

## DNA-Bild-Zytometrie zur Qualitätskontrolle der Zytologie

H. Prömer<sup>a</sup>  
G. W. Hacker<sup>b</sup>  
O. Dietze<sup>b</sup>  
O. Heiß<sup>a</sup>  
A. Staudach<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Landesfrauenklinik Salzburg

<sup>b</sup> Pathologisches Institut Salzburg

Die unumstrittene Screeningmethode für das Cervix-Carcinom stellt die von Papanicolaou vor 50 Jahren eingeführte Portio/Endocervix-Abstrichzytologie dar.

Die DNA-Bild-Zytometrie stellt eine Zellmeßmethode dar, welche die DNA-Menge im Zellkern mißt und im DNA-Histogramm eine Aussage liefert über die in der Meßprobe enthaltenen Zellkerntypen bzw. Teilpopulationen. Aufgabe der Histogrammauswertung ist die Detektion von atypischen Zellen über die Form des Histogramms und die Beschreibung durch entsprechend weitgehend objektive Parameter.

In zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten der letzten Jahre wurde über den diagnostischen und vor allem prognostischen Wert der DNA-Ploidie-Messung an Operationspräparaten von Konisationen und Hysterektomien mit originärem und dysplastischem Epithel [1] und bei Cervixkarzinomen [2-7] berichtet, ebenso wurden DNA-Messungen an Ascitesflüssigkeit [8] und zytologischen Ausstrichen [9] durchgeführt, wobei sich auch in den Carcinomvorstufen entsprechende Veränderungen bei den Histogrammen zeigten.

Die Frage der vorliegenden Studie war es, inwieweit die DNA-Zytometrie am gynäkologischen Abstrich als objektive Qualitätskontrolle der Routine-Zytologie gewertet werden kann.

### Material und Methode

Wir haben bei 151 Frauen im Rahmen des Routineabstriches von Portio und Endocervix jeweils 2 Abstriche auf SILAN-beschichtete Glas-Objektträger durchgeführt und mit dem Ahrens-Zytometrie-System ACAS untersucht. Großteils handelte es sich dabei um Frauen mit „positiven“ oder verdächtigen zytologischen Vorbefunden, der Rest waren unbekannte Vorbefunde. 16 Frauen waren zum Zeitpunkt der Abstrichentnahme gravide.

Die Abstriche wurden mindestens eine Stunde luftgetrocknet, bei 4° C über Nacht in 4% phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert, mit der Feulgen-Methode gefärbt und anschließend durch Bild-Zytometrie fotometrisch ausgewertet.

Wir haben unterschieden zwischen euploiden und aneuploiden Fällen nach Histogramm-Aspekt, weiters wurde die Typisierung nach Auer (die Typen charakterisieren in steigender Folge steigende Grade von Malignitätspotential) – Abb. 1 – vorgenommen sowie der

DNA-Index (Beschreibung des Ploidiestatus – 1,00 = Eichzelle), die 5c-Exceeding-Rate (Prozentsatz der Zellen, deren DNA-Gehalt oberhalb der 5c-Schwelle liegt), % S-Phase (Maß für die Proliferations-Aktivität) und der 2c-Deviationsindex (Maß für die Abweichung der Meßwerte vom diploiden (2c) Wert) bestimmt.

Die meisten Frauen (70%) wurden durch anschließende Konisation histologisch abgeklärt, der Rest mehrfach zytologisch kontrolliert.

### Ergebnisse

Die Auswertung ergab in 53 Fällen (35%) euploide und in 65% aneuploide Histogramme, 9% wurden dem AUER-Typ I, 26% Typ II, 29% Typ III und 36% Typ IV zugeordnet. Von den histologisch abgeklärten 107 Fällen waren 36% als low grade SIL-entsprechend (minimale Zellveränderungen, Koilocytose und CIN I) und 64% als high grade SIL – entsprechend (CIN II bis Carcinoma in situ) befundet.

