

**Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. C. Stief**

**Validierung des NMP22®BladderChek als Marker für das
Harnblasenkarzinom an der Photodynamischen
Diagnostik (PDD)**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von

Sonja Scharf

aus

München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Dirk Zaak
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Albrecht Schilling
	Priv. Doz. Dr. Oliver Gires
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Stefan Tritschler
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser
Tag der mündlichen Prüfung:	16.10.2008

**Für
meine Eltern**

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Prozentualer Anteil ausgewählter Krebserkrankungen in Deutschland [http://www.rki.de].....	1
Abb. 2: Beschreibung eines Primärtumors: T-Kategorie [Rathert , Roth 1995].....	11
Abb. 3: Starres und flexibles Zystoskop	15
Abb. 4: Bsp.1 für Carcinoma in situ: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re)22 [Zaak,2007]	22
Abb. 5: Bsp.2 für Carcinoma in situ: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re)22 [Zaak, 2007]	22
Abb. 6: Papillärer Tumor: low-grade non invasive: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re) [Zaak, 2007]	22
Abb. 7: Das Spektrum elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich mit Angabe der Wellenlänge.....	25
Abb. 8: Wechselwirkung des Lichts mit der Elektronenhülle von Atomen.....	26
Abb. 9: Hämbiosynthese	27
Abb. 10: Absorptionsspektrum (oben) und Fluoreszenzspektrum (unten)	28
von PPIX in Methanol.....	28
Abb. 11: Die Nukleären-Matrix-Proteine bilden den inneren strukturellen Rahmen des Zellkerns [Lahme et al. 2001]	33
Abb. 12: Untersuchungsbogen der Patienten	39
Abb. 13: Ergebnisse der Vergleichsstudie NMP-22 vs. PDD.....	40
Abb. 14: Durchführung des NMP22BladderChek® [Matritech GmbH]	42
Abb. 15: Datenblatt zur 5-Aminolävulinsäure (5-ALA).....	46
Abb. 16: Prinzip der Fluoreszenz –Zystoskopie	48
Abb. 17: Komplettausstattung für die Fluoreszenz-Zystoskopie mit 5-ALA	48
(Fluoreszenztaugliches Zystoskop und Kamera, Videomonitor, D-Light, Videorekorder, Kamerasteuerung)	48
Abb. 18: Histologien der 36 falsch-positiven Ergebnisse des NMP22BladderChek®.....	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: WHO-Klassifikation von 2004 [Seitz et al. 2005]	7
Tab. 2: Gegenüberstellung verschiedener Grading-Systeme [Lehmann et al. 2005]	8
Tab. 3: Stadieneinteilung nach dem UICC TNM-System [Hautmann, Huland 2006]	10
Tab. 4: Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie aus verschiedenen Studien	13
Tab. 5: Nachsorge bei nichtinvasivem Harnblasenkarzinom (Zeitintervall in Monaten) [Liedl et al. 2003].....	20
Tab. 6: Sensitivität und Spezifität des Flureszenzzystoskopie im Vergleich zur Weißlichtendoskopie	23
Tab. 7: Der Median der Sensitivität und Spezifität, die Anzahl der Studien, Institutionen und Patienten [van Rhijn et al. 2005].....	30
Tab. 8: Zielsetzung versus Idealvorstellung.....	31
Tab. 9: Sensitivität und Spezifität des NMP22 Test, validiert in zahlreichen Studien [Glas et al. 2003].....	34
Tab. 10: Klinische und histomorphologische Klassifikationen der Studie	36
In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, bei denen aufgrund von Symptomen oder klinischen Befunden ein klinischer Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom vorlag oder Patienten, die im Rahmen der Nachsorge eines Blasentumors untersucht wurden.	37
Tab. 11: Vorangegangene Histologien der Nachsorgepatienten (n=70).....	37
Tab. 12: Durchführung der Färbung nach Papanicolaou	43
Tab. 13: Histologische Kriterien für die Beurteilung und Einteilung der papillären Urothelalterationen.....	49
[Epstein et al. 1998]	49
Tab. 14: histopathologischen Ergebnisse der 40 malignen Befunde	51
Tab. 15: Validität der einzelnen Testverfahren.....	55
Tab. 16: Sensitivität der einzelnen Testverfahren in Abhängigkeit vom Tumorstadium	55
Tab. 17: Sensitivität der einzelnen Testverfahren in Abhängigkeit vom Tumorgrad.....	56
Tab. 18: Aufschlüsselung der detektierten und übersehenen Tumoren nach Staging und Grading.....	57
Tab. 19: Aufschlüsselung der Sensitivität und Spezifität beim NMP22BladderChek®.....	58

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Pathogenese.....	4
1.1.4 Klassifikationen.....	5
1.1.4.1 Histologie	5
1.1.4.2 WHO-Klassifikation.....	6
1.1.4.3 TNM-Klassifikation	9
1.1.5 Symptomatik	11
1.1.6 Diagnostik	12
1.1.6.1 Obligate Untersuchungsverfahren.....	12
1.1.6.2 Fakultative Untersuchungsverfahren	15
1.1.7 Therapie des nichtinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms	17
1.1.7.1 Operative Therapie.....	17
1.1.7.2 Intravesikale Instillationstherapie	18
1.1.8 Nachsorge und Prognose.....	20
1.2 Photodynamische Diagnostik (PDD)	21
1.2.1 Photodynamische Diagnostik versus Weißlichtendoskopie.....	21
1.2.2 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenz und Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)	25
1.2.2.1 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenz	25
1.2.2.2 Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA).....	26
1.3 Tumormarker.....	29
1.3.1 Überblick.....	29
1.3.2 NMP22®BladderChek	32
1.3.2.1 Struktur und Aufgaben des Nukleären-Matrix-Proteins	33

1.3.2.2	Bisherige Untersuchungen zum NMP-22	34
1.4	Zielsetzung und Fragestellung	35
2	Material und Methoden	36
2.1	Patienten	36
2.2	Studienablauf	38
2.3	NMP-22BladderChek®	41
2.3.1	Allgemein	41
2.3.2	Durchführung	41
2.4	Urinzytologie	42
2.4.1	Anfertigung der Präparate	42
2.4.2	Beurteilung der Präparate	44
2.5	Weisslichtendoskopie	45
2.5.1	Durchführung	45
2.5.2	Komplikationen	46
2.6	Photodynamische Diagnostik	46
2.6.1	5-Aminolävulinsäure (5-ALA)	46
2.6.2	Durchführung	47
2.7	Spülzytologie	48
2.8	Histologie	49
2.9	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Ergebnisse der Histologie	51
3.2	Qualität der Testverfahren	52
3.3	Aufschlüsselung der detektierten und übersehenen Tumoren nach Staging und Grading	57
3.4	Aufschlüsselung der Sensitivität und Spezifität beim NMP22BladderChek®	58
3.5	Ergebnisse der Kontrollen der 36 falsch-positiven Ergebnisse des NMP22BladderChek®	59
4	Diskussion	60
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	72
7	Danksagung	83
8	Lebenslauf	84

1 Einleitung

1.1 Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. Es stellt 2-3% aller malignen Tumoren des Menschen dar und ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Tumor des Urogenitaltraktes, beim Mann insgesamt der vierthäufigste Tumor und der zehnthäufigste bei der Frau [Hautmann, Huland 2006]. In Deutschland erfasst man jährlich ca. 25.950 bösartige Neubildungen der Harnblase. Davon treten bei Männern jährlich 18.850 und bei Frauen 7100 Erkrankungsfälle auf. Männer sind zweieinhalb Mal so häufig betroffen wie Frauen [RKI-Schätzung für Deutschland 2002, <http://www.rki.de>]. Der prozentuale Anteil des Harnblasenkarzinoms im Vergleich zu anderen Karzinomen ergibt sich aus nachfolgender Abbildung.

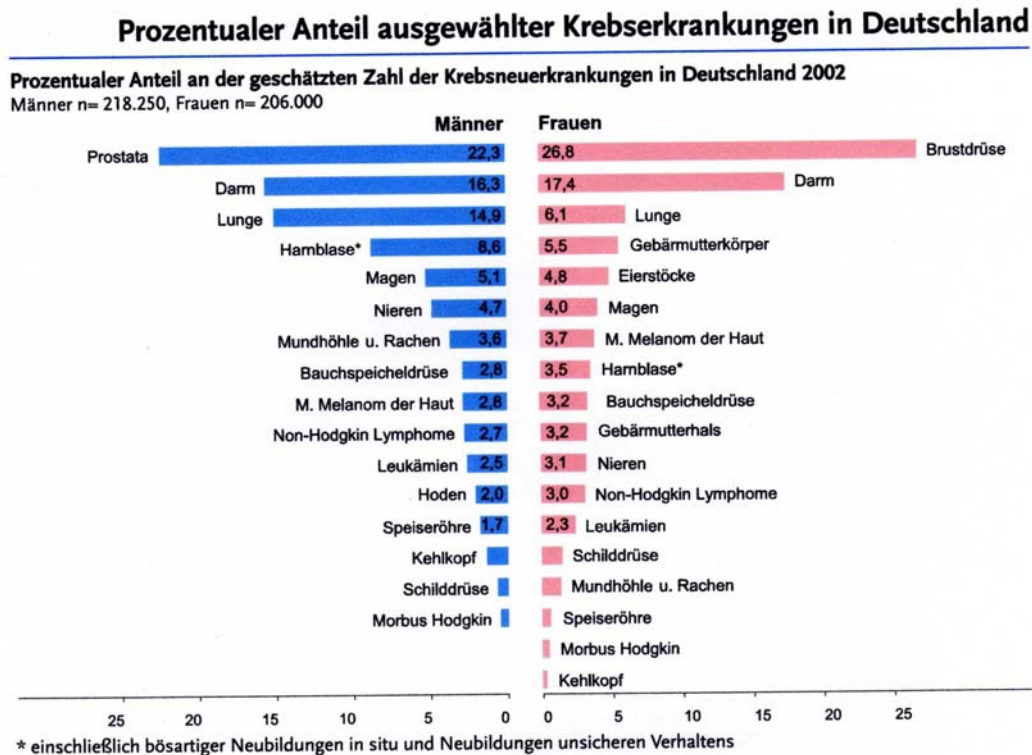


Abb.1: Prozentualer Anteil ausgewählter Krebserkrankungen in Deutschland [<http://www.rki.de>]

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen 75% aller Patienten ein Harnblasenkarzinom auf, das noch nicht die Muskulatur der Harnblasenwand invadiert hat. Bei 20% liegt bereits ein invasives und bei 5% ein metastasiertes Karzinom vor [Hautmann, Huland 2006]. Die Tumoren, die die Muskulatur der Harnblasenwand noch nicht invadiert haben, gelten als prognostisch sehr günstig. Die Problematik bei diesen Tumoren liegt jedoch in dem hohen Rezidivrisiko von 30-85% in den ersten Jahren nach Diagnosestellung [Zaak et al. 2006]. Es wird dabei in bis zu 20% der Fälle eine Progression im Sinne eines infiltrativen Wachstums festgestellt, weshalb eine regelmäßige Nachsorge erforderlich ist [Saad et al. 2002]. Hat der Tumor die Muskulatur bereits infiltriert, besteht ein hohes Risiko für eine Lymphknoten- oder Fern-metastasierung. Die Mortalität der Erkrankung beträgt etwa 3-8/100.000. Ab dem 40. Lebensjahr steigt das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Alter an. Der Altersmittelwert bei der Erstdiagnose liegt bei Frauen bei 70,2 Jahren und bei Männern bei 66,4 Jahren [Tumorrregister München <http://www.med.uni-muenchen.de/trm>].

Für die Stadt München liegt das mittlere Sterbealter bei Männern je 100.000 der Bevölkerung bei 76,6 Jahren und bei Frauen entsprechend bei 82,7 Jahren [Tumorrregister München <http://www.med.uni-muenchen.de/trm>]. In den letzten Jahrzehnten ist aufgrund der höheren Lebenserwartung und einer größeren Schadstoffbelastung des Menschen eine Zunahme der Erkrankung zu beobachten.

1.1.2 Ätiologie

Für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms sind mehrere Ursachen bekannt:

Aromatische Amine

Der erste experimentelle Hinweis, dass aromatische Amine Blasentumoren verursachen, wurde von Hueper et al. 1938 geführt [Hueper et al. 1938]. Aromatische Amine werden über den Gastrointestinaltrakt, die Lunge und die Haut aufgenommen, in der Leber metabolisiert und über den Urin ausgeschieden. Durch die N-Acetyltransferase ist eine Inaktivierung möglich. Für Langsam-Acetylierer besteht ein erhöhtes Tumorrisiko. Die Latenzperiode zwischen der Einwirkung des Karzinogens und der Entwicklung eines Tumors beträgt zwischen 10 und 40 Jahren [Rathert, Roth 1995]. Die Blasentumorerkrankung wird bei Exposition mit aromatischen Aminen in entsprechenden Betrieben (Textil-, Leder- und Farbstoffindustrie etc.) als Berufskrankheit nach Nr. 1301 der Berufskrankheitenverordnung anerkannt [Norpoth et al. 1994].

Nikotin

Das relative Risiko von Zigarettenrauchern an einem Harnblasentumor zu erkranken beträgt im Vergleich zu einem Nichtraucher zwischen 2:1 und 6:1 [Cole 1971; Kunze et al. 1986]. Je länger und stärker der Nikotinabusus, desto höher ist das Risiko für eine Erkrankung. Im Allgemeinen werden etwa 1/3 der Blasenkarzinome durch den Nikotinkonsum hervorgerufen [Hautmann, Huland 2006]. Die entscheidende Rolle scheint hier das 2-Naphthylamin zu spielen [Hoffmann et al. 1969; Patrianakos et al. 1979].

Medikamente

Anzuführen sind hier vor allem drei Medikamente: das Chlornaphazin, das Phenacetin und das Cyclophosphamid. Der Gebrauch von Chlornaphazin erfolgte bis 1963. Das Phenacetin führt, neben der interstitiellen Nephritis, in erster Linie im oberen Harntrakt zur Entstehung von Urothelkarzinomen. 5-10% der Patienten mit einer Phenacetinnephropathie entwickeln ein Urothelkarzinom [Gonwa et al. 1980]. Das aktive Karzinogen ist ein Stickstoffhydroxylmetabolit des Phenacetins, welches chemisch die Struktur eines aromatischen Amins aufweist [Rathert et al. 1975]. Cyclophosphamid führt über eine symptomatische oder asymptomatische chemische Zystitis zu einem erhöhten Blasentumorrisiko [Pearson et al. 1978]. Allerdings konnte das kanzerogene Potential durch die Einführung der Zystitisprophylaxe mit Mesna reduziert werden [Liedl et al. 2003].

Harnwegsinfektionen

Für Patienten mit chronischen Harnwegsinfekten besteht ein erhöhtes Risiko an einem Harnblasenkarzinom, insbesondere einem Plattenepithelkarzinom, zu erkranken. Vor allem Patienten mit einer langjährigen Katheterableitung oder Blasensteinen sind hiervon betroffen [Wynder et al. 1977].

Die Bilharziose ist in weiten Teilen Afrikas und arabischen Ländern endemisch. Entwickelt sich dabei eine chronische Infektion, kommt es gehäuft zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms [Morrison et al. 1982]. Ätiologisch wird eine infektbedingte Nitrosaminbildung diskutiert. Des Weiteren spielen neben dem Alter und dem Geschlecht auch die Rasse und geographische Gesichtspunkte eine Rolle. Weiße erkranken häufiger als Schwarze, das Erkrankungsrisiko in Asien ist kleiner als das in Europa und dieses wiederum kleiner als in Südafrika. Genetische Dispositionen konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

1.1.3 Pathogenese

92% aller Harnblasenkarzinome gehen vom Urothel aus und werden als Übergangsepithelkarzinome oder Transitionalzellkarzinome bezeichnet. In ca. 7% finden sich Plattenepithelkarzinome, die auch im Endstadium eines Urothelkarzinoms auftreten können. In etwa 1% treten Adenokarzinome der Blase auf, die bevorzugt vom Blasendach ausgehen [Liedl et al. 2003]. Bei der Erstdiagnose zeigen 80% aller Tumoren ein nichtinvasives, papilläres Wachstum. 10 bis 15% dieser Tumoren entwickeln im weiteren Verlauf eine Progression mit muskelinvasivem Wachstum.

Sekundäre Blasentumoren wie z.B. durch Infiltration (weibliches Genitale, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) sind mit <1% ausgesprochen selten. Ebenfalls selten vorkommende mesenchymale Tumoren der Harnblase können sowohl benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom) als auch maligner (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumoren) Natur sein [Liedl et al. 2003].

Blasenkarzinome wachsen im weiteren Verlauf lokal durch die Wandschichten der Harnblase und metastasieren sowohl lymphogen als auch hämatogen. Bei der lymphogenen Metastasierung werden die Lymphknoten des kleinen Beckens in der Fossa obturatoria, in der präsakralen und iliacalen Region befallen. Die häufigsten hämatogenen Metastasenorte sind Lunge, Knochen und Leber [Hautmann, Huland 2006].

Das Carcinoma in situ (Cis) ist eine flache, nichtpapilläre intraepitheliale Läsion und infiltriert nicht die Lamina propria mucosae. Typische Zellveränderungen sind große Zellkerne mit hohem Chromatingehalt, prominente Nukleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Weiter findet sich eine Erhöhung der Zellschichten der Schleimhaut mit unregelmäßiger Zellanordnung. Makroskopisch weist das Carcinoma in situ nur uncharakteristische Veränderungen der Mukosa wie Rötung und lachsfarbene Verfärbung und/oder leichte Verdickung auf. Das Carcinoma in situ kann sowohl als einzige Tumorentität als auch gleichzeitig in Kombination (assoziiertes Cis) mit einem anderen Blasentumor vorkommen. In 38-83 % entwickelt sich aus dem Carcinoma in situ innerhalb von 5 Jahren ein invasives Karzinom [Althausen et al. 1976].

1.1.4 Klassifikationen

1.1.4.1 Histologie

Histologisch gesehen können bei der Harnblase von innen nach außen vier Schichten unterschieden werden [Baumhoer et al. 2000]:

Tunica mucosa

Die Harnblase ist mit einem mehrreihigen Übergangsepithel ausgekleidet. Im entleerten Zustand bildet die Schleimhaut reliefartige Falten, die bei voller Blase verstrichen sind. Typisch für das Uroepithel sind die lumenwärts liegenden „Umbrella cells“, die sogenannten Schirmzellen oder Deckzellen. Diese Schirmzellen werden lumenwärts von einer sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht bedeckt, die die Schleimschicht bildet [Hautmann, Huland 2006].

Direkt an das Übergangsepithel schließt die Lamina propria an, die eine lockere Bindegewebsschicht bildet.

Tunica submucosa

Sie ist sehr dünn und fehlt im Bereich des Trigonum vesicae. Die Schleimhaut ist deshalb im Trigonum fest mit der Muskelschicht verwachsen, weshalb es auch bei entleerter Blase zu keiner Faltenbildung kommt.

Tunica muscularis

Sie besteht aus glatten Muskelzellen, die in einer Dreischichtung angeordnet sind (Stratum longitudinale internum, Stratum circulare, Stratum longitudinale externum). Der M. sphincter internus wird im Bereich des Trigonum vesicae von der innersten Muskelschicht gebildet.

Tunica adventitia

Diese Schicht dient dem Einbau der Harnblase in das Beckenbindegewebe und enthält Gefäße und den Nervenplexus.

1.1.4.2 WHO-Klassifikation

Bereits 1925 konnten Tumoren durch die sog. „Broders-Classification“ von Albert C. Broders, der zwischen vier unterschiedlichen Differenzierungsgraden (Grad 1-4) unterschied, genauer charakterisiert werden. Die erste WHO-Klassifikation für Harnblasentumore wurde 1973 von Mostofi et al. eingeführt. Sie unterschied das Papillom von dem Urothelkarzinom Grad 1-3. Diese Klassifikation wies jedoch einige Nachteile auf, wie z.B. die nicht eindeutig definierte Einteilung in Grad 1-3 oder der nicht korrekten Definition, dass alle papillären Tumoren einem Karzinom gleichzusetzen wären [Seitz et al. 2005].

1999 veröffentlichte die WHO ein Klassifikationssystem, das sowohl das biologische Verhalten der Tumoren als auch die zytogenetischen und molekularbiologischen Veränderungen berücksichtigt [Lopez-Beltran et al. 2004, Epstein et al. 1998]. Hinsichtlich der Tumorbilogie und des daraus resultierenden Progressionsrisikos werden Harnblasenkarzinome in „low-grade“-Tumoren mit niedrigem Progressionsrisiko und „high-grade“-Tumoren mit hoher Progressionswahrscheinlichkeit unterteilt. Die Gradings 1, 2 und 3 von 1973 entsprechen in der WHO-Nomenklatur den neuen Termini [Lopez-Beltran et al. 2004]:

Nichtinvasive papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential (**PUNLMP**)

Nichtinvasives papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom (**LGPUC**)

Nichtinvasives papilläres urotheliales High-grade-Karzinom (**HGPUC**)

Die papilläre Neoplasie mit niedrig malignem Potential (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 nichtinvasiven papillären Urothelkarzinomen beobachtet [Lehmann et al. 2005]. Diese Tumoren weisen eine günstige Prognose auf.

