

**Validierung und kritische Evaluation der  
Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in  
Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms –  
Ein Vergleich differenzieller Auswertekonzepte**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Guttenberg, Lutz Philipp**

**2016**

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Schwentner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Kopp

Für Teresa



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Harnblasenkarzinom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren .....	3
1.1.3	Klinik .....	5
1.1.4	Diagnostik .....	6
1.1.5	Staging.....	9
1.1.6	Klassifikationssysteme .....	9
1.1.7	Risikostratifizierung zur Therapieplanung nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (Ta, T1).....	13
1.1.8	Therapie nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (Ta, T1) .	16
1.1.9	Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (T2-T4a).....	19
1.1.10	Therapie metastasierter Blasenkarzinome.....	23
1.1.11	Nachsorge und Prognose des Harnblasenkarzinoms .....	23
1.2	<b>Nicht-invasive Urindiagnostik .....</b>	<b>26</b>
1.2.1	Urinzytologie .....	27
1.2.2	Molekulare Tumormarker als Ergänzung zur Urinzytologie .....	28
1.2.3	Lösliche Urinmarkertests .....	29
1.2.4	Zellgebundene Urinmarkertests .....	32
1.3	<b>Multitarget-Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung .....</b>	<b>33</b>
1.4	<b>Fragestellung .....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.1	<b>Patientenkollektiv .....</b>	<b>38</b>
2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	39
2.2	<b>Umgang mit Patientendaten und Datenschutz.....</b>	<b>41</b>
2.3	<b>Ethikvotum .....</b>	<b>42</b>
2.4	<b>Untersuchungsabfolge.....</b>	<b>42</b>

---

2.4.1	Gewinnung der Urinproben .....	42
2.4.2	Fixierung der Urinproben .....	43
2.4.3	Testdurchführung.....	43
<b>2.5</b>	<b>Beurteilung der parallelen Zystoskopie und Histologie .....</b>	<b>55</b>
<b>2.6</b>	<b>Dokumentation der Studiendaten.....</b>	<b>56</b>
<b>2.7</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Diagnostikkollektiv.....</b>	<b>60</b>
3.1.1	Beschreibung des Patientenkollektivs.....	60
3.1.2	Alters- und Geschlechtsverteilung .....	60
3.1.3	Lokalisation und Tumorstadium .....	60
3.1.4	Verteilung chromosomaler Veränderungen .....	62
3.1.5	Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung...	64
3.1.6	Ergebnisse der Urinzytologie .....	70
3.1.7	Übersicht aller Auswertungen im Diagnostikkollektiv .....	71
<b>3.2</b>	<b>Prognostikkollektiv .....</b>	<b>73</b>
3.2.1	Alters- und Geschlechtsverteilung .....	73
3.2.2	Lokalisation und Tumorstadium .....	73
3.2.3	Überlebenswahrscheinlichkeiten.....	76
3.2.4	Univariable Varianzanalysen.....	76
3.2.5	Verteilung chromosomaler Veränderungen .....	78
3.2.6	Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung...	80
3.2.7	Ergebnisse der Urinzytologie .....	93
3.2.8	Übersicht aller Auswertungen im Prognostikkollektiv .....	95
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1</b>	<b>Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms.....</b>	<b>96</b>
<b>4.2</b>	<b>Eigenschaften der Patientenkollektive.....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Analyse chromosomaler Veränderungen der Kollektive .....	100
<b>4.3</b>	<b>Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms.....</b>	<b>101</b>

---

<b>4.4 Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Prognostik des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms.....</b>	<b>106</b>
<b>4.5 Vergleich zu den Ergebnissen der Urinzytologie .....</b>	<b>113</b>
<b>4.6 Anforderungen an den zukünftigen Einsatz von Urinmarkertests .....</b>	<b>115</b>
<b>4.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>117</b>
4.7.1    Patientenkollektiv .....	117
4.7.2    Befunderhebung und Datenerfassung .....	118
4.7.3    Untersuchervariabilität .....	119
<b>4.8 Schlussfolgerung .....</b>	<b>120</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>145</b>
7.1 Erklärung zum Eigenanteil.....	145
7.2 Danksagung.....	147

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
AUC	= area under the curve
AUR	= Ausscheidungsurogramm
BCG	= Bacillus Calmette-Guérin
BLCA-1	= bladder cancer specific nuclear matrix protein 1
BLCA-4	= bladder cancer specific nuclear matrix protein 4
BMI	= body mass index
BTA	= bladder tumour antigen
bzw.	= beziehungsweise
©	= Copyright
CEA	= carcinoembryonales Antigen
CEP	= Chromosome Enumeration Probe
CFHrp	= complement factor H related peptide
CI	= Konfidenzintervall
CIS	= Carcinoma in situ
cm	= Zentimeter
CT	= Computertomographie
DAPI	= 4',6-diamino-2-phenylindol
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
Dr.	= Doktor (akademischer Grad)
EAU	= European Association of Urology
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	= englisch für
e.V.	= eingetragener Verein
EORTC	= European Organization for Research and Treatment of Cancer
et al.	= et alii (lateinisch für ‚und andere‘)
FDA	= US Food and Drug Administration (US-Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde)
FISH	= Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	= Erdbeschleunigung
g	= Gramm



---

GC	= Chemotherapie-Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin
GFR	= glomeruläre Filtrationsrate
GmbH	= Gesellschaft mit beschränkter Haftung (Unternehmensform)
GSTM1	= Glutathion S-Transferase M1
HAL	= Hexaminolaevulinsäure
HA-HAase	= Urinmarkertest, der Hyaluronsäure und Hyaluronidase detektiert
HGPUC	= high grade papillary urothelial carcinoma
HR	= Hazard Ratio
Inc.	= Incorporated (Corporation, US-Unternehmensform)
ISUP	= International Society of Urological Pathology
JMP	= Statistikprogramm
KGaA	= Kommanditgesellschaft auf Aktien
Lex	= Lewis Antigen X
LGPUC	= low grade papillary urothelial carcinoma
LJ.	= Lebensjahre
LSI	= Lokus-spezifische Sonde
mG	= molecular grading
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
MRT	= Magnetresonanztomographie
M-VAC	= Kombinationstherapie aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin
NAT2	= N-Acetyltransferase 2
nm	= Nanometer
NMP22	= Nukleares Matrix Protein 22
NPV	= negative predictive value (englisch für 'negativer prädiktiver Wert')
PDD	= photodynamic diagnostic
pH-Wert	= lat.: potentia hydrogenii
POC	= Point-of-Care Test
PPV	= positive predictive value (englisch für 'positiv prädiktiver Wert')
Prof.	= Professor (akademischer Titel)
PUNLMP	= papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
p-Wert	= Überschreitungswahrscheinlichkeit

®	= registered trade mark
ROC	= receiver operating characteristic
Tab.	= Tabelle
™	= trade mark
TNM	= Einteilung der Tumorstadien
TUR-B	= transurethrale Resektion von Blasenanteilen
U/ml	= Units (Einheiten) pro Milliliter
UBC	= urinary bladder cancer
UICC	= Union Internationale Contre le Cancer
vs.	= versus / gegen
WHO	= World Health Organisation
WLC	= white light cystoscopy (englisch für ‚Weißlichtzystoskopie‘)
z.B.	= zum Beispiel
5-ALA	= 5-Aminolaevulinsäure
5-JÜR	= 5-Jahres-Überlebensrate
°C	= Grad Celsius
µl	= Mikroliter
µm	= Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Harnblasenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des harnableitenden Systems und mit einer gemittelten Inzidenz von 27 pro 100.000 Männern sogar der viert-häufigste Tumor des männlichen Geschlechts in Europa. Das Harnblasenkarzinom stellt die fünft-häufigste Tumordiagnose in Europa und die viert-häufigste in den USA dar (Sengupta et al. 2004). Weltweit beträgt die altersstandardisierte Inzidenz 9,0 für Männer und 2,2 pro 100.000 für Frauen. Sie ist in Industrieländern in etwa dreimal so hoch wie in Entwicklungsländern (Ferlay et al. 2013b). In Europa schwankt die altersstandardisierte Inzidenz in den einzelnen Ländern von maximal 47,6 bei Männern bzw. 9,4 pro 100.000 bei Frauen in Belgien bis minimal 14,8 bei Männern bzw. 4,5 pro 100.000 bei Frauen im Vereinigten Königreich (Ferlay et al. 2013a). Männer sind damit in etwa viermal so häufig betroffen wie Frauen. Der Altersgipfel des Harnblasenkarzinoms liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Sengupta et al. 2004).

Die weltweite altersstandardisierte Mortalität des Harnblasenkarzinoms liegt bei 3,2 für Männer und 0,9 pro 100.000 für Frauen und damit deutlich unter dem europäischen Durchschnitt von 8,5 für Männer und 1,8 pro 100.000 für Frauen. Am höchsten ist die altersstandardisierte Mortalität im innereuropäischen Vergleich in Lettland, Polen und Spanien. Deutschland selbst liegt mit Zahlen von 5,2 für Männer und 1,9 pro 100.000 für Frauen am unteren Ende dieser Skala (Ferlay et al. 2013a). Im Jahr 2012 war das Harnblasenkarzinom in Europa an neunter Stelle der durch maligne Tumoren verursachten Todesfälle (Ferlay et al. 2013b). Sowohl die altersstandardisierte Inzidenz als auch die Mortalität des Harnblasenkarzinoms blieben bei beiden Geschlechtern bis in die 1990er Jahre relativ stabil und sanken danach vor allem bei Männern mittleren

Alters im weltweiten Vergleich in Deutschland am deutlichsten ab (Chavan et al. 2014). Obwohl die Inzidenz und Mortalität im Augenblick bei Männern noch höher sind, steigen sie bei Frauen im Verhältnis merklich an. Als Grund kann der zunehmende Kontakt zu exogenen Risikofaktoren wie Zigarettenrauch und aromatischen Aminen bei Frauen angesehen werden. Seit den 1970er Jahren stagniert die Zahl der rauchenden Männer, während immer mehr Frauen zu rauchen begonnen haben und sich nun bei ihnen mit einer Latenz von etwa 30 Jahren Harnblasenkarzinome entwickeln (Ferlay et al. 2008; Burger et al. 2013a).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lassen sich etwa 75 % der Harnblasenkarzinome als nicht-muskelinvasiv (Ta-, T1- oder CIS-Stadium) einstufen. Die restlichen 25 % infiltrieren bereits den Musculus detrusor vesicae oder sind metastasiert. Nicht-muskelinvasive Karzinome weisen aufgrund ihrer langsamen Progression und ihrem erheblichen Langzeitüberleben eine besonders hohe Prävalenz auf, wohingegen Patienten mit muskelinvasiven Karzinomen ein signifikant höheres Risiko haben, an ihrer Krankheit zu versterben (Burger et al. 2013a).

Die mit der Diagnose eines Harnblasenkarzinoms verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem dürfen nicht vernachlässigt werden. Unter allen Tumorentitäten verursacht das Harnblasenkarzinom die höchsten Kosten pro Patient von der Diagnose bis zum Tod und ist damit das fünft teuerste Karzinom auf alle medizinischen Ausgaben gesehen (Botteman et al. 2003). Gerade die nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome machen aufgrund der hohen Rezidivraten und langen Nachbehandlungszeiträume den größten Kostenfaktor aus (Stenzl et al. 2008).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Der Hauptrisikofaktor in der Entstehung eines Harnblasenkarzinoms ist der Zigarettenkonsum. Dieser ist weltweit stark verbreitet. Etwa 20 % aller Erwachsenen in Europa und den USA rauchen oder haben schon einmal geraucht. Seit Beginn der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts sinkt jedoch die Zahl der männlichen Raucher, während viele Frauen erst in den 1970ern zu rauchen begonnen haben, sodass heutzutage in beiden Geschlechtern prozentual etwa gleich viele Raucher vorkommen (Burger et al. 2013a). Im Vergleich zu Personen, die niemals geraucht haben, ist das Risiko eines Harnblasenkarzinoms bei aktuellen Rauchern bis zu viermal und bei ehemaligen Rauchern bis zu zweimal höher (Bjerregaard et al. 2006b). Etwa die Hälfte der Harnblasenkarzinome sind mit dem Risikofaktor Rauchen assoziiert (Freedman et al. 2011). Entscheidend sind dabei die Dauer, Häufigkeit (in ‚pack years‘) und der Beginn des Zigarettenkonsums. Je früher und je länger Zigaretten konsumiert werden, desto höher ist das Lebenszeitrisiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken (Bjerregaard et al. 2006b). Dabei ist das Risiko aller Untergruppen des Harnblasenkarzinoms erhöht (Jiang et al. 2012). Frauen und starke Raucher (mehr als 40 Zigaretten/Tag für mehr als 40 Jahre) scheinen ein besonders hohes Risiko für aggressive muskelinvasive Harnblasenkarzinome aufzuweisen (Jiang et al. 2012). Wer jedoch nur fünf Jahre später mit dem Rauchen beginnt, reduziert sein Lebenszeitrisiko um 19 Prozent (Bjerregaard et al. 2006b). Aber auch Passivrauchen stellt eine potentielle Gefahr dar (Alberg et al. 2007). Gerade bei Frauen und Kindern, die passiv Zigarettenrauch ausgesetzt sind, erhöht sich das Risiko, da Heranwachsende den Karzinogenen gegenüber sensitiver reagieren (Bjerregaard et al. 2006b; Jiang et al. 2007). Selbst Gelegenheitsraucher zeigen im Vergleich zu Nichtrauchern ein deutlich erhöhtes Risiko, an Harnblasenkarzinomen zu erkranken (Bjerregaard et al. 2006a). Nicht nur die Erstmanifestation, sondern auch das Rezidivrisiko eines Harnblasenkarzinoms ist vom Raucherstatus abhängig. Rauchen verkürzt die Zeit bis zum Rezidiv (Wyszynski et al. 2013). Nach mehr als zehn Jahren Abstinenz sinkt das

Rezidivrisiko jedoch wieder auf Werte der Allgemeinbevölkerung (Rink et al. 2013).

Die direkte pathophysiologische Verbindung zwischen Zigarettenrauch und Harnblasenkarzinomen bilden die aromatischen Amine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die vermehrt in schwarzem Tabak vorkommen (Vineis et al. 1988), renal sezerniert werden und somit einen karzinogenen Effekt auf das gesamte urogenitale System haben. Berufsbedingt sind vor allem Arbeiter in der Färbemittel-, Textil- und Metallindustrie diesen exogenen Risikofaktoren ausgesetzt, sodass das Harnblasenkarzinom hier nach der Berufskrankheitenverordnung (BKV) teilweise als Berufskrankheit (BK 1301) anerkannt ist (Butz 2012; Colt et al. 2014). Kohlenwasserstoffverbindungen sind immerhin für 20 % aller Harnblasenkarzinome verantwortlich (Burger et al. 2013a). Ob und in wieweit auch der gelegentliche häusliche Gebrauch von Haarfärbemitteln mit aromatischen Aminoverbindungen ins Gewicht fällt, ist weiterhin nicht eindeutig belegt (Koutros et al. 2011; Ros et al. 2012). Ein erhöhtes Risiko wurde jedoch bei Menschen mit genetischer Prädisposition und Genotyp GSTM1 null und Phenotyp NAT2 Slow-Acetylierung gefunden (García-Closas et al. 2005). Bei Personen mit diesen Genkonstellationen fallen durch eine fehlerhafte Entgiftung der aromatischen Amine höhere Mengen dieser kanzerogenen Verbindungen an. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Harnblasenkarzinome (Hirao et al. 2009).

Das gesamte harnableitende System ist mit Urothel ausgekleidet und kann von kanzerogenen Stoffen angegriffen werden. Vermutlich bilden sich die meisten malignen Tumoren dennoch in der Harnblase, da hier der Harn zur Speicherung am längsten verweilt und die Kontaktzeit folglich am längsten ist.

Ob eine Verringerung der Kontaktzeit durch erhöhte Mengen täglich aufgenommener Flüssigkeit und Miktion einen Einfluss auf die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms hat, bleibt ungewiss (Michaud et al. 1999; Jones und Ross 1999). Die Aufnahme von chlor- oder arsenhaltigem sowie radioaktiv verseuchtem Wasser ist jedoch als potentiell kanzerogen anzusehen und geht

mit einem erhöhten Risiko für das Harnblasenkarzinom einher (Goebell et al. 2004; Lamm et al. 2006).

Starkes Übergewicht ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) und damit vergesellschaftete Erkrankungen wie Diabetes Mellitus steigern ebenfalls das Risiko einer Erstmanifestation aller Untergruppen des Harnblasenkarzinoms und verkürzen zudem die Zeit bis zum Rezidiv (Koebnick et al. 2008; Fang et al. 2013; Wyszynski et al. 2013). Eine Gewichtsreduktion, gesunde Ernährung, viel Obst, Gemüse und Fisch könnten einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung haben (Bjerregaard et al. 2006b; Holick et al. 2006; Koebnick et al. 2008). Mittlerweile scheint auch gesichert, dass selbst große Mengen an Alkohol oder Koffein keinen Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung haben (Michaud et al. 1999; Pelucchi et al. 2012).

Die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung, insbesondere einer Bestrahlung des Beckenbodens nach Prostata- oder gynäkologischen Malignomen, ist ebenfalls mit einem erhöhten Risiko verbunden (Chaturvedi et al. 2007; Abern et al. 2012). Ebenso beeinflussen die Einnahme von Cyclophosphamid als Chemotherapie bei malignen Lymphomen und Insulinsensitizer wie Pioglitazon als Dauertherapie gegen Diabetes Mellitus Typ II das Erkrankungsrisiko negativ (Burger et al. 2013a).

Darüber hinaus zählen rezidivierende und chronische Harnwegsinfekte, darunter im Besonderen die Infektion mit *Schistosoma haematobium*, zu den Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms (McDougal et al. 2011).

Einen gewissen protektiven Effekt auf die Krankheitsentwicklung scheinen hingegen weibliche Geschlechtshormone zu haben. So erkrankten Frauen mit frühem Eintritt in die Menopause (<45. LJ) beispielsweise deutlich häufiger an Harnblasenkarzinomen (McGrath et al. 2006).

### 1.1.3 Klinik

Das Kardinalsymptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie. Gelegentlich kommen noch Blasenirritationen wie Dysurie oder Pollakisurie dazu. Bei Männern im Alter über 60 Jahre weist schon eine Mikrohämaturie mit sehr hoher Sensitivität und Spezifität auf ein Tumorgeschehen der Harnblase hin (Soloway und Saad 2012). Erst bei

Fortschreiten manifestiert sich die Erkrankung durch Symptome wie Unterbauch- und Flankenschmerzen, Harnstau sowie typische B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Fieber) (Eble 2006).

Vor dem Hintergrund, dass sich das Harnblasenkarzinom zu Beginn der Krankheit nur durch schmerzlose Hämaturie zeigt oder sie sogar symptomlos fortschreitet, erklärt sich die Dringlichkeit, ein zuverlässiges Screening- und Detektionssystem für die nicht-invasive Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zu finden und weiterzuentwickeln.

#### **1.1.4 Diagnostik**

##### *1.1.4.1 Nicht-invasive und bildgebende Diagnostik*

Grundlage einer umfassenden Diagnostik bilden eine ausführliche Anamnese mit besonderem Augenmerk auf die oben genannten Risikofaktoren sowie die vollständige körperliche Untersuchung des Patienten. Liegt eine Hämaturie vor, werden weitere Untersuchungen wie Urin-Stix, die Mikroskopie des Urinsediments, die Urinzytologie und Urinmarkertests angestrebt. Zusätzlich können eine bildgebende Diagnostik und eine Spiegelung der Harnblase Gewissheit verschaffen.

In der bildgebenden Diagnostik ist die Sonographie Mittel der Wahl, da sie risikoarm, kostengünstig, und zudem leicht verfügbar ist (Patschan et al. 2008). Eine Abdomensonographie erlaubt die Erkennung und Beurteilung von intrarenalen Raumforderungen, Harnstau im Ureter und den Nierenbecken sowie Veränderungen im Innern der Harnblase und zeigt hier Veränderungen ebenso zuverlässig wie das Ausscheidungsurogramm (AUR) (Babjuk et al. 2015). Das Ausscheidungsurogramm dient zur Beurteilung der Nierenkelche und des Ureters und kann einen Harnstau besonders gut darstellen, wobei diese Methode aufgrund ihrer geringen Befunderkennungsrate zweifelhaft bleibt. In der Primärdiagnostik ist das Ausscheidungsurogramm zudem alleine wenig sensitiv und daher obsolet (Goessl et al. 1997; Patschan et al. 2008). Als Alternative kann die CT-Urographie mit Kontrastmittel behilflich sein. Sie vereint



die Vorteile einer Spiral-Computertomographie der Harnwege mit denen eines Ausscheidungsurogramms und kann nebenbei Erkenntnisse über den Lymphknotenstatus und die Nachbarorgane liefern (Van Der Molen et al. 2008). Dennoch bleibt auch die Aussagekraft ihrer Ergebnisse bei gleichzeitig erhöhter Strahlenbelastung eingeschränkt (Babjuk et al. 2015). Besteht der Verdacht auf eine Kontrastmittelallergie oder eingeschränkte Nierenfunktionsleistung, kann noch auf die retrograde Pyelographie oder die Magnetresonanztomographie zurückgegriffen werden, bei beiden jedoch mit ähnlich umstrittenen Detektionsraten eines Harnblasenkarzinoms (Patschan et al. 2008).

#### 1.1.4.2 *Zystoskopie und Ureterorenoskopie*

In der Erkennung eines Harnblasenkarzinoms bilden die Weißlicht-Zystoskopie, die makroskopische Bewertung eines Befunds sowie die histologische Beurteilung von Probenentnahmen den Goldstandard und das Mittel der Wahl (Stenzl 2009). Die Erfindung des starren Zystoskops durch Maximilian Nitze 1877 in Wien revolutionierte die Diagnostik und Therapie von Harnblasenerkrankungen und hat als Untersuchungstechnik bis heute Bestand (Herr 2006). Wurde damals nur mit starren Zystoskopen gearbeitet, so finden heute auch flexible Optiken Verwendung. Die Untersuchung findet zudem nach einer vorausgehenden Injektion von Lokalanästhetika in Form von Gel statt, wodurch die Compliance der Patienten deutlich verbessert werden kann (Aaronson et al. 2009). Ziel einer Zystoskopie ist es, die Harnblase samt ableitenden Harnwegen sorgfältig auf Unregelmäßigkeiten zu inspizieren und Befunde schematisch nach Lage, Größe, Anzahl und Morphologie zu dokumentieren. Die Untersuchung geschieht im Normalfall unter Weißlicht (WLC = white light cystoscopy) kann aber auch als Fluoreszenz-Zystoskopie (PDD = photodynamic diagnosis) durchgeführt werden. Dabei wird die Blase nach Eingabe von fluoreszierenden Kontrastmitteln wie 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA) oder Hexaminolaevulinsäure (HAL) in blauem Licht inspiziert, wodurch insgesamt mehr und vor allem flachere Tumorerkrankungen oder Carcinomata in situ besser erkannt werden können (Schmidbauer et al. 2004; Stenzl et al. 2011). In klinischen Studien verringert allerdings nur die Fluoreszenz-Zystoskopie mit HAL auch die Rezidivrate und verlängert die Zeit bis zum Rezidiv signifikant.

Insbesondere aufgrund ihrer hohen Zusatzkosten in Ausstattung und Material wird die Fluoreszenz-Zystoskopie nur Patienten mit Verdacht auf oder der Vorgeschichte eines hochgradigen Tumors empfohlen (Stenzl et al. 2010a; Burger et al. 2013b).

Ein weiteres relativ neues Verfahren ist die Narrow Band Imaging-Technologie (NBI), bei der durch eine Filterung des weißen Lichts in die Wellenlängen 415 nm und 540 nm der Kontrast zwischen gesundem Urothel und hypervaskularisiertem Tumorgewebe erhöht wird. Erste Studien zeigen hier bereits ein Erfolgspotential (Cauberg et al. 2010).

Während viele bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms eine eingeschränkte Aussagekraft aufweisen und darüber hinaus oftmals mit einer hohen Strahlenbelastung des Patienten verbunden sind, zeigt die Zystoskopie eine hohe Sensitivität, technische Vorteile – wie die simultane Probenentnahme – und kann auf eine lange Erfolgsgeschichte zurückblicken. Allerdings handelt es sich dabei um einen invasiven Eingriff, der von Patienten oftmals als körperlich belastend empfunden wird und mit enormen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden ist (Budman et al. 2008).

#### 1.1.4.3 *Transurethrale Resektion von Blasenanteilen (TUR-B)*

Die transurethrale Resektion von Blasenanteilen (TUR-B) dient sowohl der Diagnostik als auch der Therapie des Harnblasenkarzinoms. Im diagnostischen Rahmen entnimmt der Untersucher Gewebeproben von unregelmäßig erscheinenden Zonen der Blasenwand in der Zystoskopie mithilfe einer kalten Biopsiezange (Beaglier und Grasso 1994). Die einzelnen Proben werden getrennt voneinander verpackt und zur histologischen Bestimmung dem Pathologen übergeben. Bei positiver Urinzytologie oder Verdacht auf ein Carcinoma in situ können anschließend weitere Biopsien aus unauffällig und gesund aussehenden Blasenarealen entnommen werden. Diese beinhalten Proben aus dem Trigonum, dem Blasendach, der linken, rechten, anterioren und posterioren Blasenwand und der prostatistischen Urethra. Solche Biopsien aus unauffälligen Arealen sollten bei Patienten mit Ta- oder T1-Tumoren jedoch nicht ohne begründeten Verdacht durchgeführt werden, da hier ein zusätzliches Carcinoma in situ in < 2% der Fälle extrem selten vorkommt (van der Meijden et

al. 1999). Im Rahmen einer Probenentnahme wird meist gleichzeitig therapeutisch der komplette Primärtumor mithilfe einer elektrischen Schlinge entfernt. Die histologische Beurteilung dieses Primärtumors ist essentiell für das Staging sowie die Therapie und weitere Prognose des Patienten.

### **1.1.5 Staging**

Für die korrekte Diagnosestellung und Einteilung des Harnblasenkarzinoms ist ein umfassendes Staging wichtig. Hierbei spielt die pathologische Beurteilung und Klassifikation des Primärtumors eine entscheidende Rolle. Wird der Tumor nicht komplett entfernt und stellt sich der Resektionsrand somit nicht tumorfrei dar, kann der Primärtumor in der pathologischen Beurteilung unterschätzt und als zu wenig aggressiv eingestuft werden (Kulkarni et al. 2010).

Ein Verdacht der lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung sollte durch eine CT- oder MRT-Untersuchung geklärt werden. Die Suche nach Fernmetastasen beinhaltet nicht nur die benachbarten inguinalen und paraaortalen Lymphknoten sowie die umgebenden Organe der Harnblase wie Rektum, Prostata und Uterus, sondern auch klassische hämatogene Metastasierungswege in die Lunge, Leber und Knochen (Shinagare et al. 2011). Diese Stagingverfahren sind aufwändig, teilweise sehr strahlenintensiv und oft nicht genau genug (Paik et al. 2000). Sie sollten nur durchgeführt werden, wenn sich daraus für die nachfolgende Therapie eine Konsequenz ergibt. Gerade die Suche nach osseären Metastasen ist nur bei begründetem Verdacht oder typischer Symptomatik indiziert (Van Der Molen et al. 2008).

### **1.1.6 Klassifikationssysteme**

#### *1.1.6.1 TNM-Klassifikation maligner Tumoren*

Das TNM-System zur Klassifizierung maligner Tumoren wurde von P. Denoix (Frankreich) Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelt und von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer / International Union Against Cancer) durch viele Forschungskommissionen bis zu seinem heutigen Stand weiterentwickelt. Ziel ist es, maligne Prozesse in ein international anerkanntes Klassifikationssystem nach ihrer klinisch und histopathologisch definierten anatomischen

Ausbreitung einzuteilen und somit dem Therapeuten im Alltag Hinweise auf die weitere Behandlungsstrategie und Prognose der Krankheit zu geben.

Das TNM-System umfasst im Wesentlichen drei Komponenten:

- T** - Ausbreitung des **Primärtumors**
- N** - Fehlen oder Vorhandensein und Ausbreitung von regionären **Lymphknotenmetastasen**
- M** - Fehlen oder Vorhandensein von **Fernmetastasen**

<b>T</b>	<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
	<b>Ta</b>	Nicht invasives papilläres Karzinom
	<b>Tis</b>	Carcinoma in situ („flat tumor“) mit intakter Basalmembran
	<b>T1</b>	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
	<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Harnblasenmuskulatur
	<i>T2a</i>	<i>Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)</i>
	<i>T2b</i>	<i>Tumor infiltriert tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)</i>
	<b>T3</b>	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	<i>T3a</i>	<i>Mikroskopische Infiltration</i>
	<i>T3b</i>	<i>Makroskopische Infiltration (extravesikaler Tumor)</i>
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Nachbarorganie wie Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand	
<i>T4a</i>	<i>Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina</i>	
<i>T4b</i>	<i>Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand</i>	
<b>N</b>	<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	<b>N1</b>	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, obturatorische, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
	<b>N2</b>	Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, obturatorische, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
<b>N3</b>	Metastase(n) in Lymphknoten an Aa. iliaca communes	
<b>M</b>	<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
	<b>M1</b>	Fernmetastasen

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (Sobin et al. 2010).** Einteilung nach Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), Ausbreitung in den regionären Lymphknoten (N) und Vorhandensein von Fernmetastasen (M).

Die oben beschriebene TNM-Klassifikation ist eine prätherapeutische klinische Klassifikation (cTNM) und wichtig für die Auswahl einer geeigneten Therapie. Sie ergibt sich aus klinischer Untersuchung, Bildgebung, endoskopischen,

bioptischen und chirurgischen Verfahren. Daneben existiert noch eine postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM), die vor allem über eine adjuvante Therapie und die Prognose der Erkrankung entscheidet. Der präoperative Befund wird dabei durch pathologische Untersuchungen ergänzt. Für deren Beurteilung ist die Resektion des Primärtumors (pT) und der regionären Lymphknoten (pN) sowie die mikroskopische Untersuchung von Fernmetastasen (pM) erforderlich.

Darüber hinaus können noch das histopathologische Grading (G), die Lymphgefäß- (L) und Veneninvasion (V) sowie ein eventuell verbliebener Residualtumorstatus (R) nach Behandlung miterfasst werden.

Das histopathologische Grading wird bei den meisten Tumorlokalisationen folgendermaßen festgehalten:

<b>G</b>	<b>Gx</b>	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
	<b>G1</b>	Gut differenziert
	<b>G2</b>	Mäßig differenziert
	<b>G3-4</b>	Schlecht differenziert / undifferenziert

**Tab. 2: Histopathologisches Grading des Harnblasenkarzinoms (Sobin et al. 2010).** Einteilung nach Differenzierungsgrad des Primärtumors (G).

Die hier angewandte TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms aus dem Jahr 2010 unterscheidet sich von früheren Versionen vor allem bei der Verteilung von T2 und T3 in Unterpunkte und geringfügig bei der Definition von N1-N3 (Sobin et al. 2010).

#### 1.1.6.2 WHO- und ISUP-Klassifikation

Die Klassifikation des Harnblasenkarzinoms nach WHO (World Health Organisation) und ISUP (International Society of Urological Pathology) aus dem Jahr 2004 fokussiert nach Überarbeitung der Version von 1973 hauptsächlich auf die histopathologischen Kriterien des Primärtumors. Es wird grundsätzlich zwischen flachen und papillären Läsionen unterschieden. Die flachen Läsionen beinhalten Hyperplasien, reaktive Atypien des Urothels sowie urotheliale Dysplasien. Urotheliale Carcinoma in situ (CIS) werden bei dieser Klassifikation ebenfalls als nicht-papilläre flache Läsionen mit Zellen maligner Zytologie

beschrieben, die makroskopisch bei einer Zystoskopie leicht übersehen werden können und daher grundsätzlich als ‚High-Grade‘-Tumoren einzustufen sind. Papilläre Läsionen werden ihrerseits in vier Gruppen unterteilt: urotheliale Papillome (gutartige exophytische Neoplasie), papilläre urotheliale Neoplasien mit geringem malignen Potential (PUNLMP), papilläre urotheliale nicht-invasive Low-Grade Karzinome (LGPUC) und papilläre urotheliale nicht-invasive High-Grade Karzinome (HGPUC). Die in der klinischen Praxis teilweise weiterhin verwendete und von einigen Autoren (Bostwick und Mikuz 2002) favorisierte Einteilung der WHO von 1973 soll hier ebenfalls aufgeführt und mit der neueren Version von 2004 verglichen werden. Im Wesentlichen wurden Grad 1 und 2 neu aufgeteilt und umbenannt, womit die mäßig differenzierten Tumoren ganz wegfallen (Lopez-Beltran und Montironi 2004). Der Übergang ist hier allerdings fließend.

			<b>1973 WHO</b>
<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	
Gut differenziertes urotheliales Papillom	Mäßig differenziertes urotheliales Papillom	Schlecht differenziertes urotheliales Papillom	
<b>PUNLMP</b>	<b>Low-Grade (LGPUC)</b>	<b>High-Grade (HGPUC)</b>	<b>2004 WHO</b>
Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrigem malignen Potential	Papilläres urotheliales nicht-invasives Low-grade Karzinom → <i>Gut differenziert</i>	Papilläres urotheliales nicht-invasives High-grade Karzinom → <i>Schlecht differenziert</i>	
Gleicht dem exophytischen Papillom, dickeres Urothel, minimale Atypien, Architekturveränderungen und leicht vergrößerte Zellkerne	Architekturveränderungen, Kernpleomorphie, mitotische Figuren in den unteren Zellreihen	Architekturveränderungen, viel Kernpleomorphie, aufgehobene Zellpolarität, Zellatypien, mitotische Figuren in allen Schichten, Urotheldicke variiert stark	

**Tab. 3: WHO-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms, Vergleich 1973 zu 2004 (Lopez-Beltran und Montironi 2004).** Einteilung des Harnblasenkarzinoms nach histopathologischen Kriterien.

### 1.1.6.3 *Klassifikation nach pathomorphologischen Kriterien*

Das Harnblasenkarzinom lässt sich neben der TNM-Klassifikation und dem histopathologischen Grading auch nach pathomorphologischen Kriterien klassifizieren. Die World Health Organisation unterteilte 2004 die malignen Prozesse in der Harnblase nach Ursprungszelltyp und Differenzierungsgrad. Die vielen dabei entstanden Untergruppen kann man grob wie folgt zusammenfassen: Übergangszellkarzinome bzw. Urothelkarzinome mit papillärem Wachstum machen etwa 90 % aller Neoplasien der Harnblase aus. Der Rest verteilt sich auf Plattenepithelkarzinome mit 5 % und die vereinzelt vorkommenden Adenokarzinome (Kaufman et al. 2009).

### **1.1.7 Risikostratifizierung zur Therapieplanung nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (Ta, T1)**

Schlussendlich sind jedoch vor allem die Tumoranzahl, deren Größe und Klassifikation zusammen mit dem Rezidivrisiko entscheidend für die Therapieplanung nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome und das Langzeitüberleben der Patienten.

Die Einstufung der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) zur Abschätzung des Risikos eines Tumorrezidivs oder einer -progression beruht auf grundlegenden klinischen und pathologischen Merkmalen wie Tumoranzahl, Tumorgöße, initialer Rezidivrate, T-Stadium, Grading und dem Vorhandensein eines CIS. Damit lassen sich Kurz- und Langzeitüberleben sowie das Rezidivrisiko und die Progression eines Patienten getrennt voneinander beurteilen. Die sich dabei ergebende Punktzahl („Score“) liefert dem behandelnden Arzt ein wertvolles Instrument, die spätere Therapieplanung und die Nachsorgeintervalle an das individuelle Risiko eines Patienten anzupassen (Sylvester et al. 2006). Je nach Höhe des Scores variiert die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder die Gefahr einer Progression nach einem oder nach fünf Jahren.

Kriterium		Rezidiv	Progression
Anzahl der Tumoren	1	0	0
	2-7	3	3
	≥ 8	6	3
Tumorgröße	< 3 cm	0	0
	> 3 cm	3	3
initiale Rezidivrate	kein Rezidiv	0	0
	≤ 1 Rezidiv / Jahr	2	2
	> 1 Rezidiv / Jahr	4	2
T-Stadium	Ta	0	0
	T1	1	4
Nachweis eines CIS	Nein	0	0
	Ja	1	6
Grading (WHO1973)	G1	0	0
	G2	1	0
	G3	2	5
<b>Punkte gesamt</b>		<b>0-17</b>	<b>0-23</b>

Tab. 4: Scorebestimmung für Rezidiv und Progression (Sylvester et al. 2006). Berechnung eines Score für das Risiko eines Rezidivs und einer Progression anhand von definierten Kriterien.

Rezidiv-Score	Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv			
	Nach 1 Jahr		Nach 5 Jahren	
	%	(95% KI)	%	(95% KI)
0	15	(10-19)	31	(24-37)
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)

Tab. 5: Wahrscheinlichkeit für eine Rezidiventwicklung (Sylvester et al. 2006). Angaben des prozentualen Anteils der Patienten, die nach 1 bzw. 5 Jahren ein Rezidiv entwickeln.

Progressions-Score	Wahrscheinlichkeit für eine Progression			
	Nach 1 Jahr		Nach 5 Jahren	
	%	(95% KI)	%	(95% KI)
0	0,2	(0-0,7)	0,8	(0-1,7)
2-6	1	(0,4-1,6)	6	(5-8)
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)

Tab. 6: Wahrscheinlichkeit für die Progression (Sylvester et al. 2006). Angaben des prozentualen Anteils der Patienten, die nach 1 bzw. 5 Jahren eine Progression entwickeln.



Anhand der prognosebestimmenden Faktoren und der Einteilung der EORTC sollten Patienten zur Risikostratifizierung in drei Gruppen eingeteilt werden. Die dabei einfließenden Eigenschaften sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeschlüsselt. Diese Einteilung ist für die weitere Therapieplanung von entscheidender Bedeutung.

Risikokategorie	Definition	Therapieempfehlung
<b>Low-Risk</b> Tumoren	Erstdiagnose, ein einzelner Tumor, Ta, G1 (Low grade), < 3 cm Durchmesser, kein CIS	Einmalige intravesikale Instillation von Chemotherapie direkt nach TUR-B
<b>Intermediate-Risk</b> Tumoren	alle Tumoren, die weder Low-Risk noch High-Risk Tumoren sind	Einmalige intravesikale Instillation von Chemotherapie direkt nach TUR-B, gefolgt von weiteren Instillationen von Chemotherapie oder BCG-Therapie für ein Jahr.
<b>High-Risk</b> Tumoren	Eine der folgenden Eigenschaften: <ul style="list-style-type: none"> <li>• T1 Tumor</li> <li>• G3 (High grade) Tumor</li> <li>• CIS</li> <li>• Rezidivdiagnose und multiple Tumoren und &gt; 3 cm große Ta G1G2 Tumoren (hier müssen alle Eigenschaften erfüllt sein)</li> </ul>	BCG-Therapie für 1-3 Jahre oder radikale Zystektomie (bei höchstem Risiko)
<b>Subgruppe</b> der High-Risk Tumoren	T1 G3 Tumoren mit Anteilen von CIS, multiple oder große T1 G3 Tumoren oder Tumorrezidive, T1 G3 Tumoren in der prostatichen Urethra, mikropapilläre Varianten	Radikale Zystektomie empfohlen

**Tab. 7: Risikostratifizierung nach Tumoreigenschaften mit daraus resultierender Therapieempfehlung (Babjuk et al. 2015).** Einteilung der Tumoren in Low-, Intermediate- und High-Risk nach ihren Eigenschaften zur leichteren Risikostratifizierung und Therapieplanung.

### 1.1.8 Therapie nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (Ta, T1)

#### 1.1.8.1 Transurethrale Resektion von Blasenanteilen (TUR-B)

Den Goldstandard einer erfolgreichen Behandlung nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome stellt die transurethrale Resektion von Blasenanteilen (TUR-B) mit darunterliegenden Muskelanteilen dar (Stenzl 2009). Angestrebt werden eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes und damit die Heilung des Patienten. Abhängig von der Größe einer Läsion erfolgt die Resektion der Tumormasse. Kleine Tumoren (< 1 cm) werden in einem Stück (*en bloc*) mit Teilen der Blasenwandmuskulatur entnommen, wohingegen größere Tumoren in mehreren Anteilen reseziert werden. Der Resektionsrand sollte anschließend mikroskopisch tumorfrei sein. Bei der Entnahme von Teilen des Musculus detrusor vesicae zeigt sich die horizontale und vertikale Ausdehnung des Tumors besonders gut. Man spricht dabei von einer erweiterten Resektion (Richterstetter et al. 2012). Dennoch kann nach erfolgreicher Primärresektion des Tumors bei immerhin 33-78% der T1-Tumorpatienten weiterhin ein Residualtumor erfasst werden (Miladi et al. 2003). Diese Rate steigt mit der Anzahl der Primärtumoren. Eine umfassende und korrekt durchgeführte TUR-B ist für die weitere Prognose solcher Patienten essentiell (Brausi et al. 2002). In bestimmten Fällen sollte somit eine geplante Nachresektion im Abstand von zwei bis sechs Wochen zur Primärresektion erfolgen:

- bei unvollständiger primärer TUR-B (z.B. Fehlen des M. detrusor vesicae im Resektat)
- bei allen T1- Tumoren
- bei allen G3-Tumoren

Die Nachresektion schließt die wiederholte Resektion des primären Fundorts mit ein. Dadurch kann die weitere Therapiestrategie möglichst harnblasenerhaltend gestaltet und gerade bei hochgradigen T1-Tumoren das rezidivfreie Überleben verlängert werden (Grimm et al. 2003; Divrik et al. 2006).