In der hg SIL Gruppe waren 94% der Histogramme aneuploid (AUER IV und AUER III), in der lg SIL Gruppe waren jedoch

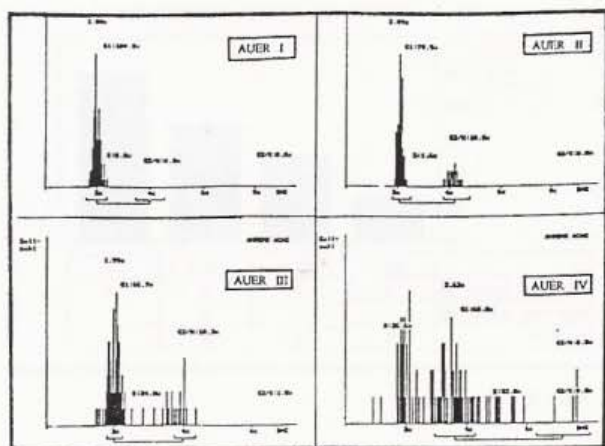


Abb. 1. Auer-Typisierung

## Literatur

- 1 Girardi F, Pickel H, Haas J: Cytophotometry of Healthy and Abnormal Squamous Epithelium of Uterine Cervix. *The Cervix and the lower female genital tract* 1992; 10: 157-162.
- 2 Zanetta GM, Katzmann JA, Keeney GL, Kinney WK, Cha SS, Podratz KC: Flow-cytometric DNA analysis of stages IB and II A cervical carcinoma. *Gynecolog. Oncol. (United States)* 1992; 46 (1): 13-19.
- 3 Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C, Fischer-Becker D, Kalkreuth G: DNA-cytometr. diagnos. of prospective malignancy in borderline lesions of the uterine cervix *Recent Results Cancer Res (Germany)* 1991; 122: 106-115.
- 4 Miller B, Dockter M, el Torkey M, Photopoulos G: Small cell carcinoma of the cervix: a clinical and flow-cytometric study. *Gynecol Oncol (United States)* 1991; 42 (1): 27-33.
- 5 Nguyen HN, Sevin BU, Averette HE, Ramos R; Ganjei P, Perras J: Evidence of tumor heterogeneity in cervical cancers and lymph node metastases as determined by flow cytometry. *Cancer (United States)* 1993; 71 (8): 2543-2550.
- 6 Sorensen FB, Bichel P, Jakobsen A: DNA level and stereological estimates of nuclear volume in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. A comparative study with analysis of prognostic impact. *Cancer (United States)* 1992; 69 (1): 187-199.
- 7 Willen R, Himmelmann A, Langstrom-Einarsson E, Ferno M, Ranstam J, Baldetorp B, Skjaeris J, Prien-Larsen J, Trope C, Stendahl U: Prospective malignancy grading, flow cytometry DNA measurements and adjuvant chemotherapy for invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anticancer Res (Greece)* 1993; 13 (4): 1187-1196.
- 8 Crosby JH, Allsbrook WC jr, Pantacis CG, Otken LB Jr, Gallup DG, Talledo OE: Cytology and DNA flow cytometry of peritoneal washings in gynecologic patients. *Mod Pathol (United States)* 1992; 5 (2): 153-157.
- 9 Mulhaupt H, Bruder E, Elit L, Rothblat I, Warhol M: Combined analysis of cervical smears. *Cytopathology, image cytometry and in situ hybridiz. Acta Cytol (United States)* 1993; 37 (3): 373-378.
- 10 Bollmann R: Die Diagnose prospektiver Malignität an zervikalen Dysplasien durch DNA-Zytometrie. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 1990; 50: 113-117.
- 11 Bibbo M, Alenghat E, Bahr GF, Bartels PH, Dytch HE, Herbst AL, Keebler CM, Pishotta FT, Wied GL: A quality-control procedure on cervical lesions for the comparison of cytology and histology. *J reprod. med* 1983; 28: 811-822.

auch ca. 40% aneuploid bzw. euploid mit hoher Proliferationsrate (ebenfalls AUER III) – Abb. 2.

