultierenden Progressionsrisikos werden Harnblasenkarzinome in „lowgrade“-Tumoren mit niedrigem Progressionsrisiko und „highgrade“-Tumoren mit hoher Progressionswahrscheinlichkeit unterteilt. Die Gradings 1, 2 und 3 von 1973 entsprechen in der WHO-Nomenklatur den neuen Termini (Lopez-Beltran, Montironi 2004):

Nicht invasive papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig maligner Potenz (**PUNLMP**)

Nicht invasives papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom (**LGPUC**)

Nicht invasives papilläres urotheliales High-grade-Karzinom (**HGPUC**)

Die papilläre Neoplasie niedrig-malignen Potentials (PUNLMP) stellt eine 1998 neu definierte Gruppe von papillären Urotheltumoren dar, die mittlerweile allgemein anerkannt wird. Diese Tumoren ähneln den urothelialen Papillomen im Aufbau, weisen aber eine vermehrte Proliferation und Dickenzunahme des Urothels auf. Bei diesen Tumoren werden weniger Rezidive wie bei hochdifferenzierten, nicht invasiven papillären Urothelkarzinomen beobachtet (Lehmann J 2005). Diese Tumoren weisen eine günstige Prognose auf.

In der neuesten WHO-Klassifikation von 2004 werden die nicht invasiven den invasiven Tumoren gegenübergestellt (Stief et al. 2006). Die Abgrenzung von nicht invasiven urothelialen Tumoren ist sinnvoll, stellen sie doch im engeren Sinn kein Karzinom, sondern eine Karzinomvorstufe dar, weil ihnen die grundlegende biologische Voraussetzung für ein Karzinom, nämlich die Invasivität, fehlt. Die sprachliche Regelung bei den nicht invasiven Karzinomen lehnt sich an die Nomenklatur von 1998 mit den Begriffen „nicht invasive papilläre urotheliale Neoplasie niedriger maligner Potenz“ (PUNLMP), „nicht invasives papilläres Urothelkarzinom lowgrade“ (LGPUC) und „nicht invasives papilläres Urothelkarzinom highgrade“ (HGPUC) an.

Die wesentlichen neuen Erkenntnisse der WHO-Klassifikation von 2004 sind auf der einen Seite die Unterteilung des Urothelkarzinoms in nur noch zwei Grade, in „lowgrade“ und „highgrade“, welches eine Form der Vereinfachung darstellt. Damit muss der genetisch stabile Tumor von dem genetisch instabilen Tumor differenziert werden. Auf der anderen Seite muss invasives Wachstum von nicht invasivem Wachstum unterschieden werden (Stief et al. 2006).

In der nachfolgenden Tabelle ist die neue Klassifikation WHO 2004 im Vergleich zur Version 1973 für die Tumore des oberen Harntraktes in Übersicht dargestellt.

**Tabelle 2 Gegenüberstellung WHO Klassifikation der Nierenbecken- und Harnleitertumoren von 1973 und der Revision 2004 (Rübben 2007)**

WHO 1973	WHO 2004
Mittlere Dysplasie	Intraurotheliale Low-grade-Neoplasie
Mittlere Dysplasie	Intraurotheliale high-grade-Neoplasie
Schwere Dysplasie	
Carcinoma in situ	
Papillom	Papillom
Grad 1	Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedriger maligner Potenz; PUNLMP
Grad 1	Nicht invasives papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom; LGPUC
Grad 2	Nicht invasives papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom; LGPUC
Grad 2	Nicht invasives papilläres urotheliales High-grade-Karzinom; HGPUC
Grad 3	Nicht invasives papilläres urotheliales High-grade-Karzinom; HGPUC

Wegen der ausgeprägten Änderungen in der Klassifikation von 2004 ist es schwierig die bisherige Literatur hinsichtlich der Therapie und Prognose mit der nun folgenden zu vergleichen (Rübben 2007).

In der vorliegenden Studie wurde bei der Auswertung der Histologie zur besseren Vergleichbarkeit simultan die Klassifikation nach WHO 2004, 1973 und UICC-TNM 2002 verwendet.

### **1.1.5 Symptomatik**

Die Makrohämaturie ist das häufigste und in etwa 75% das einzige Symptom für einen Nierenbeckentumor (Guinan et al. 1992). Koliken bedingt durch Koagelabgang oder dumpfe, dauerhafte Schmerzen wegen lokaler Tumorausbreitung oder Hydronephrose finden sich in 13-46% der Nierenbeckenkarzinome (Johansson et al. 1974; Jakse, Marberger 1985). Patienten mit Harnleitertumoren haben in 44-90% eine Makrohämaturie oder stellen sich wegen kolikartigen Schmerzen vor. Ein palpabler Tumor, ein positives Psoaszeichen oder eine Varikozele sind meist Ausdruck eines bereits lokal fortgeschrittenen Tumors (Babaian RJ 1980). Bei der Symptomatik von Nierenbecken- oder Harnleitertumoren gibt es kaum Unterschiede, jedoch sind Harnwegsinfektionen häufiger mit Nierenbeckenkarzinomen assoziiert. Miktionsbeschwerden sind selten und meist Folge von Infektionen oder begleitender Blasentumore. Gewichtsverlust, Schwäche, Fieber und Symptome durch Metastasen treten in 2-7% der Fälle auf (Guinan et al. 1992).

### **1.1.6 Diagnostik**

Die Diagnostik des Nierenbecken- und Harnleiterkarzinoms ist durch die Anamnese, klinische Untersuchung, das Infusionsurogramm, die retrograde Pyelographie mit Entnahme einer Urinzytologie und Endoskopie der oberen Harnwege charakterisiert. Die Ultraschalluntersuchung ist hilfreich bei der Differenzialdiagnose, während die Computertomographie hinsichtlich der Tumorausdehnung, der Lymphknoten- und Fernmetastasen Auskunft geben kann (Rübben 2007).

#### **1.1.6.1 Ausscheidungsurogramm**

Charakteristisch für einen Nierenbeckentumor ist ein Füllungsdefekt im Ausscheidungsurogramm. Die wichtigste Differenzialdiagnose ist der Harnsäurestein. Hilfreich ist hier die Sonographie. Die weiteren Differenzialdiagnosen von Nierenbecken- und Harnleitertumoren sind nachfolgend in der Übersichtstabelle 3 dargestellt. Füllungsdefekte im Harnleiter, Harnleiterdilatationen oder stumme Nieren finden sich bei 80% der Patienten. Die typischen Zeichen des Harnleitertumors sind zentrale und randständige Füllungsdefekte. Selten sind Einengungen des Ureters durch eine solide Harnleiterwandinfiltration (Jakse, Marberger 1985; Chen GL 2000). Bei etwa 11% der Patienten mit Uretertumoren zeigt sich ein unauffälliges Urogramm. Verantwortlich ist meist die inkomplette Kontrastierung des Harnleiters. Bei sichtbaren Füllungsdefekten müssen mehrere gutartige und bösartige Veränderungen in Betracht gezogen werden.

**Tabelle 3 Differenzialdiagnosen von Nierenbecken- und Harnleitertumoren (Rübben 2007)**

<b>Nierenbeckentumor</b>	<b>Stein</b>	<b>Anomalien</b>	<b>Andere</b>
<b>Intrinsisch:</b> Nierenzellkarzinom M. Hodgkin Plasmozytom Papillom	Harnsäurestein Xanthinstein	Pseudotumor Ektope Papillen	Blutkoagel Papillennekrose Malakoplakie Pyelitis cystica
<b>Extrinsisch:</b> Retroperitoneale LK Parapelvine Zysten		Aneurysma Varikosis	
<b>Uretertumor</b>	<b>Stein</b>	<b>Anomalien</b>	<b>Andere</b>
<b>Intrinsisch:</b> Fibroepitheliom Papillom Endometriose	Harnsäurestein	Ureteritis cystica Striktur Granulom	Blutkoagel
<b>Extrinsisch:</b> Retroperitoneale LK Retroperitoneale Fibrose Metastasen			Varikosis

### 1.1.6.2 Retrograde Urographie

Bei unklarem Befund oder insuffizienter Darstellung der ableitenden Harnwege im Urogramm sollte eine retrograde Pyelographie durchgeführt werden. Der Vorteil dieser Untersuchung liegt in der gleichzeitig möglichen zystoskopischen Beurteilung der Harnblase und der kompletten Darstellung des Harnleiters und des Nierenbeckens durch individuell

dosierte Kontrastmittelapplikation. Simultan kann Spülflüssigkeit aus dem Nierenbecken und Ureter für die exfoliative Urinzytologie entnommen werden (Chen GL 2000).

### **1.1.6.3 Endoskopie**

Die Hauptindikation der Endoskopie des oberen Harntraktes ist eine unklare Hämaturie bei unauffälliger Zystoskopie und weist eine hohe diagnostische Treffsicherheit auf (Bagley, Rivas 1990). Die Sensitivität der Ureterorenoskopie liegt bei 80%, die Spezifität bei 60%. Bei suspekten Läsionen wird zur Klärung eine Biopsie entnommen. Das Grading korreliert mit der Invasionstiefe und ist somit für das weitere therapeutische Vorgehen von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren erlaubt die Ureterorenoskopie eine Selektion der Patienten, die für eine organerhaltende Therapie geeignet sind (Chen GL 2000; Guarnizo E 2000; Brown GA 2006).

### **1.1.6.4 Sonographie**

Einen Nierenbeckentumor sonographisch von einem Blutkoagel oder benignen Raumforderung zu unterscheiden ist nicht möglich. Sie ist aber hilfreich einen Füllungsdefekt im Nierenbeckenkelchsystem von einem nicht schattengebenden Konkrement zu unterscheiden und eine Abflussstörung zu erkennen (Rifkin 1985).

### **1.1.6.5 Computer- und Kernspintomographie**

Die Domäne der Computer- und Kernspintomographie ist der lokal fortgeschrittene und organüberschreitende Tumor, so wie der Nachweis, bzw. Ausschluss einer Metastasierung. (Scolieri MJ 2000). Durch die Einführung von MDCT-Scannern kann eine Verbesserung in der Diagnose von Tumoren im oberen Harntrakt erzielt werden (Caoili et al. 2005; Kemper J 2006). Bei der Differenzialdiagnose Blutkoagel und nicht schattengebendes Konkrement ist die CT ebenfalls hilfreich (Netto NR 1990). Eine besondere Bedeutung haben die Computer- und Kernspintomographie bei der Differenzialdiagnose der Harnleiterobstruktion (Milestone et al. 1990).

### **1.1.6.6 Urinzytologie**

Die zytologische Untersuchung zur Abklärung oder Verlaufskontrolle von Tumoren des oberen Harntraktes sollte durch Aufarbeitung von entnommener Spülflüssigkeit aus dem Nierenbecken und Harnleiter erfolgen, da dieses Vorgehen der Spontanurinzytologie signifikant überlegen ist. Ein großes Manko der Zytologie ist die geringe Aussagekraft bei gut differenzierten Tumoren. Nur 20-40% der Grad-1 und ca. 55% der Grad-2 Karzinome zeigen eine positive Urinzytologie. Die größte Bedeutung hat die zytologische Untersuchung bei



Grad-3 Tumoren. Falsch positive Ergebnisse beruhen in den meisten Fällen auf Irritationen des Urothels, wie sie bei chronischen Entzündungen, Urolithiasis oder durch Ureterkathetermanipulation auftreten können (Shinka et al. 1988; Chen GL 2000).

Trotz dieser Schwächen stellt die Zytologie den derzeitigen Standard der Urin-gestützten Diagnostik und Verlaufskontrolle bei Tumoren des oberen Harntraktes dar.

### **1.1.6.7 Urinmarker**

Zum Einsatz von Urinmarkersystemen bei Tumoren im oberen Harntrakt gibt es nur wenige Daten aus Untersuchungen an kleinen Patientenkollektiven. Der BAT-stat-Test, NMP22 und Telomerase zeigten in diesen Studien eine der Harnzytologie überlegene Spezifität und Sensitivität (Walsh et al. 2001; Carpinito et al. 1996; Wu et al. 2000). Eine Routineanwendung dieser Marker kann auf Grund der Datenlage derzeit aber nicht empfohlen werden.

## **1.1.7 Therapie**

### **1.1.7.1 Radikale operative Therapie**

Die Standardtherapie beim Nierenbeckenkarzinom und bei Tumoren des proximalen und mittleren Harnleiterdrittels ist die Nephroureterektomie. Die komplette Entfernung des Ureters ist von entscheidender Bedeutung, da ein Rezidiv im Harnleiterstumpf in 16-58% der Fälle auftritt (Hall et al. 1998).

Neben der offenen Resektion des Harnleiters mit Blasenmanschette wurden zur Verminderung der Ausdehnung der Inzision verschiedene Techniken entwickelt. Dabei wird das Ostium transurethral umschnitten und der Ureter entweder nach oben oder transurethral durch die Blase nach außen gestrippt. In 5-20% der Patienten ist eine Extraktion des Harnleiters auf diesem Wege nicht möglich und es muss eine konventionelle offene Resektion des distalen Ureters erfolgen (Giovansili et al. 2004; Ubrig et al. 2004).

Neben der offenen Nephroureterektomie wird zunehmend die laparoskopische und retroperitoneoskopische Technik durchgeführt. Die Morbidität ist trotz längerer Operationszeit im Vergleich zum offenen Vorgehen geringer und die onkologischen Ergebnisse werden als gleichwertig beschrieben (Rassweiler et al. 2004; McNeill et al. 2004).

### **1.1.7.2 Organerhaltende operative Therapie**

Bei einem Tumorbefall des distalen Ureters ist eine operative Entfernung meist bei allen Tumorstadien möglich und sinnvoll. Es erfolgt die komplette Resektion des unteren Harnleiters unter Mitnahme des periureteralen Gewebes mit Blasenmanschette. Die Ureterneozystostomie erfolgt entweder mit einer Psoas-Hitch Technik oder durch einen Boari-Lappen.

Weiter sind Ta und T1 Tumore des Harnleiters für eine organerhaltende Therapie geeignet. Der tumortragende Ureter wird bei offener Operation mit einem Sicherheitsabstand von 1cm entfernt und End-zu-End anastomosiert. Die 5-Jahres Überlebensraten sind bei diesem Verfahren 100% für pTa und 96% bei pT1 Karzinomen (Zungri et al. 1990). Durch den ureterskopischen Einsatz von Nd:YAG- und Holmiumlaser wurde das offene Operationsverfahren weitgehend verdrängt. Mehr als 80% der Patienten sind nach endoskopischer Therapie tumorfrei. Die 5-Jahres Überlebensrate beträgt dabei 95% bei G1 und 80% bei G2 Tumoren. Rezidive in der Harnblase treten in etwa 30% auf und sind nicht höher als bei der Nephroureterektomie (Martínez-Piñeiro et al. 1996; Mugiya et al. 2006).

Patienten mit G1 Tumoren im Nierenbecken entsprechen fast immer einem Ta oder T1 Stadium und sind bei geeigneter Selektion prinzipiell geeignet für eine organerhaltende Operation (Jarrett et al. 1995). Diese sollte auf kleine, solitäre Tumore im freien Nierenbecken und unauffälligem Harnleiter beschränkt bleiben. Karzinome des Nierenbeckens haben nach perkutaner Resektion eine Rezidivhäufigkeit von 5-33% und ein krebspezifisches Überleben von mehr als 90% (Jabbour, Smith 2000; Liatsikos et al. 2001). Bei endoskopischer Laserablation zeigen sich vergleichbare Ergebnisse und ein Organerhalt ist überwiegend möglich. Die Rezidivrate nach Nephroureterektomie ist mit 40% gegenüber der organ-erhaltenden Therapie mit 70% deutlich geringer. Ein organerhaltendes Vorgehen sollte deshalb nur bei lowgrade und low-stage-Tumoren durchgeführt werden. Organerhaltende Therapie bei G2 und G3 Tumoren des Nierenbeckens, oberen und mittleren Harnleiters sollte auf Patienten mit Einzelniere oder Niereninsuffizienz mit drohender Dialyse beschränkt bleiben (Elliott et al. 2001; Daneshmand et al. 2003; Dragicevic et al. 2007).

### **1.1.7.3 Chemo- und Immuntherapie**

Wegen der Rezidivhäufigkeit bis zu 50% nach organerhaltender Therapie von Urothelkarzinomen im oberen Harntrakt ist eine Rezidivprophylaxe analog der Behandlung oberflächlicher Blasentumore zu diskutieren. Die Therapieindikation sollte entsprechend der Indikation und risikoadaptiert wie beim Blasenkarzinom erfolgen. Als Medikamente werden

Mitomycin und Bacillus Calmette-Guérin (BCG) eingesetzt. Bei Einzelniere, drohender Dialyse oder Inoperabilität und Vorliegen eines Cis des oberen Harntrakts besteht eine Indikation zur topischen BCG-Therapie. Die Dosis beträgt bis zum 3-fachen der in der Blase eingesetzten Menge, die Kontaktzeit wird mit 30-120 Minuten angegeben. Die Applikation erfolgt über eine perkutane Nephrostomie oder liegendem Ureterkatheter. Beim Carcinoma-in-situ werden komplette Remissionen in bis zu 80% erreicht. Rezidive treten in bis zu 50% der Fälle auf. Limitierend sind die nicht unerheblichen, teilweise lebensbedrohlichen Nebenwirkungen (Thalmann et al. 2002; Kojima et al. 2006).