### 1.1.8.2 *BCG-Immunotherapie*

Die intravesikale Gabe attenuierter Tuberkulosebakterien (*Bacillus Calmette-Guérin* – BCG) ist Teil der Therapiestrategie bei Patienten mit High-Risk Karzinomen oder Carcinoma in situ. Dadurch können sowohl die Rezidivraten gesenkt (Malmström et al. 2009) als auch das Risiko einer Progression reduziert oder die Progression zumindest verzögert werden (Böhle und Bock 2004). Sogar die Entwicklung von Fernmetastasen kann durch diese Therapie vermindert und damit das Langzeitüberleben verbessert werden (Sylvester et al. 2010). Die BCG-Immunotherapie wird als mindestens gleichwertig, wenn nicht sogar einer reinen Instillation von Chemotherapeutika überlegen gesehen. Daher ist diese Therapie bei Patienten mit mittlerem und hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko angebracht, während sie bei Patienten mit Low-Grade Tumoren, Hämaturie, Harnwegsinfekten oder nach traumatischer Katheterisierung aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen (wie Blasenentzündungen, Fieber, Sepsis, Prostatitis und Arthritis) weniger geeignet ist (Shang et al. 2011). Auch Patienten, die nach bereits erfolgter primärer Chemotherapie ein nicht-invasives Tumorrezidiv entwickeln, können von der BCG-Therapie profitieren. Die vorherige Chemotherapie beeinflusst deren Wirksamkeit nicht negativ (Malmström et al. 2009). Das optimale Therapieschema zur BCG-Instillation ist eine intensive 6-wöchige Induktionstherapie (Morales et al. 1976) gefolgt von einer mindestens 12-monatigen Erhaltungstherapie in wöchentlichen Sitzungen (Böhle und Bock 2004). Die Therapie kann im Falle eines Low-Risk Rezidiv nach mehr als einem Jahr mit ähnlich guten Ergebnissen sogar noch einmal wiederholt werden (Gallagher et al. 2008). Unklar bleibt weiterhin die optimale Dosis der einzelnen BCG-Instillationen (Martínez-Piñeiro et al. 2005; Oddens et al. 2013).

### 1.1.8.3 *Intravesikale Chemotherapie*

Das Rezidivrisiko nach erfolgter TUR-B kann durch die einmalige intraoperative Eingabe eines Chemotherapeutikums in die Harnblase noch einmal um etwa 12 % gesenkt werden (Sylvester et al. 2004). Dieser Effekt beruht auf der Zerstörung von frei flottierenden Tumorzellen innerhalb der Harnblase und nicht erkannten Residualtumoren an der Blasenwand durch das Chemotherapeutikum. Die Tumorzellen werden dadurch am erneuten Festwachsen an der Blasenwand gehindert (Brocks et al. 2005). Die gängigen Präparate sind Mitomycin C, Epirubicin und Doxorubicin. Alle drei zeigen untereinander eine ähnliche Wirksamkeit (Sylvester et al. 2004). Das Chemotherapeutikum sollte möglichst innerhalb der ersten 24 Stunden nach TUR-B, eher aber direkt nach der Resektion verabreicht werden, es sei denn, es besteht der dringende Verdacht einer Harnblasenperforation, durch die das Reagenz in das umliegende Gewebe diffundieren könnte (Oddens et al. 2004). Der Umfang der intravesikalen Chemotherapie sollte sich stets am interindividuellen Kurz- und Langzeitrisiko der Patienten für ein Rezidiv oder eine Progression nach TUR-B ausrichten (Sylvester et al. 2006). Bei Low-Risk Patienten ist eine einmalige Gabe ausreichend (Sylvester et al. 2004). Bei High-Risk Patienten mit multiplen Tumoren und hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko dagegen können wiederholte Instillationen des Chemotherapeutikums als Alternative zu einer BCG-Therapie erfolgen. Bei Patienten mit hohem Rezidiv-, aber niedrigem Progressionsrisiko gilt die wiederholte intravesikale Chemotherapie als Mittel der Wahl. Sinnvoll erscheint eine kurze aber intensive Weiterführung der Chemotherapie innerhalb der ersten 3-4 Monate jedoch nie länger als ein Jahr. Über Frequenz und Dauer der Anwendung besteht zurzeit noch kein Konsens (Sylvester et al. 2008). In neuen Ansätzen werden die Rezidivraten erstmals mit erfolgsversprechenden Ergebnissen mithilfe von Hyperthermie durch Mikrowellenstrahlung oder durch Anpassung des Urin pH-Werts und der Urinausscheidung während der Chemotherapiegabe weiter gesenkt (Au et al. 2001; Lammers et al. 2011).

#### 1.1.8.4 Zystektomie

Während die radikale Entfernung der Harnblase vor allem in der Therapie der muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (T2-T4) Bedeutung hat, kann bisher nur Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen zu einer radikalen Zystektomie geraten werden, bei deren Tumorgrad mit einem sehr hohem Rezidiv- oder Progressionsrisiko zu rechnen ist (Kamat et al. 2006; Sylvester et al. 2006). Diese sind:

- multiple und/oder > 3 cm große T1 G3 (high grade) Tumoren
- T1 G3 (high grade) Tumoren mit Anteilen von CIS
- T1 G3 (high grade) Tumorrezidive
- T1 G3 (high grade) Tumoren in der prostatistischen Urethra
- mikropapilläre Variationen des Harnblasenkarzinoms
- Tumoren, die aufgrund ihrer Größe nicht vollständig resezierbar sind.

Bei diesen Patienten stellt die Zystektomie eine vertretbare Alternative zur einjährigen BCG-Therapie dar. Auch bei Patienten, deren BCG-Therapie nicht den erwünschten Erfolg brachte oder die im Verlauf ein BCG-resistentes Tumorrezidiv entwickeln, bietet die Zystektomie eine weitere Therapiemöglichkeit (Yates et al. 2012). Ein Hinauszögern der Zystektomie verschlechtert dabei sogar die Prognose in dieser Patientengruppe (Raj et al. 2007). Nichtsdestotrotz sollte die radikale Zystektomie mit ihren Risiken, ihrer hohen Morbidität und der Lebensqualitätseinschränkung in der Therapie der nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome immer das Mittel der letzten Wahl bleiben.

#### 1.1.9 Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome (T2-T4a)

Die Therapie der Wahl muskelinvasiver Harnblasenkarzinome ist die radikale Zystektomie (Hautmann et al. 2007). Die Palette der Operationsverfahren reicht von einem geringen Resektionsausmaß bis hin zu einem kompletten Ersatz der Harnblase. Auch harnblasenerhaltende Verfahren in Kombination mit Radio- und Chemotherapie stehen im Hinblick auf die Erhaltung der Lebensqualität der Patienten zur Verfügung.

### 1.1.9.1 *Radikale Zystektomie*

Eine radikale Zystektomie mit Entfernung der regionalen Lymphknoten bietet bei muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen das beste Langzeitüberleben (Stein et al. 2001). Die Operation sollte nicht zu lange hinausgezögert werden, da sonst die lokalen Komplikationen massiv ansteigen und sich die Prognose in Bezug auf das Langzeitüberleben verschlechtert (Chang et al. 2003).

Die radikale Entfernung der Harnblase ist bei Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen im Stadium T2-T4a, N0-Nx, M0 sowie bei primär nicht-muskelinvasiven High-Risk Harnblasenkarzinomen bzw. deren Rezidiven (T1 G3) oder BCG-resistenten Tumoren angebracht (Witjes et al. 2015). Ferner kann eine radikale Zystektomie bei allen Tumoren nicht-urothelialen Ursprungs sowie bei fortgeschrittenen Tumoren (T4b) der Harnblase, die die Bauch- oder Beckenwand infiltrieren, in palliativer Absicht in Betracht gezogen werden (Witjes et al. 2015).

Das Ausmaß einer radikalen Zystektomie hängt von der Größe, Anzahl und Lokalisation der Tumoren ab. Bei Männern werden grundsätzlich die Harnblase mit allen makroskopisch sichtbaren und resezierbaren Tumormassen, die distalen Ureteren, die regionären Lymphknoten, sowie die Prostata mitsamt der Samenbläschen entfernt. Bei Frauen werden in der Regel neben der Harnblase die komplette Urethra, die distalen Ureteren, die regionären Lymphknoten, Teile der angrenzenden Vagina sowie der komplette Uterus mitsamt Adnexen entfernt (Stenzl et al. 2005). Zusätzlich sollte eine radikale Entfernung der pelvinen Lymphknotenstationen erfolgen, da auch hier häufig Metastasierungen zu finden sind (Fleischmann et al. 2005; Shinagare et al. 2011). In manchen Fällen können die die Prostata und den Penis versorgenden Nerven bei den Männern sowie die Urethra bei Frauen erhalten werden, wobei weniger extensive Operationstechniken immer die Gefahr eines lokalen Rezidivs bergen (Stenzl et al. 2005).

Die Operation selbst wird offenchirurgisch oder von geschulten Operateuren in einzelnen experimentellen Studien auch schon laparoskopisch bzw. roboterassistiert durchgeführt (Chade et al. 2010; Kasraeian et al. 2010).

#### 1.1.9.2 *Blasenersatzverfahren*

Nach einer radikalen Zystektomie stehen verschiedene Harnableitungsformen zur Verfügung, die die Funktion der fehlenden Harnblase ersetzen. Bezüglich ihrer onkologischen Bedeutung unterscheiden sich diese kaum, wohl aber in ihrer Bedeutung für die Lebensqualität der Patienten.

Die älteste und früher allgemein übliche Ableitungsform ist die ureterocolische Harnableitung (Coffey 1911). Die Ureteren werden dabei mit dem intakten Rektosigmoideum verbunden, sodass kein retrograder Harnfluss möglich ist. Aufgrund häufig aufsteigender Harnwegsinfekte aus dem Enddarm und der erhöhten Gefahr eines Kolonkarzinoms ist dieses Verfahren mittlerweile obsolet (Gerharz et al. 2003).

Die Ureterocutaneostomie ist eine einfache und inkontinente Form der Harnableitung durch die Bauchdecke. Hierbei werden die Ureteren entweder einzeln oder gemeinsam mithilfe eines Stoma in der Bauchdecke fixiert. Dieses Verfahren wird vor allem bei älteren und anderweitig kompromittierten Patienten bevorzugt, bei denen eine natürlichere Harnableitung nicht mehr in Frage kommt und somit eine supravesikale Ableitung nötig ist (Deliveliotis et al. 2005). Als Standardableitungsform im 20. Jahrhundert hat sich das Ileum-Conduit etabliert (Bricker und Eisemann 1950). Die Ureteren werden hier über ein Pouch (engl. Für Beutel) aus terminalem Ileum mit der Bauchdecke verbunden. Diese harninkontinente Form der Ableitung findet auch heute noch in der klinischen Praxis Anwendung, führt jedoch häufig zu Komplikationen wie Harnwegsinfekten, Pyelonephritiden und Stenosen (Nieuwenhuijzen et al. 2008).

Die orthotope Neoblase ist eine kontinente Form der Harnableitung und in vielen Zentren bereits Mittel der ersten Wahl unter den Blasenersatzverfahren (Hautmann et al. 2007). Ein Stück des terminalen Ileums wird hierbei kugelförmig zu einem Reservoir umgewandelt und schließlich proximal mit den Ureteren und distal mit der Harnröhre verbunden. Bei guter Compliance ist

schnell ein annähernd physiologisches Entleeren der neuen Ersatzblase möglich. Für die Patienten verspricht eine Neoblase die natürlichste Form der Harnableitung (Stenzl et al. 2010b) und damit einen enormen Gewinn an Lebensqualität (Gerharz et al. 2005).

#### 1.1.9.3 *Blasenerhaltende Therapieverfahren*

Aktuelle blasenerhaltende Therapieansätze des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms kombinieren die TUR-B mit einer Bestrahlung und Chemotherapie (Rödel et al. 2002). Besonders gute Erfolge zeigt diese Kombination in frühen Stadien unifokaler Tumoren, da die TUR-B und die Bestrahlung den Tumor lokal behandeln, während die systemische Chemotherapie, meist bestehend aus Methotrexat, Cisplatin und Vinblastin, Mikrometastasen verhindern soll. Bei 60-80 % der Patienten kann somit eine komplette Remission und annähernd eine mittlere Überlebenszeit wie nach radikaler Zystektomie erreicht werden (Rödel et al. 2002). Immerhin bis zu 42 % der Patienten können so ihre Harnblase für mehr als fünf Jahre bewahren, wobei diese immer als Quelle neuer Rezidive angesehen werden kann (Rödel et al. 2002).

#### 1.1.9.4 *Neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie*

In der Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome werden mit radikaler Zystektomie 5-Jahres-Überlebensraten von etwa 50 % erreicht (Stein und Skinner 2006). Um diese Raten weiter zu steigern, wurde seit den 1980er Jahren intensiv an einer perioperativen systemischen Chemotherapie gearbeitet. Vor der radikalen Zystektomie verabreicht, soll die Chemotherapie besser verträglich sein, die Tumorlast senken und Mikrometastasen verhindern. Die 5-Jahres-Überlebensrate konnte durch diese neoadjuvante Cisplatin-Kombination um bis zu 8 % angehoben werden (Meeks et al. 2012). Eine neoadjuvante Chemotherapie vor radikaler Zystektomie kommt jedoch nur bei einem hoch selektierten Patientengut mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom in Betracht. Eine ausschließliche Radio- oder Chemotherapie spielt in der kurativen Behandlung muskelinvasiver Harnblasenkarzinome keine Rolle. Für die adjuvante Chemotherapie konnte bisher ebenso kein eindeutiger Überlebensvorteil nachgewiesen werden (Witjes et al. 2015).



### **1.1.10 Therapie metastasierter Blasenkarzinome**

Etwa 10-15 % der Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom haben bereits zum Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung Fernmetastasen (Rosenberg et al. 2005). Vor Einführung einer wirksamen systemischen Chemotherapie betrug die Lebenserwartung in diesem Zustand kaum mehr als 3-6 Monate (Sternberg und Vogelzang 2003). Als Erstlinientherapie wird bei diesen Patienten eine Kombination der Chemotherapeutika Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin – kurz M-VAC – angewandt. Entscheidend für die weitere Prognose sind der Allgemeinzustand (Karnofsky-Index > 80 %), die Nierenfunktion (GFR  $\geq$  60 ml/min) und das Vorhandensein von viszerale Metastasen (Lunge, Leber, Knochen) (Bajorin et al. 1999; Santis et al. 2009). Neuerdings wird als Chemotherapie auch Gemcitabin in Kombination mit Cisplatin – kurz GC – mit vergleichbaren Ergebnissen aber geringerer Toxizität eingesetzt. Dadurch kann die durchschnittliche Lebenserwartung bei metastasiertem Harnblasenkarzinom auf 14,8 Monate für M-VAC und 13,8 Monate für GC gesteigert werden (von der Maase et al. 2000). Viele Patienten können jedoch aufgrund schlechter Nierenfunktion nicht mit Cisplatin behandelt werden (Dash et al. 2006). Ihnen wird ohne erkennbaren Nachteil eine Kombination mit Carboplatin angeboten (Santis et al. 2012). In der Zweitlinientherapie kommen Paclitaxel und Gemcitabin (Sternberg und Vogelzang 2003), Vinca-Alkaloid-Derivate (Culine et al. 2006) und Angiogenese-Inhibitoren (Black et al. 2007) zum Einsatz. Aktuelle Zweitlinientherapie der Wahl ist Vinflunin (Bellmunt et al. 2013).

### **1.1.11 Nachsorge und Prognose des Harnblasenkarzinoms**

#### *1.1.11.1 Nachsorge nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome*

Aufgrund ihres hohen Rezidiv- und Progressionsrisikos sollten Patienten mit Ta- und T1-Tumoren konsequent nachbeobachtet werden. Je nach individuellem Risiko des Patienten (Tab. 7, siehe oben) variiert die Frequenz der Verlaufskontrollen und Nachsorgezystoskopien. Alle Patienten sollten eine erste Zystoskopie und Urinzytologie drei Monate nach Erstdiagnose erhalten.

Das Ergebnis dieser Untersuchung gilt als wichtigster prognostischer Faktor für den weiteren Verlauf der Erkrankung (Solsona et al. 2000; Sylvester et al.

2006). Patienten mit Low-Risk Tumoren kommen daraufhin bei negativem Ergebnis nach neun Monaten und dann jährlich zur Nachsorge (Soukup et al. 2012). Patienten mit High-Risk Tumoren kommen bei negativem Ergebnis nach der ersten Kontrolle weiterhin alle drei Monate bis zum zweiten Jahr, dann nur noch alle sechs Monate bis zum fünften Jahr und dann jährlich zur Nachsorge. Bei ihnen wird außerdem eine jährliche Bildgebung (bsp. Ausscheidungsurographie) empfohlen (Soukup et al. 2012).

In der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms ist die Zystoskopie bereits eng mit der nicht-invasiven Diagnostik (Urinzytologie oder Harnmarkertests) verzahnt. Nicht jeder Rezidivbefund kann auch in einer Zystoskopie definitiv erkannt werden. Ein positiver Urinmarkertest im Vorfeld sensibilisiert in der anschließenden Zystoskopie für das Vorhandensein eines Rezidivs (van der Aa et al. 2010). Zudem kann ein solcher Urinmarker im Rahmen einer nicht-invasiven Rezidivdiagnostik die Zystoskopieintervalle verlängern und damit die Belastung für den Patienten und die Kosten für das Gesundheitssystem senken.

Folgende Punkte sind generell im weiteren Nachsorgeregime nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome zu beachten: Low-Risk Tumoren entwickeln als Rezidiv im Normalfall auch einen Low-Risk Tumor, der unter ständiger Beobachtung (engl.: watchful waiting) sogar zunächst so belassen werden kann (Soloway et al. 2003; Gofrit et al. 2006). Nach fünf Jahren Rezidivfreiheit bilden sich bei Low-Risk Tumoren nur noch selten Langzeitrezidive (Mariappan und Smith 2005). Patienten mit multiplen High-Risk Tumoren entwickeln als Rezidive mit erhöhter Wahrscheinlichkeit auch obere Harnwegstumoren (Millán-Rodríguez et al. 2000b). High-Risk Rezidive sollten aufgrund der Progression und ihrer lebensbedrohlichen Entwicklung möglichst früh erkannt werden. Sie können auch nach zehn Jahren Rezidivfreiheit noch auftreten, weshalb eine lebenslange Nachbeobachtung dieser Patienten empfohlen wird (Holmäng und Ströck 2012; Soukup et al. 2012).

#### 1.1.11.2 *Nachsorge muskelinvasiver Harnblasenkarzinome*

Die Nachsorge muskelinvasiver Harnblasenkarzinome gestaltet sich im klinischen Alltag schwierig, da sie trotz radikaler Zystektomie weiterhin Lokalrezidive im urogenitalen Bereich und Fernmetastasen entwickeln können. Der Nutzen eines routinemäßigen onkologischen Follow-Up dieser Patienten mittels Bildgebung und Zystoskopie bleibt umstritten (Soukup et al. 2012). Lediglich bei Patienten, die in der Folge Lungenmetastasen entwickeln, kann sich dadurch die Überlebensdauer verlängern (Giannarini et al. 2010). Bereits durch konsequente Nachsorge können bei Patienten mit Blasenersatzverfahren Komplikationen wie Nierenfunktionsstörungen, Blasenentleerungsstörungen, Harnwegsinfekte und Stenosen vermieden werden (Soukup et al. 2012).

#### 1.1.11.3 *Prognose nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome*

Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen haben je nach Alter und Risikostratifizierung eine mittlere 5-Jahresüberlebensrate von 80-95 % (Noon et al. 2013). Die größte Gefahr ist jedoch die hohe Rezidivrate dieser Tumoren. Schätzungsweise 31-78 % der Patienten entwickeln innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv (Sylvester et al. 2006). Trotz initial erfolgreicher TUR-B kommt es selbst in der Gruppe der Ta-Tumoren in bis zu 37 % der Patienten im Verlauf von fünf Jahren zu einem Rezidiv (Millán-Rodríguez et al. 2000a). Auch ein nicht-muskelinvasiver Primärtumor kann im Rahmen einer Progression innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums in ein muskelinvasives Rezidiv übergehen (Brausi et al. 2002). Etwa 0,8-45 % erleben innerhalb von 5 Jahren eine Progression ihres Tumors, je nach ihrer individuellen Risikostratifizierung (Sylvester et al. 2006). Zur Risikostratifizierung und Einschätzung der Prognose eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms stehen neben den EORTC-Tabellen weitere Prognoseindices (Allard et al. 1998; Sylvester et al. 2006) und Nomogramme (Youssef und Lotan 2011; Ali-EI-Dein et al. 2013) zur Verfügung. Dabei geben sie jedoch den individuellen klinischen Verlauf der Erkrankung nicht ausreichend wieder. Ergänzend wären hier bessere und validere Urinmarker nötig, um die individuelle Prognose je nach Tumorstadium beurteilen zu können (Alkhateeb et al. 2011).

#### 1.1.11.4 *Prognose muskelinvasiver Harnblasenkarzinome*

Die Prognose muskelinvasiver Harnblasenkarzinome wird stark von ihrem jeweiligen Tumorstadium und Lymphknotenbefall bestimmt. Oftmals ergibt sich eine deutlich schlechtere Prognose und höhere Mortalitätsrate als bei nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen. Die geringsten Rezidiv- und höchsten Überlebensraten haben Patienten mit örtlich beschränkten Tumoren ohne Lymphknotenbefall. Wird hier frühzeitig eine adäquate Therapie eingeleitet, so kommen diese Patienten auf eine 5-Jahresüberlebensrate von 73 %. Bei organübergreifendem Tumorwachstum und befallenen Lymphknoten sinkt die Überlebensrate auf 25-33 % (Madersbacher et al. 2003; Clifton et al. 2014). Rezidive muskelinvasiver Harnblasenkarzinome bilden sich in 5-15% der Fälle im umliegenden Gewebe des Primärtumors (Huguet 2013), in über 50% als Fernmetastasen bevorzugt in Lunge, Leber und Knochen (Ghoneim et al. 2008) und in bis zu 6% trotz radikaler Zystektomie abermals im urogenitalen Bereich (Stein et al. 2005).

Rezidivfrei überleben im T4-Stadium nur noch 36 % der Patienten die 5-Jahresgrenze (Madersbacher et al. 2003). Neue Chemotherapeutika, Strahlentherapie-Schemata und Angiogenesehemmer sollen die Prognose weiter verbessern. Dennoch bleibt die Therapie muskelinvasiver Harnblasenkarzinome auch zukünftig eine klinische Herausforderung (Merseburger und Kuczyk 2007).

## **1.2 Nicht-invasive Urindiagnostik**

Die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms wird im klinischen Alltag meist durch invasive oder strahlenintensive Maßnahmen wie Zystoskopie oder CT-Urographie gestellt. Die Zystoskopie bildet hierbei nach wie vor den Goldstandard und wird nach aktueller Leitlinie in der Diagnostik, Therapie und Nachbehandlung eingesetzt (Babjuk et al. 2015). Erstrebenswert wäre jedoch auf lange Sicht ein nichtinvasives Verfahren, das das Tumorgeschehen in der Harnblase mit ähnlich hoher Spezifität und Sensitivität wie die Zystoskopie nachweist (Goebell et al. 2008). Die Anforderungen des International Bladder Cancer Network an einen solchen Test sind beachtlich: Der Test sollte nach

Möglichkeit jederzeit und überall verfügbar, einfach durchzuführen, unabhängig vom Untersucher und gleichzeitig kostengünstig sein (Lokeshwar et al. 2005). Zudem sollte er zuverlässig arbeiten und von der Präkanzerose bis zum fortgeschrittenen Karzinom alle Tumorentitäten unterscheiden können.

Bisher verfügbare Methoden der nicht-invasiven Urindiagnostik zeigen sich allerdings bezüglich dieser Anforderungen als limitiert. Es existieren jedoch mehrere vielversprechende Testverfahren, die alleine oder in Kombination ihren Beitrag dazu leisten könnten.

### **1.2.1 Urinzytologie**

Schon seit Jahrhunderten bildet die Harnbeschau und damit die Urinzytologie eine Grundlage der urologischen Diagnostik. Mitte des 19. Jahrhunderts war es noch nicht möglich, Gewebeproben direkt aus der Harnblase zu entnehmen. Man beschränkte sich daher auf die Beurteilung der mit dem Urin abgeschilferten Zellen. V.D. Lambl führte im Jahre 1856 die Urinzytologie erstmals in die onkologische Urindiagnostik ein (Grunze und Spriggs 1983). Um dieser Bedeutung gerecht zu werden, haben die Deutsche Gesellschaft für Urologie und weitere urologische Organisationen die Matula – das Glas zur Harnbeschau – zu ihrem Emblem gemacht. Auch heute noch ist die Urinzytologie nicht aus der nicht-invasiven Diagnostik des Harnblasenkarzinoms wegzudenken und wird gerne in Ergänzung oder als Alternative zur Zystoskopie angewandt. Die Untersuchung von Spontanurin oder Spülflüssigkeit hat gerade bei hochgradigen Tumoren und Carcinomata in situ eine hohe Spezifität und Sensitivität (bis zu 100%), da sich hier viele Tumorzellen von ihrem Zellverband lösen und im Urin frei umherschwimmen. Die Sensitivität der Urinzytologie variiert jedoch in aktuellen Studien sehr stark (Budman et al. 2008). Die Methode ist störanfällig und die Aussagekraft ihrer Ergebnisse schwindet gerade bei niedriggradigen und differenzierten Tumoren (Têtu 2009). In diesen Fällen bleibt die Urinzytologie häufig falsch negativ (Babjuk et al. 2015). Ein weiterer Grund für die limitierte Sensitivität könnte die starke Untersucher-Variabilität der Urinzytologie sein. Nur gut geschultes Personal sollte diese Untersuchung durchführen (Murphy 1990). Eine negative Urinzytologie schließt demnach noch kein Tumorgeschehen in der Harnblase

aus und auch bei einer positiven Probe ist nicht klar, wo genau sich der Tumor im harnableitenden System befindet, da sich Zellen vom Nierenkelch bis zur Harnblase lösen können. Infektionen der oberen Harnwege, Harnsteine und iatrogene Manipulationen können das Ergebnis zudem verfälschen (Babjuk et al. 2015). Die Untersuchung aus Spülurin ist aufgrund ihrer höheren Spezifität zu bevorzugen. Eine Analyse des Morgenurins sollte angesichts nächtlich stattfindender Zytolyse vermieden werden (Patschan et al. 2008). An großen Zentren mit erfahrenen und geschulten Untersuchern kann die Spezifität der Urinzytologie somit 90 % überschreiten (Lokeshwar et al. 2005).

### **1.2.2 Molekulare Tumormarker als Ergänzung zur Urinzytologie**

Aufgrund der geringen Sensitivität der Urinzytologie bei niedriggradigen Harnblasenkarzinomen wurden in den letzten 20 Jahren diverse molekulare Urinmarkertests in der nicht-invasiven Diagnostik des Harnblasenkarzinoms eingeführt, die alle ihre ganz spezifischen Eigenschaften besitzen. Werden die durch Routine-Zystoskopie entstehenden Gesundheitskosten berücksichtigt, eröffnet sich dabei ein weites Feld für neue kosteneffiziente Untersuchungsmethoden mit hohem Potential in der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Kein Urinmarkertest scheint jedoch bisher optimal sowohl zur Primär- als auch zur Rezidivdiagnostik geeignet zu sein. Während ein Teil dieser Urinmarkertests gute Ergebnisse in der Vorsorge und wenig falsch positive Ergebnisse zeigt, weist ein anderer Teil besonders hohe Sensitivitäten in der Rezidivdiagnostik von Harnblasenkarzinomen auf (Têtu 2009).

Die bekanntesten Urinmarker BTA stat, BTA TRAK, NMP-22, ImmunoCyt/uCyt+™ und UroVysion™ (FISH) wurden von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) genehmigt und unterscheiden sich vor allem darin, ob ihre Analysen am Urin selbst (lösliche Urinmarkertests) oder an darin gelösten abgeschilferte Urothelzellen (zellgebundene Urinmarkertests) ansetzen (van Rhijn et al. 2005).

### 1.2.3 Lösliche Urinmarkertests

#### 1.2.3.1 Hämaturie-Teststreifen

Da die schmerzlose Hämaturie das Kardinalsymptom des Harnblasenkarzinoms darstellt, lassen sich bei den meisten Tumorpatienten geringe Spuren von Blut im Urin nachweisen. Umgekehrt ist als Ursache einer Hämaturie nur in unter 5 % ein Harnblasenkarzinom zu finden. Auch bei Entzündungen, Harnsteinleiden, benigner Prostatahyperplasie und ganz physiologisch kann es zur Mikrohämaturie kommen (Budman et al. 2008). Als Screening-Methode zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms kommen Hämaturie-Teststreifen mit einer Spezifität von etwa 70 % (Konety 2006) und einem positiv prädiktiven Wert von nur 5-8 % (Lotan et al. 2008b) nicht in Frage, wohl aber um den Verdacht einer urologischen Erkrankung zu erhärten.

#### 1.2.3.2 BTA stat und BTA TRAK

BTA stat und BTA TRAK (Polymedco Inc., Redmond, WA, USA) sind Antikörper, die erhöhte Werte am CFHrp (complement factor H-related peptide) und damit indirekt das ‚bladder tumor antigen‘ (BTA) im Urin nachweisen. Diese Tests können auch als Point-of-Care Test (Abk.: POC) innerhalb weniger Minuten im Rahmen einer Vorsorge vor einer Zystoskopie durchgeführt werden. BTA stat weist das Antigen in einem Immunassay rein qualitativ nach, während BTA TRAK im ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) die quantitative Menge des Antigens angibt. Diese Verfahren erkennen besonders gut höhergradige Tumoren und fallen durch ihre hohe Sensitivität um die 70 % bei ähnlich hoher Spezifität auf (Budman et al. 2008). Ihre Spezifität kann jedoch bei urogenitalen Entzündungen, Steinleiden und anatomischen Veränderungen der Harnwege auf etwa 50 % absinken (Lokeshwar et al. 2005). Der Hersteller selbst sieht hier die Grenzen dieser Tests und warnt sogar davor, sie als alleinigen Screeningparameter zur Diagnostik des Harnblasenkarzinoms anzuwenden (Polymedco Inc. 2014).

### 1.2.3.3 NMP22

NMPs (nuclear matrix proteins) sind Teile des inneren Zellkerngerüsts einer jeden Zelle (Berezney und Coffey 1974). Diese Strukturen unterstützen die Zellform und sind an der Organisation der DNA, ihrer Transkription, Replikation und Genexpression beteiligt. Bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie Mamma-, Prostata- oder Kolonkarzinomen können ganz spezifische NMPs in vermehrter Anzahl und Aktivität nachgewiesen werden. NMP22 (Matritech Inc., Cambridge, MA, USA) ist ein nukleares Matrixprotein und zuständig für die Verteilung von Chromatin während der Replikationsphase einer Zelle (Yang et al. 1992). In gesunden Zellen ist die nachweisbare Menge gering, in Harnblasenkarzinomzellen bis zu 25-mal so hoch (Keese et al. 1996).

Der NMP22-Test ist ein quantitativer ELISA-Test, der mittels zweier Antikörpern verschiedene Epitope des mitotischen Zellapparats nachweisen kann. Er sollte nur in speziell dafür eingerichteten Laboren von ausgebildeten Fachkräften durchgeführt werden (Lokeshwar und Soloway 2001). Der Hersteller empfiehlt einen Cut-off-Wert von 10 U/ml, die Empfehlungen in der Literatur schwanken zwischen 3,6 und 27 U/ml, um das beste Verhältnis von Sensitivität und Spezifität herzustellen (Lokeshwar et al. 2005).

Der Test zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität von etwa 75 % und seine überzeugende Kosteneffizienz aus. In der Spezifität liegt der NMP22-Test mit 75 % jedoch wieder deutlich unter der Urinzytologie (Nguyen und Jones 2008). Die Spezifität lässt sich allerdings deutlich erhöhen, wenn der Cut-off-Wert erhöht und die Patienten mit falsch positiven Ergebnissen aufgrund von Harnwegsinfekt, Urolithiasis, Fremdkörper, Neoblase, intravesikaler Therapie und iatrogenen Manipulation aussortiert werden. Dadurch erreicht der Test eine Spezifität von über 95 % (Ponsky et al. 2001).

Die FDA hat den NMP22-Test als Hilfsdiagnostikum bei Hochrisikopatienten mit Symptomen eines Harnblasenkarzinoms zugelassen. Mittlerweile wurde zudem eine Point-of-Care Version des Tests veröffentlicht, die ein Testergebnis ohne großes labormedizinisches Vorwissen innerhalb von 30 - 50 Minuten erlaubt (Grossman et al. 2005).



#### 1.2.3.4 Weitere lösliche Urinmarkertest

Neben den bereits genannten Urinmarkern wird intensiv an weiteren neuen Biomarkern geforscht. Einer davon ist BLCA-4, ein Transkriptionsfaktor, der bei Patienten mit Harnblasenkarzinom sowohl in Tumor- als auch in Normalgewebe der Harnblase nachgewiesen werden kann (Konety et al. 2000). Er wird über einen ELISA-Test mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert (van Le et al. 2005). Ein weiterer erfolgversprechender Transkriptionsfaktor, BLCA-1, ist Bestandteil gegenwärtiger Forschungen (Myers-Irvin et al. 2005).

Auch Survivin zählt zu den neuen potentiellen Biomarkern zur Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms (van Tilborg, A. A. et al. 2009). Es ist Teil der antiapoptotischen Proteine, die für die Regulation des Zelltodes verantwortlich sind (Altieri 2003). Erhöhte Survivinkonzentrationen im Urin sind mit höherem Risiko und schwerwiegenderem Verlauf des Harnblasenkarzinoms vergesellschaftet (Shariat et al. 2004).

Im HA-HAase Test werden die Detektion des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure (HA) und dessen abbauenden Enzyms Hyaluronidase (HAase) kombiniert. Beide sind mit Tumorzellen assoziiert, werden in den Urin sezerniert und können mit einem ELISA-ähnlichen Test oder einer PCR nachgewiesen werden (Lokeshwar et al. 2000).

Beim ‚urinary bladder cancer‘-Test (UBC) werden mittels ELISA die Zytokeratine 8 und 18, die Teil des epithelialen Zytoskeletts sind, nachgewiesen. Liegen diese in erhöhter Konzentration vor, ist die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms wahrscheinlich. Mittlerweile wird zudem ein Schnelltest (POC, engl.: point-of-care-test) unter dem Namen UBC-rapid angeboten, der die Zytokeratine nicht nur qualitativ, sondern durch ein Messgerät (concile Q100 Reader, concile GmbH, Freiburg) mittels Photometrie auch quantitativ nachweisen kann (Ritter et al. 2014). Die Sensitivität und Spezifität des Testverfahrens schwankt je nach Studie sehr stark (Babjuk et al. 2008; Jeong et al. 2012) und sinkt beim Schnelltest nochmals deutlich ab (Schroeder et al. 2004).

## 1.2.4 Zellgebundene Urinmarkertests

### 1.2.4.1 *ImmunoCyt/uCyt+™*

*ImmunoCyt/uCyt+™* (vertrieben von Diagno-Cure Inc., Québec, QC, Canada) wurde ursprünglich entwickelt, um die geringe Sensitivität der Urinzytologie zu erhöhen. Es handelt sich um einen Fluoreszenztest, der drei Antikörper beinhaltet. Zwei davon, M344 und LDQ10, sind an Fluorescein, einen grünen Farbstoff gekoppelt und binden an Mucin-Glycoproteinähnliche Antigene (z.B. M344), die von 71 % der Ta- und T1-Tumoren exprimiert werden (Allard et al. 1995). Der dritte Antikörper, 19A211, ist an Texas Red, einen roten Farbstoff gekoppelt und bindet an eine Form des Carcinoembryonalen Antigens (CEA), das von 90 % aller Ta- und T1-Tumoren exprimiert wird (Allard et al. 1995).

Zur Auswertung des Tests werden lediglich ein qualitativ hochwertiges Fluoreszenzmikroskop und eine Zytozentrifuge benötigt. Die Auswertung kann von einer für die Urinzytologie geschulten Fachkraft mit besonderer Zusatzqualifikation durchgeführt werden. Ein großer Nachteil dieser Technik bleibt ihre Untersucherabhängigkeit und ihr Zeitaufwand. Erst durch die Auswertung von 500 Zellen kann ein Ergebnis als eindeutig negativ gewertet werden (Têtu 2009). Die Sensitivität dieses Testverfahrens schwankt je nach Studiendesign mit 52-100 % stark, seine Spezifität übersteigt kaum die 75 % (Babjuk et al. 2015). Eine Stärke des Testverfahrens liegt darin, dass es auf niedriggradige Tumoren mit 79 % ähnlich sensitiv reagiert wie auf hochgradige Tumoren mit 92 %. In Kombination mit der Urinzytologie kann eine Sensitivität von fast 99 % für hochgradige Tumoren erreicht werden (Mian et al. 2006b).

Die bisherigen Erkenntnisse des *ImmunoCyt/uCyt+™*-Tests sind vielversprechend. Er könnte auch in Zukunft eine große Rolle in der Identifikation von Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts (Lodde et al. 2001) und in der Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms spielen (Têtu et al. 2005).

#### 1.2.4.2 *Weitere zellgebundene Urinmarkertests*

Das Lewis Antigen X (Abk.: Lex) – ein Glykoprotein – kommt auf gesunden Urothelzellen vor und wird in Tumorzellen vermehrt exprimiert. Es wird immunhistochemisch mithilfe eines P12 Antikörpers auf abgeschilferten Zellen im Urin mit einer Sensitivität und Spezifität von > 80 % nachgewiesen. Gesunde Urothelzellen im Urin können jedoch das Ergebnis verfälschen (Têtu 2009).

Der Quanticyt-Nuclear-Karyometry-Test erkennt morphologische Veränderungen der Zellkerne und zeigt gleichzeitig deren Ploidie. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 60 %, seine Spezifität bei 80 % (Têtu 2009).

Weitere zellgebundene Urinmarkertests sind die Mikrosatelliten-Analyse, der Telomerase-Test sowie der DD23-Test (Lokeshwar et al. 2005).

### **1.3 Multitarget-Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung**

Sehr hohen Stellenwert innerhalb der zellgebundenen Urinmarkertests für die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms besitzt der UroVysion™-Test (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Dabei handelt es sich um eine Multitarget-DNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Abk.: FISH) zum Nachweis und zur Quantifizierung der Chromosomen 3, 7, 17 sowie des Lokus 9p21 in humanen Urinproben. In diesem Verfahren kommt es zur Anlagerung einer einsträngigen, fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde an komplementäre Zielsequenzen in abgeschilferten Urothelzellen des Patientenurins. Diese Hybridisierung kann durch Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop direkt nachgewiesen werden. Aus zytogenetischen Studien geht hervor, dass in Zellen eines Harnblasenkarzinom vor allem die Chromosomen 1, 3, 4, 7, 8, 9, 11 und 17 von Veränderungen betroffen sind (Marano et al. 2000; Junker et al. 2003). Der Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity = LOH) ist beispielsweise beim p-Schenkel des Chromosoms 9 mit bis zu 76 % am wahrscheinlichsten (Höglund 2012). Abbott Molecular liefert daher in seinem Diagnose-Kit verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte Sonden, die zu den spezifischen Sequenzen der Chromosomen 3 (Spectrum Red), 7 (Spectrum Green), 17 (Spectrum Aqua) und der lokusspezifischen Sequenz 9p21 (Spectrum Gold)

komplementär sind. Diese Sonden haben sich mit ihrer hohen Sensitivität in der Harnblasenkarzinom-Diagnostik bewährt (Sokolova et al. 2000). Durch die Hybridisierung mit der Patienten-DNA und anschließender visueller Auswertung liefern die Sonden Informationen zur Kopienzahl der Chromosomen und damit ihrer Ploidie. Grundsätzlich werden vom Untersucher unter einem Fluoreszenzmikroskop 25 morphologisch auffällige Zellen erfasst. Danach wird die Untersuchung beendet und das Ergebnis je nach Auswertekriterien eindeutig als ‚positiv‘ oder ‚negativ‘ befundet.

Nach der allgemein gebräuchlichen Methode des Herstellers Abbott Molecular (Abbott Molecular Inc. 2012) müssen mindestens 4 Zellkerne eine Vermehrung von mindestens 2 der Chromosomen 3, 7 oder 17 oder mindestens 12 Zellkerne einen homozygoten Verlust des Lokus 9p21 (kein Signal für 9p21) aufweisen, um die Kriterien für eine positive Probe zu erfüllen.

Diese Auswertekriterien sind für Primär- und Rezidivdiagnostik identisch, jedoch nicht für jede klinische Situation geeignet. Daher wurden sie in den letzten Jahren bereits von mehreren Autoren bezüglich der Wertigkeit ihrer Rohdaten validiert und überarbeitet, um so die Sensitivität und Spezifität dieses Testverfahrens zu optimieren.

Halling et al. definierten in ihrer Arbeit den Cut-off-Wert für ein positives Ergebnis auf 5 Zellkerne mit 3 oder mehr Signalen für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7 oder 17 in einem Zellkern (Halling et al. 2000). Bei Varella-Garcia et al. galt ein Ergebnis positiv bei  $\geq 16\%$  der Zellen mit 3 oder mehr Signalen für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern oder bei  $\geq 48\%$  der Zellen mit homozygotem Verlust des Lokus 9p21 (Varella-Garcia et al. 2004).