In der neuesten WHO-Klassifikation von 2004 werden die nichtinvasiven den invasiven Tumoren gegenübergestellt [Stief et al. 2006]. Die Abgrenzung von nichtinvasiven 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 nichtinvasiven Karzinomen lehnt sich an die Nomenklatur von 1998 mit den Begriffen „nichtinvasive papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential“ (PUNLMP), „nichtinvasives

papilläres Urothelkarzinom low grade“ (LGPUC) und „nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom high grade“ (HGPUC) an. Die WHO-Klassifikation von 2004 ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Normal
- Normales Urothel, inklusive früherer Diagnose „milde Dysplasie“
Nichtinvasive Neoplasie
Hyperplasie
- Flache Hyperplasie
- Papilläre Hyperplasie
Flache Läsionen mit Atypien
- Reaktive (entzündliche) Atypie
- Atypie mit unklarer Bedeutung
- Urotheliale Dysplasie (intraurotheliale Low-grade-Neoplasie)
- Carcinoma in situ (intraurotheliale High-grade-Neoplasie; enthält auch „schwere“ Dysplasie)
Papilläre Läsionen
- Papillom
- Invertiertes Papillom
- Papilläre urotheliale Neoplasie of „low malignant potential“ (PUNLMP)
- Papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom
- Papilläres urotheliales High-grade-Karzinom (bei Anaplasie kann diese im Befund erwähnt werden)
Invasive Neoplasien
- Invasion der Lamina propria
- Invasion der Muscularis propria (M. detrusor vesicae)

Tab. 1: WHO-Klassifikation von 2004 [Seitz et al. 2005]

Das Grading urothelialer Tumoren ist seit Jahrzehnten einem kontinuierlichen Wandel unterworfen und wird vermutlich auch nach dem neuen WHO-Vorschlag von 2004 weiter überarbeitet werden. In der Tab. 2 folgt eine Gegenüberstellung der verschiedenen Grading-Systeme im zeitlichen Verlauf [Lehmann et al. 2005]. Die Gegenüberstellung zeigt den schnellen Wandel, was Folge der mangelnden Akzeptanz des ISUP/WHO-Grading von 1998 bei Urologen und Pathologen war. Das modifizierte Grading von Malström et al. 1987 stellte die Basis für die Grading-Einteilungen von 1998 dar [Malström et al. 1987].

Zusammenfassend sind die neuen wesentlichen Erkenntnisse der WHO-Klassifikation von 2004 auf der einen Seite die Unterteilung des Urothelkarzinoms in nur noch zwei Grade in „low grade“ und „high grade“, welche 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 nichtinvasivem Wachstum unterschieden werden [Stief et al. 2006].

WHO 1973	Malmström 1987	ISUP/WHO 1998	WHO 2004
Papillom	Grad 1	Papillom	Papillom
Grad 1	Grad 2A	PUNLMP Low-grade-Karzinom	PUNLMP Low-grade-Karzinom
Grad 2	Grad 2B	High-grade Karzinom	High-grade-Karzinom
Grad 3	Grad 3-4	High-grade-Karzinom	High-grade-Karzinom

Tab. 2: Gegenüberstellung verschiedener Grading-Systeme [Lehmann et al. 2005]

Im Unterschied zur Klassifikation von 1973 werden in der WHO-Klassifikation von 1999 und 2004 pT1-Tumoren nun ausdrücklich als invasive Urothelkarzinome bezeichnet. Der Begriff „Oberflächliche Blasentumoren“ als Sammelbezeichnung für PUNLMP, nichtinvasive Urothelkarzinome, Carcinoma in situ und invasives Urothelkarzinom mit Invasion der Lamina propria ist mit der neuen Klassifikation obsolet. Stattdessen sollen die Termini „nichtinvasiv“ und „invasiv“ verwendet werden [Seitz et al. 2005].

In der vorliegenden Studie wurden bei der Auswertung der Histologie noch beide Klassifikationen parallel verwendet.

1.1.4.3 TNM-Klassifikation

Die Blasentumoren werden heute wie auch alle anderen Malignome nach dem UICC TNM-System klassifiziert. 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. Nach Entfernung des Tumors können weitere Angaben über die Entfernung bzw. Nichtentfernung im Gesunden (R-Status: R0 = Resektion im Gesunden, R1 = mikroskopische Tumorreste, R2 = makroskopische Tumorreste) sowie über das Tumorigradung gemacht werden [Hautmann, Huland 2006]. Beim Harnblasenkarzinom erfolgt die Beurteilung der T-Kategorie durch die histologische Untersuchung nach transurethraler Resektion. Die N-Kategorie wird nach pelviner Lymphadenektomie festgelegt. Röntgenthorax und Sonographie bzw. CT der Leber erfolgen zum Ausschluss von hämatogenen Metastasen und eine Skelettszintigraphie zum Ausschluss von Knochenmetastasen.

Innerhalb eines Tumors finden sich häufig unterschiedliche Differenzierungsgrade, wobei man sich in diesen Fällen an dem Befund mit der am stärksten abweichenden Zellmorphologie orientiert.

Das TNM-System für das Harnblasenkarzinom ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

T-Primärtumor

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

Ta Nichtinvasiver papillärer Tumor

Tis Carcinoma in situ: "flacher Tumor"

T1 Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe

T2 Tumor infiltriert Muskulatur

T2a Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)

T2b Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)

T3 Tumor infiltriert perivesikales Gewebe

T3a Mikroskopisch

T3b Makroskopisch (extravesikale Masse)

T4 Tumor infiltriert eines der folgenden Organe: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand

T4a Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina

T4b Tumor infiltriert Beckenwand oder Bauchwand

N Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen

N1 Metastase in solitärem LK ≤ 2 cm in größter Ausdehnung

N2 Metastase in solitärem LK > 2 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung oder in multiplen LK's, keiner mehr als 5 cm in größter Ausdehnung

N3 Metastasen in LK's > 5 cm in größter Ausdehnung

M Fernmetastasen

MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0 Kein Anhalt für Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen

Tab. 3: Stadieneinteilung nach dem UICC TNM-System [Hautmann, Huland 2006]

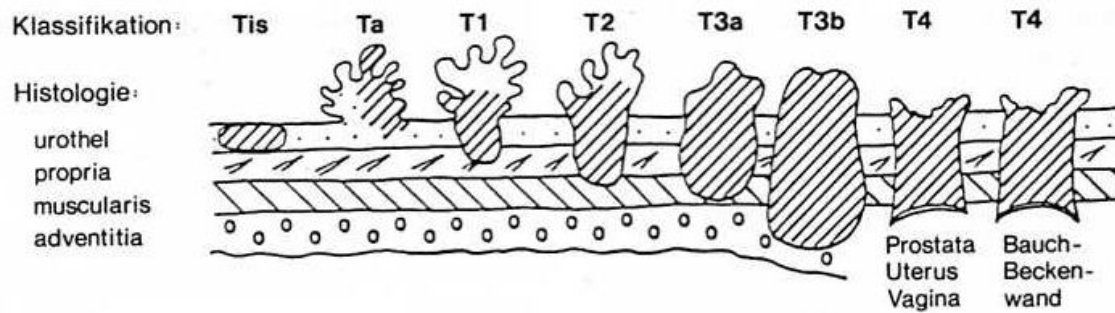


Abb. 2: Beschreibung eines Primärtumors: T-Kategorie [Rathert , Roth 1995]

Klinisch werden nach dem TNM-System nichtinvasiv wachsende (Tis, Ta, T1, N0, M0), muskelfiltrierende (T2-4, N0, M0), lymphogen (T1-4, N1-3, M0) und hämatogen (T1-4, N0-3, M1) metastasierende Harnblasenkarzinome unterschieden [Liedl et al. 2003]. Die 5-Jahresüberlebensrate wird durch lokales Tumorstadium, Lymphknoten- und Fernmetastasen bestimmt.

T1-Grad-III-Tumoren haben bereits in 10% positive Lymphknoten oder Fernmetastasen, T2-Tumoren in 29 bis 30%, T3a- und T3b-Tumoren in 40 bis 60% [Hautmann, Huland 2006].

1.1.5 Symptomatik

Das Kardinalsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie bei bis zu 80% der Patienten. Diese kann aber auch durch andere Tumoren des Harntraktes verursacht werden. Grundsätzlich muss jede schmerzlose Makrohämaturie als Hinweis auf einen Tumor im Urogenitaltrakt gelten, bis dieser sicher ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren können Miktionsbeschwerden wie Dysurie, Nykturie, Urgesymptomatik und Pollakisurie auftreten. In ca. 20 % bleiben die Harnblasenkarzinome zunächst ohne Symptome und werden lediglich im Rahmen einer Abklärung einer Mikrohämaturie, Makrohämaturie oder Leukozyturie entdeckt [Hautmann, Huland 2006].

1.1.6 Diagnostik

1.1.6.1 Obligate Untersuchungsverfahren

Da das nicht muskelinfiltrierende Harnblasenkarzinom überwiegend organerhaltend behandelt wird und eine Metastasierung selten ist, zielt die Primärdiagnostik auf die Beurteilung des lokalen Tumorstadiums.

Klinische Untersuchung

Diese beinhaltet die Palpation der Nierenlager, des Abdomens sowie die rektale Untersuchung der Prostata und der Ampulla recti beim Mann sowie die vaginale Untersuchung bei der Frau.

Urinzytologie

Transitionalepithelzellen, wie auch Karzinomzellen, werden in den Urin abgeschilfert und können so in einer Urinprobe oder Blasenspülprobe untersucht werden [Hautmann, Huland 2006]. Die Zytologiepräparate werden nach Papanicolaou gefärbt und unter dem Mikroskop nach den klassischen Malignitätskriterien beurteilt (genaue Ausführung siehe unter dem Punkt 2.3.2.).

Die größte Bedeutung der Urinzytologie liegt in der Primärdiagnose oder der Nachsorge von high-grade Läsionen nach der neuen WHO-Klassifikation. Diese Läsionen weisen ein hohes Malignitäts- und Progressionspotenzial auf [Zaak et al. 2006]. Die Domäne der Urinzytologie sind vor allem high-grade Tumoren, inklusive dem Carcinoma in situ, da hier die Sensitivität von 80% bis 95% hoch ist [Poulakis et al. 2001, Saad et al. 2002]. Für low-grade Tumoren und Dysplasien ist die Sensitivität mit ca. 25-40% jedoch enttäuschend [Lahme et al. 2001, Landmann et al. 1998, Zippe et al. 1999].

Die Urinzytologie gewinnt v.a. durch ihre hohe Spezifität, die in der Regel größer 90% ist [Zippe et al. 1999, Miyanaga et al. 1997, Glas et al. 2003]. In der Tab. 4 sind mehrere Studien mit den dazugehörigen Sensitivitäten und Spezifitäten der Urinzytologie aufgeführt.

Referenzen	Jahr	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Casella et al.	2000	52	89
Del Nero et al.	1999	46,6	
Lahme et al.	2001	45	
Landman et al.	1998	40	94
Ponsky et al.	2001	30,7	99,8
Poulakis et al.	2001	62	96
Ramakumar et al.	1999	44	95
Saad et al.	2002	48	87
Sözen et al.	2003	35	90
Zippe et al.	1999	33	100

Tab. 4: Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie aus verschiedenen Studien

Bisher jedoch ist die Urinzytologie der Goldstandard zur nichtinvasiven Diagnostik des Urothelkarzinoms, v.a. auch zur Nachsorgeuntersuchung eines bereits behandelten Karzinoms, um ein Rezidiv frühzeitig zu entdecken [Saad et al. 2002]. Indikationen zur Durchführung einer Urinzytologie sind allgemein Mikro- und Makrohämaturie, unklare Dysurie (Algurie), Urotheltumor (Verdacht, Verlaufskontrolle), Risikopatienten (Kanzero-genexposition) oder bei Verdacht auf Tumordinfiltration (Darmtumor, gynäkologischer Tumor).

Falsch positive Ergebnisse beruhen in den meisten Fällen auf Irritationen des Urothels, wie bei chronischen Entzündungen, Urolithiasis oder Dauerkatheter.

Sonographie des Abdomens

Die Sonographie dient zum einen der Beurteilung der Nieren, z.B. ob eine Stauungsniere durch Uretertumoren oder Steine vorliegt. Zum anderen können Harnblasentumore, je nach Größe, häufig schon durch die Sonographie erkannt werden. Flache urotheliale Neoplasien und kleine Tumoren hingegen können nicht identifiziert werden.

Laboruntersuchungen

Untersucht werden hierbei Parameter für die globale Nierenfunktion: Serumkreatinin, Blutbild und Gerinnung im Rahmen der Operationsvorbereitung zur transurethralen Resektion.

Urethro-Zystoskopie

Die Zystoskopie, eine endoskopische Untersuchung, ist das Standardverfahren in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. Mit diesem Verfahren können die Harnröhre und die Harnblase beurteilt werden, papilläre Tumoren oder solide Tumoren können in der Regel detektiert und anschließend biopsiert oder transurethral reseziert werden [Stief et al. 2006]. Eine Blasenspiegelung wird vorgenommen, wenn die Ursachen für eine Hämaturie geklärt werden müssen oder wenn der Verdacht auf einen Tumor bzw. einen Blasenstein oder sonstigen Fremdkörper in der Blase besteht. Auch bei Entleerungsstörungen und bei wiederkehrenden Harnwegsinfekten kommt diese Untersuchung zur Anwendung. Des Weiteren dient sie der Nachsorge nach Operationen von Blasentumoren. Es können sowohl starre als auch flexible Endoskope verwendet werden. Das Zystoskop besteht aus einem komplexen optischen Stablinsen-System, einer Lichtquelle und meist einer Spül- und Absaugvorrichtung (siehe Abb. 3). Durch Arbeitskanäle können chirurgische Instrumente (Faßzange, Biopsiezange) für operative Eingriffe oder für Entnahme von Biopsien in die Harnröhre eingeführt werden. Der äußere Teil des Geräts umfasst ein Objektiv und verschiedene Anschlüsse für das Lichtkabel, Hilfsinstrumente und Spülwasserzufluss bzw. -abfluss. Diese endoskopische Untersuchung kann über die Blase hinaus auch auf den oberen Harntrakt und das Nierenbecken angewandt werden. Dazu wird das Instrument über Harnröhre, Blase und Harnleiter bis ins Nierenbecken vorgeschoben (Ureterorenoskopie).

Jedoch können mit der Weißlichtendoskopie insbesondere flache urotheliale Läsionen, wie beispielsweise das Carcinoma in situ (Cis) oder die höhergradige Dysplasie, in der unauffällig erscheinenden Schleimhaut leicht übersehen werden, da sie nicht an typischen morphologischen Kriterien zu erkennen sind [Stief et al. 2006].

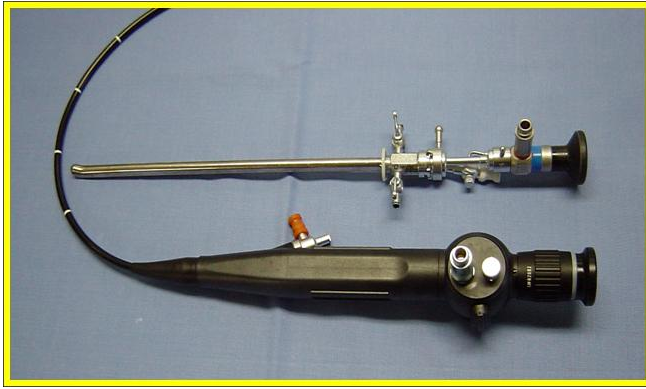


Abb. 3: Starres und flexibles Zystoskop

Ausscheidungsurogramm

Das Ausscheidungsurogramm gehört zu den radiologischen, bildgebenden Verfahren. Nach intravenöser Kontrastmittelapplikation wird das Kontrastmittel weitestgehend über die Nieren ausgeschieden. Im Verlauf des Ausscheidungsprozesses angefertigte Röntgenaufnahmen geben Auskunft über den anatomischen Zustand des Nierenkelchsystems, des Harnleiters und der Blase. So lassen sich Hinweise auf Verengungen, Verlagerungen (z. B. bei Verdrängung durch Tumoren), Ausweitungen sowie Hinweise auf Restharmengen finden. Ferner lassen sich aus dem zeitlichen Verlauf der Kontrastmittelanreicherung Rückschlüsse auf die Nierenfunktion ziehen.

1.1.6.2 Fakultative Untersuchungsverfahren

Photodynamische Diagnostik (PDD)

Da mit der Weißlichtendoskopie flache urotheliale Läsionen häufig übersehen werden, wird inzwischen die Kombination mit der PDD empfohlen. Die PDD weist im Gegensatz zur konventionellen Weißlichtendoskopie (Sensitivität von 73% [Kriegmair et al. 1996]), insbesondere für diese flachen Läsionen wie beispielsweise das Carcinoma in situ, eine höhere Sensitivität mit 90-96% [Filbeck et al. 1999, Kriegmair et al. 1996, Koenig et al. 1999, Zaak et al. 2001] auf. Studien zur PDD bestätigen eine Senkung der Residualtumorraten nach TUR gegenüber der Resektion unter Weißlicht [Riedl et al. 2001, Zaak et al. 2002]. Aus diesem Grund und der zusätzlich verbesserten Früherkennung, führt die PDD zu einer Verlängerung der rezidivfreien Intervalle. Die genaue Durchführung der PDD wird unter 2.6.2 beschrieben.

Indikationen zur Durchführung der PDD sind derzeit [Zaak et al. 2005]:

- Verdacht auf flache urotheliale Neoplasien
- Nachsorge von Patienten mit High-risk-Tumoren
- Nachweis einer positiven Urinzytologie bei negativem weißlichtendoskopischen Befund
- Multifokales Tumorwachstum

Nichtinvasive Blasentumortests

Eine hohe Intraobservervariabilität und niedrige Sensitivität der Urinzytologie bei low-grade-Tumoren, haben in den letzten Jahren zur Entwicklung von verschiedenen Urintests zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms geführt, welche teilweise auch bereits kommerziell vertrieben werden. Diese Tests, wie z.B. der „bladder tumor antigen test“ (in den Versionen BTASTat-Test und BTA-TRAK-Test), der „nuclear matrix protein test“ (NMP-22-Test), der „fibrinogen degrading products test“ und der „urinary bladder cancer test“ (UBC-Test) identifizieren spezifische, im Urin nachweisbare molekulare Marker für das Harnblasenkarzinom [Friedrich et al. 2003].

1.1.7 Therapie des nichtinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms

Die nichtinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinome lassen sich in die Carcinoma in situ (Tis), die nicht infiltrativen Tumoren (Ta) und solche, die in die Lamina propria infiltriert haben, differenzieren. Die Wahl der Therapie hängt von der Rezidiv- und der Progressionswahrscheinlichkeit ab. In der Regel ist die adäquate Therapie dieser Karzinome die komplette operative Entfernung, meist durch die transurethrale Resektion.

1.1.7.1 Operative Therapie

Je nach Ausbreitung und Stadium des Tumors stehen hier mehrere Möglichkeiten zur Verfügung:

Die transurethrale Resektion (TUR)

Bei der transurethralen Resektion wird der Tumor mit einer Elektroschlinge abgetragen. Die Tumorbasis inklusive der Blasenwandmuskulatur sowie die Tumorränder werden getrennt reseziert und zur histopathologischen Untersuchung geschickt. Die Resektion des Tumors muss ausreichend tief erfolgen, um die Muskelinfiltration beurteilen zu können. Je tiefer der Tumor infiltriert, desto schwieriger und problematischer wird die endoskopische Entfernung, aufgrund eines erhöhten Risikos der Blasenwandperforation und einer schon bestehenden Metastasierung. Eine Nachresektion nach 1 bis 4 Wochen erfolgt bei großen (>3cm), multifokalen und pT1-Tumoren, da in diesen Fällen die Erstresektion bis zu 80% unvollständig bleibt [Herr 1999].

Die radikale Zystektomie

Bei muskelinvasiven Blasentumoren T2-4a, N0-NX, M0 ist die radikale Zystektomie das Standardverfahren. Aber es findet auch seine Anwendung bei „high-risk“ Tumoren, die die Muskulatur noch nicht infiltriert haben, wie bei T1G3-Tumoren und bei BCG-resistenten Carcinoma in situ, da diese eine hohe Tendenz zur Progression zeigen [Oosterlinck et al. 2002]. Bei der Frau kommt es dabei, neben der Entfernung der Harnblase, zur Mitentfernung der vorderen Vaginalwand, ggf. der Adnexen, der Gebärmutter oder auch der Urethra. Beim Mann werden die Prostata, die Samenblasen und evtl. die Urethra mitentfernt. Von hoher prognostischer Bedeutung ist der Befall der mitentfernten regionalen Lymphknoten. Die Mortalität aufgrund des Eingriffs ist im letzten Jahrzehnt von 10% auf 2 bis 3% gesunken [Hautmann, Huland 2006].

Eine präoperative Radio- oder Chemotherapie hat die Überlebenschance nicht verbessert [Hellsten et al. 1998]. Die Lymphknotenbeteiligung und das Tumorstaging sind die einzigen unabhängigen Parameter für die Voraussage der Überlebensrate [Bassi et al. 1999].

1.1.7.2 Intravesikale Instillationstherapie

Man unterscheidet zwischen der intravesikalen Chemotherapie und der intravesikalen Immuntherapie.

Die intravesikale Chemotherapie

Hierfür stehen mehrere Medikamente zur Verfügung, wobei in Europa Mitomycin C (20-40 mg/20 ml NaCl), Adriamycin, Doxorubicin (50mg/ 50 ml NaCl) und Epirubicin (50-80 mg/50mg NaCl) die gängigsten sind [Liedl et al. 2003]. Als gesichert kann gelten, dass die intravesikale Chemotherapieprophylaxe die Rezidivrate bzw. die Zeit bis zum Eintreten eines Rezidivs gegenüber der alleinigen TUR positiv beeinflussen [Schwaibold et al. 1999]. Eine Metaanalyse von Huncharek et al. an 3703 Patienten ergab eine Reduktion der Rezidivrate nach einem Jahr um 44% gegenüber der alleinigen TUR [Huncharek et al. 2000]. Empfohlen wird die intravesikale Zytostatikaapplikation direkt im Anschluss an die TUR, dann wöchentlich oder alle 2 Wochen und danach in monatlichen Intervallen [Goebell et al. 2006]. Die Gesamtbehandlungsdauer sollte sechs Monate nicht überschreiten, außer bei einem verzögertem Beginn soll die Behandlung über 12 Monate durchgeführt werden. Das Rezidivrisiko kann durch die perioperative Instillation (Frühinstillation) innerhalb der ersten 24 Stunden nach TUR eines Tumors signifikant gesenkt werden [Stief et al. 2006]. Dies zeigt auch eine Metaanalyse zur Frühinstillation, in der sieben randomisierte Studien mit 1476 Patienten ausgewertet wurden, in der die alleinige TUR mit einer TUR und anschließender 1-maliger Instillation verglichen wurde. Das Ergebnis zeigte, dass die Rezidivrate durch die Früh-instillation von 48 auf 37% gesenkt werden konnte [Goebell et al. 2006].

