Aus der Klinik für Urologie
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Jocham

Das invertierte Papillom des Harntraktes – Eine klinische Untersuchung mit immunhistochemischer Diagnostik

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Amelie Barth
aus Hannover

Traunstein 2014

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Doehn
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Czymek
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2014

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 10.10.2014

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung und Fragestellung 1
1.1 Invertiertes Papillom 1
1.1.1 Geschichte des invertierten Papilloms 1
1.1.2 Ursachen und Häufigkeit 2
1.1.3 Klinische Aspekte 3
1.1.4 Therapie 3
1.2 Urothelkarzinom 3
1.3 Assoziation zwischen invertiertem Papillom und Urothelkarzinomen 6
1.4 Fragestellungen 8
2 Material und Methoden 9
2.1 Versuchs- und Erhebensplanung 9
2.2 Patienten 10
2.3 Immunhistochemische Untersuchungen 11
2.4 Beschreibung der immunhistochemischen Marker 13
2.4.1 Herstellen der Paraffinschnitte 13
2.4.2 HER-2 14
2.4.3 p53 15
2.4.4 Cadherin 16
2.4.5 Survivin 17
2.4.6 MIB 18
2.4.7 Clusterin 19
2.4.8 p16 20
2.4.9 CD24 21
2.5 Statistik 23
3 Ergebnisse 27
3.1 Patientengruppe 27
3.2 Auswertung der Begleitfaktoren 27
3.2.1 Patienten mit alleinigem invertierten Papillom 27
3.2.2 Patienten mit invertiertem Papillom und Urothelkarzinom 30
3.2.3 Bedeutung der Begleitfaktoren 32
3.2.4 Bedeutung der statistischen Auswertung 33
3.3 Auswertung der immunhistochemischen Marker 34

3.3.1 Patienten mit alleinigem invertierten Papillom 34
3.3.2 Patienten mit invertiertem Papillom und Urothelkarzinom 37
3.3.3 Bedeutung der immunhistochemischen Marker 37
3.3.4 Bedeutung der statistischen Auswertung 41
4 Diskussion 43
5 Zusammenfassung 53
Literaturverzeichnis 55
Anhänge 59
Danksagungen 65
Lebenslauf 66

Abkürzungsverzeichnis

API4	Apoptose Inhibitor 4
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCL2	B-Cell-Lymphoma 2
BIRC5	Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing 5
CD24	Cluster of differentiation 24
CDK 4/6	Cyclin-dependent Kinase 4/6
COX-2	Cyclooxygenase 2
Cyclin D	Cyclin-Protein, welches den Zellzyklus mitreguliert
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DANN	Desoxyribonukleinsäure
E2F	E2-Promotor-Binding-Factor
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ErBß	Bestandteil der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptoren
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER-2	Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo Dalton
MIB	Made in Borstel
p16	Tumorsuppressorgen 16
p53	Tumorsuppressorgen 53
PUNLMP	Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
Ta	Nichtinvasives papilläres Karzinom
TiS	Carcinoma in situ
TNM	Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumore (engl. für

	Tumor, Node, Metastasis)
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organization

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Invertiertes Papillom

1.1.1 Geschichte des invertierten Papilloms

Paschkis berichtete 1927 erstmals von einem „adenomatoiden Polypen" bei insgesamt vier Patienten [Paschkis 1927]. Erst einige Jahrzehnte später gelang es, den Tumor weiter zu differenzieren und anhand eines Falls zu publizieren. Erstbeschreiber des invertierten Papilloms sind Ian F. Potts und Edmond Hirst aus den Departments of Urology and Pathology im Sydney Hospital, Sydney, Australien [Potts und Hirst 1963]. Sie veröffentlichten 1963 eine Arbeit, in der sie den Fall eines Patienten mit einem ihnen vom Bild unbekannten Tumor der Blase vorstellten.

Beschrieben wurde die Anamnese eines 63-jährigen Patienten, der seit drei Jahren an Dysurie, Nykturie und häufigem Harndrang litt. Neben Befunden des kardiovaskulären und pulmonalen Systems gab es keinerlei Auffälligkeiten, die auf eine Erkrankung des Harntraktes hinwiesen. Es gab weder Operationen noch schwerwiegende Erkrankungen in der Vorgeschichte. Der Urin zeigte sich makroskopisch klar, keine Auffälligkeiten im Zentrifugat und war steril in der Kultur. In der Zystoskopie war ein Tumor zu erkennen, der aus dem Blasenhals wuchs und gestielt war. Der Hauptteil des Tumors maß 3x2x2cm, der Stiel 0,5x1cm. Der Gesamteindruck ließ auf einen gutartigen Tumor schließen, gelblich in der Farbe und von glatter, glänzender Epithelschicht bedeckt. Das Papillom war mobil und verschieblich, die restliche Blase stellte sich unauffällig dar. Der Operateur beschloss, den Tumor zu entfernen und zystoskopierte erneut nach jeweils fünf, zwölf und 18 Monaten, zu keinem Zeitpunkt gab es ein auffälliges Verhalten der Blasenschleimhaut.

Die mikroskopische Untersuchung ergab ein „Papillom ungewöhnlicher Struktur" mit einer Umkehrung der normalen Struktur, fast ausschließlich von Übergangsepithel bedeckt und ohne Anzeichen einer Entzündung. Besonders die „Kombination aus weicher Oberfläche und Pedunkel" brachte die Autoren auf den Gedanken, dass es sich um einen Tumor handeln muss, der bisher nie in dieser Form beschrieben wurde. Sie weigerten sich, ihn „einfach als Variante der gewöhnlichen papillären Übergangsepithel-Tumore" zu beschreiben. Aufgrund des histologischen

Bildes vermuten sie, dass es sich um benignes Wachstum handelt [Potts und Hirst 1963].

1.1.2 Ursachen und Häufigkeit

Grundsätzlich werden Harnblasentumore in solides und papilläres Wachstum unterteilt, wobei ca. 95% aller Tumore histologisch betrachtet vom Urothel ausgehen. Plattenepithel- und Adenokarzinome machen lediglich 5% der Entitäten aus [Raghavan et al. 1995; Riede et al. 1995]. Die Einteilung der Blasentumore erfolgt nach der TNM-Klassifikation zur Beurteilung der Ausbreitung sowie der WHO-Klassifikation zur Einschätzung des histopathologischen Grading. Nach der TNM-Klassifikation fällt das invertierte Papillom unter die Bezeichnung „Ta" für nichtinvasive papilläre Tumore und infiltriert in diesem Stadium definitionsgemäß lediglich das Urothel, während höhergradige Stadien auch die Lamina propria, die Muskularis oder das Fettgewebe durchdringen.

Die WHO-Klassifikation unterscheidet generell je nach genetischer Stabilität in „Low-grade"- und „High-grade"-Tumore. Die papillären Tumore werden in drei weitere Untergruppen klassifiziert- hochdifferenzierte papilläre Entitäten gelten als nichtmaligne und werden als „papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potenzial" (PUNLMP) bezeichnet. Sobald eine geringgradige Veränderung des Urothels (mit jedoch weitgehend erhaltener Struktur) vorliegt, handelt es sich um sogenannte „nichtinvasive Low-grade-Karzinome". Sowohl die PUNLMP als auch die nichtinvasiven Low-grade-Karzinome gelten als genetisch stabile Tumore. Bei eindeutiger Schichtungsstörung des Urothels handelt es sich schließlich um „nichtinvasive High-grade-Karzinome". Als „Carcinoma-in-situ" werden jene Tumore bezeichnet, welche eine deutliche Kernpolymorphie aufweisen.

Unter den Blasentumoren machen invertierte Papillome einen Anteil von ca. 0,4-4% aus. Die Inzidenzen schwanken zwischen 0,36% [Derouiche 2006] und 4,5% [Tsujimura 1996]. Sie gelten als benigne Entität und weisen keine Tendenz zur Infiltration auf [Doehn et al. 2006], jedoch wird auch von einem multifokalen Vorkommen berichtet. Das invertierte Papillom tritt überwiegend in der Harnblase auf (80-90%), dabei größtenteils am Trigonum (80%), selten misst der Tumor mehr als drei cm. In bis zu zehn Prozent der Fälle sind Rezidive beschrieben, in 10-15%

geht man von einer Assoziation mit dem Auftreten eines synchronen bzw. asynchronen Urothelkarzinoms aus.

1.1.3 Klinische Aspekte

Das invertierte Papillom ein seltener, aber grundsätzlich benigner Tumor. Bis dato sind insgesamt etwa 1000 Fälle publiziert. Die Patientenzahlen der Untersuchungsreihen liegen zwischen zehn [Broussard 2004] und 48 [Asano 2003]. Übereinstimmend belegen die Daten ein deutlich häufigeres Vorkommen bei männlichen Patienten. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt ca. 60 Jahre, schwankend von 56 [Asano 2003] bis 64 Jahre [Broussard 2004]. Die Symptomatik umfasst sämtliche Miktionsstörungen, wobei die Makrohämaturie als führendes Merkmal gilt.

1.1.4 Therapie

Die Dignität des invertierten Papilloms ist gesichert, unklar scheint jedoch das Wachstumsverhalten auf längere Sicht. Mehrfach wurde der Verdacht auf eine mögliche maligne Entartung geäußert, weshalb der Umfang der Nachsorge ungeklärt ist. Bisher besteht die Therapie dieses Tumors in der transurethralen Resektion der Harnblase, eindeutige Leitlinien liegen diesbezüglich allerdings nicht vor.

1.2 Urothelkarzinom

Das Harnblasenkarzinom ist die fünfthäufigste maligne Tumorerkrankung der Welt, an der jährlich über 130.000 Menschen versterben. Die Risikofaktoren sind zahlreich, darunter fallen karzinogene Noxen wie z.B. Nikotinabusus, aber auch chronisch-entzündliche Erkrankungen der ableitenden Harnwege sowie eine genetische Disposition. Becker et. al belegten, dass etwa 50% der männlichen und ca. 20% der weiblichen Todesfälle vermeidbar wären [Becker et al. 1997]. Die weltweit gemittelte Inzidenz liegt aktuell bei 10,1 pro 100.000 Personen für Männer und 2,5 pro 100.000 Personen für Frauen [Ferlay et al. 2004].

Das Harnblasenkarzinom wird bei 80% der Patienten nach dem Auftreten einer Mikro- oder Makrohämaturie entdeckt. Bei 15% der Patienten mit Makrohämaturie und 2-22% mit Mikrohämaturie wird ein Urothelkarzinom diagnostiziert. Dabei ist nicht von der Ausprägung der Hämaturie auf das Stadium des Tumors zu schließen. Seltener treten auch dysurische Beschwerden und imperativer Harndrang als

Erstsymptome auf.

Bei oberflächlichen Harnblasentumoren (Ta, Tis und T1) wird angestrebt, das Auftreten eines Rezidivs nach primärer Resektion zu vermeiden. Beim Tis ist mit seinem hochmalignen Potential eine Therapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin) oftmals erfolgreich. Tritt auch nach sechs- bis achtwöchigen Zyklen keine Heilung ein, ist eine Zystektomie angezeigt. Diese ist auch bei muskelinvasiven Tumoren häufig indiziert, selten ist ein Blasenerhalt möglich. Da ein T1G3-Tumor stark zur Progression neigt, kann eine frühe Zystektomie ratsam sein.

Am Anfang der diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen aller Harnblasenkarzinome steht die transurethrale Resektion der Harnblase (TUR-B) zur makroskopischen Einschätzung und Materialgewinnung. Die EAU-Leitlinien empfehlen eine Kaltbiopsie zur Bestimmung des histologischen Bildes und eine TUR-B zur Schätzung der Tumorgröße. [Babjuk 2011]

Bei positiver Zytologie und unauffälliger Zystoskopie sollte ein Mapping der Harnblase erfolgen. Enthält die Probe keine Muskulatur, werden 48% der T1-Tumoren zu niedrig eingestuft im Gegensatz zu 14% der Proben mit Muskulatur, weshalb häufig Nachresektionen gefordert werden. Nach Abtragung der oberflächlichen Tumoranteile sollte daher auch eine Probe aus dem Tumorgrund entnommen werden, um die mögliche Muskelinvasion festzustellen. Bei wiederkehrenden Tumoren kann eine Laserbehandlung auch ohne histologische Untersuchung mit Nd-, Ar- oder Ho-YAG-Lasern erfolgen. [Babjuk 2011]

Zur Behandlung des oberflächlichen Urothelkarzinoms stehen im Wesentlichen die intravesikale und die photodynamische Therapie sowie die Chemoprävention des Karzinoms zur Verfügung. Nach den EAU-Leitlinien kann nach erfolgter Chemotherapie und Auftreten eines Rezidivs dieselbe Therapie erneut durchgeführt werden, für schnell rezidivierende Tumoren wird in zweiter Linie eine BCG-Installations-Therapie empfohlen. [vom Dorp et. al. 2009]

Mit der adjuvanten Installationstherapie soll das Auftreten von Rezidiven und die Tumorprogression vermieden werden, beim Carcinoma in situ wird die endgültige Zerstörung des Tumors angestrebt. Medikamente der intravesikalen Chemotherapie sind beispielsweise Thiopeta, Doxorubicin, Mitomycin, Epirubicin oder

Valrubicin. Bei der intravesikalen Immuntherapie wird die Immunantwort der Harnblase als Reaktion auf einen antigenen Reiz genutzt, der mit Substanzen wie BCG, Interferon oder Keyhole-Limpet Hemocyanin hervorgerufen wird. [Babjuk 2011]

Für die Erhaltungstherapie scheint eine wöchentliche Applikation über drei Wochen alle drei, sechs, zwölf, 18, 24, 30 und 36 Monate nach einer Induktionstherapie wirksam zu sein, während weder bei der monatlichen, vierteljährlichen noch bei der halbjährlichen Applikation von einem Vorteil auszugehen ist. Bei der Installationstherapie der Ta- und T1-Urothelkarzinome ist eine mindestens einjährige BCG-Erhaltungstherapie signifikant besser als eine Behandlung mit Mitomycin (bezogen auf das Progressionsrisiko). Die Single-dose-Installationstherapie in der Therapie der Ta- und T1-Tumoren senkt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs auf 36% bei unifokalen Tumoren. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bei multiplen Tumoren wird lediglich auf 65% herabgesetzt, sodass hier weitere Installationen empfohlen werden. [Babjuk 2011]

Im Vergleich zu Mitomycin C haben Patienten mit einem mittleren und hohen Rezidivrisiko mit einer BCG-Erhaltungstherapie über mindestens ein Jahr eine eindeutig geringere Rezidivrate. Beim Tis und bei BCG-Versagern ist intravesikales Hochdosis-IFN-α eine wirksame Therapie und kann auch mit anderen intravesikalen Chemotherapeutika und BCG kombiniert werden. Die photodynamische Therapie gehört nicht zu den gängigen Behandlungsmethoden, sie stellt noch immer einen experimentellen Ansatz dar und die klinischen Daten sind nicht eindeutig.

Für die Chemoprävention oberflächlicher Harnblasenkarzinome spielen die Vitamine B6, C und E eine Rolle. Die Bedeutung ist jedoch weitgehend ungeklärt. Retinoide sind natürliche oder synthetische Analoga des Vitamin A. Eine verminderte Einnahme scheint mit einem gesteigerten Karzinomrisiko einherzugehen. Isoflavone kommen in Sojaprodukten vor und verringern das Tumorrisiko. COX-2 wird vom normalen Urothel nicht, vom Urothelkarzinom aber überexprimiert. Selektive und nicht-selektive COX-2-Inhibitoren werden daher als therapeutischer Ansatz diskutiert. [vom Dorp et. al. 2009]

Die EAU-Leitlinien empfehlen eine erste Zystoskopie zur Kontrolle nach drei Mona-

ten, bei Patienten mit pT1G2 oder G3 sollte schon zuvor eine Nachresektion stattfinden. Patienten mit niedrigem Risiko sollten eine zweite Zystoskopie nach sechs Monaten und anschließend in jährlichen Abständen bis zu fünf Jahren durchführen lassen. Patienten mit hohem Risiko sollten dies alle drei Monate in den ersten zwei Jahren, alle vier Monate im dritten Jahr, alle sechs Monate bis zum fünften Jahr und anschließend jährlich tun. Nach jedem Rezidiv beginnt die Nachsorge wieder von Neuem. Das Follow-up beträgt bei einem unifokalen TaG1-Tumor fünf Jahre, bei Patienten mit hohem Risiko lebenslang und in allen anderen Fällen zehn Jahre. [Babjuk 2011] (vgl. Tabelle 13 im Anhang)

1.3 Assoziation zwischen invertiertem Papillom und Urothelkarzinomen

Da das invertierte Papillom als nichtmaligne gilt, stellt sich die Frage der Notwendigkeit und Art der Therapie. In der Regel wird eine transurethrale Resektion der Harnblase durchgeführt, bei der das Papillom entfernt wird. Ungeklärt ist bisher der Umfang der Nachsorge.

Auffällig in sämtlichen Studien ist eine hohe Korrelation des invertierten Papillloms mit dem Auftreten eines Rezidivs bzw. eines Urothelkarzinoms. Unklar bleiben jedoch die Merkmale für ebendiese Unterscheidung. Anhand neuerer Studien und mit Hilfe histopathologischer Untersuchungsmethoden wurde eine Reihe von immunhistochemischen Markern ausgewählt, anhand derer die Eigenschaften des invertierten Papilloms identifiziert werden sollen. (vgl. Tabelle 13 im Anhang)

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, mittels der Immunhistochemie und des resezierten Papilloms für den Patienten das mögliche Entartungsrisiko frühzeitig zu erkennen und eine entsprechende Therapie und Nachsorge einzuleiten. Im Folgenden werden einige dieser Arbeiten kurz aufgeführt.

Sung et al. beschrieben in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2006 eine Gruppe von 75 Patienten mit einem invertierten Papillom des Urogenitaltrakts. Das mediane Alter betrug 60 Jahre, das mediane Follow-up 68 Monate. Die Lokalisation des invertierten Papilloms wurde mit 67 Fällen in der Harnblase angegeben, vier Mal in der prostatischen Harnröhre und vier Mal im Ureter. Es wurde von einem Rezidiv eines vesikalen invertierten Papilloms berichtet [Sung et al. 2006].

Die Autoren halten das invertierte Papillom in Anbetracht der geringen Rezidivrate und der sehr guten Prognose für eine benigne urotheliale Neoplasie, die nicht mit dem Urothelkarzinom assoziiert ist. Empfohlen wurde die transurethrale Resektion der Harnblase. Eine regelmäßige Nachsorge entsprechend den Leitlinien für das Urothelkarzinom sei nicht nötig [Sung et al. 2006]. Zu ähnlichem Ergebnis kamen Ho et al., die bei 52 Patienten mit einem medianen Alter von 58,9 Jahren und einem durchschnittlichen Follow-up von 62 Monaten lediglich den Ausschluss eines Urothelkarzinoms forderten. Für histologisch nachgewiesene und solitäre invertierte Papillome der Harnblase ohne assoziiertes Urothelkarzinom sei eine urethrozystoskopische Nachsorge nicht notwendig [Ho et al. 2006].