Bubendorf et al. stellten im Jahr 2001 konkrete Verbesserungen zu den Auswertekriterien des UroVysion<sup>TM</sup>-Tests vor, die den Einfluss von tetraploiden Zellen hervorheben sollten (Bubendorf et al. 2001). Danach wurde ein Befund als positiv vermerkt, wenn mindestens 3 Zellkerne eine Vermehrung der

Chromosomen 3, 7 oder 17 aufwiesen oder mindestens 3 Zellkerne weniger als 2 Signale für den Locus 9p21 (heterozygoter oder homozygoter Verlust) oder mindestens 5 Zellkerne einen tetraploiden Chromosomensatz zeigten.

Die von Zellweger im Jahr 2006 erarbeiteten Auswertekriterien stellten den Verlust des Locus 9p21 besonders in den Vordergrund (Zellweger et al. 2006). In diesem Fall wurde eine Probe positiv befundet, wenn mindestens 11 Zellkerne einen tetraploiden Chromosomensatz zeigten oder mindestens 4 Zellkerne nach Abzug der tetraploiden Zellkerne eine Vermehrung der Chromosomen 3, 7 oder 17 aufwiesen. Zusätzlich wurde ein Befund als positiv bewertet, wenn mindestens 4 Zellkerne einen absoluten oder relativen Verlust des Locus 9p21 zeigten. Absoluter Verlust bedeutete homozygote oder heterozygote Deletion des 9p21-Locus (kein Signal oder  $< 2$  Signale für den Locus 9p21). Relativer Verlust bedeutete, dass die Anzahl der Signale vom Locus 9p21  $\geq 2$ , jedoch geringer ist als die Anzahl der Signale von einem der Chromosom 3, 7 und 17 (Beispiel: 2-4-5-4 oder 3-5-6-5).

Interessanterweise zeigte sich in diesem Ansatz eine Korrelation vom Verlust des Locus 9p21 zu erhöhten Rezidivraten.

Die Auswertekriterien Zellwegers wurden schließlich 2010 von Fritsche et al. so abgewandelt, dass noch eine geringe Anzahl an tetraploiden Zellkernen ( $\leq 10$ ) zulässig war (Fritsche et al. 2010). Hier wurde ein Befund als positiv gewertet, wenn mindestens 5 Zellkerne nach Abzug der tetraploiden Zellkerne eine Vermehrung von mindestens 2 der Chromosomen 3, 7 oder 17 oder mindestens 11 Zellkerne einen tetraploiden Chromosomensatz zeigten. Ein Befund war ebenfalls positiv, wenn bei mindestens 12 Zellkernen kein Signal für Locus 9p21 (homozygote Deletion) nachzuweisen war. Die Sensitivität dieses Diagnoseverfahrens ist mit 70 – 86 % relativ hoch und seine Spezifität kann bis zu 93 % erreichen (van Rhijn et al. 2005).

Bei allen bisher erwähnten Auswertestrategien wurde den einzelnen Chromosomenaberrationen dieselbe Wertigkeit zuteil. Bereits 2004 beschrieben Pycha et al. jedoch signifikante Unterschiede im klinischen Ergebnis zwischen einerseits der Gruppe an FISH-negativen Befunden und FISH-positiven Befunden mit lediglich Aneuploidie von Chromosom 3 und Lokus 9p21 sowie andererseits der Gruppe mit FISH-positiven Befunden und Aneuploidie von Chromosom 7 oder 17 (Pycha et al. 2004). Mian et al. und Lodde et al. prägten daraufhin in den Jahren 2006 und 2014 den Begriff des molekularen Gradings (mG) (Mian et al. 2006a; Lodde et al. 2014a). Dabei handelt es sich um eine Unterteilung der FISH-Befunde anhand der betroffenen Chromosomen in eine Low-mG-FISH (ausschließlich Aneuploidie in Chromosom 3 und Lokus 9p21) und eine High-mG-FISH Gruppe (auch Aneuploidie in Chromosom 7 oder 17), um so die prognostische Wertigkeit der Untersuchung zu verbessern und vor allem das Rezidivrisiko von Intermediate-Risk Tumoren besser beurteilen zu können.

Mian et al. bedienten sich für die Auswertung der FISH-Ergebnisse der Kriterien von Bubendorf et al. mit einem Cut-Off von 4 Zellkernen für einen positiven Befund. Daraufhin wurden hier die positiven FISH-Befunde in Low- und High-mG-FISH unterteilt und beide Gruppen bezüglich ihrer Rezidivwahrscheinlichkeit verglichen.

Die hier beschriebenen Herangehensweisen zur Auswertung von Rohdaten der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sind bisher nicht hinreichend bezüglich ihrer klinischen Einsetzbarkeit geprüft. Die große Varianz unter den Auswerteprinzipien spiegelt den Bedarf wider, eine einheitliche, aber dennoch für jeden Patienten passende Strategie im klinischen Alltag zu finden. Es bleibt damit weiterhin offen, ob es nicht einer neuen Herangehensweise an die Auswertung des UroVysion™-Tests bedarf, um so das volle Potential der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als diagnostischem und prognostischem Urinmarker bestmöglich auszuschöpfen.

## 1.4 Fragestellung

Die Diagnostik und Nachbeobachtung eines Harnblasenkarzinoms ist außerordentlich kostenintensiv (Botteman et al. 2003). Gerade nicht-muskelinvasive Tumoren belasten durch ihre intensive Nachsorge das Gesundheitssystem (Grossman et al. 2008).

Bisher galt im klinischen Alltag eine Kombination der invasiven und kostspieligen Zystoskopie mit der nicht-invasiven Urinzytologie als sensitivste Methode zur Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms (Yutkin et al. 2010).

Eine zuverlässige nicht-invasive Strategie zur Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms würde die Zahl der Kontrollzystoskopen und damit die Gesamtkosten verringern sowie die Lebensqualität des Patienten verbessern (Lokeshwar et al. 2005). Keiner der genannten Urinmarkertests weist jedoch bisher mit der Urinzytologie vergleichbar gute Ergebnisse auf. Probleme bereiten vor allem die vielen falsch-positiven Befunde. Grund hierfür könnte der Einfluss von Hämaturie, Harnwegsinfekten oder einer vorausgegangenen Therapie des Harnblasenkarzinoms auf die Ergebnisse der Urinmarkertests sein (Agarwal et al. 2008).

Ein vielversprechender Ansatz ist die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von abgeschilferten Urothelzellen aus dem Urin der Patienten (Lokeshwar et al. 2005). Selbst bei falsch negativer Zystoskopie kann dieser Test noch auf ein nicht sichtbares Tumorgeschehen hinweisen (Schlomer et al. 2010). Trotz vieler aussagekräftiger Ergebnisse ist die optimale Strategie zur Auswertung der Rohdaten dieser Untersuchung in der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms noch nicht gefunden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die in der Literatur beschriebenen Auswertalgorithmen der ermittelten Rohdaten von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen erstmals bezüglich ihrer klinischen Wertigkeit in der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms an einem Kollektiv von Patienten der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen extern zu validieren und sie durch eine im Rahmen dieser Arbeit erstellte ‚modifizierte Auswertestrategie‘ zu ergänzen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Zur Erfassung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten diente ein Grundkollektiv an Patienten, bei denen im Zeitraum von Anfang 2007 bis Anfang 2010 an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus Urinproben durchgeführt wurde. Patienten, bei denen dieser Test im Verlauf des oben genannten Zeitraum wiederholt durchgeführt wurde, wurden mehrfach erfasst. Dadurch ergab sich ein Gesamtkollektiv von insgesamt 2228 Patienten. Anhand verschiedener Einschluss- und Ausschlusskriterien wurde schließlich das endgültige Untersuchungskollektiv für den Teilbereich der diagnostischen Wertigkeit gebildet.

Für den Teilbereich der prognostischen Wertigkeit wurden aus diesem Gesamtkollektiv Patienten herausselektiert, die nach erfolgreicher Behandlung eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms innerhalb der kommenden 24 Monate diagnostisch nachverfolgt wurden. Bei allen diesen Patienten begann der Nachbeobachtungszeitraum der Prognostik-Studie nach Behandlung eines durch Zystoskopie und Histologie nachgewiesenen Harnblasenkarzinoms mit der ersten negativen Zystoskopie oder im Falle einer auffälligen Zystoskopie mit einer negativen Histologie und endete mit dem Zeitpunkt eines Rezidivbefundes oder rezidivfrei nach Ablauf von 24 Monaten.

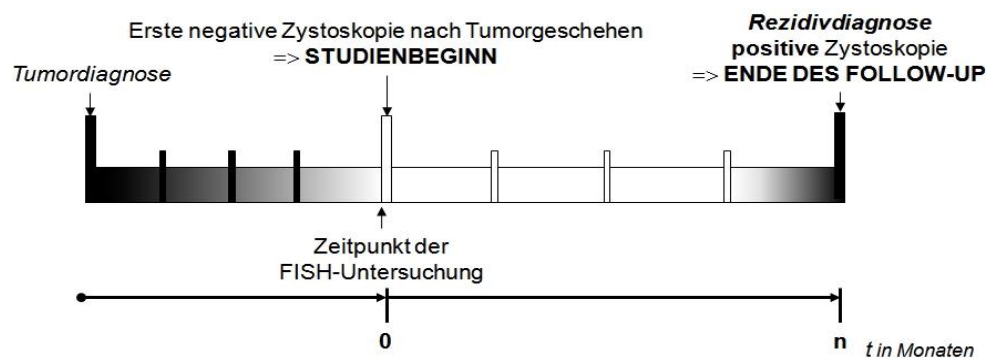


Abb. 1: Studiendesign des Prognostikkollektivs im Falle eines Rezidivs zum Ende des Follow-Up.



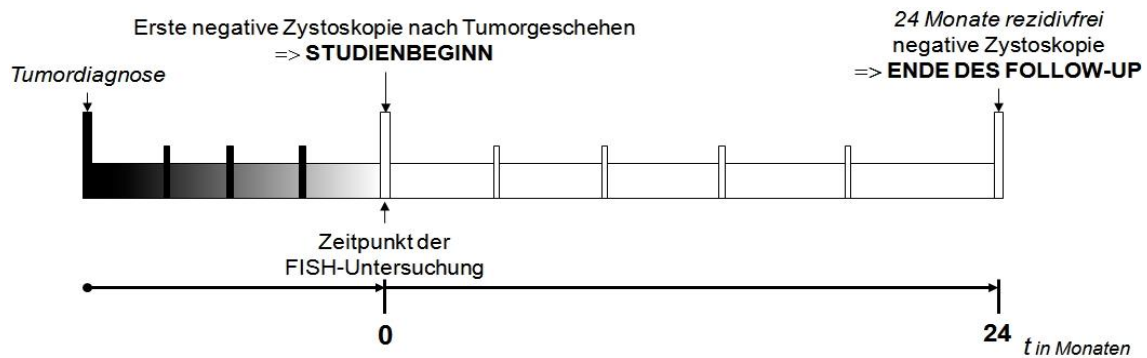


Abb. 2: Studiendesign des Prognostikkollektivs im Falle einer Rezidivfreiheit über 24 Monate.

### 2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Zur Rekrutierung der Patienten wurden die jeweiligen elektronischen Patientenakten gesichtet und der weitere Verlauf der Krankengeschichten nachvollzogen. Daraus ergab sich ein Untersuchungskollektiv nach folgenden Einschluss- und Ausschlusskriterien.

#### 2.1.1.1 Einschlusskriterien

In die vorliegende Studie wurden all jene Patienten aus dem Gesamtkollektiv eingeschlossen, bei denen

- eine Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im oben genannten Zeitraum aus Mittelstrahl- oder Katheterurin im Rahmen einer Zystoskopie durchgeführt und die Ergebnisse handschriftlich mit jeweiligen Zellveränderungen notiert wurden.
- im Falle einer auffälligen Zystoskopie eine eindeutige histologische Beurteilung der dabei gewonnenen Proben vorlag.

#### 2.1.1.2 Zusätzliche Einschlusskriterien des Prognostikkollektivs

Dem Prognostikkollektiv wurden zusätzlich all jene Patienten aus dem Gesamtkollektiv zugeordnet, bei denen

- ausschließlich ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom als letzter Tumor nachgewiesen wurde (Ta, T1, CIS) und
- der aktuelle zystoskopische Befund nach vorausgegangenem nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (Ta, T1, CIS) negativ war und dieses somit als erfolgreich therapiert gelten musste und

- parallel dazu die Rohdaten einer Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus Mittelstrahl- oder Katheterurin vorlagen und
- innerhalb von 24 Monaten nach der ersten negativen Zystoskopie eine Nachbeobachtung durch regelmäßige Zystoskopien mit Gewebegewinnung und histologischer Beurteilung bei auffälligem Zystoskopieergebnis sowie Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus Mittelstrahl- oder Katheterurin erfolgte und deren Rohdaten handschriftlich mit jeweiligen Zellveränderungen notiert wurden.

#### 2.1.1.3 *Ausschlusskriterien*

Um Einfluss- und Störfaktoren auf das Untersuchungskollektiv so weit wie möglich zu eliminieren wurden Patienten aus der Studie ausgeschlossen,

- die parallel zur Urinuntersuchung keine Zystoskopie erhalten hatten.
- die in der Vorgeschichte mit einer Neoblase versorgt wurden.
- bei denen lokal in die Harnblase infiltrierendes Tumorgewebe umliegender Organe (z.B. Prostatakarzinom) gefunden wurde.
- bei denen das Untersuchungsmaterial für die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aus den Nierenbecken oder dem oberen Harntrakt gewonnen wurde.

Darüber hinaus wurden Patienten aus dem Untersuchungskollektiv ausgeschlossen, bei denen einheitliche Bedingungen nicht erfüllt waren. Dies waren Patienten, bei denen

- die entnommene Urinprobe für die diagnostischen Tests nicht eindeutig einer Abnahmetechnik oder einem Herkunftsort zugeordnet werden konnte.
- das Ergebnis der im Rahmen der Zystoskopie gewonnenen Histologie nicht aussagekräftig oder nicht eindeutig war.
- die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aufgrund reduzierter Signalstärke der einzelnen Sonden oder verminderter Zellzahl im Präparat nicht auswertbar war.

#### 2.1.1.4 *Zusätzliche Ausschlusskriterien des Prognostikkollektivs*

Aus dem Prognostikkollektiv wurden zusätzlich alle Patienten ausgeschlossen, bei denen

- ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom (T2-T4) als letzter Tumor vor Beginn des Nachbeobachtungszeitraums oder als höchstes Tumorstadium in der Anamnese vorlag.
- keine vollständige Dokumentation innerhalb von 24 Monaten nach der ersten negativen Zystoskopie nach therapiertem nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom vorlag.
- das Datum und das Ergebnis der letzten positiven Zystoskopie und damit das Datum und der Tumorgrad des letzten Tumors vor Beginn der Studie nicht eindeutig nachvollziehbar war.

## 2.2 **Umgang mit Patientendaten und Datenschutz**

Die Daten zur Erhebung und Auswertung der vorliegenden Arbeit wurden an einem nicht-öffentlichen Rechner der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen verarbeitet, der keinen Kontakt zum öffentlichen Netz oder World Wide Web hatte und folglich ausschließlich mit dem internen Kliniknetzwerk des Universitätsklinikums Tübingen verbunden war. Zugang zu diesem Rechner hatten ausschließlich dazu befugte Mitarbeiter/innen der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen, die auch an der Datenerhebung beteiligt waren. Während der Erhebung und Auswertung der Daten zur vorliegenden Arbeit wurde die ärztliche Schweigepflicht zu jedem Zeitpunkt eingehalten und großen Wert auf den vertraulichen Umgang mit patientenbezogenen Daten gelegt. Nach Abschluss der Erhebung wurden die personenbezogenen Daten anonymisiert, sodass daraufhin keinerlei Rückschlüsse auf den jeweiligen Patienten möglich waren. Auf diese Weise wurden auch zu jeder Zeit die Auflagen des Bundesdatenschutzgesetzes erfüllt.

## **2.3 Ethikvotum**

Vor Beginn der Datenerhebung und Studiendurchführung wurden mithilfe eines Prüfplans der Studientitel, der Inhalt der vorliegenden Arbeit, deren Finanzierung und alle daran beteiligten Mitarbeiter festgelegt. Der Prüfplan regelte die Gesamtstudiendauer, die Studienpopulation, deren Rekrutierung, Ein- und Ausschlusskriterien, Untersuchungsmethoden, die Art der Dokumentation der erhobenen Daten sowie Informationen über die strikte Erfüllung des Datenschutzes. Dieser Prüfplan war bereits innerhalb des Projektes „Retrospektive Evaluation der Ergebnisse von routinemäßig durchgeführten Urinuntersuchungen zur Detektion von Harnblasenkarzinomen – Bestimmung der diagnostischen Wertigkeit, einer potenziellen prognostischen Bedeutung und Evaluation der Einflüsse von Störgrößen auf das Testergebnis“ vom 16.09.2009 der Ethikkommission des Universitätsklinikums unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Luft vorgelegt und nach sorgfältiger Begutachtung positiv beschieden worden. Er trägt das Ethik-Votum 400/2009A. Da vorliegend eine rein retrospektive Erfassung von klinischen Daten erfolgte, die routinemäßig erhoben und anschließend in einer Datenbank anonymisiert wurden, ist für die Evaluation in der vorliegenden Arbeit auf der Basis des vorhandenen Votums nicht zwingend eine weitere Begutachtung durch die Ethikkommission notwendig gewesen.

## **2.4 Untersuchungsabfolge**

### **2.4.1 Gewinnung der Urinproben**

Der zur Durchführung der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung benötigte Patientenurin wurde in der vorliegenden Arbeit auf zwei Arten und ausschließlich aus der Harnblase gewonnen. Einerseits wurde Urin durch spontane Miktion gewonnen, ohne Unterscheidung zwischen Erststrahl- und Mittelstrahlurin. Die Probengewinnung fand dabei im Rahmen eines Ambulanzbesuchs des Patienten statt, wodurch eine Verunreinigung mit Morgenurin ausgeschlossen werden konnte. Andererseits wurde Urin als Katheterurin über einen durch die Harnröhre und in der Harnblase liegenden Zystofix-Katheter gewonnen, wobei nicht zwischen Einmalkatheterisierung und

einer Dauerkatheterisierung unterschieden wurde. Über diesen Katheter konnte auch Spülurin gewonnen werden, indem die Blase nach Einlage des Katheters mit isotoner Kochsalz- oder Ringerlösung gespült wurde. Wurde vor der Miktion eine massierende Prostatastimulation durchgeführt, handelte es sich bei der gewonnenen Probe um Exprimaturin, bei dem Anteile von Prostatasekret nachweisbar sind.

#### *2.4.1.1 Mechanische Manipulation als potentieller Einflussparameter*

Die Urinentnahmen in Form von Katheterurin, Spülurin und Exprimaturin wurden als Methoden mit mechanischer Manipulation angesehen. Damit fand definitionsgemäß keine mechanische Manipulation bei der Probengewinnung aus Spontan- und Mittelstrahlurin statt.

### **2.4.2 Fixierung der Urinproben**

Unmittelbar nach der Entnahme erfolgte eine Fixierung und Konservierung der Urinproben nach Esposti zur weiteren Durchführung der Urinzytologie und Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

#### *2.4.2.1 Fixierung nach Esposti*

Für die Fixierung zur Urinzytologie und Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde das Esposti-Fixativ verwendet (Esposti et al. 1970). Dieses setzt sich aus 10 % einer 100 %igen Essigsäure (Eisessig), 48 % Methanol und 42 % Aqua dest. zusammen. Der Urin wurde direkt nach der Gewinnung im Verhältnis 1:2 mit Esposti-Fixativ gemischt und durch Schütteln homogen vermengt. Auf diese Art fixierte Proben können problemlos etwa eine Woche bei 2-4°C gelagert werden, es wird jedoch empfohlen, die Proben innerhalb von 72 Stunden zu analysieren.

### **2.4.3 Testdurchführung**

#### *2.4.3.1 Urinzytologie*

Seit Mitte des 19. Jahrhunderts ist die onkologische Urinzytologie Grundlage der urologischen Diagnostik und seit 1945 hat sie ihren Weg als Goldstandard auch in die Routinediagnostik gefunden (Rathert und Roth 2007). Bei der

Evaluation neuer diagnostischer Verfahren wird die Urinzytologie daher häufig als Referenzwert herangezogen. Bei dieser Methode werden die im Urin vorhandenen Zellen angereichert, mittels Zytozentrifugation möglichst dicht auf einem Objektträger konzentriert, gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Urinproben folgendermaßen verarbeitet:

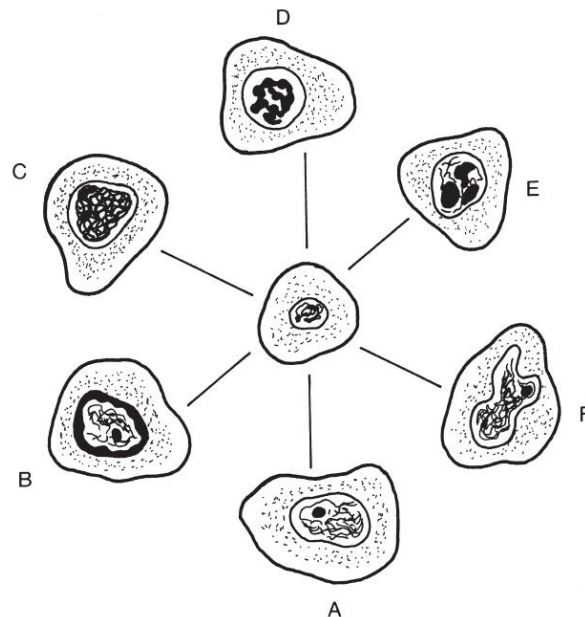
Zunächst wurden die nach Esposti fixierten Urinproben zur Zellanreicherung konzentriert. Dabei wurde die komplette Probe in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Dieses wurde in einer Zentrifuge (Hettich Rotanta 96R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) bei 800 Umdrehungen ( $600 \times g$ ) 12 Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig bis auf 2-3 ml Restvolumen abgegossen und 600-800  $\mu\text{l}$  des konzentrierten und wieder aufgeschüttelten Urins in eine Füllkammer mit Trichter (Shandon Cytofunnel, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt) pipettiert. Diese wurde mit einem Filterpapier und einem Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen) abgedeckt und in einer Zytozentrifuge (CytoSpin2, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt) bei 1500 Umdrehungen für 3 Minuten zentrifugiert.

Dabei entstanden Sedimentpräparate, die noch in feuchtem Zustand mit Merckofix Fixationsspray (Merck KGaA, Darmstadt) auf Objektträgern fixiert, getrocknet und für spätere Arbeitsschritte eingelagert wurden.

Im Anschluss erfolgte die Färbung nach Papanicolaou. Dabei handelt es sich um eine alkoholische Standardfärbung, die seit dem Jahr 1942 in der urologischen Zytologie eingesetzt wird (Papanicolaou und Marshall 1945). Die folgenden Schritte liefen im Färbeautomat Shandon Elliot (Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt) vollautomatisch ab. Zunächst wurde der Fixationsfilm auf den Objektträgern 30 Sekunden mit 30%iger Ethanol-Lösung wieder abgelöst und mit destilliertem Wasser nachgespült. Dann wurden die Objektträger für 2 Minuten in Harris' Hämatoxylin-Lösung (Papanicolaou-Lösung I) gegeben. Auf eine erneute Spülung folgte ein zweimaliges Eintauchen in 0,25%ige wässrige Salzsäure und 5 Minuten Spülung mit Leitungswasser. Danach wurden die Präparate in aufsteigender Konzentration mit Ethanol dehydriert und für 3 Minuten mit Orange-G-Lösung (Papanicolaou-

Lösung II) gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit 96%igem Ethanol gespült und mit polychromer Lösung (Papanicolaou-Lösung IIIb) für 3 Minuten eingefärbt. Nach Wiederholung der Ethanolspülung wurden die Präparate 1 Minute lang in eine Lösung aus Ethanol und Xylol (im Verhältnis 1:1) gegeben und abschließend 2 Minuten mit Xylol gespült. Auf die fertig gefärbten Präparate wurde nun ein Deckglas gegeben und sie wurden in der Folge unter dem Mikroskop beurteilt.

Diese pathomorphologische Bewertung erfolgte an einem Zeiss Olympus Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena) in den Vergrößerungsstufen 160x und 400x anhand vereinheitlichter Malignitätskriterien (Rathert und Roth 2007). Diese Malignitätskriterien beinhalten Veränderungen des Zellkerns wie: Verschiebung der Kernplasmarelation, Unregelmäßigkeiten der Kernmembran, Polymorphie des Zellkerns, Chromatinvermehrung (Hyperchromasie), Veränderungen in der Feinstruktur des Chromatins sowie eine Vergrößerung, Vermehrung oder Irregularität der Nukleolen.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der wichtigsten morphologischen Malignitätskriterien.** Im Zentrum eine normale Urothelzelle, A= Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, B= Prominenz und Irregularität der Kernmembran, C= Chromatinvermehrung und Transparenzverlust des Zellkerns, D= Chromatinvergrößerung und -verklumpung, E= Vermehrung und Entrundung der Nukleolen, F= Entrundung und Polymorphie des Zellkerns (Anisokaryose), (Rathert und Roth 2007).

Da auch normales Urothel sehr variabel aussehen kann, richtete sich die endgültige Diagnose nie nach nur einem Kriterium sondern entstand vielmehr aus der Zusammenschau mehrerer Malignitätskriterien. In Anlehnung an die histopathologische Klassifikation der WHO von Harnblasenkarzinomen aus dem Jahr 2004 wurde der zytologische Befund in drei Kategorien unterteilt: Zeigten sich im Präparat Zellen, die einer High-Grade Läsion entsprechen, wurde der Befund als ‚positiv‘ bewertet. Als ‚verdächtig‘ und ‚kontrollbedürftig‘ galt ein Präparat, das atypische Zellen enthielt, die nicht eindeutig als maligne zu werten und am ehesten mit einer Low-Grade Läsion vereinbar waren. ‚Negativ‘ wurde der Befund nur, wenn sich keine pathologischen Zellen in der Urinzytologie fanden. Alle ‚malignen‘, ‚verdächtigen‘ und ‚kontrollbedürftigen‘ Befunde dieser Arbeit wurden als ‚positives‘ Testergebnis gewertet. Nur eindeutig unauffällige Befunde wurden als ‚negative‘ Zytologie eingruppiert.

#### 2.4.3.2 *Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung – UroVysion™*

Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde mithilfe des Testkit UroVysion™ (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) anhand der Gebrauchsanleitung des Herstellers durchgeführt. Bei diesem Verfahren lagern sich einsträngige, fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden an komplementäre Sequenzen in der Zielprobe an. Diese Hybridisierung kann anschließend durch Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen und beurteilt werden.

Zur Herstellung der für die vorliegende Arbeit benötigten Präparate wurden die gesammelten Urinproben zunächst in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 800 Umdrehungen (600 x g) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15-30°C) zentrifugiert (Hettich Rotanta 96R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Nachdem der Überstand entfernt, das Sediment resuspendiert und der Inhalt in ein 15 ml fassendes Zentrifugenröhrchen überführt wurde, konnte die Probe nochmals bei 1200 Umdrehungen (600 x g) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert werden (CytoSpin2 Zentrifuge, Shandon Labortechnik GmbH, Frankfurt). Anschließend wurde möglichst viel Fixierlösung abgenommen und 0,5-1 ml



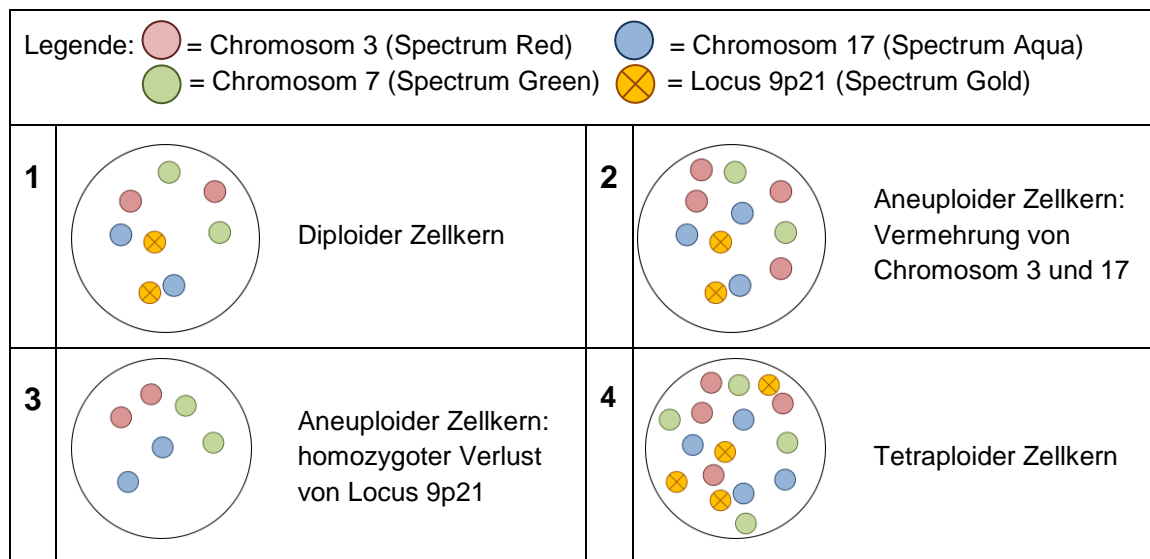
frische Fixierlösung zum Zellsediment gegeben. Das sorgfältig resuspendierte Sediment wurde auf speziell beschichteten Objektträgern (SuperFrost/Plus, Langenbrinck, Teningen) aufgebracht. Laut Anweisung des Herstellers wurden die Proben mit mehreren Fixierlösungen behandelt, sodass daraufhin die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgen konnte.

Für den Schritt der Hybridisierung wurden zunächst eine Denaturierungslösung vorbereitet und weitere Arbeitsreagenzien gerichtet. Die UroVysion-Sondenlösung, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerte, wurde parallel in einem  $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$  heißen Wasserbad erwärmt. Sie enthält einen Hybridisierungspuffer, nicht markierte Blockierungs-DNA und die fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden CEP 3 SpectrumRed, CEP 7 SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua sowie die Locus-spezifische Sonde LSI 9p21 SpectrumGold.

Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge wurden die Präparate 5 Minuten lang in  $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$  heiße Denaturierungslösung getaucht, anschließend in steigender Konzentration mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Nun wurden 3  $\mu\text{l}$  Sondenlösung auf das Präparat aufgetragen, dieser Bereich unverzüglich mit einem Deckglas verschlossen und mit einer Gummilösung abgedichtet. Während der Inkubationsphase bei  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  über Nacht (mind. 16 Stunden) fand die Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Sonden mit komplementären DNA-Abschnitten in der Probe statt. Nach abgeschlossener Hybridisierung erfolgten die Post-Hybridisierungs-Waschschritte mit mehreren Waschlösungen. Erst dann wurden die Proben mit 10  $\mu\text{l}$  DAPI II-Gegenfärbemittel behandelt und ein neues Deckglas aufgelegt. So bearbeitet konnten die Proben entweder direkt befundet oder lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für eine spätere Befundung gelagert werden.

Zur Analyse der Probenpräparate wurde ein Zeiss-Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena) mit 400facher Vergrößerung und die Filter DAPI-Einzelbandpass, Einzelbandpass-Aqua (Chromosom 17), Einzelbandpass-Gold (Locus 9p21) und Red/Green-Doppelbandpass (Chromosom 3 und 7) verwendet. Dabei wurde die komplette Probe

mäanderförmig nach malignen Zellen mit morphologischen Auffälligkeiten wie zu großem Zellkern, unregelmäßigem Umriss, unregelmäßiger DAPI-Färbung und Zellclustern abgesucht. Bei einem Treffer wurden diese Zellen in höherer Auflösung (600-1000fach) fokussiert und unter allen Filtern die Ploidie des Zellkerns überprüft. Auf diese Weise wurden 25 chromosomal auffällige Zellen mit genauer Anzahl der Chromosomen 3, 7, 17 und des Locus 9p21 handschriftlich dokumentiert. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Veränderungen der Chromosomen eines Zellkerns unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand schematischer Darstellungen.



**Abb. 4: Beispiele von chromosomal diploiden und aneuploiden Zellen.** Schematische Darstellung des mikroskopischen Befunds von normalen und abnormalen Zellkernen in der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Abbott Molecular Inc. 2012).

Daraufhin wurden folgende Auswertekonzepte auf die mikroskopischen Befunde angewandt:

- 1.) Die allgemein gebräuchliche Methode von Abbott Molecular (Abbott Molecular Inc. 2012) des UroVysion™-Testkits:

Danach war ein Befund als positiv zu werten, wenn

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 3 oder mehr Kopien (Signale) für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten oder

≥ 12 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen mit homozygoter Deletion des 9p21-Lokus (kein Signal für 9p21) vorlagen.

Traf keines der Kriterien zu, musste die Suche fortgesetzt werden, bis

≥ 4 Zellkerne mit 3 oder mehr Kopien (Signale) für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern gefunden wurden oder

≥ 12 Zellkerne mit homozygoter Deletion des 9p21-Lokus (kein Signal für 9p21) gefunden wurden oder

die gesamte Probe untersucht wurde.

- 2.) Eine von Bubendorf et al. vorgestellte Abwandlung der offiziellen Auswertestrategie, die den Einfluss von tetraploiden Zellen hervorheben sollte (Bubendorf et al. 2001):

Danach war ein Befund als positiv zu werten, wenn

≥ 3 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 3 oder mehr Kopien (Signale) für ein oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten oder

≥ 3 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen weniger als 2 Signale für den Locus 9p21 (heterozygoter / homozygoter Verlust) zeigten oder

≥ 5 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 4 Signale für jede der 4 Sonden in einem Zellkern zeigten und damit tetraploid waren.

3.) Die von Zellweger et al. im Jahr 2006 erarbeiteten Auswertekriterien stellten den Verlust des Lokus 9p21 (homozygot, heterozygot und relativ) in den Vordergrund (Zellweger et al. 2006).

Danach war ein Befund als positiv zu werten, wenn

$\geq 11$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 4 Signale für jede der 4 Sonden in einem Zellkern zeigten und damit tetraploid waren oder  
 $\geq 4$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen nach Abzug der tetraploiden Zellkerne 3 oder mehr Kopien (Signale) für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten.

Der Befund war außerdem als positiv zu werten, wenn

$\geq 4$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen absoluten oder relativen Verlust des Lokus 9p21 zeigten. Absoluter Verlust bedeutete homozygote oder heterozygote Deletion des 9p21-Lokus (kein Signal oder  $< 2$  Signale für den Lokus 9p21). Relativer Verlust bedeutete, dass die Anzahl der Signale des Lokus 9p21 im Zellkern  $\geq 2$ , jedoch geringer als die Anzahl der Signale eines der Chromosom 3, 7 oder 17 (Beispiel: 2-4-5-4 oder 3-5-6-5).

4.) Eine weitere Auswertestrategie fokussierte auf die tetraploiden Zellen und ließ auch noch eine geringe Anzahl an tetraploiden Zellkernen ( $< 10$ ) zu. Bei dieser Strategie handelte es sich um eine Abwandlung der Auswertekriterien Zellwegers (Zellweger et al. 2006) und sie wurde 2010 von Fritsche et al. zum ersten Mal vorgestellt (Fritsche et al. 2010):

Danach war ein Befund als positiv zu werten, wenn

$\geq 5$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen nach Abzug der tetraploiden Zellkerne 3 oder mehr Kopien (Signale) für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten oder  
 $\geq 11$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 4 Signale für jede der 4 Sonden in einem Zellkern zeigten und damit tetraploid waren oder  
 $\geq 12$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen mit homozygoter Deletion des 9p21-Lokus (kein Signal für 9p21) vorlagen.

5.) Mian et al. bediente sich in seiner Arbeit zur prognostischen Wertigkeit der Kriterien nach Bubendorf et al., senkte jedoch den Cut-Off für ein positives FISH-Ergebnis auf 4 Zellkerne (Mian et al. 2006a). Nach dieser Bewertung war somit ein Befund als positiv zu werten, wenn

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 3 oder mehr Kopien (Signale) für ein oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten oder

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen weniger als 2 Signale für den Lokus 9p21 (heterozygoter / homozygoter Verlust) zeigten oder

≥ 5 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen 4 Signale für jede der 4 Sonden in einem Zellkern zeigten und damit tetraploid waren.

War ein Befund negativ oder fielen bei einem positiven Ergebnis ausschließlich chromosomale Aberrationen des Chromosoms 3 bzw. des Lokus 9p21 auf, so wurde das Ergebnis als Low-mG-FISH eingestuft. Waren auch chromosomale Aberrationen der Chromosomen 7 und 17 sichtbar, so war der Befund als High-mG-FISH einzuteilen. Da diese Auswertestrategie mit anschließender Subklassifizierung in zwei Risikogruppen nur in der Prognostik des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms beschrieben ist, soll sie auch in der vorliegenden Arbeit nur im Prognostikkollektiv Anwendung finden.

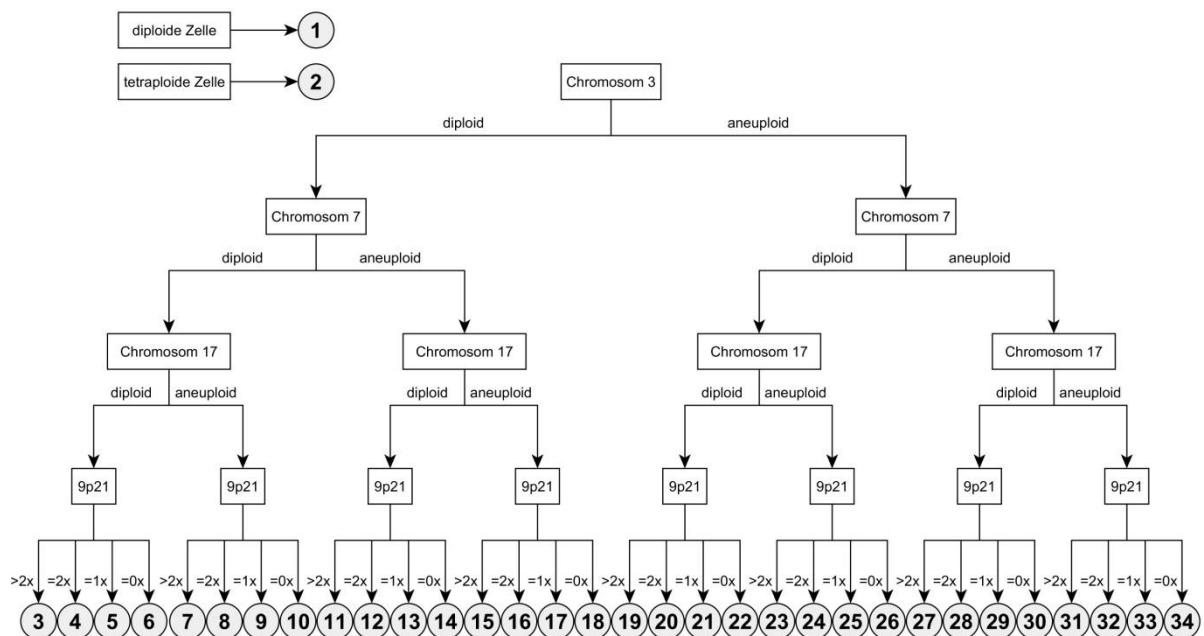
6.) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die bisher in der klinischen Praxis verwendeten Kriterien folgendermaßen abgewandelt:

Danach war ein Befund als positiv zu werten, wenn

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen nach Abzug der tetraploiden Zellkerne 3 oder mehr Kopien (Signale) für 2 oder mehr der Chromosomen 3, 7, 17 in einem Zellkern zeigten.

Diese Kriterien werden im Folgenden ‚modifizierte Auswertekriterien‘ genannt.

Die handschriftlich und papiergebunden dokumentierten Befunde der Rohdaten der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden in einem mehrstufigen Baumdiagramm für jede erfasste Zelle entsprechend separat digitalisiert, sodass pro Befund jeder der 25 Zellen je nach Anzahl der in ihrem Zellkern vorhandenen Kopien der Chromosomen 3, 7, 17 und des Lokus 9p21 ein Zahlencode zugeordnet werden konnte. Bei den Chromosomen 3, 7 und 17 wurde zwischen diploid und aneuploid, bei Lokus 9p21 zwischen homozygoter Deletion (=0), heterozygoter Deletion (=1), diploid (=2) und mehr als zwei Kopien (>2) unterschieden. Diploide und tetraploide Zellkerne erhielten separate Zahlenwerte. Die nachfolgende Abbildung soll das Verfahren verdeutlichen.



**Abb. 5: Codierung und Digitalisierung der handschriftlichen FISH-Befunde in die Elemente des 34er Codes.** Die Kombination der Ploidie der Chromosomen 3, 7, 17 und des Lokus 9p21 ergibt einen spezifischen Code je Zellkern.

Um die anschließende Auswertung zu vereinfachen und dennoch allen oben beschriebenen Kriterien der einzelnen Testverfahren gerecht zu werden, konnte der aus 34 Elementen bestehende Zahlencode auf eine Auswahl von 9 Faktoren heruntergebrochen werden. Nachstehende Tabelle gibt Aufschluss über die Zuordnung der Elemente zu einem bestimmten Faktor.