Mehr als 95% der Tumore im oberen Harntrakt sind Urothelkarzinome. Eine systemische Chemotherapie orientiert sich an der Indikationsstellung und Schemata die bei der Behandlung fortgeschrittener Blasentumore gewonnen wurden. Indikation zur systemischen Chemotherapie ist die Metastasierung in Lymphknoten oder das Bestehen von Fernmetastasen. Standardtherapie ist die Kombination aus Cisplatin und Gemcitabine. Auch bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumor oder lymphovaskulärer Tumordinvasion ist eine systemische Chemotherapie zu erwägen (Brown GA 2006; Oosterlinck et al. 2004; Hong et al. 2005).

### **1.1.8 Nachsorge**

Die empfohlenen Nachsorgemaßnahmen und Intervalle bei Patienten mit Nierenbecken- und Uretertumoren richten sich nach dem Tumorstadium und der Primärtherapie.

Nach Nephroureterektomie sollte eine Zystoskopie nach 3 und 12 Monaten und im weiteren Verlauf in den Jahren 2-5 nach Operation einmal pro Jahr durchgeführt werden. Bei Tumorstadien  $\geq T2$  wird in den ersten beiden Jahren alle 6 Monate und im 3.-5. Jahr jährlich ein CT-Abdomen/Becken und Röntgen-Thorax empfohlen. Bei Ta bis T1 Stadien nur bei entsprechender Symptomatik.

Nach organerhaltender Therapie wird die Zystoskopie mit Ureterorenoskopie des betroffenen Seite mit Entnahme einer Zytologie nach 3 und 12 Monaten, ab dem 2.-5. Jahr einmal pro Jahr empfohlen. Beim Carcinoma in situ sollten die Untersuchungen in den ersten beiden Jahren im Intervall von 3 Monaten, im 3.-5. Jahr alle 6 Monate und ab dem 6.Jahr jährlich erfolgen. Eine Ausscheidungsurographie sollte nach 1, 3 und 6 Monaten, im 2.-5. Jahr einmal pro Jahr durchgeführt werden. Röntgen-Thorax, CT-Abdomen und Knochenszintigramm sind nur bei Symptomatik nötig (Oosterlinck et al. 2004).

Übersicht der Nachsorgeempfehlungen bei Tumoren des oberen Harntraktes ist in folgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 4 Nachsorgeempfehlungen für Tumore im oberen Harntrakt (Oosterlinck et al. 2004)**

Zustand	Intervall	Diagnostik
Nach organerhaltender Therapie	Nach 1, 3, 6 Monaten dann 1.-5.Jahr 1x/Jahr	AUG, Urinzytologie
	Nach 3, 12 Monaten dann 2.-5.Jahr 1x/Jahr Cis: 1.-2.Jahr alle 3 Mo 3.-5.Jahr alle 6 Mo, ab 6.Jahr 1x/Jahr	Zystoskopie Ureterorenoskopie Urinzytologie
	Bei Symptomatik	Röntgen-Thorax CT-Abdomen/Becken Skelettszintigramm
Nach Nephroureterektomie	Nach 3, 12 Monaten dann 2.-5.Jahr 1x/Jahr	Zystoskopie
	Ta bis T1- Tumore: bei Symptomatik ≥T2-Tumore: 1.-2.Jahr alle 6 Monate 3.-5.Jahr 1x/Jahr	Röntgen-Thorax CT-Abdomen/Becken Skelettszintigramm

## **1.2 Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung (FISH)**

### **1.2.1 Anwendungsgebiete**

Als DNS-analytische Methode ist in der Zytologie die Zytometrie ein anerkanntes Ergänzungsverfahren. Sie liefert wertvolle Zusatzinformationen und ist besonders beim Harnblasenkarzinom von diagnostischer Bedeutung. Kleine DNS-Veränderungen jedoch können zytometrisch nicht nachgewiesen werden und messbare genetische Alterationen lassen sich keinem bestimmten Chromosom bzw. Gen zuordnen. Dies gelingt mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die Darstellung spezifischer DNS-Sequenzen in Einzelzellen.

Anders als in der Zytologie können Änderungen der Chromosomenzahl, chromosomale Teilverluste (Deletionen), Genamplifikationen und andere Aberrationen an zytologischen Präparaten weitgehend unabhängig von Fixations- oder Färbearbeit im Interphase-Zellkern identifiziert werden. FISH wird in der Diagnostik verschiedener Tumorarten eingesetzt. Zum Nachweis von HER2-Amplifikationen beim Mammakarzinom, NMYC-Amplifikationen bei Neuroblastomen und Nachweis einer 13q14-Deletion beim multiplen Myelom (Bubendorf 2002). Die Methode eignet sich besonders für die Analyse von soliden Tumoren die durch starke Polyploidie oder Polysomie mehrerer Chromosomen charakterisiert sind (Fadl-Elmula et al. 2001). Wenig aggressive, papilläre Urothelkarzinome mit geringen Atypien, die zytologisch nur schwer zu erfassen sind, können so aufgespürt werden. Ebenso eignet sich das Hybridisierungsverfahren für die Abgrenzung neoplastischer Zellveränderungen von reaktiven Veränderungen, die zum Beispiel bei Harnwegsinfekten, Blutungen oder nach Zytostase auftreten, sowie für eine sensitive Verlaufsbeobachtung (Griesser 2002).

### **1.2.2 Methodik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden DNS-Zielsequenzen mit spezifischen Proben markiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Grundsätzlich kommen zwei verschiedene Typen von FISH-Proben zum Einsatz: Proben für die Zentromerregion (mit repetitiven DNS-Sequenzen), die zur Zählung der Kopienzahl von Chromosomen verwendet werden und Proben für spezifische Genlokalisationen (Genloki), mit denen sich Verluste (Deletionen) und Zugewinne (Amplifikationen) bestimmter Chromosomen bzw. Chromosomenorte erfassen lassen (Bubendorf 2002). Verwendet werden bei der Diagnostik von Urothelkarzinomen Zellen in der Interphase aus Spontanurin, Katheterurin oder Blasenspülflüssigkeiten (Griesser 2002). Als Marker dienen fluoreszenzmarkierte Sonden für die Chromosome 3, 7, 17 und dem Genlocus 9p21 auf dem Gen p16. Initial werden die

zellulären Proteine durch Proteasen aufgespalten, damit die Hybridisierungssonden in die Zelle und den Zellkern eindringen können. Die Denaturierung zellulärer DNS durch Kombination von Hitze, Formamid und Säure führt zur Öffnung des DNS-Doppelstranges. Die fluoreszenzmarkierten Sequenzen der FISH Probe lagern sich im nächsten Schritt an die komplementäre Stelle der betreffenden Chromosome an. Überschüssige Probenanteile werden nach der Hybridisierung durch einen Waschschrift entfernt (Bubendorf 2002).

In der Regel können nach Hybridisierung mit den Sonden fluoreszenzmikroskopisch entsprechend dem doppelten Chromosomensatz normaler Zellkerne zwei Signale nachgewiesen werden. Verlust eines der beiden Chromosome führt zu Monosomie, bei erhöhter Chromosomenanzahl liegt eine Polysomie vor. Ebenso wie das Vorkommen von Zellen mit ungerader Zahl von Signalen (Aneuploidie) sind diese Veränderungen Malignitätskriterien. Polysomie ist bei Tumorzellen meist Ausdruck einer allgemeinen chromosomalen Instabilität. Verluste oder Zugewinne kurzer DNS-Sequenzen sprechen für eine veränderte Genfunktion: Deletionen weisen auf eine fehlende oder verminderte „Bremswirkung“ eines Tumorsuppressorgens hin, Zugewinne gehen mit einer erhöhten Genaktivierung einher. Dabei führen hochgradige Amplifikationen mit mindestens 3x mehr Gensignalen als Referenzsignalen meist zu einer deutlichen Aktivierung und Überexpression von Onkogenen (Griesser 2002; Bubendorf 2002).

Bei dem eingesetzten Testverfahren (UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit ,Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden ) liegt ein positives FISH-Resultat vor, wenn bei Durchmusterung von 25 atypischen Zellkernen bei 4 oder mehr Zellen eine Polysomie der Chromosomen (3,7,17) des Analysesets zeigen oder ein Verlust des Genlocus 9p21 Signals in mehr als 12 Zellen auftritt (Halling et al. 2000).

### **1.2.3 Bisherige Untersuchungen zur FISH bei Tumoren im Harntrakt**

Untersuchungen zur FISH bei Tumoren im Harntrakt beziehen sich hauptsächlich auf Urothelkarzinome der Harnblase. Die Sensitivität der FISH (81%) ist im Vergleich zur Zytologie (58%) deutlich höher bei vergleichbarer Spezifität (96%, 98%) (Halling et al. 2000).

In der Literaturrecherche finden sich zu Untersuchungen der FISH im oberen Harntrakt nur wenige Studien mit geringer Fallzahl. Die bisherigen Ergebnisse sind mit den Daten beim Harnblasenkarzinom vergleichbar. Die Sensitivität für FISH beträgt 76-85%, für die Zytologie 23-60%. Spezifitäten liegen für FISH bei 94-100% und bei der Zytologie 80-100% (Marín-Aguilera et al. 2006; Akkad et al. 2007; Luo et al. 2009).

Eine Übersicht dieser Arbeiten ist in folgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 5 Übersicht FISH Studien bei Tumoren im oberen Harntrakt**

Autor	Fallzahl	FISH Sensitivität	FISH Spezifität	Zytologie Sensitivität	Zytologie Spezifität
Marin-Aguilera et al. (2006)	59	76%	94%	30%	100%
Akkad et al. (2007)	16	87%	80%	60%	80%
Luo et al. (2009)	31	85%	100%	23%	100%

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Die Diagnosestellung und Nachsorge bei Tumoren des oberen Harntraktes beruht im wesentlichen auf den bildgebenden Verfahren (Ausscheidungsurographie (AUG), Computertomographie (CT) und retrograder Pyelographie (RUP)), der endoskopischen Diagnostik (Ureterorenoskopie (URS)) und der Urinzytologie. Die Tumordiagnose gelingt zu 66% mit der AUG und 80% mittels CT. Durch Kombination von RUP und URS lässt sich die Treffsicherheit auf bis zu 93% steigern (Maruschke M. 2005). Da mit der AUG und CT bis zu 34% der Tumoren im oberen Harntrakt nicht entdeckt werden, ist in der Regel eine weitere invasive Diagnostik durch Zystoskopie mit RUP und URS erforderlich. Dies ist für den Patienten belastend und mit Risiken (z.B. Infektionen, Blutung und Organperforationen) verbunden. Problematisch sind im Besonderen flache highgrade Läsionen und kleine Tumore, die leicht übersehen werden können. Die Urinzytologie stellt bis her analog zum Blasenkarzinom den Gold Standard der Urin gestützten Untersuchungsverfahren dar. Die zytologische Untersuchung sollte trotz höherer Invasivität durch Aufarbeitung von entnommener Spülflüssigkeit aus dem Nierenbecken und Harnleiter erfolgen, da dieses Vorgehen der Spontanurinzytologie signifikant überlegen ist. Ein großes Manko der Zytologie ist die geringe Aussagekraft bei gut differenzierten Tumoren. Nur 20-50% dieser Karzinome zeigen eine positive Urinzytologie. Die größte Aussagekraft hat die zytologische Untersuchung bei Grad-3 Tumoren (Chen GL 2000; Griesser 2002).

---

Ein viel versprechender Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik und Nachsorge scheint die FISH zu sein. In Untersuchungen am Urothelkarzinom der Harnblase zeigte sich eine Überlegenheit in Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität zur Urinzytologie (Halling et al. 2000). Auch im Vergleich zu den Urin-gebundenen Markersystemen beim Einsatz bei Blasenkarzinomen ist die FISH mit einer Sensitivität von 69% gegenüber BTA-Stat (67%) und NMP22 (72%) wegen deutlich besserer Spezifität von 89% zu 78% (BTA-Stat) und 66% (NMP22) überlegen (Friedrich et al. 2003).

Das Ziel dieser prospektiven Studie war es daher, den Vysis<sup>®</sup> Urovysion Test zur FISH gegenüber der Urinzytologie bei Tumoren im oberen Harntrakt bezüglich Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert zu vergleichen und zu klären ob die FISH für die Diagnostik und Tumornachsorge des Urothelkarzinoms im oberen Harntrakt geeignet ist.



---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Patienten

In der Zeit von Mai 2008 bis September 2009 wurden insgesamt 67 Patienten in die Studie eingeschlossen. 63 Patienten waren auswertbar, 4 Patienten wurden wegen nicht auswertbarer Zytologie (1 Patient) oder fehlgeschlagener Hybridisierung (3 Patienten) ausgeschlossen.

30 Patienten, die eine Abklärung des oberen Harntraktes wegen bestehender Mikrohämaturie (13 Patienten), Steinerkrankung (14 Patienten), Ureterabgangsenge und Ureterstenosen (jeweils 1 Patient) und einer Papillennekrose (1 Patient) erhielten, wurde durch Zystoskopie, Ausscheidungsurogramm und/oder retrograde Pyelographie und Ureterorenoskopie eine Neoplasie des Harntraktes ausgeschlossen. Diese Patienten dienten als Kontrollgruppe (siehe Tabelle 6, Patient 1-30). Die Altersverteilung in dieser Gruppe (18 Frauen und 12 Männer) lag zwischen 29 und 86 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 62,4 Jahre.

Bei 7 Patienten (3 Frauen, 4 Männer) im Mittel 68,3 Jahre alt (40-84 Jahre) mit endoskopisch auffälligem Befund (siehe Tabelle 7, Patient 31-37) zeigte sich bei der histologischen Begutachtung der Biopsien, die im Rahmen der URS gewonnen wurden, keine Neoplasie. Diese Patienten wurden im Rahmen der Auswertung ebenfalls der Kontrollgruppe zugeordnet.

Die Gruppe mit histologisch gesichertem Tumor im oberen Harntrakt (siehe Tabelle 8, Patient 38-63) bestand aus 26 Patienten (8 Frauen und 18 Männer) im Altersdurchschnitt von 73,8 Jahren mit einer Verteilung von 45-89 Jahren. Die histologische Klassifikation dieser Patienten erfolgte nach WHO 2004, 1973 und UICC-TNM 2002 an den Operationspräparaten nach erfolgter Nephroureterektomie.

Bei allen Patienten erfolgte zur zytologischen Beurteilung und FISH die Entnahme einer Urinspülzytologie über einen Ureterkatheter bzw. über das Ureterorenoskop im Rahmen der Diagnostik in der Kontrollgruppe und vor geplanter Operation bei gesichertem Tumor des oberen Harntraktes.