Die intravesikale Immuntherapie

Zu den topischen intravesikalen Immuntherapieverfahren zählen die Instillation attenuierter BCG-Stämme, von Interferon- α und Keyhole-Limpet-Hemocyanin. Die intravesikale Instillationstherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) wird heute als Standardtherapie bei der Behandlung des Carcinoma in situ (Cis) der Harnblase sowie in der Rezidivprophylaxe bei Hochrisikopatienten mit nicht muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen eingesetzt. Kontrollierte Studien zur intravesikalen Therapie mit BCG zeigen eine Senkung der Rezidivrate im Vergleich zur alleinigen TUR um bis zu 47% [Goebell et al. 2006; Lamm et al. 1991]. Die BCG-Stämme gehören zum Mycobacterium tuberculosis-Komplex. Der genaue Wirkmechanismus ist bislang noch ungeklärt, es wird aber eine Initiierung einer Kaskade von lokalen und systemischen Immunantworten mit Freisetzung von TNF- α , Interferon, Interleukinen 1-12 und GM-CSF diskutiert [Liedl et al. 2003].

Beim Carcinoma in situ ist die BCG-Instillation inzwischen als Therapie der Wahl anerkannt. Die komplette Remissionsrate erreicht hier bis zu 80% [Lamm et al. 1991; Schwaibold et al. 1999]. Als großer Nachteil bei der BCG-Therapie erweisen sich die häufigen und z.T. ausgeprägten Nebenwirkungen. Als Hauptnebenwirkung ist die Zystitis zu nennen, die nahezu bei allen Patienten für ein bis zwei Tage vorhanden ist und in der Regel gut durch nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente beherrscht werden kann. Es kann außerdem zu Makrohämaturie, zu Fieber, zu Prostatitis und in seltensten Fällen zu einer BCG-induzierten Sepsis kommen [Lamm 1995]. Zur Vermeidung schwerwiegender Nebenwirkungen wird diese Therapie frühestens zwei Wochen nach der Transurethralen Resektion durchgeführt. Van der Meijden et al. konnten zusammenfassend zur BCG-Therapie in ihrer Studie feststellen, dass der exakte Wirkmechanismus unbekannt ist, die intravesikale Anwendung anderen Applikationsformen überlegen ist, BCG den Zytostatika in der Rezidivprophylaxe bei höherem Nebenwirkungsspektrum geringfügig überlegen ist, ein gesicherter Einfluss auf die Tumorprogression nicht belegt ist und dass eine Erhaltungstherapie effektiver ist, ohne dass ein optimales Schema existiert [van der Meijden et al. 2003].

1.1.8 Nachsorge und Prognose

Aufgrund der hohen Rezidivrate beim Harnblasenkarzinom (30-85%) und der Gefahr der Progression in ein muskeleinfiltrierendes Karzinom ist eine regelmäßige Nachsorge notwendig. Diese erfolgt bisher in der Regel durch die Zystoskopie und die Zytologie.

Der genaue Nachsorgeplan für oberflächliche Harnblasenkarzinome ist in Tabelle 5 dargestellt.

Untersuchung	1.Jahr	2.Jahr	3.-5. Jahr	Lebenslang
Körperliche Untersuchung	3	3 (1) - 6 (2)	6 (1) - 12 (2)	12 (4)
Zystoskopie, Zytologie, ggf. PDD	3	3 (1) - 6 (2)	6 (1) - 12 (2)	12 (4)
Abdomen-Sonografie	3	3 (1) - 6 (2)	6 (1) - 12 (2)	12 (4)
Ausscheidungsurografie (Tumoren im oberen Harntrakt)	12	12 (1+3)	12 (1+3)	12 (3+4)

Tab. 5: Nachsorge bei nichtinvasivem Harnblasenkarzinom (Zeitintervall in Monaten) [Liedl et al. 2003]

(1) bei mittlerem und hohem Risiko

(2) bei niedrigem Risiko

(3) obligat bei pathologischem Sonogramm, Symptomen, pathologischer Zytologie und unauffälliger Zystoskopie und panurothelialer Erkrankung

(4) bei hohem Risiko oder Symptomen

Bezüglich der Prognose spielen vor allem die Infiltrationstiefe sowie der Differenzierungsgrad eine entscheidende Rolle. Für das Risiko eines Rezidivs spielen mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle. Das Rezidivrisiko steigt, wenn der Tumordurchmesser mehr als 3 cm beträgt, multiple Tumoren existieren, bei zunehmender Entdifferenzierung sowie bei begleitendem Carcinoma in situ [Dorp et al. 2007].

1.2 Photodynamische Diagnostik (PDD)

1.2.1 Photodynamische Diagnostik versus Weißlichtendoskopie

Das bisherige Standardverfahren zur Blasentumordiagnostik ist die konventionelle Weißlichtendoskopie. Mit ihr sind v.a. die exophytisch wachsenden und soliden Tumoren gut zu erkennen und durch die transurethrale Resektion (TUR) zu entfernen. Die konventionelle Weisslichtendoskopie weist jedoch zwei entscheidende Defizite auf. Zum Einen werden flache Schleimhautläsionen, wie das Carcinoma in situ und hochgradige Dysplasien, häufig übersehen, da sie nicht an typisch morphologischen Kriterien zu erkennen sind und sie sich oft in der völlig unauffällig erscheinenden Mukosa befinden [Soloway et al. 1978]. Gerade diese Läsionen aber sind aufgrund der Gefahr der Progression in ein muskelinfiltrierendes Karzinom von entscheidender Bedeutung für die Prognose des Patienten. Zum Anderen können nach der Weisslichtendoskopie eine hohe Rate von Residualtumoren nachgewiesen werden. Dies ist auf übersehene bzw. zurückgelassene Tumoren bei der transurethralen Resektion zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund bestand schon immer das Streben, Verfahren wie die photodynamische Diagnostik (PDD) zur in-vivo Markierung urothelialer Neoplasien zu entwickeln, um auch unauffällig erscheinende Areale zu erkennen und damit die Residual-tumorrates zu senken. Das Grundprinzip der photodynamischen Diagnostik basiert auf der Wechselwirkung von Licht mit bestimmten Farbstoffen (Photosensibilisatoren) im Gewebe. Die Lichtanregung der Photosensibilisatoren mit einer für sie charakteristischen Wellenlänge führt zur Emission einer Fluoreszenz, die zur Tumordiagnostik genutzt werden kann. In einer von Reich et al. publizierten Studie an 605 Patienten wurden bei 25,2% der Patienten urotheliale Neoplasien nur aufgrund dieser positiven Fluoreszenz entdeckt. Es wurde vor allem ein hoher Anteil (42,9%) der Carcinoma in situ in der konventionellen Weißlichtendoskopie übersehen [Reich et al. 2000]. Kriegmair und Hofstetter berichteten 1994 erstmals über eine PDD unter der Verwendung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) [Kriegmair et al. 1994]. 5-ALA ist eine körpereigene Substanz der Hämbiosynthese, die nach exogener Applikation zu einer Anreicherung von photodynamisch aktivem Protoporphyrin IX (PPIX) in Harnblasenkarzinomzellen führt. Mittels einer inkoherenten Lichtquelle kann dann während der Endoskopie die Emission einer roten Fluoreszenz aus PPIX-angereicherten Arealen induziert werden. Nachfolgende Bilder sollen den Unterschied zwischen Weißlichtendoskopie und Fluoreszenzendoskopie aufzeigen.

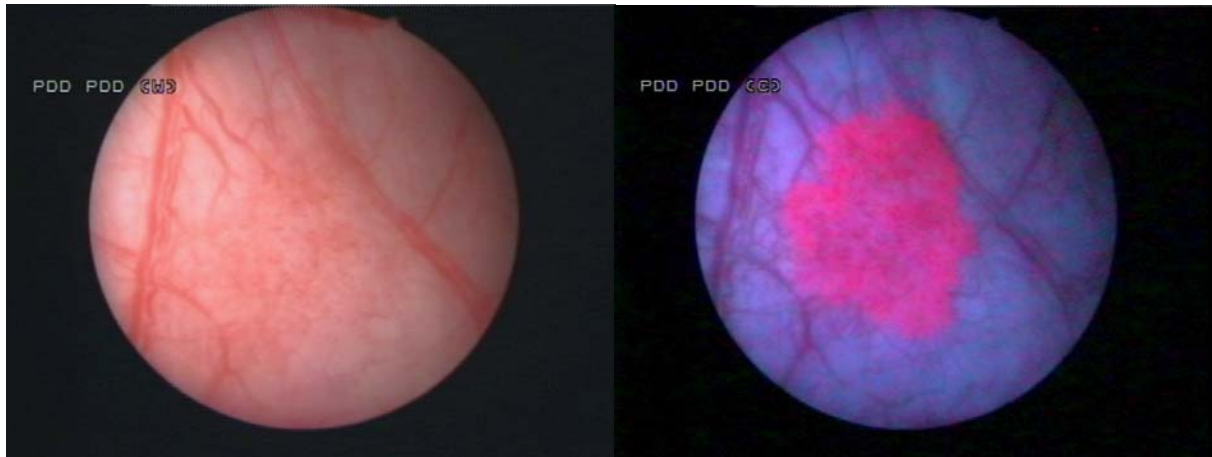


Abb. 4: Bsp.1 für Carcinoma in situ: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re)
[Zaak,2007]

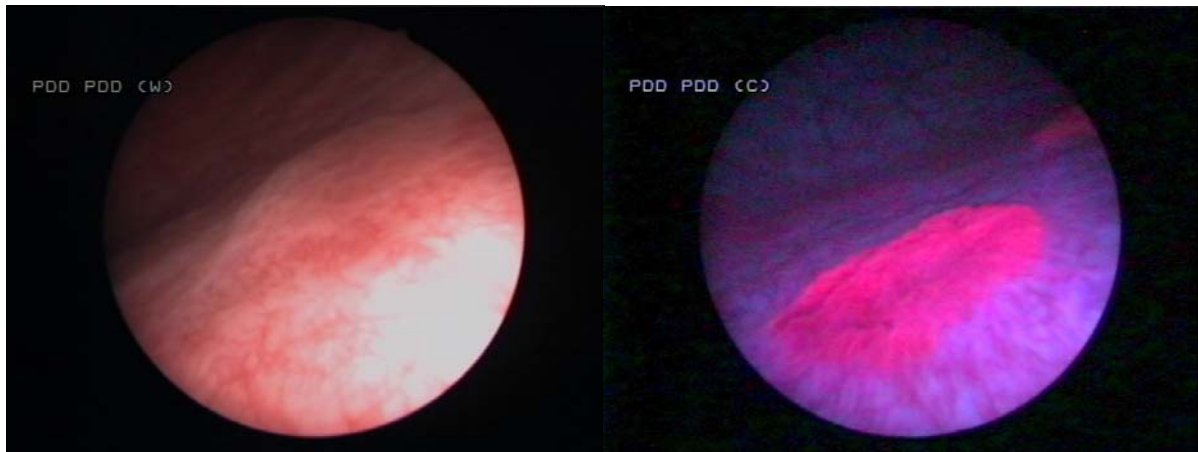


Abb. 5: Bsp.2 für Carcinoma in situ: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re)
[Zaak, 2007]

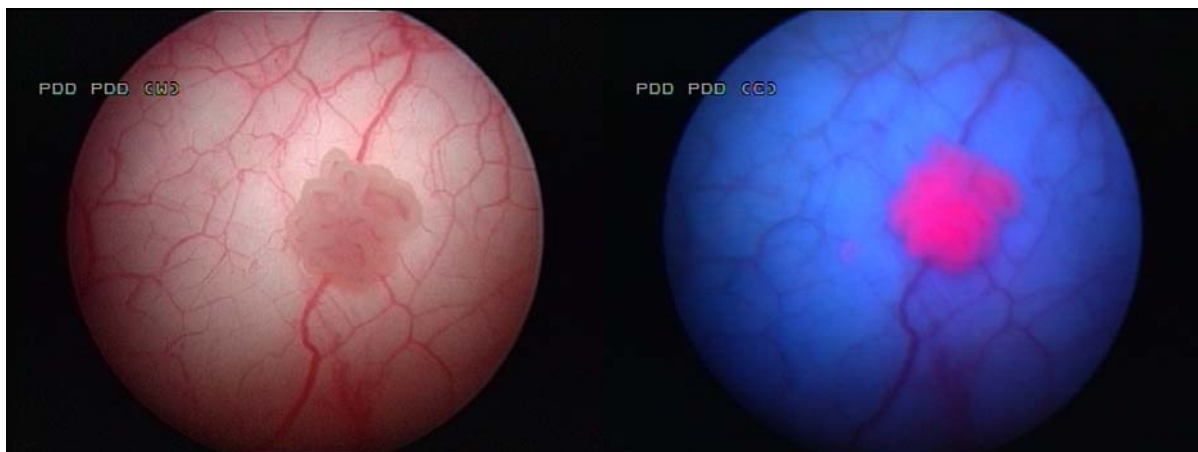


Abb. 6: Papillärer Tumor: low-grade non invasive: Weißlichtzystoskopie (li), Fluoreszenzzystoskopie (re)
[Zaak, 2007]

Mittlerweile wird neben 5-ALA eine weitere Substanz, der so genannte Hexyl-ALA-Ester (Hexvix®; Fa. Photocure ASA; Norwegen) zur PDD eingesetzt. Dieser Ester soll eine schnellere Aufnahme der Substanz in den Tumorzellverband bewirken. Für den Hexyl-ALA-Ester besteht seit März 2005 in 27 Europäischen Staaten eine Zulassung durch die Europäischen Zulassungsbehörden im Rahmen der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.

In verschiedenen Studien wurde in den vergangenen 10 Jahren die Effizienz dieses Verfahrens untersucht. Im Vergleich zur klassischen Weißlichtendoskopie konnte, insbesondere in der Diagnostik des Carcinoma in situ durch mehrere Arbeitsgruppen eine signifikante Zunahme der Detektionsrate in bis zu 50 % der Fälle nachgewiesen werden [Zaak et al. 2005]. In diesem Zusammenhang wird das Verfahren auch in den aktuellen Guidelines der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) zur Diagnostik des Carcinoma in situ der Harnblase empfohlen [van der Meijden et al. 2005]. Die Sensitivitäten und Spezifitäten des Fluorenzystoskopie (FZ) im Vergleich zur Weißlichtzystoskopie (WL) sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Referenz	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
	FZ	FZ	WL	WL
Kriegmair et al. 2002	97	67	73	69
Riedl et al. 2001	95	43	76	/
Filbeck et al. 2002	96	67	68	66
Koenig et al. 1999	87	59	69	89
Schmidbauer et al. 2004	97	/	78	/

Tab. 6: Sensitivität und Spezifität des Fluoreszenzzytoskopie im Vergleich zur Weißlichtendoskopie

Drei kontrollierte, randomisierte Phase-III-Studien untersuchten mittlerweile den Einfluss der fluoreszenzgestützten PDD auf die Residualtumorraten. In allen Studien konnte eine signifikante Reduktion der Residualtumorraten um 20 % unter fluoreszenzgestützter Resektion gegenüber der klassischen Weißlichtendoskopie demonstriert werden [Riedl et al. 2001; Filbeck et al. 2002; Kriegmair et al. 2002]. Eine weitere Langzeitstudie von Filbeck und Mitarbeitern untersuchte in diesem Zusammenhang den Einfluss des Verfahrens auf die Rezidivraten bei Patienten mit einem nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom [Filbeck et al. 2003]. Es zeigte sich, dass durch den Einsatz der PDD eine signifikante Reduktion der Rezidivraten nach TUR eines Erstbefundes gegenüber der klassischen Weißlicht-TUR erzielt werden kann. Lediglich 13% der Patienten in der PDD-Gruppe zeigten im Nachbeobachtungsintervall (Median 5 Jahre) ein Rezidiv, wohingegen 35 % in der Weißlichtgruppe ein Tumorrezidiv aufwiesen ($p < 0.005$). Auch Denzinger et al. beweisen in ihrer Studie die Überlegenheit der ALA-induzierten Fluoreszenzdiagnostik im Vergleich zur konventionellen Weißlichtzystoskopie, auch in Bezug auf das rezidivfreie Überleben der Patienten mit nicht muskel-invasivem Harnblasenkarzinom im „Langzeit-Follow-up“ [Denzinger et al. 2006]. Die geringere Anzahl von Rezidiven hat eine Reduktion der Operationen zur Folge, das bedeutet für den Patienten eine geringere Morbidität und für das Gesundheitssystem reduzierte Behandlungskosten.

Kürzlich konnten Jocham und Mitarbeiter in einer multizentrischen Phase-III-Studie zeigen, dass 96% der Tumore in ihrer Studie mit der PDD entdeckt werden konnten im Vergleich zu nur 77% bei Verwendung ausschließlich der Weißlichtendoskopie. Besonders auffällig ist die Differenz bei Dyslasien (93% vs. 48%), Cacinoma in situ (95% vs. 68%) und oberflächliche papilläre Tumoren (96% vs. 85%) [Jocham et al. 2005].

1.2.2 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenz und Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

1.2.2.1 Physikalische Grundlagen der Fluoreszenz

Im molekularen Maßstab wird die Wechselwirkung von Licht mit Materie als Interaktion eines „Lichtteilchens“ (Photon) beschrieben. Ein einzelnes Photon kann unterschiedlich viel Energie tragen, was sich in der Frequenz bzw. Wellenlänge der zugrunde liegenden elektromagnetischen Schwingung äußert und vom Auge als unterschiedliche Farbe wahrgenommen wird. Je höher die Frequenz, d.h. je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher ist das Photon. Der wellenlängenabhängige Farbeindruck, die Spektralfarbe, ist in Abb. 7 dargestellt und macht den Energieunterschied zwischen „blauen“ und „roten“ Photonen deutlich. Demnach sind also „blaue“ Photonen energiereicher als „rote“ Photonen. Die Elektronenhüllen von Molekülen und Atomen sind die Wechselwirkungspartner für Licht. Bei einem Absorptionsprozess wird die Photonenenergie auf die Elektronen übertragen, die dadurch auf eine energiereichere „Bahn“ angehoben werden, siehe Abb. 8. Das Molekül befindet sich in einem angeregten Zustand und geht in kürzester Zeit wieder in den Grundzustand zurück. Die Anregungsenergie kann entweder in Bewegungsenergie des Atoms übergehen, was letztlich zu einer Erwärmung der Substanz führt, oder in Form „neu entstehender“ Photonen abgegeben werden, wozu auch die Fluoreszenz zählt. Da ein Teil der Anregungsenergie bereits in Bewegungsenergie umgewandelt wird, bevor die Fluoreszenzphotonen emittiert werden, ist die Energie des Fluoreszenzphotons immer etwas geringer als die des Anregungsphotons, d.h. die Fluoreszenz ist demnach „zum Roten hin“ verschoben.

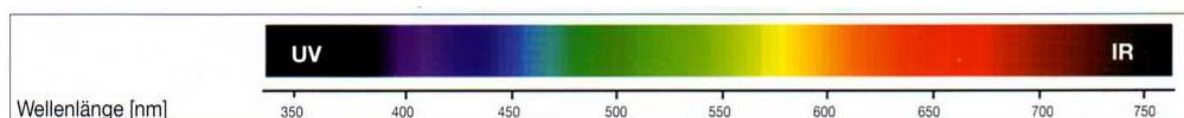


Abb. 7: Das Spektrum elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Bereich mit Angabe der Wellenlänge

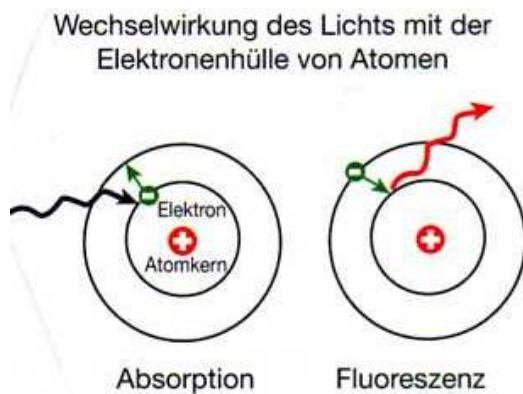


Abb. 8: Wechselwirkung des Lichts mit der Elektronenhülle von Atomen

1.2.2.2 Wirkungsweise von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

5-ALA ist das Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese und wird im Zielgewebe über mehrere Schritte zu Porphyrinen, v.a. zu Protoporphyrin IX (PPIX) umgewandelt (siehe Abb. 9). PPIX stellt den eigentlichen Photosensibilisator dar, 5-Aminolävulinsäure selbst ist nicht fluoreszierend. Nach exogener Applikation von 5-ALA kommt es zu einer Anreicherung von endogenen Porphyrinen, insbesondere von PPIX, in Zellen epithelialen Ursprungs. Seine tumorselektive Akkumulation in Harnblasenkarzinomen konnte an einem tierexperimentellen Modell nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzanregungsspektrum von PPIX weist ein Maximum im violettblauen Wellenlängenbereich um 400 nm auf (siehe Abb. 10). Als Fluoreszenzanregungslichtquelle wurde zunächst ein Krypton-Ionen-Laser verwendet. Die klinische Praktikabilität war hierbei jedoch eingeschränkt, da zur Ausleuchtung der Harnblase mit dem Laser spezielle Kunststofflichtleiter erforderlich waren. Mit der Entwicklung einer inkohärenten Hochleistungslichtquelle, dem D-Light [Fa. Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen] konnte das Verfahren entscheidend vereinfacht werden, so dass eine breite klinische Anwendung möglich war. Das D-Light transmittiert mittels einer Bandpaßfilterung violettblaues Anregungslicht der Wellenlänge zwischen 375 und 440 nm durch ein Glasfaserbeleuchtungs-bündel. Ein Langpaßfilter im Okular des Zystoskops erzeugt einen Farbkontrast zwischen der roten Fluoreszenz der urothelialen Neoplasien und der im rückgestreuten Anregungslicht blau dargestellten, normalen Harnblasenschleimhaut. Mit dem D-Light können prinzipiell alle herkömmlichen endoskopischen Instrumente kombiniert werden. Lediglich spezielle Endoskopieoptiken mit integriertem Lichtleitfaserbündel und gelbem Beobachtungsfiter im Okular sind hierzu erforderlich.