Eigenschaft des Zellkerns	Element im 34er Code	Faktor im 9er Code
Diploidie	1, 4, ggf. 3	0
Tetraploidie	2	1
Aneuploidie in genau 1 Chromosom + homozygote Deletion von Lokus 9p21	10, 14, 22	2
Aneuploidie in > 1 Chromosom + homozygote Deletion von Lokus 9p21	18, 26, 30, 34	3
Diploidie + homozygote Deletion von Lokus 9p21	6	4
Aneuploidie von genau 1 Chromosom + heterozygote Deletion von Lokus 9p21	9, 13, 21	5
Aneuploidie von > 1 Chromosom + heterozygote Deletion von Lokus 9p21	17, 25, 29, 33	6
Diploidie + heterozygote Deletion von Lokus 9p21	5	7
Aneuploidie von genau 1 Chromosom + Vermehrung von Lokus 9p21 $\geq 2$	7, 8, 11, 12, 19, 20	8
Aneuploidie von > 1 Chromosom + Vermehrung von Lokus 9p21 $\geq 2$	15, 16, 23, 24, 27, 28, 31, 32	9

**Tab. 8: Faktoren zur Auswertung der Testkriterien.** Zuordnung der 34 möglichen Elemente zu einem der 9 möglichen Faktoren

Den Faktoren entsprechend wurden alle in dieser Arbeit angewandten Testkriterien übersetzt.

- 1.) Bei der allgemein gebräuchlichen Auswertemethode nach Abbott Molecular (Abbott Molecular Inc. 2012) aus dem UroVysion™-Testkit wurde demnach der Befund als positiv vermerkt, wenn
  - $\geq 4$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 1, 3, 6 oder 9 aufwiesen oder
  - $\geq 12$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3 oder 4 aufwiesen.
- 2.) Ein Testergebnis wurde in der Auswertemethode nach Bubendorf et al. als positiv gewertet, wenn
  - $\geq 3$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3, 5, 6, 8 oder 9 aufwiesen oder
  - $\geq 3$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 aufwiesen oder
  - $\geq 5$  Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 1 aufwiesen.

Da die Anzahl der Zellkerne mit relativem Verlust von Lokus 9p21 von 25 ausgewerteten Zellen separat notiert wurde, konnte so auch die Auswertestrategie nach Zellweger et al. angewandt werden.

3.) Das Testergebnis nach Zellweger et al. wurde dementsprechend als positiv gewertet, wenn

≥ 11 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 1 aufwiesen

oder

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 3, 6 oder 9 aufwiesen oder

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen einen relativen Verlust des Lokus 9p21 aufwiesen.

4.) Auch auf die vierte Auswertestrategie nach Fritsche et al. ließ sich diese Vereinfachung anwenden. Hier wurde der Befund als positiv bewertet, wenn

≥ 5 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 3, 6 oder 9 aufwiesen oder

≥ 11 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 1 aufwiesen oder

≥ 12 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3 oder 4 aufwiesen.

5.) Die Auswertemethode nach Mian et al. wurde nach der Umcodierung in Faktoren als positiv gewertet, wenn

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3, 5, 6, 8 oder 9 aufwiesen oder

≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 aufwiesen oder

≥ 5 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 1 aufwiesen.



Daraufhin wurden die positiven Befunde nach ihrem molekularen Grading in Low-mG-FISH eingeteilt, wenn sie negativ waren oder ausschließlich Zellkerne mit den Elementen 1, 3, 4, 5, 6, 19, 20, 21 und 22 (im 34er Code) enthielten. Wurde mindestens einem Zellkern ein anderes der 34 Elemente zugewiesen, so galt die komplette Probe als High-mG-FISH.

- 6.) Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Strategie nach modifizierten Auswertekriterien wurde in dieser Umwandlung als positiv gewertet, wenn
- ≥ 4 Zellkerne von 25 ausgewerteten Zellen den Faktor 3, 6 oder 9 aufwiesen.

Auf diese Weise codiert, konnte jedem Befund ein eindeutiges Ergebnis (positiv / negativ) je nach Testverfahren zugeordnet werden.

## **2.5 Beurteilung der parallelen Zystoskopie und Histologie**

Die gesicherte Diagnose eines Harnblasenkarzinoms hängt in der Primär- und Rezidivdiagnostik heutzutage noch immer eng mit einer direkten Zystoskopie der Blase und der Entnahme von Gewebeproben zusammen (Stenzl 2009). Im Rahmen des Eingriffs können mehrere Proben entnommen und histologisch aufgearbeitet werden. Daher bietet sich diese Methode an, um bei Patienten den Primärverdacht eines Harnblasenkarzinoms zu erhärten. Auch in der Rezidivdiagnostik haben sich routinemäßige Zystoskopien parallel zur ambulanten Nachsorge etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der parallelen direkten Zystoskopie mit nachfolgender histologischer Befundung der Probeentnahmen mit dem Ergebnis der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verglichen. Bei einer unauffälligen Harnblasenwand in der Zystoskopie erfolgte keine Probenentnahme zur histopathologischen Beurteilung. Der Befund wurde als

‚negativ‘ gewertet. Bei dieser Konstellation wurde angenommen, dass zum Untersuchungszeitpunkt kein Harnblasenkarzinom vorlag.

Bei auffälligen Arealen an der Harnblasenwand wurden noch während der Untersuchung Gewebeproben entnommen und anschließend unter histopathologischen Gesichtspunkten beurteilt. Ebenfalls als ‚negativ‘ wurden dabei eindeutig benigne Proben im histopathologischen Befund gewertet. Jede Art von malignem Befund wurde hingegen als ‚positiv‘ registriert und anhand des jeweiligen Tumorstadiums klassifiziert.

## **2.6 Dokumentation der Studiendaten**

Nach Erfassung der elektronisch gespeicherten Arztbriefe, der Operationsberichte, Labor- und histopathologischen Befunde sowie der handschriftlich erhobenen Befunde der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der einzelnen Patienten erfolgte die Dokumentation der klinisch erhobenen Daten. Dabei wurde anhand der Anamnese zwischen primär- oder rezidivdiagnostischen Befunden unterschieden. Unvollständige Patientendaten mit fehlenden Angaben erfuhren durch direkte Sichtung der papiergebundenen Patientenakten Ergänzung. Im Abschluss an die Evaluation erfolgte die Anonymisierung aller Patientendaten. Die Parameter der Datenbanken beider Studiengruppen „Diagnostik“ und „Prognostik“ werden im Folgenden genauer erläutert.

Die Datenbank des Diagnostikkollektivs umfasste folgende Parameter für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten: Name, Vorname, Geburtsdatum des Patienten, Probennummer der untersuchten Urinprobe, Herkunft der Urinprobe (aufgeschlüsselt nach ‚oberer Harntrakt‘ und ‚Harnblase‘), Art und Datum der Uringewinnung. Die handschriftlichen Befunde der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden Zellkern für Zellkern im oben beschriebenen 34er Code digitalisiert. Das Ergebnis der parallelen Zystoskopie (‚kein Hinweis auf Tumor‘ oder ‚auffällige Zystoskopie‘ mit Entnahme von Gewebeproben) sowie das Ergebnis der histopathologischen Untersuchung (‚keine Malignität‘ oder ‚Nachweis von malignem Gewebe‘) diente als Referenz. Bei Nachweis von malignem Gewebe in der histopathologischen Aufarbeitung der Gewebeproben

wurden der Entnahmeort und das Tumorstadium nach TNM- und WHO-Klassifikation notiert (in ‚Ta‘, ‚T1‘, ‚T2‘, ‚T3‘, ‚T4‘ und ‚G1‘, ‚G2‘, ‚G3‘ und ‚CIS‘). Tumoren des oberen Harntrakts flossen nicht in die Auswertung der vorliegenden Arbeit mit ein.

Zusätzlich waren aus vorbestehenden Untersuchungen bereits Ergebnisse weiterer Urintests (Urinzytologie, NMP22, uCyt+) sowie Einflussfaktoren des Urinstatus‘ (Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Nitrit) vorhanden.

Die aus den Patientenunterlagen gewonnenen Daten dienten aufgearbeitet als Grundlage der in der vorliegenden Arbeit getätigten Berechnungen. Aus dem Geburtsdatum der Patienten und dem Datum der erhobenen Urinproben errechnete sich das genaue Alter der Patienten zum Untersuchungszeitpunkt. Die Herkunft der Urinprobe lieferte eine Einteilung in Urin aus dem ‚oberen Harntrakt‘ und Urin aus der ‚Harnblase‘, wobei in dieser Arbeit auf alle Proben mit Herkunft außerhalb der Harnblase verzichtet wurde. Die im 34er Code digitalisierten Befunde der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden für jeden Zellkern in die 9 Faktoren übersetzt. Daraufhin wurde die Anzahl jeder der 9 Faktoren im jeweiligen Befund dokumentiert und damit die Ergebnisse der drei angewandten Auswertestrategien anhand der vorher bestimmten Kriterien als ‚positiv‘ und ‚negativ‘ bewertet.

In der Datenbank des Prognostikkollektivs wurden für alle Patienten, die die Ein- und Ausschlusskriterien dieser Studie erfüllten, dieselben Parameter wie beim Diagnostikkollektiv erhoben. Außerdem wurden das Datum des letzten Harnblasenkarzinoms vor Studienbeginn und dessen histopathologisches Tumorstadium erfasst. Vermerkt wurde auch die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs oder bis zum Ende des Follow-Up in Monaten und bei Auftreten eines Rezidivs im Rahmen des Follow-Up dessen histopathologisches Tumorstadium nach TNM- und WHO-Klassifikation. Es wurden für jeden Patienten ergänzend das bisher höchste Tumorstadium, ein ‚CIS‘ oder ‚G3‘ in der bisherigen Anamnese sowie ein eventuell ‚höheres Rezidiv‘ als der letzte nachgewiesene Tumor nach TNM-Klassifikation miterfasst.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Datenanalyse-Tool JMP® (Version 11.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt.

In die Statistik flossen sowohl nominale, ordinale als auch stetige Merkmale mit ein. Um dennoch statistische Signifikanz zu erreichen, musste der p-Wert der einzelnen Signifikanztests unter einem vorher festgelegten Signifikanzniveau bleiben. Im Rahmen der Auswertung waren Parameter ‚signifikant verschieden‘, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% blieb ( $p < 0,05$ ). Ergebnisse mit p-Werten zwischen 5% und 10% ( $0,05 > p > 0,1$ ) wurden als ‚auffällig‘ bewertet. Alle Parameter mit p-Werten größer als 10% ( $p > 0,1$ ) zeigten ‚keinen signifikanten Unterschied‘.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende statistische Analysen angewandt:

- Kontingenzanalysen sind zur Prüfung der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit zweier oder mehrerer nominal skalierten Variablen verwendet worden.
- Grenzwertoptimierungskurven (engl.: receiver operating characteristic, Abk.: ROC) und die dabei berechnete Fläche unter der Kurve (engl.: area under the curve, Abk.: AUC) sind als Qualitätsmaß der Kontingenzanalysen verwendet worden. Je steiler die Kurve und je größer die AUC (Werte  $> 0,5$  sprechen gegen einen Zufallsprozess), desto höher die Qualität des Testverfahrens.
- Chi-Quadrat Tests sind zur Prüfung der Unterschiedlichkeit von nominal oder ordinal verteilten Variablen im Rahmen von Kontingenzanalysen verwendet worden.

Im Rahmen des Prognostikkollektivs wurden zudem folgende statistische Analysen angewandt:

- Kaplan-Meier-Schätzer (auch Produkt-Limit-Schätzer genannt) sind zur Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit im Rahmen einer Ereigniszeitanalyse verwendet worden.
- Univariable und multivariable Cox-Regressionsanalysen sind zur Prüfung des unabhängigen Einflusses einer oder mehrerer gleichzeitig einwirkender Einflussvariablen auf dieselbe Zielvariable verwendet worden. Prognostische Faktoren waren der Tumorgrad des letzten Tumors (High-Risk vs. Low-/Intermediate-Risk), die Zeit seit dem letzten Tumor (< vs. > 6 Monate) vor Beginn der Nachbeobachtung, der bisher höchste Tumorgrad in der Anamnese (High-Risk vs. Low-/Intermediate-Risk) sowie der Einfluss der Aberration des Lokus 9p21.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Diagnostikkollektiv**

#### **3.1.1 Beschreibung des Patientenkollektivs**

Im Untersuchungszeitraum von Januar 2007 bis Januar 2010 wurden an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen bei insgesamt 2228 Patienten Urinproben entnommen, um diese zu diagnostischen Zwecken aufzuarbeiten. Durch die umfassende Datenerhebung des Entnahmeprozesses konnten Urinproben aus dem oberen Harntrakt und dem Nierenbecken ausgeschlossen und ausschließlich Urinproben aus der Harnblase für die spätere Analyse verwendet werden. Anhand der Ein- und Ausschlusskriterien wurden letztendlich für die Auswertung der vorliegenden Arbeit n=1048 Patienten in das Diagnostikkollektiv und n=122 Patienten in das Prognostikkollektiv aufgenommen.

#### **3.1.2 Alters- und Geschlechtsverteilung**

Im Diagnostikkollektiv waren 858 der 1048 untersuchten Patienten männlich und 190 weiblich. Dies entsprach einem Geschlechterverhältnis von 81,9 % : 18,1 % (Männer : Frauen). Das mittlere Alter des Kollektivs betrug zum Zeitpunkt der Probenentnahme 64,6 Jahre mit einer Standardabweichung von 13,7 Jahren. Der Median lag bei 67 Jahren. Der jüngste Patient war zum Untersuchungszeitpunkt 20 Jahre, der älteste 101 Jahre alt.

#### **3.1.3 Lokalisation und Tumorstadium**

Zum Zeitpunkt der Urinabnahme hatten im Diagnostikkollektiv 820 Patienten kein Harnblasenkarzinom, was durch eine parallel zur Urinabnahme durchgeführte Zystoskopie mit anschließender Histologie entnommener Gewebeproben festgestellt wurde. Dies entsprach einem Anteil von 78,2 %. Bei 228 Patienten (21,8 %) wurde in der histologischen Aufarbeitung der Gewebeproben ein malignes Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Dabei entfielen 22 der Tumoren (9,6 %) auf den oberen Harntrakt, in der Harnblase waren 206 Tumoren (90,4 %) lokalisiert.

Mit einer Anzahl von 102 Patienten handelte es sich bei etwa der Hälfte der Tumornachweise (44,7 %) um eine Erstmanifestation und bei 126 Tumornachweisen (55,3 %) um Rezidive eines vorbestehenden Harnblasenkarzinoms.

Von 228 erkannten Neoplasien entsprachen 178 (78,1 %) der Gruppe der nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (Ta oder T1), 31 Neoplasien (13,6 %) waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits muskelfiltrierend. In 19 Fällen (8,3 %) wurde dem Tumor seitens der Pathologie kein T-Stadium zugeordnet. Im histopathologischen Grading wiesen 84 Patienten (36,8 %) einen G1-Tumor, 75 Patienten (32,9 %) einen G2-Tumor und 48 Patienten (21,1 %) einen G3-Tumor auf. Bei 21 Patienten (9,2 %) wurde das G-Stadium des Tumors nicht ermittelt, da es sich bei den Tumoren um reine CIS oder um PUNLMP handelte und damit um das Tumorstadium Ta. Unter allen Neoplasien konnte bei 37 Patienten (16,2 %) ein CIS nachgewiesen werden, 19 Tumorpatienten (8,3 %) hatten Anteile eines CIS zusätzlich zu einer weiteren Tumorentität, bei 18 Patienten (7,9 %) wurde ausschließlich ein CIS nachgewiesen. Nachfolgende Tabellen geben Aufschluss über die genaue Verteilung des Diagnostikkollektivs.

<b>Eigenschaften des Diagnostikkollektivs</b>	Anzahl der gesamten Patienten, n	1048
	Alter, Median (Range)	67 (20-101)
	Geschlecht (männlich / weiblich)	858 / 190
	Anzahl Patienten ohne Tumor, n (% von Anzahl der gesamten Patienten)	820 (78,2)
	Anzahl Patienten mit Tumor, n (% von Anzahl der gesamten Patienten)	228 (21,8)
	Erstdiagnostik, n (% von Patienten mit Tumor)	102 (44,7)
Rezidivdiagnostik, n (% von Patienten mit Tumor)	126 (55,3)	

Tab. 9: Grundlegende Eigenschaften der Patienten im Diagnostikkollektiv.

<b>Verteilung nach Tumorstadium</b>	<b>T-Stadium, n (% von Patienten mit Tumor)</b>	
	Ta	147 (64,5)
	T1	31 (13,6)
	T2	21 ( 9,2)
	T3	5 ( 2,2)
	T4	5 ( 2,2)
	<b>G-Stadium, n (% von Patienten mit Tumor)</b>	
	G1	84 (36,8)
	G2	75 (32,9)
	G3	48 (21,1)
	<b>CIS, n (% von Patienten mit Tumor)</b>	
	CIS gesamt	37 (16,2)
	zusätzlich CIS	18 ( 7,9)
	ausschließlich CIS	19 ( 8,3)

Tab. 10: Statistische Verteilung der Tumorstadien der Patienten des Diagnostikkollektiv.

### 3.1.4 Verteilung chromosomaler Veränderungen

Um das Ausmaß der Veränderungen einzelner Chromosomen besser beurteilen zu können, wurden die Verteilungen der chromosomalen Aberrationen der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in Bezug zum Ergebnis der parallelen Histologie gesetzt.

Von 25 ausgewerteten Zellen der FISH-Analyse waren bei 228 Tumorpatienten des Diagnostikkollektivs im Median in mindestens 5 Zellkernen das Chromosom 3, 7 oder 17, im Median in 6 Zellkernen mindestens 2 dieser Chromosomen gleichzeitig und in 4 Zellkernen bereits alle drei Chromosomen vermehrt, hiervon ausgenommen tetraploide Zellkerne. Diese Werte lagen signifikant über der Anzahl chromosomaler Aberrationen im Falle einer negativen parallelen Histologie ( $p < 0,001$ ).

Die Anzahl der Zellkerne mit homozygotem oder heterozygotem Verlust des Locus 9p21 war im Diagnostikkollektiv im Median vergleichbar für eine positive oder negative parallele Histologie ( $p < 0,001$ ). Lediglich der relative Verlust des Locus 9p21 – wie beschrieben bei Zellweger et al. – zeigte signifikante Unterschiede. Im Median hatten 3 Zellkerne einen relativen Verlust des Locus 9p21 bei positiver, im Median nur 1 Zellkern bei negativer Tumorhistologie ( $p < 0,001$ ).



Tetraploide Zellkerne konnten im Median sowohl bei positiver als auch negativer Histologie im Befund nicht nachgewiesen werden, wobei die Spannweiten stark variierten und sich dieser Zusammenhang als nicht signifikant darstellte. Die untenstehende Tabelle gibt hier noch einmal genauer Aufschluss.

Art der Zellkernveränderung	Anzahl der Zellen im Befund mit jeweiliger Zellkernveränderung bei paralleler		AUC	p-Wert
	<i>positiver Histologie</i>	<i>negativer Histologie</i>		
<i>Vermehrung von..., Median (Spannweite)</i>				
Chromosom 3	5 (0-23)	1 (0-23)	0,75	<b>&lt; 0,001</b>
Chromosom 7	6 (0-23)	1 (0-22)	0,76	<b>&lt; 0,001</b>
Chromosom 17	5 (0-22)	1 (0-23)	0,75	<b>&lt; 0,001</b>
> 1 dieser Chromosomen	6 (0-23)	2 (0-23)	0,76	<b>&lt; 0,001</b>
> 2 dieser Chromosomen	4 (0-22)	1 (0-22)	0,74	<b>&lt; 0,001</b>
<i>Verlust von..., Median (Spannweite)</i>				
Lokus 9p21 insgesamt	0 (0-21)	0 (0-23)	0,65	<b>&lt; 0,001</b>
Lokus 9p21 homozygot	0 (0-20)	0 (0-22)	0,59	<b>&lt; 0,001</b>
Lokus 9p21 heterozygot	0 (0-8)	0 (0-5)	0,60	<b>&lt; 0,001</b>
Lokus 9p21 relativ (Zellweger et al.)	3 (0-15)	1 (0-12)	0,72	<b>&lt; 0,001</b>
Tetraploide Zellkerne, Median (Spannweite)	0 (0-19)	0 (0-7)	0,53	0,10

**Tab. 11: Verteilung der chromosomalen Veränderungen im Diagnostikkollektiv.** Anzahl chromosomaler Aberrationen je nach Befund der parallelen Histologie. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.1.5 Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

#### 3.1.5.1 Auswertung nach den Kriterien von Abbott Molecular

Zur Analyse der Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnten alle 1048 Patienten des Diagnostikkollektivs untersucht werden. Von ihnen hatten 820 Patienten (78,2 %) zum Zeitpunkt der Urinabnahme nachweislich kein Harnblasenkarzinom, während bei 228 Patienten (21,8 %) in der parallelen Zystoskopie histologisch ein Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden konnte. Den vom Hersteller empfohlenen Auswertekriterien des UroVysion™-Testkits von Abbott Molecular entsprechend betrug die Sensitivität des Testverfahrens in unserem Kollektiv 71,9 %, die Spezifität 69,3 %.

	Abbott Molecular FISH negativ	Abbott Molecular FISH positiv
<b>Tumorhistologie negativ</b>	568	252
<b>Tumorhistologie positiv</b>	64	164

**Tab. 12: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach Abbott Molecular FISH-Ergebnis.** Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Der positiv prädiktive Wert (engl.: positive predictive value, Abk.: PPV) oder die Genauigkeit der Auswertestrategie betrug 39,4 %, der negativ prädiktive Wert (engl.: negative predictive value, Abk.: NPV) und damit die Trennfähigkeit der Auswertestrategie betrug 89,9 %. Die diagnostische Genauigkeit (engl.: accuracy) lag in diesem Test bei 69,8 %.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Auswertestrategie von Abbott Molecular nach Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom in ihrer Vorgeschichte aufgeschlüsselt.

Auswertung nach Abbott Molecular	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
<i>Gesamtkollektiv</i>	71,9 %	69,3 %	39,4 %	89,9 %	69,8 %	0,71
<i>Primärdiagnostik</i>	72,6 %	74,4 %	35,9 %	93,2 %	74,1 %	0,74
<i>Rezidivdiagnostik</i>	71,4 %	60,5 %	42,9 %	83,6 %	63,7 %	0,66

**Tab. 13: Wertigkeit des Testverfahrens nach Abbott Molecular in Primär- und Rezidivdiagnostik.** Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.

### 3.1.5.2 Auswertung nach den Kriterien von Bubendorf et al.

Bei Anwendung einer Variation der allgemein gebräuchlichen Testkriterien nach Bubendorf et al., die die Bedeutung der tetraploiden Zellkerne hervorheben soll, war die Sensitivität im Diagnostikkollektiv mit 76,8 % leicht höher als bei der Auswertung nach Abbott Molecular, die Spezifität mit 62,8 % jedoch leicht geringer.

	Bubendorf FISH negativ	Bubendorf FISH positiv
Tumorhistologie negativ	515	305
Tumorhistologie positiv	53	175

**Tab. 14: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach Bubendorf et al. FISH-Ergebnis.** Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Der positiv prädiktive Wert (PPV) dieser Auswertestrategie berechnete sich auf 36,5 %, der negativ prädiktive Wert (NPV) auf 90,7 %. Die diagnostische Genauigkeit (accuracy), lag mit lediglich 65,8 % deutlich unter dem Wert der Auswertung nach Abbott Molecular.

Um die grundlegende Wertigkeit der Auswertestrategie nach Bubendorf et al. in Bezug auf Primär- und Rezidivdiagnostik zu bewerten, sind die Ergebnisse im Folgenden nach Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom in ihrer Vorgeschichte aufgeschlüsselt.

Auswertung nach Bubendorf et al.	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
Gesamtkollektiv	76,8 %	62,8 %	36,5 %	90,7 %	65,8 %	0,69
Primärdiagnostik	74,5 %	67,3 %	31,0 %	93,0 %	68,4 %	0,71
Rezidivdiagnostik	78,6 %	55,3 %	42,1 %	86,2 %	62,1 %	0,67

**Tab. 15: Wertigkeit des Testverfahrens nach Bubendorf et al. in Primär- und Rezidivdiagnostik.** Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.

### 3.1.5.3 Auswertung nach den Kriterien von Zellweger et al.

Die Auswertestrategie von Zellweger et al. erlaubt noch 10 tetraploide Zellkerne in einem negativen Befund und legt einen besonderen Fokus auf den relativen Verlust des Lokus 9p21. Bei dieser Variante betrug die Sensitivität des Testverfahrens in unserem Kollektiv 68,4 %, die Spezifität 78,8 %.

	Zellweger FISH negativ	Zellweger FISH positiv
Tumorhistologie negativ	646	174
Tumorhistologie positiv	72	156

Tab. 16: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach Zellweger et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Der positiv prädiktive Wert (PPV) der Auswertestrategie lag in unserem Kollektiv bei 47,3 %, der negativ prädiktive Wert (NPV) bei 89,9 %. Die diagnostische Genauigkeit (accuracy) betrug mit diesem Testverfahren 76,5 %.

Anschließend erfolgte die Aufschlüsselung dieser Auswertestrategie nach Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom in ihrer Vorgeschichte, um damit die Beurteilung der Wertigkeit des Testverfahrens in Bezug auf Primär- und Rezidivdiagnostik zu ermöglichen.

Auswertung nach Zellweger et al.	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
Gesamtkollektiv	68,4 %	78,8 %	47,3 %	89,9 %	76,5 %	0,74
Primärdiagnostik	65,7 %	84,3 %	45,3 %	92,6 %	81,2 %	0,75
Rezidivdiagnostik	70,6 %	69,4 %	48,9 %	85,1%	69,8 %	0,70

Tab. 17: Wertigkeit des Testverfahrens nach Zellweger et al. in Primär- und Rezidivdiagnostik. Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.

### 3.1.5.4 Auswertung nach den Kriterien von Fritsche et al.

Nach der Auswertestrategie von Fritsche et al., in der immerhin 10 tetraploide Zellkerne noch als negatives Ergebnis und der Verlust des Lokus 9p21 ähnlich den Kriterien von Abbott Molecular bewertet wird, belief sich die Sensitivität im Diagnostikkollektiv auf 58,3 %, die Spezifität auf 85,0 %.

	Fritsche FISH negativ	Fritsche FISH positiv
Tumorhistologie negativ	697	123
Tumorhistologie positiv	95	133

**Tab. 18: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach Fritsche et al. FISH-Ergebnis.** Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Als positiv prädiktiver Wert (PPV) dieser Auswertestrategie ergaben sich 52,0 %, als negativ prädiktive Wert (NPV) 88,0 %. Die diagnostische Genauigkeit (accuracy) lag in diesem Test mit 79,2 % deutlich über dem Wert der Auswertung nach Abbott Molecular.

Im Folgenden zeigt eine Tabelle wiederum die Ergebnisse der Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom in ihrer Vorgeschichte, um damit die grundlegende Wertigkeit des Testverfahrens in Bezug auf Primär- und Rezidivdiagnostik zu beurteilen.

Auswertung nach Fritsche et al.	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
Gesamtkollektiv	58,3 %	85,0 %	52,0 %	88,0 %	79,2 %	0,72
Primärdiagnostik	54,9 %	90,9 %	54,4 %	91,1 %	85,0 %	0,73
Rezidivdiagnostik	61,1 %	75,0 %	50,3 %	82,3 %	70,9 %	0,68

**Tab. 19: Wertigkeit des Testverfahrens nach Fritsche et al. in Primär- und Rezidivdiagnostik.** Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.

### 3.1.5.5 Auswertung nach den modifizierten Kriterien dieser Arbeit

Bereits während der Erhebung der Daten fiel der überdurchschnittlich häufige Verlust des Lokus 9p21 im Patientenkollektiv ohne klinische Relevanz und ohne bestehendes Tumorgeschehen auf. Auch die Anzahl der tetraploiden Zellkerne stand bei der ersten Sichtung der Daten nur bedingt mit dem Tumorstadium in Verbindung. Daher wurde vermutet, dass lediglich eine Aneuploidie der Chromosomen 3, 7 und 17 in direkter Verbindung mit dem Harnblasenkarzinom stand.

Anhand einer nominal-logistischen Regressionsanalyse ergab sich ein Cut-off-Wert von mindestens 4 Zellkernen mit einer chromosomalen Aberration von Chromosom 3, 7 oder 17 als Kriterium der modifizierten Auswertestrategie dieser Arbeit. Bei mehr als 3 Zellkernen mit den oben genannten chromosomalen Veränderungen erreichte das Testverfahren in unserem Diagnostikkollektiv die höchste Sensitivität gepaart mit der höchsten Spezifität.

Anzahl der FISH positiven Zellkerne	Sensitivität	Spezifizität	Sensitiv.-(1-Spez.)	Wahr pos.	Wahr neg.	Falsch pos.	Falsch neg.
10	20,18	95,24	15,42	46	781	39	182
9	27,63	93,90	21,53	63	770	50	165
8	33,33	92,32	25,65	76	757	63	152
7	42,54	90,49	33,03	97	742	78	131
6	50,44	87,20	37,63	115	715	105	113
5	57,89	85,00	42,89	132	697	123	96
<b>4</b>	<b>64,04</b>	<b>81,10</b>	<b>45,13</b>	<b>146</b>	<b>665</b>	<b>155</b>	<b>82</b>
3	71,93	70,85	42,78	164	581	239	64
2	82,02	52,20	34,21	187	428	392	41
1	89,91	30,85	20,77	205	253	567	23

**Tab. 20: Nominal-logistische Regression der FISH-positiven Zellkerne mit dem Ergebnis der parallelen Histologie.** FISH positiv bedeutet in diesem Fall  $\geq 3$  Kopien für  $\geq 2$  der Chromosomen 3, 7 und 17; tetraploide Zellkerne ausgeschlossen.

Im Rahmen der modifizierten Auswertekriterien dieser Arbeit, die den Verlust von Lokus 9p21 und die tetraploiden Zellkerne vernachlässigt, errechneten sich im Diagnostikkollektiv eine Sensitivität dieses Testverfahrens von 64,0 % und eine Spezifität von 81,1 %.

Der positiv prädiktive Wert (PPV) dieser modifizierten Auswertestrategie lag mit 48,5 % über, der negativ prädiktive Wert (NPV) mit 89,0 % unter den Werten der Auswertung nach Abbott Molecular. Die diagnostische Genauigkeit (accuracy) lag in diesem Test jedoch mit 77,4 % über dem Wert der Auswertung nach Abbott Molecular.

	Modifizierte Auswertung FISH negativ	Modifizierte Auswertung FISH positiv
<b>Tumorhistologie negativ</b>	665	155
<b>Tumorhistologie positiv</b>	82	146

**Tab. 21: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach FISH-Ergebnis der modifizierten Auswertung.** Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Die Ergebnisse der modifizierten Auswertestrategie dieser Arbeit sind ebenfalls nach Patienten mit und ohne Harnblasenkarzinom in ihrer Vorgeschichte aufgeschlüsselt worden, um auch hier deren grundlegende Wertigkeit in Bezug auf Primär- und Rezidivdiagnostik bewerten zu können.

Modifizierte Auswertung	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
<i>Gesamtkollektiv</i>	64,0 %	81,1 %	48,5 %	89,0 %	77,4 %	0,73
<i>Primärdiagnostik</i>	61,8 %	86,4 %	47,4 %	92,0 %	82,4 %	0,75
<i>Rezidivdiagnostik</i>	65,9 %	72,0 %	49,4 %	83,6 %	70,2 %	0,69

**Tab. 22: Wertigkeit des modifizierten Testverfahrens in Primär- und Rezidivdiagnostik.** Auswertestrategie aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.

### 3.1.6 Ergebnisse der Urinzytologie

Die Ergebnisse der verschiedenen Auswertekonzepte der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden mit den Ergebnissen der Urinzytologie – dem bisherigen Goldstandard der nicht-invasiven Harnblasenkarzinomdiagnostik – verglichen.

Von 1048 Patienten des Diagnostikkollektivs konnte bei 1015 Patienten (96,9 %) das Ergebnis der Urinzytologie ausgewertet werden. Hiervon hatten 788 Patienten (77,6 %) zum Zeitpunkt der Urinabnahme nachweislich kein Harnblasenkarzinom, 227 Patienten (22,4 %) dagegen einen positiven Tumornachweis. Die daraus berechnete Sensitivität der Urinzytologie betrug im Diagnostikkollektiv 70,0 %, ihre Spezifität 82,3 %.

	Zytologie negativ	Zytologie positiv
Tumorhistologie negativ	652	140
Tumorhistologie positiv	67	156

**Tab. 23: Kontingenztabelle der Tumorhistologie nach Ergebnis der Zytologie.**  
Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Der positiv prädiktive Wert (PPV) oder die Genauigkeit der Urinzytologie betrug 52,7 %. Korrekt als negativ erkannt an der Gesamtheit der als negativ erkannten Ergebnisse wurden mit der Zytologie 90,7 % der Ergebnisse, was dem negativ prädiktiven Wert (NPV) und damit der Trennfähigkeit des Tests entspricht. Die diagnostische Genauigkeit (accuracy) dieser Untersuchung in unserem Kollektiv betrug somit 79,6 %.

Zur Beurteilung der Wertigkeit der Urinzytologie in Primär- oder Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms, sind im Folgenden auch ihre Ergebnisse nach Patienten mit positiver und negativer Tumoranamnese getrennt aufgelistet.

Auswertung der Zytologie	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
<i>Gesamtkollektiv</i>	70,0 %	82,3 %	52,7 %	90,7 %	79,6 %	0,76
<i>Primärdiagnostik</i>	71,0 %	87,8 %	53,8 %	93,8 %	85,0 %	0,79
<i>Rezidivdiagnostik</i>	69,1 %	72,9 %	51,8 %	84,9 %	71,8 %	0,71

**Tab. 24: Wertigkeit der Urinzytologie in Primär- und Rezidivdiagnostik.** Auswertung aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC.



### 3.1.7 Übersicht aller Auswertungen im Diagnostikkollektiv

Nachfolgende Tabelle gibt noch einmal einen Überblick über die Sensitivität, Spezifität und Wertigkeit der verschiedenen Auswertestrategien und kann zum Vergleich der einzelnen Diagnoseverfahren verwendet werden. Sämtliche abgebildeten Werte waren signifikant mit einem p-Wert < 0,001.

		Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
<b>Auswertung der FISH Ergebnisse nach Abbott Molecular</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	71,9%	69,3%	39,4%	89,9%	69,8%	0,71
	<i>Primärdiagnostik</i>	72,6%	74,4%	35,9%	93,2%	74,1%	0,74
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	71,4%	60,5%	42,9%	83,6%	63,7%	0,66
<b>Auswertung der FISH Ergebnisse nach Bubendorf et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	76,8%	62,8%	36,5%	90,7%	65,8%	0,69
	<i>Primärdiagnostik</i>	74,5%	67,3%	31,0%	93,0%	68,4%	0,71
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	78,6%	55,3%	42,1%	86,2%	62,1%	0,67
<b>Auswertung der FISH Ergebnisse nach Zellweger et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	68,4%	78,8%	47,3%	89,9%	76,5%	0,74
	<i>Primärdiagnostik</i>	65,7%	84,3%	45,3%	92,6%	81,2%	0,75
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	70,6%	69,4%	48,9%	85,1%	69,8%	0,7
<b>Auswertung der FISH Ergebnisse nach Fritsche et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	58,3%	85,0%	52,0%	88,0%	79,2%	0,72
	<i>Primärdiagnostik</i>	54,9%	90,9%	54,4%	91,1%	85,0%	0,73
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	61,1%	75,0%	50,3%	82,3%	70,9%	0,68
<b>Modifizierte Auswertung der FISH Ergebnisse</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	64,0%	81,1%	48,5%	89,0%	77,4%	0,73
	<i>Primärdiagnostik</i>	61,8%	86,4%	47,4%	92,0%	82,4%	0,75
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	65,9%	72,0%	49,4%	83,6%	70,2%	0,69
<b>Auswertung der Urinzytologie</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	70,0%	82,3%	52,7%	90,7%	79,6%	0,76
	<i>Primärdiagnostik</i>	71,0%	87,8%	53,8%	93,8%	85,0%	0,79
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	69,1%	72,9%	51,8%	84,9%	71,8%	0,71

**Tab. 25: Tabellarische Übersicht der Auswerteverfahren im Diagnostikkollektiv.** Aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC; grün ≙ im Vergleich der jeweiligen Spalte hohe Werte, rot ≙ im Vergleich der jeweiligen Spalte niedrige Werte.

Um das volle Potential der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auszuschöpfen und die Spannweite der Untersuchung zu erweitern, wurde früh die Idee entwickelt, diese mit anderen Urinmarkertests oder den Ergebnissen der Urinzytologie zu kombinieren (Birkhahn et al. 2007; Campos-Fernandes et al. 2007; Horstmann et al. 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Urinzytologie mit den Ergebnissen der FISH-Befunde – aufgeschlüsselt nach deren Auswertestrategie – kombiniert. Ein positiver Kombinationsbefund lag demnach nur bei auffälliger oder positiver Urinzytologie bei gleichzeitig positiver FISH-Untersuchung vor. Im Folgenden sind die einzelnen Kombinationen nach ihrer Sensitivität, Spezifität und Wertigkeit in Primär- und Rezidivdiagnostik aufgeschlüsselt. Alle Angaben waren signifikant mit einem p-Wert < 0,001.

Kombination von...		Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC
<b>Urinzytologie + FISH Ergebnisse nach Abbott Molecular</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	60,9%	86,4%	55,2%	88,9%	80,9%	0,74
	<i>Primärdiagnostik</i>	62,4%	91,4%	58,9%	92,5%	86,7%	0,77
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	59,7%	77,9%	52,5%	82,5%	72,6%	0,69
<b>Urinzytologie + FISH Ergebnisse nach Bubendorf et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	63,1%	86,5%	56,4%	89,5%	81,5%	0,75
	<i>Primärdiagnostik</i>	62,4%	91,0%	57,8%	92,5%	86,3%	0,77
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	63,7%	78,9%	55,2%	84,2%	74,5%	0,71
<b>Urinzytologie + FISH Ergebnisse nach Zellweger et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	58,2%	88,5%	58,2%	88,5%	82,0%	0,74
	<i>Primärdiagnostik</i>	56,4%	93,2%	62,0%	91,6%	87,2%	0,75
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	59,7%	80,5%	55,6%	83,0%	74,5%	0,70
<b>Urinzytologie + FISH Ergebnisse nach Fritsche et al.</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	53,1%	89,6%	58,5%	87,4%	81,7%	0,71
	<i>Primärdiagnostik</i>	51,0%	94,0%	62,7%	90,7%	86,9%	0,73
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	54,8%	82,2%	55,7%	81,6%	74,2%	0,69
<b>Urinzytologie + Modifizierte Auswertung der FISH Ergebnisse</b>	<i>Gesamtkollektiv</i>	56,2%	88,8%	58,0%	88,0%	81,7%	0,73
	<i>Primärdiagnostik</i>	54,9%	93,6%	62,9%	91,3%	87,2%	0,75
	<i>Rezidivdiagnostik</i>	57,3%	80,5%	54,6%	82,2%	73,8%	0,69

**Tab. 26: Tabellarische Übersicht der Auswertung der Urinzytologie in Kombination mit den Auswerteverfahren der FISH im Diagnostikkollektiv.** Aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC; grün ≙ im Vergleich der jeweiligen Spalte hohe Werte, rot ≙ im Vergleich der jeweiligen Spalte niedrige Werte.

## 3.2 Prognostikkollektiv

### 3.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Im Prognostikkollektiv waren von 122 untersuchten Patienten 103 männlich und 19 Patienten weiblich. Dies entsprach einem Geschlechterverhältnis von 84,4 % : 15,6 % (Männer : Frauen). Das mittlere Alter des Kollektivs betrug zum Zeitpunkt der Probenentnahme 69,7 Jahre mit einer Standardabweichung von 10,8 Jahren. Der Median lag bei 70 Jahren. Der jüngste Patient war zum Untersuchungszeitpunkt 35 Jahre, der älteste 96 Jahre alt.

<b>Eigenschaften des Prognostikkollektivs</b>	Anzahl der gesamten Patienten des Follow-Up, n	122
	Alter, Median (Range)	70 (35-96)
	Geschlecht (männlich / weiblich), n	103 / 19
	Anzahl der Patienten ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up, n (% aller Patienten des Follow-Up)	84 (68,9)
	Anzahl der Patienten mit Rezidiv zum Ende des Follow-Up, n (% aller Patienten des Follow-Up)	39 (31,9)
	Zeit bis zum Auftreten des Rezidiv oder Ende des Follow-Up in Monaten, Median (Range)	24 (1-24)
	Zeit seit letztem Tumor bis zu Beginn des Follow-Up in Monaten, Median (Range)	7 (1-289)
	Zeit bis zum Auftreten des Rezidiv in Monaten, Median (Range)	12 (1-24)
	Zeit bis zum Auftreten einer Progression in Monaten, Median (Range)	12,5 (1-23)

Tab. 27: Grundlegende Eigenschaften des Prognostikkollektivs.

### 3.2.2 Lokalisation und Tumorstadium

Entsprechend der Einschlusskriterien des Prognostikkollektivs hatten alle Patienten kurz vor Beginn der Studie ein durch histologische Analyse von Gewebeproben nachgewiesenes nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom. Startpunkt der Studie war der Zeitpunkt der ersten negativen Zystoskopie nach Therapie dieses vorangegangenen Harnblasenkarzinoms.