Witjes et al. beschrieben 1997 in ihrer Arbeit eine Gruppe von 51 Patienten mit der Diagnose des invertierten Papilloms. Nachdem 14 Patienten aufgrund einer falschen Diagnose ausgeschlossen werden mussten, verblieben 37 Patienten in der Studie. Beschrieben wurde das Auftreten eines Rezidivs nach 49 Monaten. Schließlich wurde eine Relation zwischen dem invertierten Papillom und dem Urothelkarzinom aufgewiesen, das invertierte Papillom wurdr dennoch nicht als Risikofaktor für das Entstehen eines Urothelkarzinoms genannt. Eine zweifelhafte histologische Diagnose vorausgesetzt, scheint die frequente und jahrelange Nachsorge nicht sinnvoll [Witjes et al. 1997].

Anders verhalten sich die Empfehlungen bei nachfolgend genannten Arbeiten. 2005 berichteten Cheng et al. von 20 Patienten mit einem medianen Alter von 60,8 Jahren und medianem zystoskopischen Follow-up von 30 Monaten. Rezidive wurden nicht beschrieben. Es wurde vom Auftreten eines Urothelkarzinoms bei einem Patienten nach 44 und 76 Monaten berichtet. In Anbetracht der nicht selten auftretenden Rezidive und der Gefahr eines im Verlauf entstehenden Urothelkarzinoms wurde die Nachsorge mit einem flexiblen Zystoskop empfohlen [Cheng et al. 2005].

Auch Asano et al. sprachen sich für eine regelmäßige Nachsorge über wenigstens zwei Jahre aus. In der Arbeit von 2003 mit 48 Patienten, einem medianen Alter von 56 Jahren und einem synchronen Vorliegen eines Urothelkarzinoms in fünf Fällen wurde ein medianes Follow-up von über acht Monaten beschrieben. Vermutet wurde das Vorkommen von zwei unterschiedlichen Typen des invertierten Pa-

pilloms, wovon einer benigne erscheint und der andere mit malignem Entartungspotential. Da die verschiedenen Typen nicht unterschieden werden konnten, wurde ein Follow-up über mindestens zwei Jahre für alle invertierten Papillome angestrebt [Asano et al. 2003].

1.4 Fragestellungen

Das invertierte Papillom der Harnblase ist eine seltene Diagnose im Spektrum der urologischen Erkrankungen. In der Literatur wird das invertierte Papillom als benigne Entität beschrieben mit niedrigem malignen Potential. Dennoch gibt es Patienten, bei denen es zur malignen Entartung eines ursprünglich benignen Tumors kommt.

Zur Differenzierung dieser Patienten untersuchten wir klinische Aspekte des invertierten Papilloms sowie die mögliche Korrelation mit der Entstehung eines Urothelkarzinoms. Für die Diagnosestellung eines Urothelkarzinoms kann u.a. eine Urinzytologie mit entsprechenden Markersystemen herangezogen werden oder auch molekulargenetische Verfahren. Die Diagnose eines invertierten Papilloms jedoch erfolgt meist zufällig, da die Erkrankung einerseits äußerst selten ist und andererseits kaum diagnostische Verfahren bekannt sind. Darüber hinaus sind die Notwendigkeit sowie das Ausmaß der Nachsorge bisher ungeklärt.
Die Fragen, die sich uns also stellen, betreffen vorrangig die Planung einer adäquaten Nachsorge und in Folge dessen die Differenzierung derer Patienten, welche ein Rezidiv eines invertierten Papilloms erleiden bzw. syn- oder metachron ein Urothelkarzinom entwickeln. Daraus ergibt sich die weitere Fragestellung, ob sich die Neigung zur Entwicklung eines Malignoms bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des invertierten Papilloms herauskristallisiert. Von weiterem Interesse war die Suche nach Untersuchungsmethoden, die für den Patienten keine zusätzliche Belastung bedeutet, jedoch die Ausweitung der Diagnostik auf bereits vorhandenes Material (Paraffinblöcke) erlaubt.
Aufgrund der kleinen Fallzahlen dieses Krankheitsbildes und des daraus resultierenden spärlichen Literaturangebots erscheint uns die Erarbeitung dieser Fragen von besonderer Bedeutung, speziell im Sinne einer präventiven Medizin.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchs- und Erhebensplanung

Die Korrelation zwischen einem invertierten Papillom und einem Urothelkarziom wird bereits seit längerer Zeit diskutiert. Auch in dem vorliegenden Patientenkollektiv sind überdurchschnittlich viele Patienten an einem Harnblasenkarzinom erkrankt. Da sämtliche Patienten synchron oder metachron ein invertiertes Papillom der Harnblase aufweisen, stellt sich die Frage, ob hier von einem Zusammenhang der beiden Erkrankungen ausgegangen werden kann.

Nach Durchsicht der Patientenakten wurde eine Liste aller 52 Patienten mit Namen, Geburtsdatum, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Vorhandensein eines Urothelkarzinoms in der Anamnese sowie der Name des behandelnden Urologen erstellt. Es folgte der Entwurf eines Anschreibens mit Erläuterungen zu der geplanten Studie sowie einer Einverständniserklärung mit der Bitte um Rücksendung. Weiterhin wurde ein Fragebogen erstellt, auf dem die betroffenen Patienten um Angabe bzgl. ihrer Symptomatik gebeten wurden. Der Bogen beinhaltet neben den freien Flächen für Name, Vorname und Geburtsdatum auch Fragen nach „Blut im Urin", „andere Probleme beim Wasserlassen", erneute Diagnose eines invertierten Papilloms, Diagnose eines Blasentumors, Betreuung durch einen Urologen, erneute Durchführung einer Blasenspiegelung und Nikotinkonsum. Teilweise gibt es Felder zum Ankreuzen für „ja" bzw. „nein" sowie freien Platz für die schriftliche Angabe weiterer Information, teilweise nur freie Flächen bei offenen Fragen. (vgl. Fragebogen im Anhang) Nach Erhalt der ersten Antworten wurden die restlichen Patienten zusätzlich telefonisch kontaktiert.

Von besonderer Bedeutung in dieser Untersuchung ist die Frage, ob bereits beim Auftreten des invertierten Papilloms als gutartiger Veränderung mit dem Auftreten eines Karzinoms zu rechnen ist. Um diese Annahme zu objektivieren, kommen acht verschiedene immunhistochemische Marker in Betracht, die bereits in anderen Fachbereichen der Medizin in der Verlaufskontrolle maligner Erkrankungen und präventiver Maßnahmen Anwendung finden. Diese sind p16, p53, MIB, CD24, HER-2, Clusterin, Survivin und E-Cadherin.

Zunächst wurden aus den vorliegenden Paraffinblöcken jeweils neun Schnitte angefertigt. Im Anschluss wurde jeweils ein Exemplar in HE-Technik gefärbt, um die Diagnose „invertiertes Papillom" erneut histopathologisch zu verifizieren. Die übrigen Schnitte wurden in spezifischer Technik mit den acht o. g. Markern vorbereitet. Anschließend wurden die Objektträger nach standardisierter Methode von zwei Pathologen beurteilt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden dann statistisch ausgewertet und für die hier gegebene Fragestellung weiterverarbeitet.

2.2 Patienten

Die Klinik für Urologie des UKSH hat in der Zeitspanne von 1993 bis 2007 bei 52 Patienten die Diagnose eines invertierten Papilloms gestellt und diese entsprechend therapiert. Aufgrund dieser im Vergleich zur vorliegenden Literatur relevanten Fallzahl wurde eine retrospektive Analyse dieser Patienten geplant.

Die ursprüngliche Patientenliste konnte nach Erhalt möglichst vieler Rückantworten um die Symptome, Datum der Therapie sowie Vorliegen eines zusätzlichen Urothelkarzinoms ergänzt werden.

Elf Patienten waren bereits verstorben, weitere 25/51 Patienten beantworteten den Fragebogen sachgerecht und gaben ihr Einverständnis. Vier Patienten lehnten die Teilnahme an der Studie ausdrücklich ab. Bei sechs Patienten gelang der Kontakt via Anschreiben und auch im weiteren Verlauf telefonisch nicht, sodass bei fehlendem Einverständnis auf die Nutzung der Daten verzichtet werden musste. Da die Patienten entweder bereits verstorben waren oder ihr ausdrückliches Einverständnis gaben, war ein Ethik-Votum nicht notwendig. Anschließend wurde ein erstes Patientenkollektiv erstellt.

Hieraus mussten zwei Patienten ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Paraffinblöcke nicht verwertbar waren. In einem Fall handelte es sich bei dem Präparat nicht um ein invertiertes Papillom, wie bei der ursprünglichen histopathologischen Befundung angenommen. Im zweiten Fall befand sich der Paraffinblock nicht im Archiv des Instituts für Pathologie. Schließlich ergab sich ein Kollektiv von insgesamt 33 Patienten (von ursprünglich 52, entspricht 63,5%), welches weiter untersucht werden konnte. Darunter befinden sich 25 Männer und acht Frauen mit der Diagnose eines invertierten Papilloms im Harntrakt. Aus den

Akten der Patienten geht hervor, dass alle Fälle am UKSH, Campus Lübeck, diagnostiziert und therapiert worden sind. Die Tumore wurden nach der Resektion im Archiv der Pathologie der UKSH in Paraffin gebettet und aufbewahrt.

Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe des Mikrotoms jeweils neun Schnitte mit einer Schichtdicke von zwei bis drei Mikrometer angefertigt und auf Objektträger der Firma Dako gezogen. Der erste Schnitt wurde HE-gefärbt, um die Diagnose „invertiertes Papillom" zu verifizieren. Anschließend wurden acht weitere Objektträger mit verschiedenen immunhistochemischen Markern (p16, p53, MIB, HER-2, CD24, Clusterin, Survivin und E-Cadherin) gefärbt und nach festgelegten, unten genannten Standards ausgewertet.

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

In der Immunhistochemie werden Proteine mit Hilfe von speziellen Antikörpern gefärbt. Dabei wird fixiertes Gewebe beispielsweise aus ganzen Tieren, aus Körperflüssigkeiten oder aus Gewebeschnitten, wie in diesem Fall die invertierten Papillome aus dem Urogenitaltrakt, verwendet. In der Medizin dient diese Methode weitgehend der Identifikation von Tumorgewebe und seiner Klassifizierung. Dabei wird die unterschiedliche Expression verschiedener Antigene auf einer Tumorzelle genutzt. So können auch Metastasen ihrem Primärtumor zugeordnet werden [Herbst und Hübner 2003].

Antikörper sind Immunglobuline, die zur Gruppe der Proteine gehören. Unter den Immunglobulinen (Ig) unterscheidet man fünf Hauptklassen: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Alle Immunglobuline haben einen charakteristischen Aufbau- jeweils zwei identische schwere Ketten (heavy chains), welche die Klasse und Subklasse des Moleküls bestimmen, und zwei identische leichte Ketten (light chains), welche entweder vom Typ kappa (κ) oder lambda (λ) sind. Verbunden werden sowohl die leichten mit den schweren Ketten, als auch die schweren Ketten untereinander durch kovalente Disulfidbrücken. In der Immunhistochemie werden vorwiegend die Antikörper der IgG- und IgM-Klasse verwendet [Boenisch 2003].

Das Prinzip dieser Färbemethode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der eingesetzte Antikörper eine gewisse Affinität gegenüber einer bestimmten Gewebeeigenschaft des zu untersuchenden Materials aufweisen muss. Ideal-

erweise ist die Bindung des Antikörpers durch hohe Spezifität und Affinität ausgezeichnet, um Kreuzreaktionen und damit falsche Ergebnisse zu vermeiden. An den Antikörper sind Moleküle gebunden, welche ihn im Präparat sichtbar machen. Mit Hilfe von verschiedenen Methoden ist es möglich, schon sehr kleine Mengen an bestimmten Gewebemerkmalen verstärkt darzustellen. Die gesuchte Gewebeeigenschaft wird auch als Epitop bezeichnet, der dagegen gerichtete Antikörper auch als Primärantikörper.

Aufgrund der vielen Schritte, die in der Immunhistochemie letztlich zum Ergebnis führen, ist dieses Verfahren relativ langwierig und fehleranfällig. Bei der Qualität des Endproduktes spielen neben Art und Dauer der Fixierung auch die Vorbehandlung und die Form der Einbettung eine wichtige Rolle. Die Antigen-Antikörper-Reaktion kann durch die Temperatur, Konzentration, Inkubationszeit und durch das Reaktionsmilieu entscheidend beeinflusst werden.

Damit von einem möglichst einheitlichen und verlässlichen Ergebnis ausgegangen werden kann, werden heutzutage im Labor große Zahlen an Proben von immunhistochemischen Automaten angefertigt [Böcker et al. 2004]. Im Folgenden werden die Handhabung und Eigenschaften spezieller Antikörper erläutert, welche im vorliegenden Fall zum Einsatz kamen.

2.4 Beschreibung der immunhistochemischen Marker

2.4.1 Herstellen der Paraffinschnitte

Die hier untersuchten Präparate waren allesamt im Archiv des Instituts für Pathologie vorhanden und bereits in Paraffin gebettet. Das häufigste Fixativ für Paraffinschnitte ist Formaldehyd und wurde auch hier verwendet. Das Färbeergebnis wird durch Konzentration, Pufferung und pH-Wert sowie durch die Einwirkzeit des Fixativs maßgeblich mitbestimmt. Somit können die Fixative von Labor zu Labor- je nach technischen Gegebenheiten- stark variieren. Um die Varianz möglichst gering zu halten, wird allgemein eine neutral gepufferte Formalinlösung verwendet. Nachdem die Gewebe zugeschnitten sind, werden sie in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Anschließend werden die Zuschnitte infiltriert und in flüssigem Paraffin gebettet. Dabei ist eine Erhitzung bis zum Schmelzpunkt des verwendeten Paraffins erforderlich, in der Regel 55-58°C. Im Archiv des UKSH werden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert.

Zur weiteren Untersuchung wurden aus den gelagerten Paraffinblöcken Schnitte mit einer Dicke von 4-6 µm angefertigt und diese auf entsprechende Objektträger aufgezogen. Im vorliegenden Fall handelte es sich dabei um Objektträger der Firma DAKO. Die Trocknung erfolgte über zwölf bis 24 Stunden bei Raumtemperatur, anschließend die Trocknung über Nacht bei 37°C. Vor der eigentlichen Immunfärbung war eine Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte notwendig. Hierzu wurden Inkubationen in Xylol, 95%-igem und 70%-igem Ethanol sowie destilliertem Wasser benötigt.

Schließlich konnten die Schnitte mit den immunhistochemischen Markern behandelt werden. Die Isotonie der Präparate wurde mit neutralen Salzen und Puffersystemen erreicht. Je nach verwendetem Marker kamen außerdem Hitzevorbehandlungen (auch Dampfhitze) und Proteolyse zum Einsatz. Dabei musste gewährleistet sein, dass morphologische Eigenschaften des Präparates bestehen bleiben. Das beinhaltete auch die unveränderte Immunlokalisation des gesuchten Antigens. [Boenisch 2003]

Die immunhistochemischen Marker werden im Folgenden weiter beschrieben.

2.4.2 HER-2

Das HER-2-Protoonkogen (Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2) aus der Gruppe der ErbB-Familie („Epidermal-Growth-Factor-Receptor"-Tyrosinkinase-Familie) hat große Bedeutung in der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Die Heterodimere mit HER-2 sind sehr stabil, was sich in der langsamen Lösung der Liganden von seinem Komplex- im Gegensatz zu EGF-Rezeptor-Homodimeren- und seinem stärkeren und langanhaltenden Signal zeigt. Diese Eigenschaft wird Verstärkerfunktion des HER-2 genannt.

In 20-30% der Mamma- und Ovarialkarzinome kommt es per Genamplifikation zur Überexpression des Rezeptors, wobei HER-2 häufig in Dimere rekrutiert wird. Oft bilden sich HER-2/HER-3-Heterodimere, die im entsprechenden Organ ein starkes Wachstumssignal auslösen. Bei Tumoren mit HER-2-Überexpression nutzt man diese Eigenschaft und therapiert mit humanisierten klonalen Antikörpern gegen das HER-2-Molekül. Durch Bindung an die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors wird seine Tyrosinkinase inaktiviert [Siegenthaler et al. 2006].

HER-2 ist ein Antikörper der Firma DAKO und liegt als Zellüberstand in flüssiger Form vor. Es wurde gegen 0,05mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2, dialysiert und enthält 15mmol/L NaN3. Im Labor des Pathologischen Instituts des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte im Dampfgarer bei einem pH-Wert von 6,1 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 weiterbehandelt. Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals bestimmt. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran von Bedeutung. Es wurde in vier Stufen von „0" bis „+3" bewertet, wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutete ein negatives Ergebnis, also „0"). Außerdem wurde unterschieden, ob die Zellmembran in vollem Umfang oder nur teilweise angefärbt war. Die Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Pathologen am Lichtmikroskop, die Ergebnisse wurden jeweils gemittelt. Kriterien waren neben standardisierten Verfahren einer quantitativen Auswertung pathologischer Präparate auch die klinische Erfahrung der begutachtenden Pathologen. Es liegt eine objektive, quantitative Beurteilung zugrunde.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.3 p53

Das Gen für das Tumorsuppressorgen p53 ist auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisiert. Entdeckt wurde es 1979 von David Lane und Arnold Levine und nach seinem Molekulargewicht von 53 kDa benannt. Das durch P53 kodierte Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen zur Kontrolle des Zellzyklus, zur Induktion der Apoptose und zur DNA-Reparatur infolge einer DNA-Schädigung reguliert [Lane und Crawford 1979].

Das Protein ist grundsätzlich instabil und unterliegt einer ständigen Umwandlung. Sobald es in der DNA zu einem Schaden kommt, wird das durch p53 kodierte Protein innerhalb von 30 Minuten posttranslational stabilisiert und akkumuliert in der Zelle. Anschließend werden sowohl DNA-Reparatur-Mechanismen gestartet als auch der Zellzyklus gestoppt. Eine Mutation in dem für p53 kodierenden Gen TP53 führt zur Produktion eines fehlerhaften und inaktiven p53, dies sind im Allgemeinen Punktmutationen. Infolgedessen kann weder die DNA repariert werden, noch besteht die Möglichkeit eines programmierten Zelltodes. So kann es aufgrund unkontrollierter Zellteilung bei fehlerhafter DNA zur Tumorbildung kommen. Ebenso können chemische Stoffe wie Benzopyren aus Tabakrauch oder Aflatoxin p53 verändern und so seinen Funktionsverlust hervorrufen [Linzer und Levine 1979], [Lane 1992].