Die Fluoreszenzendoskopie kann ohne weitere Hilfsmittel mit dem bloßen Auge durchgeführt werden. Die Fluoreszenzintensität ist jedoch zu gering um mit handelsüblichen Endokameras aufgenommen werden zu können. Es wurde deshalb eine spezielle Kamera [Fa. Karl Storz GmbH & Co, Tuttlingen] entwickelt, die nicht nur im Rotkanal empfindlicher ist, sondern auch zwischen den beiden Betriebsmodi Weißlicht und Fluoreszenz unterscheidet und die jeweils optimalen Einstellungen zur Verfügung stellt.

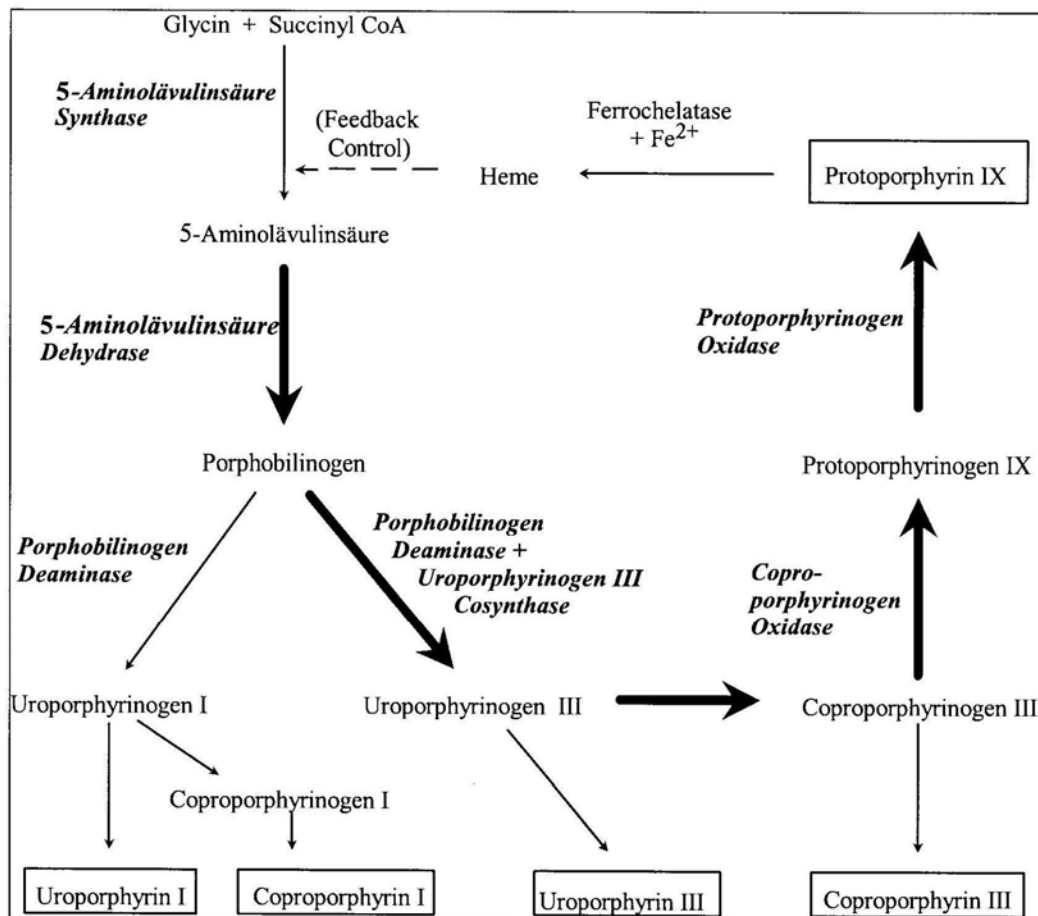


Abb. 9: Hämbiosynthese

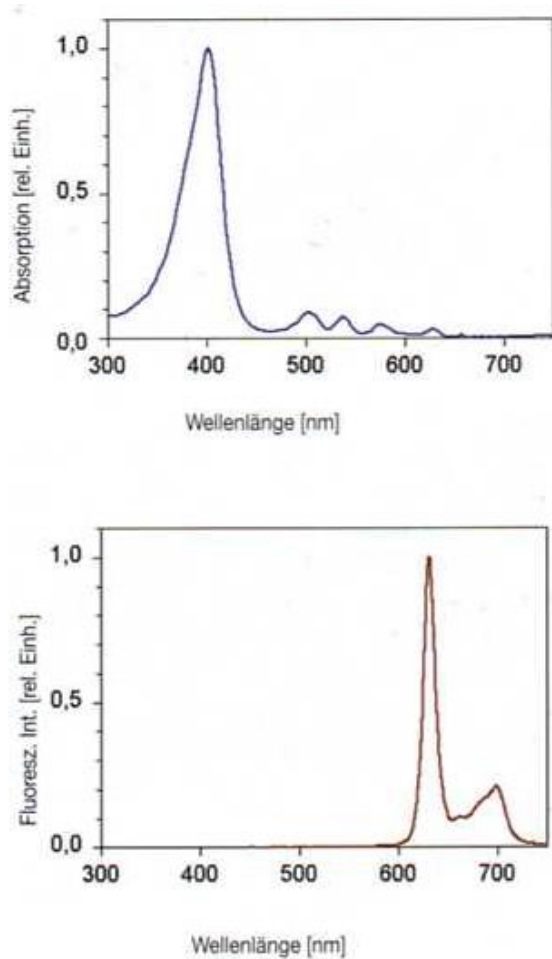


Abb. 10: Absorptionsspektrum (oben) und Fluoreszenzspektrum (unten) von PPIX in Methanol

2-3 Stunden vor der geplanten Fluoreszenzendoskopie wird die 5-Aminolävulinsäure (1,5 g 5-Aminolävulinsäurehydrochlorid in 50 ml Phosphatpuffer) oder der Hexyl-Ester mittels eines sterilen Einmalkatheters intravesikal appliziert. Aus Stabilitätsgründen muss die Lösung frisch zubereitet werden.

Sowohl papilläre Tumoren, als auch die flachen Läsionen fluoreszieren rot und zeichnen sich mit hohem Kontrast von der blauvioletten Schleimhaut der übrigen Blase ab. In gleicher Sitzung kann die TUR oder Nd-YAG-Laserkoagulation fluoreszenzkontrolliert durchgeführt und anschließend das Resektionsareal auf Residualtumor und Blutungsfreiheit überprüft werden.

1.3 Tumormarker

1.3.1 Überblick

Allgemein werden zelluläre Tumormarker von humoralen Tumormarkern unterschieden:

Zu den **zellulären Tumormarkern** zählen zellmembranständige Antigene, Hormon- und Wachstumsrezeptoren sowie molekulargenetische Veränderungen.

Bei den **humoralen Tumormarkern** wiederum lassen sich im Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten Substanzen, die vom Tumorgewebe synthetisiert und seziniert, durch Tumorzerfall freigesetzt oder als Reaktion des Organismus auf einen Tumor gebildet werden, in erhöhten Konzentrationen nachweisen.

Durch eine qualitative oder quantitative Analyse kann somit eine Aussage über Vorliegen, Verlauf oder Prognose von bösartigen Erkrankungen möglich werden.

Urinlösliche urotheliale Tumormarker sind Hilfsmittel in der Urologie, die seit ungefähr 15 Jahren in wissenschaftlichen Untersuchungen auf ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft hin überprüft werden und in der urologischen Onkologie weite Verbreitung gefunden haben. Dies trifft insbesondere für die Prostata mit dem prostataspezifischen Antigen (PSA), die Hoden-tumormarker HCG (humanes Choriongonadotropin) und das AFP (α -Fetoprotein) zu. In den letzten Jahren steigt zunehmend das Interesse ähnlich bedeutsame Markersysteme für das Harnblasenkarzinom zu entwickeln. Diese nichtinvasiven Markersysteme beruhen meist auf der Erkennung von tumorassoziierten Stoffen, wie z. B. Enzymen, Zuckerpolymeren, von Tumorzellen produzierte Proteine oder Genexpressionen [Soloway et al. 2001].

Inzwischen gibt es eine Reihe dieser nichtinvasiven Testverfahren. Nach van Rhijen et al. werden bis zum jetzigen Zeitpunkt der NMP22BladderChek, der Immunozyt-Test und der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), welche auch von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA anerkannt wurden, als die vielversprechendsten Marker bei der Tumorüberwachung angesehen [van Rhijen et al. 2005]. In der Spezifität ist die Urinzytologie bisher allen untersuchten Markern überlegen, jedoch konnten einige Studien zeigen, dass Marker wie NMP22, BTA-Stat, HA-Haase, Immunocyt, UroVysion eine höhere Sensitivität aufweisen als die Urinzytologie in der Diagnostik von Harnblasenkarzinomen [Lokeshwar et al. 2001, van Rhijn et al. 2005]. Hier liegt möglicherweise ein Ansatzpunkt für den klinischen Einsatz dieser Testverfahren, um die Zahl der erforderlichen Kontrollzystoskopen zu reduzieren.

Nachfolgende Tabelle von van Rhijn et al. gibt einen Überblick über die verschiedenen Marker und ihre Validität [van Rhijn et al. 2005].

Marker	Studies/institute (n/n)	No. pts.	Median sensitivity (%)	Range	No. pts.	Median specificity (%)	Range
BTastat	17/14	1377	58	29-74	2084	73	56-86
BTA trak	4/4	360	71	60-83	195	66	60-79
NMP22	15/12	838	71	47-100	1203	73	55-98
FDP	4/4	168	54	47-68	173	61	25-80
ImmunoCyt	6/5	276	67	52-100	683	75	62-82
Cytometry	5/5	364	60	45-85	89	82	50-92
Quanticyt	5/2	129	58	45-65	227	76	68-87
Hb-dipstick	2/2	117	40	37-41	113	87	87
LewisX	3/2	95	75	68-79	215	85	67-86
FISH	4/4	165	79	70-86	147	70	66-93
Telomerase	3/3	146	39	29-66	-	Na	Na
Microsatellite	6/4	108	82	75-92	153	89	79-100
CYFRA21-1	3/2	156	85	75-88	323	82	73-95
UBC	5/4	267	60	21-80	480	87	72-95
Cytokeratin20	2/2	117	85	79-87	61	76	76
BTA	5/5	436	48	32-58	216	92	91-92
TPS	3/2	179	65	50-80	246	83	63-95
Cytology	26/20	2213	35	13-75	3322	94	85-100

Tab. 7: Der Median der Sensitivität und Spezifität, die Anzahl der Studien, Institutionen und Patienten [van Rhijn et al. 2005]

Für die nichtinvasive Messung des Tumormarkers, wie beispielsweise den NMP22, sprechen folgende Indikationen:

- der klinische Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom durch Makro-, Mikrohämaturie, suspekten Zyto- oder Sonobefund
- Screening von Risikopopulationen, wie Rauchern oder beruflich exponierten Patienten
- Monitoring bei bekanntem und therapiertem Harnblasenkarzinom

Das Ziel der Messung eines uringebundenen Tumormarkers bei der Diagnose eines Blasen-tumors ist es, Risikopopulationen im Screening frühzeitig zu erfassen sowie die Anzahl unnötiger Zystoskopien in der Tumornachsorge zu reduzieren. Um dies zu ermöglichen, ist ein idealer Tumormarker Voraussetzung, welcher möglichst nachfolgende Kriterien erfüllen sollte:

- nichtinvasiv gewinnbar
- Zielsubstanz stabil
- diagnostisch und prognostisch verwertbar
- technisch einfach durchführbar
- Technologie flächendeckend verfügbar
- Ergebnisse schnell verfügbar
- Interpretation der Ergebnisse objektiv
- kostengünstig

In der nachfolgenden Tabelle ist die Zielsetzung der Idealvorstellung gegenübergestellt:

Zielsetzung	Idealvorstellung
Diagnostisches Hilfsmittel	100%ige Sensitivität → keine falsch-negativen Ergebnisse 100%ige Spezifität → keine falsch-positiven Ergebnisse
Stadieneinteilung	Relation zur Tumorgroße- und ausbreitung
Prognose	Aussage über Krankheitsverlauf
Therapieauswahl	Entscheidungshilfe
Therapiekontrolle	Korrelation zum Krankheitsverlauf
Rezidiverkennung	Tumormarker-Anstieg vor Klinik

Tab. 8: Zielsetzung versus Idealvorstellung

Limitiert werden diese Tests meist durch die genaue Festlegung und Einhaltung der Ausschlusskriterien, wie Harnwegsinfekt, intravesikale Instillationstherapien, Harnableitungen oder einer Makrohämaturie [Zaak et al. 2006]. Diese müssen für jeden einzelnen Test exakt definiert werden, um die Zahl „falsch positiver“ Ergebnisse möglichst gering zu halten.

1.3.2 NMP22®BladderChek

Eines der nichtinvasiven Tumormarkerverfahren, das in dieser Arbeit genauer untersucht, an der Photodynamischen Diagnostik validiert und mit der Urinzytologie verglichen werden soll, ist der NMP-22 Test.

Den Matritech NMP22-Test gibt es in zwei von der FDA zugelassenen Versionen, als quantitativen (Zulassung Januar 2000) und qualitativen (Zulassung April 2003) In-vitro-Test, indiziert als Hilfe bei Diagnose und Monitoring von Blasenkrebspatienten in Verbindung mit der Standarddiagnostik. Das quantitative NMP22-ELISA-Testsystem wurde für die schnelle Bestimmung in professionellen Laborbetrieben konzipiert und es besteht Erfahrung aus 10 Jahren wissenschaftlicher Datenauswertung mit mehr als 10 000 Proben. Der neue qualitative NMP22®BladderChek wurde entwickelt für die einfache und schnelle Handhabung in Praxen ohne entsprechende Laborausrüstung für ELISA-Kits und liefert innerhalb von 30 Minuten ein qualitatives Ergebnis. Er weist bis dato aber nur 3 Jahre wissenschaftliche Datenauswertung auf, mit einer analysierten Zahl von etwa 3000 Proben, größtenteils aus amerikanischen Universitätszentren.

Da Harnblasenentzündungen, Hämaturie, Fremdkörper oder eine BCG-Therapie insbesondere bei den Proteinmarkern zu falsch-positiven Ergebnissen führen können [Konety et al. 2007], wurden bei der Verwendung des NMP22®BladderChek in dieser Studie folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- Akute, massive Harnwegsinfektionen
- Instrumentationen im Blasen- oder Harntrakt innerhalb der letzten 2 Wochen
- Darminterponate im Harntrakt
- Andere Tumoren im Harntrakt
- Urolithiasis
- Patienten mit einem Dauerkatheter
- aktive Chemo-, Immuno- oder Strahlentherapie.

1.3.2.1 Struktur und Aufgaben des Nukleären-Matrix-Proteins

NMP-22 steht für Nukleäres-Matrix-Protein-22 und zählt zu den tumorassoziierten Antigenen. Diese Proteine sind 50-KD RNA-Proteine und bilden das strukturelle Stützgerüst des Nukleus [Lahme et al. 2001]. Nukleäre-Matrix-Proteine bilden den inneren strukturellen Rahmen des Zellkerns und unterstützen die DNA-Organisation während der Zellteilung, bilden die 3D-Struktur des Zellkerns und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation nukleärer Prozesse, wie der DNA-Replikation und der Genexpression [Getzenberg RH et al. 1994]. Das NMP22 ist u.a. am Aufbau des Spindelapparates sowie der Chromosomenpositionierung während der Mitose beteiligt. Nukleäre-Matrix-Proteine gibt es tausendfach im Zellkern und sie variieren je nach Zelltyp, Zelldifferenzierungsphase, Zellzyklus und Tumortyp. Die Nukleären-Matrix-Proteine werden von Tumorzellen um den Faktor 10-100 vermehrt gebildet und während der Apoptose freigesetzt. Somit ist NMP-22 bei Patienten mit Blasenkarzinom im Urin erhöht [Getzenberg RH et al. 1996] und kann durch einen ELISA-Immunoassay im Urin nachgewiesen werden. Dies geschieht durch zwei monoklonale Antikörper, MAb302-22 und MAb302-18, die dieses nukleäre Matrix Protein erkennen [Miyanaga et al. 1997].

Bei dem in der Studie verwendeten NMP22®BladderChek [Matritech, Germany] handelt es sich um einen neuen In-vitro Immunoassay Point-of-Care (POC) Schnelltest zum Nachweis von Nukleärem-Matrix-Protein-22 im Urin. Dieser kann im Gegensatz zu dem meist bisher verwendeten und untersuchten NMP22®-ELISA-Verfahren ohne technische Hilfsmittel binnen 30 Minuten durchgeführt werden. Der Grenzwert für eine positive Reaktion, der so genannte Cut-off, liegt bei dem NMP22®BladderChek bei 10 U/ml. Der NMP22®-ELISA benötigt hingegen sechs Stunden, ist umständlicher und arbeitsintensiver.

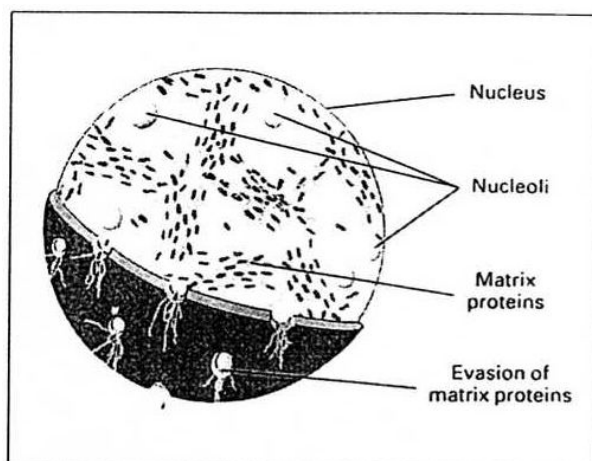


Abb. 11: Die Nukleären-Matrix-Proteine bilden den inneren strukturellen Rahmen des Zellkerns [Lahme et al. 2001]

1.3.2.2 Bisherige Untersuchungen zum NMP-22

Der NMP-22 Test wurde bisher in zahlreichen Studien mit einer großen Breite der Ergebnisse validiert. Die Sensitivität reicht dabei von 44% - 100% und die Spezifität von 60% - 95% [Glas et al. 2003]. In der Studie von Soloway et al., die 125 Patienten umfasst, beträgt die Sensitivität für den NMP-22 Test 70% und die Spezifität 79%. Alle Patienten mit invasivem Tumor waren NMP-22 positiv [Soloway et al. 1996]. Miyanaga et al. zeigten bei 300 Patienten eine Sensitivität von 81%. Die Spezifität lag aufgrund vieler Patienten mit einem akuten Harnwegsinfekt bei 64% [Miyanaga et al. 1997].

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse gibt nachfolgende Tabelle.

Referenzen	Cutoff (U/ml)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Sözen et al. 1999	10	73	81
Zippe et al. 1999	10	100	86
Casella et al. 2000	10	52	84
Sharma et al. 1999	10	67	83
Ramakumar et al. 1999	3,6	53	60
Landman et al. 1998	7	81	77
Giannopoulos et al. 2001	8	69	68
Miyanaga et al. 1999	12	91	76
Paoluzzi et al. 1999	10	84	62
Abbate et al. 1998	12	54	95
Lee 2001	7,7	76	72
Chahal et al. 2001	10	44	91
Lahme et al. 2001	10	63	76
Oge et al. 2001	10	74	60

Tab. 9: Sensitivität und Spezifität des NMP22 Test, validiert in zahlreichen Studien [Glas et al. 2003]

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Den bisherigen Goldstandard in der Diagnosestellung und der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms stellen die Zystoskopie und die Zytologie dar. Aufgrund der hohen Rezidivrate beim Harnblasenkarzinom und um eine Progression in ein invasives Karzinom zu vermeiden, wird eine Zystoskopie alle 3-4 Monate in den ersten zwei Jahren und in den folgenden Jahren in einem größeren Zeitintervall im Rahmen der Nachsorge empfohlen. Jedoch ist die Zystoskopie ein invasives, zeitaufwendiges, für den Patienten unangenehmes und auch kostenintensives Untersuchungsverfahren. Die Zytologie ist das bisher klassische nichtinvasive Untersuchungsverfahren und wird schon seit 1945, mit der Einführung der Färbemethode von Papanicolaou und Marschall, zur Bestimmung des Blasenkarzinoms bei Risikopatienten verwendet. Sie weist mit knapp 100% eine hohe Spezifität auf [Zippe et al. 1999, Miyanaga et al. 1997], die Sensitivität v.a. für low-grade Tumoren jedoch ist enttäuschend. Des Weiteren ist die Zytologie abhängig von der Beurteilung und Erfahrung der Zytopathologen und ist somit keine objektive Methode.

Diese Gründe waren u.a. die Ursache für die Entwicklung nichtinvasiver untersucherunabhängiger Urinmarkertests mit dem Ziel eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie die Zystoskopie zu erhalten.