Tabelle 6: Patienten der Kontrollgruppe

Patient	Initialen	Geschl.	Alter	Diagnostik	Diagnose
1	T.S.	w	69	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie
2	B.C.	w	75	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie
3	K.R.	w	59	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
4	S-W.A.	w	62	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
5	O.A.	w	77	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
6	S.A.	w	67	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
7	R.U.	w	74	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
8	D.W.	m	65	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie
9	O.E.	w	56	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt
10	R.M.	w	38	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt
11	S.E-H.	m	78	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt
12	F.H-G	m	67	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt
13	M.F.	m	82	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt
14	S.P.	m	68	KU,U,UK,S,Z, AUG,URS	Nierenstein re
15	S.J.	w	68	KU,U,UK,S,Z, AUG,URS	Nierenstein re
16	G.K.	m	77	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Nierenstein re
17	R.M.	w	29	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Nierenstein re
18	D.M.	m	81	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Nierenstein re
19	M.A.	w	61	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Nierenstein re
20	G.S.	w	39	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Nierenstein re
21	A.C.	m	35	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Nierenstein li
22	M.L.	m	54	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Nierenstein li
23	D.W.	m	54	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Nierenstein li
24	L.S.	w	38	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Ureterstein re
25	K.D.	w	60	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Ureterstein li
26	P.G.	w	46	KU,U,UK,S,Z, AUG,RUP,URS	Ureterstein li
27	E.R.	w	73	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Ureterstein li
28	M.M-C.	w	59	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Ureterabgangsenge re
29	T.W.	m	76	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Harnleiterstenose bds.
30	S.R.	m	86	KU,U,UK,S,Z,RUP,URS	Papillennekrose re Nierenbecken

Legende: KU=körperliche Untersuchung, U=Urinstatus, UK=Urinkultur, S=Sonographie, Z=Zytologie, RUP=retrograde Pyelographie, AUG=Ausscheidungsurogramm, URS=Ureterorenoskopie

**Tabelle 7: Patienten mit endoskopisch auffälligem Befund und negativer Histologie**

Patient	Initialen	m/w	Alter	Histologie	Biopsieort
31	Z.M.	w	84	Pyelitis	Nierenbecken re
32	P.V.	w	76	Pyelitis	Nierenbecken re
33	M.G.	m	73	Ureteritis cystica	Ureter re
34	M.A.	w	40	Ureteritis cystica	Ureter re
35	C.R.	m	83	Ureteritis	Ureter re
36	P.G.	m	45	Pap. Hyperplasie	Ureter li
37	T.A.	m	77	Pap. Hyperplasie	Ureter li

**Tabelle 8: Patienten mit histologisch gesichertem Tumor im oberen Harntrakt**

Patient	Initialen	m/w	Alter	Histologie	Tumorlokalisation
38	I.O.	m	83	Papillom	Nierenbecken li
39	C.C.	m	83	Papillom	Nierenbecken li
40	F.E.	w	79	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken li
41	G.G.	m	67	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken li
42	B.H.	m	56	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken li
43	S.J.	m	77	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken li
44	O.L.	m	86	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken re
45	P.R.	m	82	pTaG1, lowgrade	Nierenbecken re
46	H.J.	w	79	pTaG1, lowgrade	Ureter li
47	K-T.G.	w	81	pTaG1, lowgrade	Ureter li
48	T.R.	m	72	pTaG1, lowgrade	Ureter re
49	N.F.	w	82	pTaG1, lowgrade	Ureter re
50	B.I.	m	58	pTaG1, lowgrade	Ureter re
51	S.R.	m	84	pTaG2, highgrade	Ureter re
52	J.R.	m	64	pTaG2, highgrade	Ureter re
53	C.S.	w	79	CIS	Ureter li
54	M.L.	m	64	pTaG3, highgrade u. CIS	Nierenbecken re
55	A.G.	m	72	pT1G2, highgrade	Nierenbecken li
56	R.G.	m	89	pT1G2, highgrade	Nierenbecken re
57	P.I.	w	72	pT1G2, high grade	Nierenbecken li
58	E.H.	w	73	pT1G2, highgrade	Ureter li
59	B.S.	m	82	pT1G3, highgrade	Nierenbecken re
60	P.A.	m	66	pT1G3, highgrade	Nierenbecken re
61	B.P.	m	82	pT1G3, highgrade u. CIS	Nierenbecken li
62	C.A.	m	79	pT2G3 u. CIS	Ureter re
63	D-M.R.	w	67	pT2G3 u. CIS	Ureter li

## 2.2 Studienablauf

Die Untersuchung wurde als bizenrische Studie der Urologischen Abteilung des Zentralkrankenhauses Bozen (Vorstand: Prof. Dr. A. Pycha) und der Urologischen Belegabteilung des Klinikums Traunstein (Ltd. Ärzte: Dr. L. Galamb, Dr. J. Schuhbeck und Prof. Dr. D. Zaak) durchgeführt.

Nach stationärer Aufnahme erfolgte die Anamnese, klinische Untersuchung, Sonographie des Harntraktes und Bewertung mitgebrachter Befunde und die allgemeine Operationsvorbereitung mit Aufklärung des Patienten. Im Rahmen dieses Gespräches wurden die Patienten über die Untersuchungen unterrichtet und gaben hierzu ihr Einverständnis.

Die Dokumentation der Studienpatienten erfolgte an Hand von folgendem Auswertebogen.

<b>Auswertebogen FISH Studie</b>			
Name:	Vorname:	Geb.:	
Geschlecht: m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>	Alter:	Jahre	InterneNr:
<b>Risikofaktoren:</b>			
Berufliche Exposition mit Noxen: Unbekannt: <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> wenn Ja, welche:			
Rauchen:	Unbekannt: <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Wenn Ja, Menge	Zigg/Tag	Dauer: Jahre
Familiäre Belastung:	Unbekannt: <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> , wenn Ja, welche:		
Andere:			
<b>Anamnese und Befund:</b>			
Urolithiasis:	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> wenn Ja, wann:	Therapie:	
Mikrohämaturie:	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/>	Makrohämaturie:	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/>
Harnwegsinfekt:	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/>		
Sonstiges:			
	k.B.e.*	o.p.B**	Pathologischer Befund
<b>Klinische Untersuchung</b>			
Abdomen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Äußeres Genitale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
DRU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>Urinbefund</b>			
Urinstatus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Urinkultur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>Bildgebung</b>			
Sono Nieren u. Blase	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AUG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RUP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
CT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>Endoskopie</b>			
Zysto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

URS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
*k.B.e = kein Befund erhoben		**o.p.B. = ohne pathologischem Befund	
<b>Sonstige:</b>			
<b>Therapie:</b>			
Operationen:	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	wenn Ja, welche:      wann:
Tumor:	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	wenn Ja, wann:      Histo:
Instillationstherapie:	Frühinstillation: Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	Medikament: Mito <input type="checkbox"/>
	Erhaltungstherapie: Nein <input type="checkbox"/>		
Ja <input type="checkbox"/>	Dauer: Mo	Medikament: Mito <input type="checkbox"/>	BCG <input type="checkbox"/>
	Andere:		
Harnableitung:	DK: Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	wenn Ja, Liegezeit:      Tage
DJ:	Nein <input type="checkbox"/>	Ja <input type="checkbox"/>	wenn Ja, Liegezeit:      Tage
<b>Spülzytologie:</b>	Auswertbar: Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Material aus:	Blase <input type="checkbox"/>	Ureter re <input type="checkbox"/>	li <input type="checkbox"/>
		Nierenbecken re <input type="checkbox"/>	li <input type="checkbox"/>
Befund:	Normalbefund <input type="checkbox"/>	suspekt <input type="checkbox"/>	Atypien <input type="checkbox"/>
	Tumorzellen <input type="checkbox"/>	low grade <input type="checkbox"/>	high grade <input type="checkbox"/>
Gutachten:			
<b>FISH:</b>	Auswertbar: Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Material aus:	Blase <input type="checkbox"/>	Ureter re <input type="checkbox"/>	li <input type="checkbox"/>
		Nierenbecken re <input type="checkbox"/>	li <input type="checkbox"/>
	FISH negativ <input type="checkbox"/>	FISH positiv <input type="checkbox"/>	
Gutachten:			

**Abbildung 1: Auswertebogen FISH Studie**

Zur Entnahme der Spülzytologie wurde nach Applikation von 10-20 ml physiologischer Kochsalzlösung über einen eingelegten Ureterkatheter oder über das URS die abtropfende Spülflüssigkeit in mit Ethanol absolut (als Stabilisator) gefüllte Probengefäße aufgefangen und am gleichen Tag zur zytologischen Begutachtung und Durchführung der FISH versandt.

Die Begutachtung des Untersuchungsmaterials der Traunsteiner Gruppe erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke) und für die Bozener Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie des Zentralkrankenhauses Bozen (Vorstand: Dr. G. Mazzoleni). Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen wurde die Aufarbeitung der Urinproben und FISH in Aachen und Bozen nach gleichen Kriterien (wie in Kap. 2.3-2.5 näher beschrieben) durchgeführt. Die Befundung der Zytologie und FISH erfolgte ausschließlich durch Fr. Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke für die Traunsteiner und Fr. Dr. C. Mian für die Bozener Präparate

Routineuntersuchungen des Urins (Urinstatus und Urinmikrobiologie) der Patienten erfolgte im jeweiligen Labor der Kliniken Traunstein und Bozen.

Mit den Ergebnissen der Urinzytologie, FISH sowie der Histologie wurde die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert ermittelt.

## 2.3 Untersuchungsmaterial und Zytospinpräparation

Zur Aufarbeitung wurde die bereits am Gewinnungsort in absolutem Alkohol stabilisierten und kühl gehaltenen Proben (Spülzytologie aus dem oberen Harntrakt, in der Regel 20 ml pro Patient) zunächst in konische Zentrifugenröhrchen (Falconröhrchen) gefüllt und in einer Tischzentrifuge (Hettich) 10 Minuten lang bei 1500U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde aus dem aufgeschüttelten Sediment in der Zytozentrifuge (Shandon) bei 700U/min für 10 Minuten Zytospins angefertigt und anschließend luftgetrocknet. Um zu gewährleisten, dass für die spätere zytologische Begutachtung und Auflichtfluoreszenzmikroskopie eine repräsentative Anzahl an einschichtig liegenden Zellkernen zur Bewertung vorhanden war, erfolgte vor Beginn der Färbung nach Papanicolaou und Sondenmarkierung eine lichtmikroskopische Beurteilung der Qualität der Zytospinpräparate. Voraussetzung für die folgende zytologische Beurteilung und Fluoreszenzhybridisierung waren das Vorhandensein von genügend Zellen (im Durchschnitt 100 Zellen im Blickfeld), möglichst frei von Verunreinigung (Bakterien, Zelldetritus o. ä.) und nicht in Clustern (Zellhaufen) vorliegend, um eine ausreichende Denaturierung der zellulären DNS und konsekutive Sondenmarkierung zu erreichen.

Die so erstellten Zytospinpräparate wurden für die Zytologie wie im Kap. 2.4 und FISH im Kap. 2.5 beschrieben weiterverarbeitet

## 2.4 Urinzytologie

### 2.4.1 Anfertigung der Präparate

Zur zytologischen Beurteilung wurden die angefertigten Zytospins (siehe Kap. 2.3) nach Papanicolaou gefärbt.

Bei der Papanicolaou-Färbung erfolgt zunächst eine Feuchtfixierung. Dafür werden die Präparate für mindestens 20 Minuten in eine Küvette mit 96% Alkohol gestellt. Anschließend erfolgt die Hydrierung durch eine fallende Alkoholreihe mit Spülung in Aqua dest. und Färbung über 5 Minuten in der Papanicolaous-Lösung 1b. Die Präparate werden danach mit Aqua dest. gespült und zum Differenzieren kurz in 0,5 % HCl-Alkohol getaucht und nach erneuter Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe in der Papanicolaous Lösung 2a blau eingefärbt und danach mit 96% Alkohol abgespült. Es folgt die letzte Färbung in der Papanicolaous Lösung 3b. Danach werden die Präparate wieder mit Alkohol gespült und

schließlich in einem 1:1-Gemisch von Alkohol-Xylol eingestellt. Zuletzt folgt das Einstellen in das Einbettmedium Xylol für mindestens 10 Minuten mit anschließender Trocknung.

Der genaue Ablauf der Färbung ist in folgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 9: Durchführung der Färbung nach Papanicolaou**

Alkohol 96%	20-30 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Alkohol 70%	0,5 Minuten
Alkohol 50%	0,5 Minuten
Aqua destilliert	0,5 Minuten
Papanicolaous Lösung 1b	5 Minuten
Leitungswasser	0,5 Minuten
HCl-Alkohol 0,5%	3x kurz eintauchen
Unter fließendem Leitungswasser	5-10 Minuten bläuen
Alkohol 50%	0,5 Minuten
Alkohol 70%	0,5 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Papanicolaous Lösung 2a	2,5 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Papanicolaous Lösung 3b	2,5 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Alkohol 96%	0,5 Minuten
Alkohol absolut	0,5 Minuten
Absoluter Alkohol: Xylol 1:1	3-5 Minuten
Xylol	10 Minuten

## 2.4.2 Beurteilung der Präparate

In der Papanicolaou-Färbung nimmt das Zytoplasma der Übergangsepithelzellen eine blaugraue bis rosa Farbe an. Die Zellkerne färben sich schwarzbraun, graublau bis violett, die Kernkörperchen rötlich. Erythrozyten erscheinen leuchtend rot bis grün, je nach Dichte. Das Zellplasma der Leukozyten wird blassrosa.

Die Zytologischen Befunde wurden in 3 Klassifikationen (negativ, suspekt und positiv) eingeteilt.

Ein negatives Ergebnis lag vor bei Erfüllung folgender Kriterien:

- Unveränderte Urothelien
- oder reaktive Veränderungen (z. B. viele Deckzellen mit vergrößerten und teils multiplen und größenvariablen runden Zellkernen bei unveränderter Kern-Plasma-Relation. Das Zytoplasma ist meist aufgelockert und zeigt oft eine perinukleäre, fein vakuolisierte Zone)
- Fehlen von Merkmalen die unter suspekt oder positiv aufgeführt sind

Als suspekt wurde beurteilt wenn folgende Kriterien vorlagen:

- Suspekt auf eine urotheliale Neoplasie, reicht aber für eine sichere Diagnose nicht aus (exzentrische Lage der Zellkerne, hohe Kern-Plasma-Relation, dunkel angefarbtes und unregelmäßig verteiltes Kernchromatin, diskrete Unregelmäßigkeiten und Verbreiterung der Kernmembran)

Ein positiver Befund lag vor bei folgenden Merkmalen:

- Unmittelbar erkennbare ausgeprägte Kernotypen in Form von vergrößerten Kernen, Polymorphie, Hyperchromasie, unregelmäßig verteiltem Chromatin und unregelmäßiger Kernkontur. Hohe Kern-Plasma-Relation
- Vorliegen von Tumorzellen, z.B. high grade Neoplasie

## **2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

### **2.5.1 Geräte und Reagenzien**

#### **2.5.1.1 Geräte**

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden zusätzlich zur üblichen Laborausstattung folgende Geräte eingesetzt:

Auflicht-/ Fluoreszenzmikroskop Axiovert S135 der Firma Zeiss mit folgenden Filtersets

- 4er Schieber 1:  
Position 1: DAPI  
Position 2: DAPI, Spec Green, Spec Red



Position 3: Spec Green, Spec orange

Position 4: Spec Aqua, Spec Green, Spec Red

- 3er Schieber 1:

Position 2: Spec Gold Position 3: Spec Aqua

- 3er Schieber 2:

Position 1: Spec Red, Texas Red Position 2: Spec Green, FITC

Programmierbarer Heizblock mit integrierter Feuchtigkeitskammer (HYBrite™, Vysis Inc., Downers Grove, USA) zur Denaturierung und Hybridisierung.

### 2.5.1.2 Lösungen und Reagenzien

Reagenzien des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit, Firma Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden:

- DAPI II-Gegenfärbemittel (4,6-Diamidino-2-Penylindol) in 1,4-Phenylendiamin, Glycerin und Puffer im Lieferumfang von 1000 µl zum Gegenfärben der hybridisierten Präparate
- Nonidet P-40 (NP-40)
- UroVysion™ Sonden-Mischung bestehend aus Fluorophor-markierten zentromer-spezifischen Chromosomensonden (Chromosome Enumeration probe, CEP®) CEP 3 SpectrumRed™, CEP 7 SpectrumGreen™, CEP 17 SpectrumAqua™ und der Lokus-spezifischen Sonde (Locus Specific Identifier, LSI®) 9p21 SpectrumGold™ im Puffer aus Dextransulfat, Formamid und SSC im Lieferumfang von 300 µl für den Nachweis und die Quantifizierung der Chromosomen 3, 7, 17 und dem Lokus 9p21
- 20 x SSC- Salz (66g), zusammengesetzt aus 43,9 g Natriumchlorid und 22,1 g Natriumzitat, zum Erstellen von bis zu 250 ml 20 x SSC-Lösung durch Auffüllen mit Aqua dest
- FISH Reagenzien-Kit:  
Protease (Pepsin) 250mg  
Proteaspuffer (phosphate buffered saline; PBS) 2 x 250 ml

Unter Raumtemperatur (RT) hergestellte Lösungen:

- 2xSSC Lösung:  
10ml 20xSSC mit 90ml Aqua. dest. steril mischen, pH-Wert mit 1N NaOH auf pH 7,0 einstellen, im Wasserbad auf 73°C erwärmen ( nach einmaligem Gebrauch verwerfen)
- 20xSSC-Lösung:  
132 g 20 x SSC-Salz (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) werden zum Erstellen einer 20 x SSC-Lösung in 400 ml Aqua. dest. steril gelöst und auf pH 5,3 titriert (RT 6 Monate haltbar)
- 2xSSC / 0,1% NP-40 Lösung:  
100ml 20xSSC mit 850 ml Aqua dest mischen, 1ml NP40 zugeben, den pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,0-7,5 einstellen, mit Aqua dest auf 1l auffüllen (RT 6 Monate haltbar)
- 0,4xSSC / 0,3% NP-40 Lösung:  
20 ml 20 x SSC-Lösung mit 850ml Aqua dest mischen, 3 ml NP-40 dazugeben, pH mit 1N NaOH 7-7,5 einstellen und mit Aqua dest auf 1l auffüllen (RT 6 Monate haltbar)
- 25mg Protease Lösung:  
Protease 250mg in 10 ml Aqua dest lösen und zu Portionen von 1ml einfrieren und vor Gebrauch bei RT auftauen (bei -20°C 1 Monat haltbar), 1ml kurz vor Gebrauch zu Proteasepuffer (50ml 2xSSC) geben
- 1% Formaldehydlösung:  
12,5 ml der 10%igen neutral-gepufferten Formalinlösung mit 37ml PBS mischen, 0,5 ml 2M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  zugeben, gut mischen ( nach Gebrauch verwerfen)
- Ethanol 85%:  
85ml Ethanol absolut mit Aqua dest auf 100ml auffüllen
- Ethanol 70%:  
70ml Ethanol absolut mit Aqua dest auf 100ml auffüllen

Daneben wurden Ethanol absolut (Brüggemann Alcohol GmbH & CO KG, Heilbronn) und Xylol (CSC Jäklechemie GmbH & Co. KG, Nürnberg) zum Fixieren und Waschen der Präparate verwendet. Konzentrierte Natronlauge (NaOH) und konzentrierte Salzsäurelösung (HCl) zur pH Einstellung stammten von Merck Chemie GmbH Darmstadt.