Bei der Studienpopulation des Prognostikkollektivs handelte es sich ausschließlich um Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen in der Anamnese. Es wiesen 75 Patienten (61,5 %) beim letzten Tumor vor Studienbeginn das Stadium Ta, 32 Patienten (26,2 %) das Stadium T1 auf und

bei 5 Patienten (4,1 %) war das T-Stadium des letzten nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms von seiten der Pathologie nicht genauer spezifiziert, da der letzte Tumor mehr als zehn Jahre zurück lag. Im histopathologischen Grading wurden 53 Patienten (43,5 %) ein G1-Tumor, 38 Patienten (31,1 %) ein G2-Tumor und 16 Patienten (13,1 %) ein G3-Tumor als letzter Tumor vor Studienbeginn zugewiesen. Bei 5 Patienten (4,1 %) handelte es sich beim letzten Tumor um ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom mit nicht genauer spezifizierbarem G-Stadium. In 26 Fällen (21,3 %) konnte schon einmal ein G3-Tumor in der Patientenanamnese ermittelt werden. Ein CIS konnte bei 22 der 122 Patienten (18,0 %) im letzten Tumor vor Studienbeginn diagnostiziert werden. Bei 12 Patienten (9,8 %) bestanden Anteile eines CIS in weiterer Lokalisation zusätzlich zum Tumor, bei 10 Patienten (8,2 %) wurde ausschließlich ein CIS nachgewiesen. Anamnestisch wurden jedoch bei 26 (21,3 %) der 122 im Kollektiv eingeschlossenen Patienten in der Vergangenheit schon einmal ein CIS nachgewiesen.

Im Median wurden die Patienten 24 Monate nachbeobachtet. Innerhalb dieser Zeit entwickelten sie ein Rezidiv oder überlebten die 24 Monate rezidivfrei. Zum Ende des Nachbeobachtungszeitraums hatten 39 Patienten (31,9 %) einen Rezidivtumor. Die Zeit bis zum Auftreten dieses Rezidivs betrug im Median 12,3 Monate. 29 dieser 39 Rezidive (74,4 %) entsprachen der Gruppe der nicht-muskelinvasiven Karzinome (Ta oder T1), 2 (5,1 %) davon waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits muskelfiltrierend. Im histopathologischen Grading hatten 16 Patienten (41,0 %) einen G1-Rezidivtumor, 9 Patienten (23,1 %) einen G2-Rezidivtumor und 7 Patienten (17,9 %) einen G3-Rezidivtumor. Bei 12 der 39 Rezidivpatienten (30,8 %) konnte im Rezidivtumor ein CIS nachgewiesen werden. 5 Patienten (12,8 %) hatten Anteile eines CIS zusätzlich zum Rezidivtumor, bei 7 Patienten (17,9 %) wurde ausschließlich ein CIS als Rezidivtumor diagnostiziert. Nur 5 der 39 Rezidivtumorpatienten (12,8 %) wiesen jedoch sowohl Anteile eines CIS im letzten Tumor vor Studienbeginn auf und bildeten auch im Rezidivtumor wieder Anteile eines CIS aus.

In 14 Fällen (11,5 %) entwickelten Patienten im Falle ihres Rezidiv ein höheres T- oder G-Tumorstadium oder zum ersten Mal in ihrer Tumorgeschichte ein CIS und damit eine Progression. Diese Progression wurde im Median nach 12,5 Monaten erreicht. Eine Progression in ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom entwickelten nur 2 Patienten (5,3 %) des Kollektivs.

Nachfolgende Tabelle gibt detaillierten Aufschluss über die Verteilung der Primär- und Rezidivtumorstadien der Patienten des Prognostikkollektivs.

		Letzter Tumor	Bisher höchster Tumorgrad	Rezidivtumor
<b>Verteilung nach Tumorstadium</b>	<i>T-Stadium</i>	n (% aller Patienten des Follow-Up)	n (% aller Patienten des Follow-Up)	n (% aller Patienten mit Rezidivtumor)
	Ta	75 (61,5)	71 (58,2)	24 (61,5)
	T1	32 (26,2)	36 (29,5)	5 (12,8)
	T2	- -	- -	2 ( 5,1)
	T3	- -	- -	1 ( 2,6)
	NMIBC - nicht genauer spezifiziert	5 ( 4,1)	5 ( 4,1)	- -
	<i>G-Stadium</i>			
	G1	53 (43,5)	48 (39,3)	16 (41,0)
	G2	38 (31,1)	42 (34,4)	9 (23,1)
	G3	16 (13,1)	17 (14,0)	7 (17,9)
	NMIBC - nicht genauer spezifiziert	5 ( 4,1)	5 ( 4,1)	- -
	<b>CIS</b>			
	CIS gesamt	22 (18,0)	26 (21,3)	12 (30,8)
	zusätzlich CIS	12 ( 9,8)	16 (13,1)	5 (12,8)
	ausschließlich CIS	10 ( 8,2)	10 ( 8,2)	7 (17,9)

Tab. 28: Statistische Verteilung der Tumorstadien der Patienten des Prognostikkollektivs

### 3.2.3 Überlebenswahrscheinlichkeiten

Kaplan-Meier-Schätzer wurden zur Beurteilung der Überlebenswahrscheinlichkeit im Rahmen einer Ereigniszeitanalyse verwendet. Dadurch konnte das 24 Monate rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben aller Patienten des Prognostikkollektivs ermittelt werden. Dieses betrug 66,9 % für das Rezidiv bzw. 86,6 % für den Progress. Die detaillierten Überlebenswahrscheinlichkeiten können den nachstehenden Kaplan-Meier-Kurven für das Prognostikkollektiv entnommen werden.

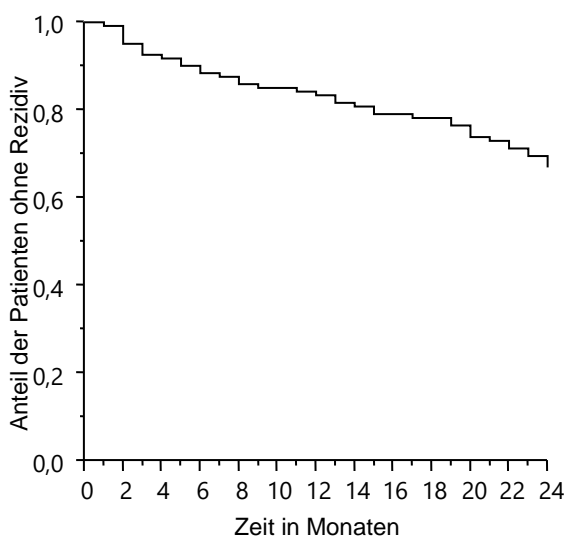


Abb. 6: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv im gesamten Prognostikkollektiv.

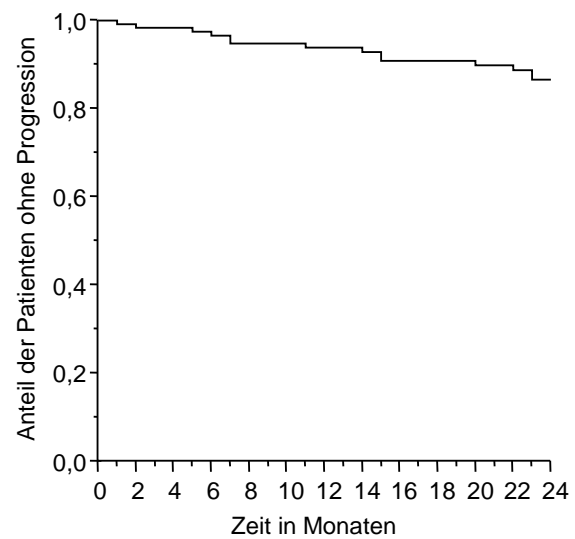


Abb. 7: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv im gesamten Prognostikkollektiv.

### 3.2.4 Univariable Varianzanalysen

Im Rahmen univariabler Cox-Regressionsanalysen wurden klinische Faktoren ermittelt, die einen Einfluss auf die Zeit bis zum Eintreten eines Rezidivs oder einer Tumorprogression haben. Hierbei konnte ermittelt werden, dass eine Zeit von < 6 Monaten seit dem letzten Tumor vor Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p < 0,001$ ) sowie der homozygote Verlust des Lokus 9p21 in > 12 Zellkernen im Befund ( $p = 0,015$ ) mit einem erhöhten Risiko einhergeht, im Laufe des Follow-Up einen Rezidivtumor zu entwickeln. Der Tumorgrad des letzten Tumors sowie der bisher höchste Tumorgrad hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Rezidivrisiko.

Parameter	Hazard Ratio (HR)	95 % Konfidenzintervall (CI)	p-Wert
Letzter Tumor High-Risk vs. Low-Risk	1,07	0,56 - 2,02	0,837
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	1,10	0,58 - 2,10	0,761
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,43	2,26 - 9,31	<b>&lt; 0,001</b>
Homozygoter Verlust des Lokus 9p21 in < vs. ≥ 12 Zellkernen	11,77	1,82 - 43,55	<b>0,015</b>

**Tab. 29: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

Ein Zeitraum von < 6 Monaten seit dem letzten Tumor vor Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,008$ ) geht darüber hinaus auch mit einem erhöhten Risiko einer Tumorprogression im Falle des Rezidivs einher während dieses bei homozygotem Verlust des Lokus 9p21 in > 12 Zellkernen im Befund zumindest auffällig ist ( $p=0,057$ ). Der Tumorgrad des letzten Tumors sowie der bisher höchste Tumorgrad hatten hier ebenfalls keinen Einfluss auf das Progressionsrisiko.

Parameter	Hazard Ratio (HR)	95 % Konfidenzintervall (CI)	p-Wert
Letzter Tumor High-Risk vs. Low-Risk	1,31	0,45 - 3,83	0,613
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	1,97	0,68 - 6,41	0,213
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,36	1,45 - 15,95	<b>0,008</b>
Homozygoter Verlust des Lokus 9p21 in < vs. ≥ 12 Zellkernen	17,27	0,90 - 108,84	0,057

**Tab. 30: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Werts. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

Anhand der Ergebnisse dieser univariablen Cox-Regressionsanalysen wurden die jeweiligen ‚FISH-Auswertestrategie‘, die ‚Zeit seit letztem Tumor vor Beginn des Nachbeobachtungszeitraums‘ sowie der ‚höchste Tumorgrad bisher‘ als Faktoren festgelegt, die in die multivariablen Analysen in den folgenden Abschnitten mit einfließen.

### 3.2.5 Verteilung chromosomaler Veränderungen

Im Prognostikkollektiv wurden die Verteilung der chromosomalen Veränderungen im Zellkern danach differenziert, ob die Nachbeobachtung eines Patienten mit seiner Rezidivdiagnose endete, dieser über 24 Monate rezidivfrei blieb oder ob im Rezidivfall ein Progress im Vergleich zum Primärtumor vorlag.

Patienten mit Rezidiv zum Ende des Follow-Up hatten in der FISH-Analyse der 25 Zellkerne im Median in etwa 3 Zellkernen eine Vermehrung von Chromosom 3, 7 oder 17, in 3 Zellkernen eine Vermehrung von mindestens 2 dieser Chromosomen gleichzeitig und in 2 Zellkernen sogar eine Vermehrung aller drei Chromosomen, hiervon ausgenommen tetraploide Zellkerne. Bei Patienten ohne Rezidiv im Verlauf des Follow-Up konnten diese chromosomalen Aberrationen im Median in einem Zellkern weniger nachgewiesen werden.

Im Bezug auf den Progress im Rezidivfall waren die Ergebnisse deutlich heterogener. Hier hatten Patienten mit Progress im Median in etwa 7 Zellkernen eine Vermehrung von Chromosom 3, 7 oder 17, in 8 Zellkernen eine Vermehrung von mindestens 2 dieser Chromosomen gleichzeitig und in 6 Zellkernen sogar eine Vermehrung aller drei Chromosomen, hiervon ausgenommen tetraploide Zellkerne. Bei Patienten ohne Progress im Rezidivfall konnte im Median in 2 Zellkernen eine Vermehrung des Chromosoms 3 und Chromosoms 7, in 1 Zellkern eine Vermehrung des Chromosoms 17, in 2 Zellkernen die Vermehrung von mindestens 2 dieser Chromosomen gleichzeitig und in 1 Zellkern die Vermehrung aller drei Chromosomen gleichzeitig, ausgenommen tetraploide Zellkerne, nachgewiesen werden.

Die Anzahl der Zellkerne mit homozygotem oder heterozygotem Verlust des Locus 9p21 war in Bezug auf Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress im Rezidivfall bei beiden Endpunkten im Median etwa gleich. Ebenso wenig unterschied sich die Anzahl der tetraploiden Zellkerne in den beiden Klassen im Median. Die Anzahl der Zellkerne mit homozygotem Verlust des Locus 9p21 war im Kollektiv lediglich bei Patienten mit einem Rezidiv im Nachbeobachtungszeitraum signifikant erhöht, während die Anzahl der Zellkerne mit relativem Verlust des Locus 9p21 nach Zellweger et al. im Kollektiv bei



Patienten mit Progress im Rezidivfall signifikant erhöht war. Auffällig blieben weiterhin der deutliche Unterschied in der Spannweite der chromosomalen Veränderungen bei den beiden Endpunkten und die Tatsache, dass lediglich eine chromosomale Aberration der Chromosomen 3, 7 oder 17 bzw.  $\geq 2$  dieser Chromosomen zugleich sowie der Verlust des Lokus 9p21 einen signifikanten Zusammenhang herstellen konnten.

Art der Zellkernveränderung	Anzahl der Zellen im Befund mit jeweiliger Zellkernveränderung bei		AUC	p-Wert
	Rezidiv zum Ende des Follow-Up	kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up		
<i>Vermehrung von..., Median (Spannweite)</i>				
Chromosom 3	3 (0-23)	1 (0-13)	0,63	<b>0,010</b>
Chromosom 7	3 (0-22)	1 (0-12)	0,62	<b>0,012</b>
Chromosom 17	2 (0-23)	1 (0-11)	0,62	<b>0,004</b>
> 1 dieser Chromosomen	3 (0-23)	2 (0-13)	0,62	<b>0,015</b>
> 2 dieser Chromosomen	2 (0-22)	1 (0-11)	0,62	<b>0,004</b>
<i>Verlust von..., Median (Spannweite)</i>				
Lokus 9p21 insgesamt	0 (0-23)	0 (0- 6)	0,58	<b>0,016</b>
Lokus 9p21 homozygot	0 (0-22)	0 (0- 5)	0,55	<b>0,036</b>
Lokus 9p21 heterozygot	0 (0- 4)	0 (0- 4)	0,56	0,146
Lokus 9p21 relativ (Zellweger et al.)	1 (0-11)	1 (0- 7)	0,56	0,060
Tetraploide Zellkerne, Median (Spannweite)	0 (0- 7)	0 (0- 3)	0,55	0,069

**Tab. 31: Verteilung der chromosomalen Veränderungen im Prognostikkollektiv in Bezug auf Rezidiv zum Ende des Follow-Up.** Anzahl chromosomaler Aberrationen je nach Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up. Statistisch signifikante Werte fett markiert .

Art der Zellkernveränderung	Anzahl der Zellen im Befund mit jeweiliger Zellkernveränderung bei		AUC	p-Wert
	Progress im Rezidivfall	kein Progress im Rezidivfall		
<i>Vermehrung von..., Median (Spannweite)</i>				
Chromosom 3	7 (0-23)	2 (0-13)	0,69	<b>0,001</b>
Chromosom 7	7,5 (0-22)	2 (0-14)	0,69	<b>0,001</b>
Chromosom 17	6,5 (0-23)	1 (0-14)	0,69	<b>0,001</b>
> 1 dieser Chromosomen	7,5 (0-23)	2 (0-14)	0,69	<b>0,001</b>
> 2 dieser Chromosomen	6 (0-22)	1 (0-11)	0,68	<b>0,001</b>
<i>Verlust von..., Median (Spannweite)</i>				
Lokus 9p21 insgesamt	0 (0-23)	0 (0-15)	0,60	<b>0,028</b>
Lokus 9p21 homozygot	0 (0-22)	0 (0-15)	0,61	0,050
Lokus 9p21 heterozygot	0 (0- 4)	0 (0- 4)	0,58	0,156
Lokus 9p21 relativ (Zellweger et al.)	2,5 (0-11)	1 (0- 9)	0,68	<b>0,002</b>
Tetraploide Zellkerne, Median (Spannweite)	0 (0- 4)	0 (0- 7)	0,52	0,716

**Tab. 32: Verteilung der chromosomalen Veränderungen im Prognostikkollektiv in Bezug auf Progress im Rezidivfall.** Anzahl chromosomaler Aberrationen je nach Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up. Statistisch signifikante Werte fett markiert .

### 3.2.6 Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

#### 3.2.6.1 Auswertung nach den Kriterien von Abbott Molecular

Die Anteile der Patienten mit und ohne Rezidiv innerhalb von 24 Monaten sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor nach den vom Hersteller empfohlenen Testkriterien sind in der nachstehenden Tabelle nach positiven bzw. negativen FISH-Ergebnis zu Beginn der Nachbeobachtung aufgeteilt.

	Abbott Molecular FISH negativ	Abbott Molecular FISH positiv
Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up	56	27
Rezidiv zum Ende des Follow-Up	16	23

Tab. 33: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Abbott Molecular FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Abbott Molecular FISH negativ	Abbott Molecular FISH positiv
Kein Progress beim Rezidivtumor	67	41
Progress beim Rezidivtumor	5	9

Tab. 34: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach Abbott Molecular FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Das 24 Monate rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben bei Patienten mit negativem FISH-Ergebnis nach Abbott Molecular betrug 76,90 % bzw. 92,23 % im Gegensatz zu 52,78 % bzw. 77,75 % bei Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,0126$  für Rezidiv;  $p=0,0573$  für Progression). Grafisch ist dieses Verhältnis in den folgenden Kaplan-Meier-Kurven abgebildet.

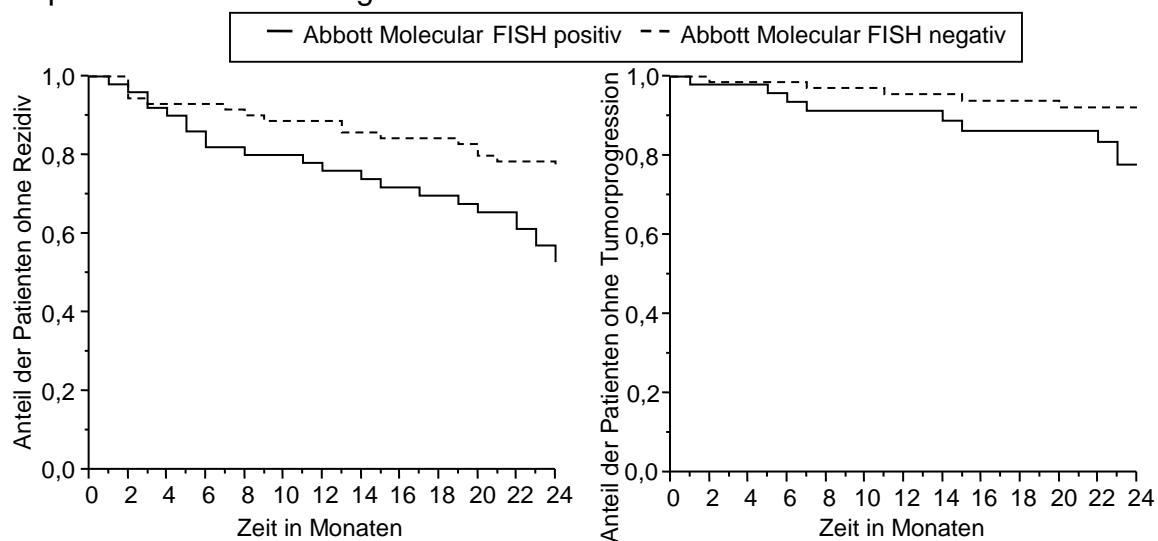


Abb. 8: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Abbott Molecular ( $p=0,0126$ ).

Abb. 9: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Abbott Molecular ( $p=0,0573$ ).

In der univariablen Cox-Regressionsanalyse war ein positives FISH-Ergebnis nach den Kriterien von Abbott Molecular ein signifikanter Risikofaktor sowohl für ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up, als auch für eine Progression des Tumors beim Rezidiv ( $p=0,0095$  und  $p=0,0491$ ). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigte sich eine positive FISH-Analyse nach Abbott Molecular als signifikanter Risikofaktor für ein Rezidiv und eine Progression jedoch nicht ( $p=0,0705$  für Rezidiv;  $p=0,1278$  für Progression).

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Abbott Molecular FISH positiv vs. negativ	2,31	1,23-4,45	<b>0,009</b>	2,91	1,00-9,47	<b>0,049</b>

**Tab. 35: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Abbott Molecular FISH positiv vs. negativ	1,86	0,97-3,67	0,0632	2,29	0,77-7,66	0,1372
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,71	1,85-7,93	<b>0,0002</b>	3,33	1,07-12,49	<b>0,0369</b>
Höchster Tumorstadium bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,83	0,43-1,61	0,5870	1,47	0,49-4,89	0,4918
2 Parameter- Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Abbott Molecular FISH positiv vs. negativ	1,81	0,95-3,52	0,0705	2,32	0,79-7,64	0,1278
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,97	2,00-8,42	<b>0,0001</b>	3,75	1,23-13,91	<b>0,0196</b>

**Tab. 36: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.2.6.2 Auswertung nach den Kriterien von Bubendorf et al.

Die Anzahl der Patienten mit und ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor ist im Folgenden je nach FISH-Ergebnis nach der Auswertestrategie von Bubendorf et al. zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums aufgelistet.

	Bubendorf FISH negativ	Bubendorf FISH positiv
<b>Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	50	33
<b>Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	15	24

Tab. 37: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Bubendorf et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Bubendorf FISH negativ	Bubendorf FISH positiv
<b>Kein Progress beim Rezidivtumor</b>	59	49
<b>Progress beim Rezidivtumor</b>	6	8

Tab. 38: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach Bubendorf et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Rezidiv- bzw. progressionsfrei überlebten die 24 Monate 75,96 % bzw. 89,72 % der Patienten mit negativem FISH-Ergebnis nach Bubendorf et al., verglichen mit 56,92 % bzw. 82,57 % der Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,0642$  für Rezidiv;  $p=0,4547$  für Progression). In den folgenden Kaplan-Meier-Kurven ist diese Beziehung nachzuvollziehen.

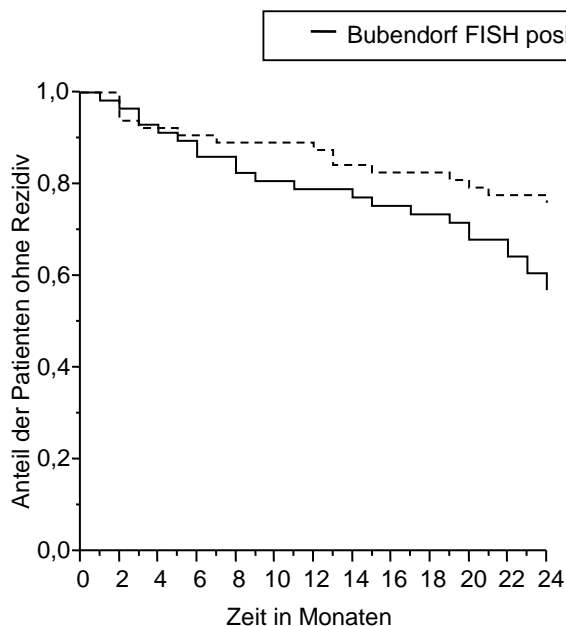


Abb. 10: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Bubendorf et al. ( $p=0,0642$ ).

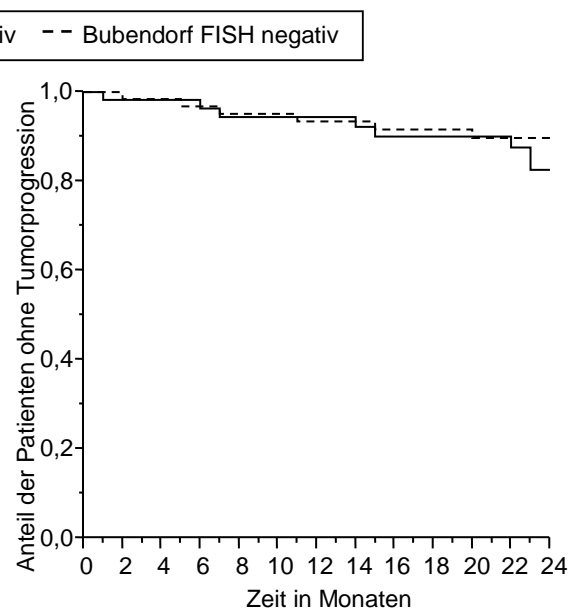


Abb. 11: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Bubendorf et al. ( $p=0,4547$ ).

Ein positives FISH-Ergebnis nach den Kriterien von Bubendorf et al. steigerte in der univariablen Cox-Regressionsanalyse signifikant das Rezidivrisiko im Follow-Up, hatte jedoch keinen Einfluss auf den Progress beim Rezidivtumor ( $p=0,043$  und  $p=0,373$ ). Auch in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse der signifikantesten klinischen Werte konnte keine Verbindung zwischen einem positiven FISH-Ergebnis nach Bubendorf et al. und einem erhöhten Risiko, ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up oder einen Tumorprogress beim Rezidiv zu entwickeln, gefunden werden.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Bubendorf FISH positiv vs. negativ	1,93	1,02-3,76	<b>0,043</b>	1,61	0,56-4,90	0,373

**Tab. 39: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Bubendorf FISH positiv vs. negativ	1,85	0,95-3,70	0,0719	1,79	0,59-6,07	0,3059
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,06	2,04-8,62	<b>&lt;0,0001</b>	3,73	1,22-13,82	<b>0,0206</b>
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate- Risk	0,78	0,39-1,53	0,4636	1,48	0,48-5,04	0,4967
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Bubendorf FISH positiv vs. negativ	1,74	0,92-3,40	0,0875	1,47	0,51-4,47	0,4760
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,25	2,17-8,96	<b>&lt;0,0001</b>	4,25	1,41-15,56	<b>0,0096</b>

**Tab. 40: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.2.6.3 Auswertung nach den Kriterien von Zellweger et al.

Die Auswertestrategie nach Zellweger et al. legt einen besonderen Fokus auf den relativen Verlust des Lokus 9p21 und ist speziell zur Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms entwickelt worden. Die Anteile der Patienten mit und ohne Rezidiv innerhalb von 24 Monaten bzw. mit und ohne Progress beim Rezidivtumor sind nun in Abhängigkeit zum FISH-Ergebnis nach dieser Auswertung zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums bestimmt worden.

	Zellweger FISH negativ	Zellweger FISH positiv
<b>Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	58	25
<b>Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	21	18

Tab. 41: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Zellweger et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Zellweger FISH negativ	Zellweger FISH positiv
<b>Kein Progress beim Rezidivtumor</b>	73	35
<b>Progress beim Rezidivtumor</b>	6	8

Tab. 42: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach Zellweger et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Das rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben über 24 Monate der Patienten mit negativem FISH-Ergebnis lag nach den Kriterien von Zellweger et al. bei 72,43 % bzw. 91,41 % gegenüber 56,73 % bzw. 77,37 % bei Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Beobachtungszeitraums ( $p=0,1499$  für Rezidiv;  $p=0,0962$  für Progression).

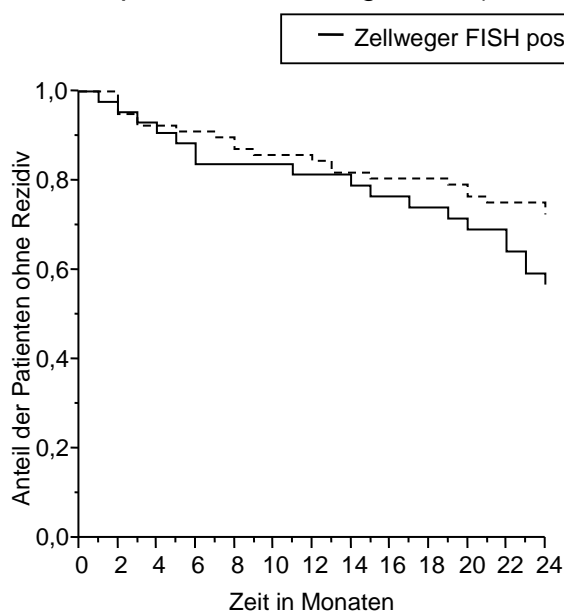


Abb. 12: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidivs. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Zellweger et al. ( $p=0,1499$ ).

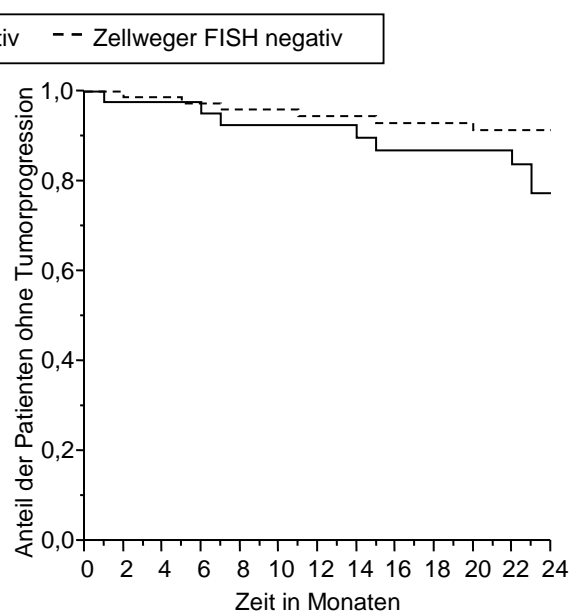


Abb. 13: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Zellweger et al. ( $p=0,0962$ ).

Die univariable Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass ein positives FISH-Ergebnis nach den Kriterien von Zellweger et al. das Rezidivrisiko im Allgemeinen sowie das Risiko einer Tumorprogression im Rezidivfall nicht beeinflusste. In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse mit den signifikantesten klinischen Einflussparametern stand ein positives FISH-Ergebnis nach diesen Kriterien in keinem signifikanten Zusammenhang zu einem erhöhten Rezidiv- oder Progressionsrisiko.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Zellweger FISH positiv vs. negativ	1,66	0,87-3,12	0,1192	2,58	0,89-7,84	0,078

**Tab. 43: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Zellweger FISH positiv vs. negativ	1,47	0,75-2,85	0,2582	2,17	0,73-6,81	0,1632
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,98	2,00-8,44	<b>&lt;0,0001</b>	3,59	1,17-13,32	<b>0,0244</b>
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,84	0,43-1,63	0,6019	1,38	0,46-4,66	0,5722
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Zellweger FISH positiv vs. negativ	1,41	0,74-2,66	0,2886	2,21	0,76-6,77	<b>0,1404</b>
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,26	2,17-8,98	<b>&lt;0,0001</b>	3,98	1,32-14,63	<b>0,0138</b>

**Tab. 44: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.2.6.4 Auswertung nach den Kriterien von Fritsche et al.

Die Anteile der Patienten mit und ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor sind anschließend in Abhängigkeit zum FISH-Ergebnis nach der Auswertestrategie von Fritsche et al. zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums dargestellt.

	Fritsche FISH negativ	Fritsche FISH positiv
Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up	61	22
Rezidiv zum Ende des Follow-Up	21	18

Tab. 45: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Fritsche et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Fritsche FISH negativ	Fritsche FISH positiv
Kein Progress beim Rezidivtumor	76	32
Progress beim Rezidivtumor	6	8

Tab. 46: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach Fritsche et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Nach 24 Monaten betrug das rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben bei Patienten mit negativem FISH-Ergebnis nach Fritsche 73,30 % bzw. 91,72 % gegenüber 54,19 % bzw. 75,80 % bei Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,0713$  für Rezidiv;  $p=0,0579$  für Progression).

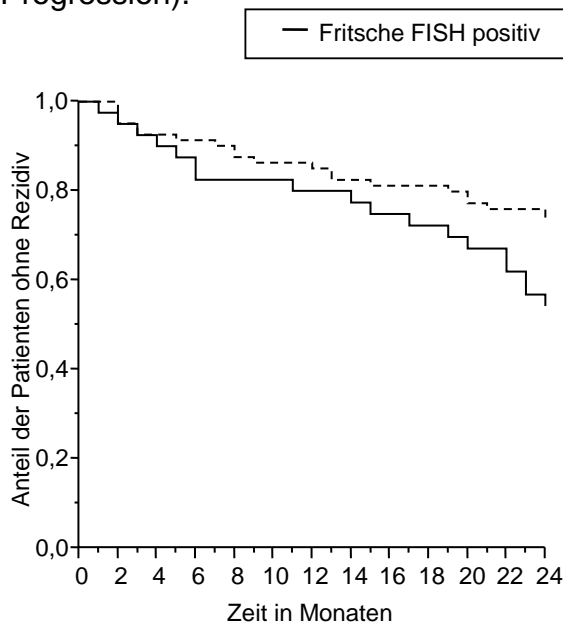


Abb. 14: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Fritsche et al. ( $p=0,0713$ ).

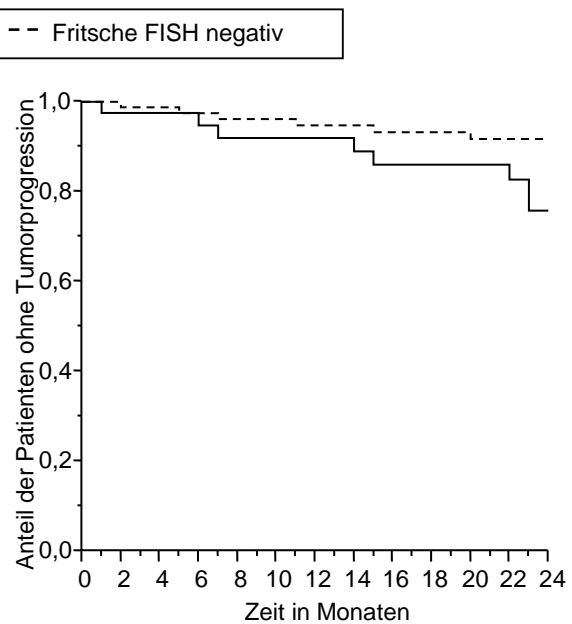


Abb. 15: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Fritsche et al. ( $p=0,0579$ ).



Nach der Auswertestrategie von Fritsche et al. erhöhte ein positives FISH-Ergebnis in der univariablen Cox-Regressionsanalyse annähernd signifikant sowohl das Rezidivrisiko während des Follow-Up als auch das Risiko eines Progress beim Rezidivtumor ( $p=0,058$  und  $p=0,049$ ). In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse steigerte das positive FISH-Ergebnis nach Fritsche et al. zu Beginn des Follow-Up das allgemeine Rezidivrisiko sowie das Progressionsrisiko nicht signifikant.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Fritsche FISH positiv vs. negativ	1,86	0,98-3,49	0,058	2,89	1,00-8,78	<b>0,049</b>

**Tab. 47: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Fritsche FISH positiv vs. negativ	1,69	0,87-3,25	0,1198	2,55	0,87-7,90	0,0874
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,96	1,99-8,41	<b>&lt;0,0001</b>	3,58	1,17-13,27	<b>0,0245</b>
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,84	0,43-1,62	0,5946	1,41	0,47-4,69	0,5439
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Fritsche FISH positiv vs. negativ	1,63	0,86-3,07	0,1333	2,55	0,88-7,79	0,0825
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,23	2,16-8,92	<b>&lt;0,0001</b>	3,99	1,33-14,67	<b>0,0132</b>

**Tab. 48: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.2.6.5 Auswertung nach den Kriterien von Mian et al.

Im Folgenden ist die Anzahl der Patienten mit und ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor je nach FISH-Ergebnis nach der Auswertestrategie von Mian et al. zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums aufgelistet.

	Mian FISH negativ	Mian FISH positiv
Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up	56	27
Rezidiv zum Ende des Follow-Up	20	19

Tab. 49: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Mian et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Mian FISH negativ	Mian FISH positiv
Kein Progress beim Rezidivtumor	70	38
Progress beim Rezidivtumor	6	8

Tab. 50: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach Mian et al. FISH-Ergebnis. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Rezidiv- bzw. progressionsfrei überlebten die 24 Monate 72,69 % bzw. 91,02 % der Patienten mit negativem FISH-Ergebnis nach Mian et al. im Vergleich zu 57,37 % bzw. 79,18 % der Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,1965$  für Rezidiv;  $p=0,1608$  für Progression). Diese Differenz ist in den folgenden Kaplan-Meier-Kurven nachzuvollziehen.

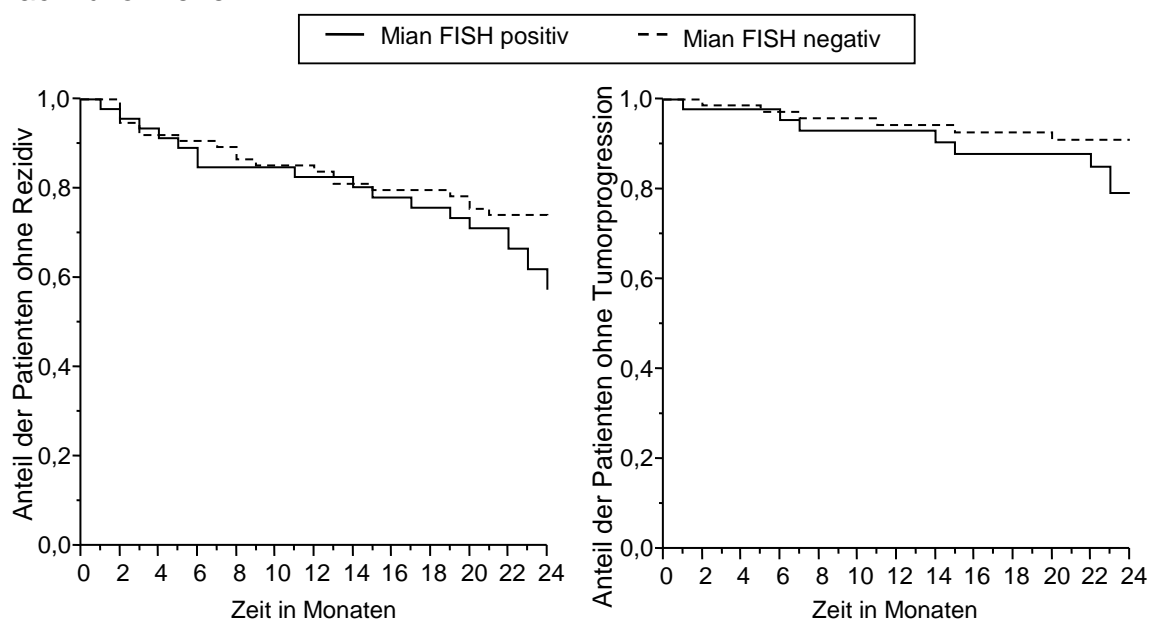


Abb. 16: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Mian et al. ( $p=0,1965$ ).

Abb. 17: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach Mian et al. ( $p=0,1608$ ).

Gemäß der Auswertestrategie nach Mian et al. erhöhte ein positives FISH-Ergebnis in der univariablen Cox-Regressionsanalyse signifikant weder das Risiko für einen Progress im Rezidivfall, noch das Rezidivrisiko selbst ( $p=0,129$  und  $p=0,140$ ). In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse hatte lediglich der Zeitpunkt des letzten Tumors vor Beginn des Nachbeobachtungszeitraums einen signifikanten Einfluss auf das Risiko eines Rezidivs und Progress im Rezidivfall. Das Ergebnis der FISH-Untersuchung nach den Kriterien von Mian zeigte auch hier in keinem Fall eine Signifikanz.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Mian FISH positiv vs. negativ	1,61	0,85-3,03	0,140	2,26	0,78-6,86	0,129

**Tab. 51: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Mian FISH positiv vs. negativ	1,45	0,74-2,83	0,2771	1,88	0,62-5,93	0,2607
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,00	2,02-8,49	<b>&lt;0,0001</b>	3,67	1,19-13,58	<b>0,0221</b>
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,83	0,42-1,63	0,5843	1,39	0,46-4,75	0,5612
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Mian FISH positiv vs. negativ	1,38	0,73-2,61	0,3155	1,96	0,68-5,97	0,2137
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,27	2,17-9,01	<b>&lt;0,0001</b>	4,05	1,34-14,89	<b>0,0125</b>

**Tab. 52: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

Entsprechend den Originalarbeiten von Mian et al. und Lodde et al. wurden die positiven FISH-Ergebnisse dieser Auswertestrategie anschließend noch anhand ihres jeweiligen molekularen Gratings klassifiziert (Mian et al. 2006a; Lodde et al. 2014a). Obwohl die Anzahl der positiven und negativen Befunde nicht identisch zur Auswertung nach Bubendorf et al. waren, fiel auf, dass keinem positiven FISH-Befund nach dem Auswertekonzept von Mian et al. im Prognostikkollektiv ein Low-mG-Grading zugeordnet werden konnte, da alle als positiv befundenen Ergebnisse auch Aberrationen der Chromosomen 7 und/oder 17 enthielten und somit in die Gruppe des High-mG-Grading fielen. Die Subklassifikation durch das molekulare Grading konnte somit im Prognostikkollektiv der vorliegenden Arbeit nicht angewandt werden.

	Auswertung nach Bubendorf et al.	Auswertung nach Mian et al.
<b>Negative FISH-Befunde, n</b>	65	76
<b>Positive FISH-Befunde, n</b>	57	46
<b>Low-mG-FISH, n</b>	65	76
<b>High-mG-FISH, n (% der positiven FISH-Befunde)</b>	57 (100 %)	48 (100 %)

Tab. 53: Subklassifizierung der positiven FISH-Befunde anhand ihres molekularen Gratings nach Mian et al. (Mian et al. 2006a).

### 3.2.6.6 Auswertung nach den modifizierten Kriterien dieser Arbeit

Die Anzahl der Patienten mit und ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor soll in der folgenden Tabelle nach ihrem FISH-Ergebnis nach den modifizierten Auswertekriterien dieser Arbeit zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums aufgeschlüsselt werden.