Das durch p53 kodierte Protein kann durch einen Antikörper der Firma DAKO dargestellt werden. Im Labor des Instituts für Pathologie des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte in der Mikrowelle bei einem pH-Wert von 6,0 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 weiterbehandelt. Die gefärbten Präparate wurden von zwei klinisch erfahrenen Pathologen bewertet, die eine quantitative Bestimmung am Lichtmikroskop durchführten. Beide Ergebnisse wurden gemittelt und unterlagen herkömmlichen Bestimmungen in der Pathologie. Grundlage sind nationale und internationale Empfehlungen sowie entsprechende Leitlinien zur ärztlichen Auswertung histopathologischer Präparate.

Die Auswertung oblag der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals. Beurteilt wurde in Schritten von jeweils zehn Prozent. Präparate mit einer Markierung von zehn Prozent oder weniger wurden einer weiteren Unterteilung unterzogen (jeweils zu einem oder fünf Prozent). Eine schwächere Anfärbung als ein Prozent bedeutete ein negatives Ergebnis („0").

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.4 Cadherin

Cadherine sind kalziumionenabhängige transmembrane Glykoproteine, die zur Gruppe der Adhäsionsproteine gehören. Cadherine bilden als Desmosomen und Adhering junctions Zellkontakte. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten, in der embryonalen Morphogenese, der Erhaltung der Zellpolarität und der Signaltransduktion. Je nach Größe des Cadherins, nach Anzahl der Ectodomänen und nach seiner cytoplasmatischen Domäne werden Cadherine in sechs Untergruppen unterteilt (klassische, desmosomale, Proto-, Proteinkinase-, FAT-ähnliche und 7-Transmembran-Cadherine). Alle bilden in den Zellen parallele cis-Dimere, mit einer gegenüberliegenden Zelle eine trans-Dimerisierung und überbrücken so den extrazellulären Raum. Mit verschiedenen Interaktionspartnern kommunizieren die Cadherine über ihre intrazelluläre Domäne und bilden so im Verband mit anderen Adhäsionskomplexen adherence junctions [Angst et al. 2001].

Bei verminderter Expression oder Funktion von E-Cadherin ist die Adhäsion zwischen zwei Zellen nicht mehr gegeben, erhöht also ihre Mobilität, und erleichtert einer Tumorzelle das Eindringen in gesundes Gewebe [Nollet et al. 2000].

E-Cadherin ist ein Antikörper der Firma Lab Vision. Im Labor des Pathologischen Instituts des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte mit EDTA bei einem pH-Wert von 8,0 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 weiterbehandelt. Die Auswertung erfolgte in vier Stufen von „0" bis „+3", wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutete ein negatives Ergebnis, also „0"). Die Stärke der Färbung, die Anzahl der positiven Zellen sowie die Qualität bzw. Lokalisation des Signals be-

stimmten maßgeblich das Ergebnis. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran von Bedeutung. Des Weiteren stellten die Färbeintensität sowie das Ausmaß der gefärbten Zellmembran wichtige Kriterien in der Begutachtung dar. Die Auswertung wurde von zwei Pathologen am Lichtmikroskop vorgenommen. Sie richteten sich nach standardisierten Methoden der histopathologischen Bewertung und verfügen über reichliche Erfahrung in diesem Fachbereich. Die Ergebnisse beider Untersucher wurden gemittelt.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.5 Survivin

1997 entdeckten G. Ambrosini, C. Adida und D.C. Altieri erstmals das Apoptose-hemmende Protein Survivin in verschiedenen malignen Zelllinien und fetalen Geweben. Survivin wird auch als BIRC5 oder API4 bezeichnet. Die eigentliche Funktion von Survivin besteht in der Embryonalphase darin, für eine fehlerfreie Weitergabe der Chromosomen während der Zellteilung zu sorgen. Nach der Embryonalphase ist es in ruhenden, gesunden Zellen kaum noch nachzuweisen. In entarteten Zellen hingegen ist nahezu immer Survivin zu finden, was auf das schnelle Wachstum der Tumorzellen zurückzuführen ist. [Ambrosini et al. 1997].

Die genaue Funktion von Survivin ist noch nicht vollständig geklärt, die Apoptose-hemmende Wirkung ist wahrscheinlich mit der mitochondrienabhängigen Antagonisierung der Apoptose zu erklären (intrinsischer Apoptoseweg). Die Inaktivierung der Zelltodprotease Caspase-9 scheint dabei auch eine wichtige Rolle zu spielen. Bei Urothelkarzinomen lässt sich Survivin im Urin der Patienten nachweisen. Derzeit sind klinische Studien zur weiteren Verwendung von Survivin aktiv [Altieri 2003].

Im Labor des Instituts für Pathologie des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte im Dampfgarer bei einem pH-Wert von 9,6 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 weiterbehandelt. Nach dem Abschluss der Färbung wurde die Auswertung von zwei erfahrenen Pathologen am Lichtmikroskop vorgenommen. Grundlage boten nationale und internationale Empfehlungen sowie Leitlinien zur histopathologischen Bewertung immunhistochemischer Verfahren. Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Fär-

bung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals bestimmt. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran von Bedeutung. Es wurde in vier Stufen von „0" bis „+3" bewertet, wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutete ein negatives Ergebnis, also „0"). Außerdem wurde unterschieden, ob die Zellmembran in vollem Umfang oder nur teilweise angefärbt ist. Die Ergebnisse der beiden Pathologen wurden schließlich gemittelt.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.6 MIB

Das Prinzip dieser immunhistochemischen Färbung ist die Reaktion des monoklonalen MIB-1-Antikörpers mit dem nukleären Ki-67-Antigen. Neben Ki-67 gibt es eine Reihe anderer Antikörperklone, „Ki" bezieht sich auf die Herkunft des Antigens, dem Institut für Pathologie in Kiel. „MIB" steht für „Made in Borstel", dem Ort der Entdeckung in Borstel, Schleswig-Holstein.

Der Antikörper ist für In-vitro-Untersuchungen bestimmt und lässt mittels Immunhistochemie und Lichtmikroskopie Aussagen über die qualitative Identifizierung gesunder wie auch neoplastischer Zellen zu. Das Ki-67-Antigen wird vorwiegend während der aktiven Phasen (G_1, S, G_2 und M-Phase) des Zellzyklus exprimiert und fehlt in ruhenden Zellen (G0-Phase) [Scholzen et al. 2000].

Derzeit sind zwei Isoformen des nukleären Proteins mit je 345 und 395 kDa bekannt. Mit dem Antikörper markierte Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster. Während der Mitose wird ein Großteil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen verlagert, hier werden nur Chromosomen und Zytoplasma markiert. Befindet sich eine Zelle nicht in der Proliferation, wird das Antigen rasch abgebaut, während der DNA-Reparatur scheint Ki-67 nicht vorzuliegen. [Rahmanzadeh et al. 2007].

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete MIB-Antikörper ist ein Produkt der Firma DAKO. Er wird geliefert als Zellkulturüberstand in flüssiger Form und ist gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2, dialysiert und enthält 15mmol/L NaN3. Im Labor des Pathologischen Instituts, UKSH, wurde der in Paraffin gebettete Gewebeschnitt im Dampfgarer bei einem pH-Wert von 6,0 vorbehandelt, der MIB-

Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:100 verarbeitet. Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals bestimmt. Es wurde in Schritten von jeweils zehn Prozent eingeteilt, wobei bei denjenigen Präparaten, welche schwächer als zu zehn Prozent markiert wurden, eine weitere Unterteilung zu einem oder fünf Prozent erfolgte. Eine schwächere Anfärbung als ein Prozent bedeutete ein negatives Ergebnis („0"). Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Pathologen durchgeführt. Hierzu wurden die am Lichtmikroskop erhobenen Ergebnisse beider Pathologen gemittelt. Maßgeblich für die Auswertung sind entsprechende Leitlinien und nationale sowie internationale Empfehlungen.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.7 Clusterin

Clusterin ist ein monoklonaler Antikörper mit Disulfiden und einer Größe von 75-80 kDa. Entdeckt wurde das Protein zuerst in Rete testis bei Ratten, wo sich ein Clustering von Sertoli-Zellen mit Erythrozyten zeigte, daher die Namensgebung. Auch bekannt als Apolipoprotein J ist er Teil zahlreicher Prozesse, u.a. des aktiven Zelltodes [Jones et al. 2002]. Clusterin kommt in den meisten Geweben bei Säugetieren vor, u.a. im Blutplasma, Milch, Urin, Liquor und Samenflüssigkeit. Eine Bindung und Komplexbildung ist u.a. möglich mit Immunglobulinen, Lipiden, Heparin, Bakterien und Komplement-Faktoren. Eine Überexpression wurde beschrieben für koronare Herzerkrankung sowie für großzellige anaplastische Lymphome, Pankreas-, Mamma- und Prostata-Karzinome. Neuere Studien beschreiben einen Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit, es wird sogar vermutet, dass mit höheren Clusterin-Blutspiegeln ein rascherer zerebraler Abbau stattfindet [Schrijvers et al. 2011].

Clusterin ist ein Antikörper der Firma Biocarta. Im Labor des Pathologischen Instituts des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte mit EDTA bei einem pH-Wert von 8,0 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 weiterbehandelt. Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals bestimmt. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran

von Bedeutung. Es wurde in vier Stufen von „0" bis „+3" bewertet, wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutete ein negatives Ergebnis, also „0"). Außerdem wurde unterschieden, ob die Zellmembran in vollem Umfang oder nur teilweise angefärbt war. Ein weiteres Kriterium stellte die Färbeintensität dar. Die Auswertung wurde von zwei Pathologen am Lichtmikroskop durchgeführt. Zugrunde lagen die entsprechenden Empfehlungen und Leitlinien bzgl. der histopathologischen Bewertung immunhistochemischer Färbungen. Die so ermittelten Ergebnisse wurden letztlich gemittelt, um objektive Daten zu erhalten.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.8 p16

p16 ist ein Tumorsuppressorgen und spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus sowie bei Zellmutationen. Synonyme sind CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) und MTS-1 (multiple tumor suppressor 1). Es sind mindestens drei Varianten dieses Proteins bekannt, von denen zwei Isoformen als CDK4-Kinase-Inhibitor fungieren [Nobori et al. 1994]. Des Weiteren spielt p16 eine Rolle in der Stabilisierung und dem Abbau des Tumorsuppressorgens p53. Eine vermehrte p16-Expression in alternden Organsimen reduziert die Stammzell-Proliferation und erhöht das Risiko für Karzinomentstehung, v.a. für Melanome. Häufig assoziiert mit Mutationen des CDKN2A-Gens sind Pankreas-Adenokarzinome, eine Deletion von p16 findet sich bei Ösophagus- und Magen-Karzinomen [Liggett et al. 1998]. Theoretisch spiegelt der Blut-CDKN2A-Spiegel das Alter des Gewebes auf Molekularebene wider [Liu et al. 2009].

Das Protein, welches durch p16 kodiert wird, ist durch einen Antikörper der Firma Santa Cruz immunhistochemisch nachweisbar. Im Labor des Instituts für Pathologie des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte in der Mikrowelle bei einem pH-Wert von 6,0 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 weiterbehandelt. Nach Abschluss des Färbeprozesses wurden die Präparate von zwei Pathologen am Lichtmikroskop beurteilt. Hierzu waren eine ausreichende histopathologische Erfahrung sowie gängige Beurteilungskriteri-

en, wie im Folgenden beschrieben, notwendig. Die histopathologische Bewertung richtet sich nach nationalen und internationalen Empfehlungen und Leitlinien.

Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals bestimmt. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran von Bedeutung. Es wurde in vier Stufen von „0" bis „+3" bewertet, wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutete ein negatives Ergebnis, also „0"). Außerdem wurde unterschieden, ob die Zellmembran in vollem Umfang oder nur teilweise angefärbt war. Ein weiteres Kriterium stellte die Färbeintensität dar.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.4.9 CD24

CD24 steht für „Cluster of differentiation" und ist ein Adhäsionsmolekül. Es verschlüsselt ein Sialoglykoprotein und ist auf der Oberfläche reifer Granulozyten sowie der meisten B-Lymphozyten lokalisiert. Des Weiteren findet man es auf unreifen Zellen fast der gesamten hämatopoetischen Zelllinie, in wachsenden Neuronen, embryonalen intestinalen, nasalen und Speicheldrüsenzellen [Hough et al. 1994], [Jackson et al. 1992]. In vollständig differenzierten Zellen ist CD24 kaum mehr nachzuweisen. Die CD24-Expression wird während der B- und T-Zellreifung ständig induziert und gehemmt [Allman et al. 1992]. Erythrozyten stellen insofern eine Ausnahme dar, als dass CD24 hier lange vorzufinden ist. Bei vielen Malignomen, u.a. dem kleinzelligen Bronchial-Karzinom, ist das Protein eines der häufigsten Oberflächen-Antigene [Nedelec et al. 1992].

CD24 ist ein Antikörper der Firma Biocarta. Im Labor des Pathologischen Instituts des UKSH wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeschnitte mit EDTA bei einem pH-Wert von 7,4 vorbehandelt und dann mit dem Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 weiterbehandelt. Nachdem die Färbung der Präparate abgeschlossen war, gingen sie zur Beurteilung zwei unabhängigen Pathologen zu mit Erfahrung in der histopathologischen Auswertung immunhistochemischer Färbetechniken. Zugrunde lagen hierfür entsprechende Leitlinien sowie nationale und internationale Empfehlungen. Das Färbeergebnis wurde anhand der Stärke der Färbung, der Anzahl der positiven Zellen und anhand der Qualität bzw. Lokalisation des Signals

bestimmt. Hierbei war lediglich das Ergebnis der Zellmembran von Bedeutung. Es wurde in vier Stufen von „0" bis „+3" bewertet, wobei mindestens 10% der Tumorzellen angefärbt sein mussten (<10% bedeutet ein negatives Ergebnis, also „0"). Außerdem wurde unterschieden, ob die Zellmembran in vollem Umfang oder nur teilweise angefärbt war. Ein weiteres Kriterium stellte die Färbeintensität dar.

Die von beiden Pathologen am Lichtmikroskop ermittelten Ergebnisse wurden schließlich gemittelt.

(vgl. hierzu die histologischen Bilder im Anhang)

2.5 Statistik

Die vorliegenden Daten wurden mithilfe der Software SPSS Statistics 19 ausgewertet. Ziel der statistischen Analyse war einerseits, Zusammenhänge zwischen den einzelnen erhobenen Daten aufzudecken und andererseits, mögliche Unterschiede der beiden Gruppen I (nur invertiertes Papillom) und II (invertiertes Papillom und meta- /synchrones Karzinom) darzustellen. Um die signifikanten Unterschiede festzustellen, wurden Kreuztabellen und t-Tests durchgeführt. Alle Berechnungen basieren auf einem Signifikanzniveau von 5%. Dabei stellt „✗" jeweils ein negatives und „✓" ein positives Ergebnis dar.

Zunächst wurden die Begleitfaktoren (Makrohämaturie, Zystitis, Dysurie, Nikotinkonsum) beschrieben. In folgender Tabelle werden die Ergebnisse des t-Tests dargestellt, welcher die Mittelwerte der Gruppen I und II vergleicht. Hierbei wurde geprüft, ob auch von einem Unterschied der Mittelwerte in der Grundgesamtheit ausgegangen werden kann.

Variable	Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz t-Test	Ergebnis
Makrohämaturie	I	-55,86	53,810	0,497	✗
	II	-40,81	50,820		
Zystitis	I	-27,57	48,795	0,762	✗
	II	-21,81	43,119		
Dysurie	I	-55,86	53,810	0,499	✗
	II	-40,88	50,754		
Nikotinkonsum	I	-41,57	53,721	0,691	✗
	II	-33,04	48,945		

Tabelle 1: T-Test der Begleitfaktoren

Keiner der vorliegenden Werte liegt unter dem vorgegebenen Niveau von 0,05. Somit konnten mithilfe des t-Tests keine signifikanten Unterschiede der vier aufgeführten Variablen festgestellt werden.

Aufgrund der durchweg negativen Ergebnisse wurde auf die Durchführung eines Chi-Quadrat-Tests bzw. einer Kreuztabelle verzichtet.

Des Weiteren wurden die Korrelationen der einzelnen Variablen untersucht. Diese werden im Folgenden lediglich beschrieben, wenn ein aussagekräftiges Ergebnis vorlag. Eine perfekte Korrelation nach Pearson liegt vor bei einem Wert von 1,0.

Eine sehr starke Korrelation liegt bei einem Wert von 0,8 bis < 1,0, eine starke von 0,6 bis < 0,8 und eine mittlere Korrelation liegt vor bei Werten zwischen 0,4 bis < 0,6. Bei Werten darunter besteht höchstens eine schwache Korrelation.

Eine perfekte Korrelation zeigten lediglich das gleichzeitige Vorliegen von Makrohämaturie und Dysurie (Korrelation nach Pearson 1,0; p=0,000). Ebenfalls sehr starke Korrelationen wiesen Makrohämaturie mit Nikotinkonsum (Korrelation nach Pearson 0,827; p=0,000) bzw. Dysurie mit Nikotinkonsum auf (Korrelation nach Pearson 0,827; p=0,000).

Im folgenden Schritt wurden die acht verwendeten immunhistochemischen Marker betrachtet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des t-Tests, wiederum wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Getestet wurde der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines meta- bzw. synchronen Karzinoms und der Eigenschaft eines immunhistochemischen Markers, das Präparat ausreichend positiv anzufärben.

Variable	Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz t-Test	Ergebnis
p53	I	0,9269	0,874	0,088	✗
	II	0,8571	0,113		
MIB	I	0,0954	0,149	0,565	✗
	II	0,0614	0,069		
HER-2	I	2,69	0,549	0,931	✗
	II	2,71	0,756		
p16	I	1,15	1,084	0,784	✗
	II	1,29	1,254		
Clusterin	I	0,77	0,863	0,814	✗
	II	0,86	0,900		
Survivin	I	3,00	0,000	*	✗
	II	3,00	0,000		
E-Cadherin	I	2,69	0,618	0,509	✗
	II	2,86	0,378		
CD24	I	2,19	0,895	0,596	✗
	II	2,00	0,577		

Tabelle 2: t-Test der immunhistochemischen Marker

Auch bei der Auswertung der immunhistochemischen Marker konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Im Fall

von Survivin kann der t-Wert nicht berechnet werden, da die Standardabweichungen beider Gruppen gleich null sind. Dieses Feld wurde mit „*" gekennzeichnet.

Anschließend wurden die Marker in Subklassen unterteilt, um die Ausprägung eines einzelnen Markers zu verdichten. Dabei wurde Survivin ausgeschlossen, da in diesem speziellen Fall eine konstante Ausprägung der Variablen vorlag und somit kein aussagekräftiges Ergebnis zu erwarten ist. Anhand der Intensität der Anfärbung in der pathologischen Begutachtung wurde innerhalb der Abstufung individuell eine Grenze festgelegt. p53 wurde in die Subklassen ≤0,8 und ≥0,9 aufgeteilt, MIB in Gruppen ≤0,05 und ≥0,1, HER-2 in Klassen von ≤2 und ≥3. p16 wurde in Subklassen von ≤1 und ≥2 geteilt, Clusterin in Gruppen ≤1 und ≥2, E-Cadherin in Klassen ≤2 und ≥3 sowie CD 24 in Subklassen von ≤2 und ≥3. Die so entstandenen Untergruppen wurden jeweils in „0" und „1" umbenannt, um eine binäre Umrechnung zu ermöglichen. Die folgende Tabelle zeigt den t-Test nach Aufteilung der immunhistochemischen Marker in ihre Untergruppen.