### **2.5.2 Vorbereitung der Zytospinpräparate zur Hybridisierung**

Vor der Sondenanwendung mit dem UroVysion™-Kit wurden alle Präparate nach dem Schema des Herstellers vorbehandelt und fixiert. Zuerst wurden die trockenen Präparate 2 Minuten lang in 2 x SSC im Wasserbad auf 73°C erwärmt und 2 Minuten künstlich gealtert. Anschließend erfolgte die Proteinaufschlüsselung der Zytospins für 10 Minuten bei 37°C in der Proteaselösung. Die Proteaselösung war zuvor durch Zugabe von 25 mg Pepsin zu 50 ml 2xSSC erzeugt worden. Nach erfolgter Proteolyse wurden die Präparate zuerst in 1%igem Formaldehyd 5 Minuten fixiert, anschließend in PBS weitere 5 Minuten gewaschen, nachfolgend durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert ( 1 Minute in 70-, 85- und 100%igem Ethanol) und erneut bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

### **2.5.3 Hybridisierung**

Die Hybridisierung erfolgte mit der Sondenmischung des UroVysion™ (Firma Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) bestehend aus Fluorophor-markierten zentromer-spezifischen Chromosomensonden (Chromosome Enumerationprobe, CEP®) CEP3 SpectrumRed™, CEP7 SpectrumGreen™, CEP17 SpectrumAqua™ und der Lokus-spezifischen Sonde (Locus Specific Identifier, LSI®) LSIp16 für den Genlokus 9p21 SpectrumGold™ nach den Herstellervorgaben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit wurden die folgenden Arbeitsschritte bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in Dunkelheit durchgeführt. Die Sondenmischung wurde nach dem Auftauen bei Raumtemperatur durchmischt und 3µl davon auf den Zytospin pipettiert und mit einem Deckglas versehen, welches mit Fixogum versiegelt wurde. Nach Einlage der versiegelten Präparate in den Heizblock des ThermoBrite der Firma Abbott erfolgte zunächst die Denaturierung bei 72°C für 5 Minuten und anschließende Hybridisierung bei 39°C über Nacht unter Lichtabschluss in einem automatisiertem Vorgang.

### **2.5.4 Waschvorgänge und Färbung nach erfolgter Hybridisierung**

Nach Abschluss des Hybridisierungsvorganges erfolgte die Entfernung des Fixogum mit einer Pinzette und Abnahme der Deckgläser. Die Zytospins wurden dann in der 0,4xSSC/0,3NP40-Waschlösung auf 73°C im Wasserbad erwärmt, für 2 Minuten gewaschen und anschließend in der 2xSSC/0,1NP40-Waschlösung bei Raumtemperatur für 1 Minute unter leichtem Schwenken erneut gewaschen, schräg gestellt und im Dunklen bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Abschluss wurden 10 µl DAPI II- Gegenfärbemittel auf den Zytospin pipettiert, mit einem Deckglas versehen und mit Nagellack am Rand versiegelt.

### **2.5.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung**

Die Fluoreszenzfilter wurden entsprechend den Vorgaben in der Anleitung vom Hersteller des UroVysion™ Bladder Cancer Recurrence Kit eingesetzt. Zunächst wurde bei 200facher Vergrößerung im DAPI-Fluoreszenzfilter für die Analyse geeignete Areale detektiert. Die tatsächliche Auswertung der Präparate erfolgte bei 630facher Vergrößerung in jedem einzelnen der vier Fluoreszenzfilter. Insgesamt wurden pro Präparat 25 morphologisch auffällige Zellkerne analysiert und die Ergebnisse notiert.

### **2.5.6 DAPI-Fluoreszenzfilter**

Die Darstellung der Zellkerne im DAPI-Filter erlaubt Aussagen über die Zellkernmorphologie. Auffällig sind dabei unregelmäßig begrenzte oder vergrößerte Zellkerne, die von der normal glatt konturierten, regelmäßigen Kernform abweichen. Die DAPI-Sättigung normaler Zellkerne zeigt eine gleichmäßige helle, bläuliche Fluoreszenz, entsprechend einer ausgeglichenen Chromatinverteilung. Bei Störungen in der Chromatinstruktur können sich löchrige Bereiche (verminderte Fluoreszenz) bilden, die einem „wolkigem“ Gesamtbild innerhalb des Zellkerns entsprechen oder lokal verdichtete, „schollige“ Areale (verstärkte Fluoreszenz), welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für abnorme Kernveränderungen sprechen. Daneben können unterschiedlich zahlreiche unauffällige Zellkerne im gleichen Präparat auftreten.

### **2.5.7 Rot-Grün-, Aqua-, Gold-Fluoreszenzfilter**

Veränderungen in der Anzahl einzelner Chromosomen werden im Rot-Grün- (Chromosom 3 rot und 7 grün), Aqua- (Chromosom 17 blau) und Gold-Fluoreszenzfilter (Genlocus 9p21 gelb) durch in der jeweiligen farblich leuchtenden Fluoreszenz sichtbar. Anders als die morphologische Darstellung der Chromatinstruktur im DAPI-Filter erlauben diese Filter Einblicke in die chromosomale Zusammensetzung. Die einzelnen Chromosomen bzw. der Genlocus 9p21 stellen sich dabei als fluoreszierende Punkte innerhalb des Zellkerns dar.

### 2.5.8 Interpretation der Ergebnisse der Fluoreszenzsignale

Zur Beurteilung der Chromosomenzahl der einzelnen Zellkerne wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Axiovert S135 der Firma Zeiss unter Verwendung der Filtersets DAPI, Rot/Grün, Aqua und Gold durchmustert.

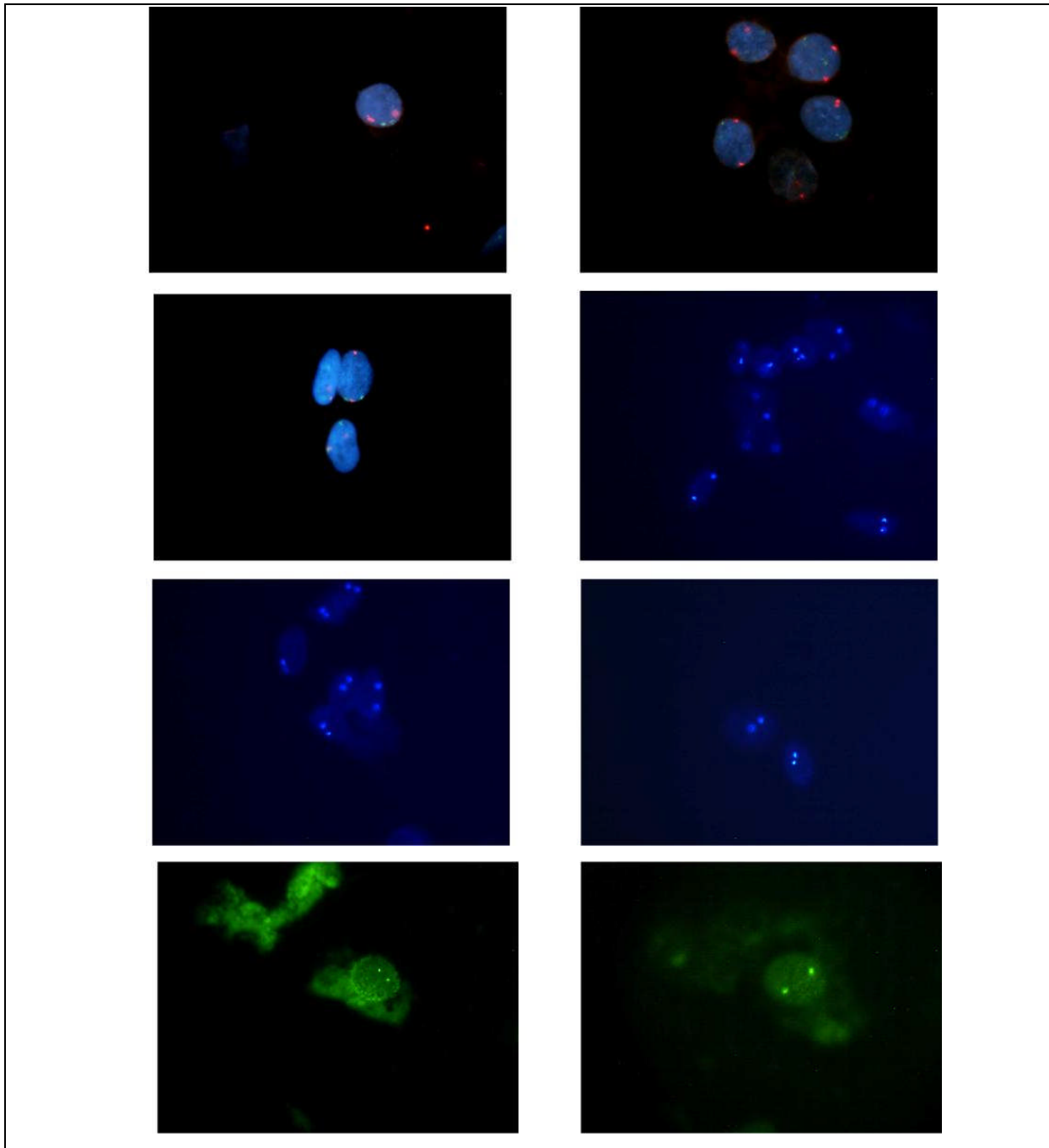
In normalen Zellkernen erscheinen durch das Vorliegen des diploiden Chromosomensatzes für jede Sonde jeweils 2 Signale in der jeweiligen Farbe. Die Anzahl der jeweiligen Sonden-signale entspricht dabei der Kopienzahl der Chromosome 3,7,17 und des p16 Gens. In die Bewertung gingen Zellkerne ein, die eine Abweichung von diesem Normalsatz aufwiesen. Beim Nachweis der Chromosomen 3 (rotes), 7 (grünes Signal) im Rot/Grün Filter und 17 (blaue Fluoreszenz) im Aqua Filter bedeutete dies eine Zunahme der Chromosomenzahl auf 3 oder mehr Signale, wobei jedes einzelne Sonden-signal gezählt und zum entsprechenden Zellkern notiert wurde. Im Gold-Filter war ein Fehlen eines oder beider gelben Sonden-signale Beweis für eine Deletion des markierten Genlokus 9p21 auf dem p16 Gen..

Die abschließende Beurteilung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers (UroVysion™ Firma Abbott). Der FISH-Test wurde als positiv bewertet, wenn von 25 ausgezählten Zellkernen vier oder mehr eine Zunahme der Signale der Chromosomen 3, 7 oder 17 zeigen. Hierbei ist es unerheblich, ob sich innerhalb einer und/oder mehrerer Chromosomenreihen Zugewinne darstellen oder ob die gesamte Zelle polyploid ist. Ein Präparat gilt im Gesamten ebenso als positiv, wenn 12 oder mehr Zellkerne ein oder kein Signal für 9p21 zeigen.

Exemplarisch für die Patientenauswertung des FISH-Testes sind in den folgenden Tabellen und korrespondierenden Abbildungen die Befunde des Patienten 16 (Kontrollgruppe, FISH negativ) und des Patienten 56 (Nierenbeckenkarzinom, pT1G2, FISH positiv) dargestellt.

**Tabelle 10: Auswertung FISH Patient 16, Fett = Zellen mit Chromosomenaberrationen**

Filter Sonden Zellen	rot Cep3 Signale	grün Cep7 Signale	blau Cep17 Signale	gold LSIp16 Signale
1	2	2	2	2
2	2	2	2	2
3	2	2	2	2
<b>4</b>	2	2	2	<b>1</b>
5	2	2	2	2
6	2	2	2	2
7	2	2	2	2
8	2	2	2	2
9	2	2	2	2
<b>10</b>	2	2	2	<b>1</b>
11	2	2	2	2
12	2	2	2	2
13	2	2	2	2
14	2	2	2	2
15	2	2	2	2
<b>16</b>	<b>3</b>	2	2	2
17	2	2	2	2
18	2	2	2	2
19	2	2	2	2
20	2	2	2	2
<b>21</b>	2	2	2	<b>1</b>
22	2	2	2	2
23	2	2	2	2
24	2	2	2	2
25	2	2	2	2

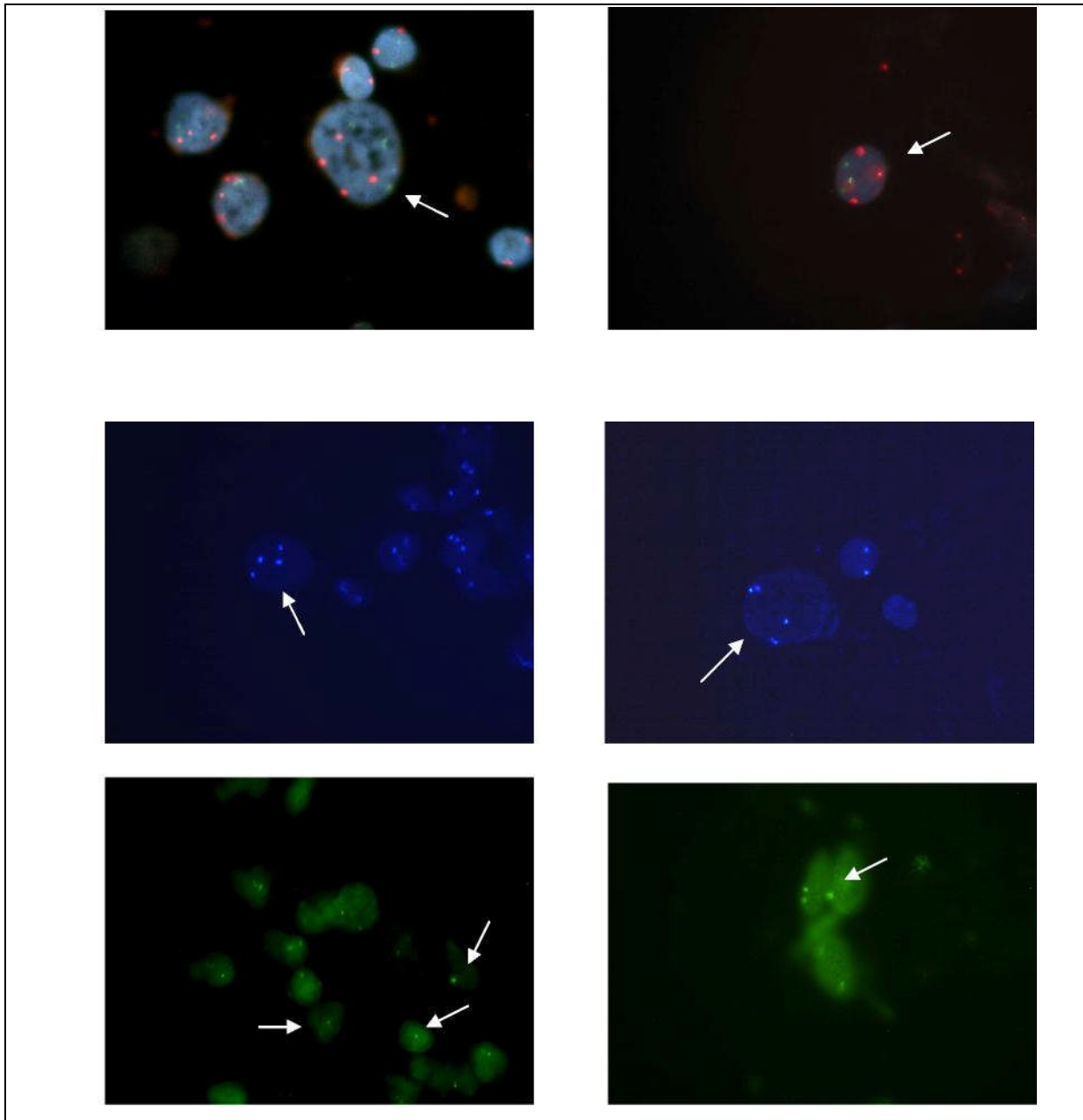


**Abbildung 2: Patient 16: FISH negativ: Euploider Chromosomensatz mit je 2 roten (Cep3) für Chromosom 3 und 2 (schwach sichtbaren) grünen Signalen (Cep7) für Chromosom 7 (Bild 1-3 Rot-Grün-Filter). 2 blaue Signale (Cep17) pro Zellkern für Chromosom 17 (Bild 4-6 Aqua-Filter). 2 gelbe Sondensignale (LSIp16) pro Zellkern für Genlocus 9p21 (Bild 7-8 Gold-Filter).**

Tabelle 11: FISH Patient 56, , Fett = Zellen mit Chromosomenaberrationen

Filter Sonden Zellen	rot Cep3 Signale	grün Cep7 Signale	blau Cep17 Signale	gold LSIp16 Signale
1	2	2	2	2
<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
3	2	2	2	2
4	2	2	2	2
<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
7	2	2	2	2
<b>8</b>	2	2	2	<b>1</b>
<b>9</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
10	2	2	2	<b>1</b>
<b>11</b>	2	2	2	<b>1</b>
<b>12</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>13</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
14	2	2	2	2
15	2	2	2	2
<b>16</b>	2	2	2	<b>1</b>
<b>17</b>	2	2	2	<b>1</b>
<b>18</b>	2	2	2	<b>1</b>
19	2	2	2	2
<b>20</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
21	2	2	2	2
22	2	2	2	2
<b>23</b>	2	2	2	<b>1</b>
<b>24</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
25	2	2	2	2





**Abbildung 3: Patient 56: FISH positiv: Polyploide Zellkerne mit 4 roten (Cep3) und 3 grünen Sonden-signalen (Cep7) im Rot-Grün- Filter. 4 blauen Sonden-signalen (Cep 17) im Aqua- Filter. Aneuploide Zell-kerne mit je 1 gelben Sonden-signal (LSIp16) pro Zellkern für Genlokus 9p21 im Gold-Filter**

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Ermittlung der Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert für die Zytologie und der FISH erfolgte durch den Chi-Quadrat-Test. Aus den Daten der Vierfeldertafeln wurden diese statistischen Parameter nach folgenden Formeln berechnet:

	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	A	B
Test negativ	C	D

$$\text{Sensitivität} = \frac{A}{A + C}$$

Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Erkrankter ein positives Testergebnis bekommt.

$$\text{Spezifität} = \frac{D}{B + D}$$

Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Gesunder ein negatives Testergebnis bekommt.

$$\text{PPW} = \frac{A}{A + B}$$

Der positive prädiktive Wert (PPW) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein erhaltenes positives Ergebnis „richtig“ ist.

$$\text{NPW} = \frac{D}{C + D}$$

Der negative prädiktive Wert (NPW) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein erhaltenes negatives Ergebnis „richtig“ ist.