Die Fallanalyse dieser „falsch positiven“ Fälle ergab bei 2 Frauen jeweils einen großen Cervicalpolyp, histologisch ohne Hinweis auf Malignität. 14 histologische Ergebnisse lauteten CIN I, 8 Frauen wurden meist auf Grund der Jugend bisher lediglich zytologisch und DNA kontrolliert, wobei sich sowohl negative Kontrollergebnisse in der Zytologie, als auch geringgradige Veränderungen der Histogramme (durchwegs prozentuelle Abnahme der S-Phase) zeigten.

Die Auswertung des DNA-Index zeigt, daß 38 der 151 Fälle einen DNA-Index >1,3 ergaben, davon 36 >1,5 und 13 >2,0.

Alle über 1,3 gelegenen, histologisch abgeklärten zeigten auffällige Histologien, 5mal ein CIN I (lg SIL), eine davon mit DNA-Index 2,0 war schwanger, die restlichen verteilten sich auf CIN II bis invasives Carcinom.

Insgesamt gesehen lag der Durchschnittswert bei negativer Histologie, sowie CIN I und II um den Wert 1,00 oder knapp darüber, was dem Ploidiestatus der Zellpopulation von 2c entspricht. Der DNA-Index bei CIN III lag über 1,3 mit einer Streubreite bis über 3,0, bei allen Carcinomen war der Wert über mindestens 1,55 %.

Umgekehrt waren jedoch auch 25% der CIN II und 26% der CIN III-Fälle DNA-Index normal (<1,3) – Abb. 3. Dieser Umstand läßt annehmen, daß histologisch „gleich befundene“ Veränderungen sehr wohl unterschiedlich maligne oder prä-maligne Potenz in ihrem DNA Muster zeigen, worin der prognostische Wert dieser Zusatzbestimmung liegt.