Variable	Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Signifikanz t-Test	Ergebnis
p53*	I	0,81	0,402	0,047	✓
	II	0.43	0,535		
MIB*	I	0,38	0,496	0,642	✗
	II	0,29	0,488		
HER-2*	I	0,73	0,452	0,504	✗
	II	0,86	0,378		
p16*	I	0,35	0,485	0,294	✗
	II	0,57	0,535		
Clusterin*	I	0,27	0,452	0,933	✗
	II	0,29	0,488		
E-Cadherin*	I	0,77	0,430	0,627	✗
	II	0,86	0,378		
CD24*	I	0,42	0,504	0,132	✗
	II	0,14	0,378		

Tabelle 3: t-Test der Markergruppen

Bei den getesteten Subklassen der immunhistochemischen Marker zeigte sich im Fall von p53 das einzig signifikante Ergebnis mit p= 0,047.

Der hier durchgeführte t-Test stellt hohe Anforderungen an das zu untersuchende Kollektiv, welche schon aufgrund der kleinen Fallzahlen schwer einzuhalten sind.

Deshalb wurden die Zusammenhänge der Variablen zusätzlich anhand von Kreuztabellen untersucht. Zur Prüfung der Unabhängigkeit der Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson herangezogen.

Variable	Grenze	Untergruppe	Chi-Quadrat-Test nach Pearson	Ergebnis
p53*	≤ 0,8	0	0,046	✓
	≥ 0,9	1		
MIB*	≤ 0,05	0	0,629	✗
	≥ 0,1	1		
HER-2*	≤ 2	0	0,489	✗
	≥ 3	1		
p16*	≤ 1	0	0,279	✗
	≥ 2	1		
Clusterin*	≤ 1	0	0,931	✗
	≥ 2	1		
E-Cadherin*	≤ 2	0	0,614	✗
	≥ 3	1		
CD24*	≤ 2	0	0,171	✗
	≥ 3	1		

Tabelle 4: Chi-Quadrat-Test der Markergruppen

Erwartungsgemäß ist auch hier lediglich beim umkodierten Marker p53 (Markergruppe p53*) ein signifikanter Wert zu beobachten (p= 0,046).

Schließlich wurden noch die Korrelationen der immunhistochemischen Marker mit den übrigen Variablen berechnet. Dabei konnte keine perfekte oder starke Korrelation verzeichnet werden. Lediglich der Marker Clusterin zeigte eine mittlere Korrelation mit dem Geschlecht (Korrelation nach Pearson 0,444; p=0,01), sowie die Subklasse des Markers HER-2 (HER-2*) mit dem Marker E-Cadherin (Korrelation nach Pearson 0,478; p=0,005).

3 Ergebnisse

3.1 Patientengruppe

Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 65,2 Jahre (Spannweite 31-86 Jahre), das mediane Alter der Frauen lag bei 61,4 (Spannweite 31-80 Jahre), das der Männer bei 66,4 Jahren (Spannweite 40-86 Jahre). Eine weibliche sowie drei männliche Teilnehmer konnten als Raucher verzeichnet werden, zwölf Männer und vier Frauen als Nichtraucher. Ohne Angabe verblieben zehn Männer und drei Frauen. Bei jeweils einem Mann und einer Frau wurde ein Rezidiv eines invertierten Papilloms angegeben.

Insgesamt sieben Patienten, darunter sechs männliche und ein weiblicher, erkrankten metachron oder synchron zusätzlich an einem Urothelkarzinom. Zwei Patienten (zwei Männer) gaben ein Urothelkarzinom in der Anamnese an, ein weiterer Mann erhielt die Diagnose eines malignen Blasentumors nach der Diagnose des invertierten Papilloms. Vier Patienten (drei Männer, eine Frau) bestätigten das Vorliegen eines Malignoms, jedoch ohne zeitliche Angabe.

Unter allen Urothelkarzinomen lag drei Mal das Stadium pTaG1 vor, ein Mal pTaG2, ein Mal pT1G2, ein Mal pT1G3 und ein Mal pT2G3. Somit ergibt sich für das Vorliegen beider Diagnosen insgesamt eine Inzidenz von 21,2% in dieser Patientengruppe (24% bei den männlichen, 12,5% bei den weiblichen Patienten).

3.2 Auswertung der Begleitfaktoren

3.2.1 Patienten mit alleinigem invertierten Papillom

Unter allen Patienten litten 26 an einem solitären invertierten Papillom. Die Lokalisation verteilte sich auf das Blasendach (ein Patient), den Blasenboden (vier Patienten), die Hinterwand (drei Patienten), den Blasenauslass (vier Patienten), die linke Seitenwand (vier Patienten), die rechte Seitenwand (zwei Patienten) und das linke Ostium (zwei Patienten). Bei zwei Patienten war das Papillom in der prostatischen Harnröhre lokalisiert, bei einem weiteren an einer nicht genau beschriebenen Stelle in der Harnröhre. Bei drei Patienten war die Lokalisation im Operations-Bericht nicht exakt beschrieben.

Die Größe schwankte zwischen 0,5 cm und 4,0 cm (zwei Mal 0,5 cm, ein Mal 1,0 cm, drei Mal 2,0 cm, ein Mal 2,5 cm, drei Mal 3,0 cm, ein Mal 3,5 cm und zwei Mal

4,0 cm). Bei der anderen Hälfte der Patienten ließ sich keine Tumorgröße eruieren. Insgesamt 19 Patienten erhielten eine transurethrale Resektion der Harnblase, acht Patienten wurden mit 5-Fluorouracil (FU) in unterschiedlicher Dauer behandelt (ein Mal einen Monat, zwei Mal drei Monate, ein Mal sechs Monate und ein Mal 18 Monate lang, drei Mal Therapie unklarer Dauer). Bei sieben weiteren war die Art der Therapie nicht nachzuvollziehen. Ein weiblicher Patient entwickelte 14 Monate und ein weiterer, männlicher, 18 Monate nach der Erstdiagnose des invertierten Papilloms ein Rezidiv, wobei der männliche Patient Atypien in der Histologie aufwies.

Von den insgesamt 26 Patienten mit Auftreten lediglich eines invertierten Papilloms gaben zwei Patienten eine Makrohämaturie an, 15 verneinten diese, neun weitere machten diesbezüglich keine Angabe. Somit wird bei 7,7% eine Makrohämaturie eindeutig bestätigt, bei 57,7% eindeutig verneint (34,6% ohne Angabe). 13 Patienten, also 50%, bestätigten Symptome einer Zystitis, fünf, also 19,2%, verneinten diese, acht weitere, entsprechend 30,8%, machten hierzu keine Angaben. Weitere Symptome einer Dysurie (Nykturie, Pollakisurie, Blasenentleerungsstörung) fanden sich bei vier Patienten (entsprechend 15,4%), 13 (50%) waren beschwerdefrei, neun (34,6%) enthielten sich der Aussage.

Zwei der Patienten gaben sich als Raucher aus (entsprechend 7,7%), darunter jeweils ein Mann und eine Frau. Elf Männer und vier Frauen (entspricht 57,7%) verneinten Nikotinkonsum, sieben Männer und zwei Frauen (34,6%) machten keine Angabe zu dieser Frage.

Makrohämaturie	Ja (männlich)	2x
	Ja (weiblich)	0
	Nein (männlich)	10x
	Nein (weiblich)	5x
	Ohne Angabe (männlich)	7x
	Ohne Angabe (weiblich)	2x
Zystitis	Ja (männlich)	9x
	Ja (weiblich)	4x
	Nein (männlich)	5x
	Nein (weiblich)	0
	Ohne Angabe (männlich)	5x
	Ohne Angabe (weiblich)	3x

Dysurie	Ja (männlich)	3x
	Ja (weiblich)	1x
	Nein (männlich)	9x
	Nein (weiblich)	4x
	Ohne Angabe (männlich)	7x
	Ohne Angabe (weiblich)	2x
Nikotionkonsum	Ja (männlich)	1x
	Ja (weiblich)	1x
	Nein (männlich)	11x
	Nein (weiblich)	4x
	Ohne Angabe (männlich)	7x
	Ohne Angabe (weiblich)	2x

Tabelle 5: Patienten mit invertiertem Papillom: Begleitfaktoren

Lokalisation	Blasenauslass	4x
	Blasenboden	4x
	Blasendach	1x
	Harnröhre	1x
	Hinterwand	3x
	Linkes Ostium	2x
	Linke Seitenwand	4x
	Prostatische Harnröhre	2x
	Rechte Seitenwand	2x
	Unbekannt	3x
Tumorgröße	4,0cm	2x
	3,5cm	1x
	3,0cm	3x
	2,5cm	1x
	2,0cm	3x
	1,0cm	1x
	0,5cm	2x
	Unbekannt	13x
Therapie	Nachbeobachtung (1-18 Monate)	8x
	TUR-B	19x
	Unbekannt	7x
Rezidiv	Nach 14 Monaten (weiblich)	1x
	Nach 18 Monaten (männlich)	1x

Tabelle 6: Patienten mit invertiertem Papillom: Therapie

3.2.2 Patienten mit invertiertem Papillom und Urothelkarzinom

In der Patientengruppe (n=33) entwickelten insgesamt sieben Patienten (ein weiblicher, sechs männliche) ein Urothelkarzinom. Darunter traten die Malignome drei Mal metachron auf und vier Mal zu unbekanntem Zeitpunkt. Aufgrund unvollständiger Akten konnte der Zeitpunkt der Erstdiagnose des Karzinoms im weiteren Verlauf nicht mehr eruiert werden. In keinem der genannten Fälle wurden jedoch in der Histologie außer den Zellen des Papilloms auch Zellen eines Karzinoms beschrieben. Die Lokalisation der Papillome verteilt sich auf den Blasenboden (ein Patient), die linke Seitenwand (ein Patient), die rechte Seitenwand (ein Patient), das linke Ostium (ein Patient) und den Grenzbereich zum rechten Nierenbecken (ein Patient). Zwei Mal ist die genaue Lokalisation in der Harnblase unklar. Zur Tumorgröße liegen keine Angaben vor.

Die Therapie bestand drei Mal in einer transurethralen Resektion der Harnblase mit begleitender 5-Fluorouracil-Behandlung unterschiedlicher Dauer (ein Mal neun Monate, ein Mal 27 Monate und ein Mal unklarer Dauer). Ein Patient erhielt eine Nephroureterektomie und ein weiterer eine radikale Zystektomie (jeweils ohne 5-Fluorouracil). Bei zwei Patienten war die Art der Behandlung nicht eruierbar.

Unter den sieben Patienten mit meta- bzw. synchronem Auftreten eines Karzinoms gab ein Mann, also 14,3%, Makrohämaturie an, zwei Männer, also 28,6%, verneinten diese, vier weitere (drei Männer, eine Frau), also 57,1%, machten diesbezüglich keine Angabe. Zeichen einer Zystitis empfanden fünf Männer (71,4%), jeweils ein Mann und eine Frau (28,6%) gaben hierzu keine Information an. Symptome der Dysurie (Nykturie, Pollakisurie, Blasenentleerungsstörung) bejahte ein männlicher Patient (14,3%), zwei männliche (28,6%) verneinten diese und vier weitere Patienten (drei Männer, eine Frau, entsprechend 57,1%) machten diesbezüglich keine Angabe.

Unter den Patienten mit meta- bzw. synchronem Auftreten eines Karzinoms waren zwei Raucher (beide männlich, 28,6%) und ein Nichtraucher (männlich, 14,3%), die restlichen vier Patienten (drei männlich, einer weiblich, entsprechend 57,1%) machten keine Angabe zum Nikotinkonsum.

Makrohämaturie	Ja (männlich)	1x
	Ja (weiblich)	0
	Nein (männlich)	2x
	Nein (weiblich)	0
	Ohne Angabe (männlich)	3x
	Ohne Angabe (weiblich)	1x
Zystitis	Ja (männlich)	5x
	Ja (weiblich)	0
	Nein (männlich)	0
	Nein (weiblich)	0
	Ohne Angabe (männlich)	1x
	Ohne Angabe (weiblich)	1x
Dysurie	Ja (männlich)	1x
	Ja (weiblich)	0
	Nein (männlich)	2x
	Nein (weiblich)	0
	Ohne Angabe (männlich)	3x
	Ohne Angabe (weiblich)	1x
Nikotionkonsum	Ja (männlich)	2x
	Ja (weiblich)	0x
	Nein (männlich)	1x
	Nein (weiblich)	0x
	Ohne Angabe (männlich)	3x
	Ohne Angabe (weiblich)	1x

Tabelle 7: Patienten mit meta- bwz. synchronem Karzinom: Begleitfaktoren

Lokalisation	Blasenboden	1x
	Linkes Ostium	1x
	Linke Seitenwand	1x
	Rechtes Nierenbecken	1x
	Rechte Seitenwand	1x
	Unbekannt	2x
Therapie	Nephroureterektomie	1x
	Radikale Zystektomie	1x
	TUR-B + Nachbeobachtung (9-27 Monate)	3x
	Unbekannt	2x
Rezidiv	Metachron (männlich)	4x
	Metachron (weiblich)	1x
	Synchron (männlich)	2x
	Synchron (weiblich)	0

Tabelle 8: Patienten mit meta- bzw. synchronem Karzinom: Therapie

3.2.3 Bedeutung der Begleitfaktoren

Die Geschlechterverteilung lag bei der Patientengruppe I (Patienten mit alleinigem Vorkommen eines invertierten Papilloms) deutlich zu Ungunsten der männlichen Patienten (sieben weiblich/ 19 männlich), während lediglich ca. 27% weiblich waren.

Noch deutlicher stellte sich diese Verteilung in Patientengruppe II (Patienten mit invertiertem Papillom und meta- bzw. synchronem Auftreten eines Urothelkarzinoms) dar, hier waren ca. 86% der Patienten männlich, lediglich eine Frau befand sich darunter.

Das mittlere Alter in Patientengruppe I betrug 64,6 Jahre (Spannweite 31-86 Jahre), das der Frauen 59,0 Jahre (Spannweite 31-80 Jahre) und das der Männer 66,7 Jahre (Spannweite 44-86 Jahre). Das mittlere Alter in Patientengruppe II belief sich auf 67,1 Jahre (Spannweite 40-82 Jahre), wobei die einzige Frau 78 Jahre alt war, die Männer im Durchschnitt 65,3 Jahre (Spannweite 40-82 Jahre). Somit war das durchschnittliche Alter mit 64,6 Jahren bei Diagnosestellung eines invertierten Papilloms etwas niedriger als in der Vergleichsgruppe II mit 67,1 Jahren. Insgesamt waren die weiblichen Patienten in Gruppe I mit 59 Jahren deutlich jünger als die männlichen Patienten derselben Gruppe.

Die überwiegende Anzahl der Patienten beider Gruppen machte bezüglich der Frage nach einer Makrohämaturie keine Angabe, sodass die mit „ja" oder „nein" beantworteten Fragen nicht repräsentativ sind. Dennoch auffällig war die kleine Patientenanzahl, die eine Makrohämaturie als Symptomatik angab. Lediglich zwei Patienten der Gruppe I (entspricht 7,7%) sowie ein Patient der Gruppe II (entspricht 14,3%) gaben an, eine Makrohämaturie erlitten zu haben. 57,7% (entspricht 15 Patienten) der Patientengruppe I und 28,6% (entspricht zwei Patienten) der Patientengruppe II beantworteten die Frage mit „nein".

Entgegen der in der Literatur als führendes Symptom des invertierten Papilloms beschriebenen Makrohämaturie wird diese hier selten mit „ja" beantwortet. Möglicherweise wurde die Frage seitens der Patienten missverstanden, und deshalb häufig falsch oder gar nicht beantwortet.

Auffällig viele Patienten- 50% (13 Patienten) der Patientengruppe I und 71,4% (fünf Patienten) der Patientengruppe II- gaben Beschwerden einer Zystitis an. Fünf Patienten (19,2%) aus Gruppe I verneinten diese Frage, die restlichen Befragten beider Gruppen machten keine Angabe. Die Frage nach den Symptomen einer Zystitis wurde, verglichen mit den anderen genannten des Fragebogens, überwiegend eindeutig beantwortet, ein Großteil beider Patientengruppen bejahten diese.

Andere dysurische Beschwerden (z. B. Pollakisurie, Nykturie) wurden von vier Patienten (15,4%) der Gruppe I und einem Patienten der Gruppe II (14,3%) angegeben. 13 Patienten (50%)- respektive zwei Patienten (28,6%)- beantworteten die Frage mit „nein". Die übrigen Patienten gaben keine eindeutige Antwort.

Aufgrund der großen Anzahl nicht beantworteter Fragen („keine Angabe") ist zweifelhaft, ob die Fragen verlässlich beantwortet wurden. Vermutlich war den Befragten auch hier der zeitliche Bezug auf die zurückliegende Symptomatik im Rahmen der Erkrankung nicht eindeutig.

Einen Nikotinabusus gaben zwei Patienten (7,7%) der Gruppe I sowie zwei weitere (28,6%) der Gruppe II an. Verneint wurde Nikotinkonsum von 15 Patienten (57,7%) der Gruppe I und einem weiteren (14,3%) der Gruppe II. Die restlichen Fragebögen enthielten diesbezüglich keine Angabe. Somit stellen sich auffällig viele Patienten der Gruppe I als Nichtraucher heraus. Unklar bleibt jedoch, ob der Patient zum Zeitpunkt der Erkrankung oder aber zur Zeit der Befragung Nikotinkonsum bertrieb. Dies wurde in der Fragestellung nicht differenziert.

3.2.4 Bedeutung der statistischen Auswertung

Zunächst erfolgte die Durchführung eines t-Tests, um die Bedeutung der Begleitfaktoren einzuschätzen. Dabei lag keiner der vorliegenden Werte unter dem vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05. Somit konnten mithilfe des t-Tests keine signifikanten Unterschiede der vier aufgeführten Variablen festgestellt werden. Es ist demnach kein Zusammenhang anzunehmen zwischen dem Vorhandensein eines meta- bzw. synchronen Karzinoms und dem Vorliegen oben genannter Begleitfaktoren.

Anschließend wurden die Korrelationen nach Pearson bestimmt. Die perfekte Korrelation von Makrohämaturie und Dysurie ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass beide Symptome einer Zystitis darstellen können. Auf Basis des vorliegenden Samples kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass ein Vorliegen von Makrohämaturie, Zystitis, Dysurie bzw. Nikotinkonsum als prädiktiver Faktor für die Entartung eines invertierten Papilloms herangezogen werden kann.