Die Datenaufarbeitung und -analyse erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2007.

Die Textverarbeitung dieser Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2007 durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

67 Patienten wurden in der Studie untersucht. 63 Patienten waren auswertbar. 4 Patienten wurden wegen nicht auswertbarer Zytologie oder fehlgeschlagener FISH ausgeschlossen. Bei 26 Patienten (Lfd.Nr.38-63) lag histologisch ein Tumor des oberen Harntraktes vor. 2 mal wurde ein Papillom diagnostiziert. 21 Patienten hatten bei Diagnosestellung ein oberflächliches, nicht invasives (14 Ta-, 7 T1-Tumore), 2 Patienten ein invasives (T2) Urothelkarzinom. Ein Patient hatte ein alleiniges Carcinoma in situ (Tis), bei 2 Patienten fand sich begleitend zu einem Ta bzw. T1 Tumor ein Tis. Die Zytologiebefunde und FISH Ergebnisse mit Aufschlüsselung der Chromosomenaberrationen in Bezug auf Tumorausdehnung und Grading sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 12: Übersicht der Zytologie- und FISH Auswertung der Tumorpatienten. X=Polysomie am Chromosom 3,7,17 bzw. Aneuploidie am Locus 9p21**

Patient Lfd.Nr.	Histologie		Chromosom			Locus	Befund		
	T-Stadium	Grading	3	7	17	9p21	FISH	Zytologie	
38	Papillom	G0	-	-	-	X	positiv	positiv	
39	Papillom	G0	-	-	-	X	positiv	<b>negativ</b>	
40	Ta	G1	LGPUC	X	X	-	X	positiv	suspekt
41	Ta	G1	LGPUC	X	-	-	-	positiv	suspekt
42	Ta	G1	LGPUC	X	-	-	X	positiv	suspekt
43	Ta	G1	LGPUC	X	X	-	-	positiv	<b>negativ</b>
44	Ta	G1	LGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
45	Ta	G1	LGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
46	Ta	G1	LGPUC	-	-	-	-	<b>negativ</b>	suspekt
47	Ta	G1	LGPUC	X	-	-	X	positiv	<b>negativ</b>
48	Ta	G1	LGPUC	-	-	-	-	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
49	Ta	G1	LGPUC	X	-	-	X	positiv	suspekt
50	Ta	G1	LGPUC	-	-	-	-	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
51	Ta	G2	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
52	Ta	G2	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
53	Tis	G3	HGPUC	X	X	X	X	positiv	positiv
54	Ta	G3	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
	Tis	G3	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
55	T1	G2	HGPUC	X	X	X	X	positiv	positiv
56	T1	G2	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
57	T1	G2	HGPUC	-	-	-	-	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
58	T1	G2	HGPUC	X	-	-	-	positiv	suspekt
59	T1	G3	HGPUC	X	X	X	-	positiv	suspekt
60	T1	G3	HGPUC	X	X	-	-	positiv	<b>negativ</b>
61	T1	G3	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
	Tis	G3	HGPUC	X	X	X	X	positiv	suspekt
62	T2	G3	-	X	X	X	X	positiv	suspekt
63	T2	G3	-	X	X	-	X	positiv	<b>negativ</b>

37 Patienten dienten als Kontrollgruppe und sind in Tabelle 13 zusammenfassend dargestellt. Bei 30 Patienten (Lfd.Nr.1-30) konnte durch Bildgebung und Endoskopie ein Tumor im oberen Harntrakt ausgeschlossen werden. Bei 7 Patienten (Lfd.Nr.31-37) wurde ein Malignom bei suspektem Endoskopiebefund durch Biopsie histologisch ausgeschlossen.

**Tabelle 13: Übersicht der Zytologie- und FISH Auswertung der Kontrollgruppe. X=Polysomie am Chromosom 3,7,17 bzw. Aneuploidie am Locus 9p21**

Patient Lfd.Nr.	Diagnose	Chromosom			Locus 9p21	Befund	
		3	7	17		FISH	Zytologie
1	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
2	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
3	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
4	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
5	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
6	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
7	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
8	Mikrohämaturie	-	-	-	-	negativ	negativ
9	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	negativ
10	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
11	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	negativ
12	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
13	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	negativ
14	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	negativ
15	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	negativ
16	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	negativ
17	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	negativ
18	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
19	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	negativ
20	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
21	Nierenstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
22	Nierenstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
23	Nierenstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
24	Ureterstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
25	Ureterstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
26	Ureterstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
27	Ureterstein li	-	-	-	-	negativ	negativ
28	Ureterabgangsenge re	-	-	-	-	negativ	negativ
29	Harnleiterstenose bds.	-	-	-	-	negativ	negativ
30	Papillennekrose re Nierenbecken	-	-	-	-	negativ	negativ
31	Pyelitis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	<b>suspekt</b>
32	Pyelitis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	negativ
33	Ureteritis cystica	X	-	-	-	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
34	Ureteritis cystica	-	-	-	-	negativ	negativ
35	Ureteritis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	<b>suspekt</b>
36	Pap. Hyperplasie	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
37	Pap. Hyperplasie	-	-	-	-	negativ	negativ

Zur Ermittlung der Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Voraussagewerte wurden die suspekten Zytologiebefunde der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe als positiv gewertet.

### **3.1 Sensitivitäten und PPW der Testverfahren**

Von den 28 histologisch gesicherten Urothelkarzinomen im oberen Harntrakt wurden 24 durch die FISH richtig erkannt (FISH positiv), 4 Patienten zeigten ein falsch negatives Ergebnis (FISH negativ). Bei den nicht erkannten Tumoren handelte es sich um 3 Patienten mit einem pTaG1 (LGPUC) und einen Patienten mit pT1G2 (HGPUC) Tumor. In der Zytologie wurden 3 richtig positiv, 17 suspekt und 8 als falsch negativ beurteilt. Die nicht erkannten Tumore waren 1 Patient mit Papillom, 4 Patienten mit pTaG1 (LGPUC), je 1 Patient mit pT1G2, pT1G3 (HGPUC) und 1 Patient mit pT2G3 Karzinom (siehe Tabelle 12).

Daraus errechnet sich unter Berücksichtigung aller Tumorstadien und Differenzierungsgrade eine Sensitivität von 85,7% für die FISH versus 71,4% für die Zytologie.

Der positive prädiktive Wert (PPW) beträgt für die FISH 96,0% gegenüber 69,0% für die Zytologie.

#### **3.1.1 Aufschlüsselung der Sensitivität nach T-Stadium und Grading**

Betrachtet man die Sensitivität der FISH und Zytologie in Abhängigkeit zur Tumorausdehnung und dem Differenzierungsgrad (siehe Tabelle 14), so zeigt sich bei den oberflächlichen, nicht invasiven Tumoren in Bezug auf das Grading eine Sensitivität von 72,7% bei den lowgrade Tumoren (LGPUC) und 90,0% für die highgrade Tumoren (HGPUC) bei der FISH und respektive 63,3% und 80,0% für die Zytologie. Bei muskelinvasivem Wachstum erhöht sich die Sensitivität der FISH auf 100% gegenüber 50% der Zytologie. Beim Carcinoma in situ zeigen beide Testverfahren eine Sensitivität von 100%.

**Tabelle 14: Sensitivität in Abhängigkeit von Tumorstadium und Grading**

Nicht invasive Tumore Ta/T1								
Grading		FISH			Zytologie			
	Zahl	positiv	negativ	Sensitivität	positiv	negativ	suspekt	Sensitivität
LGPUC	11	8	3	72,7%	0	4	7	63,6%
HGPUC	10	9	1	90,0%	1	2	7	80,0%
LG+HG	21	17	4	81,0%	1	6	14	71,4%
Invasive Tumore T2								
Grading		FISH			Zytologie			
	Zahl	positiv	negativ	Sensitivität	positiv	negativ	suspekt	Sensitivität
G3	2	2	0	100,0%	0	1	1	50,0%
Carcinoma in situ Tis								
Grading		FISH			Zytologie			
	Zahl	positiv	negativ	Sensitivität	positiv	negativ	suspekt	Sensitivität
G3	3	3	0	100,0%	1	0	2	100,0%

### 3.1.2 Verteilung der Chromosomenaberrationen in der FISH

Die Zahl der Chromosomenaberrationen bei unseren Daten zeigt eine Korrelation mit der Tumorausdehnung und der Differenzierung. Während beim Papillom nur eine Deletion am Genlocus 9p21 vorliegt, findet sich beim Carcinoma in situ (Tis) eine Polysomie der Chromosomen 3,7,17 und eine Aneuploidie bei 9p21 in allen Fällen. Über alle Tumorstadien betrachtet zeigt sich in 42,8% eine Polysomie aller Chromosomen 3,7,17 in Kombination mit einer Aneuploidie am locus 9p21. Betrachtet man nur die oberflächlichen Tumore (Ta,T1), so findet sich die häufigste Aberration am Chromosom 3 (78,6% der Ta- und 85,7% der T1-Tumore), gefolgt von Polysomie am Chromosom 7 (50% und 71,4%), Chromosom 17 (35,7% und 57,1%) und Aneuploidie am Locus 9p21 (64,3% und 42,9%). Trennt man diese Tumore nach dem Grading, so findet sich eine Verteilung von Chromosomenveränderungen für LGPUC von 72,7%, 36,4%, 18,2%, 54,5% und HGPUC in 90%, 80%, 70%, 60% am Chromosom 3,7,17 und 9p21. Bei den muskelinvasiven Tumoren (T2) finden sich Polysomien der Chromosomen 3,7 und Aneuploidie am 9p21 zu 100% und in 50% am Chromosom 17.

**Tabelle 15: Chromosomenaberration in Bezug auf T-Stadium und Grading**

Histologie	Chromosomenaberration					Chromosomenaberration in %			
	Zahl	3	7	17	9p21	3	7	17	9p21
Papillom	2	0	0	0	2	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
Tis	3	3	3	3	3	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Ta	14	11	7	5	9	78,6%	50,0%	35,7%	64,3%
T1	7	6	5	4	3	85,7%	71,4%	57,1%	42,9%
T2	2	2	2	1	2	100,0%	100,0%	50,0%	100,0%
Summe	28	22	17	13	19	78,6%	60,7%	46,4%	67,9%
Ta+T1	21	17	12	9	12	81,0%	57,1%	42,9%	57,1%
LGPUC	11	8	4	2	6	72,7%	36,4%	18,2%	54,5%
HGPUC	10	9	8	7	6	90,0%	80,0%	70,0%	60,0%

### 3.1.3 FISH Ergebnisse bei Tumorpatienten mit suspekter Zytologie

Bei 15 Patienten (Lfd-Nr. 40-62) mit histologisch gesichertem Urothelkarzinom im oberen Harntrakt wurde zytologisch der Befund als suspekt eingestuft. Betrachtet man diese Subgruppe mit der korrespondierenden FISH Analyse (siehe Tabelle 16), so wurden bei 14 Patienten (93,3%) die Tumore durch die FISH richtig erkannt. Nur bei einem Patienten (Lfd-Nr. 46) mit einem oberflächlichem Karzinom (pTa,G1 LGPUC) zeigte sich ein falsch negatives Analyseergebnis.

**Tabelle 16: Gegenüberstellung FISH Ergebnisse und suspekter Zytologie**

Patient Lfd.Nr.	Histologie			Befund	
	T-Stadium	Grading		FISH	Zytologie
40	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
41	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
42	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
44	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
45	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
46	Ta	G1	LGPUC	<b>negativ</b>	suspekt
49	Ta	G1	LGPUC	positiv	suspekt
51	Ta	G2	HGPUC	positiv	suspekt
52	Ta	G2	HGPUC	positiv	suspekt
54	Ta	G3	HGPUC	positiv	suspekt
	Tis	G3	HGPUC	positiv	suspekt
56	T1	G2	HGPUC	positiv	suspekt
58	T1	G2	HGPUC	positiv	suspekt
59	T1	G3	HGPUC	positiv	suspekt
61	T1	G3	HGPUC	positiv	suspekt
	Tis	G3	HGPUC	positiv	suspekt
62	T2	G3	-	positiv	suspekt

## 3.2 Spezifitäten und NPW der Testverfahren

Die Ermittlung der Spezifitäten (siehe Tabelle 17) erfolgte an Hand der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 13), bestehend aus 37 Patienten, bei denen ein Tumor des oberen Harntraktes ausgeschlossen wurde.

In der FISH fand sich in 33 Fällen ein richtig negatives Ergebnis und in 4 Fällen ein falsch positives Testresultat. Daraus errechnet sich eine Spezifität von 89,2%.

Die zytologische Beurteilung ergab in 28 Fällen ein richtig negatives, bei einem ein falsch positives und bei 8 Patienten einen suspekten Befund, was einer Spezifität von 75,7% entspricht.

**Tabelle 17: Spezifitäten der Testverfahren**

Kontrollgruppe							
Patienten	FISH			Zytologie			
Zahl	positiv	negativ	Spezifität	positiv	negativ	suspekt	Spezifität
37	4	33	89,2%	1	28	8	75,7%

Der negative Voraussagewert (NPW) für FISH beträgt 89,2% versus 77,8% für die Zytologie.

### 3.2.1 Falsch positive Befunde in der Kontrollgruppe

Die falsch positiven Befunde der FISH Analyse bei 4 von 37 Patienten fanden sich ausschließlich bei entzündlichen Prozessen im oberen Harntrakt mit makroskopisch auffälliger Schleimhaut. In der histologischen Aufarbeitung ergab sich 2 mal eine Pyelitis und jeweils 1 mal eine Ureteritis und Ureteritis cystica. Die Chromosomenaberrationen fanden sich auf den Chromosomen 3 und 7, so wie am Genlocus 9p21 bei den Patienten mit Pyelitis und Ureteritis, so wie eine alleinige Polysomie am Chromosom 3 bei dem Patienten mit Ureteritis cystica.

In der zytologischen Beurteilung zeigte sich 8 mal ein suspekter (2 Patienten mit Harnwegsinfekt und Mikrohämaturie, 3 mit Urolithiasis, jeweils 1 Patient mit Ureteritis und papillärer Hyperplasie) und bei einem Patienten (Ureteritis cystica) ein falsch positiver Befund.



**Tabelle 18: Falsch positive Befunde in der Kontrollgruppe**

Patient	Diagnose	Chromosom			Locus	Befund	
Lfd.Nr.		3	7	17	9p21	FISH	Zytologie
10	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
12	Mikrohämaturie, Harnwegsinfekt	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
18	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
20	Nierenstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
24	Ureterstein re	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>
31	Pyelitis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	<b>suspekt</b>
32	Pyelitis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	negativ
33	Ureteritis cystica	X	-	-	-	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
35	Ureteritis	X	X	-	X	<b>positiv</b>	<b>suspekt</b>
36	Pap. Hyperplasie	-	-	-	-	negativ	<b>suspekt</b>

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse (siehe Tabelle 18) scheint das Vorhandensein einer Mikrohämaturie und Urolithiasis das Ergebnis der FISH im Gegensatz zur Zytologie nicht zu beeinflussen, während entzündliche Schleimhautläsionen bei beiden Testverfahren eine störende Einflussgröße darstellen können.