	Modifizierte Auswertung FISH negativ	Modifizierte Auswertung FISH positiv
Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up	59	24
Rezidiv zum Ende des Follow-Up	21	18

Tab. 54: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach FISH-Ergebnis modifizierte Auswertung. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Modifizierte Auswertung FISH negativ	Modifizierte Auswertung FISH positiv
Kein Progress beim Rezidivtumor	74	34
Progress beim Rezidivtumor	6	8

Tab. 55: Kontingenztabelle des Progress beim Rezidivtumor nach FISH-Ergebnis modifizierte Auswertung. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Das 24 Monate rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben bei Patienten mit negativem FISH-Ergebnis nach modifizierter Auswertung betrug 72,79 % bzw. 91,53 % im Gegensatz zu 55,65 % bzw. 76,70 % bei Patienten mit positivem FISH-Ergebnis zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,1136$  für Rezidiv;  $p=0,0793$  für Progression).

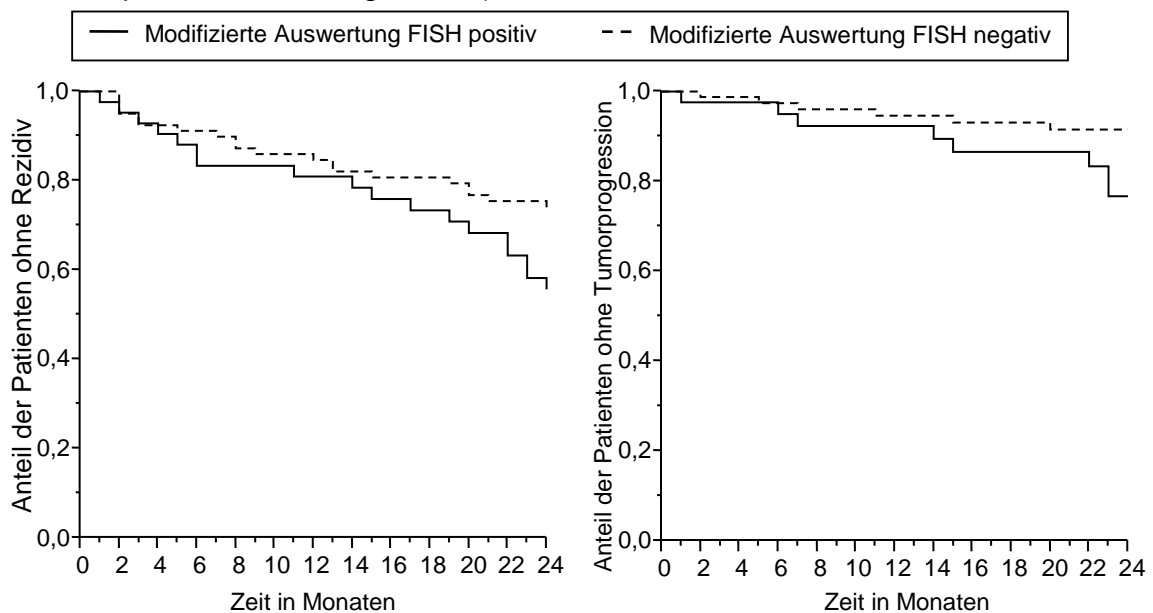


Abb. 18: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach modifizierten Auswertekriterien ( $p=0,1136$ ).

Abb. 19: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativem und positivem FISH-Ergebnis nach modifizierten Auswertekriterien ( $p=0,0793$ ).

In der univariablen Cox-Regressionsanalyse zeigte ein positives FISH-Ergebnis nach den modifizierten Auswertekriterien dieser Arbeit zu Beginn des Follow-Up lediglich ein marginal signifikant gesteigertes Risiko für ein Rezidiv im Follow-Up oder eine Progression des Tumors im Rezidivfall ( $p=0,089$  und  $p=0,065$ ). Auch in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse zeigte sich für ein positives FISH-Ergebnis nach den modifizierten Kriterien dieser Arbeit kein Zusammenhang zum Rezidivrisiko allgemein und ‚Progress beim Rezidiv‘.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Modifizierte Auswertung FISH positiv vs. negativ	1,74	0,92-3,26	0,089	2,70	0,94-8,21	0,065

**Tab. 56: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Modifizierte Auswertung FISH positiv vs. negativ	1,50	0,76-2,91	0,2325	2,23	0,75-7,00	0,1481
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,94	1,98-8,38	<b>&lt;0,0001</b>	3,51	1,14-13,05	<b>0,0279</b>
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,84	0,43-1,63	0,6002	1,39	0,46-4,67	0,5661
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Modifizierte Auswertung FISH positiv vs. negativ	1,44	0,76-2,72	0,2614	2,26	0,78-6,94	0,1301
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	4,22	2,14-8,91	<b>&lt;0,0001</b>	3,91	1,29-14,40	<b>0,0153</b>

**Tab. 57: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

### 3.2.7 Ergebnisse der Urinzytologie

Bei allen 122 Patienten des Prognostikkollektivs konnte das Ergebnis der parallelen Urinzytologie zusätzlich zu den FISH-Analysen ausgewertet werden. Nachstehende Tabelle gibt Aufschluss über die Anzahl der Patienten mit und ohne Rezidiv zum Ende des Follow-Up sowie mit und ohne Progress beim Rezidivtumor in Abhängigkeit vom Ergebnis der Urinzytologie zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums.

	Zytologie negativ	Zytologie positiv
<b>Kein Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	65	18
<b>Rezidiv zum Ende des Follow-Up</b>	18	21

Tab. 58: Kontingenztabelle des Rezidivstatus zum Ende des Follow-Up nach Ergebnis der Zytologie. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

	Zytologie negativ	Zytologie positiv
<b>Kein Progress beim Rezidivtumor</b>	79	29
<b>Progress beim Rezidivtumor</b>	4	10

Tab. 59: Kontingenztabelle Progress beim Rezidivtumor nach Ergebnis der Zytologie. Angabe der absoluten Patientenzahlen.

Das 24 Monate rezidiv- bzw. progressionsfreie Überleben bei Patienten mit negativer Zytologie betrug 77,14 % bzw. 94,48 % im Gegensatz zu 46,15 % bzw. 68,63 % bei Patienten mit positiver Zytologie zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums ( $p=0,0002$  für Rezidiv;  $p=0,0004$  für Progress).

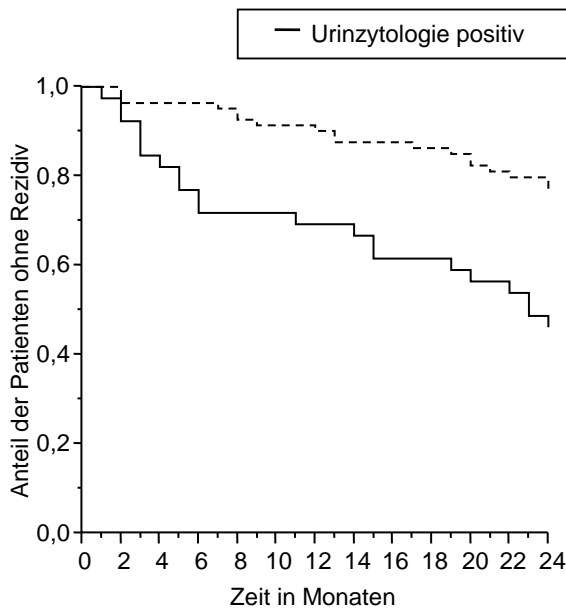


Abb. 20: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten eines Rezidiv. Aufgeteilt nach negativer und positiver Zytologie ( $p=0,0002$ ).

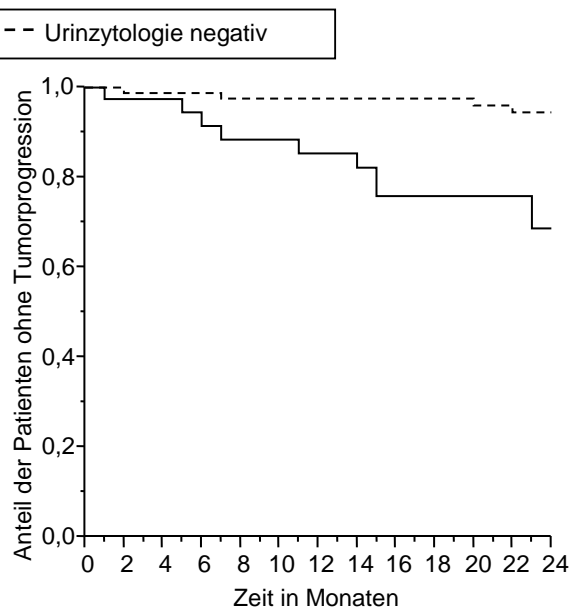


Abb. 21: Kaplan-Meier Analyse für das Auftreten einer Progression beim Rezidiv. Aufgeteilt nach negativer und positiver Zytologie ( $p=0,0004$ ).

In der univariablen Cox-Regressionsanalyse stellte eine auffällige Zytologie zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums einen signifikanten Risikofaktor sowohl für ein ‚Rezidiv zum Ende des Follow-Up‘ als auch für einen ‚Progress beim Rezidivtumor‘ dar ( $p=0,0007$  und  $p=0,0008$ ). In einer anschließenden multivariablen Cox-Regressionsanalyse der signifikantesten klinischen Einflussparameter bestätigte sich der Einfluss einer auffälligen Zytologie zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums auf das Rezidiv- und Progressionsrisiko.

Parameter	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Urinzytologie positiv vs. negativ	3,03	1,61-5,74	<b>0,0007</b>	6,42	2,15-23,42	<b>0,0008</b>

**Tab. 60: Univariable Cox-Regressionsanalyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progression beim Rezidiv.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.

3 Parameter-Analyse	Rezidiv zum Ende des Follow-Up			Progress beim Rezidivtumor		
	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Urinzytologie positiv vs. negativ	2,27	1,18-4,41	<b>0,0143</b>	5,02	1,63-18,71	<b>0,0045</b>
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,46	1,72-7,43	<b>0,0004</b>	2,79	0,89-10,44	0,0767
Höchster Tumorgrad bisher High-Risk vs. Low- oder Intermediate-Risk	0,87	0,46-1,66	0,6724	1,49	0,51-4,88	0,4723
2 Parameter-Analyse	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (HR)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall (CI)</i>	<i>p-Wert</i>
Urinzytologie positiv vs. negativ	2,27	1,19-4,37	<b>0,0131</b>	4,99	1,62-18,59	<b>0,0046</b>
Zeit seit letztem Tumor < vs. > 6 Monate	3,70	1,86-7,89	<b>0,0001</b>	3,04	0,98-11,38	0,0537

**Tab. 61: Multivariable Cox-Regressions-Analyse für Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor.** Angabe von Hazard Ratio (HR), 95 % Konfidenzintervall (95 % CI) und p-Wert. Statistisch signifikante Werte fett markiert.



### 3.2.8 Übersicht aller Auswertungen im Prognostikkollektiv

Die einzelnen Auswertestrategien sind nun noch einmal gemeinsam in ihrer Wertigkeit in Bezug auf Rezidiv zum Ende des Follow-Up und Progress beim Rezidivtumor aufgelistet. Die folgenden statistischen Größen beziehen sich auf den Endpunkt Rezidiv oder Progress. So beschreibt die Sensitivität hier den Anteil der richtig positiven FISH-Ergebnisse zum Zeitpunkt null aus der Gruppe der Patienten, die später tatsächlich ein Rezidiv erhalten, während die Spezifität den Anteil der richtig negativen FISH-Ergebnisse aus der Gruppe der Patienten wiedergibt, die über 24 Monate rezidivfrei bleiben werden.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC	p-Wert
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Abbott Molecular	58,9%	67,5%	46,0%	77,8%	64,8%	0,63	0,0058
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Bubendorf et al.	61,5%	60,2%	42,1%	76,9%	60,7%	0,60	0,0242
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Zellweger et al.	46,2%	69,9%	41,9%	73,4%	62,3%	0,58	0,0856
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Fritsche et al.	46,2%	73,5%	45,0%	74,4%	64,8%	0,59	0,0331
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Mian et al.	48,7%	67,5%	41,3%	73,7%	61,5%	0,58	0,0874
Modifizierte Auswertung der FISH Ergebnisse	46,2%	71,1%	42,9%	73,8%	63,1%	0,58	0,0642
Auswertung der Urinzytologie	53,9%	78,3%	53,9%	78,3%	70,5%	0,66	0,0005

Tab. 62: Tabellarische Übersicht der Auswerteverfahren im Prognostikkollektiv in Bezug auf Rezidiv zum Ende des Follow-Up. Aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC; grün = im Vergleich der jeweiligen Spalte hohe Werte, rot = im Vergleich der jeweiligen Spalte niedrige Werte.

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	Accuracy	AUC	p-Wert
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Abbott Molecular	64,3	62,0	18,0	93,1	62,3	0,63	0,0617
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Bubendorf et al.	57,1	54,6	14,0	90,8	54,9	0,56	0,4065
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Zellweger et al.	57,1	67,6	18,6	92,4	66,4	0,62	0,0752
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Fritsche et al.	57,1	70,4	20,0	92,7	68,9	0,64	0,0459
Auswertung der FISH Ergebnisse nach Mian et al.	57,1	64,8	17,4	92,1	63,9	0,61	0,1169
Modifizierte Auswertung der FISH Ergebnisse	57,1	68,5	19,0	92,5	67,2	0,63	0,0642
Auswertung der Urinzytologie	71,4	73,2	25,6	95,2	72,9	0,72	0,0012

Tab. 63: Tabellarische Übersicht der Auswerteverfahren im Prognostikkollektiv in Bezug auf Progress beim Rezidivtumor. Aufgeschlüsselt nach Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV, Accuracy und AUC; grün = im Vergleich der jeweiligen Spalte hohe Werte, rot = im Vergleich der jeweiligen Spalte niedrige Werte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom bildet den vierthäufigsten malignen Tumor bei Männern in Europa. Seine hohe Inzidenz sowie starke Rezidivneigung machen eine rigide und kostenintensive Nachbeobachtung nötig und sind ursächlich für die höchsten Behandlungskosten je Tumorpatient von der Diagnose bis zum Tod (Botteman et al. 2003; Stenzl et al. 2008).

Die Einteilung eines Harnblasenkarzinoms hängt stark von der Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium) und dessen Differenzierungsgrad (G-Stadium) ab. Nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (Ta, T1) können mittels TUR-B und intravesikaler Immuno- oder Chemotherapie lokal behandelt werden, gehen jedoch mit einer hohen Rezidivneigung einher (Sylvester et al. 2006). Muskelinvasive Harnblasenkarzinome (T2-T4) infiltrieren den Musculus detrusor vesicae oder benachbarte Strukturen, wodurch die Überlebensprognose gerade bei fortgeschrittenen Tumoren stark sinkt. Als Therapie kann diesen Patienten die radikale Entfernung ihrer Harnblase in kurativer oder teils nur palliativer Absicht angeboten werden. Weitere Therapiemöglichkeiten umfassen systemische Chemotherapeutika und Angiogenese-Inhibitoren.

Erstes Anzeichen eines malignen Geschehens der Harnblase ist oftmals die schmerzlose Makrohämaturie. Allgemeinsymptome zeigen sich erst bei Fortschreiten der Erkrankung. Im klinischen Alltag der Primärdiagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms stellt die Zystoskopie den Goldstandard dar. Ein grundlegender Nachteil ist ihre geringe Sensitivität bei der Erkennung flacher Läsionen (Burger et al. 2013b). Zudem handelt es sich um eine teure und für den Patienten unangenehme, da invasive Maßnahme (Yeo et al. 2013). In Kombination oder als Ergänzung zur Zystoskopie kommt regelmäßig die Urinzytologie als nicht-invasives Diagnostikum zur Anwendung. Mit diesem Verfahren lassen sich jedoch Low-Grade Tumoren nicht ausreichend zuverlässig detektieren (Babjuk et al. 2015). Zur besseren Beurteilung der Prognose und Risikostratifizierung der Erkrankung tragen verschiedene Prognoseindices bei.

In der Zusammenschau spiegeln diese Methoden jedoch den jeweiligen klinischen Verlauf nur unzureichend wider. Betroffene Patienten sowie behandelnde Ärzte würden von einem zuverlässigen nicht-invasiven Parameter profitieren, der ihnen sowohl Aussagen über das aktuelle Stadium und die Aggressivität als auch über den Verlauf und die Prognose der Erkrankung geben kann. Die bekanntesten nicht-invasiven Urinmarker sind BTA stat, BTA TRAK, NMP-22, ImmunoCyt/uCyt+™ und UroVysion™ (FISH), aber auch neue Urinmarker wie BLCA-4, HAHAase oder UBC zeigen erste erfolgversprechende Ergebnisse. Einen besonderen Stellenwert hat die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in Form des UroVysion™-Tests, die durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden komplementäre Zielsequenzen in abgeschilferten Urothelzellen im Patientenurin nachweisen kann. Durch visuelle Auswertung wird die Ploidie der Zellkerne bestimmt und der Befund anhand differentieller Auswertekonzepte ermittelt. Mit dieser Methode scheint es sogar möglich, ein Tumorgeschehen zu einem Zeitpunkt nachzuweisen, an dem noch kein makroskopischer Befund in der Zystoskopie sichtbar ist (Yoder et al. 2007; Gofrit et al. 2008; Schlomer et al. 2010). Zudem können damit vor allem High-Risk Karzinome und CIS mit Sensitivitäten und Spezifitäten von bis zu 96 % zuverlässig erkannt werden (Bubendorf et al. 2001; Mian et al. 2003; Fritsche et al. 2010). Obwohl die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bereits seit längerer Zeit im klinischen Alltag der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms etabliert ist, kann sie bisher noch nicht mit den Ergebnissen der klassischen Zystoskopie und Urinzytologie konkurrieren (Tilki et al. 2011). Viele ihrer Auswertekonzepte wurden an gemischten Populationen mit Anteilen von Primär- und Rezidivdiagnostikpatienten erstellt und besitzen daher ganz eigene Charakteristika. Durch den fehlenden Konsens einer einheitlichen Auswertung dieser Methode entstehen darüber hinaus sehr inhomogene Testergebnisse (Maffezzini et al. 2010). Diese Inhomogenität erschwert die weltweite Vergleichbarkeit von FISH-Befunden sowie die anschließende Bestimmung individueller Prognosen und Rezidivrisiken.

Besonders bezüglich ihrer Wertigkeit in der jeweiligen klinischen Situation unterscheiden sich die in dieser Arbeit behandelten Auswertekriterien der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung deutlich.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick der häufigsten bisher in der Literatur angewandten Auswertestrategien.

Auswertung nach	Autor	Jahr	Proben (n)	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
<b>Halling et al.</b>	<b>Halling et al.</b>	2000	242	84,2%	91,8%	-	-
	<i>Placer et al.</i>	2002	80	80,4%	85,3%	88,1%	76,3%
	<i>Skacel et al.</i>	2003	120	85,0%	97,0%	-	-
	<i>Marin-Aguilera et al.</i>	2007	112	76,0%	94,7%	-	-
<b>Abbott Molecular – UroVysion™ Bladder Cancer Kit</b>	<b>Sarosdy et al.</b>	2002	448	71,0%	65,8%	53,0%	80,6%
	<i>Friedrich et al.</i>	2003	101	68,0%	89,0%	84,0%	78,0%
	<i>Laudadio et al.</i>	2005	258	73,0%	75,0%	-	-
	<i>Kang et al.</i>	2006	62	89,4%	93,3%	97,7%	73,7%
	<i>Sarosdy et al.</i>	2006	473	69,0%	79,0%	31,0%	95,0%
	<i>Junker et al.</i>	2006	121	60,0%	82,6%	-	-
	<i>Moonen et al.</i>	2007	103	39,1%	89,7%	-	-
	<i>Gudjónsson et al.</i>	2008	158	30,0%	95,0%	71,0%	-
<b>Bubendorf et al.</b>	<b>Bubendorf et al.</b>	2001	117	71,0%	96,0%	98,0%	86,0%
	<i>Mian et al.</i>	2003	63	96,4%	46,4%	67,5%	93,7%
<b>Zellweger et al.</b>	<b>Zellweger et al.</b>	2006	138	-	-	71,0%	79,0%
<b>Fritsche et al.</b>	<b>Fritsche et al.</b>	2010	210	95,0%	93,0%	76,0%	99,0%
<b>Modifizierte Auswertung</b>	<b>Modifizierte Auswertung</b>	2015	1048	70,0%	82,6%	53,7%	90,5%

Tab. 64: Historische Übersicht der Auswertestrategien von FISH-Befunden. Aufgelistet sind Originalarbeiten (fett markiert) sowie weitere Autoren, die sich dieser Methoden bedienten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, erstmals die in der Literatur beschriebenen Auswertekonzepte an einem Kollektiv von 1048 Patienten der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen anhand ihrer klinischen Wertigkeit in Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms zu evaluieren und durch eine im Rahmen der Arbeit erstellte ‚modifizierte Auswertestrategie‘ zu ergänzen.

## 4.2 Eigenschaften der Patientenkollektive

Zur Erhebung der Daten der vorliegenden Arbeit wurden im Diagnostikkollektiv 1048 Patienten und im Prognostikkollektiv 122 Patienten berücksichtigt. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag in beiden Kollektiven im Median bei 67-69 Jahren, das Geschlechterverhältnis der Männer : Frauen betrug in etwa 5:1. Diese Ergebnisse entsprechen der Alters- und Geschlechterverteilung weltweiter epidemiologischer Studien zum Harnblasenkarzinom (Ferlay et al. 2013b). Bereits zum Zeitpunkt der Urinabnahme wurde in der parallelen Zystoskopie bei 21,8 % aller Patienten des Diagnostikkollektivs ein malignes Harnblasenkarzinom histologisch gesichert, wobei 78,1 % der Befunde als nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (Ta,T1) und nur 13,6 % als muskelinvasiv eingruppiert werden konnten. Im histopathologischen Grading verteilten sich diese Tumoren jeweils zu etwa einem Drittel auf die Kategorien G1, G2 und zu etwa 20 % auf G3. Die Prävalenz im Diagnostikkollektiv spiegelt in keiner Weise die Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in der Allgemeinbevölkerung wider. Bei den eingeschlossenen Patienten der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen handelte es sich um ein von Grund auf selektiertes Kollektiv und nicht um eine standardisierte und randomisierte Studiengruppe. Der Anteil der nicht-muskelinvasiven Befunde in der Kohorte stimmt jedoch mit Werten in der Literatur überein (Burger et al. 2013a).

Entsprechend der Einschlusskriterien wiesen alle 122 Patienten des Prognostikkollektivs bereits ein Harnblasenkarzinom in der Anamnese auf. Dabei handelte es sich ausschließlich um nicht-muskelinvasive Tumorstadien (Ta, T1, CIS), wodurch die Rezidivrate und Progression der Erkrankung besser beurteilbar und mit bestehender Literatur vergleichbar wurde. Das Follow-Up begann mit dem FISH-Befund parallel zur ersten negativen Zystoskopie nach erfolgreicher Behandlung eines vorausgegangenen nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms. Die Nachbeobachtungszeit des Prognostikkollektivs endete mit dem Zeitpunkt einer Rezidivdiagnose oder nach Ablauf von 24 Monaten rezidivfrei. Im Median wurden alle Patienten 24 Monate nachbeobachtet. Etwa ein Drittel der Patienten entwickelte im Verlauf des Nachbeobachtungszeitraums einen

Rezidivtumor, wobei ein Großteil dieser Rezidive der Gruppe der nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinome (Ta,T1) zuzuordnen war. Die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs betrug im Median 12 Monate. In 14 Fällen entwickelte sich im Median nach 12,5 Monaten beim Rezidivtumor ein höheres T- oder G-Tumorstadium und damit eine Progression. Den kompletten Nachbeobachtungszeitraum von 24 Monaten überlebten im Prognostikkollektiv 66,9 % bzw. 86,6 % der Patienten rezidiv- bzw. progressionsfrei.

#### **4.2.1 Analyse chromosomaler Veränderungen der Kollektive**

Im Erbgut der Zellen eines Harnblasenkarzinoms konnten in den letzten Jahrzehnten mittels zytogenetischer Analyse komplexe chromosomale Veränderungen entdeckt werden. Der Verlust von DNA-Information am p-Schenkel des Chromosom 9 stellte sich bereits in frühen Tumorstadien als pathogenetisch entscheidender Faktor dar (Richter et al. 1998; Höglund et al. 2001; Höglund 2012). Auf Grundlage dieser Studien wurde für den Lokus 9p21 ein Farbsignal in das allgemeingebräuchliche Urovysion™-Kit integriert. Die Vermehrung der Chromosomen 3, 7 und 17 wiesen in Kombination am sensitivsten ein Tumorgeschehen nach, weshalb auch diese Sonden Grundlage des Urovysion™-Kit wurden (Sauter et al. 1997; Sokolova et al. 2000). Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen.

Im Diagnostikkollektiv zeigten die Chromosomen 3, 7 und 17 eine signifikante Vermehrung im Falle einer positiven parallelen Histologie und damit eines Tumorgeschehens – bei Chromosom 7 mit der höchsten AUC von 0,76 – während ein Verlust des Lokus 9p21 nicht gehäuft auftrat ( $p < 0,001$ ). Lediglich der relative Verlust des Lokus 9p21 nach Zellweger et al. war im Falle einer positiven parallelen Histologie signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ).

Im Prognostikkollektiv waren in der Gruppe der Patienten mit Rezidiv zum Ende des Follow-Up bzw. Progress im Rezidivfall die Chromosomen 3, 7 und 17 signifikant vermehrt ( $p = 0,001-0,012$ ). Auch eine gehäufte Aberration des Lokus 9p21 konnte nachgewiesen werden ( $p = 0,016$  bzw.  $p = 0,028$ ). Analog zum Diagnostikkollektiv konnte beim Progress im Rezidivfall ebenso ein signifikant erhöhter relativer Verlust des Lokus 9p21 nachgewiesen werden ( $p = 0,002$ ).

Ähnliche Beobachtungen stellten bereits andere Arbeitsgruppen an (Fritsche et al. 2010; Köhler et al. 2014). Grund für diese uneinheitlichen Ergebnisse könnte auch das schwache Signal des Lokus 9p21 im Urovysion™-Kit sein, das sich teilweise schlecht vom Hintergrund der Probe abhebt. Zudem ist weiterhin ungeklärt, ob der Verlust des Lokus 9p21 bei niedriggradigen Ta- und T1-Tumoren oder bei höhergradigen Tumoren ( $\geq T2$ ) sowie CIS vermehrt auftritt (Knowles 2008).

Sowohl im Diagnostik-, als auch im Prognostikkollektiv waren tetraploide Zellkerne größtenteils nicht nachweisbar. Tetraploide Zellen in FISH-Befunden aus Spülurin sind jedoch nichts Ungewöhnliches. Vor allem reaktive Urothelzellen nach Blasenirritationen (z.B. durch einen Harnwegsinfekt) sind häufig tetraploid (Bushman et al. 1994; Bubendorf et al. 2001). Diese Zellen werden durch den Spülvorgang abgeschilfert und treten dadurch im Befund vermehrt auf (Zellweger et al. 2006). Es wird daher mittlerweile empfohlen, tetraploide Zellkerne bei der Beurteilung von FISH-Befunden auszuschließen, um so die Rate der falsch-positiven Ergebnisse gering zu halten (Moatamed et al. 2013).

### **4.3 Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms**

In der Primärdiagnostik des Harnblasenkarzinoms ist die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bereits etabliert und kann potentiell zu einem zeitnahen und korrekten Befund beitragen.

Die vom Hersteller Abbott Molecular empfohlene Auswertestrategie ergab im Diagnostikkollektiv mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse bezogen auf die Sensitivität und Spezifität (72 % und 70 % zu 71 % und 66 % in der Originalarbeit) (Sarosdy et al. 2002). Der positiv prädiktive Wert schnitt im Vergleich schlechter (39 % zu 53 % in der Originalarbeit), der negativ prädiktive Wert und die Accuracy im Vergleich zur Originalarbeit wieder besser ab (90 % und 70 % zu 81 % und 68 %). Vermutlich beeinflusste auch die hohe

Anzahl an nicht-muskelinvasiven Tumoren der vorliegenden Kohorte die Sensitivität und Spezifität dieser Auswertung negativ. In der reinen Primärdiagnostik stieg der NPV sogar auf 93 % und die Spezifität sowie die Accuracy auf 74 %. Mit dieser Methode könnten somit vor allem im ambulanten Bereich falsch-positive Diagnosen und dadurch entstehende Folgekosten vermieden werden.

Eine Variante dieser Auswertestrategie nach Bubendorf et al. zeigte in unserem Kollektiv im Vergleich zur Originalarbeit (Bubendorf et al. 2001) eine verminderte Spezifität (63 % zu 96 %) und einen deutlich geringeren PPV (37 % zu 98 %), jedoch eine leicht höhere Sensitivität (77 % zu 71 %) und einen höheren NPV (91 % zu 86 %). Die Sensitivität und der PPV waren im Rahmen der reinen Rezidivdiagnostik noch minimal besser (79 % zu 77 % und 42 % zu 37 % im Gesamtkollektiv), allerdings auf Kosten der bis dahin hohen Spezifität (55 % zu 63 %). Eine Arbeit von Mian et al. bediente sich ebenfalls dieser Auswertestrategie und hatte dabei mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar hohe Verluste der Spezifität und des PPV gegenüber der Originalarbeit zu verzeichnen (Mian et al. 2003). In unserem Kollektiv lieferte die Variante nach Bubendorf et al. im direkten Vergleich zur Auswertestrategie von Abbott Molecular in der Primärdiagnostik übereinstimmende, in der Rezidivdiagnostik bessere Ergebnisse. Nach dieser Strategie waren noch 4 tetraploide Zellkerne bei einer negativen Probe zulässig, um so den gehäuft vorkommenden tetraploiden Zellkernen und deren geringem pathogenetischen Einfluss entgegenzuwirken (Bubendorf et al. 2001). Die dezidierte Vermehrung tetraploider Zellkerne trotz negativer Histologie konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Analyse der chromosomalen Zellkernveränderungen ergab im Median weder bei positiver noch bei negativer Tumorphistologie tetraploide Zellkerne, wobei sich dieses Ergebnis als nicht signifikant darstellte ( $p=0,1$ ).



Die Auswertestrategie nach Zellweger et al. wurde ursprünglich zur Verbesserung der klinischen Wertigkeit der FISH-Diagnostik in der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms entwickelt. Dabei erhöhte sich die zulässige Anzahl der tetraploiden Zellkerne sogar auf 10 für einen negativen Testbefund. Zudem wurde der absolute und relative Verlust des Lokus 9p21 in den Fokus gerückt (Zellweger et al. 2006). Grundlage bildet die Theorie einer frühzeitigen Aberration des Lokus 9p21 in den Tumorzellen des Harnblasenkarzinoms (Tsukamoto et al. 2002). Der Verlust des Lokus 9p21 stellte sich dagegen in der vorliegenden Arbeit uneinheitlich dar. Während sich die Anzahl der Zellkerne mit homo- und heterozygoten Verlust des Lokus 9p21 bei Patienten mit positiver oder negativer Tumorphistologie nicht unterschied, so gab es doch eine signifikante Differenz in der Anzahl der Zellkerne mit relativem Verlust des Lokus 9p21 nach Zellweger et al. (3 Zellkerne im Median bei positiver vs. 1 Zellkern im Median bei negativer Tumorphistologie). In der Originalarbeit entstand durch diese Art der Auswertung ein relativ hoher PPV und NPV von 71 % und 79 % gegenüber 47 % und 90 % für den PPV und NPV nach dieser Strategie im Diagnostikkollektiv. Im Vergleich zur Auswertung des Herstellers Abbott Molecular ergaben sich jedoch eine deutlich höhere Spezifität (79 % zu 69 % bei Abbott Molecular), ein größerer PPV (47 % zu 39 % bei Abbott Molecular), ein vergleichbarer NPV und eine höhere Accuracy (77 % zu 70 % bei Abbott Molecular).

Die Auswertestrategie von Fritsche et al. aus dem Jahre 2010 diene primär zur Nachsorge nicht-muskelinvasiver High-Risk Harnblasenkarzinome und CIS (Fritsche et al. 2010). Es handelt sich dabei um eine Mischung der Auswertekonzepte von Zellweger et al. und denen des Herstellers Abbott Molecular. Sie erreichte im Rahmen der Originalarbeit im Vergleich zu den Werten der vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität (95 % und 93 % zu 58 % und 85 % in der vorliegenden Arbeit) sowie einen besseren PPV und NPV (76 % und 99 % zu 52 % und 88 % in der vorliegenden Arbeit). Obwohl diese Art der Auswertung von FISH-Befunden zur Nachsorge des Harnblasenkarzinoms entwickelt wurde, zeigte sie im Diagnostikkollektiv in der

reinen Primärdiagnostik im Vergleich zur reinen Rezidivdiagnostik eine deutlich verbesserte Leistung mit einer Spezifität, einem NPV und einer Accuracy von 91 %, 91 % und 85 % statt nur 75 %, 82 % und 71 %. Die Sensitivität und der PPV entsprachen in Primär- und Rezidivdiagnostik etwa einander (55 % und 54 % zu 61 % und 50 %). Gegenüber der Auswertestrategie des Herstellers Abbott Molecular konnte diese neue Herangehensweise nach Fritsche et al. im Diagnostikkollektiv eine gesteigerte Spezifität, PPV und Accuracy aufweisen (85 %, 52 % und 79 % zu 69 %, 40 % und 70 % bei Abbott Molecular), worunter jedoch die Sensitivität litt (58 % zu 72 % bei Abbott Molecular).

Im Rahmen der Datenerhebung dieser Arbeit konnte im Diagnostikkollektiv weder der übermäßige Verlust des Lokus 9p21 noch das Vorkommen vieler tetraploider Zellkerne bei positiver Tumorphistologie bestätigt werden. Folglich wurde eine stark vereinfachte modifizierte Auswertestrategie entwickelt, die sich auf chromosomale Aberrationen der Chromosomen 3, 7 und 17 beschränkte. Durch diese Anpassung wurden die FISH-Befunde leichter auswertbar und für den klinischen Alltag zeit- und ressourcensparend handhabbar. In Primär- und Rezidivdiagnostik zeigten sich dabei mit bestehenden Auswertemethoden konkurrenzfähige Ergebnisse. Gegenüber der Auswertung nach Abbott Molecular bot diese neue Methode im Diagnostikkollektiv eine deutlich erhöhte Spezifität, PPV und Accuracy (81 %, 49 % und 77 % zu 69 %, 40 % und 70 % bei Abbott Molecular) bei vergleichbaren Werten beim NPV (89 % zu 90 %) und verminderten Werten in der Sensitivität (64 % zu 72 % bei Abbott Molecular).

Mithilfe des allgemein gebräuchlichen Urovysion™-Kit können bevorzugt High-Grade Karzinome und CIS entdeckt werden (Moonen et al. 2007; Edge et al. 2010). Diese Methode leidet allerdings an einer bisher geringen Sensitivität bei der Erkennung von Low-Grade Karzinomen (Lokeshwar et al. 2005). Da das Diagnostikkollektiv zu knapp zwei Dritteln aus niedriggradigen Ta/G1 oder G2-Tumoren bestand, ergab sich eine oftmals geringere Sensitivität der Auswertestrategien im Vergleich zur Originalliteratur (Gudjónsson et al. 2008). Auch der PPV aller Auswertestrategien in der vorliegenden Arbeit lag mit

Werten zwischen 35 % und 55 % deutlich unter den Angaben der Literatur. Ein Grund dafür könnte die eher niedrige Spezifität der Auswertestrategien im Diagnostikkollektiv sein. Die Spezifität hat auf den PPV generell einen größeren Einfluss als die Sensitivität (Gordis 2008). Darüber hinaus hängt der PPV stark von der hohen Anzahl nicht-muskelinvasiver Karzinome sowie der Erkrankungshäufigkeit innerhalb der vorliegenden Kohorte ab. Je höher die Prävalenz einer Krankheit innerhalb eines Kollektivs, desto höher der PPV. Bei einer bestehenden Prävalenz von 21,8 % und einer durchschnittlichen Sensitivität und Spezifität aller Auswertestrategien von 68 % und 75 % im Diagnostikkollektiv erreichte der PPV nur einen mittleren Wert von 45 %. Selbst wenn die Sensitivität und Spezifität Werte von 99 % und 95 % erreichen würden, könnte der PPV bei gleichbleibender Prävalenz nie größer als 85 % werden.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse des Diagnostikkollektivs zeigte die Auswertung des Herstellers Abbott Molecular in Primär- und Rezidivdiagnostik konstant hohe Werte. In der reinen Primärdiagnostik wird jedoch eine Methode mit möglichst hoher Spezifität und hohem PPV favorisiert (Goebell et al. 2008). Diese Vorgaben konnten von den hier besprochenen Auswertestrategien die Auswertung nach Fritsche et al. sowie die modifizierte Auswertung dieser Arbeit am besten erfüllen. Mit einer Spezifität von 91 % bzw. 86 % und einem PPV von jeweils um die 50 % hielten sie die Rate der falsch-positiven Primärdiagnosen gering.

In der Nachsorge und Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms sollten hingegen nach Möglichkeit die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse möglichst niedrig gehalten werden, um frühzeitig ein Rezidivgeschehen aufzudecken. Daher wird hier eine hohe Sensitivität und ein hoher NPV bevorzugt (Lokeshwar et al. 2005). Bei diesen Werten lieferte die modifizierte Auswertung mittelmäßige, mit der Auswertung nach Abbott Molecular vergleichbare Ergebnisse (Sensitivität 66 %, NPV 84 %, Accuracy 70 %). Mit Werten von 79 % und 86 % für die Sensitivität und den NPV erbrachte die Auswertestrategie nach Bubendorf et al. in der reinen Rezidivdiagnostik die beste Leistung, jedoch mit einer deutlich verminderten Accuracy von nur 62 %.

#### **4.4 Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Prognostik des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms**

Die Diagnose eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms geht unabhängig von seinem histopathologischen Grading stets mit einem hohen Rezidiv- und Progressionsrisiko einher. Ziel der vorliegenden Arbeit war im Prognostikkollektiv die externe Validierung differentieller Auswertekonzepte der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ertsmals auch zur objektiven Einschätzung der individuellen Prognose eines Patienten und somit zur Reduzierung der kostenintensiven und invasiven Folgezystoskopien in der Nachsorge des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (Gudjónsson et al. 2008). Im Besonderen wurde die vorliegende Arbeit auch der Fragestellung gerecht, ob es tatsächlich ausreicht, das Ergebnis einer FISH-Untersuchung allein mit dem Ergebnis einer parallelen Zystoskopie zu vergleichen und welcher diagnostische Weg im Falle eines positiven FISH-Befundes bei negativer paralleler Zystoskopie eingeschlagen werden sollte. Im Studiendesign dieser Arbeit war die Zystoskopie zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums definitionsgemäß negativ während das Ergebnis der FISH-Untersuchung je nach Auswertestrategie dennoch positiv ausfallen konnte. Diese Eigenschaft wird als ‚anticipatory positivity‘ bezeichnet, eine Art vorausschauender Blick in die Zukunft (Sarosdy et al. 2002). Dieser Effekt wurde durch PPVs von 41,9 % (bei Zellweger et al.) bis 46 % (bei Abbott Molecular) sichtbar. Eine negative Zystoskopie in der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms kann daher nicht mit absoluter Sicherheit ein Rezidivgeschehen ausschließen und im Falle eines positiven FISH-Befundes bei negativer Zystoskopie wäre zumindest eine erhöhte Wachsamkeit angebracht (Kim et al. 2014).

Die Ergebnisse von FISH-Untersuchungen wurden bisher nur in wenigen Studien als prognostischer Marker in der Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms angewandt. Dabei ergaben sich nach therapierter Grunderkrankung selbst im Falle einer negativen Zystoskopie ohne klinische Anzeichen bei allein positivem FISH-Befund Rezidivraten zwischen 39 % und 69,5 % (Sarosdy et al. 2002; Zellweger et al. 2006; Yoder et al. 2007; Gofrit et al. 2008). Zudem kam

es bei 50 % - 73 % der Patienten zu einem Progress im Vergleich zum Primärtumor (van Rhijn et al. 2009b; Maffezzini et al. 2010). Die in der Literatur beschriebene durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs von 8-30 Monaten (Mian et al. 2006a; Gofrit et al. 2008) deckte sich mit den 12 Monaten im Median im Prognostikkollektiv wohingegen eine durchschnittliche Zeit bis zum Auftreten eines Progresses im Rezidivfall in der vorliegenden Arbeit von 12,5 Monaten deutlich unterhalb der in der Literatur beschriebenen 35 Monate lag (Matsuyama et al. 2014).

Zur besseren Risikostratifizierung werden die Patienten im klinischen Alltag mithilfe der Risiko-Tabellen der EORTC unterteilt (Sylvester et al. 2006). Diese Klassifizierung kann jedoch nur bedingt das individuelle Risiko des einzelnen Patienten wiedergeben. Eine verbesserte Risikostratifizierung wäre daher dringend nötig.

In der Literatur finden sich oftmals Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht der Patienten, Tumorgrad, -größe, -anzahl sowie jeweilige Therapieansätze (Lodde et al. 2014a). Im Rahmen von univariablen und multivariablen Cox-Regressionsanalysen wurden in der vorliegenden Arbeit vorrangig Faktoren analysiert, die als Bestandteil des EORTC-Risiko-Score einen Einfluss auf das Rezidiv- und Progressionsrisiko haben (Sylvester et al. 2006). So wurden sämtliche G3-, CIS- und  $\geq$ T1-Tumoren als High-Risk Tumoren eingestuft, während die Entitäten der Low- und Intermediate-Risk Tumoren als Referenzgruppe verwendet wurden.