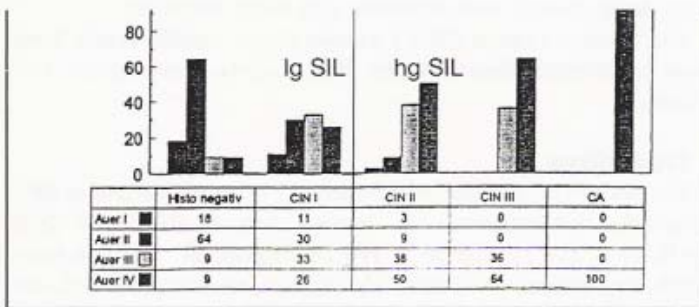


Abb. 2. Auer - Typ Klassen - - - Histologie

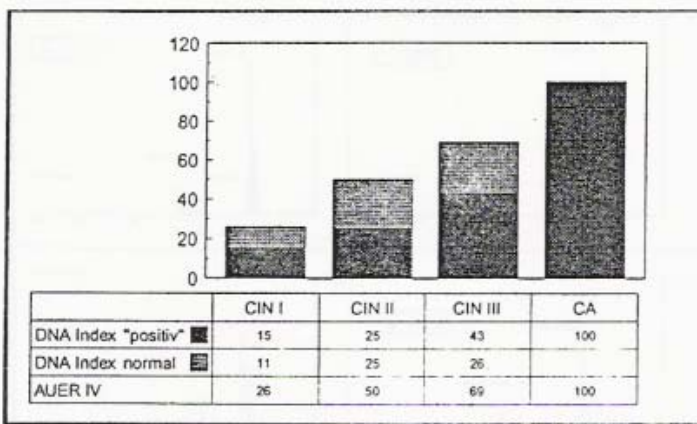


Abb. 3. DNA-Index

Abb. 4 : 2 c Deviation Index - - - Histologie

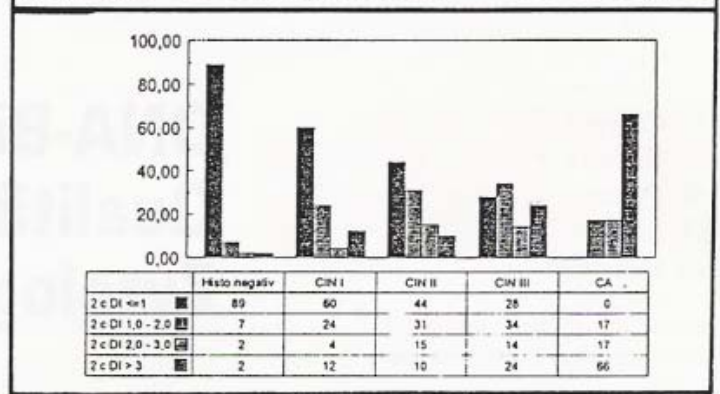


Abb. 4. 2 c Deviation Index - - - Histologie

Der 2c-Deviation-Index stellt eine Kombination von Proliferation und Aneuploidie dar und beschreibt bis zum numerischen Wert kleiner als 1 die Normalzellpopulation. Im Bereich zwischen 1,0 und 3,0 sind alle Grade der cervicalen intraepithelialen Dysplasie und vereinzelt Carcinome zu finden – Abb. 4 –, ein Wert über 3,0 ist hauptsächlich bei Carcinoma in situ und Carcinoma zu sehen.

Ploidie, Auer-Typ sowie 2c-Deviation-Index bieten somit als Screeningkriterien einzeln nur eine bedingt brauchbare Aussage, zusammen ausgewertet jedoch eine hohe Sensitivität bei allerdings niedriger Spezifität.

Von den 16 schwangeren Frauen wurden 8 während bzw. unmittelbar nach beendeter Gravidität histologisch abgeklärt, in allen Fällen bestand eine CIN II bzw. III und alle waren aneuploid, 7 AUER-Typ IV, 1 AUER-Typ III. Die übrigen 8 waren euploid bei auch negativer Routine-Zytologie.

### Zusammenfassung

An Hand der vorliegenden Ergebnisse von 151 gemessenen DNA-Zytometrie – zytologischen Abstrichen ergeben sich retrospektiv als Grenzbereiche für Abklärungspflicht für den DNA-Index der Wert 1,3, bzw. für den 2c-Deviation-Index der Wert >1,0. Es zeigt damit die DNA-Ploidie keinen falsch negativen Befund bei jedoch mangelhafter Spezifität im Gegensatz zur Aussage von R. Bollman [10], der von hoher Spezifität bei mangelhafter Sensitivität spricht.

Für die Zahl der „falsch positiven“ Fälle kommen teilweise Entzündung und Polypen aus dem Cervicalbereich ohne Dysplasie kausal in Betracht.

Eine Indikation für diese Zusatz-Zytologie ist der rezidivierend „gering suspekter“ Abstrich mit Kernunruhe, persistierender Koilozytose etc., der per se noch keine Abklärungsindikation darstellt, bei zusätzlich positiver DNA-Messung allerdings schon.

Die pathologischen DNA-Befunde bei „low grade“ positiver Histologie geben möglicherweise einen wichtigen prognostischen Hinweis und damit eine Entscheidungshilfe für weiterführende Eingriffe, wie z. B. Nachkonisation oder ggf. Hysterektomie.

Insgesamt steht mit der DNA-Ploidie-Bestimmung eine objektiverbare Methode der Qualitätskontrolle für die Routine-Zytologie zur Verfügung, die zugleich von prognostischer Relevanz sein kann (Langzeitergebnisse fehlen) und die auch im Screening eingesetzt werden kann [11].