---

## 4 Diskussion

---

Etwa 5-6% der urothelialen Tumore der Harnwege treten im oberen Harntrakt auf. 25% sind primär in den Ureteren, 75 % im Nierenbecken zu finden. 95% der bösartigen Tumoren sind Übergangszellkarzinome und entsprechen in ihrem Aufbau den Tumoren die in der Harnblase anzutreffen sind (Oosterlinck et al. 2004; Krogh et al. 1991; Das et al. 1990). Im Vergleich zum Blasenkarzinom zeigen Tumore im oberen Harntrakt bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium (33% pT2-4) und ein höheres Grading (35% G3 Stadium) (Stewart et al. 2005).

Die Diagnosestellung und Nachsorge bei Tumoren des oberen Harntraktes beruht im wesentlichen auf den bildgebenden Verfahren (Ausscheidungsurographie (AUG), Computertomographie (CT) und retrograder Pyelographie (RUP)), der endoskopischen Diagnostik (Ureterorenoskopie (URS)) und der Urinzytologie (Oosterlinck et al. 2004). Die Tumordiagnose gelingt zu 66% mit der AUG und 80% mittels CT. Durch Kombination mit RUP und URS lässt sich die Treffsicherheit auf bis zu 93% steigern (Maruschke M. 2005). Da mit der AUG und CT bis zu 34% der Tumoren im oberen Harntrakt nicht entdeckt werden, ist in der Regel eine weitere invasive Diagnostik durch Zystoskopie mit RUP und URS erforderlich. Dies ist für den Patienten belastend und mit Risiken (z.B. Infektionen, Blutung und Organperforationen) verbunden. Problematisch sind im Besonderen flache highgrade Läsionen und kleine Tumore die leicht übersehen werden können.

Den derzeitigen Gold-Standard der Urin-gestützten Diagnostik und Verlaufskontrolle bei Tumoren des oberen Harntraktes stellt die Zytologie dar. Ein großes Manko ist ihre geringe Aussagekraft bei gut differenzierten Tumoren. Nur 20-40% der Grad-1 und ca. 55% der Grad-2 Karzinome zeigen eine positive Urinzytologie. Die größte Aussagekraft hat die zytologische Untersuchung bei Grad-3 Tumoren. Des weiteren beeinträchtigen Irritationen des Urothels, wie sie bei chronischen Entzündungen, Urolithiasis oder durch Manipulation im Harntrakt auftreten den Befund (Shinka et al. 1988; Chen GL 2000; Griesser 2002). Dies stellt gerade bei der Interpretation von Spülzytologien aus dem oberen Harntrakt ein Problem dar und führt, auch in den Händen von sehr erfahrenen Zytopathologen, häufig zur Klassifikation "suspekt" (Tumorzellen sind zwar nicht sichtbar, eine Neoplasie ist aber nicht sicher auszuschließen). Ein suspekter Befund ist für den Kliniker jedoch ein unbefriedigendes Ergebnis, da trotz Fehlen eindeutiger Malignitätskriterien ein Tumor nicht ausgeschlossen ist.

Wünschenswert wären daher Markersysteme im Urin, die Untersucher unabhängig sind und gerade im Bereich der gut differenzierten Tumore eine bessere Sensitivität als die Urinzytologie bei gleich hoher Spezifität hätten.

Ein viel versprechender Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik und Nachsorge scheint die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu sein. Da es sich bei der FISH um eine Untersuchung an Zellkernen handelt, wird dieses Verfahren nicht beeinflusst durch Veränderungen auf zellulärer Ebene, wie sie bei Entzündungen oder Manipulationen im Harntrakt entstehen. Des Weiteren ist die FISH im Gegensatz zur Zytologie weitaus weniger durch eine subjektive Bewertung des Untersuchers beeinflusst (Halling et al 2000)

In der Übersichtsarbeit von Halling et al 2007, in der die bis dato 12 größten Studien zum Einsatz der FISH bei Urothelkarzinomen der Harnblase ausgewertet wurden, zeigte sich eine Überlegenheit in der Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität zur Urinzytologie. Im Einzelnen lagen die Sensitivitäten bei 67, 97, 90 und 92% für die FISH versus 28, 73, 67 und 74% bei der Zytologie für die entsprechenden Ta-, Tis-, T1 und T2-4 Tumorstadien. Die Spezifität betrug für die FISH 85% und 93% für die Zytologie. Auch im Vergleich zu anderen uringebundenen Markersystemen beim Einsatz bei Blasenkarzinomen ist die FISH mit einer Sensitivität von 69% gegenüber BTA-Stat (67%) und NMP22 (72%) wegen deutlich besserer Spezifität von 89% zu 78% (BTA-Stat) und 66% (NMP22) überlegen (Friedrich et al. 2003).

Auf Grund der viel versprechenden Daten zur FISH beim Urothelkarzinom der Harnblase, war das Ziel unserer prospektiven Studie, den Vysis<sup>®</sup> Urovysion Test zur FISH gegen die Urinzytologie bei Tumoren im oberen Harntrakt bezüglich Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert zu validieren und zu klären, ob die FISH ein geeignetes Instrument für die Diagnostik und Nachsorge dieser Tumorentität darstellt.

Zu Untersuchungen der FISH im oberen Harntrakt (siehe Tabelle 19) gibt es derzeit nur 3 Studien. Die bisherigen Ergebnisse sind mit den Daten beim Harnblasenkarzinom vergleichbar und zeigen auch hier eine Überlegenheit der FISH in Sensitivität und Spezifität im Vergleich zur Urinzytologie. Die Sensitivität für FISH bei diesen Studien beträgt 76-85%, für die Zytologie 23-60%. Spezifitäten liegen für FISH bei 94-100% und bei der Zytologie 80-100% (Marín-Aguilera et al. 2006; Akkad et al. 2007; Luo et al. 2009).

Mit 67 Patienten ist unsere Arbeit bis dato weltweit die Größte zu diesem Thema. Vergleichbare Zahlen (53 Patienten) bietet nur die Studie von Marin-Aguilera 2006, während

Akkad 2007 und Luo 2009 nur Fallzahlen von 15 und 31 aufweisen. Ein weiterer Unterschied der vorgelegten Daten im Vergleich zu oben genannten Studien besteht in der Verteilung der Tumorstadien und der Zusammensetzung der Kontrollgruppe. Bei Aguilera finden sich in 58% fortgeschrittene Karzinome ( $\geq T2$ ), während in der vorgelegten Untersuchung mit 92% oberflächliche Tumore (Ta/T1) zu finden sind. Die Kontrollgruppe bei den Studien von Aguilera und Luo bestand ausschließlich aus gesunden Probanden, während wir Patienten, die eine urologische Abklärung oder Therapie wegen nicht tumorröser Erkrankungen des oberen Harntraktes erhielten als Kontrolle verwendeten. Dies wurde bewusst so gewählt um diese Einflussgrößen bezüglich Sensitivität und Spezifität auf die Zytologie und FISH mit zu werten.

**Tabelle 19: Gegenüberstellung der eigenen Daten mit bisherigen Studien zur FISH im oberen Harntrakt**

Studie	Fallzahl	Tumorstadium		Kontrolle	Sensitivität in %		Spezifität in %	
		Tis/Ta /T1	$\geq T2$		Zytologie	FISH	Zytologie	FISH
Aguilera et al 2006	53	11	15	19	36	76,7	100	94,7
Akkad et al 2007	15	4	5	6	60	87,5	80	80
Luo et al 2009	31	5	16	10	23,8	85,1	100	100
Eigene Daten	67	23	2	37	71,4	85,7	75,7	89,2

Unter Berücksichtigung aller Tumorstadien und Differenzierungsgrade ergibt sich für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus unseren Daten eine Sensitivität von 85,7% und Spezifität von 89,2%.

Die Sensitivität der FISH in unserer Studie ist damit vergleichbar mit Untersuchungen für das Harnblasenkarzinom von Halling et al. 2000 an Kollektiven mit hoher Fallzahl (Sensitivität für FISH von 81%, Spezifität 96%) und mit den Arbeiten über Tumore im oberen Harntrakt von Akkad et al. 2007 und Luo et al. 2009, die über eine Sensitivität für FISH von 87,5 und 85,1% berichten. Die mit 76,7% niedrigere Sensitivität, trotz des deutlich höheren Anteils an fortgeschrittenen Tumoren im Kollektiv bei Marín-Aguilera et al. 2006, ist durch Unterschiede in der Fixation der Urinproben und Durchführung der FISH erklärbar. In unserer Arbeit erfolgte die Fixation mit Ethanol und die Lyse der Zellen vor geplanter Hybridisierung mit Pepsin, welches in eigenen Testreihen eine bessere Hybridisierung zeigte, als die bei Aguilera eingesetzten Substanzen Carbovax / Carnoy-Lösung zur Fixation und Protease zur Aufspaltung der Zellmembranen. Die höhere Spezifität von 94,7 (Marín-Aguilera et al 2006) und 100% (Luo et al 2009) ist dadurch bedingt, dass sich in deren Kontrollgruppen ausschließlich gesunde Probanden befanden.

Für die Zytologie errechnet sich eine Sensitivität von 71,4% und Spezifität von 75,7% im Vergleich zu Sensitivitäten von 30, 60 und 23% und Spezifitäten von 100, 80 und 100% bei den vergleichbaren Studien (Marín-Aguilera et al. 2006), (Akkad et al. 2007) und (Luo et al. 2009). Ein Grund für die Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität der Zytologie besteht vermutlich darin, dass die Beurteilung stark von der Expertise des Pathologen abhängt und die Untersuchung von Spülzytologien aus dem oberen Harntrakt durch die Manipulation mit dem Ureterkatheter oder URS, Blutbeimengungen oder entzündlichen Veränderungen deutlich erschwert wird. (Chen GL 2000). Wie bereits durch Halling et al. 2000 beschrieben bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen weiteren Vorteil der FISH. Denn anders als bei der Zytologie stellen artifizielle Veränderungen der Zellen durch die Gewinnung, Entzündungen und Erythrozyturie keine nennenswerte Beeinträchtigung in der FISH Analyse dar.

Der positive prädiktive Wert (PPW) laut unserer Daten beträgt für die FISH 96,0% gegenüber 69,0% für die Zytologie. Der negative Voraussagewert (NPW) für FISH beträgt 89,2% versus 77,8% für die Zytologie. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Marín-Aguilera et al. 2006 die über einen PPW für FISH von 95,8% versus 72% für die Zytologie berichten. Da bei einem positiven FISH Ergebnis in bis zu 96% der Fälle ein Tumor im oberen Harntrakt vorliegt ist diese Untersuchung eine wesentliche Hilfestellung in der Planung weiterer Schritte bei der Diagnostik und Nachsorge dieser Tumorentität. Im Umkehrschluss ist mit einem negativem FISH Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Tumor vorhanden. Dies ist im Besonderen hilfreich bei zweifelhaften Befunden in der Bildgebung oder nicht repräsentativer Histologie.

Betrachtet man die Sensitivität der FISH und Zytologie in Abhängigkeit zur Tumorausdehnung und dem Differenzierungsgrad so zeigt sich bei den 21 oberflächlichen, nicht invasiven Tumoren (Ta, T1) in Bezug auf das Grading eine Sensitivität von 72,7% bei den lowgrade Tumoren (LGPUC) und 90,0% für die highgrade Tumore (HGPUC) bei der FISH und respektive 63,3% und 80,0% für die Zytologie. Bei muskelinvasivem Wachstum erhöht sich die Sensitivität der FISH auf 100% gegenüber 50% bei der Zytologie. Wo bei anzumerken ist, dass wegen der geringen Fallzahl (2 Patienten mit T2-Tumor) dieser Aspekt mit Vorsicht zu bewerten ist. Beim Carcinoma in situ zeigen beide Testverfahren eine Sensitivität von 100%. Vergleicht man die Zahlen mit der bis her größten vergleichbaren Studie (25 Patienten mit Urothelkarzinom im oberen Harntrakt) von Marín-Aguilera et al. 2006 auf gesplittet nach Ausdehnung und Grading (10 Patienten mit Ta,T1 lowgrade Tumoren und 15 muskelinvasiven ( $\geq$  T2) Tumoren) so finden sich dort Sensitivitäten von 50,

respektive 86,4% für die FISH versus 20 zu 63,6% für die Zytologie, so lässt sich daraus, unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse ableiten, dass die FISH bei den oberflächlichen lowgrade Tumoren mit einer Sensitivität von 50-72,7% der Zytologie mit 20-63% überlegen ist, aber in 28-50% diese nicht erkannt werden. Bei den muskelinvasiven Tumoren lässt sich jedoch eine Sensitivität von 86,4-100% bei der FISH im Vergleich zur Zytologie mit 50-63% erreichen.

Von unseren 28 histologisch gesicherten Urothelkarzinomen im oberen Harntrakt wurden 86% durch die FISH richtig erkannt, 14% zeigten ein falsch negatives Ergebnis. Bei den nicht erkannten Tumoren handelte es sich um 3 Patienten mit einem pTaG1 (lowgrade) und einen Patienten mit pT1G2 (highgrade) Tumor. Mögliche Ursache für das nicht detektieren der oberflächlichen, gut differenzierten Tumore, sind zu geringe chromosomale Veränderungen, die in der Hybridisierung nicht in genügender Anzahl nachweisbar sind. Ein Absenken des cut off Wertes chromosomaler Veränderungen in der Auswertung würde zwar die Sensitivität in diesem Bereich erhöhen, aber auch vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen führen. Weitere Erklärungen für die falsch negativen FISH Ergebnisse sind eine kleine Tumorlast und zu geringe Exfoliation von Tumorzellen in den oberen Harntrakt. Auch eine Fehlinterpretation der Hybridisierung durch Überlagerung einzelner Fluoreszenzsignale, was zum Vortäuschen einer Euploidie trotz bestehender Polysomie führen kann, wäre denkbar.

In der Zytologie wurden nur 11% der Fälle eindeutig als Karzinom eingestuft, 60% als suspekt und 29% als falsch negativ beurteilt. Diese Daten bestätigen die bereits beschriebenen Schwierigkeiten in der Beurteilung und Schwächen von Zytologien aus dem oberen Harntrakt. Die nicht erkannten Tumore waren 1 Patient mit Papillom, 4 Patienten mit pTaG1 (lowgrade). Dies belegt die geringe Aussagekraft der Urinzytologie bei diesen Tumorstadien. Auch bei den highgrade und fortgeschrittenen Karzinomen, die ja die Domäne der zytologischen Diagnostik darstellen, wurde je 1 Patient mit pT1G2 und pT1G3 (highgrade) sowie 1 Patient mit pT2G3 Karzinom durch die Zytologie nicht detektiert.

Die FISH des Kontrollkollektivs ergab in 89% ein richtig negatives Ergebnis und in 11% ein falsch positives Testresultat. Die falsch positiven Befunde der FISH Analyse bei 4 von 37 Patienten fanden sich ausschließlich bei entzündlichen Prozessen im oberen Harntrakt mit makroskopisch auffälliger Schleimhaut. In der histologischen Aufarbeitung ergab sich 2 mal eine Pyelitis und jeweils 1 mal eine Ureteritis und Ureteritis cystica. Die Chromosomenaberrationen fanden sich auf den Chromosomen 3 und 7, so wie am Genlocus 9p21 bei den Patienten mit Pyelitis und Ureteritis, so wie eine alleinige Polysomie am Chromosom 3 bei

dem Patienten mit Ureteritis cystica. Die Tatsache, dass bei einer positiven FISH mit Anomalien an 2 oder mehr Chromosomen ein Risiko von ca. 65% besteht, im weiteren Verlauf (6-15 Monate) ein Karzinom zu entwickeln (Luo et al. 2009), ist erst im weiteren Follow up mit Rebiopsie zu entscheiden, ob wirklich falsch positive Ergebnisse der FISH vorliegen oder der Tumor bis her nur nicht detektierbar war. Bei den übrigen 33 Patienten der Kontrollgruppe zeigte sich ein richtig negatives FISH Resultat trotz bestehender Harnwegsinfektion (5 Patienten), Mikrohämaturie (13 Patienten) oder Urolithiasis (14 Patienten). Dies belegt, dass das Hybridisierungsverfahren im Gegensatz zur Zytologie durch solche Bedingungen weit weniger störanfällig ist

Die zytologische Beurteilung ergab in 76% ein richtig negatives, in 3% ein falsch positives und bei 21% der Kontrollgruppe einen suspekten Befund. Es ist anzumerken, dass in fast einem Viertel der tumornegativen Patienten eine abklärungsbedürftige Zytologie (suspekt oder positiv) vorlag, was im klinischen Alltag für den betreffenden Patienten eine invasive Diagnostik zum Tumorausschluss zur Folge hat.