Da allein die erste negative Zystoskopie nach Tumorbehandlung den Startpunkt der Nachbeobachtung definierte, war die Zeit seit dem letzten Tumor vor Studienbeginn nicht für alle Patienten identisch. Folglich fielen die Zeitpunkte, zu denen die FISH-Proben abgenommen wurden, sehr heterogen aus. Um dennoch den Einfluss der Zeit seit dem letzten Tumorgeschehen zu bestätigen, floss diese als Faktor in die Regressionsanalysen mit ein. Hierbei ergab sich bei einer Zeitspanne von < 6 Monaten seit der letzten Tumordiagnose sowohl in der univariablen als auch in der multivariablen Analyse unabhängig vom Grad des letzten Tumors und der jeweiligen Auswertestrategie der FISH-Befunde mit hoher Signifikanz ein bis zu 4-fach erhöhtes Risiko für ein Rezidiv im Verlauf

des Follow-Up sowie ein Progress im Rezidivfall. Damit bestätigt sich der außerordentliche Einfluss der Zeitspanne zwischen dem Datum der letzten Tumordiagnose und dem Zeitpunkt der Probenabnahme auf die Interpretation der FISH-Ergebnisse und damit das weitere Nachsorgeregime.

Die Auswirkungen eines Verlustes von Lokus 9p21 auf das Rezidivrisiko des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms wurden bereits vielfach diskutiert. Der Lokus 9p21 enthält das p16 Gen, das seinerseits in den korrekten Ablauf des Zellzyklus eingebunden ist. Eine Fehlfunktion dieses Proteins kann zu einem ungeregelten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und damit zur Tumorgenese führen (Matsuyama et al. 2014). Schon 2002 wurde die prädiktive Wertigkeit eines homozygoten Verlusts des Lokus 9p21 geschildert (Tsukamoto et al. 2002). Zellweger et al. beschrieb im Jahr 2006 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verlust von Lokus 9p21 und einem erhöhten Rezidivrisiko (Zellweger et al. 2006). Kawauchi et al. prägte 2009 erstmals den Begriff des ‚9p21-Index‘ zur besseren Risikostratifizierung eines Rezidivs (Kawauchi et al. 2009). Bei all diesen Studien tauchte für einen positiven FISH-Befund wiederholt ein Wert von >12 Zellkernen (Abbott Molecular Inc. 2012) oder >12 % von 100 Zellkernen auf (Matsuyama et al. 2014). Auf dieser Grundlage wurde der Einfluss dieses Faktors auf das Rezidivgeschehen und das Risiko einer Progression im Rahmen einer univariablen Regressionsanalyse überprüft. Auf ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up ergab sich dabei eine signifikante ( $p=0,015$ ) Risikosteigerung um das 12-fache. Beim Progress im Rezidivfall zeigte diese chromosomale Aberration eine auffällige ( $p=0,057$ ) Risikosteigerung um das 17-fache. Anhand dieser und der Ergebnisse des Diagnostikkollektivs konnte der in der Literatur vielfach beschriebene Einfluss des Lokus 9p21 im Rahmen der Erstdiagnostik eines Harnblasenkarzinoms nicht bestätigt werden, durchaus aber auf das Rezidiv- und Progressionsrisiko eines Patienten mit vorbestehendem nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom. Somit könnte der Verlust des Lokus 9p21 ein wesentlicher Bestandteil zukünftiger Auswertestrategien in Bezug auf die Beurteilung des

Rezidiv- und Progressionsrisikos eines Patienten bleiben oder sogar noch an Bedeutung gewinnen.

Die verschiedenen Auswertekonzepte und Interpretationen des UroVysion™-Tests unterscheiden sich stark in ihrer prognostischen Wertigkeit in der Nachsorge des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms.

Im Rahmen der univariablen Regressionsanalysen ergab sich durch einen positiven FISH-Befund nach Abbott Molecular bei negativer paralleler Zystoskopie ein signifikant erhöhtes Risiko sowohl für ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up, als auch für einen Progress im Rezidivfall. Die Auswertestrategie nach Bubendorf zeigte allein ein signifikant erhöhtes Risiko für ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up, die Auswertestrategie nach Fritsche et al. allein ein signifikant erhöhtes Risiko für einen Progress des Tumors im Rezidivfall. Bemerkenswerterweise lagen die Testdurchführung und die Entwicklung des Rezidivtumors bis zu 24 Monate auseinander. Diese Tatsache bestätigt vorherige Arbeiten, die darauf hindeuten, dass der UroVysion™-Test prämaligne Veränderungen im Urothel der Harnblase nachweisen kann, obwohl diese noch nicht makroskopisch in der Zystoskopie sichtbar sind. Die meisten dieser Arbeiten beschrieben die Korrelation zwischen einem positiven FISH-Befund des UroVysion™-Tests und einem erhöhten Rezidivrisiko, aber nur wenige konnten bisher auch einen Zusammenhang zu einem erhöhten Progressionsrisiko nachweisen (Riesz et al. 2007; Seideman et al. 2015).

Die Auswertestrategie nach Abbott Molecular bot im Prognostikkollektiv das beste Konzept, um zuverlässig ein Rezidivgeschehen auszuschließen, ohne viele falsch-negative Diagnosen zu stellen. Das 24 Monate rezidiv- und progressionsfreie Überleben lag bei dieser Strategie im Falle eines negativen FISH-Befundes zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums mit 77 % und 92 % am höchsten. Ein Grund dafür könnte der hohe Stellenwert des Locus 9p21 dieser Auswertestrategie sein, da sich der Verlust des Locus 9p21 im Rahmen der univariablen Regressionsanalyse wie oben beschrieben ebenfalls als unabhängiger Risikofaktor für ein Rezidivgeschehen herausgestellt hat.

Die modifizierte Auswertung dieser Arbeit lag in Bezug auf das 24 Monate rezidiv- und progressionsfreie Überleben mit 73 % und 92 % im Falle eines negativen FISH-Befundes zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums nur im Mittelfeld.

Ähnliche Werte erzielte auch die Auswertung des UroVysion™-Tests nach Mian et al. Die in der Originalarbeit und weiteren Studien beschriebene Subklassifikation durch ‚molekulares Grading‘ konnte in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt werden (Pycha et al. 2004; Mian et al. 2006a; Lodde et al. 2014a). Obwohl durch die Auswertung nach Mian et al. aufgrund des geringeren Cut-Off-Wertes im Vergleich zu Bubendorf et al. weniger positive Befunde anfielen, so wiesen diese jedoch alle Aberrationen der Chromosomen 7 oder 17 auf und wurden somit in die Klasse der High-mG-FISH eingestuft. Der Klasse der Low-mG-FISH konnte kein positiver Befund zugeordnet werden. Ähnliche Schwierigkeiten mit dieser Subklassifikation sind in der Literatur beschrieben. Als Grund wird die Zuordnung der Zellkerne mit Aneuploidie des Chromosoms 3 zur Gruppe der Low-mG-FISH genannt (Matsuyama et al. 2014). Ob diese Unterteilung somit im klinischen Alltag Verwendung finden kann und im Besonderen in der Nachsorge der Intermediate-Risk Tumoren einen klaren Nutzen bringt, sollte in einer größeren Kohorte überprüft werden.

Für die nahe Zukunft ist eine genauere molekulare Analyse der Zellveränderungen im Harnblasenkarzinom nötig. So können die aktuell gebräuchlichen Gensonden reevaluiert sowie der Einfluss weiterer chromosomaler Aberrationen beurteilt und diese gegebenenfalls im klinischen Alltag in die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eingebunden werden (Höglund 2012; Lodde et al. 2014b).

Aus den beschriebenen Ergebnissen lassen sich vereinfacht mehrere diagnostische Wege anhand des parallelen Zystoskopie- und Urinzytologiebefundes erörtern: Bei einer positiven Zystoskopie und Urinzytologie bieten die Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bislang keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn. Sind bei einer Nachsorgezystoskopie allerdings

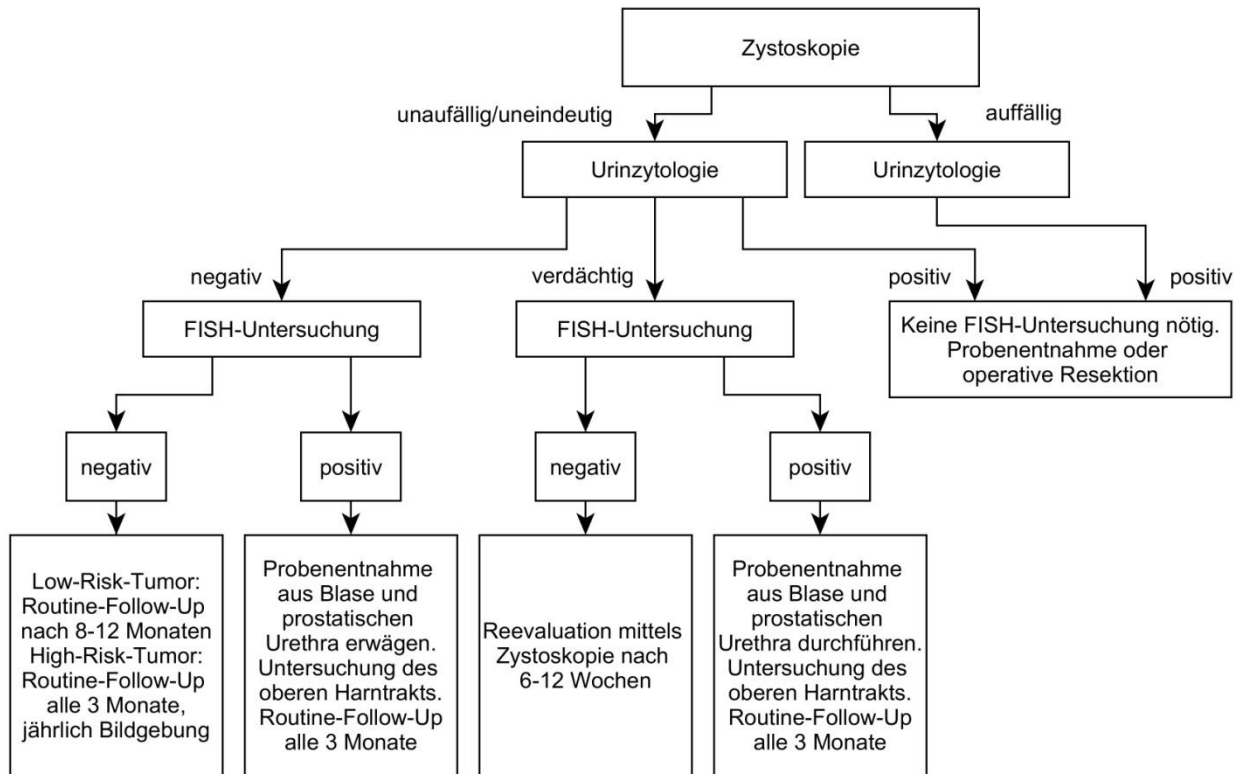


nur unklare Läsionen sichtbar, so kann das Ergebnis der FISH-Untersuchung Gewissheit bringen und unnötige Resektionen verhindern (Lotan et al. 2008a). Bei negativer bzw. unklarer Zystoskopie und negativer Urinzytologie sollte jedoch bei positivem parallelen FISH-Befund eine Probenentnahme aus der Harnblase und die Evaluation der oberen Harnwege in Betracht gezogen werden (Lotan et al. 2008a). In der Theorie schließt somit eine negative Zystoskopie noch kein beginnendes Rezidivgeschehen aus und ein auffälliger FISH-Befund ist noch kein Beweis dafür. Er kann vielmehr auf frei flottierende Tumorstromazellen hindeuten, die das Potential besitzen, sich im Laufe der Zeit zu Harnblasenkarzinomzellen weiterzuentwickeln. Wann und wie viele dieser Zellen eine solche Transformation durchlaufen, ist schwer vorhersagbar. Die Wahrscheinlichkeit für einen Patienten mit einem Low-Risk Tumor in der Anamnese und derzeit negativem Zystoskopie- und FISH-Befund, an einem Harnblasenkarzinom zu leiden, ist äußerst gering (Nguyen et al. 2009). Bei dieser Konstellation sind demnach aktuell keine Tumorstromazellen im harnleitenden System nachweisbar. Auch das Risiko dieses Patienten, im kommenden Jahr ein Rezidiv zu entwickeln ist gering. Daher kann es in diesem Fall sinnvoll sein, die Nachsorgeintervalle zu verlängern und erst nach 8-12 Monaten wieder eine Folgeuntersuchung durchzuführen (Soloway et al. 2003; Gofrit et al. 2006; Nguyen et al. 2009).

Patienten mit einem High-Risk Tumor in der Anamnese und derzeit negativem Zystoskopie- und negativem FISH-Befund sollten jedoch weiterhin konsequent alle 3 Monate mittels Zystoskopie, Urinzytologie und FISH-Untersuchung nachbeobachtet werden (Gofrit et al. 2008).

Alle Patienten mit positiver Tumoranamnese und derzeit negativem Zystoskopie- aber positivem FISH-Befund bedürfen gemäß den aktuellen Leitlinien ebenfalls einer intensiven Nachbeobachtung alle 3 Monate mittels Zystoskopie, Urinzytologie und FISH-Untersuchung sowie regelmäßiger Evaluation der oberen Harnwege (Gofrit et al. 2008). In diesem Fall sollte zudem eine Probenentnahme der Harnblase und der prostatistischen Urethra, sowie eine Evaluation der oberen Harnwege erwogen werden (Lotan et al. 2008a).

Zusammengenommen lässt sich somit bei einem nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom folgendes Nachsorgeregime in Abhängigkeit vom Ergebnis der FISH-Untersuchung zum Zeitpunkt der parallelen Nachsorgezystoskopie diskutieren:



**Abb. 22: Rezidivdiagnostikregime nicht-muskelinvasiver Harnblasenkarzinome gemäß aktueller Literatur.** (Gofrit et al. 2008; Lotan et al. 2008a).

Ziel der Erforschung neuartiger Urinmarkertests ist stets auch die Senkung der mit der Diagnose eines Harnblasenkarzinoms verbundenen Nachsorgekosten für das Gesundheitssystem (Sievert et al. 2009). Der Einsatz von Urinmarkertests als Ergänzung zum Standard-Nachsorgeregime ist unter ökonomischen Gesichtspunkten weiterhin umstritten. Es wird angezweifelt, dass Urinmarkertests in diesem Bereich Zystoskopien ersetzen oder ergänzen können (Hong und Loughlin 2008; Youssef et al. 2012). Ihr Einsatz soll unwirtschaftlich sein und zusätzliche Kosten von etwa 100 € in der ohnehin schon teuren Nachsorge von Harnblasenkarzinomen verursachen (Kamat et al. 2011; Lodde et al. 2014a). Abweichende Studien belegen jedoch, dass die ergänzende Einbindung der FISH-Diagnostik vor allem bei Patienten mit einer negativen oder unklaren Zystoskopie und auffälliger Urinzytologie einen frühen Hinweis

auf ein Rezidivgeschehen geben und somit die anschließenden Behandlungskosten um mehr als 2000 \$ pro Patient reduzieren kann (Yoder et al. 2007; Lotan et al. 2008a; Gayed et al. 2013).

#### **4.5 Vergleich zu den Ergebnissen der Urinzytologie**

In ihrer kurzen Geschichte musste sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms stets mit der hohen Spezifität der Urinzytologie messen lassen. Unter Optimalbedingungen kann diese Werte von über 90 % erreichen (Lokeshwar et al. 2005). Die Urinzytologie unterliegt allerdings einer starken Untersucher- und institutionellen Variabilität (Raitanen et al. 2002; Karakiewicz et al. 2006). Ihre Auswertung wird zudem durch eine geringe Zelldichte im Urin, Harnwegsinfektionen, Harnsteine oder durch intravesikale Instillationen erschwert. Bei niedrigmalignen Tumoren leidet sie darüber hinaus unter einer geringen Sensitivität von weniger als 65 % während sie hochmaligne Tumoren mit einer Sensitivität von bis zu 80 % erkennt (Lokeshwar et al. 2005). Ähnliche Erkenntnisse lieferten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die Urinzytologie war im Diagnostikkollektiv bestens zur Primärdiagnostik eines Harnblasenkarzinoms geeignet. Hier erreichte sie im Vergleich zur Literatur mit einer Sensitivität und einem NPV von etwa 70 % und 91 % sowie einer Spezifität, PPV und Accuracy von bis zu 88 %, 54 % und 85 % deutlich überdurchschnittliche Werte. Grund dafür könnte die Zusammensetzung des vorliegenden Kollektivs, sowie die standardisierte Probenentnahme und Auswertung aller Urinzytologiebefunde durch eine speziell ausgebildete Fachkraft sein. Die Spezifität, der PPV und die Accuracy der Untersuchung konnten in der Kombination aus Urinzytologie und FISH-Befunden sogar noch einmal gesteigert werden. So erreichte die Urinzytologie zusammen mit der modifizierten Auswertung dieser Arbeit in der reinen Primärdiagnostik eine Spezifität von 94 %, einen PPV von 63 % sowie eine Accuracy von 87 %, worunter jedoch die Sensitivität mit Werten von dann nur noch 55 % stark litt.

Auch im Prognostikkollektiv war die Urinzytologie in ihrer Wertigkeit den Auswertungen der FISH-Untersuchung weiterhin überlegen. Sowohl in der univariablen, als auch in der multivariablen 2 und 3 Parameter-Analyse stellte eine positive Urinzytologie einen signifikanten Risikofaktor für ein Rezidiv zum Ende des Follow-Up und den Progress im Rezidivfall dar. Eine positive Urinzytologie zu Beginn war demnach auch mit dem höchsten Anteil an Patienten mit Rezidiv im Verlauf des Nachbeobachtungszeitraums sowie einem Progress im Rezidivfall verbunden. Das 24 Monate rezidiv- und progressionsfreie Überleben von Patienten mit negativer Urinzytologie hingegen war mit Werten von 77 % und 94 % im direkten Vergleich mit den Auswertungen der FISH-Untersuchung ebenfalls am höchsten.

Die Durchführung einer Urinzytologie im Falle einer negativen Zystoskopie hat somit auch in der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms weiterhin ihre Berechtigung und kann noch nicht durch die bereits vielversprechenden FISH-Untersuchungen ersetzt werden. Vielmehr liefert eine gemeinsame Anwendung beider Verfahren die besten Ergebnisse und könnte die Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms auch in ökonomischer Hinsicht revolutionieren (Zellweger et al. 2006). Bei eindeutig auffälliger Urinzytologie bringt ein positiver FISH-Befund wie oben bereits beschrieben keinen Wissenszuwachs, da sich stark entdifferenzierte Zellen meistens FISH-positiv darstellen (Skacel et al. 2003). Gerade bei der Unterscheidung reaktiver Läsionen und Low-Risk Tumoren jedoch leidet die Urinzytologie unter der schlechten Objektivierbarkeit ihrer Methodik (Raitanen et al. 2002). Hier könnten sich beide Verfahren ergänzen. Von einem grundlegend optimierten Nachsorgeregime würden nicht nur die betroffenen Patienten, sondern auch die behandelnden Ärzte profitieren, die im Falle eines positiven Urinzytologie-FISH-Kombinationsbefundes die Nachsorge selbst intensivieren oder im Falle eines negativen Ergebnisses die einzelnen Follow-Up Zystoskopien hinauszögern könnten.

#### **4.6 Anforderungen an den zukünftigen Einsatz von Urinmarkertests**

An den Einsatz eines Urinmarkertests werden je nach klinischem Kontext in der Diagnostik oder Nachsorge des Harnblasenkarzinoms unterschiedliche Anforderungen gestellt, wobei die jeweilige Aussagekraft variieren kann (Lotan et al. 2010).

Ziele könnten sein:

- Einsatz eines Urinmarkertests als Screening-Maßnahme in der gesunden Population.
- Einsatz eines Urinmarkertests in der Primärdiagnostik bei Patienten mit Risikofaktoren, die mit Erst-Symptomen wie Hämaturie vorstellig werden.
- Einsatz eines Urinmarkertests als Verlaufsparemeter in der Nachbeobachtung von Patienten mit vorbestehendem Harnblasenkarzinom, zur Kontrolle des Therapieerfolgs und zur Rezidivdiagnostik.

Der routinemäßige Einsatz von Urinmarkertests als Screeningmaßnahme innerhalb einer gesunden Bevölkerung wird trotz geringer Kosten und guter Umsetzbarkeit – verglichen mit der Zystoskopie – noch nicht empfohlen, da die Prävalenz des Harnblasenkarzinoms in der Bevölkerung relativ gering und das symptomfreie Intervall sehr kurz sind (van Rhijn et al. 2009a). Selbst der Einsatz innerhalb einer Hochrisikobevölkerung bleibt umstritten (Banek et al. 2012; Huber et al. 2012). Die Kosten pro korrekt erkanntem Harnblasenkarzinom wären deutlich höher als bei bereits bestehenden Screening-Maßnahmen wie bei Mamma- oder Kolonkarzinomen. Zunächst müssten hier genaue Kriterien einer Screening-Population wie Alter, Risikofaktoren der Patienten und Frequenz des Screenings festgelegt werden (Lotan et al. 2008b). Der Einsatz von Urinmarkertests in der Primärdiagnostik des Harnblasenkarzinoms bei Patienten, die mit Symptomen wie Hämaturie vorstellig werden, ist dagegen äußerst sinnvoll. Bisher kann noch keiner der Urinmarker eine Zystoskopie ersetzen, sie erhöhen jedoch die Sensibilität des Untersuchers und dienen als Anhaltspunkt für Tumoren, die sonst im Rahmen der Zystoskopie übersehen worden wären (van der Aa et al. 2010).

Jeder neue Urinmarker wird stets an der vergleichsweise hohen Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie gemessen. Um in der Primärdiagnostik mit der Urinzytologie konkurrieren zu können, müssen die Urinmarkertests eine hohe Spezifität und einen hohen positiv prädiktiven Wert aufweisen (Goebell et al. 2008). Dadurch können falsch positive Ergebnisse und folglich unnötig invasive Untersuchungen gering gehalten, aber möglichst frühzeitig besonders die hochmalignen Formen des Harnblasenkarzinoms entdeckt werden (Têtu 2009). Die Spezifität aller gängigen Urinmarkertests ist bisher allerdings aufgrund vieler falsch positiver Ergebnisse noch nicht mit der Spezifität der Urinzytologie vergleichbar (Lokeshwar et al. 2005).

In der Rezidivdiagnostik von Patienten mit vorbestehendem Harnblasenkarzinom sind vor allem Urinmarker mit hoher Sensitivität und einem hohen negativ prädiktiven Wert gefordert, um hier die Zahl der falsch negativen Ergebnisse gering zu halten und damit die Zahl der Kontrollzystoskopien verringern zu können, ohne diese gänzlich zu ersetzen (Lokeshwar et al. 2005). Im Rahmen der Nachsorge und Rezidivdiagnostik sind Urinmarker folglich von größter Bedeutung und hier decken die Kosten auch den Nutzen der Untersuchung (Stenzl et al. 2008).

Denkbar wären in Primär- und Rezidivdiagnostik auch Kombinationen verschiedener Urinmarker wie Urinzytologie in Kombination mit NMP22 und FISH oder uCyt+™ zusammen mit NMP22 und FISH. Dabei kann die Sensitivität annähernd 100% erreichen, während die Spezifität jedoch durch viele falsch positive Ergebnisse stark absinkt (Horstmann et al. 2009).

Gerade bei niedrigmalignen Formen des Harnblasenkarzinoms ist es nötig, die Patienten konsequent und engmaschig nachzuverfolgen, da Rezidive schleichend und oft klinisch unsichtbar entstehen. Häufige Zystoskopien in der Nachsorge sind jedoch aufwändig, teuer und für den Patienten unangenehm (van der Aa et al. 2008; Stenzl et al. 2008). Ein verlässlicher, durch weitere Studien ausreichend validierter Urinmarker könnte die Intervalle zwischen den invasiven Nachsorgeuntersuchungen verlängern und damit die Lebensqualität

der Patienten deutlich verbessern (van Rhijn et al. 2005; Schmitz-Drager et al. 2008). Zudem würde ein solcher Urinmarkertest schon zu Beginn der Rezidivdiagnostik eine entscheidende Ergänzung zu bisher vorhandenen Prognoseindices darstellen und den behandelnden Ärzten ein wertvolles Instrument zur individuellen Risikostratifizierung der Patienten liefern.

## **4.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit**

### **4.7.1 Patientenkollektiv**

Das in die Untersuchungen eingeschlossene Patientenkollektiv entsprach aufgrund seiner überdurchschnittlich hohen Inzidenzrate an Harnblasenkarzinomen nicht der Normalverteilung in der Bevölkerung. Da es sich um das vorselektierte Patientengut eines Universitätsklinikums handelte, bestand bei vielen der Patienten im Rahmen einer Routineuntersuchung bereits aufgrund von klinischen Symptomen der dringende Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom. Innerhalb der Tumorpatienten waren zudem die Anzahl der nicht-muskelinvasiven Tumoren mit 78 % und die Anzahl der Rezidivdiagnosen mit 54 % sehr stark vertreten. Dadurch lässt sich wahrscheinlich auch die nur moderate Accuracy der besprochenen Auswertestrategien erklären. Die hier gewonnenen Erkenntnisse können somit nur schwer auf eine randomisierte Gruppe oder klinische Fragestellungen wie den Einsatz eines Urinmarkertest als Screeningparameter angewandt werden.

Die vorliegende Arbeit hatte als rein retrospektive Evaluation verschiedener Auswertestrategien der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung einige erkenntnistheoretische Nachteile. Die Nachbeobachtung begann mit dem Zeitpunkt der ersten negativen Zystoskopie nach Therapie eines nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms. Dieser Zeitpunkt war bei allen Patienten verschieden und der Studienbeginn damit sehr heterogen. Dennoch wurden alle Patienten ab diesem Zeitpunkt bis zur Rezidivdiagnose oder andernfalls mindestens über die Dauer von 24 Monaten nachverfolgt. Die Zeitspanne seit dem letzten Tumor vor Studienbeginn floss in die Regressionsanalysen mit ein.

Durch eine rein retrospektive Studie kann generell kein kausaler Zusammenhang hergestellt und daher kann im vorliegenden Fall auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein positives FISH-Ergebnis zu Beginn den weiteren Verlauf der Nachbeobachtung und damit die Behandlung des Patienten beeinflusst haben könnte.

#### **4.7.2 Befunderhebung und Datenerfassung**

Bereits seit dem Jahr 2000 besteht der Konsens, bei der Auswertung von FISH-Untersuchungen die komplette Probe mäanderförmig nach malignen Zellen mit morphologischen Auffälligkeiten zu durchsuchen, bis mindestens 25 Zellen identifiziert wurden. Andernfalls sei die komplette Probe zu untersuchen (Sokolova et al. 2000; Abbott Molecular Inc. 2012). Die chromosomalen Veränderungen dieser Zellen werden daraufhin zur Befundung der Probe nach der jeweiligen Strategie herangezogen. Bei der Befunderhebung an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen wurde die Untersuchung bei einer eindeutig positiven Probe nach den Kriterien von Abbott Molecular jedoch teilweise bereits bei weniger als 25 chromosomal auffälligen Zellkernen gestoppt und das Ergebnis handschriftlich notiert. Im Falle einer weniger auffälligen oder negativen Probe wurde jedoch die komplette Probe untersucht und die chromosomalen Eigenschaften von 25 morphologisch auffälligen Zellen notiert.

Angesichts dieser Maßnahme können bei positiven Proben Informationen verlorengegangen sein, worunter die Sensitivität der Ergebnisse leidet. Wären mehr Zellkerne pro auffälliger Probe notiert worden, so wären eventuell mehr tatsächlich Kranke als richtig positiv befundet worden. In der vorliegenden Arbeit hatte dieses Vorgehen jedoch keinen maßgeblichen Einfluss auf die Sensitivität, da die betroffenen Proben nach allen Auswertekonzepten als positiv befundet worden wären. Somit konnten die gewonnenen Daten zum Vergleich der Auswertestrategien herangezogen werden.

Obwohl die ergänzenden Daten nach besten Wissen und Gewissen aus Arztbriefen, Operationsprotokollen sowie mikrobiologischen und pathologischen Befundberichten der Klinik für Urologie des Uniklinikums Tübingen ermittelt



wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Erstellung dieser Dokumente Erkenntnisse verlorengegangen oder durcheinandergebracht worden sind.

#### **4.7.3 Untersuchervariabilität**

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen unterliegen einer gewissen Untersucherabhängigkeit. Die Interpretation von Urinzytologie-Befunden variiert stark (Raitanen et al. 2002) und wird durch eine geringe Zelldichte im Urin, Harnwegsinfektionen, Harnsteine sowie Applikation von Flüssigkeiten in die Harnblase erschwert. Da die Ergebnisse der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Hand unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden, kann es auch hier zu subjektiven Interpretationen kommen. Schwierigkeiten bereiten bei der Befundung zudem die oftmals schwachen Signale des Lokus 9p21 im Diagnose-Kit (Köhler et al. 2014) sowie die uneinheitliche Auswertung der Methode (Maffezzini et al. 2010). Die FISH-Untersuchung selbst ist kaum von störenden Einflussfaktoren betroffen, kann jedoch im Falle von massiv frei flottierenden Urothelzellen (Moatamed et al. 2013) und nach Virusinfektionen mit z.B. Polyoma-Viren (Tapia et al. 2011) vermehrt falsch-positive Ergebnisse und durch nicht erkannte Harnwegsinfektionen und Low-Grade Karzinome, eine Verschmutzung durch Gleitmittel oder vaginales Plattenepithel sowie durch einen Mangel an auswertbaren Urothelzellen vermehrt falsch-negative Ergebnisse erzeugen (Dimashkieh et al. 2013).

## 4.8 Schlussfolgerung

Die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist heutzutage schon routinemäßig in der klinischen Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms eingebunden und gibt Auskunft über Vorhandensein und Schweregrad der Erkrankung, aber auch über den Erfolg der Therapie (Ding et al. 2011). Sie erbringt als eigenständige Untersuchung, in Ergänzung zur Urinzytologie oder in Kombination mit anderen molekularen Markern hervorragende Ergebnisse, ist leicht umsetzbar und dabei weitestgehend von urogenitalen Einflussfaktoren oder dem jeweiligen Untersucher unabhängig. Die Aussagekraft dieser Methode ist jedoch stark von der jeweilig angewandten Auswertestrategie abhängig. Ein Konsens über die Auswertung der FISH-Befunde durch allgemeingültige und anerkannte Auswertekriterien besteht bisher noch nicht und ist daher dringend notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden die diagnostische und prognostische Wertigkeit bereits etablierter Auswertestrategien genauer beleuchtet und extern validiert. Diese zeigten je nach klinischer Fragestellung unterschiedliche Ergebnisse. Die besonders weit verbreitete Auswertung des Herstellers Abbott Molecular konnte sowohl in Diagnostik als auch Prognostik des Harnblasenkarzinoms durchweg die zuverlässigsten Ergebnisse liefern.

Um die Laborbefundung im klinischen Alltag zu vereinfachen und den chromosomalen Veränderungen von Harnblasenkarzinomzellen noch besser gerecht zu werden, wurde eine modifizierte Auswertestrategie vorgestellt, die sowohl in Primär- als auch Rezidivdiagnostik konkurrenzfähige Ergebnisse liefert und deren prognostische Aussagekraft als durchaus vergleichbar angesehen werden kann.

Die Urinzytologie war in ihrer Aussagekraft jedoch allen Ergebnissen der besprochenen Auswertestrategien überlegen und behält damit zusammen mit der Zystoskopie in der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms weiterhin ihre Berechtigung.

Um unnötig invasive Diagnostik zu vermeiden, wäre schließlich eine Optimierung oder die Kombination bestehender Urinmarkertests nötig und erst im weiteren Verlauf ein Wandel im klassischen Nachsorgeregime des Harnblasenkarzinoms denkbar (Todenhöfer et al. 2015).

Der Fokus zukünftiger Forschung sollte auch die Bedeutung tetraploider Zellkerne bei der Auswertung der FISH-Ergebnisse, die Validierung des Lokus 9p21 sowie die Entdeckung neuer Sonden für abweichende Gen-Loki einschließen, die die chromosomalen Variationen von Harnblasenkarzinomzellen noch besser abbilden. Ein internationaler Konsens über eine allgemein gültige Auswertestrategie mit definierten Cut-Off-Werten könnte die Effizienz dieser Methode noch weiter steigern.

Besonders in der Rezidivdiagnostik niedrigmaligner Harnblasenkarzinome könnten Patienten dann vom positiv antizipatorischen Effekt einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung profitieren. Ein positiver FISH- oder Urinzytologie/FISH-Kombinationsbefund zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums würde auf eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Rezidivtumoren hinweisen, zu einer Anpassung des Nachbeobachtungsschemas führen und eine Kontroll-Zystoskopie notwendig machen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur, dass die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in bestimmten klinischen Situationen und in ökonomisch sinnvollem Rahmen in Ergänzung zur Zystoskopie und Urinzytologie zusätzliche Erkenntnisse in der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms erbringen kann, dass das Potential dieser Untersuchung bisher jedoch noch nicht umfassend ausgeschöpft wurde.

## 5 Zusammenfassung

Ein Großteil aller Harnblasenkarzinome lässt sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als nicht-muskelinvasiv (Ta, T1 und CIS) einstufen. Diese Tumorentität neigt häufig zu Rezidiven und verursacht durch lange Nachbeobachtungszeiträume die höchsten Kosten pro Patient von der Diagnose bis zum Tod. Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms haben sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt. Als Goldstandard gilt weiterhin die Zystoskopie, im klinischen Alltag regelmäßig ergänzt durch die Urinzytologie. Unzureichende Erkenntnisse einer Urinzytologie in Bezug auf die Prognose und das Rezidivrisiko eines Patienten führten zur Entwicklung spezifischer Urinmarkertests. Darunter auch die Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung abgeschilfter Urothelzellen aus dem Urin der Patienten. Sie liefert Informationen über die Anzahl der Chromosomen 3, 7, 17 und des Lokus 9p21 in den Zellkernen einer Probe, ist variabel einsetzbar und dabei weitestgehend unabhängig von urogenitalen Einflussfaktoren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die in der Literatur beschriebenen Auswertelgorithmen der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung erstmals bezüglich ihrer klinischen Wertigkeit in der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms extern zu validieren und sie durch eine im Rahmen dieser Arbeit erstellte ‚modifizierte Auswertestrategie‘ zu ergänzen, um somit die Laborbefundung dieser Methode im klinischen Alltag zu vereinfachen und den chromosomalen Veränderungen von Harnblasenkarzinomzellen noch besser gerecht zu werden.

Das Diagnostikkollektiv der vorliegenden Arbeit umfasste 1048 Patienten, im Prognostikkollektiv waren 122 Patienten mit der Vorgeschichte eines nicht-invasiven Harnblasenkarzinoms eingeschlossen. Die gewonnenen Urinproben der Patienten wurden der Urinzytologie und Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zugeführt und anhand etablierter Auswertestrategien befundet.

Die Analyse der Befunde erfolgte mithilfe von Kontingenzanalysen, Grenzwert-optimierungskurven, uni- und multivariablen Regressionsanalysen sowie Kaplan-Meier-Schätzern.

In der Zusammenschau der Ergebnisse des Diagnostikkollektivs zeigte die Auswertung des Herstellers Abbott Molecular in Primär- und Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms konstant hohe Werte gepaart mit der jeweils höchsten Accuracy. In der reinen Primärdiagnostik wird jedoch eine Methode mit möglichst hoher Spezifität und hohem PPV favorisiert. Diese Vorgaben konnten von den besprochenen Auswertestrategien die Befundung nach Fritsche et al. mit 91 % für die Spezifität und 54 % für den PPV sowie die modifizierte Auswertung dieser Arbeit mit 86 % und 47 % am besten erfüllen. In der Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms sollte hingegen die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse möglichst gering gehalten werden, um ein Rezidivgeschehen zeitnah nachzuweisen, was durch die Auswertung der Befunde nach Bubendorf et al. mit einer Sensitivität und einem NPV von 79 % und 86 % am besten gelang.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die externe Validierung der Auswertekonzepte im Prognostikkollektiv zur objektiven Einschätzung der individuellen Prognose eines Patienten. Mit einem 24 Monate rezidiv- und progressionsfreien Überleben im Falle eines negativen FISH-Befundes zu Beginn des Nachbeobachtungszeitraums von 77 % und 92 % bot die Auswertestrategie des Herstellers Abbott Molecular das beste Konzept, ein solches Rezidivgeschehen zuverlässig auszuschließen, ohne viele falsch-negative Diagnosen zu stellen. Ein positiver Befund nach dieser Strategie war zudem mit einem signifikant erhöhten Rezidiv- und Progressionsrisiko verbunden.

Unabhängig von den Ergebnissen der FISH-Befunde war jedoch die Urinzytologie sowohl in der Primär- als auch in der Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms in ihrer klinischen und prognostischen Wertigkeit weiterhin überlegen. Die Durchführung einer Urinzytologie im Fall einer

negativen Zystoskopie hat damit auch zukünftig in der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms ihre Berechtigung und kann noch nicht durch die bereits viel versprechenden FISH-Untersuchungen ersetzt werden. Momentan scheint vielmehr eine Kombination mit der Urinzytologie das volle Potential der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auszuschöpfen.

Nur durch ein besseres Verständnis der chromosomalen Veränderungen in den Zellen des Harnblasenkarzinoms und durch den Konsens einer allgemeingültigen und anerkannten Auswertestrategie der Multitarget-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kann eine Verlängerung der Zystoskopieintervalle in der Nachsorge erreicht und damit die Rezidivdiagnostik des Harnblasenkarzinoms auch in ökonomischer Hinsicht verbessert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aaronson, D. S.; Walsh, T. J.; Smith, J. F. et al. (2009): *Meta-analysis: does lidocaine gel before flexible cystoscopy provide pain relief?* BJU Int. 104 (4), S. 506–510. PubMed ID: 19239453.
- Abbott Molecular Inc. (2012): *UroVysion. Bladder Cancer Kit*. Hg. v. Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL, USA. Online verfügbar unter <https://www.abbottmolecular.com/en-us/staticAssets/pdfs/us/urovysion-package-insert.pdf>, zuletzt geprüft am 28.12.2015.
- Abern, M. R.; Dude, A. M.; Tsivian, M.; Coogan, C. L. (2012): *The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer*. Urologic oncology (8), S. 1628–1634. PubMed ID: 22575239.
- Agarwal, P. K.; Black, P. C.; Kamat, A. M. (2008): *Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer*. World J Urol 26 (1), S. 39–44. PubMed ID: 18092171.
- Alberg, A. J.; Kouzis, A.; Genkinger, J. M. et al. (2007): *A prospective cohort study of bladder cancer risk in relation to active cigarette smoking and household exposure to secondhand cigarette smoke*. Am. J. Epidemiol. 165 (6), S. 660–666. PubMed ID: 17204516.
- Ali-El-Dein, B.; Sooriakumaran, P.; Trinh, Q.-D. et al. (2013): *Construction of predictive models for recurrence and progression in 1000 patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) from a single centre*. BJU Int. 111 (8), S. E331-41. PubMed ID: 23445082.
- Alkhateeb, S. S.; Neill, M.; Bar-Moshe, S. et al. (2011): *Long-term prognostic value of the combination of EORTC risk group calculator and molecular markers in non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical Bacille Calmette-Guérin*. Urol Ann 3 (3), S. 119–126. PubMed ID: 21976923.
- Allard, P.; Fradet, Y.; Têtu, B.; Bernard, P. (1995): *Tumor-associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder*. Clin. Cancer Res. 1 (10), S. 1195–1202. PubMed ID: 9815912.
- Allard, P.; Bernard, P.; Fradet, Y.; Têtu, B. (1998): *The early clinical course of primary Ta and T1 bladder cancer: a proposed prognostic index*. Br J Urol 81 (5), S. 692–698. PubMed ID: 9634043.
- Altieri, D. C. (2003): *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer*. Oncogene 22 (53), S. 8581–8589. PubMed ID: 14634620.
- Au, J. L.; Badalament, R. A.; Wientjes, M. G. et al. (2001): *Methods to improve efficacy of intravesical mitomycin C: results of a randomized phase III trial*. J. Natl. Cancer Inst. 93 (8), S. 597–604. PubMed ID: 11309436.