Zudem konnten Korrelationen zwischen den Variablen Nikotinkonsum und Makrohämaturie sowie Nikotinkonsum und Dysurie mit jeweils einem Wert von 0,827 ($p \leq 0{,}001$) beobachtet werden. Beide Variablen weisen eine vollständig positive Korrelation von eins auf. Hierbei ist fraglich, ob dieser Zusammenhang repräsentativ ist oder auf die Antworten missverstandener Fragen der Patienten zurückzuführen ist. Möglicherweise wurde die Frage nach Nikotinkonsum überdurchschnittlich häufig negativ beantwortet aus Sorge seitens der Patienten, dies könnte die Beurteilung der Erkrankung bzw. der Therapie ungünstig beeinflussen.

3.3 Auswertung der immunhistochemischen Marker

Aufgrund der auffälligen Inzidenz eines malignen Harnblasentumors bei Patienten mit gesichertem invertierten Papillom wurden die Präparate mit insgesamt acht immunhistochemischen Markern behandelt, welche bereits in anderen Fachbereichen der Medizin v.a. in der Diagnostik und Nachsorge onkologischer Erkrankungen einen wichtigen Stellenwert besitzen.

Nach Anfertigung der Schnitte aus den Paraffinblöcken und immunhistochemischer Behandlung nach o.g. Verfahren wurden die Präparate durch Pathologen nach spezifischen, o.g. Kriterien mithilfe des Lichtmikroskops beurteilt.

3.3.1 Patienten mit alleinigem invertierten Papillom

Die mit HER-2 bearbeiteten Präparate waren überwiegend (19/26, entsprechend 73,1%) dreifach positiv angefärbt, sechs Präparate zweifach positiv (23,1%) und lediglich eines ist einfach positiv (3,9%).

50% (13/26) der mit p53 markierten Schnitte waren zu 100% angefärbt, 8/26 (30,8%) sind zu 90%, 4/26 (15,4%) zu 80% und ein Schnitt (3,9%) zu 70% angefärbt.

20/26 (76,9%) der mit E-Cadherin behandelten Objektträger wurden als dreifach positiv gewertet, 4/26 (15,4%) als zweifach positiv und einer als einfach positiv (3,9%).

Alle mit Survivin versehenen invertierten Papillome stellten sich maximal, also dreifach positiv, dar (100%).

Jeweils nur ein Präparat färbte sich unter dem MIB- Antikörper zu 70% (1/26, also 3,9%) bzw. zu 30% (1/26, also 3,9%) an. Jeweils vier Präparate wurden hierunter zu 20% (4/26, entspricht 15,4%), 10% (4/26, entspricht 15,4%) und 5% (4/26, entspricht 15,4%) positiv. Die meisten Präparate (8/26, entspricht 30,8%) zeigten eine schwache Anfärbung von 1%. Vier weitere (4/26, entspricht 15,4%) reagierten nicht mit dem MIB-Antikörper.

Die Hälfte (13/26) der mit Clusterin markierten Schnitte blieben unauffällig, sieben (7/26, also 26,9%) hatten ein zweifach positives, die restlichen sechs (6/26, also 23,1%) ein einfach positives Ergebnis.

Die mit p16 behandelten invertierten Papillome wurden überwiegend nicht- (9/26, also 34,6%) oder nur einfach positiv (8/26, also 30,8%) gewertet. 5/26 (19,2%) färbten sich zweifach positiv und 4/26 (15,4%) dreifach positiv an.

Jeweils elf (11/26, 42,3%) der CD24- markierten Objektträger zeigten eine dreifach- bzw. zweifach positive Anfärbung, jeweils zwei (2/26, 7,7%) eine einfach positive bzw. keine Anfärbung an.

HER-2	3+ 2+ 1+ 0	25x 6x 2x 0
p53	100% 90% 80% 70% 60% 50%	15x 9x 7x 2x 0 0

	40% 30% 20% 10% 0	0 0 0 0 0
E-Cadherin	3+ 2+ 1+ 0	26x 5x 2x 0
Survivin	3+ 2+ 1+ 0	33x 0 0 0
MIB	100% 90% 80% 70% 60% 50% 40% 30% 20% 10% 5% 1% 0	0 0 0 1x 0 0 0 1x 5x 5x 6x 11x 4x
Clusterin	3+ 2+ 1+ 0	0 9x 8x 16x
p16	3+ 2+ 1+ 0	5x 8x 8x 12x
CD24	3+ 2+ 1+ 0	12x 16x 3x 2x

Tabelle 9: Immunhistochemische Auswertung aller Patienten mit invertiertem Papillom

3.3.2 Patienten mit invertiertem Papillom und Urothelkarzinom

Die mit HER-2 bearbeiteten Präparate waren überwiegend (3/7, entsprechend 42,9%) dreifach positiv angefärbt, ein Präparat ist einfach positiv (1/7, entsprechend 14,3%).

28,6% (2/7) der mit p53 markierten Schnitte waren zu 100% angefärbt, 1/7 (14,3%) war zu 90%, 3/7 (42,9%) zu 80% und ein Schnitt (14,3%) zu 70% angefärbt.

6/7 (85,7%) der mit E-Cadherin behandelten Objektträger wurden als dreifach positiv gewertet und einer (14,3%) als einfach positiv.

Alle mit Survivin versehenen Schnitte stellten sich dreifach positiv dar (100%).

Jeweils nur ein Präparat färbte sich unter dem MIB-Antikörper zu 20% (1/7, also 14,3%) bzw. zu 10% (1/7, also 14,3%) an. Zwei Präparate wurden hierunter zu 5% (2/7, entspricht 28,6%) und drei zu 1% (1/7, entspricht 14,3%) angefärbt.

Drei (3/7, 42,9%) der mit Clusterin markierten Schnitte blieben unauffällig, jeweils zwei (2/7, also 28,6%) hatten ein zweifach- bzw. einfach positives Ergebnis.

Die mit p16 behandelten Tumore wurden ein Mal (1/7, 14,3%) dreifach-, sowie jeweils drei Mal (3/7, also jeweils 42,9%) zweifach bzw. nicht positiv gewertet.

Einer (14,3%) der CD24-markierten Objektträger zeigte eine dreifach positive Anfärbung, fünf (5/7, 71,4%) eine zweifach positive und ein weiterer eine einfach positive Anfärbung.

3.3.3 Bedeutung der immunhistochemischen Marker

Die Ergebnisse der mit HER-2 markierten Präparate waren in beiden Patientengruppen vergleichbar. Während sich ca. 96% der Präparate in Gruppe I drei- oder zweifach positiv darstellten, waren es in Patientengruppe II ca. 86%.

Somit scheint HER-2 kein geeigneter Parameter zur Differenzierung beider Gruppen zu sein.

Deutliche Unterschiede fielen in den mit p53 behandelten Schnitten auf. Die histopathologische Beurteilung erfolgte in 10%- Schritten, je nach Ausmaß der Anfär-

bung des jeweiligen Objektträgers. Die Ergebnisse der Gruppe I fielen überdurchschnittlich hoch positiv aus. 21 Schnitte (entspricht 80,8%) färbten sich zu 90 bzw. 100% an, in der Vergleichsgruppe II waren es lediglich 42,9% (3/7 Schnitten). Zusammenfassend ist hier von einem unterschiedlichen Verhalten der Papillome mit bzw. ohne zusätzlichem Karzinom auszugehen.

Die mit E-Cadherin markierten Papillome wiesen in Gruppe I ein zu 76,9% dreifach positives Ergebnis auf, in Gruppe II waren es 85,7%. Somit lässt sich hier kein gravierender Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen.

Alle mit Survivin versehenen Präparate zeigten ein maximal positives Ergebnis, daher ist eine weitere Differenzierung anhand des immunhistochemischen Markers nicht möglich.

Auffällig unter den mit MIB behandelten Schnitten war die insgesamt eher schwache Anfärbung. In Gruppe II betrug das maximale Ausmaß der Anfärbung 20%, jedoch färbten sich lediglich 71,4% zu 5% oder weniger an. Verglichen mit Gruppe I, in der das Ausmaß der maximalen Anfärbung 70% betrug, färbten sich nur 61,5% zu 5% oder weniger an.

Bei den mit Clusterin versehenen Präparaten fiel ein in beiden Gruppen hoher Anteil an negativen Ergebnissen auf, in Gruppe I färbten sich 50%, in Gruppe II 42,9% nicht mit Clusterin an.

Ein großer Anteil der mit p16 markierten Papillome färbte sich schwach oder gar nicht an. In Gruppe I war der Teil der nicht- oder einfach positiv angefärbten Präparate mit 65,4% deutlich größer im Vergleich zur Gruppe II mit 42,9%. In Gruppe I betrug der Anteil der drei- oder zweifach positiv gefärbten Präparate 34,6%, während dieser Anteil in Gruppe II 57,1% betrug. Diejenigen Papillome mit einem meta- bzw. synchronen Auftreten eines Urothelkarzinoms scheinen sich also deutlich stärker zu markieren.

Auffällig unter den mit CD24 markierten Objektträgern war der deutlich größere Teil an dreifach positiven Ergebnissen in Gruppe I mit 42,3% verglichen mit 14,3% in Gruppe II. Fasst man jedoch die drei- und zweifach positiven Ergebnisse zusammen, beträgt der Prozentsatz in Gruppe I 84,6%, respektive 85,7% in Gruppe II, womit beide Gruppen wieder vergleichbare Ergebnisse aufweisen.

HER-2	3+ 2+ 1+ 0	19x 6x 1x 0
p53	100% 90% 80% 70% 60% 50% 40% 30% 20% 10% 0	13x 8x 4x 1x 0 0 0 0 0 0 0
E-Cadherin	3+ 2+ 1+ 0	20x 4x 2x 0
Survivin	3+ 2+ 1+ 0	26x 0 0 0
MIB	100% 90% 80% 70% 60% 50% 40% 30% 20% 10% 5% 1% 0	0 0 0 1x 0 0 0 1x 4x 4x 4x 8x 4x
Clusterin	3+ 2+ 1+ 0	0 7x 6x 13x
p16	3+ 2+ 1+	4x 5x 8x

	0	9x
CD24	3+	11x
	2+	11x
	1+	2x
	0	2x

Tabelle 10: Immunhistochemische Auswertung aller Patienten mit invertiertem Papillom ohne Karzinom

HER-2	3+	6x
	2+	0
	1+	1x
	0	0
p53	100%	2x
	90%	1x
	80%	3x
	70%	1x
	60%	0
	50%	0
	40%	0
	30%	0
	20%	0
	10%	0
	0	0
E-Cadherin	3+	6x
	2+	1x
	1+	0
	0	0
Survivin	3+	7x
	2+	0
	1+	0
	0	0
MIB	100%	0
	90%	0
	80%	0
	70%	0
	60%	0
	50%	0
	40%	0
	30%	0
	20%	1x
	10%	1x
	5%	2x
	1%	3x

	0	0
Clusterin	3+ 2+ 1+ 0	0 2x 2x 3x
p16	3+ 2+ 1+ 0	1x 3x 0 3x
CD24	3+ 2+ 1+ 0	1x 5x 1x 0

Tabelle 11: Immunhistochemische Auswertung der Patienten mit invertiertem Papillom und meta- bzw. synchronem Auftreten eines Karzinoms

3.3.4 Bedeutung der statistischen Auswertung

Der t-Test bezüglich des Markers p53 stellt mit einer Signifikanz von p=0,088 den Marker mit der höchsten Sensitivität dar. Dies kann jedoch bei einem festgelegten Signifikanzniveau von 5% nicht als signifikant bezeichnet werden. Es ist also nicht davon auszugehen, dass ein positives Ergebnis im Sinne der pathologischen Betrachtung mit dem Vorliegen eines Karzinoms korreliert.

Nach Verdichtung der Marker in Subklassen wurden insgesamt ähnliche Ergebnisse erzielt wie im vorangegangenen t-Test. Der Marker p53 jedoch wies ein signifikantes Ergebnis (p= 0,047) auf, wenn die hochpositiven Präparate (Anfärbung ≥ 0,9) gesondert betrachtet wurden. Somit ist anzunehmen, dass die Anfärbung eines Präparates mit p53 von ≥ 90% auf das Vorliegen eines Karzinoms hinweisen kann.

Die Ergebnisse der Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Tests bestätigten die bereits erhobenen Daten mithilfe des t-Tests. Somit besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Karzinoms und einer hochpositiven Anfärbung mit p53. Demnach kann die Vermutung unterstützt werden, dass p53 den vergleichsweise zuverlässigsten der hier getesteten Marker darstellt. Voraussetzung hierfür ist eine starke Anfärbung des Präparates zu ≥ 90%.

Schließlich erfolgte die Berechnung der Korrelationen nach Pearson. Die Auswertung der immunhistochemischen Marker ergab keine starken oder gar perfekten Korrelationen. Die hier aufgewiesenen mittleren Korrelationen zwischen Clusterin und dem Geschlecht bzw. E-Cadherin und der HER-2-Gruppe sind vernachlässigbar. Die Korrelationen nach Pearson beschreiben lediglich Zusammenhänge zwischen einzelnen Variablen und sind nicht zentraler Bestandteil dieser Untersuchung. Sie dienen lediglich der Ergänzung der bereits erhobenen Daten und lieferten erwartungsgemäß vergleichbare Ergebnisse.

4 Diskussion

Das invertierte Papillom ist eine seltene, jedoch gutartige Erkrankung des Urogenitaltraktes mit einer Inzidenz von etwa 0,5-4,5% aller Blasentumore. Das Literaturangebot ist eingeschränkt, dennoch gibt es weltweit einige Arbeiten, die sich mit dem biologischen Verhalten sowie der Therapie und Nachsorge des invertierten Papilloms befassen.

Die vorliegende Untersuchung umfasst eine Gruppe von 33 Patienten, welche sich allesamt an der medizinischen Universität zu Lübeck in Behandlung befanden. Auffällig war der hohe Anteil an Patienten (20,6%), welche meta- oder synchron an einem Urothelkarzinom erkrankten. Diese Tatsache deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Aufgrund der vermuteten Kausalität stellte sich uns die Frage, ob bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des invertierten Papilloms eine Tendenz zur Entwicklung eines Urothelkarzinoms zu erkennen ist. Hierfür wurden neben der Auswertung der Begleitfaktoren und des Follow-ups verschiedene immunhistochemische Marker herangezogen, welche in verschiedenen Bereichen der Medizin- v.a. in der Diagnostik, Therapiekontrolle und Nachsorge von Malignomen- Anwendung finden.

Zur Einordnung der Ergebnisse in die derzeitige Datenlage wurde ein Vergleich hergestellt mit den fallstärksten Untersuchungen der letzten Jahre. Diese sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Urotheliale Papillome und Low-grade-Karzinome weisen bekanntermaßen eine hohe Inzidenz an FGFR-Mutationen auf und haben eine gute Prognose. Lott et al. analysierten 2009 20 Fälle mit invertiertem Papillom des Urogenitaltraktes, bei denen Mutationen der FGFR3- und TP53-Gene gesucht wurden [Lott et al. 2008]. Die häufigste Mutation wies R248C auf, keines der invertierten Papillome zeigte eine TP53-Mutation. Während der Nachbeobachtung über 78 Monate konnte kein Rezidiv oder Urothelkarzinom diagnostiziert werden. Zusammenfassend bestätigt diese Untersuchung die Vermutung, dass Low-grade- und High-grade-Karzinome des Urothels unterschiedliche molekulare Eigenschaften besitzen [Lott et al. 2008].

Sung et al. untersuchten in ihrer Arbeit von 2006 eine Gruppe von 75 Patienten mit der Diagnose eines invertierten Papilloms ohne das zeitgleiche bzw. in der

Anamnese beschriebene Vorliegen eines Urothelkarzinoms [Sung et al. 2006]. Ziel war das Festlegen von Therapiestrategien bezogen auf das klinisch-pathologische Verhalten und die Prognose des invertierten Papilloms. In einem Fall ist ein Rezidiv eines invertierten Papilloms beschrieben, alle anderen Patienten blieben im Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 68 Monaten rezidiv- bzw. tumorfrei. Zusammenfassend gehen die Autoren aufgrund der niedrigen Rezidivrate (1%) und der sehr guten Prognose von einem gutartigen Verhalten des invertierten Papilloms aus, wenn die Diagnose nach strengen Kriterien gestellt wird. Empfohlen wird die komplette transurethrale Resektion der Harnblase, nicht aber eine Nachsorge ähnlich der des Urothelkarzinoms [Sung et al. 2006].

Cheng et al. veröffentlichen 2005 eine Untersuchung über 20 Patienten (18 männlich, zwei weiblich) mit einem invertierten Papillom und einer Literaturübersicht bezüglich multifokalem Vorkommen, Rezidivrate, Assoziation mit Urothelkarzinomen sowie der Nachsorge [Cheng et al. 2005]. Das mittlere Alter der Patienten betrug 60,8 Jahre (Spannweite 35-78 Jahre), alle hatten einen solitären Tumor mit einer Größe von 3-30 mm, die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit (Zystoskopie) betrug 30 Monate. Ein Rezidiv wurde nicht beobachtet, ein Patient erlitt nach jeweils 44 und 76 Monaten ein Urothelkarzinom. Es wird eine regelmäßige Nachsorge mittels Zystoskopie empfohlen [Cheng et al. 2005].

Broussard et al. führten 2004 eine Untersuchung mit elf Patienten mit invertiertem Papillom mit Atypien und zehn Patienten mit invertiertem Papillom ohne Atypien durch [Broussard et al. 2004]. Diejenigen mit Atypien wurden je nach histopathologischem Befund in fünf weitere Untergruppen unterteilt. Dabei wiesen insgesamt drei Papillome mit Atypien eine positive Reaktion auf Ki67 auf (keines der zehn Kontroll-Präparate) und zwei auf p53 (eine positive in der Kontrollgruppe). Sämtliche Präparate (mit oder ohne Atypien) zeigten ein negatives Ergebnis auf Cytokeratin 20. Das Follow-up der elf Patienten mit invertiertem Papillom und Atypien verlief unauffällig bezüglich Rezidiv oder Entwicklung eines Urothelkarzinoms. Zusammenfassend empfehlen die Autoren, die derzeitig gebräuchliche Nomenklatur („invertiertes Papillom mit Atypie") beizubehalten, weitere Evaluation sei jedoch notwendig [Broussard et al. 2004].

Asano et al. berichteten 2003 über 48 Fälle eines invertierten Papilloms in Korrelation mit der in der Literatur beschriebenen klinischen Signifikanz [Asano et al. 2003]. In insgesamt fünf Fällen lag zeitgleich ein Urothelkarzinom vor, bei 42 von 48 Fällen war ein Follow-up möglich. 7% erlitten ein Rezidiv, welches innerhalb von fünf Monaten bis zweieinhalb Jahren auftrat. Zusammenfassend gingen die Autoren von zwei verschiedenen Arten des invertierten Papilloms aus. Der erste Typ schien benigne zu sein, der zweite mit Potenzial zur malignen Entartung. Ein Unterscheidungsmerkmal war den Autoren nicht bekannt. Die Empfehlung lautet, alle Patienten mindestens zwei Jahre nach der initialen Therapie zu beobachten [Asano et al. 2003].