Untersuchungen der FISH am Harnblasenkarzinom zeigten einen Zusammenhang zwischen Polysomie der Chromosomen 3,7,17 und Aneuploidie am locus 9p21 und dem Tumorstadium. Dabei fanden sich vermehrt alleinige Deletionen an 9p21 bei hoch differenzierten, oberflächlichen Tumoren und zunehmende Polysomien am Chromosom 3 und 7 bei fortgeschrittenen und highgrade Tumoren. Aberrationen an einzelnen Chromosomen traten selten auf (Halling, Kipp 2007). Die Daten der vorgelegten Studie zeigen eine vergleichbare Korrelation mit der Tumorausdehnung und der Differenzierung. Während beim Papillom nur eine Deletion am Genlocus 9p21 vorlag, fand sich beim Carcinoma in situ (Tis) eine Polysomie der Chromosomen 3,7,17 und eine Aneuploidie bei 9p21 in allen Fällen. Über alle Tumorstadien betrachtet zeigte sich in 42,8% eine Polysomie aller Chromosomen 3,7,17 in Kombination mit einer Aneuploidie am locus 9p21. Betrachtet man nur die oberflächlichen Tumore (Ta,T1), so fand sich die häufigste Aberration am Chromosom 3 (78,6% der Ta- und 85,7% der T1-Tumore), gefolgt von Polysomie am Chromosom 7 (50% und 71,4%), Chromosom 17 (35,7% und 57,1%) und Aneuploidie am Locus 9p21 (64,3% und 42,9%). Trennt man diese Tumore nach dem Grading, so zeigte sich eine Verteilung von Chromosomenveränderungen für LGPUC von 72,7%, 36,4%, 18,2%, 54,5% und HGPUC in 90%, 80%, 70%, 60% am Chromosom 3,7,17 und 9p21. Bei den muskelinvasiven Tumoren (T2) fanden sich Polysomien der Chromosomen 3,7 und Aneuploidie am 9p21 zu 100% und in 50% am Chromosom 17. Die Daten zeigen, dass die Anzahl und Verteilung der Chromosomenaberrationen einen Hinweis auf die Aggressivität des Karzinoms zulassen.

Eine besondere Betrachtung verdienen die Patienten mit suspektem Zytologiebefund. Bei 17 Patienten in unserer Studie mit histologisch gesichertem Urothelkarzinom im oberen Harntrakt wurde zytologisch der Befund als suspekt eingestuft. Betrachtet man diese Subgruppe mit der korrespondierenden FISH Analyse, so wurden bei 14 Patienten (82,4%) die Tumore durch die FISH richtig erkannt. Vergleichbare Resultate mit 70% richtig positiver FISH bei suspekter Zytologie finden sich auch in der Arbeit von Marín-Aguilera et al. 2006. In der Kontrollgruppe fand sich bei 8 Patienten ein suspekter Zytologiebefund. 75% (6 von 8) dieser Patienten waren richtig FISH negativ. Nach diesen Daten ist die FISH Analyse ein wichtiges Instrument zur Einordnung eines suspekten Zytologiebefundes in Bezug auf das Vorliegen eines Tumors.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die FISH der Zytologie in Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW überlegen ist. Dennoch birgt auch die Hybridisierung Schwächen bei den nicht invasiven, lowgrade Tumoren. Sie ist zwar auch in diesem Feld der Zytologie in Spezifität und Sensitivität um ca. 10% überlegen, dennoch werden auch in der FISH bis zu 28% dieser Tumore nicht erkannt und kann somit die Bildgebung in Kombination mit invasiven Techniken (RUP und URS), die einen Tumor in bis zu 93% der Fälle detektieren (Chen GL 2000), nicht ersetzen. Besonders hilfreich scheint die FISH in der Einordnung suspekter und negativer Zytologiebefunde bei Tumorverdacht und der Nachsorge zu sein, was für eine weitere Diagnostik und Therapie von entscheidender Bedeutung ist. Hier sehen wir derzeit die Hauptindikation für die FISH in Ergänzung zur Zytologie. Nicht zuletzt wegen der hohen Kosten (350€ pro Untersuchung) der FISH im Vergleich zur Urinzytologie (25€) sollte dieser Test unserer Einschätzung nach derzeit nur ergänzend und nicht als Ersatz zur Zytologie eingesetzt werden. Wegen der bis her dünnen Datenlage sind weitere, prospektive Studien mit größeren Fallzahlen zur Untermauerung der vorliegenden Ergebnisse dringend erforderlich.



---

## 5 Zusammenfassung

---

Nur etwa 5% der urothelialen Karzinome finden sich im oberen Harntrakt. Diese stellen jedoch in Diagnostik und Nachsorge für den Urologen eine besondere Herausforderung dar. Diagnosestellung und Nachsorge dieser Tumore beruhen im wesentlichen auf den bildgebenden Verfahren (Ausscheidungsurographie (AUG), Computertomographie (CT) und retrograder Pyelographie (RUP)), der endoskopischen Diagnostik (Ureterorenoskopie (URS)) und der Urinzytologie. Die Tumordiagnose gelingt zu 66% mit der AUG und 80% mittels CT. Durch Kombination mit RUP und URS lässt sich die Treffsicherheit auf bis zu 93% steigern. Da mit der AUG und CT bis zu 34% der Tumoren im oberen Harntrakt nicht entdeckt werden, ist in der Regel eine weitere invasive Diagnostik durch Zystoskopie mit RUP und URS erforderlich. Dies ist für den Patienten belastend und mit Risiken (z.B. Infektionen, Blutung und Organperforationen) verbunden. Die Urinzytologie stellt bis her analog zum Harnblasenkarzinom den Gold Standard der Urin-gestützten Untersuchungsverfahren dar. Ein großes Manko der Zytologie ist die geringe Aussagekraft bei gut differenzierten Tumoren. Nur 20-50% dieser Karzinome zeigen eine positive Urinzytologie. Die größte Aussagekraft hat die zytologische Untersuchung bei Grad-3 Tumoren. Des Weiteren ist die Zytologie keine objektiv zu bewertende Methode, da sie stark von der Beurteilung und Erfahrung der Zytopathologen abhängig ist. Wünschenswert wären da her Urin-gestützte Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität um die invasive Diagnostik zu ersetzen.

Ein viel versprechender Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik und Nachsorge scheint die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu sein. In Untersuchungen am Urothelkarzinom der Harnblase zeigte sich eine Überlegenheit in Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität zur Urinzytologie. Auch im Vergleich zu den Urin gebundenen Markersystemen beim Einsatz bei Blasenkarzinomen ist die FISH gegenüber BTA-Stat und NMP22 wegen deutlich besserer Spezifität bei vergleichbarer Sensitivität überlegen.

Das Ziel dieser Studie war es, den Vysis® Urovysion Test zur FISH gegenüber dem Goldstandard, der Urinzytologie bei Tumoren im oberen Harntrakt bezüglich Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem Vorhersagewert zu validieren.

Insgesamt 67 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, davon waren 63 Patienten auswertbar. 28 Patienten wiesen histologisch einen Tumor im oberen Harntrakt auf. 37 Patienten, bei denen wegen Mikrohämaturie, Urolithiasis oder anderer pathologischer

Veränderungen des oberen Harntraktes eine Abklärung durch bildgebende Verfahren und Endoskopie erfolgte und ein Tumor ausgeschlossen wurde, dienten als Kontrollgruppe.

Bei allen Patienten erfolgte zur zytologischen Beurteilung und FISH die Entnahme einer Urinspülzytologie über einen Ureterkatheter bzw. über das Ureterorenoskop im Rahmen der Diagnostik in der Kontrollgruppe und vor geplanter Operation bei gesichertem Tumor des oberen Harntraktes. Mit den Ergebnissen der Urinzytologie, FISH sowie der Histologie als Referenzparameter wurde die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert ermittelt.

Zur zytologischen Beurteilung wurden die angefertigten Zytospins nach Papanicolaou gefärbt und in negativ, suspekt und positiv klassifiziert.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Zytospins erfolgte mit der Sondenmischung des UroVysion™ nach den Herstellervorgaben. Die Auswertung nach erfolgter Hybridisierung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung der Filtersets DAPI, Rot/Grün, Aqua und Gold. In die Bewertung gingen Zellkerne ein, die eine Abweichung vom Euploiden Chromosomensatz aufwiesen. Beim Nachweis der Chromosomen 3 (rotes), 7 (grünes Signal) im Rot/Grün Filter und 17 (blaue Fluoreszenz) im Aqua Filter bedeutete dies eine Zunahme der Chromosomenzahl auf 3 oder mehr Signale, im Gold-Filter war ein Fehlen eines oder beider gelber Sonden signale Beweis für eine Deletion des markierten Genlokus 9p21 auf dem p16 Gen. Der FISH-Test wurde als positiv bewertet, wenn von 25 ausgezählten Zellkernen vier oder mehr eine Zunahme der Signale der Chromosomen 3, 7 oder 17 zeigten, oder wenn 12 oder mehr Zellkerne ein oder kein Signal für 9p21 aufwiesen.

Von den 28 Patienten mit histologisch gesichertem Urothelkarzinom im oberen Harntrakt wurden 24 durch die FISH richtig erkannt, 4 Patienten zeigten ein falsch negatives Ergebnis. In der Zytologie wurden 3 richtig positiv, 17 suspekt und 8 als falsch negativ beurteilt. Daraus errechnet sich unter Berücksichtigung aller Tumorstadien und Differenzierungsgrade eine Sensitivität von 85,7% für die FISH versus 71,4% für die Zytologie. Der positive prädiktive Wert (PPW) beträgt für die FISH 96,0% gegenüber 69,0% für die Zytologie. In Abhängigkeit zur Tumorausdehnung und dem Differenzierungsgrad zeigte sich bei den Ta/T1-Tumoren in Bezug auf das Grading eine Sensitivität von 72,7% bei den lowgrade Tumoren und 90,0% für die highgrade Tumoren bei der FISH und respektive 63,3% und 80,0% für die Zytologie. Bei muskelinvasivem Wachstum erhöht sich die Sensitivität der FISH auf 100% gegenüber 50% der Zytologie. Beim Carcinoma in situ zeigen beide Testverfahren eine Sensitivität von 100%.

In 17 Fällen mit histologisch gesichertem Urothelkarzinom im oberen Harntrakt wurde zytologisch der Befund als suspekt eingestuft. Betrachtet man diese Subgruppe mit der korrespondierenden FISH Analyse, so wurden bei 14 (82,4%) die Tumore durch die FISH richtig erkannt.

In der FISH fand sich in 33 von 37 Fällen ein richtig negatives Ergebnis und in 4 Fällen ein falsch positives Testresultat. Daraus errechnet sich eine Spezifität von 89,2%. Die zytologische Beurteilung ergab in 28 Fällen ein richtig negatives, bei einem ein falsch positives und bei 8 Patienten einen suspekten Befund, was einer Spezifität von 75,7% entspricht. Der negative Voraussagewert (NPW) für FISH betrug 89,2% versus 77,8% für die Zytologie.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die FISH der Zytologie in Sensitivität und Spezifität überlegen ist. Dennoch zeigt auch die Hybridisierung Schwächen bei den nicht invasiven, lowgrade Tumoren. Sie ist zwar auch in diesem Feld der Zytologie in Spezifität und Sensitivität um ca. 10% überlegen, dennoch werden auch in der FISH bis zu 28% dieser Tumore nicht erkannt. Die Fluoreszenzhybridisierung kann somit die Bildgebung in Kombination mit den invasiven Techniken (RUP und URS), die einen Tumor in 93% der Fälle detektieren, nicht ersetzen. Besonders hilfreich scheint die FISH in der Einordnung negativer und suspekter Zytologiebefunde bei Tumorverdacht und Nachsorge zu sein, was für eine weitere Diagnostik und Therapie von entscheidender Bedeutung ist. Hier sehen wir derzeit die Hauptindikation für die FISH in Ergänzung zur Zytologie. Wegen der bis her dünnen Datenlage sind weitere, prospektive Studien mit größeren Fallzahlen zur Untermauerung der vorliegenden Ergebnisse dringend erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Akkad, T; Brunner, A; Pallwein, L; Gozzi, C; Bartsch, G; Mikuz, G et al. (2007): Fluorescence in situ hybridization for detecting upper urinary tract tumors-a preliminary report.  
In: *Urology*, Jg. 70, H. 4, S. 753–757.
2. Babaian RJ, Johnson D. E. (1980): Primary carcinoma of the ureter.  
In: *The Journal of urology*, H. 123, S. 357–359.
3. Bagley, D. H.; Rivas, D. (1990): Upper urinary tract filling defects: flexible ureteroscopic diagnosis. In: *The Journal of urology*, Jg. 143, H. 6, S. 1196–1200.
4. Brown GA, Busby JE Wood CG Pisters LL Dinney CP Swanson DA Matin SF (2006): Nephroureterectomy for treating upper urinary tract transitional cell carcinoma: Time to change the treatment paradigm?  
In: *BJU international*, S. 1176–1180.
5. Bubendorf, L (2002): FISH in der Zytologie. In: *Cyto-Info*, H. 3, S. 86–90.
6. Caoili, EM.; Cohan, RH.; Inampudi, PE, JH.; Shah, RB.; Faerber, GJ.; Montie, JE. (2005): MDCT urography of upper tract urothelial neoplasms.  
In: *AJR. American journal of roentgenology*, Jg. 184, H. 6, S. 1873–1881.
7. Carpinito, GA.; Stadler, WM.; Briggman, JV.; Chodak, GW.; Church, PA.; Lamm, DL. et al. (1996): Urinary nuclear matrix protein as a marker for transitional cell carcinoma of the urinary tract.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 156, H. 4, S. 1280–1285.
8. Chen GL, El-Gabry EA Bagley DH (2000): Surveillance of upper urinary tract transitional cell carcinoma: the role of ureteroscopy, retrgrade pyelographie, cytology and urinalysis. In: *The Journal of urology*, H. 164, S. 1901–1904.
9. Craig M, Womack S. Sagalowsky AI Carmody T. Erickstad MD Roehborn CG (1998): Prognostic factors, recurrence and survival in transtional cell carcinoma of the upper urinary tract: a 30 year experience in 252 patients.  
In: *Urology*, H. 52, S. 594–601.
10. Daneshmand, S; Quek, M; Huffman, J. (2003): Endoscopic management of upper urinary tract transitional cell carcinoma: long-term experience.  
In: *Cancer*, Jg. 98, H. 1, S. 55–60.
11. Das, A.K.; Carson, CC.; Bolick, D.; Paulson, DF. (1990): Primary carcinoma of the upper urinary tract. Effect of primary and secondary therapy on survival.  
In: *Cancer*, Jg. 66, H. 9, S. 1919–1923.

12. Davis, BW.; Hough, AJ.; Gardner, WA. (1987): Renal pelvic carcinoma: morphological correlates of metastatic behavior.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 137, H. 5, S. 857–861.
13. Dragicevic, D; Djokic, M; Pekmezovic, T; Micic, S; Hadzi-Djokic, J; Vuksanovic, A; Simic, T (2007): Survival of patients with transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis in Balkan endemic nephropathy and non-endemic areas of Serbia.  
In: *BJU international*, Jg. 99, H. 6, S. 1357–1362.
14. Ehrenberg, L.; Ekman, G.; Svensson, A. (1990): Epidemiological studies of geographic variations of cancer incidence in Sweden. Choice of variables and statistical units.  
In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, Jg. 29, H. 8, S. 961–969.
15. Elliott, DS.; Segura, JW.; Lightner, D.; Patterson, DE.; Blute, ML. (2001): Is nephroureterectomy necessary in all cases of upper tract transitional cell carcinoma? Long-term results of conservative endourologic management of upper tract transitional cell carcinoma in individuals with a normal contralateral kidney.  
In: *Urology*, Jg. 58, H. 2, S. 174–178.
16. Fadel-Elmula, I; Kytölä, S; Pan, Y; Lui, WO; Derienzo, G; Forsberg, L et al. (2001): Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 92, H. 6, S. 824–831.
17. Friedrich, MG; Toma, MI; Hellstern, A; Pantel, K; Weisenberger, DJ; Noldus, J; Huland, H (2003): Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer.  
In: *BJU international*, Jg. 92, H. 9, S. 911–914.
18. Giovansili, B; Peyromaure, M; Saïghi, D; Dayma, T; Zerbib, M; Debré, B (2004): Stripping technique for endoscopic management of distal ureter during nephroureterectomy: experience of 32 procedures.  
In: *Urology*, Jg. 64, H. 3, S. 448-52; discussion 452.
19. Gittes, RF. (1976): Operative nephroscopy.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 116, H. 2, S. 148–152.
20. Griesser, H. (2002): Exfoliativzytologie der ableitenden Harnwege.  
In: *Cyto-Info*, H. 3, S. 79-85.