Einer der kommerziell erhältlichen Testverfahren ist der NMP-22 BladderCheck®. Dieser neue Test soll innerhalb von 30 Minuten ein valides Testergebnis liefern.

Das Ziel dieser Studie war es, den NMP-22 BladderCheck® als nichtinvasive Methode an der gegenwärtig sensitivsten endoskopischen Methode, der photodynamische Diagnostik, zu validieren. Darüber hinaus wurden die Sensitivitäten der Urinzytologie, der Spülzytologie und der klassischen Weißlichtendoskopie bestimmt und miteinander verglichen.

Die Fragen, die sich hierbei aufwerfen sind, ob sich durch die Validierung des NMP22-Tests anhand der PDD die Sensitivität durch mehr gefundene Tumore verschlechtert und ob sich die Spezifität verbessert, aufgrund einer Senkung der „falsch-positiven“ Ergebnisse. Die entscheidende Frage ist letztendlich, ob der NMP-22 BladderCheck® eine Relevanz in der klinischen Routine einnehmen könnte und in der Tumornachsorge eine Alternative zur Zystoskopie und Urinzytologie darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In der Zeit von September 2004 bis April 2005 wurden insgesamt 100 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Altersvarianz der 29 Frauen und 71 Männer liegt zwischen 18 und 94 Jahren. Das Durchschnittsalter beträgt 67,9 Jahre.

Die klinischen und histomorphologischen Klassifikationen sind in der Tab. 10 zusammengefasst.

Anzahl der Patienten (männlich/weiblich)	100 (71 / 29)
Durchschnittsalter (jüngster pat./ ältester Pat.)	67,9 (18 / 94)
Anzahl der Tumornachsorgen (davon maligne/benigne)	70 (27 / 43)
Anzahl der tumorsuspekten Erstbefunde (davon maligne/benigne)	30 (13 / 17)
Tumorstaging	
Tx	2
Ta	22
T1	4
≥T2	3
Tis	9
Tumorgrading	
G1	16
G2	6
G3	18
Instillationen innerhalb der letzten 2 Jahre (BCG/Mitomycin)	21 (9 / 12)
Klinischer Verdacht auf Blasen tumor gestellt durch	
Makrohämaturie	24
Mikrohämaturie	6
Susp. Zyto-Befund	5
Susp. Sono-Befund	3
Susp. Zystoskopie-Befund	22

Tab. 10: Klinische und histomorphologische Klassifikationen der Studie

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, bei denen aufgrund von Symptomen oder klinischen Befunden ein klinischer Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom vorlag oder Patienten, die im Rahmen der Nachsorge eines Blasentumors untersucht wurden.

Um eine Tumornachsorge handelte es sich bei 70 Patienten. Die vorangegangenen Histologien dieser Patienten sind in Tab. 11 aufgeführt.

	pTa	pT1	pT2	pTx	pTis	
G1	20			1		21
G2	20	3	2	1		26
G3	3	5	2		12	22
Gesamt	44	8	4	2	12	70/69

Tab. 11: Vorangegangene Histologien der Nachsorgepatienten (n=70)

Die restlichen 30 Patienten wurden aufgrund eines Verdachts auf ein Harnblasenkarzinom durch Hämaturie, suspekta Zytologie, suspekten Sono- oder Zystoskopiebefund in die Studie aufgenommen.

Folgende Ausschlusskriterien wurden für die Teilnahme der Patienten an der Studie festgelegt und eingehalten:

- Harnwegsinfektionen
- Instrumentationen innerhalb der letzten zwei Wochen
- Fremdkörper wie Nierenfistel, Steine oder DJ
- Darminterponate im Harntrakt
- andere Tumoren im Harntrakt
- Urotheliasis
- Massive Makrohämaturie

Tumoren im oberen Harntrakt konnten bei allen Patienten durch ein IUG, eine RUP oder ein CT/MRT ausgeschlossen werden.

2.2 Studienablauf

Nach stationärer Aufnahme erfolgte die allgemeine Operationsvorbereitung mit Aufklärung des Patienten. Im Rahmen dieses Gespräches wurden die Patienten über die Untersuchungen unterrichtet und gaben hierzu ihr Einverständnis.

Die Patienten wurden gebeten am Operationstag den Urin für mindestens zwei Stunden in der Blase zu behalten, bevor präoperativ der NMP-22 BladderChek® durchgeführt und eine Urinzytologie angefertigt wurde.

Anschließend wurde den Patienten 1,5g ALA [Medac GmbH, Wedel, Germany] oder ALA-Hexylester [Photocure ASA, Oslo, Norwegen], aufgelöst in 50ml einer 5,7% Natriumhydrogenphosphatlösung, mittels eines sterilen Einmalkatheters in die Blase instilliert. Es erfolgte in Allgemeinanästhesie oder einem Regionalverfahren (i.d.R. Spinalanästhesie) die Weißlichtendoskopie und die Photodynamische Diagnostik mit der Entnahme von Biopsien, wie weiter unten bei Punkt 2.5. beschrieben. Ferner wurde eine Spülzytologie entnommen, die zum einen im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke) und zum anderen im Zytologischen Labor der Urologischen Klinik des Klinikums der Universität München Großhadern untersucht wurde.

Die Biopsien wurden nach der alten und neuen TNM Klassifikation (WHO 1997/2004) im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen beurteilt (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke).

Routineuntersuchungen des Urins der Patienten sowie die Untersuchung der Zytologie erfolgte im Zytologischen Labor der Urologischen Klinik des Klinikums der Universität München Großhadern durch Dr. S. Tritschler und Dr. S. Tauber. Die Aufbereitung und Färbung der Präparate erfolgte durch Frau Fischer und mich.

Es wurde für jeden Patienten ein Untersuchungsbogen sowie ein Bogen über die Ergebnisse der Weißlichtendoskopie versus PDD ausgefüllt (siehe unten stehende Bögen).

Mit den Ergebnissen der Untersuchungen sowie der Histologie wurde die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert ermittelt. Es wurden zwei Patientengruppen gebildet: Patienten mit erstmaligem Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom und Patienten in der Tumornachsorge.

Studie NMP22 BladderChek vs. PDD

Patienten ID: [kleines Etikett]

Patientennummer: _____

Patient zur Nachsorge ☐

letzter Tumornachweis _____

letzte Histologie _____

Instillationen in der Vorgeschichte

BCG ☐

Mitomycin ☐

wann _____

Klin. Verd. auf BT ☐

Makrohämaturie ☐

Mikrohämaturie ☐

susp. Zyto-Befund ☐

susp. Sono-Befund ☐

Folgende Kriterien Ausgeschlossen:

Harnwegsinfektion ☐

Instrumentationen in den letzte 2 Wochen ☐

Fremdkörper (DJ, Nifi,...) ☐

Darminterponate im Harntrakt ☐

Andere Tumoren im Harntrakt ☐

Urolithiasis ☐

Aktueller Urinbefund:

Abklärung oberer Harntrakt:

Makrohämaturie ☐

von wann unauff. suspekt

Mikrohämaturie (Sediment) ☐

IUG ☐

Leukozyturie (Sediment) ☐

RUP ☐

Nitrit pos. ☐

CT/MRT ☐

NMP22 BladderChek

Pos. ☐

Neg. ☐

Weisslichtendoskopie

Pos. ☐

Neg. ☐

PDD

Pos. ☐

Neg. ☐

Spülzytologie

Pos. ☐

Neg. ☐

G

Urinzytologie

Pos. ☐

Neg. ☐

G

TUR-B/Biopsie

ja ☐

nein ☐

Anzahl der Biopsien: _____

Histologie _____

Tritschler 2004

Abb. 12: Untersuchungsbogen der Patienten

Vergleichsstudie NMP-22 vs. PDD

Weisslichtendoskopie: unauffällig ☐ suspekt ☐

PDD: unauffällig ☐ suspekt ☐

~ Kalte PE entnommen: nein ☐ ja ☐ Wie viele? _____

TUR-B: nein ☐ ja ☐

PDD-pos. Areale unter
Weisslicht übersehen? nein ☐ ja ☐

Wurden PE aus diesen
Arealen entnommen? nein ☐ ja ☐ Wie viele? _____

Tritschler 2004

Abb. 13: Ergebnisse der Vergleichsstudie NMP-22 vs. PDD

2.3 NMP-22BladderChek®

2.3.1 Allgemein

Der NMP-22BladderChek Test wurde von der Firma Matritech [Matritech GmbH, Freiburg, Germany] bezogen.

Es handelt sich dabei um einen In-vitro-Immunoassay Point-of-Care Test, der zur Früherkennung des Harnblasentumors und zum Screenen von Risiko- sowie der Kontrolle von Tumorpatienten bestimmt ist. Der Test ist ein schnelles immuno-chromatographisches Verfahren mit Einsatz NMP22-spezifischer monoklonaler Antikörper, das ein qualitatives Testergebnis in ca. 30 min liefert.

2.3.2 Durchführung

Es wird präoperativ der Morgenurin der Patienten verwendet, der in einem sterilen Plastikbecher abgegeben wird. Dieser Urin kann maximal 2 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert werden, sollte aber möglichst innerhalb von 30 Minuten verarbeitet werden. Mit einer beigefügten Pipette werden vier volle Tropfen ohne Luftblasen aus dem Becher senkrecht auf die Mikrotiterplatte in die Öffnung „S“ getropft. Das Testergebnis sollte nach 30 Minuten, spätestens nach 50 Minuten abgelesen werden. Dazu wird überprüft, ob in der Verfahrenskontrollzone „C“ eine Linie erscheint. Ist diese vorhanden, wurde der Test richtig ausgeführt. Ist in der Testzone „T“ eine vollständig durchgezogene Linie zu sehen, deutet dies auf ein positives Testergebnis hin. Ein negatives Testergebnis liegt bei vollständiger Abwesenheit oder nicht komplett durchgezogener Linie in der Testzone „T“ vor (siehe hierzu Abb. 14).

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden wurden die Ausschlusskriterien, wie unter Punkt 1.3.2 bereits beschrieben, festgelegt und streng eingehalten.



Abb. 14: Durchführung des NMP22BladderChek® [Matritech GmbH]

2.4 Urinzytologie

2.4.1 Anfertigung der Präparate

Für die Urinzytologie wird der Spontanurin der Patienten untersucht. Dieser wird in 50ml Röhrchen in einer Zentrifuge bei 2000 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, das Sediment 1:1 mit Fixierlösung (Esposti-Fixativ, 45% Aqua dest., 45% Methanol, 10% Essig) aufgeschüttet und für mindestens 15 Minuten stehengelassen. Die Suspension wird ein zweites Mal für nur fünf Minuten ebenfalls bei 2000 U/Min zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Mit einer Pasteurpipette wird die gleiche Menge an Pectin-Lösung (200 mg Citruspectin, 40 ml Glycerin ad 1000ml Aqua bidest.) zugegeben, vermischt und auf einem Objektträger ein bis zwei Tropfen vorsichtig ausgestrichen. Die Präparate sollten für mindestens 24 Stunden in einer geschlossenen Mappe trocknen.

Die getrockneten Präparate werden nach Papanicolaou gefärbt. Diese Färbung ist die Standardfärbung der urologischen Urinzytologie. Die exakte Durchführung ist in der Tab. 12 geschildert.

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

Tab. 12: Durchführung der Färbung nach Papanicolaou

Bei der Papanicolaou-Färbung ist zunächst eine Feuchtfixierung obligat, da es sonst zu degenerativen Zellveränderungen kommen kann. Diese Fixierung erfolgt durch ein Alkoholtauchbad, bei der die Präparate für mindestens 20 Minuten in eine Küvette mit 96% Alkohol gestellt werden.

Es folgt eine Hydrierung, da die Papanicolaous Lösung 1b wässrig ist, bei der die Präparate durch eine fallende Alkoholreihe getaucht und in Aqua dest. gespült werden. Die Färbezeit von 5 Minuten in der Papanicolaous-Lösung 1b sollte nicht überschritten werden, da es sonst zu einer Überfärbung mit scheinbarer Hyperchromasie kommen kann. Die Präparate werden mit Aqua dest. gespült und zum Differenzieren kurz in 0,5 % HCl-Alkohol getaucht, wobei sich rotbraune Farbwolken lösen. In einer überlaufenden Küvette mit Leitungswasser werden

die Präparate anschließend gebläut. Aufgrund der alkoholischen Papanicolaous Lösung 2a müssen die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert werden. Es folgt die Färbung in der Papanicolaous Lösung 2 a mit anschließendem Spülvorgang in 96% Alkohol.

Der letzte Färbeschritt ist die Papanicolaous Lösung 3b. Die Präparate werden zunächst wieder in 96% Alkohol und dann mit 100% 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. Die Präparate werden nass aus dem Xylol mit einem kleinen Tropfen Eukitt blasenfrei eingedeckt und in einer Trockenkammer getrocknet.

2.4.2 Beurteilung der Präparate

In der Papanicolaou-Färbung nimmt das Zytoplasma der Übergangsepithelzellen eine blaugraue bis rosa Farbe an. Keratinisierte Zellen färben sich leuchtend orange bis gelblich. 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 Beurteilung erfolgt unter Beachtung der folgenden Malignitätskriterien:

- Verschiebung der Kernplasmarelation zugunsten des Kernes
- Prominenz und Irregularität der Kernmembran
- Chromatinvermehrung mit Transparenzverlust des Zellkerns
- Änderung der Chromatinfeinstruktur
- Vermehrung und Entrundung der Kernkörperchen
- Entrundung und Varianz der Zellkerne

2.5 Weisslichtendoskopie

2.5.1 Durchführung

Zur Vorbereitung der Blasenspiegelung wird der Patient auf einem speziellen Untersuchungstisch in die so genannte Steinschnittlagerung gebracht: die Position ist ähnlich der bei einer gynäkologischen Untersuchung, die Beine sind gespreizt und werden hochgelagert, die Hüften sind gebeugt und die untere Körperhälfte ist mit sterilen Tüchern abgedeckt. Der genitale Bereich wird zur Verhinderung von Verunreinigungen und bakteriellen Infektion gereinigt und desinfiziert. Eine Vollnarkose erfolgt meist nur bei Kindern und bei jungen Männern mit enger Harnröhre. Da die Harnröhre bei der Frau (3 bis 4 cm) kürzer ist als beim Mann (25 bis 30 cm), ist für Männer die Untersuchung unangenehmer. Damit die Untersuchung schmerzfrei erfolgen kann wird ein Gleitmittel, dem ein örtliches Betäubungsmittel zugesetzt ist, in die Harnröhre eingebracht. Nach dieser Vorbereitung wird beim Mann eine Penisklemme angebracht, um das Herausfließen des betäubenden Gleitmittels, das zur Entfaltung seiner Wirkung einige Minuten benötigt, zu verhindern. Anschließend wird das Zystoskop langsam über die gestreckte Harnröhre in die Harnblase eingeführt, während kontinuierlich steriles Spülwasser zufließt. Wenn das Zystoskop in der Blase angelangt ist, wird die Optik so angepasst, dass ein Rundumblick möglich ist und der untersuchende Arzt den Zustand der Blase in allen ihren Bereichen beurteilen kann. Alle suspekt erscheinenden Areale werden mittels der transurethralen Elektroresektion entfernt. Das eingeleitete Spülwasser sorgt einerseits dafür, dass die Blase ausgedehnt und damit in allen Bereichen einsehbar ist, andererseits kann damit eine die Untersuchung behindernde Trübung durch Eiter oder Blut ausgespült werden. Als zusätzliche Maßnahme kann der Arzt während der Untersuchung die Bauchdecke eindrücken, um die Blasenvorderwand besser sichtbar zu machen. Aufgrund der langen Harnröhre des Mannes wird heute meist eine Zystoskopie mit flexiblem Instrumentensystem durchgeführt. Nach Entleerung der Blase wird der Patient bei normaler Rückenlage untersucht. Dies ist angenehmer für den Patienten, überdies führt die flexible Zystoskopie zu weit weniger Beschwerden nach Abschluss der Untersuchung. Bei Frauen ist diese Untersuchung auch ohne Betäubung möglich. Die im Vergleich zum Mann sehr kurze Harnröhre der Frau erlaubt eine meist problemlose Einführung eines starren Zystoskops.

2.5.2 Komplikationen

Die Untersuchung von Harnröhre und Blase kann auch unter sterilen Arbeitsbedingungen Krankheitskeime in die Blase schleusen und somit eine Harnröhren- oder Blasenentzündung verursachen.

Durch die Instrumentation kann die Schleimhaut der Harnröhre oder der Blase verletzt werden. Die einer Verletzung folgende Narbenbildung kann beispielsweise die Harnröhre verengen und Probleme beim Wasserlassen verursachen. Leichte Blutspuren im Harn unmittelbar nach einer Blasenspiegelung können vorkommen und sind in der Regel harmlos.

2.6 Photodynamische Diagnostik

2.6.1 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

Der klinische Steckbrief von 5-ALA ist in Abb.15 aufgeführt.

Name: 5-Aminolävulinsäure(hydrochlorid), 5-ALA
Chem. Bezeichnung: 5-Amino-4-oxo-pentansäurehydrochlorid (C ₅ H ₁₀ ClNO ₃)
Molekulargewicht: 167,59 g/mol
Aussehen: weißes bis bräunlich weißes Pulver
Schmelzpunkt: 151 - 154 °C
pH (1% in Wasser): 2,2 – 3,2
Löslichkeit: löslich in Wasser, wenig löslich in Ethanol und Methanol
Formulierung: steriles, pyrogenfreies Lyophilisat in lichtgeschützter Flasche

Abb. 15: Datenblatt zur 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

Die genaue Wirkungsweise von 5-ALA siehe unter Punkt 1.2.2.2.

2.6.2 Durchführung

- Applikation

Den Patienten wird ungefähr zwei Stunden vor dem Eingriff 1,5g 5-ALA (medac GmbH, Wedel, Germany), aufgelöst in 50ml einer 5,7% Natriumhydrogenphosphatlösung, mit einem sterilen 14F Einmalkatheter intravesikal instilliert. 5-ALA wird als Trockensubstanz zur Herstellung der Lösung angeboten, sodass die Lösung aus Stabilitätsgründen unmittelbar vor der Instillation zubereitet werden muss. Die Instillation erfolgt in die entleerte Harnblase. Die optimale Retentionszeit beträgt für die 5-ALA-Lösung etwa 2-3 Stunden, wobei eine Retentionsszeit von 30 Minuten keinesfalls unterschritten werden sollte. Die Patienten sollten daher die Harnblase bis zum Operationsbeginn nicht mehr entleeren.

Die Lösung reichert sich in der Blase tumorspezifisch an. 5-ALA wird im Hämstoffwechsel in Protoporphyrin IX umgewandelt, welches dann bei entsprechender Fluoreszenzanregung von etwa 400 nm eine charakteristische Rotfluoreszenz mit einer Wellenlänge um 630-700 nm abgibt.

Der Katheter wird direkt nach der Instillation wieder entfernt.

- Durchführung der PDD

Die Lagerung des Patienten und die Vorgehensweise entspricht zunächst der der bereits oben beschriebenen konventionellen Weisslichtendoskopie. Nach Einführen des Zystoskops wird die Blase zunächst mit Weisslicht inspiziert bevor dann mittels eines Fußschalters auf das Fluoreszenzlicht umgeschaltet wird. Zur Fluoreszenzanregung wird eine inkohärente Hochleistungslichtquelle verwendet, D-Licht [Storz GmbH]. Diese Lichtquelle transmittiert violettblaues Anregungslicht der Wellenlänge zwischen 375 und 440 nm durch ein Glasfaserbeleuchtungsbündel. Die Fluoreszenz kann bereits mit bloßem Auge unter Verwendung eines gelben Langpassfilters, welcher in das Okular der Beobachtungsoptik des Standardzystoskopes eingebaut ist, optisch erkannt werden. Es entsteht ein Farbkontrast zwischen der roten Fluoreszenz der urothelialen flachen Läsionen, wie dem Carcinoma in situ, den Dysplasien oder papillären Tumoren und der im rückgestreuten Anregungslicht blau dargestellten, normalen Harnblasenschleimhaut (siehe dazu Abbildungen 4-6). Sämtliche fluoreszierende sowie alle unter Weisslicht suspekten Areale oder Tumoren werden reseziert und anschließend das Resektionsareal auf Residualtumor und Blutungsfreiheit kontrolliert.

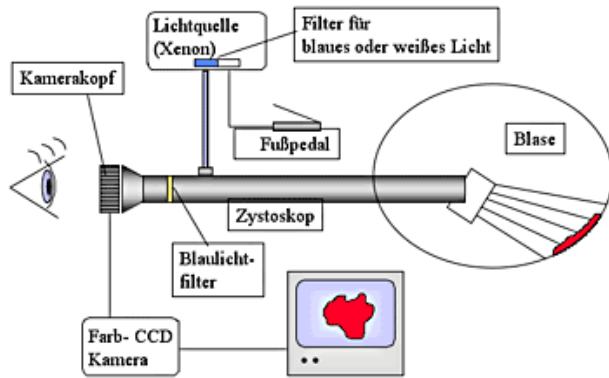


Abb. 16: Prinzip der Fluoreszenz –Zystoskopie

[http://www.charite.de/ch/uro/de/html/patient_erkrankungen/blasenkarzinom.html]



Abb. 17: Komplettausstattung für die Fluoreszenz-Zystoskopie mit 5-ALA
(Fluoreszenztaugliches Zystoskop und Kamera, Videomonitor, D-Light, Videorekorder, Kamerasteuerung)

2.7 Spülzytologie

Im Rahmen der Zystoskopie wird hierbei die Blase nach Entleerung mit 50-100 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült, zwei Spülzytologien entnommen und untersucht. Zur Erstellung einer Referenzzytologie wird eine der beiden Spülzytologie extern untersucht. Die Beurteilung erfolgt wie bei der Urinzytologie nach den bereits oben beschriebenen Malignitäts-kriterien.

2.8 Histologie

Die Beurteilung und Einteilung des papillären Urothelalterationen erfolgt nach histologischen Kriterien, die in Tab. 13 aufgeführt sind.