Núñez Mora et al. veröffentlichten 2001 eine retrospektive Arbeit über 31 von ihnen therapierte Patienten (Zeitspanne 1976-1999) mit der Diagnose eines invertierten Papilloms des Urogenitaltraktes [Núñez Mora et al. 2001]. 17/31 Patienten boten synchron bzw. in der Anamnese ein Urothelkarzinom, 14/17 ein primäres invertiertes Papillom. Zwölf Patienten (41,4%) erlitten ein Rezidiv in Form eines Blasentumors nach durchschnittlich 17,9 Monaten. Abschließend zeigte das invertierte Papillom eine hohe Rezidivrate und eine deutliche Assoziation mit einem Urothelkarzinom. Das invertierte Papillom sollte deshalb behandelt werden wie ein Low-grade-Tumor mit regelmäßiger Nachsorge [Núñez Mora et al. 2001].

Witjes et al. untersuchten 1997 ihr Patientengut hinsichtlich der unklaren Daten über eine mögliche maligne Entartung und das Follow-up [Wittjes et al. 1997]. Die Ergebnisse waren mit denen in der Literatur vorbeschriebenen vergleichbar. Bei einem Patienten wurde ein zusätzlicher Blasentumor nach 49 Monaten diagnostiziert. In der Schlussfolgerung wurde nicht davon ausgegangen, dass das invertierte Papillom einen Risikofaktor für das Entstehen eines Urothelkarzinoms darstellt, obwohl die Autoren von einer gewissen Korrelation beider Krankheitsbilder ausgehen. Ein Langzeit-Follow-up wird nicht empfohlen [Wittjes et al. 1997].

Im Vergleich zu anderen Arbeiten ähnlicher Fragestellung liegt in dieser Arbeit mit 33 Patienten eine relativ fallstarke Untersuchungsreihe vor. (vgl. Tabelle 12)

Im gesamten Patientenkollektiv trat in sieben Fällen (20,6%) meta- oder synchron ein Urothelkarzinom auf. Dies lässt eine ausgeprägte Assoziation zwischen dem

Auftreten eines invertierten Papilloms und eines Urothelkarzinoms vermuten. Die Arbeiten von Lott et al. (2009), Sung et al. (2006) und Broussard et al. (2004) konnten mit Fallzahlen zwischen 20 und 75 Patienten keine Korrelation beider Krankheitsbilder erkennen. Auch Witjes et al. (1997, 37 Patienten) konnte keinen eindeutigen Zusammenhang beschreiben. Alle empfahlen als Therapie die transurethrale Resektion der Harnblase, sahen jedoch von einer Nachbeobachtung dieser Patienten ab. Cheng et al. (2005), Asano et al. (2003) und Núñez Mora et al. (2001) kamen zu der Annahme, dass zwischen dem invertierten Papillom und dem Urothelkarzinom ein eindeutiger Zusammenhang besteht. Übereinstimmend wurde die Empfehlung zur regelmäßigen Nachsorge geäußert, Asano et al. empfahlen eine Beobachtung über zwei Jahre, Núñez Mora et al. sogar eine Nachsorge wie bei Low-grade-Tumoren (fünf Jahre).

Unter den 26 Patienten mit solitärem invertierten Papillom wurde in zwei Fällen ein Rezidiv diagnostiziert, ein Mal nach 14 Monaten und ein weiteres Mal nach 18 Monaten, welches auch Atypien in der Kernmorphologie aufwies. Die Rezidivrate lag somit bei 6,1% (2/33).

Autor/ Jahr	**Patienten**	**Assoziation mit Urothelkarzinom**	**Empfehlung**
Aktuelle Arbeit 2013	33	Ja	TUR und regelmäßige Nachsorge
Lott et al. 2009	20	Nein	-
Sung et al. 2006	75	Nein	TUR, aber keine Nachsorge
Cheng et al. 2005	20	Ja	Regelmäßige Nachsorge
Broussard et al. 2004	21	Nein	IP mit oder ohne Atypien
Asano et al. 2003	48	Ja	Beobachtung über zwei Jahre

Núñez Mora et al. 2001	31	Ja	Nachsorge wie Low- grade- Tumor
Witjes et al. 1997	37	Eher nein	Kein Langzeit-Follow- up

Tabelle 12: Übersicht der letzten Arbeiten über invertierte Papillome

Ein Großteil dieser Untersuchung ist eine retrospektive Analyse der Patientendaten. Um diese zu erheben, war zunächst eine Einverständniserklärung der Patienten erforderlich und im weiteren Verlauf eine schriftliche Befragung der Teilnehmer. Die wahrheitsgemäße und korrekte Beantwortung bietet die Grundlage für aussagekräftige Ergebnisse.

Ein gewisser Anteil der Fragen zur Erhebung der Daten bezüglich der Begleitfaktoren ist nicht beantwortet worden. Dies ist einerseits dadurch bedingt, dass einige Patienten bereits verstorben waren und die Fragen somit offen blieben. Andererseits waren auch einige der zurückgesendeten Fragebögen ohne eindeutige Antwort („keine Angabe") versehen. Dies kann unter Umständen auch in der teilweise missverständlichen Formulierung der Fragen begründet sein. Die Fragestellung war nicht immer explizit auf den Zeitpunkt des Symptombeginns bzw. der Diagnosestellung bezogen. Auch zu diskutieren ist, ob eine telefonische Befragung gegebenenfalls effektiver gewesen wäre. So wäre der Patientenkontakt näher gewesen und somit evtl. auch das Vertrauen in die Relevanz der Datenerhebung.

Letztlich wäre auch ein Anschreiben an den behandelnden Urologen oder Hausarzt eine Möglichkeit der Kontaktaufnahme gewesen. Dieser Weg wäre ein Versuch, die Verständnisschwierigkeiten durch gemeinsames Beantworten der Fragen von Patient und Arzt zu umgehen.

Die verschiedenen o.g. Autoren kamen zu unterschiedlichen, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Die Assoziation des invertierten Papilloms mit dem Urothelkarzinom konnte nicht immer hergestellt werden. Dennoch zeigten sich in einigen Analysen sowie auch in dieser aktuellen Studie eindeutige Zusammenhänge beider Krankheitsbilder, sodass von einer gewissen Korrelation ausgegangen werden muss. Auch wenn der Hintergrund bis dato histopathologisch nicht beleuchtet werden konnte, belegen die ermittelten Werte diese Vermutung.

Mit 33 Patienten ist diese Untersuchungsreihe im Vergleich zu Arbeiten ähnlicher Fragestellung relativ fallstark. Aufgrund der geringen Inzidenz dieser Erkrankung ist das Vorliegen von Vergleichsstudien sowie das Literaturangebot jedoch stark limitiert.

Dieser aktuellen Untersuchung liegt eine Gruppe von 33 Patienten zugrunde. Die Rezidivrate eines invertierten Papilloms lag bei 6,1% (zwei Patienten, Rezidiv nach 14 und 18 Monaten, darunter ein Papillom mit Atypien). 20,6% aller Patienten entwickelten meta- oder synchron ein Urothelkarzinom. Aufgrund unvollständiger Akten sowie der zu hinterfragenden Daten aus der Patientenbefragung war der Zeitpunkt des Auftretens des Karzinoms nicht in jedem Fall eindeutig. Bei drei Patienten war ein metachrones Karinom aufgetreten, bei den übrigen vier Patienten war der Zeitpunkt nicht sicher eruierbar, sodass hier eine weitere Unterscheidung zwischen meta- bzw. synchronem Auftreten nicht möglich war.

Die hier erhobenen Daten decken sich teilweise mit denen von Cheng et al. (2005), Asano et al. (2003) und Núñez Mora et al. (2001). Alle gehen von einer Assoziation zwischen dem invertierten Papillom und der Entstehung eines Urothelkarzinoms aus. Dementsprechend wird die Anpassung der Richtlinien für die Nachsorge gefordert. Die Rezidivrate für das invertierte Papillom ist in dieser aktuellen Untersuchung mit 6,1% vermutlich eher zu vernachlässigen. Anders verhält es sich jedoch mit dem Anteil der Patienten, welche meta- oder synchron an einem Urothelkarzinom erkrankten. Mit ca. 21% spricht dies für einen starken Zusammenhang und sollte eine Modifikation der Therapie und anschließenden Nachsorge des betroffenen Patientenguts nach sich ziehen.

Der Anteil der weiblichen Patienten unter denen mit solitärem invertierten Papillom betrug 27%, der Anteil der männlichen Patienten 73%. In der Gruppe der invertierten Papillome mit meta- bzw. synchronem Urothelkarzinom betrug der Anteil männlicher Patienten sogar 86%, das mittlere Alter in dieser Patientengruppe lag bei 67 Jahren. Die als führendes Symptom eines invertierten Papilloms geltende Makrohämaturie gaben in dieser Studie 58% der Patientengruppe I (Patienten mit alleinigem Vorkommen eines invertierten Papilloms), jedoch lediglich etwa 29% der Patientengruppe II (Patienten mit invertiertem Papillom und meta- bzw. synchronem Auftreten eines Urothelkarzinoms) an. Anders verhielt es sich mit den

Zeichen einer Zystitis- 50% der Gruppe I gaben an, hierunter zu leiden, während ca. 71% der Gruppe II Beschwerden einer Zystitis beklagten.

Es ist also davon auszugehen, dass die Makrohämaturie zwar ein häufiges Symptom des invertierten Papilloms darstellt, nicht aber gehäuft vorkommt bei denjenigen Patienten, welche meta- oder synchron ein Urothelkarzinom entwickelten. Andererseits scheint die Symptomatik einer Zystitis vorherrschend zu sein in dieser Patientengruppe.

Die Lokalisation betraf in der überwiegenden Anzahl die Harnblase. Bei den solitären invertierten Papillomen waren besonders häufig die linke Seitenwand, der Blasenboden und der Blasenauslass befallen (bei jeweils 4/26 Patienten), seltener die Urethra (insgesamt drei Mal), davon zwei Mal die prostatische Harnröhre. Die Papillome mit meta- bzw. synchronem Urothelkarzinom waren hauptsächlich in der Harnblase lokalisiert, lediglich eines fand sich am Übergang zum rechten Nierenbecken.

Eine eindeutige Assoziation mit einem Nikotinkonsum ließ sich nicht herstellen, der überwiegende Anteil aller Patienten stellte sich als Nichtraucher heraus.

Die immunhistochemischen Marker HER-2, E-Cadherin, Survivin und Clusterin zeigten keine wegweisenden Unterschiede beider Patientengruppen. Sie scheinen somit nicht geeignet für die Differenzierung des biologischen Verhaltens der Papillome.

Die mit p53 markierten, solitären Papillome ließen sich durch die Intensität der Anfärbung von den Papillomen mit meta- bzw. synchronem Urothelkarzinom differenzieren. Die Bewertung der Intensität erfolgte in Schritten von jeweils zehn Prozent. Ca. 81% der Papillome aus Gruppe I färbten sich zu 90% oder 100% an, während es in der Vergleichsgruppe II lediglich 43% waren. Diejenigen Papillome, welche eine Assoziation zum Urothelkarzinom aufwiesen, schienen die Tendenz zur weniger intensiven Anfärbung unter p53 zu besitzen. Unter der Behandlung mit p16 hingegen kam es zu einer deutlich stärkeren Ausprägung der Präparate in Patientengruppe II als in der Vergleichsgruppe. Die Ergebnisse der markierten Präparate wurden in vier Kategorien (negativ, einfach-, zweifach-, dreifach-positiv) eingeteilt. Waren die Ergebnisse in Gruppe II zu 57% zwei- oder dreifach positiv,

waren es in Gruppe I vergleichsweise nur 35%. Somit ist von einer stärkeren Darstellung unter p16 auszugehen, wenn ein zusätzliches Malignom vorliegt.

Die mit CD24 behandelten Papillome wurden bewertet wie die mit p16 markierten. Gruppe II zeigte mit ca. 42% einen deutlich größeren Anteil an dreifach-positiven Ergebnissen als Gruppe I mit ca. 14%. Die übrige Auswertung zeigte annähernd ähnliche Werte. Auch hier ist unter der immunhistochemischen Markierung von einer stärker ausgeprägten Antwort auszugehen, wenn es sich um ein Papillom mit meta- bzw. synchronem Urothelkarzinom handelt.

19 Patienten der Gruppe I wurden mit einer transurethralen Resektion der Harnblase behandelt und erhielten zum Teil eine unterstützende Instillationstherapie. Bei sieben weiteren Patienten war die Therapieform nicht eruierbar. Drei Patienten der Gruppe II erhielten eine Therapie in Form einer transurethralen Resektion der Harnblase, teilweise mit begleitender Instillationstherapie, je ein Patient wurde einer Nephroureterektomie bzw. einer radikalen Zystektomie unterzogen, bei einem Patienten war die Art der Therapie unklar. Die Nachbeobachtung dieser Patientengruppe betrug zwischen einem Monat und 13 Jahren.

Nach Erhebung aller o.g. Daten und der retrospektiven Analyse gehen wir davon aus, dass ca. 21% aller Patienten mit der Erstdiagnose eines invertierten Papilloms zur Entwicklung eines Urothelkarzinoms neigen. Die Risikofaktoren hierfür sind das männliche Geschlecht, Alter um 67 Jahre sowie Makrohämaturie und Symptome einer Zystitis in der Anamnese.

Bis dato umfasst die empfohlene Therapie eine transurethrale Resektion der Harnblase gemäß den Richtlinien für Low-grade-Karzinome, eine Nachsorge wird nicht empfohlen. Ausgehend von unseren Ergebnissen scheint die TUR-B eine angemessene Therapie darzustellen. Zu diskutieren wäre eine ergänzende Chemotherapie, ggf. die Instillationstherapie der Harnblase.

Nach den EAU-Leitlinien von 2011 verringert sich die Rezidivrate eines TaT1-Blasentumors signifikant durch eine sofortige, einmalige Instillationstherapie. Je nach Tumorstadium und individuellem Rezidivrisiko werden außer der initialen Instillationstherapie auch nachfolgende Behandlungen empfohlen. Bei high-grade-Karzinomen kann eine sofortige Zystektomie indiziert sein.

Die Leitlinien empfehlen weiterhin ein Follow-up für TaT1-Tumore aufgrund der hohen Rezidiv- und Progressionsraten. Ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv des oberen Harntraktes haben Patienten mit multiplen oder High-grade-Karzinomen. Eine nicht-invasive Alternative zur TUR besteht derzeit nicht [Babjuk et al. 2011].

Patienten mit TaT1-Tumoren und niedrigem Risiko für ein Rezidiv bzw. Progress sollten eine erste Nachsorge mittels TUR nach drei Monaten erhalten. Bei unauffälligem Ergebnis eine weitere TUR nach neun Monaten und dann jährlich für fünf Jahre. Bei hohem Risiko für ein Rezidiv oder Progress bzw. bei Patienten mit CIS sollte nach drei Monaten eine TUR sowie ergänzend eine Urinzytologie stattfinden. Die Festlegung der weiteren Untersuchungen sowie der Abstände dazwischen richtet sich nach dem jeweiligen Ergebnis und dem Tumorstadium [Babjuk et al. 2011].

Zusammenfassend besteht beim invertierten Papillom des Harntraktes ein hohes Risiko für ein Rezidiv sowie das meta- bzw. synchrone Entstehen eines Urothelkarzinoms. Um diejenigen Patienten frühzeitig zu detektieren, empfehlen wir eine regelmäßige Nachsorge mittels TUR sowie eine einmalige immunhistochemische Diagnostik nach Erstdiagnose zur Einschätzung der Prognose. Hierzu geeignet sind p16, p53 und CD24. In erster Linie ist jedoch eine immunhistochemische Diagnostik mittels p53 zu empfehlen, da diese als einziger Marker signifikante Ergebnisse hervorbrachte, wenn eine Anfärbung von ≥ 90% vorlag. Bei einer geringeren Anfärbung ist die Aussage jedoch zweifelhaft.

Eine weitere Unterscheidung zwischen dem immunhistochemischen Verhalten eines metachronen oder synchronen Auftreten des Karzinoms war aus o.g. Gründen leider nicht möglich. Das vorliegende Patientenkollektiv beinhaltet drei Patienten mit invertiertem Papillom und sicher metachronem Auftreten eines Karzinoms. Bei den vier weiteren Patienten mit zusätzlichem Karzinom war der Zeitpunkt nicht eruierbar. Jedoch scheint ein synchrones Karzinom sehr unwahrscheinlich, da keines der hier untersuchten Präparate neben dem histologischen Bild eines Papilloms auch Zellen eines Karzinoms aufwies. Es ist letztlich also zu vermuten, dass es sich hier um sieben Fälle eines invertierten Papilloms mit metachronem Auftreten eines Karzinoms handelt.

Bezüglich der Gestaltung der Nachsorge können wir uns den EAU-Leitlinien anschließen. Eine zusätzliche immunhistochemische Diagnostik als Verlaufsparameter neben TUR und ggf. Urinzytologie ist vermutlich nicht notwendig. Aufgrund der großen Relevanz der frühzeitigen Diagnose eines Rezidivs scheinen Aufwand und Kosten der regelmäßigen Nachsorge gerechtfertigt. Aus Mangel an nichtinvasiven Methoden bleibt die transurethrale Resektion das Mittel der Wahl. Die EAU empfiehlt für nicht-muskelinvasive Tumore eine erste TUR drei Monate nach der Erstdiagnose. Wir schlagen darüber hinaus eine regelmäßige Nachsorge über zwei Jahre vor. Diese sollte alle drei Monate durchgeführt werden. In Anbetracht des ungewissen Auftretens des invertierten Papilloms sowie der unklaren Dignität erscheint uns eine frequente Nachbeobachtung gerechtfertigt.

Weitere Staging-Untersuchungen sind vermutlich nicht notwendig, da weder in der aktuellen Studie noch in der Literatur eine Metastasierung des invertierten Papilloms beschrieben wird.

5 Zusammenfassung

Das invertierte Papillom ist mit einer Inzidenz von 0,4-4,5% aller Blasentumore eine seltene, jedoch gutartige Erkrankung der Urologie. In der Literatur ist erstmals 1927 von einem „adenomatoiden Polypen" (Paschkis) die Rede, Erstbeschreiber des invertierten Papilloms sind Potts und Hirst 1963.

Als führendes Symptom bei Patienten mit invertiertem Papillom gilt in der Literatur die Makrohämaturie. Die Therapie besteht bis dato überwiegend in der transurethralen Resektion der Harnblase. Leitlinien für die Nachsorge existieren nicht, dennoch ist für diese Patientengruppe ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Blasentumors vorbeschrieben. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, immunhistochemische Marker beim invertierten Papillom zu evaluieren sowie möglichst frühzeitig die Tendenz zur Entwicklung eines Urothelkarzinoms zu erkennen und anhand der Untersuchungsergebnisse einen praktischen Leitfaden für die Nachsorge zu erstellen.