21. Guarnizo E, Pavlovich CH, Seiba M, Carlson DZ, Vaugham ED, Sosa RE (2000): Ureteroscopic biopsy of upper tract urothelial carcinoma: improved diagnostic accuracy and histopathological considerations using a multi-biopsy approach.  
In: *The Journal of urology*, H. 163, S. 52–55.
22. Guinan, P.; Vogelzang, N. J.; Randazzo, R.; Sener, S.; Chmiel, J.; Fremgen, A.; Sylvester, J. (1992): Renal pelvic cancer: a review of 611 patients treated in Illinois 1975-1985. Cancer Incidence and End Results Committee.  
In: *Urology*, Jg. 40, H. 5, S. 393–399.
23. Hafner, C.; Knuechel, R.; Zanardo, L.; Dietmaier, W.; Blaszyk, H.; Cheville, J. et al. (2001): Evidence for oligoclonality and tumor spread by intraluminal seeding in multifocal urothelial carcinomas of the upper and lower urinary tract.  
In: *Oncogene*, Jg. 20, H. 35, S. 4910–4915.
24. Hall, MC.; Womack, S.; Sagalowsky, AI.; Carmody, T.; Erickstad, MD.; Roehrborn, CG. (1998): Prognostic factors, recurrence, and survival in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: a 30-year experience in 252 patients.  
In: *Urology*, Jg. 52, H. 4, S. 594–601.
25. Halling, KC; King, W; Sokolova, IA; Meyer, RG; Burkhardt, HM; Halling, AC et al. (2000): A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 164, H. 5, S. 1768–1775.
26. Halling, KC; Kipp, BR. (2007): Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. In: *Human Pathology*, H. 38, S. 1137–1144.
27. Hannibal, D.; Gross-Fengels, W.; Hesse, U. (1991): Malignant tumors of the normotopic kidneys and ureters following kidney transplantation.  
In: *RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, Jg. 154, H. 5, S. 546–549.
28. Hartmann, A; Zanardo, L; Bocker-Edmonston, T; Blaszyk, H; Dietmaier, W; Stoehr, R et al. (2002): Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract. In: *Cancer research*, Jg. 62, H. 23, S. 6796–6802.
29. Hellsten, S.; Glifberg, I.; Lindholm, K.; Lindholm, CE.; Ogiwara, T.; Wehlin, L. (1980): Carcinoma in situ of the renal pelvis after cystectomy. A case report including comments concerning diagnostic procedures and surgical treatment.  
In: *Urologia internationalis*, Jg. 35, H. 5, S. 316–320.

30. Herr, HW.; Cookson, MS.; Soloway, SM. (1996): Upper tract tumors in patients with primary bladder cancer followed for 15 years.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 156, H. 4, S. 1286–1287.
31. Holmäng, S; Johansson, SL. (2004): Synchronous bilateral ureteral and renal pelvic carcinomas: incidence, etiology, treatment and outcome.  
In: *Cancer*, Jg. 101, H. 4, S. 741–747.
32. Hong, B; Park, S; Hong, JH; Kim, CS; Ro, JY.; Ahn, H (2005): Prognostic value of lymphovascular invasion in transitional cell carcinoma of upper urinary tract.  
In: *Urology*, Jg. 65, H. 4, S. 692–696.
33. Huguet-Pérez, J.; Palou, J.; Millán-Rodríguez, F.; Salvador-Bayarri, J.; Villavicencio-Mavrich, H.; Vicente-Rodríguez, J. (2001): Upper tract transitional cell carcinoma following cystectomy for bladder cancer.  
In: *European urology*, Jg. 40, H. 3, S. 318–323.
34. Jabbour, ME.; Smith, AD. (2000): Primary percutaneous approach to upper urinary tract transitional cell carcinoma.  
In: *The Urologic clinics of North America*, Jg. 27, H. 4, S. 739–750.
35. Jakse, G.; Marberger, H. (1985): Tumors of the renal pelvis. Herausgegeben von Loening SA (eds) *Genitourinary oncology* Lea & Febiger Philadelphia Culp DA.
36. Jarrett, TW.; Sweetser, PM.; Weiss, GH.; Smith, AD. (1995): Percutaneous management of transitional cell carcinoma of the renal collecting system: 9-year experience. In: *The Journal of urology*, Jg. 154, H. 5, S. 1629–1635.
37. Jensen, OM.; Knudsen, JB.; McLaughlin, JK.; Sørensen, BL. (1988): The Copenhagen case-control study of renal pelvis and ureter cancer: role of smoking and occupational exposures. In: *International journal of cancer*. Jg. 41, H. 4, S. 557–561.
38. Johansson, S.; Angervall, L.; Bengtsson, U.; Wahlqvist, L. (1974): Uroepithelial tumors of the renal pelvis associated with abuse of phenacetin-containing analgesics.  
In: *Cancer*, Jg. 33, H. 3, S. 743–753.
39. Kang, CH; Yu, TJ; Hsieh, HH; Yang, JW.; Shu, KS, (2004): Synchronous bilateral primary transitional cell carcinoma of the upper urinary tracts: ten patients with more than five years of follow-up. In: *Urology*, Jg. 63, H. 2, S. 380–382.
40. Kemper J, Adam G. Nolte-Ernsting C. (2006): Moderne Diagnostik des oberen Harntrakts mittels Mehrschicht-CT-Urographie. In: *Rofo*, H. 178, S. 1086–1094.

41. Kiemeney, LA.; Moret, NC.; Witjes, JA.; Schoenberg, MP.; Tulinius, H. (1997):  
Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland.  
In: *The Journal of urology*, Jg. 157, H. 5, S. 1649–1651.
42. Kojima, Y; Tozawa, K; Kawai, N; Sasaki, S; Hayashi, Y; Kohri, K (2006): Long-term  
outcome of upper urinary tract carcinoma in situ: effectiveness of nephroureterectomy  
versus bacillus Calmette-Guérin therapy.  
In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological  
Association*, Jg. 13, H. 4, S. 340–344.
43. Krogh, J.; Kvist, E.; Rye, B. (1991): Transitional cell carcinoma of the upper urinary  
tract: prognostic variables and post-operative recurrences.  
In: *British journal of urology*, Jg. 67, H. 1, S. 32–36.
44. Lehmann J, Retz M. Stöckle M. (2005): Blasenkarzinom – Neue Perspektiven in  
Diagnostik und Behandlung: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
45. Liatsikos, EN.; Dinlenc, CZ.; Kapoor, R.; Smith, AD. (2001): Transitional-cell  
carcinoma of the renal pelvis: ureteroscopic and percutaneous approach.  
In: *Journal of endourology / Endourological Society*, Jg. 15, H. 4, S. 377-83;
46. Lopez-Beltran, A; Montironi, R (2004): Non-invasive urothelial neoplasms: according  
to the most recent WHO classification. In: *European urology*, Jg. 46, H. 2, S. 170–176.
47. Luo, B; Li, W; Deng, CH; Zheng, FF; Sun, XZ; Wang, DH; Dai, YP (2009): Utility of  
fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of upper urinary tract urothelial  
carcinoma. In: *Cancer genetics and cytogenetics*, Jg. 189, H. 2, S. 93–97.
48. Lynch, HT.; Ens, JA.; Lynch, JF. (1990): The Lynch syndrome II and urological  
malignancies. In: *The Journal of urology*, Jg. 143, H. 1, S. 24–28.
49. Marín-Aguilera, M; Mengual, L; Ribal, MJ; Musquera, M; Ars, E; Villavicencio, H et  
al. (2006): Utility of fluorescence in situ hybridization as a non-invasive technique in  
the diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma.  
In: *European urology*, Jg. 51, H. 2, S. 409-15; discussion 415.
50. Martínez-Piñeiro, JA.; García Matres, MJ.; Martínez-Piñeiro, L. (1996):  
Endourological treatment of upper tract urothelial carcinomas: analysis of a series of  
59 tumors. In: *The Journal of urology*, Jg. 156, H. 2 Pt 1, S. 377–385.
51. Maruschke M., Seiter H. (2005): Urothelkarzinome des oberen Harntraktes:  
Retrospektive Studie zu Diagnostik, Tumorcharakteristika und Therapie bei 28  
Patienten. In: *J Urol Urogynaekol*, H. 12, S. 5–14.



- 
52. Mazeman, E. (1976): Tumours of the upper urinary tract calyces, renal pelvis and ureter. In: *European urology*, Jg. 2, H. 3, S. 120–126.
53. McLaughlin, JK.; Silverman, DT.; Hsing, AW.; Ross, RK.; Schoenberg, JB.; Yu, MC. et al. (1992): Cigarette smoking and cancers of the renal pelvis and ureter. In: *Cancer research*, Jg. 52, H. 2, S. 254–257.
54. McNeill, A; Oakley, N; Tolley, DA.; Gill, IS. (2004): Laparoscopic nephroureterectomy for upper tract transitional cell carcinoma: a critical appraisal. In: *BJU international*, Jg. 94, H. 3, S. 259–263.
55. Milestone, B.; Friedman, AC.; Seidmon, EJ.; Radecki, PD.; Lev-Toaff, AS.; Caroline, DF. (1990): Staging of ureteral transitional cell carcinoma by CT and MRI. In: *Urology*, Jg. 36, H. 4, S. 346–349.
56. Millán-Rodríguez, F.; Chéchile-Toniolo, G.; Salvador-Bayarri, J.; Huguet-Pérez, J.; Vicente-Rodríguez, J. (2000): Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. In: *The Journal of urology*, Jg. 164, H. 4, S. 1183–1187.
57. Mugiya, S; Ozono, S; Nagata, M; Otsuka, A; Takayama, T; Nagae, H (2006): Retrograde endoscopic laser therapy and ureteroscopic surveillance for transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. In: *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, Jg. 13, H. 1, S. 1–6.
58. Netto NR, Almeida Claro JF (1990): Ct scanning in the diagnosis of pevicalcyleal fiiling defects. In: *Archivos españoles de urología*, H. 43, S. 683–685.
59. Oosterlinck, W; Solsona, E; van der Meijden, APM; Sylvester, R; Böhle, A; Rintala, E et al. (2004): EAU guidelines on diagnosis and treatment of upper urinary tract transitional cell carcinoma. In: *European urology*, Jg. 46, H. 2, S. 147–154.
60. Palou, J; Rodríguez-Rubio, F; Huguet, J; Segarra, J; Ribal, MJ; Alcaraz, A; Villavicencio, H (2005): Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor. In: *The Journal of urology*, Jg. 174, H. 3, S. 859-61; discussion 861
61. Pecqueux, JC.; Schwarz, A.; Dieckmann, KP.; Offermann, G. (1990): Cancer incidence in patients on chronic dialysis and in renal transplant recipients. In: *Urologia internationalis*, Jg. 45, H. 5, S. 290–292.
62. Petersen, I.; Ohgaki, H.; Ludeke, BI.; Kleihues, P. (1993): p53 mutations in phenacetin-associated human urothelial carcinomas. In: *Carcinogenesis*, Jg. 14, H. 10, S. 2119–2122.

63. Rassweiler, J.; Schulze, M; Marrero, R; Frede, T; Palou Redorta, ; Bassi, PF (2004): Laparoscopic nephroureterectomy for upper urinary tract transitional cell carcinoma: is it better than open surgery? In: *European urology*, Jg. 46, H. 6, S. 690–697.
64. Rifkin, MD. (1985): Ultrasonography of the lower genitourinary tract. In: *The Urologic clinics of North America*, Jg. 12, H. 4, S. 645–656.
65. Ross, RK.; Paganini-Hill, A.; Landolph, J.; Gerkins, V.; Henderson, BE. (1989): Analgesics, cigarette smoking, and other risk factors for cancer of the renal pelvis and ureter. In: *Cancer research*, Jg. 49, H. 4, S. 1045–1048.
66. Rübber, H (2007): *Uroonkologie. 4.,vollständig überarbeitete Auflage*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-11773 /Dig. Serial]).
67. Scolieri MJ, Paik ML Brown SL Resnik MI (2000): Limitation of computer tomography in the preoperative staging of upper tract urothelial carcinoma. In: *Urology*, H. 56, S. 930–934.
68. Shinka, T.; Uekado, Y.; Aoshi, H.; Hirano, A.; Ohkawa, T. (1988): Occurrence of uroepithelial tumors of the upper urinary tract after the initial diagnosis of bladder cancer. In: *The Journal of urology*, Jg. 140, H. 4, S. 745–748.
69. Sijmons, RH.; Kiemeneij, LA.; Witjes, JA.; Vasen, HF. (1998): Urinary tract cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: risks and screening options. In: *The Journal of urology*, Jg. 160, H. 2, S. 466–470.
70. Sorahan, T.; Sole, G. (1990): Coarse fishing and urothelial cancer: a regional case-control study. In: *British journal of cancer*, Jg. 62, H. 1, S. 138–141.
71. Stewart, GD.; Bariol, SV.; Grigor, KM.; Tolley, DA.; McNeill, SA (2005): A comparison of the pathology of transitional cell carcinoma of the bladder and upper urinary tract. In: *BJU international*, Jg. 95, H. 6, S. 791–793.
72. Stief, C.; Zaak, D.; Stöckle, M.; Studer, U.; Knuechel, R.; Rödel, C. et al. (2006): Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms – Standards und Perspektiven. In: *Der Urologe. Ausg. A*, Jg. 45, H. Supplement 04, S. 90–96.
73. Thalmann, GN.; Markwalder, R; Walter, B; Studer, UE. (2002): Long-term experience with bacillus Calmette-Guerin therapy of upper urinary tract transitional cell carcinoma in patients not eligible for surgery. In: *The Journal of urology*, Jg. 168, H. 4 Pt 1, S. 1381–1385.
74. Ubrig, B; Boenig, M; Waldner, M; Roth, S (2004): Transurethral approach to the distal ureter in nephroureterectomy: transurethral extraction vs. "pluck" technique with long-term follow-up. In: *European urology*, Jg. 46, H. 6, S. 741–747.

- 
75. UICC 2002: TNM classification of malignant tumors.  
In: 6th ed. New: Wiley and sons; 2002 .
76. Walsh, IK.; Keane, PF.; Ishak, LM.; Flessland, KA. (2001): The BTA stat test: a tumor marker for the detection of upper tract transitional cell carcinoma.  
In: Urology, Jg. 58, H. 4, S. 532–535.
77. Wu, WJ.; Liu, LT.; Huang, CN.; Huang, CH.; Chang, LL. (2000): The clinical implications of telomerase activity in upper tract urothelial cancer and washings.  
In: BJU international, Jg. 86, H. 3, S. 213–219.
78. Yousem, DM.; Gatewood, OM.; Goldman, SM.; Marshall, FF. (1988): Synchronous and metachronous transitional cell carcinoma of the urinary tract: prevalence, incidence, and radiographic detection. In: Radiology, Jg. 167, H. 3, S. 613–618.
79. Zungri, E.; Chéchile, G.; Algaba, F.; Diaz, I.; Vilá, F.; Castro, C. (1990): Treatment of transitional cell carcinoma of the ureter: is the controversy justified?  
In: European urology, Jg. 17, H. 4, S. 276–280.

## 7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med Dirk Zaak, für die Bereitstellung des Themas, seine vorzügliche Betreuung und Unterstützung bei der Studie und Erstellung meiner Dissertation ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med Armin Pycha und dem Team der Urologischen Abteilung für die freundliche Aufnahme und Begleitung während meines Aufenthaltes am Klinikum Bozen.

Für die Durchführung der FISH, zytologischen und pathologischen Begutachtung bedanke ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke, Frau Dr. Christiane Mian und den beteiligten Mitarbeitern an den entsprechenden Instituten.

Nicht zuletzt möchte ich allen weiteren, nicht namentlich genannten Personen, die vor und hinter den Kulissen, bei der Durchführung der Studie mit gewirkt haben, meinen Dank übermitteln.

## 8 Lebenslauf

Name: Armin Will  
Geburtsdatum: 14.11.1960  
Geburtsort: Landshut  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch

### Schulbildung:

1967-1971 Grundschule, Kempten i. Allgäu  
1971-1972 Hauptschule Kempten i. Allgäu  
1972-1974 Allgäugymnasium Kempten i. Allgäu  
1974-1981 Luitpoldgymnasium München  
April 1981 Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

01.07.1981-30.06.1983 Zeitsoldat in München, Entlassung als  
Fähnrich der Reserve  
Juli 1987 Ernennung zum Oberleutnant der Reserve

### Studium:

WS 1983- WS 1990 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

**Prüfungen und Qualifikationen:**

11.09. 1985	Ärztliche Vorprüfung
15.09. 1986	I. Staatsexamen
14.04. 1989	II. Staatsexamen
29.05. 1990	III. Staatsexamen
29.05.1990	Erlaubnis für die Tätigkeit als AIP
01.01.1992	Approbation als Arzt
28.07.1998	Anerkennung Facharzt für Urologie
14.02.2007	Anerkennung Zusatzbezeichnung Andrologie
11.06.2008	Anerkennung Zusatzbezeichnung Medikamentöse Tumorthherapie

**Arbeitsverhältnisse :**

01.07.90-31.12.91	AIP auf der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauszweckverbandes Kaufbeuren Chefarzt Dr. Hegel
01.01.92-15.06.92	Assistenzarzt auf der Allgemeinchirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Trostberg Chefarzt Dr. Weber
15.06.92-31.01.96	Assistenzarzt auf der Urologischen Belegarztabteilung des Kreiskrankenhauses Traunstein Ltd. Ärzte Dr. Obermayer u. Dr. Galamb
01.02.96-31.05.98	Assistenzarzt auf der Urologischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Bad Tölz Chefarzt Dr. Paessler
01.06.98-31.07.2002	Oberarzt auf der Urologischen Belegarztabteilung Klinikum Traunstein Ltd. Ärzte Dr. Galamb u. Dr. Schuhbeck
Seit 01.08.2002	Niederlassung als Urologe in Trostberg