	PUNLMP	Low-grade-PUC	High-grade-PUC
Histoarchitektur			
Papillen	Zart, gelegentlich fusioniert	Fusioniert, verästelt, zart	Fusioniert, verästelt, zart
Zellorganisation	Zellordnung wie normales Urothel; jede Mukosaverbreiterung	Vorwiegend geordnete Urothelzellen; jede Mukosaverbreiterung, diskreter Verlust der Polarität	Vorwiegend geordnete Urothelzellen; jede Mukosaverbreiterung, häufiger Verlust der Polarität
Zytologie			
Größe des Zellkerns	Gleichmäßig vergrößert;	Unterschiedlich vergrößert	Unterschiedlich vergrößert
Form des Zellkerns	Rund-oval, uniform	Rund-oval, diskrete Varianten bei Form und Kontur	Mäßiger Pleomorphismus
Chromatin	Fein	Geringe Unregelmäßigkeiten innerhalb der Zellen und der Zellen untereinander	Geringe Unregelmäßigkeiten innerhalb der Zellen und der Zellen untereinander; Hyperchromasie
Nukleolus	Nicht nachweisbar oder unauffällig	Gewöhnlich unauffällig	Multipel prominente Nukleoli können vorhanden sein
Mitosen	Selten, basal	Gelegentlich, in jeder Schicht	Häufig, in jeder Schicht
Deckzellen („umbrella cells“)	Vorhanden	Gewöhnlich vorhanden	Können fehlen

Tab. 13: Histologische Kriterien für die Beurteilung und Einteilung der papillären Urothelalterationen [Epstein et al. 1998]

2.9 Statistische Auswertung

Tumormarker, wie auch andere Laborparameter, werden durch Ihre Sensitivität und Spezifität definiert. Aus den Daten der Vierfeldertafeln wurden diese klinisch gebräuchlichen 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.

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

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

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

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

Die Datenaufbearbeitung und -analyse erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2003.

Die Textverarbeitung dieser Arbeit wurde mit Microsoft Office Word 2003 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Histologie

100 Patienten wurden in der Studie untersucht. Bei 94 Patienten fand sich im Rahmen der PDD und Weißlichtendoskopie ein Befund, der biopsiert wurde. Histologisch zeigte sich in 54 Fällen ein benigner Befund, in 40 Fällen ein maligner Befund.

Bei den restlichen 6 Patienten war der PDD-Endoskopiebefund unauffällig. Es wurde folglich nur eine Spülzytologie entnommen, die sich ebenfalls als unauffällig erwies.

Die histopathologischen Ergebnisse der 40 malignen Befunde sind in Tab. 14 dargestellt.

	pTa	pT1	≥pT2	pTx	pTis	
G1	16					16
G2	3	2		1		6
G3	3	2	3	1	9	18
Gesamt	22	4	3	2	9	40

Tab. 14: histopathologischen Ergebnisse der 40 malignen Befunde

Bei 13 Patienten von den 40 positiven Befunden handelt es sich dabei um die Erstdiagnose eines Harnblasenkarzinoms, bei den restlichen 27 um ein Rezidiv.

Die Ergebnisse der Histologie dienten als Referenzstandard zur Berechnung der verschiedenen Qualitäten.

3.2 Qualität der Testverfahren

Berechnung der jeweiligen Sensitivität, Spezifität, des positiven- und negativen prädiktiven Wertes:

NMP-22	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	26	36
Test negativ	14	24

$$\text{Sensitivität} = \frac{26}{40} = 0,65 = 65\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{24}{60} = 0,40 = 40\%$$

$$\text{PPV} = \frac{26}{62} = 0,42 = 42\%, \quad \text{NPV} = \frac{24}{38} = 0,63 = 63\%$$

PDD	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	37	34
Test negativ	3	26

$$\text{Sensitivität} = \frac{37}{40} = 0,93 = 93\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{26}{60} = 0,43 = 43\%$$

$$\text{PPV} = \frac{37}{71} = 0,52 = 52\%, \quad \text{NPV} = \frac{26}{29} = 0,90 = 90\%$$

Weißlicht	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	35	33
Test negativ	5	27

$$\text{Sensitivität} = \frac{35}{40} = 0,88 = 88\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{27}{60} = 0,45 = 45\%$$

$$\text{PPV} = \frac{35}{68} = 0,51 = 51\%, \quad \text{NPV} = \frac{27}{32} = 0,84 = 84\%$$

Spülzytologie	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	26	23
Test negativ	8	37

$$\text{Sensitivität} = \frac{26}{34} = 0,76 = 76\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{37}{60} = 0,62 = 62\%$$

$$\text{PPV} = \frac{26}{49} = 0,53 = 53\%, \quad \text{NPV} = \frac{37}{45} = 0,82 = 82\%$$

Urinzytologie	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	15	11
Test negativ	19	40

$$\text{Sensitivität} = \frac{15}{34} = 0,44 = 44\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{40}{51} = 0,78 = 78\%$$

$$\text{PPV} = \frac{15}{26} = 0,58 = 58\%, \quad \text{NPV} = \frac{40}{59} = 0,68 = 68\%$$

NMP-22 bei Erstdiagnose	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	9	9
Test negativ	4	8

$$\text{Sensitivität} = \frac{9}{13} = 0,69 = 69\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{8}{17} = 0,47 = 47\%$$

$$\text{PPV} = \frac{9}{18} = 0,50 = 50\%, \quad \text{NPV} = \frac{8}{12} = 0,67 = 67\%$$

NMP-22 bei Nachsorge	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	17	27
Test negativ	10	16

$$\text{Sensitivität} = \frac{17}{27} = 0,63 = 63\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{16}{43} = 0,37 = 37\%$$

$$\text{PPV} = \frac{17}{44} = 0,39 = 39\%, \quad \text{NPV} = \frac{16}{26} = 0,62 = 62\%$$

NMP-22 mit Ausschluss der Instillationspatienten	Tumor positiv	Tumor negativ
Test positiv	23	30
Test negativ	9	17

$$\text{Sensitivität} = \frac{23}{32} = 0,72 = 72\%, \quad \text{Spezifität} = \frac{17}{47} = 0,36 = 36\%$$

$$\text{PPV} = \frac{23}{53} = 0,43 = 43\%, \quad \text{NPV} = \frac{17}{26} = 0,65 = 65\%$$

Die Validität der einzelnen Verfahren ist in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Test	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
NMP-22 Bladder Chek	65 (26/40)	40 (24/60)	42 (26/62)	63 (24/38)
Photodynamische Diagnostik	93 (37/40)	43 (26/60)	52 (37/71)	90 (3/29)
WLE	88 (35/40)	45 (27/60)	51 (35/68)	84 (27/32)
Spülzytologie	76 (26/34)	62 (37/60)	53 (26/49)	82 (37/45)
Urinzytologie	44 (15/34)	78 (40/51)	58 15/26)	68 (40/59)
Kombination von NMP-22 + Urinzytologie	83 (33/40)	37 (22/60)	46 (33/71)	76 (22/29)

Tab. 15: Validität der einzelnen Testverfahren

In den beiden nachfolgenden Tabellen finden sich die Sensitivitäten der einzelnen Testverfahren in Abhängigkeit vom Tumorstadium und Tumorgrad.

Test	pTa	pT1	≥ pT2	pTis
NMP-22 Bladder Chek	13/23 (57%)	2/4 (50%)	3/3 (100%)	6/8 (75%)
PDD	22/23 (96%)	4/4 (100%)	3/3 (100%)	6/8 (75%)
WLE	22/23 (96%)	4/4 (100%)	3/3 (100%)	4/8 (50%)
Spülzytologie	17/21 (81%)	2/3 (67%)	0/1 (0%)	6/8 (75%)
Urinzytologie	9/18 (50%)	2/4 (50%)	1/3 (33%)	1/7 (14%)

Tab. 16: Sensitivität der einzelnen Testverfahren in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Test	Grad 1	Grad 2	Grad 3
NMP-22 Bladder Chek	8/16 (50%)	4/6 (67%)	6/8 (75%)
PDD	16/16 (100%)	5/6 (83%)	8/8 (100%)
WLE	16/16 (100%)	5/6 (83%)	8/8 (100%)
Spülzytologie	13/16 (81%)	4/5 (80%)	3/4 (75%)
Urinzytologie	7/13 (54%)	3/5 (60%)	3/7 (43%)

Tab. 17: Sensitivität der einzelnen Testverfahren in Abhängigkeit vom Tumorgad

3.3 Aufschlüsselung der detektierten und übersehenen Tumoren nach Staging und Grading

Mit dem NMP-22 Bladder Chek wurden insgesamt 14 Tumoren nicht erkannt (falsch-negativ), davon 8 G1, 2 G2 und 4 G3-Tumore. In der Photodynamischen Diagnostik waren 3 Tumore, 2 pTis und 1 G2, fluoreszenznegativ. Mit der Weisslichtendoskopie wurden 5 Tumore nicht detektiert, 4 pTis und 1 G2.

Tumoren	Anzahl Insgesamt	Übersehen von NMP22	Übersehen von PDD	Übersehen von WLE	Übersehen von Spülzytologie	Übersehen von Urinzytologie
G1	16	8	-	-	3	6
G2	6	2	1	1	2	2
G3	18	4	2	4	2	10
Gx					1	1
Ta	23	10	1	1	4	9
T1	4	2	-	-	1	2
T2	2	-	-	-	1	1
T3	1	-	-	-	-	1
Tis	8	2	2	4	2	6
Summe		14	3	5	8	19

Tab. 18: Aufschlüsselung der detektierten und übersehenen Tumoren nach Staging und Grading

3.4 Aufschlüsselung der Sensitivität und Spezifität beim NMP22BladderChek®

Beim NMP-22 Bladder Chek wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten unter bestimmten Ausschlusskriterien nochmals gesondert berechnet.

Bei Patienten bei denen es sich um eine Erstdiagnose handelte, betrug die Sensitivität 69% und die Spezifität 47%. Bei den Patienten im Rahmen einer Nachsorge zeigte sich eine Sensitivität von 63% und eine Spezifität von 37%.

Wurden nur die Patienten berücksichtigt, bei denen ein klinischer Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom vorlag, betrug die Sensitivität 72% und die Spezifität 38%. Wurden alle Patienten ausgeschlossen, die innerhalb der letzten zwei Jahre eine Instillationsbehandlung bekommen hatten, lag die Sensitivität bei 72% und die Spezifität bei 36%.

	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Patienten mit Erstdiagnose (n = 30)	69	47
Patienten zur Nachsorge (n = 70)	63	37
Ausschluss der Patienten mit Instillationen innerhalb der letzten 2 Jahre	72	36

Tab. 19: Aufschlüsselung der Sensitivität und Spezifität beim NMP22BladderChek®

3.5 Ergebnisse der Kontrollen der 36 falsch-positiven Ergebnisse des NMP22BladderChek®

Bei 36 Patienten konnte trotz eines positiven NMP-22 Tests histologisch kein Tumor nachgewiesen werden (=falsch-positiv). Die Ergebnisse der einzelnen Histologien dieser Patienten sind in Abb. 18 dargestellt.

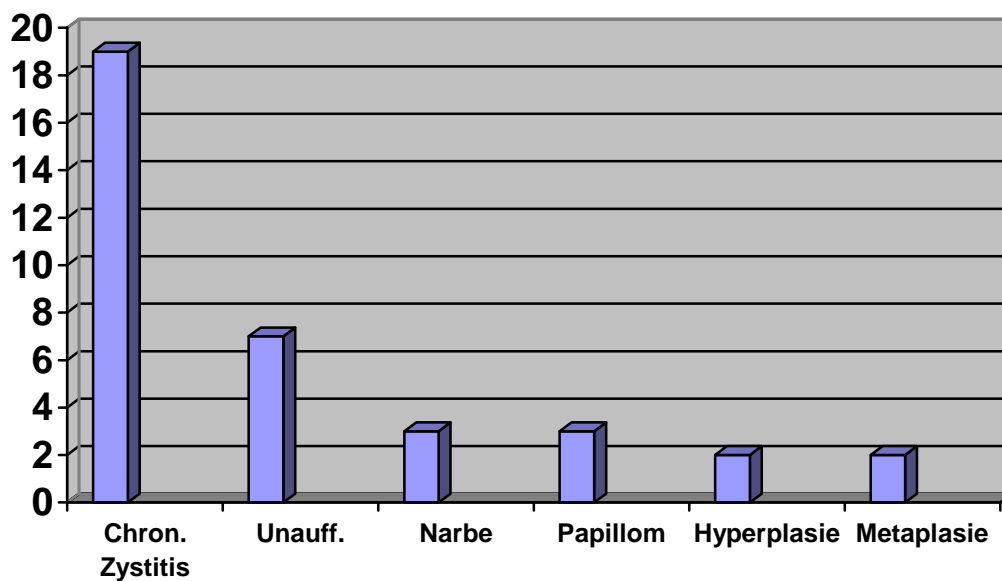


Abb. 18: Histologien der 36 falsch-positiven Ergebnisse des NMP22BladderChek®

Bei 18 dieser 36 Patienten konnte innerhalb von 6 Monaten eine Tumornachsorge durchgeführt werden. Dabei wurde bei 2 Patienten ein positiver Tumorbefund erhoben (1 pTis; 1 Ta, G3).

4 Diskussion

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Harnblasenkarzinoms weisen die meisten Patienten einen Tumor auf, der noch nicht die Muskulatur der Harnblasenwand infiltriert hat und meist organerhaltend therapiert werden kann. Die Problematik bei diesen Tumoren stellt allerdings die hohe lokale Rezidivrate, die in den ersten Jahren nach Diagnosestellung bis zu 70% beträgt, dar [Zaak et al. 2006]. Deshalb ist eine frühzeitige Diagnosestellung des Primär- als auch des Rezidivtumors eine wesentliche Voraussetzung für eine effektive Behandlung. Der momentane Goldstandard in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ist die Zystoskopie und als nichtinvasives Verfahren die Zytologie [Saad et al. 2002]. Bei der Zystoskopie handelt es sich um eine invasive, und somit, für den Patienten unangenehme und auch kostenintensive Untersuchungsmethode. Der Schwerpunkt der Urinzytologie liegt in der Primärdiagnose oder der Nachsorge von high-grade Tumoren nach der neuen WHO-Klassifikation. Besondere Bedeutung gewinnt die urinzytologische Diagnostik bei flachen Urothelläsionen, wie insbesondere dem Carcinoma in situ, da diese Tumoren endoskopisch nur schwer zu erkennen sind. Innerhalb dieser Tumorentität weist die Urinzytologie eine hohe Sensitivität, zwischen 80% und 95% auf [Poulakis et al. 2001, Saad et al. 2002, Lotan et al. 2003]. Des Weiteren zeichnet sich die Urinzytologie durch eine hohe Spezifität von bis zu 100% [Zippe et al. 1999, Miyanaga et al. 1997, Glas et al. 2003] aus. Allerdings weist die Urinzytologie in der Routinediagnostik auch Limitationen auf. Dies ist zum einen die geringe Sensitivität der Urinzytologie, um die 25%-40% für low-risk Tumoren, aufgrund der gering ausgeprägten Diskrepanz zum normalen Urothel [Lahme et al. 2001, Landman et al. 1998, Zippe et al. 1999]. Darüber hinaus können Harnwegsinfektionen, Harnsteinleiden oder durchgeführte Instillationstherapien zu falsch-positiven Ergebnissen führen und außerdem erweist sich die Subjektivität der Interpretation der Urinzytologie als problematisch. Entscheidend für den Einsatz der Urinzytologie sind eine ausreichende Erfahrung und gute Kenntnisse in der Interpretation der zytologischen Malignitätskriterien. So konnte in einer multizentrischen Studie gezeigt werden, dass trotz hoher Spezifität eine Übereinstimmung in Bezug auf die Sensitivität zwischen dem Reviewzytologen und den primären Untersuchern nur in ausgewählten Zentren vorlag [Raitanen et al. 2002].

Diese Gründe sind die Ursache für die Entwicklung nichtinvasiver untersucherunabhängiger Urinmarkertests, die derzeit in großer Auswahl kommerziell, aber auch experimentell angeboten werden [Saad et al. 2002]. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass Marker wie NMP22, BTA-Stat, HA-Haase, BLCA-4, Immunocyt oder UroVysion eine höhere Sensitivität als die Urinzytologie in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms aufweisen [Lokeshwar et al. 2001, Habuchi et al. 2005]. Hierhin liegt möglicherweise ein Ansatzpunkt für den klinischen Einsatz dieser Marker, um die Zahl der im Rahmen der Nachsorge nötigen Kontrollzystoskopen zu reduzieren. Einer dieser neuen Testverfahren, der NMP-22 Bladder-Check®, ein in-vitro Immunoassay Point-of-Care (POC) Schnelltest zum Nachweis von nukleärem Matrixprotein22 im Urin, ist seit kurzem kommerziell erhältlich. Ziel dieser Studie ist es dieses Testverfahren zu validieren.

Sensitivität und Spezifität des NMP22

Ziel neuer nichtinvasiver Blasentumortestverfahren ist die sichere Diagnose bzw. der sichere Ausschluss von Harnblasentumoren. Dabei muss sich jedes neue Verfahren an dem, wie oben beschriebenen, bisherigen Goldstandard in der nichtinvasiven Blasentumordiagnostik, der Urinzytologie, messen. Die ersten Studien über Tumormarker wie den NMP22 Test fielen zunächst recht viel versprechend aus. Zippe et al. berichten in ihrer Studie von einer Sensitivität des NMP22 bei einem Cut-off von 10 U/ml von 100% und einer Spezifität von 86% [Zippe et al. 1999]. In der Studie von Del Nero et al. beträgt die Sensitivität, ebenfalls bei einem Cut-off von 10 U/ml, 82,8% und die Spezifität 86,8% [Del Nero et al. 1999]. Poulakis et al. führten eine Studie mit 739 Patienten mit Verdacht auf Harnblasenkarzinom durch. Die Sensitivität schwankt dabei je nach verwendetem Cut-off zwischen 70% bis 91% und die Spezifität zwischen 68% und 80% [Poulakis et al. 2001].

Neuere Studien können jedoch diese initialen Ergebnisse nicht bestätigen. Chahal et al. berichten bei einem Cut-off von 10 U/ml von einer Sensitivität von 44% und Casella et al. von 51% [Chahal et al. 2001, Casella et al. 2000]. Die Spezifität beträgt bei beiden 91% bzw. 83%. Dies ist bei einer jedoch sehr geringen Sensitivität von limitiertem Wert, denn die Anzahl der übersehenen Tumoren wäre zu groß, um den Test sinnvoll einsetzen zu können. Lahme et al. ermitteln eine Sensitivität von 63% und Giannopoulos et al. zu 63,5% [Lahme et al. 2001, Giannopoulos et al. 2001]. Glas et al. führten eine Metaanalyse zu dem NMP22 Test durch. Basierend auf 2290 Patienten ergibt die Sensitivität hierbei 67% (CI: 60% bis 73%) und die Spezifität 78% (CI: 72% bis 83%) [Glas et al. 2003].

In einer erst kürzlich veröffentlichten Metaanalyse von van Rhijn et al. wird von einer Sensitivitätsbreite von 47-100% und einer Spezifität zwischen 55-98% ausschließlich bei der Verwendung des Tests in der Tumornachsorge berichtet. Hinsichtlich der Sensitivität des Tests wird hier festgestellt, dass dieser Test die Anzahl der Nachsorgezystoskopen nicht reduzieren kann [van Rhijn et al. 2005].

Bei der Beurteilung dieser Studien fällt die große Schwankungsbreite der ermittelten Werte für die Sensitivität und die Spezifität auf. Dafür gibt es im Wesentlichen zwei Ursachen:

Zum Einen die Patientenselektion und somit die Ausschlusskriterien, die für die Beteiligung an der Studie festgelegt werden. Dabei interessiert vorwiegend die Frage, ob das Testverfahren als Screeninginstrument in einer Risikogruppe oder als Nachsorgeuntersuchung nach vorangegangener Blasentumorerkrankung verwendet wird. Van Rhijn et al. beispielsweise nahmen in ihre Metanalyse nur Studien auf, bei denen es sich um Nachsorgepatienten bzw. bei denen die Nachsorgepatienten getrennt von den Patienten mit Erstdiagnose untersucht und bewertet wurden [van Rhijn et al. 2005]. Grossman et al. wiederum führten ihre Studie ausschließlich mit Risikopatienten, d.h. Patienten, die beispielsweise einen hohen oder langen Nikotinkonsum aufweisen oder bei denen eine Hämaturie vorliegt, durch [Grossman et al. 2005]. Um konstant gute Ergebnisse zu erzielen, müssten die Ausschlusskriterien möglicherweise erweitert werden.

Zum Anderen spielt die Verwendung von verschiedenen Cut-off-Werten, die in den zitierten Arbeiten zwischen 7,5 und 21,5 U/ml liegen, eine entscheidende Rolle, da die Sensitivität mit steigenden Schwellenwerten sinkt, die Spezifität jedoch steigt.

Bei der Beurteilung der Qualität eines diagnostischen Verfahrens ist der entscheidende Punkt der zugrunde liegende Goldstandard. Bis heute gilt die Weisslichtendoskopie als Goldstandard in der Blasentumordiagnostik. Alle genannten Studien zur Evaluierung der nichtinvasiven Blasentumortests haben sie als Referenzuntersuchung genutzt.

Seit einigen Jahren wird die 5-ALA-induzierte Photodynamische Diagnostik zur Diagnose von Urothelkarzinomen der Harnblase eingesetzt. In zahlreichen Studien hat sie die Überlegenheit in der Detektion von Blasentumoren gegenüber der Weisslichtendoskopie bewiesen (siehe hierzu auch Tab. 6, Abschnitt 1.2.1), insbesondere in der Diagnostik von flachen high-grade Läsionen (Carcinoma in situ, Dysplasie Grad II) [Zaak et al. 2002]. Durch den Einsatz der PDD können 30% mehr Tumoren entdeckt werden als mit der Weisslichtendoskopie und

die Rezidivrate kann deutlich gesenkt werden [Danilchenko et al. 2005, Filbeck et al. 2002].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, den diagnostischen Wert des NMP22BladderChek® anhand des sensitivsten diagnostischen Instruments, eben der Photodynamischen Diagnostik zu evaluieren.