An der Klinik für Urologie der medizinischen Universität zu Lübeck wurde im Zeitraum 1993-2007 bei insgesamt 53 Patienten die Erstdiagnose eines invertierten Papilloms gestellt. Für die vorliegende Untersuchung konnten 33 Fälle eingeschlossen werden, bei denen eine operative Therapie bereits erfolgt war. Alle histologischen Präparate wurden erneut aufgearbeitet und mit acht in der Diagnostik und Therapie onkologischer Erkrankungen gängigen immunhistochemischen Marker behandelt.

Im vorliegenden Patientenkollektiv waren Männer (25/33, davon 6/7 mit meta- bzw. synchronem Karzinom) deutlich häufiger von diesem Krankheitsbild betroffen als Frauen (8/33, davon 1/7 mit meta- bzw. synchronem Karzinom). Das mittlere Alter lag bei 64,6 Jahren in Gruppe I (nur invertiertes Papillom) und 67,1 Jahren in Gruppe II (invertiertes Papillom und meta- bzw. synchrones Karzinom). Die Therapie bestand in 22 Fällen in einer transurethralen Resektion, ein Mal radikale Zystektomie, ein Mal Nephroureterektomie, in den restlichen Fällen konnte keine spezifische Art der Behandlung eruiert werden. Die Rezidivrate eines Papilloms lag in dieser Arbeit bei 6,1%. Von allen Patienten entwickelten 20,6% (ein weiblicher, sechs männliche Patienten) meta- bzw. synchron ein Urothelkarzinom. Häufiger

betroffen hiervon scheinen männliche Patienten, Alter >65 Jahre, Vorliegen von Makrohämaturie bzw. zystitische Beschwerden.

Der Verdacht auf ein erhöhtes Risiko für ein Urothelkarzinom nach der Erstdiagnose eines invertierten Papilloms konnte also hier bestätigt werden (20,6%). Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Software SPSS Statistics 19 herangezogen. Es erfolgte die Festlegung eines Signifikanzniveaus von 5% für alle Tests in beiden Gruppen (I und II). Die Auswertung der klinischen Begleitfaktoren (Makrohämaturie, Zystitis, Dysurie, Nikotinkonsum) erbrachte im t-Test kein signifikantes Ergebnis. Da die Untersuchung der immunhistochemischen Marker (HER-2, p53, E-Cadherin, Survivin, MIB, Clusterin, p16, CD24) ebensowenig signifikante Werte erzielte, wurden die einzelnen Marker in individuelle Subklassen unterteilt, um die jeweilige Ausprägung zu verdichten. Anhand eigens festgelegter Grenzwerte wurde so eine binäre Umrechnung der Daten möglich. Aufgrund einer konstanten Ausprägung des Markers wurde Survivin von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Schließlich stellte sich p53 als einziger Marker mit einem signifikanten Ergebnis ($p=0,047$) heraus. Dies konnte in den nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden. Für die immunhistochemische Markierung zur Differenzierung derjenigen invertierten Papillome mit Tendenz zur malignen Entartung scheint somit in erster Linie p53 geeignet. Dabei ist auf eine ausgeprägte Anfärbung des Präparates mit dem Marker zu achten, die hier festgelegte Grenze lag bei ≥90%. Bei weniger stark angefärbten Präparaten ist die Aussage jedoch zweifelhaft.

Zusammenfassend empfehlen wir allen Patienten mit der Erstdiagnose eines invertierten Papilloms die transurethrale Resektion der Harnblase. Zur weiteren Differenzierung und Risikoabschätzung des Tumors kann eine immunhistochemische Untersuchung herangezogen werden. Hierfür eignet sich p53, wenn o.g. Kriterien beachtet werden. Des Weiteren sollte eine Nachsorge der betroffenen Patienten erfolgen, da sich- sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vorangegangenen Untersuchungen von Cheng, Asano und Núñez Mora- eine Entartungstendenz der invertierten Papillome zeigte. Des Weiteren kam es gehäuft zu Rezidiven, in vorliegender Arbeit in 6,1% der Fälle. Die Nachsorge sollte eine regelmäßige Urethrozystoskopie beinhalten. Wir empfehlen einen Beobachtungszeitraum über etwa zwei Jahre.

Literaturverzeichnis

Allman D. M., Ferguson S. E., Cancro M. P.: Peripheral B cell maturation. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. J Immunol. 149(8):2533-2540 (1992)

Altieri D. C.: Validating Survivin as a cancer therapeutic target. Nat Rev Cancer 3:46-54 (2003)

Ambrosini G., Adida C., Altieri D. C.: A novel anti- apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma. Nat. Med. 3(8):917-21 (1997)

Angst B. D., Marcozzi C., Magee A. I.: The cadherin superfamily: diversity in form and function; Journal of cell science. J Cell Sci. 114(Pt 4):629-41 (2001)

Asano K., Miki J., Maeda S., Naruoka T., Takahashi H., Oishi Y.: Clinical studies on inverted papilloma of the urinary tract: report of 48 cases and review of the literature. J Urol 170 (4 Pt 1):1209-12 (2003)

Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Böhle A., Palou J., Rouprêt M.: Guidelines on non- muscle invasive bladder cancer (Ta1 and CIS). European Association of Urology, 2011 EAU Guidelines on Non- Muscle- Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, 2011 Update. Actas Urol Esp, 36 (1):2-14 (2012)

Böcker W., Kleihues P., Höfler H.K., Lax S., Poremba C., Moll R.: Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker W., Denk H., Heitz P. U.: Pathologie. 3. Aufl., 169- 214, Elsevier München (2004)

Boenisch, T.: Immunhistochemische Färbemethoden, 3. Aufl., DakoCytomation (2003)

Broussard J. N., Tan P. H., Epstein J. I.: Atypia in inverted urothelial papillomas: pathology and prognostic significance. Hum Pathol, 35:1499–1504 (2004)

Cheng C. W., Chan L. W., Chan C. K., Ng C. F., Cheung H. Y., Chan S. Y., Wong W. S., To K. F.: Is Surveillance necessary for Inverted Papilloma in the Urinary Bladder and Urethra? ANZ J Surg 75(4):213-7 (2005)

Derouiche A., El Attat R., Kourda N., Ben Slama M. R., Ben Jilali S., Ayed M.: Inverted Papilloma of the Bladder: Diagnosis and Course. Prog Urol. 16(2):160-2 (2006)

Doehn C., Behm A., Sommerauer M., Walden O., Peter M., Jocham D.: Das invertierte Papillom des Harntraktes: Symptomatik, Therapie und Nachsorge, 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Hamburg (2006)

Doehn C., Walden O., Peter M., Jocham D.: Symptomatik und Therapie des invertierten Papilloms des Harntraktes, 12. Tagung der Berliner Urologischen Gesellschaft e.V. und 48. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Urologen e.V. (2006)

Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D. M.: GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0., Lyon: IARC Press (2004)

Ho H., Chen Y. D., Tan P. H., Wang M. Lau W. K. O., Cheng C.: Inverted Papilloma of Urinary Bladder: Is Long- Term Cystoscopic Surveillance needed? A single Center's Experience Urology. Volume 68, Issue 2, 333-336 (2006)

Hough M. R., Rosten P. M., Sexton T. L., Kay R., Humphries R. K.: Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. Genomics 22 (1): 154–61 (1994)

Herbst H., Hübner J. H.: http://www.pathologie-online.de (Tag des Zugriffs: 17.09.2011)

Jackson D., Waibel R., Weber E., Bell J., Stahel R. A.: CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. Cancer Research 52(19): 5264-5270 (1992)

Jones S. E., Jomary C.: Clusterin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34 (5): 427–431 (2002)

Lane D. P.: Cancer. P53, guardian of the genome. Nature 358(6381):15-6 (1992)

Lane D. P., Crawford L. V.: T- antigen is bound to a host protein in SV40- transformed cells. Nature 278, 261-263 (1979)

Liggett W. H., Sidransky D.: Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. J Clin Oncol (3) 16, 1197–206 (1998)

Linzer D. I., Levine A. J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV40- transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17, 43-52 (1979)

Liu Y., Sanoff H. K., Cho H., Burd C. E., Torrice C., Ibrahim J. G., Thomas N. E., Sharpless N. E.: Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. Aging Cell 8 (4): 439–48. (2009)

Lott S., Wang M., Zhang S., MacLennan G. T., Lopez-Beltran A., Montironi R., Sung M. T., Tan P. H., Cheng L.: FGFR3 and TP53 mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations. Mod Pathol. 22(5):627-32 (2009)

Nedelec J., Pierres M., Moreau H., Barbet J., Naquet P., Faivre- Sarrailh C., Rougon G.: Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. Eur. J. Biochem, 203,433-442 (1992)

Nobori T., Miura K., Wu D. J., Lois A., Takabayashi K., Carson D. A.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368 (6473): 753–6 (1994)

Nollet F., Kools P., van Roy F.: Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J. Mol. Biol. 299 (3): 551–72 (2000)

Núñez Mora C., Ríos González E., García Mediero J. M., Alvarez Ferriera J., Martínez-Piñeiro Lorenzo L., Cisneros Ledó J., Picazo García M. L., de La Peña Barthel J.: Prognostic value of inverted papilloma of the lower urinary tract. Arch Esp Urol, 54(1):35-42 (2001)

Paschkis R.: Über Adenoma der Harnblase. Z Urol Chir: 21:315-25 (1927)

Potts I. F., Hirst E.: Inverted Papilloma of the Bladder. J Urol 90: 175 (1963)

Raghavan D., Huben R.: Management of bladder cancer. Curr Probl Cancer 19: 1-64 (1995)

Rahmanzadeh R., Hüttmann G., Gerdes J., Scholzen T.: Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. Cell Prolif. 40 (3): 422–30 (2007)

Riede U. N., Schaefer H. E.: Neoplastische Läsionen. In: Riede U. N., Werner M., Schaefer H.E.: Allgemeine und spezielle Pathologie. 5. Aufl., 854- 857, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)

Scholzen T., Gerdes J.: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell. Physiol. 182 (3): 311–22 (2000)

Schrijvers E. M., Koudstaal, P. J., Hofman A., Breteler M. M. B.: Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. JAMA 305 (13): 1322–1326 (2011)

Siegenthaler W., Blum H. E.: Klinische Pathologie. 9. Aufl., 1108- 1109, Thieme, Stuttgart (2006)

Sung M.- T., MacLennan G. T., Lopez- Beltran A., Montironi R., Cheng L.: Natural History of Urothelial Inverted Papilloma. Cancer 1;107(11):2622-7 (2006)

Tsujimura A., Oka T., Miki T., Gotoh T. Tsukikawa M., Sugao H., Takaha M., Takeda M., Kurata A.: Clinical Studies of inverted papilloma of the bladder. Hinyokika Kiyo, 42(6):423-6 (1996)

Vom Dorp F., Eisenhardt A., Goebell P. J., Gschwend J., Jäger T., Jaske G., Jocham D., Karl A., Krege S., Lümmen G.., Otto T., Rettenmeier A., Rödel C., Rübben H., Schenck M., Schmid K. W., Stief C., Stöckle M., Zaak D.: Harnblasenkarzinom. In: Rübben H.: Uroonkologie. 5. Aufl., 395- 459, Springer, Heidelberg, 2009

Witjes J. A., van Balken M. R., van de Kaa C. A.: The Prognostic Value of a Primary Inverted Papilloma of the Urinary Tract. J Urol 158:1500–1505 (1997)

Anhänge

Niedriges Risiko (einzelne Läsion TaG1 < 3 cm Durchmesser)	TUR	Instillation innerhalb 6 h (Epirubicin, Mitomycin C, Doxorubicin)
Mittleres Risiko (alle Tumoren, die nicht in die Kategorie niedriges oder hohes Risiko eingeordnet werden)	TUR Re-TUR, wenn komplette Resektion zweifelhaft (nach 4-6 Wochen, optional)	Adjuvante intravesikale Chemotherapie; Erhaltungstherapie bis maximal 1 Jahr *oder* Adjuvante intravesikale Immuntherapie (BCG; volle oder reduzierte Dosis), Erhaltungstherapie wenigstens 1 Jahr, maximal 3 Jahre
Hohes Risiko (T1G3, multifokal oder rezidivierend, Tis)	TUR Re-TUR nach 4-6 Wochen (empfohlen)	Adjuvante intravesikale Immuntherapie (BCG), Erhaltungstherapie wenigstens 1 Jahr, maximal 3 Jahre *oder* Radikale Zystektomie (primär, optional) oder nach Versagen der BCG-Therapie

Tabelle 13: Risikoadaptierte Primärtherapie nach den Leitlinien der EAU

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

Campus Lübeck
Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. D. Jocham

Tel: 0451 / 500-2271 Fax 500-3338 (Klinikdirektion)
0451 / 500-6113 Fax 500-4666 (Sekr. Oberärzte)
0451 / 500-2102 Fax 500-6066 (Poliklinik)
0451 / 500-2042 Fax 500-6223 (Station 17)
0451 / 500-2484 Fax 500-6066 (Lithotripsie)
Internet: www.urologie.uni-luebeck.de

Datum: 03.05.2007

Sehr geehrte Frau/Herr,

bei Ihnen wurde in der Vergangenheit die Diagnose eines invertierten Papilloms des Harntrakts gestellt. Wir interessieren uns für die Langzeitergebnisse bei Patienten mit dieser Diagnose, auch unter Berücksichtigung bestimmter molekularer Marker.
Zu diesem Zweck verschicken wir an alle Patienten, die im Zeitraum 1993 bis 2006 unter der Diagnose invertiertes Papillom behandelt wurden, den beiliegenden Fragebogen, die Einwilligungserklärung und die Patienteninformation.
An den Gewebeproben, die bei der Operation entnommen wurden und in der Pathologie archiviert sind, sollen verschiedene Marker bestimmt werden, um neue Erkenntnisse und möglicherweise verbesserte Diagnosemöglichkeiten bei zukünftigen Patienten zu gewinnen.
Diese Untersuchungen unterliegen hinsichtlich der Archivierung und späteren Vernichtung den üblichen pathologischen Richtlinien.
Hiermit bitten wir Sie um Ihr Einverständniss zur wissenschaftlichen Verwendung Ihrer Gewebeproben. Das verwendete Material ist zur weiteren Diagnostik Ihrer Erkrankung nicht erforderlich. Für Sie entstehen somit sowohl in der Erkennung als auch in der Behandlung keine Nachteile.
Wir würden Sie freundlich bitten, die beiliegenden Unterlagen sorgfältig zu lesen und ausgefüllt an uns zurückzusenden. Anbei finden Sie einen frankierten und adressierten Rückumschlag. Wir bedanken uns im Vorwege.

Mit freundlichem Gruß

Einwilligungserklärung

Das Invertierte Papillom des Harntraktes

Ich hatte Gelegenheit alle meine Fragen zu stellen. Diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet.

Name: _____

Vorname: _____

Geb-Datum: _____

Ich wurde durch _____ über die Studie informiert.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich -mündlich und schriftlich- über das Ziel und den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken, meine Rechte und Pflichten und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen.

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert. Mit der Erhebung, Verarbeitung und Speicherung meiner Daten, sowie der Übermittlung im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

_____	_____
Ort und Datum	Unterschrift Studienteilnehmer
_____	_____
Ort und Datum	Unterschrift Arzt

Patienten-Fragebogen

„invertiertes Papillom“

Name: Vorname:

Geb.-Datum:

1. Haben Sie Blut im Urin bemerkt?
   - □ nein
   - □ ja

2. Bestehen bei Ihnen andere Probleme beim Wasserlassen?
   - □ nein
   - □ ja, und zwar folgende:_____
     _____
     _____

3. Ist bei Ihnen erneut die Diagnose eines invertierten Papilloms der Harnblase gestellt worden?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Datum der
   Diagnose:_____

4. Ist bei Ihnen die Diagnose eines Blasentumors (Urothelkarzinom) gestellt worden?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Datum der Diagnose:_____
   Stadium des Blasentumors:_____
   Therapie des Blasentumors:_____

5.Befinden Sie sich in urologischer Behandlung?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Name des Urologen:_____

   Grund der urologischen Behandlung:_____

6. Wann ist bei Ihnen die letzte Blasenspiegelung durchgeführt worden?
   Datum:_____
   Ergebnis:_____
   - □ keine Blasenspiegelung durchgeführt

7. Sind Sie Raucher?

- ☐ ja
- ☐ nein

_____	_____
Ort und Datum	Unterschrift

Patienten-Fragebogen

„invertiertes Papillom“

Name: Vorname:

Geb.-Datum:

1. Haben Sie Blut im Urin bemerkt?
   - □ nein
   - □ ja

2. Bestehen bei Ihnen andere Probleme beim Wasserlassen?
   - □ nein
   - □ ja, und zwar folgende:_____
     _____
     _____

3. Ist bei Ihnen erneut die Diagnose eines invertierten Papilloms der Harnblase gestellt worden?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Datum der
   Diagnose:_____

4. Ist bei Ihnen die Diagnose eines Blasentumors (Urothelkarzinom) gestellt worden?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Datum der Diagnose:_____
   Stadium des Blasentumors:_____
   Therapie des Blasentumors:_____

5.Befinden Sie sich in urologischer Behandlung?
   - □ nein
   - □ ja

   wenn ja: Name des Urologen:_____

   Grund der urologischen Behandlung:_____

6. Wann ist bei Ihnen die letzte Blasenspiegelung durchgeführt worden?
   Datum:_____
   Ergebnis:_____
   - □ keine Blasenspiegelung durchgeführt

7. Sind Sie Raucher?

- ☐ ja
- ☐ nein

_____	_____
Ort und Datum	Unterschrift

Histologische Bilder:

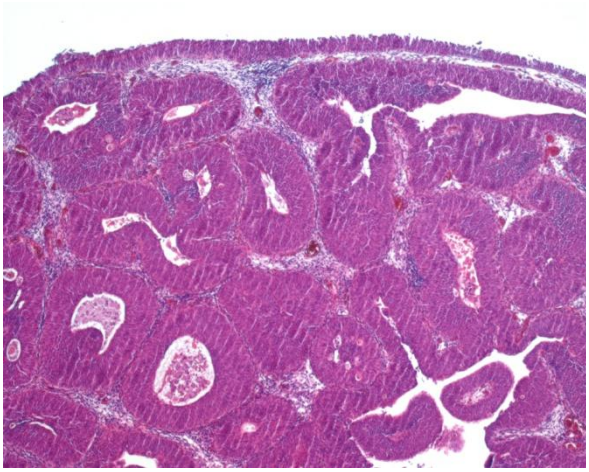

Abbildung 1: Invertiertes Papillom, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung

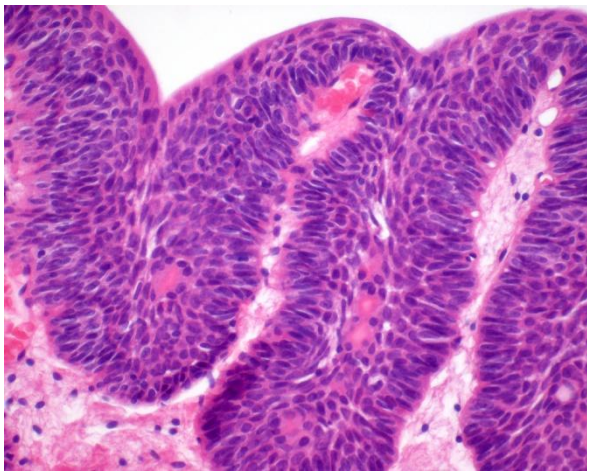

Abbildung 2: Invertiertes Papillom, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung

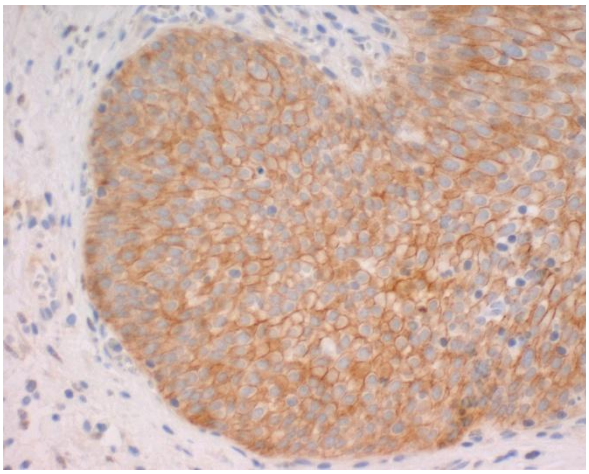

Abbildung 3: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit HER-2, schwache Anfärbung

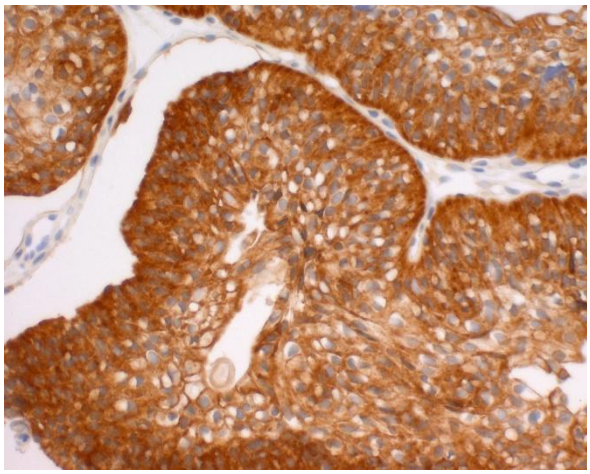

Abbildung 4: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit HER-2, starke Anfärbung

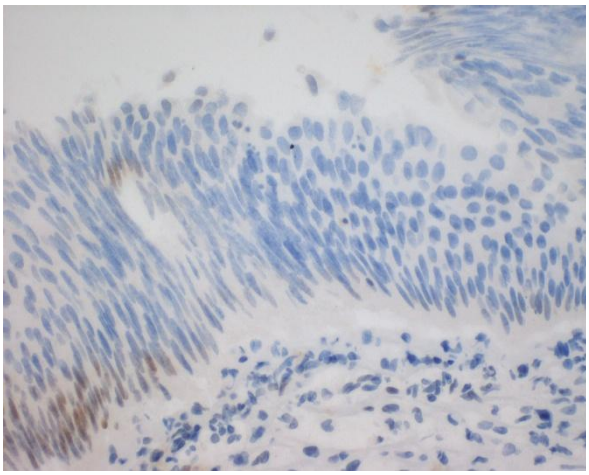

Abbildung 5: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit p53, schwache Anfärbung

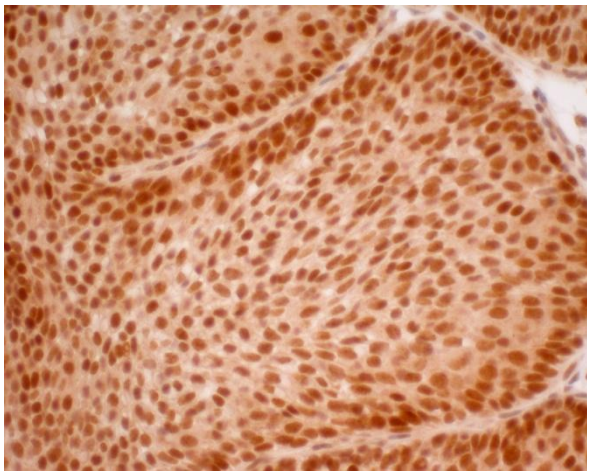

Abbildung 6: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit p53, starke Anfärbung

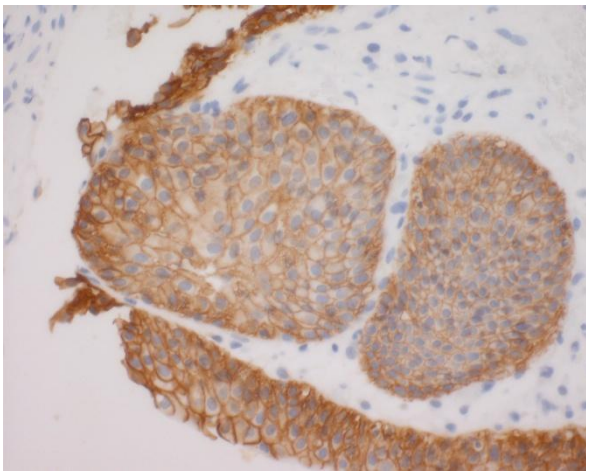

Abbildung 7: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit E-Cadherin, schwache Anfärbung

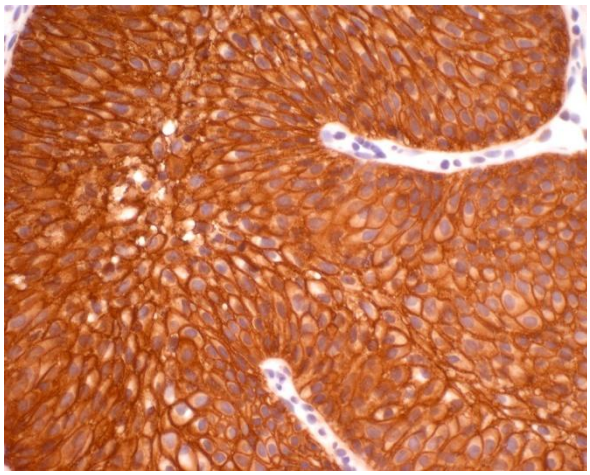

Abbildung 8: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit E-Cadherin, starke Anfärbung

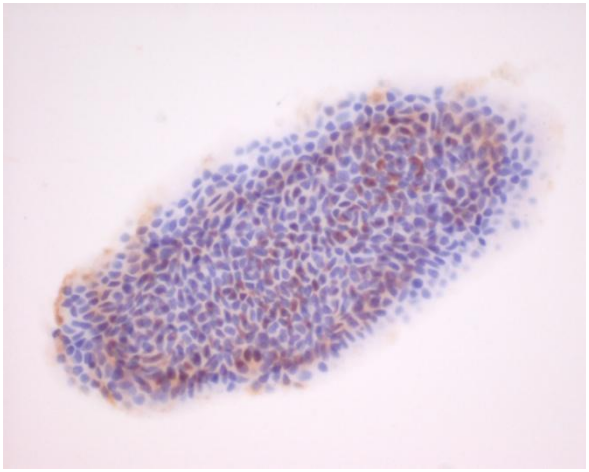

Abbildung 9: Beispielpräparat nach immunhistochemischer Behandlung mit Survivin, schwache Anfärbung

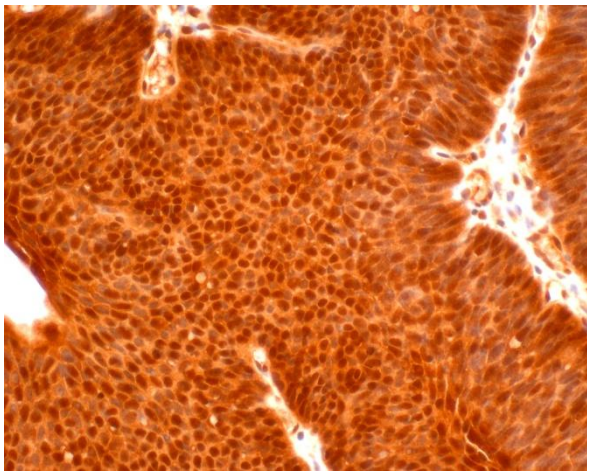

Abbildung 10: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit Survivin, starke Anfärbung

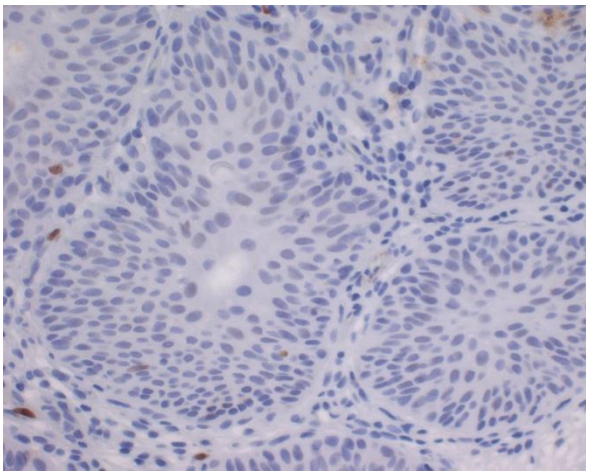

Abbildung 11: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit MiB, schwache Anfärbung

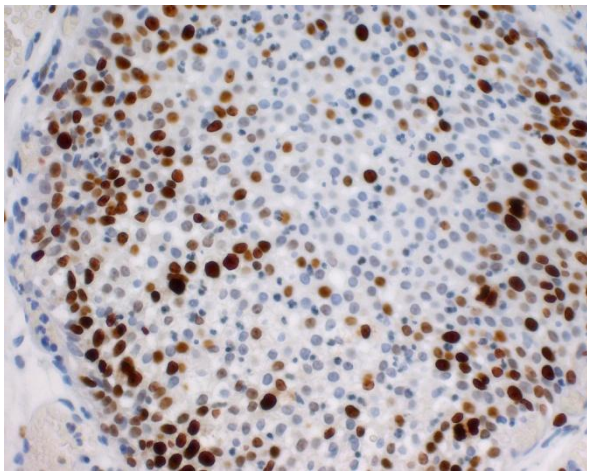

Abbildung 12: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit MiB, starke Anfärbung

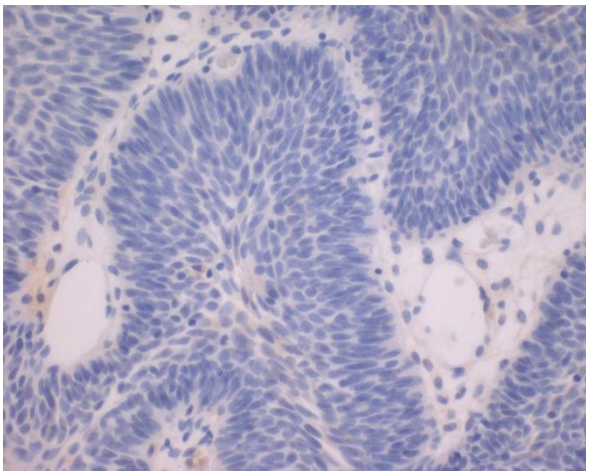

Abbildung 13: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit Clusterin, schwache Anfärbung

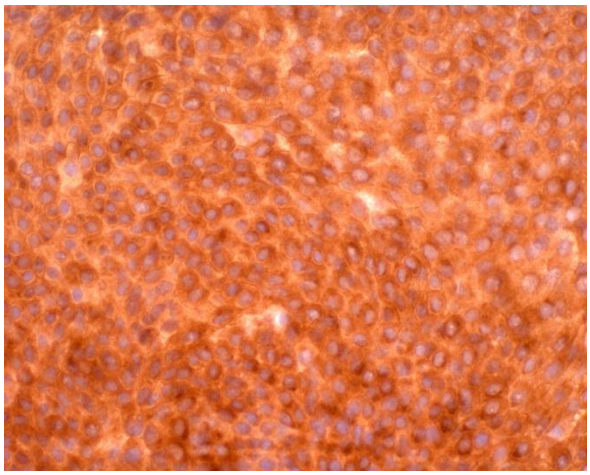

Abbildung 14: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit Clusterin, starke Anfärbung

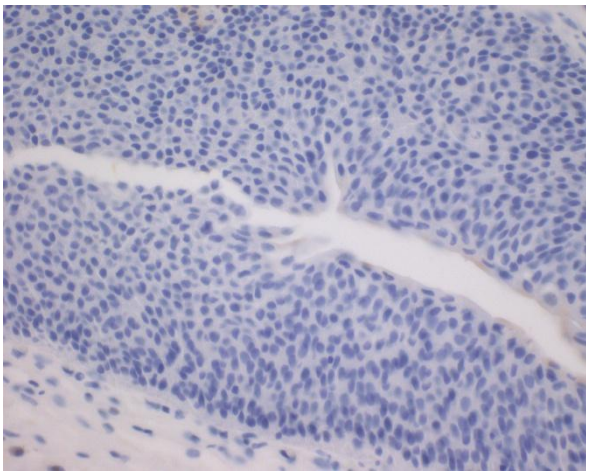

Abbildung 15: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit p16, schwache Anfärbung

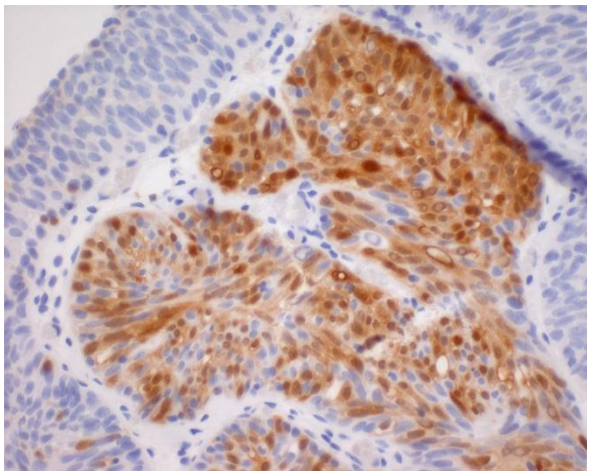

Abbildung 16: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit p16, starke Anfärbung

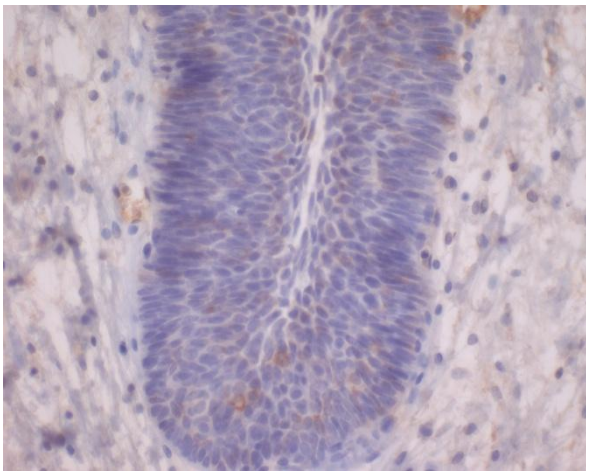

Abbildung 17: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit CD 24, schwache Anfärbung

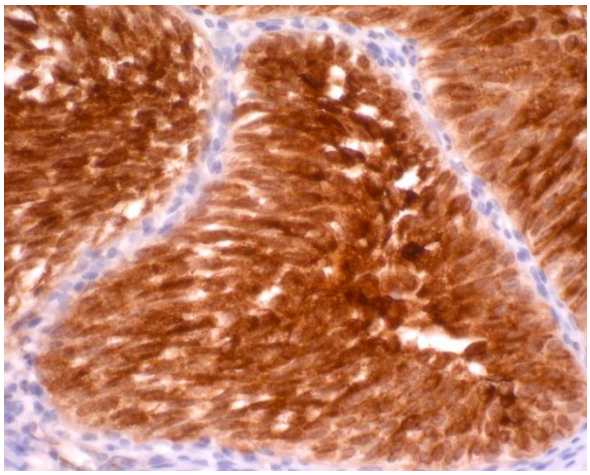

Abbildung 18: Invertiertes Papillom, immunhistochemische Behandlung mit CD 24, starke Anfärbung

Danksagungen

Ich bedanke mich bei all denjenigen, die mich im Laufe der Jahre bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dieter Jocham für das Angebot, meine Arbeit an der Klinik für Urologie der Universität zu Lübeck fertigzustellen sowie für die Ermöglichung eines Arbeitsplatzes. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Doehn danke ich für die Bereitstellung des Themas und für all die konstruktiven Ratschläge, Diskussionen und Korrekturen. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. Martin Sommerauer für die langjährige Betreuung, für seine Ermunterungen, hilfreichen Vorschläge und tatkräftige Unterstützung. Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der Klinik für Urologie, insbesondere im Archiv der Patientenakten und den stets freundlichen Damen im Sekretariat.

Herrn Dr. med. Florian Stellmacher aus dem Institut für Pathologie danke ich für die Betreuung und Einarbeitung in die Befundung histopathologischer Präparate sowie für sämtliche Hilfestellung und Kritik. Ebenso hilfreich war die Unterstützung durch die Mitarbeiter im Institut für Pathologie. Hier möchte ich im Besonderen die MTAs im Labor nennen, die mir in mühsamer Arbeit das korrekte Schneiden, die Behandlung und Anfärbung der Präparate beibrachten.

Meinen Eltern danke ich für die umfangreiche Unterstützung jeglicher Art in den Jahren meines Studiums. Nur so konnte ich es erfolgreich und ohne größere Hindernisse absolvieren. Insbesondere meine Geschwister waren mir ein große Hilfe auf der langen Strecke der Textverarbeitung und äußeren Form. Dank der wiederholten und harten, aber herzlichen Aufforderungen und Ermutigungen meiner Familie und Freunde kann ich meine Dissertation nun abschließen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Amelie Sophie Catharine Barth
Geburtstag	12.04.1984
Geburtsort	Hannover, Deutschland

Ausbildung

Schule	1990-1993: Grundschule Sarstedt, Sarstedt, Deutschland
	1993: Grundschule Greifswalder Straße, Hildesheim, Deutschland
	1993- 2002: European School of Mol, Mol, Belgien
	2002: Europäisches Baccalaureat
Studium	2002-2005 Vorklinik, UKSH, Campus Lübeck
	2005-2008 Klinik, UKSH, Campus Lübeck
Praktisches Jahr	2008-2009:
	1. Tertial (1. Hälfte): Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, Sana-Klinik Lübeck
	1. Tertial (2. Hälfte): Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, North York General Hospital, Toronto, Kanada
	2. Tertial: Medizinische Klinik des Forschungszentrums Borstel, Borstel

	3. Tertial: Klinik für Urologie, UKSH, Campus Lübeck
Promotion	2006-2009, UKSH, Campus Lübeck
Assistenzärztin	09/2009-dato: Klinikum Traunstein, Bayern