NMP22BladderChek®

Bis vor kurzem war der NMP22 Test nur als quantitatives ELISA-Verfahren erhältlich, der in einem spezialisierten Labor durchgeführt werden musste. Der neu entwickelte NMP22BladderChek® Test ist ein qualitativer immunochromatographischer Assay mit einem Cut-off von 10 U/ml, der als Schnelltest mit einfacher Handhabung in jeder Praxis durchgeführt werden kann und ein qualitatives Ergebnis bereits nach 30 Minuten erbringt.

Bislang gibt es nur wenige publizierte Daten zu diesem neuen Testverfahren. Hautmann et al. vergleichen bei 75 Patienten, 52 davon mit oberflächlichem Harnblasenkarzinom und 23 Kontrollen, den neuen NMP22BladderChek® Test mit dem NMP22®-ELISA Verfahren. Der NMP22®-ELISA zeigt hierbei eine Sensitivität von 87% gegenüber 85% für den NMP22BladderChek®. Die Spezifität beträgt für den ELISA 83% gegenüber 91% für den BladderChek®. Auch hinsichtlich des positiven und negativen prädiktiven Wertes zeigen beide Testverfahren keine signifikanten Unterschiede, so dass die Autoren schlussfolgern, dass der NMP22BladderChek® aufgrund seiner einfachen Handhabung dem NMP22®-ELISA vorzuziehen sei [Hautmann et al. 2005]. Weitere Studien erbringen jedoch keine vergleichbaren Werte.

Grossman et al. untersuchen den NMP22BladderChek® als reinen Screeningtest in einer Population von 1331 Patienten mit „erhöhtem Risiko“ für ein Harnblasenkarzinom. In dieser Studie sind Patienten mit Raucheranamnese, Dysurie oder Hämaturie eingeschlossen. Es zeigt sich eine Sensitivität von 55,7% und eine Spezifität von 85,7% [Grossman et al. 2005]. Akkad et al. kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie vergleichen den NMP22BladderChek® mit dem FISH (Fluorescence in situ Hybridisation) und der konventionellen Urinzytologie. Hierbei zeigt der NMP22BladderChek® eine Sensitivität von 55%, der FISH von 72%. Insbesondere für G1 Tumoren weist der NMP22BladderChek® nur eine Sensitivität von 16% auf (Urinzytologie 54%). Die Spezifität beträgt 70% für den NMP22BladderChek®, 45% für die FISH und 75% für die Urinzytologie [Akkad et al. 2005].

Auch Moonen et al. untersuchten den NMP22BladderChek®. Bei 73 Patienten in der Nachsorgegruppe weist der NMP22BladderChek® eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zur Zytologie auf (57,1% vs. 42,9%). In dieser Studie werden jedoch negative Testergebnisse bei Patienten mit TaG1 Tumoren nicht als falsch-positiv bewertet, was somit die Sensitivität insgesamt verbessert. Die Spezifität beträgt für den NMP22BladderChek® 89,8% gegenüber 93,2% für die Zytologie [Moonen et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit können die Ergebnisse von Hautmann et al. ebenfalls nicht bestätigt werden [Hautmann et al. 2005]. Die Sensitivität des NMP22BladderChek® beträgt hier 65% und die Spezifität nur 40%. In dieser Studie werden sowohl Nachsorgepatienten wie auch Patienten mit klinischem Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom eingeschlossen.

Wie bereits erwähnt, hängt die Qualität des zu bewertenden Verfahrens maßgeblich von dem zugrunde liegenden Standardverfahren ab, das es validiert. Dies können u.a. Lipinski et al. in einer Studie nachweisen, in der die Effektivität des BTastat Tests reduziert wird, aufgrund der Validierung dieses Testes mittels der PDD [Lipinski et al. 2002].

Dieser Sachverhalt bestätigt sich auch in der vorgelegten Studie. Im Rahmen der Validierung des NMP22 mittels der PDD werden 8 von 16 G1 Tumoren und 4 von 18 G3 Tumoren nicht durch den NMP-22 Test entdeckt. Mit der PDD werden alle G1 Tumoren gefunden und lediglich zwei der G3 Tumoren übersehen. Die PDD zeigt in dieser Studie eine geringe Spezifität von nur 43%. Ihre hohe Sensitivität von 93% jedoch ermöglicht eine zuverlässige Entfernung aller Tumorerkrankungen. Dies wurde in mehreren Studien bereits ausgiebig untersucht [Zaak et al. 2005, Loidl et al. 2005, Danilchenko et al. 2005]. Durch einen nichtinvasiven Tumormarker, wie den NMP22BladderChek®, könnten unnötige invasive Prozeduren vermieden werden, falls dieser eine hohe Spezifität aufweist. Eine Spezifität von 40% wie in der vorliegenden Studie ist hierzu nicht ausreichend, im Vergleich zu der Spezifität von 85,7% von der Grossman et al. berichten. Wie jedoch bereits erwähnt führten Grossman et al. ihre Studie nur bei Risikopatienten als Screening durch und nahmen keine Nachsorgepatienten in ihre Studie auf, was unterschiedlich zu dieser Studie ist, in der 70% Nachsorgepatienten sind [Grossman et al. 2005]. Moonen et al. hingegen führten ihre Studie auch bei Nachsorgepatienten durch und erlangten hierbei eine Spezifität von 89,9%. Dieser Studie sind leider keine Angaben über vorherige intravesikale Therapien zu entnehmen. Möglicherweise aber beeinflussen diese die Ergebnisse [Moonen et al. 2005]. In vorliegender Studie erhielten 32 Patienten bereits eine BCG- oder Mitomycininstillation, die jedoch bei allen schon einige Monate zurücklagen.

Der positive prädiktive Wert fällt bei allen hier verwendeten Methoden sehr gering aus. Die Urinzytologie schneidet hierbei mit 58% am besten ab, bei dem NMP22BladderChek® erreicht sie 42%. Chang et al. berichten in ihrer Studie von einem positiven prädiktiven Wert von 21,2% bei einem verwendeten Cut-off von 7,5 U/ml. Die Autoren schließen daraus, dass der NMP22BladderChek® aufgrund der hohen falsch-positiven Rate nicht zum Screening geeignet ist [Chang et al. 2004]. Dies bekräftigen auch die in dieser Studie gefundenen histologischen Ergebnisse bei Patienten ohne Tumor, aber positivem NMP22BladderChek®. Der negative prädiktive Wert erreicht bei der PDD 90% und beim NMP22-Test 63%.

In Abhängigkeit vom Staging und Grading steigt hier bei dem NMP22BladderChek® mit zunehmender Differenzierung die Sensitivität von 50% bei G1 auf 75% bei G3. Dies entspricht der Studie von van Rhijn et al. bei der die Sensitivität von 41% bei G1 auf 80% bei G3 steigt und der Studie von Akkad et al. (16% bei G1, 51% bei G2, 75% bei G3) [van Rhijn et al. 2005, Akkad et al. 2005].

Die Urinzytologie ist in der Sensitivität mit 44 % dem NMP22BladderChek® unterlegen, weist jedoch mit 78% eine wesentlich bessere Spezifität auf. Die Sensitivität der Urinzytologie entspricht in etwa den Daten in der Literatur [Lahme et al. 2001, Ramakumar et al. 1999, Del Nero et al. 1999], während die Spezifität mit 78% unter den üblichen Literaturangaben liegt, aber dennoch deutlich besser als die NMP-22 Spezifität mit 40% ist. Die niedrige Spezifität der Zytologie in dieser Studie (Urinzytologie 78%, Spülzytologie 62%) kann möglicherweise an der hohen Anzahl an früher resezierten und instillierten Patienten liegen.

Bei der Urinzytologie, die in der Regel eine relativ gute Sensitivität für hochgradige und eine eingeschränkte Sensitivität für niedrig differenzierte Tumoren aufweist, kann dies in der vorliegenden Studie überraschend nicht bestätigt werden. Die Sensitivität schneidet hier mit 43% für G3 Tumoren relativ schlecht ab, womit der NMP22BladderChek® hier der Zytologie überlegen ist.

Die Spülzytologie fällt mit 76% sensitiver als die Urinzytologie aus, ist jedoch mit 62% weniger spezifisch. Die gegenüber der Urinzytologie verbesserte Sensitivität ist auf die Qualität des Zellmaterials zurückzuführen: Während Zellen im Spontanurin der hyperosmolaren Umgebung unter Umständen mehrere Stunden ausgesetzt sind und dementsprechend starke degenerative Veränderungen aufweisen, sind die Zellen der Spülzytologie durchgehend besser erhalten, was die Tumordetektion verbessert.

„Falsch-positive“ Ergebnisse

Der NMP-22 Test liefert in der vorliegenden Untersuchung bei 36 Patienten ein „falsch-positives“ Ergebnis, obwohl alle Ausschlusskriterien eingehalten wurden. Dies führt zu der geringen Spezifität von 40%. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden zum einen die Histologien dieser Patienten analysiert. Zum anderen könnten die positiven Testergebnisse Tumoren anzeigen, die in der Zystoskopie und PDD übersehen wurden. Daher wurden die Ergebnisse der nachfolgenden Tumornachsorgeuntersuchungen analysiert.

Die Histologie zeigt bei 31,7% (n=19) eine chronische Zystitis. Möglicherweise wird diese durch länger als in den Ausschlusskriterien festgelegte, zurückliegende Operationen oder Instillationstherapien, wie z.B. BCG-Instillationen verursacht und führt somit zu der niedrigen Spezifität. Von den 19 Patienten hatten jedoch lediglich sieben eine vorherige BCG-Instillation, die bei allen Patienten bereits mehrere Monate zurück lag. Daraus lässt sich folgern, dass zumindest in diesem Fall die BCG-Instillation keine entscheidende Ursache für die chronische Zystitis spielt.

Ein Nachteil des NMP-22 Test ist, dass er auch auf benigne Urothelveränderungen, wie Hyperplasie, Metaplasie, narbiges Gewebe anspricht und so in über 25% der Fälle zu falsch-positiven Ergebnissen führt [Sharma et al. 1999, Poulakis et al. 2001]. Deshalb ist er speziell in der Nachsorge nur bedingt geeignet, da ein Großteil dieser Patienten vorangegangene Instillationstherapien hatte.

Die erste Kontrolluntersuchung sollte i.d.R. nach 3 Monaten erfolgen. Von den n=36 „falsch-positiven“ Patienten waren 26 innerhalb von zwölf Monaten bei einer weiteren Zystoskopiekontrolle. Bei 3 Patienten war eine weitere Nachuntersuchung wegen Tod oder schwerer, nicht-urologischer Erkrankung nicht möglich, die verbliebenen 7 Patienten entzogen sich der weiteren Nachsorge („lost for followup“.) Bei drei der nachuntersuchten Patienten wurde ein positiver Tumorbefund erhoben (zwei Blasentumoren und ein Nierenbeckentumor). Trotz der geringen Patientenzahl in der Nachsorge muss gefolgert werden, dass die Ergebnisse des NMP-22 größtenteils tatsächlich falsch-positiv sind. Daraus ist zu schließen, dass zumindest in dieser Untersuchung aufgrund der mangelnden Spezifität des NMP-22 Tests keine invasiven Untersuchungen erspart worden, sondern bei dem überwiegenden Anteil sogar unnötigerweise provoziert worden wären.

Die Vernachlässigung der regelmäßigen zystoskopischen Nachuntersuchung stellt auch Schrag et al. in seiner Studie fest. Er findet heraus, dass nur 40% der Patienten sich einer regelmäßigen Zystoskopie, wie diese nach den klinischen Richtlinien empfohlen wird, unterziehen [Schrag et al. 2003].

Trotzdem kann die Sensitivität und Spezifität auch nicht verbessert werden, wenn wie bei der Studie von Moonen et al., nur die Nachsorgepatienten berücksichtigt werden, denn selbst dann beträgt die Sensitivität nur 63% und die Spezifität 37% [Moonen et al. 2005]. Auch bei dem Ausschluss der Patienten mit vorangegangener Instillationstherapie kann keine Besserung erreicht werden (Sensitivität 72%, Spezifität 36%).

Rückführung auf die Zielsetzung und ist die Kombination mit anderen Methoden sinnvoll?

Der NMP22BladderChek® ist trotz der einfachen Handhabung und schnellen Durchführung innerhalb von 30 Minuten aufgrund der geringen Spezifität und der mäßigen Sensitivität nicht zur allgemeinen Früherkennung von Harnblasentumoren und in der Nachsorge geeignet. Für die Verwendung als allgemeines Screeningverfahren in der Bevölkerung sollten die Spezifität und der positive prädiktive Wert sehr hoch sein, sodass bei so wenig Patienten wie möglich eine unnötige Zystoskopie durchgeführt werden müsste. Auch der negative prädiktive Wert spielt hier eine Rolle, denn ist dieser Wert hoch, liegt bei einem negativen Testergebnis auch kein Grund für eine Zystoskopie vor. In dieser Studie kann jedoch keiner dieser Werte ein hierfür zufrieden stellendes Ergebnis erbringen. Bei der Verwendung des NMP22BladderChek® in der Nachsorge sollte auf jeden Fall eine hohe Sensitivität vorliegen, um zu vermeiden, dass Tumoren übersehen werden. Eine Sensitivität von 65%, wie in diesem Fall, erscheint jedoch hierfür zu gering. Trotz der großen Anzahl der inzwischen durchgeführten Studien sind die Ergebnisse nicht einheitlich genug, um den generellen Einsatz der Tumormarker außerhalb klinischer Studien im Routinebetrieb zu empfehlen. Weitergehende multizentrische kontrollierte Studien sind für ein abschließendes Urteil mit einer klaren Indikationsstellung für selektionierte Patientengruppen erforderlich.

Der NMP22BladderChek® könnte allerdings gezielt bei Risikopatienten eingesetzt werden, wie dies in der Studie von Grossman et al. der Fall war. Sie führten den Test als Screening bei insgesamt 1331 Patienten durch die Raucher waren oder eine Hämaturie aufwiesen. Sie stuften den NMP22BladderChek® hierbei als sinnvolle Ergänzung zur Zystosokpie ein [Grossman et al 2005]. Der NMP22BladderChek® würde mit einer Sensitivität von 55,7%, wie in dem Beispiel von Grossman et al., oder mit 65% wie in der vorliegenden Studie zwar nicht alle Tumorpatienten entdecken, aber dennoch das Risiko senken und wäre somit als Screening bei beruflich Exponierten oder Rauchern möglicherweise sinnvoll.

Eine weitere Überlegung ist, den NMP22BladderChek® in Kombination mit anderen Testverfahren einzusetzen. In der Studie von Eissa et al. wurde dies beispielsweise genauer untersucht. Die Sensitivität und die Spezifität betrugen bei dem NMP-22 Test 85% und 91,3%, bei der Zytologie 44% und 100%. Bei einer Kombination dieser beiden Verfahren erreicht die Sensitivität 88% und die Spezifität 91,3%. Dieser Studie zufolge würde sich die Kombination als eindeutig sinnvoll erweisen [Eissa et al. 2002].

Auch Moonen et al. stellt bei der Kombination der Urinzytologie mit dem NMP-22 Test in der Nachsorgegruppe eine Steigerung der Sensitivität von 57,1% beim NMP-22 Test und 42,9% bei der Zytologie auf 78,6% fest. Die Spezifität zeigt eine geringe Verschlechterung. Eine relativ große Anzahl von G3 Tumoren (5/13) wurde jedoch sowohl von dem NMP-22 Test als auch von der Zytologie übersehen [Moonen et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit steigt bei einer Kombination der Urinzytologie mit dem NMP22BladderChek® die Sensitivität beim NMP22BladderChek® von 65% auf 83% und bei der Urinzytologie von 44% auf 83%. Die Spezifität allerdings fällt auf 37%. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Moonen et al. Eine Kombination wiederum würde mit einer Steigerung der Kosten einhergehen.

5 Zusammenfassung

Der momentane Goldstandard in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms ist die Zystoskopie und als nichtinvasives Verfahren die Zytologie. Bei der Zystoskopie jedoch handelt es sich um eine invasive, eher zeitaufwändige, für den Patienten unangenehme und auch kostenintensive Untersuchungsmethode. Die Zytologie, das klassische nichtinvasive Untersuchungsverfahren, weist eine hohe Spezifität, von bis zu 100% auf. Limitierend ist dabei aber die geringe Sensitivität für low-grade-Tumoren. Des Weiteren ist die Zytologie keine objektiv zu bewertende Methode, da sie von der Beurteilung und Erfahrung der Zytopathologen abhängig ist.

Um eine mögliche Alternative zu der Zystoskopie und der Zytologie zu erlangen, wurden in den letzten Jahren eine Reihe nichtinvasiver, im Urin nachweisbarer molekularer Marker entwickelt. Ziel dieser verschiedenen löslichen oder zellgebundenen Blasentumormarker (z.B. NMP22, BTA, UBC, HA-Haase, Immunocyt, Telomerase, FISH) ist es die Anzahl unnötiger Zystoskopien in der Tumornachsorge zu reduzieren oder Risikopopulationen im Screening frühzeitig zu erfassen. Einer dieser Markersysteme ist der NMP-22 BladderCheck®, ein In-vitro Immunoassay Point-of-Care (POC) Schnelltest zum Nachweis von nukleärem Matrixprotein22 im Urin.

Das Ziel der vorliegenden Studie war einerseits die Validierung des NMP-22 BladderCheck® als nichtinvasive Methode an der PDD, welche gegenwärtig die sensitivste Methodik zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms darstellt und andererseits der Vergleich mit der Urinzytologie. Der Hintergrund hierbei war die Frage, ob der NMP-22 BladderCheck® eine Relevanz in der klinischen Routine einnehmen könnte und in der Tumornachsorge eine Alternative zur Zystoskopie und Urinzytologie darstellt.

In die Studie wurden insgesamt 100 Patienten eingeschlossen, bei denen ein klinischer Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom vorlag oder die im Rahmen der Nachsorge eines Harnblasenkarzinoms untersucht wurden. Präoperativ wird bei allen Patienten der NMP22BladderChek® durchgeführt und eine Urinzytologie angefertigt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Weisslichtendoskopie und die Photodynamische Diagnostik (PDD) mit 5-ALA oder Hexylester und der Entnahme von Biopsien und einer Spülzytologie. Die Biopsien wurden nach der TNM-Klassifikation beurteilt.

Mit diesen Ergebnissen wurden die Sensitivität, die Spezifität, der positive und negative prädiktive Wert der einzelnen Methoden errechnet und miteinander verglichen.

Der PDD-Endoskopiebefund war bei 94 Patienten suspekt. Die Histologie ergab bei 40 Patienten einen malignen und bei 54 Patienten einen benignen Befund. Die Sensitivität von NMP-22, PDD, WLE, Spülzytologie und Urinzytologie ergaben dabei 65%, 93%, 88%, 76% und 44%. Die Spezifität betrug 40%, 43%, 45%, 62% und 78% für NMP-22, PDD, WLE, Spülzytologie und Urinzytologie. Daraus errechnet sich ein positiver prädiktiver Wert von 42%, 52%, 51%, 53%, 58% und ein negativer prädiktiver Wert von 63%, 90%, 84%, 82%, 68% für den NMP-22, PDD, WLE, Spülzytologie und Urinzytologie

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der NMP22BladderChek® bisher nicht für die klinische Routine geeignet ist und damit weder die Zystoskopie in der Nachsorge noch die Urinzytologie ersetzen kann. Bei einer Sensitivität von 65% wäre das Risiko, Tumoren nicht zu erkennen zu groß und eine Spezifität von 40% hätte eine zu große Anzahl an unnötigen invasiven Eingriffen zur Folge. Der Test ist, trotz der Berücksichtigung der vom Hersteller empfohlenen Ausschlusskriterien, durch seine hohe Störanfälligkeit bei gutartigen Läsionen, wie Hyperplasie, Metaplasie oder reaktive entzündliche Atypien, beschränkt, da diese zu einer Reduktion der Spezifität führen. Infolgedessen ist eine exakte Selektion der Patienten nötig, um überflüssige folgende Prozeduren zu vermeiden. Auch bei der Berücksichtigung ausschließlich der Patienten, die im Rahmen der Nachsorge untersucht wurden oder bei der Verwendung des Tests ausschließlich bei Patienten mit Erstdiagnose konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden. Selbst bei einem Ausschluss der Patienten, die innerhalb der letzten zwei Jahre eine Instillationstherapie erhielten stieg die Sensitivität nur marginal an.

Der NMP22BladderChek® ist der Urinzytologie zwar in der Sensitivität überlegen, weißt jedoch eine deutlich niedrigere Spezifität auf. Infolgedessen kann dieser Test die Urinzytologie derzeit nicht ersetzen. Möglicherweise wäre eine Kombination der Urinzytologie mit dem NMP22BladderChek® denkbar, welche zu einer Verbesserung in der Tumordiagnostik führen würde. Jedoch wäre diese Kombination auch mit einem höheren Kostenaufwand verbunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bislang vorliegenden Daten es nicht erlauben den NMP22BladderChek® derzeit als Alternative zur Endoskopie zu betrachten bzw. eine generelle Empfehlung im Screening oder der Nachsorge auszusprechen. Die Zystoskopie bleibt der Urinzytologie und dem nichtinvasiven NMP22BladderChek® überlegen. Weitergehende multizentrische kontrollierte Studien sind, verbunden mit einer klaren Indikationsstellung für selektionierte Patientengruppen, erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

01. **Abbate** I, D'Introno A, Cardo G, Marano A, Addabbo L, Musci M:
Comparison of nuclear matrix protein 22 and bladder tumor antigen in urine of patients with bladder cancer
Anticancer Res 18, 3808, 1998
02. **Akkad** T, Verdorfer I, Mueller T, Gozzi C, Bartsch G, Steiner H:
Voided urinary specimen-comparison of a multitarget in situ hybridisation fluorescence (FISH) assay, NMP22-BladderChek and conventional cytology for detection of transitional cell cancer of the bladder
European Urology Suppl. 4 (3): 159, 2005
03. **Althausen**, AF, Prout jr GR, Daly JJ:
Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ
Journal of Urology 116(5): 575-580, 1976
04. **Bassi** P, Ferrante G, Piazza N, Spinadin R, Carando R, Pappagallo G, Pagano F :
Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort.
Journal of Urology 161(5): 1494-1497, 1999
05. **Baumhoer** D, Steinbrück I, Götz W :
Histologie – Kurzlehrbuch mit Schemazeichnungen
Urban & Fischer Verlag München, Jena; 1. Auflage 2000
06. **Casella** R, Huber P, Blöchliger A, Stoffel F, Dalquen P, Grasser TC, Lehmann K:
Urinary level of nuclear matrix protein 22 in the diagnosis of bladder cancer: experience with 130 patients with biopsy confirmed tumor
The Journal of Urology 164: 1926-1928, 2000
- 07 **Chahal** R, Darshane A, Browning AJ, Sundaram SK:
Evaluation of the clinical value of urinary NMP22 as a marker in the screening and surveillance of transitional cell carcinoma of the urinary bladder
European Urology 40: 415, 2001
08. **Chang** YH, Wu CH, Lee YL, Huang PH, Kao YL, Shiao MY:
Evaluation of nuclear matrix protein-22 as a clinical diagnostic marker for bladder cancer
Urology 64: 687-92, 2004

09. Cole P:

Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract.

Lancet 1: 1335, 1971

10. Danilchenko D; Riedl CR, Sachs MD, Koenig F, Daha KL, Pflueger H, Loening SA, Schnorr D:

Long-term benefit of 5-aminolevulinic acid fluorescence assisted transurethral resection of superficial bladder cancer: 5-year results of a prospective randomized study

The Journal of Urology 174: 2129-2133, 2005

11. Del Nero A, Esposito N, Curro A, Biasoni D, Montanari E, Mangiarotti B, Trinchieri A, Zanetti G, Serrago MP, Piasani E:

Evaluation of Urinary Level of NMP-22 as a Diagnostic Marker for Stage pTa-pT1 Bladder Cancer: Comparison with Urinary Cytology and BTA Test

European Urology 53: 93-97, 1999

12. Denzinger S, Rößler W, Wieland WF, Filbeck T:

Senkung der Rezidivrate oberflächlicher Blasenkarzinome durch transurethrale Resektion mittels 5-Aminolävulinsäure induzierter Fluoreszenzdiagnostik - ein 8-Jahres Follow-up.

Der Urologe 45 (Supplement 1): S77, 2006

13. Dorp F, Kausch I, Joacham D:

Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms

Deutsches Ärzteblatt Jg. 104, Heft 12: 797-802, 2007

14. Eissa S, Swellam M, Sadek M, Mourad MS, Ahmady O, Khalifa A:

Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibrnectin, unrinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors.

The Journal of Urology 168: 465-469, 2002

15. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR:

The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder.

Am J Surg Pathol 22: 1435-1448, 1998

16. Filbeck T, Pichlmeier U, Knuechel R, Wieland WF, Roessler W:

Clinically relevant improvement of recurrence-free survival with 5-Aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis in patients with superficial bladder tumors

The Journal of Urology 168: 67-71, 2002

17. **Filbeck** T, Roessler W, Knuechel R, Straub M, Kiel HJ, Wieland WF:
Clinical Results of the Transurethral Resection and Evaluation of Superficial Bladder Carcinomas by Means of Fluorescence Diagnosis after Intravesical Insillation of 5-Aminolevulinic Acid
Journal of Endourology 13 (2): 117-121, 1999

18. **Friedrich** MG, Hellstern A, Hautmann SH, Graefen M, Conrad S, Huland E, Huland H:
Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against lewis X and 486p3/12 with the BTA stat and NMP22 test
The Journal of Urology 168: 470-474, 2002

19. **Friedrich** MG, Hellstern A, Hautmann SH, Noldus I, Huland H:
Nichtinvasive Urintests in der Diagnostik und als Prognosemarker beim Harnblasenkarzinom
Urologe (A) 42: 523-530, 2003

20. **Friedrich** MG, Hellstern A, Toma MI, Hammerer P, Huland H:
Are false-positive urine markers for the detection of bladder carcinoma really wrong or do they predict tumor recurrence?
European Urology 43: 146-151, 2003

21. **Getzenberg** RH, Konety BR, Oeler TA:
Bladder cancer associated nuclear matrix proteins.
Cancer Res 56: 1690–1694, 1996

22. **Giannopoulos** A, Manousakas T, Gounari A, Constantinides C, Choremi-Papadopoulou H, Dimopoulos C:
Comparative evaluation of the diagnostic performance of the BTA stat test, NMP-22 and urinary bladder cancer antigen for primary and recurrent bladder tumors
The Journal of Urology 166: 470-475, 2001

23. **Glas** AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH:
Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review
The Journal of Urology 169: 1975-1982, 2003

24. **Goebell** PJ, vom Dorp F, Rödel C, Frohneberg D, Thüroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knüchel R, Schmidt KW, Kausch I, Zaak D, Wiesner C, Miller K, Sauer R, Rübber H:
Nichtinvasives und invasives Harnblasenkarzinom – Diagnostik und Therapie.
Der Urologe 45: 873-885, 2006

25. **Gonwa** TA, Corbett WT, Schey HM, Buckalew VM:
Analgesic associated nephropathy and transitional cell carcinoma of the urinary tract.
Ann Intern Med 93: 249, 1980

-
26. **Grossman** HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, Shen Y:
Detection of Bladder Cancer Using a Point-of-Care Proteomic Assay
JAMA 293 (7): 810-816, 2005
27. **Hautmann** S, Filippow N, Braun P, Ellinghausen H, Friedrich M, Huland H, Juenemann K:
The new proteomic-based point-of-care (POC) urine NMP22-BladderChek® compared to the standard NMP22
ELISA urine lab test for bladder cancer detection
European Urology 3 (4): 160, Abstract #630, 2005
28. **Hautmann** R, Huland H:
Urologie
Springer Medizin Verlag Heidelberg, 3. Auflage, 2006
29. **Hellsten** S, Rintala E, Wahlqvist R, Malmström PU.
Nordic prospective trials of radical cystectomy and neoadjuvant chemotherapy. The Nordic Cooperative Bladder
Cancer Study Group.
European Urology 33 (4): 35-38, 1998
30. **Herr** H:
The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors.
The Journal of Urology 162: 74-76, 1999
31. **Hoffmann** D, Masuda Y, Wynder EL:
Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke.
Nature 221: 254, 1969
32. **Hueper** WC, Wiley FH, Wolfe HD:
Experimental production of bladder tumours in dogs by administration of beta-naphthylamine.
J Indust Hyg Toxicol 20 (1): 46, 1938
33. **Huncharek** M, Geschwind JF, Witherspoon B, McGarry R, Adcock B:
Intravesical chemotherapy prophylaxis in primary superficial bladder cancer: a meta-analysis of 3703 patients
from 11 randomized trials.
Journal of Clinical Epidemiol. 53: 676, 2000
34. **Jocham** D, Witjes F, Wagner S, Zeylemaker B, van Moorselaar J, Grimm MO, Muschter R, Popken G,
König F, Knüchel R, Kurth KH:
Improved detection and treatment of bladder cancer using hexaminolevulinate imaging: a prospective, phase III
multicenter study.
The Journal of Urology 174: 862-866, 2005

-
35. **Koenig** F, McGovern FJ, Larne R, Enquist H, Schomacker KT, Deutsch TF:
Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid
BJU International 83: 129-135, 1999
36. **Konety** BR:
Current Status of Urinary Tests for Bladder Cancer Detection.
AUA News 12 (1): 5-7, 2007
37. **Kriegmair** M, Baumgartner R, Ehsan A, Steinbach P, Lumper W, Hofstädter F, Hofstetter A:
Photodynamische Diagnose urothelialer Neoplasien nach intravesikaler Instillation von 5-Aminolävulinsäure :
Laserbehandlung in der Urologie
Der Urologe A 33: 270-275, 1994
38. **Kriegmair** M, Baumgartner R, Knuchel R, Stepp H, Hofstaedter F, Hofstetter A:
Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence
The Journal of Urology 155(1): 105-109, 1996
39. **Kriegmair** M, Zaak D, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Knuechel R, Hofstetter A :
Transurethral Resection and Surveillance of Bladder Cancer Supported by 5-Aminolevulinic Acid-Induces
Fluorescence Endoscopy
European Urology 36: 386-392, 1999
40. **Kriegmair** M, Zaak D, Rothenberger KH, Rassweiler J, Jocham D, Eisenberger F, Tauber R, Stenzl A,
Hofstetter A:
Transurethral resection for bladder cancer using 5-aminolevulinic acid induces fluorescence endoscopy versus
white light endoscopy.
The Journal of Urology 168: 457-478, 2002
41. **Kunze** E, Calude J, Frentzel-Beyme R:
Association of cancer of the lower urinary tract with consumption of alcoholic beverages – a case control study.
Carcinogenesis 7: 163, 1986
42. **Lahme** S, Bichler KH, Feil G, Krause S:
Comparison of Cytology and Nuclear Matrix Protein 22 for the detection and follow-up of bladder cancer
Urologia Internationalis 66: 72-77, 2001

43. **Lamm DL**, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, Stanisc TH, Smith JA, Sullivan J, Sarosdy MF, Crissman JD, Coltman CA :

A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacilli Calmette-Guérin for transitional cell carcinoma of the bladder.

N Engl J Med 325: 1205-09, 1991

44. **Lamm DL**:

BCG in perspective: advances in the treatment of superficial bladder cancer.

Eur Urol 27 Suppl. 1: 2-8, 1995

45. **Landman J**, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, Liu BC:

Sensitivity and specificity of NMP-22, Telomerase and BTA in the detection of human bladder cancer

Urology 52: 398, 1998

46. **Lee KH**:

Evaluation of the NMP22 test and comparison with voided urine cytology in the detection of bladder cancer.

Yonsei Med J 42: 14, 2001

47. **Lehmann J**, Retz M, Stöckle M:

Blasenkarzinom – Neue Perspektiven in Diagnostik und Behandlung.

Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005

48. **Liedl B**, Zaak D, Schwaibold H, Hungerhuber E, Zimmermann F, Treiber U, Weiss M:

Harnblasenkarzinom. In Urogenitale Tumoren. Hrsg.: TZM München

3. Auflage, 2003

49. **Lipinski M**, Jeromin L:

Comparison of the bladder tumour antigen test with photodynamic diagnosis in patients with pathologically confirmed recurrent superficial urinary bladder tumour

BJU International 89: 757-759, 2002

50. **Lokeshwar VB**, Soloway MS:

Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity?

The Journal of Urology 165: 1067-1077, 2001

51. **Lopez-Beltran A**, Montironi R:

Non-invasive urothelial neoplasms: According to the most recent WHO classification.

Eur Urol 46: 170-176, 2004

52. **Malmström** PU, Wijkström H, Lundholm C, Wester K, Busch C, Norlen BJ:
5-Year followup of a randomized prospective study comparing mitomycin C and bacillus calmette-guerin in patients with superficial bladder carcinoma
The Journal of Urology 161: 1124-1127, 1999
53. **Millan-Rodriguez** F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodriguez J:
Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence
The Journal of Urology 164: 680-684, 2000
54. **Miyana** N, Akaza H, Ishikawa S, Ohtani M, Noguchi R, Kawai K, Koiso K, Kobayashi M, Koyama A, Takahashi T:
Clinical Evaluation of Nuclear Matrix Protein 22 (NMP22) in Urine as a Novel Marker for Urothelial Cancer
European Urology 31: 163-168, 1997
55. **Miyana** N, Akaza H, Tsukamoto T, Ishikawa S, Noguchi R, Ohtani M:
Urinary nuclear matrix protein 22 as a new marker for the screening of urothelial cancer in patients with microscopic hematuria
International Journal of Urology 6: 173, 1999
56. **Moonen** PMJ, Kiemeny LALM, Witjes JA:
Urinary NMP22®BladderChek® Test in the Diagnosis of Superficial Bladder Cancer.
European Urology 48: 951-956, 2005
57. **Morrison** AS, Cole P:
Urinary tract.
In: Schottenfeld D, Fraumeni FJ, Saunders WB (eds) Cancer epidemiology and prevention.
Saunders, Philadelphia: 925, 1982
58. **Mostofi** FK, Sobin LH, Tosoni I:
Histological typing of urinary bladder tumours.
International classification of tumours, No 19, WHO, Geneva, 1973
59. **Norpoth** K, Weitowitz HJ:
Beruflich verursachte Tumoren.
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1994
60. **Oge** O, Atsu N, Kendi S, Ozen H:
Evaluation of nuclear matrix protein 22 (NMP22) as a tumor marker in the detection of bladder cancer
Int Urol Nephrol 32: 367, 2001

-
61. **Oosterlinck** W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C:
Guidelines on Bladder Cancer
European Urology 41: 105-112, 2002
62. **Paoluzzi** M, Cuttano MG, Mugnaini P, Salsano F, Giannotti P:
Urinary dosage of nuclear matrix protein 22 (NMP22) like biologic marker of transitional cell carcinoma (TCC):
a study on patients with hematuria
Arch Ital Urol Androl 71: 13, 1999
63. **Patrianakos** C, Hoffman D:
Chemical studies on tobacco smoke. LXIV On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke.
J Anal Toxicol 3: 150, 1979
64. **Pearson** RM, Soloway MS:
Does cyclophosphamide induce bladder cancer?
Urology 4: 437, 1978
65. **Ponsky** LE, Sharma S, Pandrangi L, Kedia S, Nelson D, Agarwal A, Zippe CD:
Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22
The Journal of Urology 166: 75-78, 2001
66. **Poulakis** V, Witzsch U, Vries R, Altmannsberger HM, Manyak MJ, Becht E:
A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumor antigen tests with voided urinary cytology
in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results
BJU International 88(7): 692-701, 2001
67. **Raitanen** M, Aine R, Rintala E:
Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver
multicenters analysis.6
European Urology 41: 284-289, 2002
68. **Ramakumar** S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML:
Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer.
The journal of Urology 161: 388, 1999
69. **Rathert** P, Melchior HJ, Lutzeyer W:
Phenacetin: A carcinogen for the urinary tract.
J Urol 113: 653, 1975

70. **Rathert P**, Roth S:
Urinzytologie – Praxis und Atlas
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 3., aktualisierte Auflage, 1995
71. **Reich O**, Zaak D, Knüchel R, Kriegmair M, Hofstetter A:
Die 5-ALA zur Detektion des Harnblasenkarzinoms – eine techinsche Spielerei oder diagnostischer Fortschritt?
Der Urologe A, 39 (Suppl. 1): 11, 2000
72. **Riedl C**, Daniltchenko D, Koenig F, Simak R, Loening S, Pflueger H:
Fluorescence endoscopy with 5-Aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer
The Journal of Urology 165: 1121-1123, 2001
73. **Saad A**, Hanbury DC, McNicholas TA, Boustead GB, Morgan S, Woodman AC:
A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine.
BJU International 89: 369-373, 2002
74. **Schmidbauer J**, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M:
Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy
The Journal of Urology 171: 135-138, 2004
75. **Schrag D**, Hsieh LJ, Rabbani F, Bach PB, Herr H, Begg CB:
Adherence to Surveillance Among Patients With Superficial Bladder Cancer.
Journal of The National Cancer Institute 95, No. 8: 588-597, 2003
76. **Schwaibold H**, Leyh H, Hartung R:
Ist die intravesikale Chemotherapie beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom überholt?
Akt Urol 30: 380-385, 1999
77. **Seitz M**, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C:
Harnblasentumoren / Die neue WHO-Klassifikation 2004
Der Urologe 44: 1073-1086, 2005
78. **Sharma S**, Zippe CD, Pandrangi L, Nelson L, Agarwal A:
Exclusion criteria enhance the specifity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat
The Journal of Urology 162: 53, 1999
79. **Soloway M**, Murphy W, Rao MK, Cox C:
Serial Multiple-Site biopsies in patients with bladder cancer
The Journal of Urology 120: 57-59, 1978

80. **Soloway** M, Briggman JV, Carpinito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL, Lange P, Messing E, Pasciak RM, Reservitz GB, Rukstalis DB, Sarosdy MF, Stadler WM, Thiel RP, Hayden CL:
Use of a new Tumor Marker, Urinary NMP22, in the Detection of Occult or Rapidly Recurring Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Tract Following Surgical Treatment
The Journal of Urology 156(2): 363-367, 1996
81. **Sözen** S, Eskicorabci S, Özen H:
Urinary markers for urothelial cancer
BJU International 92: 531-533, 2003
82. **Sözen** S, Biri H, Sinik Z, Kupeli B, Alkibay T, Bozkirli I:
Comparison of the nuclear matrix protein 22 with voided urine cytology and BTA stat test in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder.
European Urology 36: 225, 1999
83. **Stief** C, Zaak D, Stöckle M, Studer U, Knuechel R, Rödel C, Sauer R, Rubben H:
Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms – Standards und Perspektiven.
Der Urologe Sonderheft 45: 90-96, 2006
84. **Tauber** S, Liedl B, Schneede P¹, Ließmann F, Waidelich R und Hofstetter A:
Fluoreszenzzytologie der Harnblase
Urologe (A) 40: 217-221, 2001
85. **van der Meijden** AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W:
Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for TaT1 bladder tumors is not associated with increases toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial.
Eur Urol 44 (4): 429-434, 2003
86. **van der Meijden** A, Sylvester R, Oosterlinck W, Solsona E, Boehle A, Lobel E, Rintala E:
EAU Guidelines on the diagnosis and treatment of urothelial carcinoma in situ
European Urology 48: 363-371, 2005
87. **van Rhijn** B, van der Poel HG, van der Kwast TH:
Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review
European Urology 47: 736-748, 2005
88. **Wynder** EL, Goldsmith R:
The epidemiology of bladder cancer: a second look.
Cancer 40: 1246, 1977

89. **Zaak D**, Kriegmair M, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Oberneder R, Schneede P, Corvin S, Frimberger D, Knüchel R, Hofstetter A:
Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-Aminolevulinic acid: results of 1012 fluorescence endoscopies.
Urology 57 (4): 690-694, 2001
90. **Zaak D**, Hungerhuber E, Schneede P, Stepp H, Frimberger D, Corvin S, Schmeller N, Kriegmair M, Hofstetter A, Knöchel R:
Role of 5-Aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions
American Cancer Society 95 (6): 1234-1238, 2002
91. **Zaak D**, Hofstetter A:
The current diagnosis of superficial bladder cancer must be reconsidered
Urologia Internationalis 69: 85-90, 2002
92. **Zaak D**, Karl A, Knüchel R, Stepp H, Hartmann A, Reich O, Bachmann A, Siebels M, Popken G, Stief C:
Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy
BJU International 96: 217-222, 2005
93. **Zaak D**, Tritschler S, Knuechel R, Vom Dorp F, Hakenberg OW, Hautmann S, Rübben H:
Die Urinzytologie - Möglichkeiten, Grenzen und Zukunft.
Der Urologe Sonderheft: 97-101, 2006
94. **Zaak D**:
Fotos PDD versus Weißlichtendoskopie, 2007
95. **Zippe C**, Pandrangi L, Agarwal A:
NMP22 is a sensitive, cost-effective test in patients at risk for bladder cancer
The Journal of Urology 161: 62-65, 1999
96. **RKI-Schätzung** für Deutschland 2002, <http://www.rki.de>
97. **Tumorregister München** <http://www.med.uni-muenchen.de/trm>

7 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an meinen Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Zaak. Ich möchte mich bei ihm für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation, sowie für die Bereitstellung des Themas und die stets hilfreiche und motivierende Unterstützung während der Erstellung bedanken. Die immer mögliche Ansprechbarkeit sowie die stets prompte Rückmeldung ist keine Selbstverständlichkeit.

Ein weiterer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Stefan Tritschler, der mir insbesondere in der Anfangsphase jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, sowie Herrn Prof. Dr. med. Christian Stief, dem Ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Bedanken möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei Roswitha Fischer für die große Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre in ihrem Labor.

Außerdem bedanke ich mich bei den Schwestern und Pflegern der Stationen G4, H4 und I22 für ihre Mithilfe sowie bei allen Studienteilnehmern, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, die Studie überhaupt durchzuführen.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle ganz besonders meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, denen die Doktorarbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir das Medizinstudium ermöglicht und sind mir jederzeit und in jeder Hinsicht während des Studiums sowie bei der Erstellung der Dissertation zur Seite gestanden.

Ein ebenso großer Dank gilt meinem Freund Tom, der mich stets unterstützt und motiviert und somit zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Scharf
Vorname:	Sonja Heike
Geburtsdatum/ -ort:	26.04.1981, München
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1987 - 1991	Besuch der Grundschule Am Schererplatz, München
1991 – 06 / 2000	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Max-Planck-Gymnasiums, München Leistungskurse: Französisch, Kunsterziehung Sprachen: Englisch, Französisch
06 / 2000	Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

10 / 2000 – 10 / 2001	Studium der Betriebswirtschaftslehre, Universität Augsburg
10 / 2001 – 10 / 2002	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
10 / 2002 – 10 / 2003	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm

08 / 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum), Universität Ulm
10 / 2003 – 10 / 2007	Studium der Humanmedizin, Technische Universität München
10 / 2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Technische Universität München
Seit 01 / 2008	Assistenzärztin der Augenklinik Rechts der Isar der TU München