- Babjuk, M.; Soukup, V.; Pesl, M. et al. (2008): *Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pTapT1 bladder urothelial carcinoma*. *Urology* 71 (4), S. 718–722. PubMed ID: 18387400.
- Babjuk, M.; Böhle, A.; Burger, M. et al. (2015): *Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). Limited Update March 2015. Edition presented at the EAU Annual Congress Madrid 2015 (EAU Guidelines)*. Online verfügbar unter <http://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/>, zuletzt geprüft am 15.11.2015.
- Bajorin, D. F.; Dodd, P. M.; Mazumdar, M. et al. (1999): *Long-term survival in metastatic transitional-cell carcinoma and prognostic factors predicting outcome of therapy*. *J. Clin. Oncol.* 17 (10), S. 3173–3181. PubMed ID: 10506615.
- Banek, S.; Schwentner, C.; Tager, D. et al. (2012): *Prospective evaluation of fluorescence-in situ-hybridization to detect bladder cancer. Results from the UroScreen-Study*. *Urologic oncology* (8), S. 1656–1662. PubMed ID: 22621963.
- Beagher, M.; Grasso, M. (1994): *Flexible cystoscopic bladder biopsies: a technique for outpatient evaluation of the lower urinary tract urothelium*. *Urology* 44 (5), S. 756–759. PubMed ID: 7974952.
- Bellmunt, J.; Fougerey, R.; Rosenberg, J. E. et al. (2013): *Long-term survival results of a randomized phase III trial of vinflunine plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced urothelial carcinoma patients after failure of platinum-based chemotherapy*. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24 (6), S. 1466–1472. PubMed ID: 23419284.
- Berezney, R.; Coffey, D. S. (1974): *Identification of a nuclear protein matrix*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60 (4), S. 1410–1417. PubMed ID: 4214419.
- Birkhahn, M.; Mitra, A. P.; Cote, R. J. (2007): *Molecular markers for bladder cancer: the road to a multimarker approach*. *Expert Rev Anticancer Ther* 7 (12), S. 1717–1727. PubMed ID: 18062746.
- Bjerregaard, B. K.; Raaschou-Nielsen, O.; Sørensen, M. et al. (2006a): *The effect of occasional smoking on smoking-related cancers: in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. *Cancer Causes Control* 17 (10), S. 1305–1309. PubMed ID: 17111263.
- Bjerregaard, B. K.; Raaschou-Nielsen, O.; Sorensen, M. et al. (2006b): *Tobacco smoke and bladder cancer--in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119 (10), S. 2412–2416. PubMed ID: 16894557.
- Black, P. C.; Agarwal, P. K.; Dinney, Colin P N (2007): *Targeted therapies in bladder cancer--an update*. *Urol. Oncol.* 25 (5), S. 433–438. PubMed ID: 17826665.



- Böhle, A.; Bock, P. R. (2004): *Intravesical bacille Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression*. Urology 63 (4), S. 682–687. PubMed ID: 15072879.
- Bostwick, D.; Mikuz, G. (2002): *Urothelial papillary (exophytic) neoplasms*. Virchows Archiv 441 (2), S. 109–116. PubMed ID: 12189499.
- Botteman, M. F.; Pashos, C. L.; Redaelli, A. et al. (2003): *The Health Economics of Bladder Cancer. A Comprehensive Review of the Published Literature*. Pharmacoeconomics 21 (18), S. 1315–1330. PubMed ID: 14750899.
- Brausi, M.; Collette, L.; Kurth, K. et al. (2002): *Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies*. Eur. Urol. 41 (5), S. 523–531. PubMed ID: 12074794.
- Bricker, E. M.; Eisemann, B. (1950): *Bladder reconstruction from cecum and ascending colon following resection of pelvic viscera*. Ann. Surg. 132 (1), S. 77–84. PubMed ID: 15426192.
- Brocks, C. P.; Büttner, H.; Böhle, A. (2005): *Inhibition of tumor implantation by intravesical gemcitabine in a murine model of superficial bladder cancer*. J. Urol. 174 (3), S. 1115–1118. PubMed ID: 16094076.
- Bubendorf, L.; Grilli, B.; Sauter, G. et al. (2001): *Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings*. American journal of clinical pathology 116 (1), S. 79–86. PubMed ID: 11447756.
- Budman, L. I.; Kassouf, W.; Steinberg, J. R. (2008): *Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer*. Can Urol Assoc J 2 (3), S. 212–221. PubMed ID: 18682775.
- Burger, M.; Catto, James W F; Dalbagni, G. et al. (2013a): *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer*. Eur Urol 63 (2), S. 234–241. PubMed ID: 22877502.
- Burger, M.; Grossman, H. B.; Droller, M. et al. (2013b): *Photodynamic Diagnosis of Non-muscle-invasive Bladder Cancer with Hexaminolevulinate Cystoscopy. A Meta-analysis of Detection and Recurrence Based on Raw Data*. European urology 64 (5), S. 846–854. PubMed ID: 23602406.
- Bushman, W.; Goolsby, C.; Grayhack, J. T.; Schaeffer, A. J. (1994): *Abnormal flow cytometry profiles in patients with interstitial cystitis*. J. Urol. 152 (6 Pt 2), S. 2262–2266. PubMed ID: 7525999.
- Butz, Martin (2012): *Beruflich verursachte Krebserkrankungen. Eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2000 anerkannten Berufskrankheiten; Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in Deutschland - BK-DOK. 10., überarb. und erg. Aufl.* Berlin: Dt. Gesetzliche Unfallversicherung.

- Campos-Fernandes, J.-L.; Descotes, F.; André, J. et al. (2007): *Intérêt des marqueurs urinaires dans le diagnostic et le suivi des tumeurs urothéliales de vessie*. Prog. Urol. 17 (1), S. 23–34. PubMed ID: 17373233.
- Cauberg, E. C. C.; Kloen, S.; Visser, M. et al. (2010): *Narrow band imaging cystoscopy improves the detection of non-muscle-invasive bladder cancer*. Urology 76 (3), S. 658–663. PubMed ID: 20223505.
- Chade, D. C.; Laudone, V. P.; Bochner, B. H.; Parra, R. O. (2010): *Oncological outcomes after radical cystectomy for bladder cancer: open versus minimally invasive approaches*. J. Urol. 183 (3), S. 862–869. PubMed ID: 20083269.
- Chang, S. S.; Hassan, J. M.; Cookson, M. S. et al. (2003): *Delaying radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer results in worse pathological stage*. J. Urol. 170 (4 Pt 1), S. 1085–1087. PubMed ID: 14501697.
- Chaturvedi, A. K.; Engels, E. A.; Gilbert, E. S. et al. (2007): *Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer. evaluation of long-term risk*. Journal of the National Cancer Institute 99 (21), S. 1634–1643. PubMed ID: 17971527.
- Chavan, S.; Bray, F.; Lortet-Tieulent, J. et al. (2014): *International variations in bladder cancer incidence and mortality*. European Urology 66 (1), S. 59–73. PubMed ID: 24451595.
- Clifton, M. M.; Psutka, S. P.; Boorjian, S. A. et al. (2014): *Cancer-specific mortality following radical cystectomy for bladder cancer with lymph node involvement: impact of pathologic disease features and adjuvant chemotherapy*. World J Urol 33 (3), S. 373–379. PubMed ID: 24833245.
- Coffey, R. C. (1911): *Physiologic implantation of the severed ureter or common bile-duct into the intestine*. JAMA LVI (6), S. 397.
- Colt, J.; Friesen, M.; Stewart, P. et al. (2014): *A Case-Control Study of Occupational Exposure to Metalworking Fluids and Bladder Cancer Risk among Men*. Occupational and environmental medicine 71 (10), S. 667–674. PubMed ID: 25201311.
- Culine, S.; Theodore, C.; Santis, M. de et al. (2006): *A phase II study of vinflunine in bladder cancer patients progressing after first-line platinum-containing regimen*. Br. J. Cancer 94 (10), S. 1395–1401. PubMed ID: 16622447.
- Dash, A.; Galsky, M. D.; Vickers, A. J. et al. (2006): *Impact of renal impairment on eligibility for adjuvant cisplatin-based chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder*. Cancer 107 (3), S. 506–513. PubMed ID: 16773629.
- Deliveliotis, C.; Papatsoris, A.; Chrisofos, M. et al. (2005): *Urinary diversion in high-risk elderly patients: modified cutaneous ureterostomy or ileal conduit?* Urology 66 (2), S. 299–304. PubMed ID: 16040096.

- Dimashkieh, H.; Wolff, D. J.; Smith, T. M. et al. (2013): *Evaluation of urovysion and cytology for bladder cancer detection: a study of 1835 paired urine samples with clinical and histologic correlation*. *Cancer Cytopathol* 121 (10), S. 591–597. PubMed ID: 23801650.
- Ding, T.; Wang, Y. K.; Cao, Y. H.; Yang, L. Y. (2011): *Clinical utility of fluorescence in situ hybridization for prediction of residual tumor after transurethral resection of bladder urothelial carcinoma*. *Urology* 77 (4), S. 855–859. PubMed ID: 21296388.
- Divrik, R. T.; Yildirim, U.; Zorlu, F.; Ozen, H. (2006): *The effect of repeat transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with T1 tumors of the bladder who received intravesical mitomycin: a prospective, randomized clinical trial*. *J. Urol.* 175 (5), S. 1641–1644. PubMed ID: 16600720.
- Eble, John N. (2006): *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. [... editorial and consensus conference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002]*. Reprint. Lyon: IARC Press (World Health Organization classification of tumours, 6).
- Edge, Stephen B.; Byrd, D. R.; Compton, C. C.; Fritz, A. G.; Greene, F. L.; Trotti, A. (2010): *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer.
- Esposti, P. L.; Moberger, G.; Zajicek, J. (1970): *The cytologic diagnosis of transitional cell tumors of the urinary bladder and its histologic basis. A study of 567 cases of urinary-tract disorder including 170 untreated and 182 irradiated bladder tumors*. *Acta Cytol.* 14 (3), S. 145–155. PubMed ID: 4985639.
- Fang, H.; Yao, B.; Yan, Y. et al. (2013): *Diabetes mellitus increases the risk of bladder cancer: an updated meta-analysis of observational studies*. *Diabetes Technol. Ther.* 15 (11), S. 914–922. PubMed ID: 24180357.
- Ferlay, J.; Randi, G.; Bosetti, C. et al. (2008): *Declining mortality from bladder cancer in Europe*. *BJU international*, S. 11–19. PubMed ID: 17971176.
- Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J. et al. (2013a): *Cancer incidence and mortality patterns in Europe. estimates for 40 countries in 2012*. *European journal of cancer* 49 (6), S. 1374–1403. PubMed ID: 23485231.
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M. et al. (2013b): *GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Online verfügbar unter <http://globocan.iarc.fr>, zuletzt geprüft am 28.12.15.
- Fleischmann, A.; Thalmann, G. N.; Markwalder, R.; Studer, U. E. (2005): *Extracapsular extension of pelvic lymph node metastases from urothelial carcinoma of the bladder is an independent prognostic factor*. *J. Clin. Oncol.* 23 (10), S. 2358–2365. PubMed ID: 15800327.

- Freedman, N. D.; Silverman, D. T.; Hollenbeck, A. R. et al. (2011): *Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women*. JAMA : the journal of the American Medical Association 306 (7), S. 737–745. PubMed ID: 3441175.
- Fritsche, H. M.; Burger, M.; Dietmaier, W. et al. (2010): *Multicolor FISH (UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder*. American journal of clinical pathology 134 (4), S. 597–603. PubMed ID: 20855641.
- Gallagher, B. L.; Joudi, F. N.; Maymí, J. L.; O'Donnell, M. A. (2008): *Impact of previous bacille Calmette-Guérin failure pattern on subsequent response to bacille Calmette-Guérin plus interferon intravesical therapy*. Urology 71 (2), S. 297–301. PubMed ID: 18308107.
- García-Closas, M.; Malats, N.; Silverman, D. et al. (2005): *NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses*. Lancet 366 (9486), S. 649–659. PubMed ID: 16112301.
- Gayed, B. A.; Seideman, C.; Lotan, Y. (2013): *Cost-effectiveness of fluorescence in situ hybridization in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma*. The Journal of urology 190 (4), S. 1181–1186. PubMed ID: 23583531.
- Gerharz, E. W.; Turner, W. H.; Kälble, T.; Woodhouse, C R J (2003): *Metabolic and functional consequences of urinary reconstruction with bowel*. BJU Int. 91 (2), S. 143–149. PubMed ID: 12519116.
- Gerharz, E. W.; Månsson, A.; Hunt, S. et al. (2005): *Quality of life after cystectomy and urinary diversion: an evidence based analysis*. J. Urol. 174 (5), S. 1729–1736. PubMed ID: 16217273.
- Ghoneim, M. A.; Abdel-Latif, M.; el-Mekresh, M. et al. (2008): *Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: 2,720 consecutive cases 5 years later*. J. Urol. 180 (1), S. 121–127. PubMed ID: 18485392.
- Giannarini, G.; Kessler, T. M.; Thoeny, H. C. et al. (2010): *Do patients benefit from routine follow-up to detect recurrences after radical cystectomy and ileal orthotopic bladder substitution?* Eur. Urol. 58 (4), S. 486–494. PubMed ID: 20541311.
- Goebell, P. J.; Villanueva, C. M.; Rettenmeier, A. W. et al. (2004): *Environmental exposure, chlorinated drinking water, and bladder cancer*. World J Urol 21 (6), S. 424–432. PubMed ID: 14689225.
- Goebell, P. J.; Groshen, S. L.; Schmitz-Dräger, B. J. (2008): *Guidelines for development of diagnostic markers in bladder cancer*. World J Urol 26 (1), S. 5–11. PubMed ID: 18253738.
- Goessl, C.; Knispel, H. H.; Miller, K.; Klän, R. (1997): *Is routine excretory urography necessary at first diagnosis of bladder cancer?* J. Urol. 157 (2), S. 480–481. PubMed ID: 8996338.

- Gofrit, O. N.; Pode, D.; Lazar, A. et al. (2006): *Watchful waiting policy in recurrent Ta G1 bladder tumors*. Eur. Urol. 49 (2), S. 303–307. PubMed ID: 16413659.
- Gofrit, O. N.; Zorn, K. C.; Silvestre, J. et al. (2008): *The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer*. Urol. Oncol. 26 (3), S. 246–249. PubMed ID: 18452813.
- Gordis, Leon (2008): *Epidemiologie*. Dt. Erstaussg. Marburg: Kilian.
- Grimm, M.-O.; Steinhoff, C.; Simon, X. et al. (2003): *Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study*. J. Urol. 170 (2 Pt 1), S. 433–437. PubMed ID: 12853793.
- Grossman, H. B.; Messing, E.; Soloway, M. et al. (2005): *Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay*. JAMA 293 (7), S. 810–816. PubMed ID: 15713770.
- Grossman, H. B.; Stenzl, A.; Moyad, M. A.; Droller, M. J. (2008): *Bladder cancer: chemoprevention, complementary approaches and budgetary considerations*. Scand J Urol Nephrol Suppl (218), S. 213–233. PubMed ID: 18815935.
- Grunze, Heinz; Spriggs, Arthur I. (1983): *History of clinical cytology. A selection of documents*. 2nd ed. Darmstadt: G-I-T Verlag E. Giebel.
- Gudjónsson, S.; Isfoss, B. L.; Hansson, K. et al. (2008): *The value of the UroVysion assay for surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer*. Eur. Urol. 54 (2), S. 402–408. PubMed ID: 18082934.
- Halling, K. C.; King, W.; Sokolova, I. A. et al. (2000): *A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma*. J. Urol. 164 (5), S. 1768–1775. PubMed ID: 11025767.
- Hautmann, R. E.; Abol-Enein, H.; Hafez, K. et al. (2007): *Urinary diversion*. Urology 69 (1 Suppl), S. 17–49. PubMed ID: 17280907.
- Herr, H. W. (2006): *Max Nitze, the cystoscope and urology*. J. Urol. 176 (4 Pt 1), S. 1313–1316. PubMed ID: 16952618.
- Hirao, Y.; Kim, W.-J.; Fujimoto, K. (2009): *Environmental factors promoting bladder cancer*. Curr Opin Urol 19 (5), S. 494–499. PubMed ID: 19553820.
- Höglund, M.; Säll, T.; Heim, S. et al. (2001): *Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma*. Cancer Res. 61 (22), S. 8241–8246. PubMed ID: 11719456.
- Höglund, M. (2012): *The bladder cancer genome; chromosomal changes as prognostic makers, opportunities, and obstacles*. Urol. Oncol. 30 (4), S. 533–540. PubMed ID: 22742566.
- Holick, C. N.; Giovannucci, E. L.; Stampfer, M. J.; Michaud, D. S. (2006): *A prospective study of fish, marine fatty acids, and bladder cancer risk among men and women (United States)*. Cancer Causes Control 17 (9), S. 1163–1173. PubMed ID: 17006722.

- Holmäng, S.; Ströck, V. (2012): *Should follow-up cystoscopy in bacillus Calmette-Guérin-treated patients continue after five tumour-free years?* Eur. Urol. 61 (3), S. 503–507. PubMed ID: 22119022.
- Hong, Y. M.; Loughlin, K. R. (2008): *Economic impact of tumor markers in bladder cancer surveillance.* Urology 71 (1), S. 131–135. PubMed ID: 18242381.
- Horstmann, M.; Patschan, O.; Hennenlotter, J. et al. (2009): *Combinations of urine-based tumour markers in bladder cancer surveillance.* Scandinavian journal of urology and nephrology 43 (6), S. 461–466. PubMed ID: 19903092.
- Huber, S.; Schwentner, C.; Taeger, D. et al. (2012): *Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study.* BJU international 110 (5), S. 699–708. PubMed ID: 22313585.
- Huguet, J. (2013): *Follow-up after radical cystectomy based on patterns of tumour recurrence and its risk factors.* Actas Urol Esp 37 (6), S. 376–382. PubMed ID: 23611464.
- Jeong, S.; Park, Y.; Cho, Y. et al. (2012): *Diagnostic values of urine CYFRA21-1, NMP22, UBC, and FDP for the detection of bladder cancer.* Clin. Chim. Acta 414, S. 93–100. PubMed ID: 22944145.
- Jiang, X.; Yuan, J.-M.; Skipper, P. L. et al. (2007): *Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County.* Cancer Res. 67 (15), S. 7540–7545. PubMed ID: 17671226.
- Jiang, X.; Castelao, J. E.; Yuan, J.-M. et al. (2012): *Cigarette smoking and subtypes of bladder cancer.* Int. J. Cancer 130 (4), S. 896–901. PubMed ID: 21412765.
- Jones, P. A.; Ross, R. K. (1999): *Prevention of bladder cancer.* The New England journal of medicine 340 (18), S. 1424–1426. PubMed ID: 10228196.
- Junker, K.; Boerner, D.; Schulze, W. et al. (2003): *Analysis of genetic alterations in normal bladder urothelium.* Urology 62 (6), S. 1134–1138. PubMed ID: 14665377.
- Kamat, A. M.; Gee, J. R.; Dinney, C. P. N. et al. (2006): *The case for early cystectomy in the treatment of nonmuscle invasive micropapillary bladder carcinoma.* The Journal of urology 175 (3 Pt 1), S. 881–885. PubMed ID: 16469571.
- Kamat, A. M.; Karam, J. A.; Grossman, H. B. et al. (2011): *Prospective trial to identify optimal bladder cancer surveillance protocol: reducing costs while maximizing sensitivity.* BJU Int. 108 (7), S. 1119–1123. PubMed ID: 21426474.
- Karakiewicz, P. I.; Benayoun, S.; Zippe, C. et al. (2006): *Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder.* BJU Int. 97 (5), S. 997–1001. PubMed ID: 16542342.

- Kasraeian, A.; Barret, E.; Cathelineau, X. et al. (2010): *Robot-assisted laparoscopic cystoprostatectomy with extended pelvic lymphadenectomy, extracorporeal enterocystoplasty, and intracorporeal enterourethral anastomosis: initial Montsouris experience*. J. Endourol. 24 (3), S. 409–413. PubMed ID: 20218885.
- Kaufman, D. S.; Shipley, W. U.; Feldman, A. S. (2009): *Bladder cancer*. Lancet 374 (9685), S. 239–249. PubMed ID: 19520422.
- Kawauchi, S.; Sakai, H.; Ikemoto, K. et al. (2009): *9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology*. Hum. Pathol. 40 (12), S. 1783–1789. PubMed ID: 19733894.
- Keese, S. K.; Briggman, J. V.; Thill, G.; Wu, Y. J. (1996): *Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis*. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 6 (2-3), S. 189–214. PubMed ID: 8855388.
- Kim, P. H.; Sukhu, R.; Cordon, B. H. et al. (2014): *Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy*. BJU Int. 114 (3), S. 354–359. PubMed ID: 24128299.
- Knowles, M. A. (2008): *Molecular pathogenesis of bladder cancer*. Int. J. Clin. Oncol. 13 (4), S. 287–297. PubMed ID: 18704628.
- Koebnick, C.; Michaud, D.; Moore, S. C. et al. (2008): *Body mass index, physical activity, and bladder cancer in a large prospective study*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17 (5), S. 1214–1221. PubMed ID: 18483344.
- Köhler, C. U.; Martin, L.; Bonberg, N. et al. (2014): *Automated quantification of FISH signals in urinary cells enables the assessment of chromosomal aberration patterns characteristic for bladder cancer*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 448 (4), S. 467–472. PubMed ID: 24802410.
- Konety, B. R.; Nguyen, T. S.; Dhir, R. et al. (2000): *Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4*. Clin. Cancer Res. 6 (7), S. 2618–2625. PubMed ID: 10914702.
- Konety, B. R. (2006): *Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal*. Urol. Oncol. 24 (4), S. 326–337. PubMed ID: 16818187.
- Koutros, S.; Silverman, D. T.; Baris, D. et al. (2011): *Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study*. International journal of cancer. Journal international du cancer 129 (12), S. 2894–2904. PubMed ID: 3203248.
- Kulkarni, G. S.; Hakenberg, O. W.; Gschwend, J. E. et al. (2010): *An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer*. Eur. Urol. 57 (1), S. 60–70. PubMed ID: 19740595.

- Lammers, R. J. M.; Witjes, J. A.; Inman, B. A. et al. (2011): *The role of a combined regimen with intravesical chemotherapy and hyperthermia in the management of non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review*. Eur. Urol. 60 (1), S. 81–93. PubMed ID: 21531502.
- Lamm, S. H.; Engel, A.; Penn, C. A. et al. (2006): *Arsenic cancer risk confounder in southwest Taiwan data set*. Environmental health perspectives 114 (7), S. 1077–1082. PubMed ID: 1513326.
- Lodde, M.; Mian, C.; Wiener, H. et al. (2001): *Detection of upper urinary tract transitional cell carcinoma with ImmunoCyt: a preliminary report*. Urology 58 (3), S. 362–366. PubMed ID: 11549481.
- Lodde, M.; Mian, C.; Mayr, R. et al. (2014a): *Recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer: Prognostic models including multicolor fluorescence in situ hybridization molecular grading*. Int. J. Urol. 21 (10), S. 968–972. PubMed ID: 24947145.
- Lodde, M.; Mian, C.; Mayr, R. et al. (2014b): *Response to Editorial Comment from Dr Todenhöfer and Dr Schwentner to Recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer: Prognostic models including multicolor fluorescence in situ hybridization molecular grading*. Int. J. Urol. 21 (10), S. 974. PubMed ID: 24947451.
- Lokeshwar, V. B.; Obek, C.; Pham, H. T. et al. (2000): *Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade*. J. Urol. 163 (1), S. 348–356. PubMed ID: 10604388.
- Lokeshwar, V. B.; Soloway, M. S. (2001): *Current bladder tumor tests. does their projected utility fulfill clinical necessity?* The Journal of urology 165 (4), S. 1067–1077. PubMed ID: 11257640.
- Lokeshwar, V. B.; Habuchi, T.; Grossman, H. B. et al. (2005): *Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers*. Urology 66 (6 Suppl 1), S. 35–63. PubMed ID: 16399415.
- Lopez-Beltran, A.; Montironi, R. (2004): *Non-invasive urothelial neoplasms. according to the most recent WHO classification*. European urology 46 (2), S. 170–176. PubMed ID: 15245809.
- Lotan, Y.; Bensalah, K.; Ruddell, T. et al. (2008a): *Prospective evaluation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder*. J. Urol. 179 (6), S. 2164–2169. PubMed ID: 18423745.
- Lotan, Y.; Svatek, R. S.; Malats, N. (2008b): *Screening for bladder cancer. a perspective*. World journal of urology 26 (1), S. 13–18. PubMed ID: 18030473.
- Lotan, Y.; Shariat, S. F.; Schmitz-Dräger, B. J. et al. (2010): *Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer*. Urol. Oncol. 28 (4), S. 441–448. PubMed ID: 20610281.



- Madersbacher, S.; Hochreiter, W.; Burkhard, F. et al. (2003): *Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy*. J. Clin. Oncol. 21 (4), S. 690–696. PubMed ID: 12586807.
- Maffezzini, M.; Campodonico, F.; Capponi, G. et al. (2010): *Prognostic significance of fluorescent in situ hybridisation in the follow-up of non-muscle-invasive bladder cancer*. Anticancer Res. 30 (11), S. 4761–4765. PubMed ID: 21115937.
- Malmström, P.-U.; Sylvester, R. J.; Crawford, D. E. et al. (2009): *An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer*. Eur. Urol. 56 (2), S. 247–256. PubMed ID: 19409692.
- Marano, A.; Pan, Y.; Li, C. et al. (2000): *Chromosomal numerical aberrations detected by fluorescence in situ hybridization on bladder washings from patients with bladder cancer*. Eur. Urol. 37 (3), S. 358–365. PubMed ID: 10720866.
- Mariappan, P.; Smith, G. (2005): *A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database*. J. Urol. 173 (4), S. 1108–1111. PubMed ID: 15758711.
- Martínez-Piñero, J. A.; Martínez-Piñero, L.; Solsona, E. et al. (2005): *Has a 3-fold decreased dose of bacillus Calmette-Guerin the same efficacy against recurrences and progression of T1G3 and Tis bladder tumors than the standard dose? Results of a prospective randomized trial*. J. Urol. 174 (4 Pt 1), S. 1242–1247. PubMed ID: 16145378.
- Matsuyama, H.; Ikemoto, K.; Eguchi, S. et al. (2014): *Copy number aberrations using multicolour fluorescence in situ hybridization (FISH) for prognostication in non-muscle-invasive bladder cancer (NIMBC)*. BJU Int. 113 (4), S. 662–667. PubMed ID: 23890221.
- McDougal, W. S.; Shipley, W. U.; Kaufman, D. S. (Hg.) (2011): *Cancer of the bladder, ureter, and renal pelvis*. In: DeVita, V.T.; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S.A.; *CANCER: Principles and practice of oncology*. 9. Aufl. Philadelphia: Lippincott Raven.
- McGrath, M.; Michaud, D. S.; Vivo, I. de (2006): *Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women*. American journal of epidemiology 163 (3), S. 236–244. PubMed ID: 16319290.
- Meeks, J. J.; Bellmunt, J.; Bochner, B. H. et al. (2012): *A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer*. Eur. Urol. 62 (3), S. 523–533. PubMed ID: 22677572.
- Merseburger, A. S.; Kuczyk, M. A. (2007): *The value of bladder-conserving strategies in muscle-invasive bladder carcinoma compared with radical surgery*. Curr Opin Urol 17 (5), S. 358–362. PubMed ID: 17762631.

- Mian, C.; Lodde, M.; Comploj, E. et al. (2003): *Liquid-based cytology as a tool for the performance of uCyt+ and Urovysion Multicolour-FISH in the detection of urothelial carcinoma*. *Cytopathology* 14 (6), S. 338–342. PubMed ID: 14632732.
- Mian, C.; Lodde, M.; Comploj, E. et al. (2006a): *Multiprobe fluorescence in situ hybridisation: prognostic perspectives in superficial bladder cancer*. *J. Clin. Pathol.* 59 (9), S. 984–987. PubMed ID: 16935973.
- Mian, C.; Maier, K.; Comploj, E. et al. (2006b): *uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses*. *Cancer* 108 (1), S. 60–65. PubMed ID: 16411183.
- Michaud, D. S.; Spiegelman, D.; Clinton, S. K. et al. (1999): *Fluid intake and the risk of bladder cancer in men*. *The New England journal of medicine* 340 (18), S. 1390–1397. PubMed ID: 10228189.
- Miladi, M.; Peyromaure, M.; Zerbib, M. et al. (2003): *The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours*. *Eur. Urol.* 43 (3), S. 241–245. PubMed ID: 12600426.
- Millán-Rodríguez, F.; Chéchile-Toniolo, G.; Salvador-Bayarri, J. et al. (2000a): *Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence*. *J. Urol.* 164 (3 Pt 1), S. 680–684. PubMed ID: 10954628.
- Millán-Rodríguez, F.; Chéchile-Toniolo, G.; Salvador-Bayarri, J. et al. (2000b): *Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups*. *J. Urol.* 164 (4), S. 1183–1187. PubMed ID: 10992362.
- Moatamed, N. A.; Apple, S. K.; Bennett, C. J. et al. (2013): *Exclusion of the uniform tetraploid cells significantly improves specificity of the urine FISH assay*. *Diagn. Cytopathol.* 41 (3), S. 218–225. PubMed ID: 21987521.
- Moonen, P. M. J.; Merks, G. F. M.; Peelen, P. et al. (2007): *UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer*. *Eur. Urol.* 51 (5), S. 1275–1280. PubMed ID: 17084511.
- Morales, A.; Eiding, D.; Bruce, A. W. (1976): *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. *J. Urol.* 116 (2), S. 180–183. PubMed ID: 820877.
- Murphy, W. M. (1990): *Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms*. *Hum. Pathol.* 21 (9), S. 886–896. PubMed ID: 2203672.
- Myers-Irvin, J. M.; Landsittel, D.; Getzenberg, R. H. (2005): *Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer*. *J. Urol.* 174 (1), S. 64–68. PubMed ID: 15947579.
- Nguyen, C. T.; Jones, J. S. (2008): *Defining the role of NMP22 in bladder cancer surveillance*. *World J Urol* 26 (1), S. 51–58. PubMed ID: 18058108.

- Nguyen, C. T.; Litt, D. B.; Dolar, S. E. et al. (2009): *Prognostic significance of nondiagnostic molecular changes in urine detected by UroVysion fluorescence in situ hybridization during surveillance for bladder cancer*. Urology 73 (2), S. 347–350. PubMed ID: 19022486.
- Nieuwenhuijzen, J. A.; de Vries, Remco R; Bex, A. et al. (2008): *Urinary diversions after cystectomy: the association of clinical factors, complications and functional results of four different diversions*. Eur. Urol. 53 (4), S. 834–844. PubMed ID: 17904276.
- Noon, A. P.; Albertsen, P. C.; Thomas, F. et al. (2013): *Competing mortality in patients diagnosed with bladder cancer: evidence of undertreatment in the elderly and female patients*. British journal of cancer 108 (7), S. 1534–1540. PubMed ID: 23481180.
- Oddens, J. R.; van der Meijden, A. P. M.; Sylvester, R. (2004): *One immediate postoperative instillation of chemotherapy in low risk Ta, T1 bladder cancer patients. Is it always safe?* Eur. Urol. 46 (3), S. 336–338. PubMed ID: 15306104.
- Oddens, J. R.; Brausi, M.; Sylvester, R. et al. (2013): *Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of maintenance*. Eur. Urol. 63 (3), S. 462–472. PubMed ID: 23141049.
- Paik, M. L.; Scolieri, M. J.; Brown, S. L. et al. (2000): *Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy*. J. Urol. 163 (6), S. 1693–1696. PubMed ID: 10799162.
- Papanicolaou, G. N.; Marshall, V. F. (1945): *Urine Sediment Smears as a Diagnostic Procedure in Cancers of the Urinary Tract*. Science 101 (2629), S. 519–520. PubMed ID: 17775845.
- Patschan, O.; Horstmann, M.; Thomas, C. et al. (2008): *Diagnostik von Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts*. Urologe 47 (11), S. 1487–1496.
- Pelucchi, C.; Galeone, C.; Tramacere, I. et al. (2012): *Alcohol drinking and bladder cancer risk: a meta-analysis*. Ann. Oncol. 23 (6), S. 1586–1593. PubMed ID: 22039083.
- Polymedco Inc. (2014): *The BTA stat® Test Package Insert. A Rapid Test For the Qualitative Detection of Bladder Tumor Associated Antigen in Human Urine*. Hg. v. Polymedco Inc. Redmond, WA, USA. Online verfügbar unter [http://www.btastat.com/package\\_insertP1.html](http://www.btastat.com/package_insertP1.html), zuletzt geprüft am 28.12.2015.
- Ponsky, L. E.; Sharma, S.; Pandrangi, L. et al. (2001): *Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22*. J. Urol. 166 (1), S. 75–78. PubMed ID: 11435827.
- Pycha, A.; Lodde, M.; Comploj, E. et al. (2004): *Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem?* Urology 63 (3), S. 472–475. PubMed ID: 15028440.

- Raitanen, M.-P.; Aine, R.; Rintala, E. et al. (2002): *Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis.* Eur. Urol. 41 (3), S. 284–289. PubMed ID: 12180229.
- Raj, G. V.; Herr, H.; Serio, A. M. et al. (2007): *Treatment paradigm shift may improve survival of patients with high risk superficial bladder cancer.* J. Urol. 177 (4), S. 1283–1286. PubMed ID: 17382713.
- Rathert, Peter; Roth, S. (2007): *Urinzytologie. Praxis und Atlas.* 4., aktualisierte und erg. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin.
- Richter, J.; Beffa, L.; Wagner, U. et al. (1998): *Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization.* Am. J. Pathol. 153 (5), S. 1615–1621. PubMed ID: 9811354.
- Richterstetter, M.; Wullich, B.; Amann, K. et al. (2012): *The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer.* BJU Int. 110 (2 Pt 2), S. E76-9. PubMed ID: 22313727.
- Riesz, P.; Lotz, G.; Páska, C. et al. (2007): *Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique.* Pathol. Oncol. Res. 13 (3), S. 187–194. PubMed ID: 17922047.
- Rink, M.; Furberg, H.; Zabor, E. C. et al. (2013): *Impact of smoking and smoking cessation on oncologic outcomes in primary non-muscle-invasive bladder cancer.* Eur. Urol. 63 (4), S. 724–732. PubMed ID: 22925575.
- Ritter, R.; Hennenlotter, J.; Kühs, U. et al. (2014): *Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer.* Urol. Oncol. 32 (3), S. 337–344. PubMed ID: 24332643.
- Rödel, C.; Grabenbauer, G. G.; Kühn, R. et al. (2002): *Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results.* J. Clin. Oncol. 20 (14), S. 3061–3071. PubMed ID: 12118019.
- Rosenberg, J. E.; Carroll, P. R.; Small, E. J. (2005): *Update on chemotherapy for advanced bladder cancer.* J. Urol. 174 (1), S. 14–20. PubMed ID: 15947569.
- Ros, M. M.; Gago-Dominguez, M.; Aben, K. K. et al. (2012): *Personal hair dye use and the risk of bladder cancer. a case-control study from The Netherlands.* Cancer causes & control : CCC 23 (7), S. 1139–1148. PubMed ID: 3369132.
- Santis, M. de; Bellmunt, J.; Mead, G. et al. (2009): *Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/ carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer "unfit" for cisplatin-based chemotherapy: phase II--results of EORTC study 30986.* J. Clin. Oncol. 27 (33), S. 5634–5639. PubMed ID: 19786668.

- Santis, M. de; Bellmunt, J.; Mead, G. et al. (2012): *Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986*. J. Clin. Oncol. 30 (2), S. 191–199. PubMed ID: 22162575.
- Sarosdy, M. F.; Schellhammer, P.; Bokinsky, G. et al. (2002): *Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer*. J. Urol. 168 (5), S. 1950–1954. PubMed ID: 12394683.
- Sauter, G.; Gasser, T. C.; Moch, H. et al. (1997): *DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH*. Urol. Res. 25 Suppl 1, S. S37-43. PubMed ID: 9079755.
- Schlomer, B. J.; Ho, R.; Sagalowsky, A. et al. (2010): *Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder*. J. Urol. 183 (1), S. 62–67. PubMed ID: 19913822.
- Schmidbauer, J.; Witjes, F.; Schmeller, N. et al. (2004): *Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinic acid fluorescence cystoscopy*. J. Urol. 171 (1), S. 135–138. PubMed ID: 14665861.
- Schmitz-Drager, B. J.; Fradet, Y.; Grossman, H. B. (2008): *Bladder cancer markers in patient management. the current perspective*. World journal of urology 26 (1), S. 1–3. PubMed ID: 18060549.
- Schroeder, G. L.; Lorenzo-Gomez, M.-F.; Hautmann, S. H. et al. (2004): *A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection*. J. Urol. 172 (3), S. 1123–1126. PubMed ID: 15311054.
- Seideman, C.; Canter, D.; Kim, P. et al. (2015): *Multicenter evaluation of the role of UroVysion FISH assay in surveillance of patients with bladder cancer: does FISH positivity anticipate recurrence?* World journal of urology 33 (9), S. 1309–1313. PubMed ID: 25420920.
- Sengupta, N.; Siddiqui, E.; Mumtaz, F. H. (2004): *Cancers of the bladder*. The journal of the Royal Society for the Promotion of Health 124 (5), S. 228–229. PubMed ID: 15493783.
- Shang, P. F.; Kwong, J.; Wang, Z. P. et al. (2011): *Intravesical Bacillus Calmette-Guérin versus epirubicin for T<sub>a</sub> and T<sub>1</sub> bladder cancer*. Cochrane Database Syst Rev (5), S. CD006885. PubMed ID: 21563157.
- Shariat, S. F.; Casella, R.; Khoddami, S. M. et al. (2004): *Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer*. J. Urol. 171 (2 Pt 1), S. 626–630. PubMed ID: 14713774.
- Shinagare, A. B.; Ramaiya, N. H.; Jagannathan, J. P. et al. (2011): *Metastatic pattern of bladder cancer: correlation with the characteristics of the primary tumor*. AJR Am J Roentgenol 196 (1), S. 117–122. PubMed ID: 21178055.
- Sievert, K. D.; Amend, B.; Nagele, U. et al. (2009): *Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?* World J Urol 27 (3), S. 295–300. PubMed ID: 19271220.

- Skacel, M.; Fahmy, M.; Brainard, J. A. et al. (2003): *Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology*. J. Urol. 169 (6), S. 2101–2105. PubMed ID: 12771727.
- Sobin, Leslie Howard; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (2010): *TNM classification of malignant tumours*. Seventh edition. Chichester (U.K.), Hoboken (N.J.): Wiley-Blackwell.
- Sokolova, I. A.; Halling, K. C.; Jenkins, R. B. et al. (2000): *The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine*. The Journal of molecular diagnostics : JMD 2 (3), S. 116–123. PubMed ID: 1906906.
- Soloway, M. S.; Bruck, D. S.; Kim, S. S. (2003): *Expectant management of small, recurrent, noninvasive papillary bladder tumors*. J. Urol. 170 (2 Pt 1), S. 438–441. PubMed ID: 12853794.
- Soloway, M. S.; Saad, K. (2012): *Bladder Cancer Second Edition 2012. 2nd International Consultation on Bladder Cancer*. EAU.
- Solsona, E.; Iborra, I.; Dumont, R. et al. (2000): *The 3-month clinical response to intravesical therapy as a predictive factor for progression in patients with high risk superficial bladder cancer*. J. Urol. 164 (3 Pt 1), S. 685–689. PubMed ID: 10953125.
- Soukup, V.; Babjuk, M.; Bellmunt, J. et al. (2012): *Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature*. Eur. Urol. 62 (2), S. 290–302. PubMed ID: 22609313.
- Stein, J. P.; Lieskovsky, G.; Cote, R. et al. (2001): *Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients*. J. Clin. Oncol. 19 (3), S. 666–675. PubMed ID: 11157016.
- Stein, J. P.; Clark, P.; Miranda, G. et al. (2005): *Urethral tumor recurrence following cystectomy and urinary diversion: clinical and pathological characteristics in 768 male patients*. J. Urol. 173 (4), S. 1163–1168. PubMed ID: 15758728.
- Stein, J. P.; Skinner, D. G. (2006): *Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure*. World J Urol 24 (3), S. 296–304. PubMed ID: 16518661.
- Stenzl, A.; Nagele, U.; Kuczyk, M. et al. (2005): *Cystectomy – Technical Considerations in Male and Female Patients*. EAU Update Series 3 (3), S. 138–146.
- Stenzl, A.; Hennenlotter, J.; Schilling, D. (2008): *Can we still afford bladder cancer?* Current opinion in urology 18 (5), S. 488–492. PubMed ID: 18670272.
- Stenzl, A. (2009): *Bladder cancer. work in progress*. Current opinion in urology 19 (5), S. 486–487. PubMed ID: 19652558.

- Stenzl, A.; Burger, M.; Fradet, Y. et al. (2010a): *Hexaminolevulinic acid-guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer*. J. Urol. 184 (5), S. 1907–1913. PubMed ID: 20850152.
- Stenzl, A.; Sherif, H.; Kuczyk, M. (2010b): *Radical cystectomy with orthotopic neobladder for invasive bladder cancer: a critical analysis of long term oncological, functional and quality of life results*. International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology 36 (5), S. 537–547. PubMed ID: 21044370.
- Stenzl, A.; Penkoff, H.; Dajc-Sommerer, E. et al. (2011): *Detection and clinical outcome of urinary bladder cancer with 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence cystoscopy. A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Cancer 117 (5), S. 938–947. PubMed ID: 21351082.
- Sternberg, C. N.; Vogelzang, N. J. (2003): *Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers*. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 46 Suppl, S. S105-15. PubMed ID: 12850531.
- Sylvester, R. J.; Oosterlinck, W.; van der Meijden, Adrian P M (2004): *A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials*. J. Urol. 171 (6 Pt 1), S. 2186–2190. PubMed ID: 15126782.
- Sylvester, R. J.; van der Meijden, A. P.; Oosterlinck, W. et al. (2006): *Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables. a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials*. European urology 49 (3), S. 466–477. PubMed ID: 16442208.
- Sylvester, R. J.; Oosterlinck, W.; Witjes, J. A. (2008): *The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials*. Eur. Urol. 53 (4), S. 709–719. PubMed ID: 18207317.
- Sylvester, R. J.; Brausi, M. A.; Kirkels, W. J. et al. (2010): *Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin, and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder*. Eur. Urol. 57 (5), S. 766–773. PubMed ID: 20034729.
- Tapia, C.; Glatz, K.; Obermann, E. C. et al. (2011): *Evaluation of chromosomal aberrations in patients with benign conditions and reactive changes in urinary cytology*. Cancer Cytopathol 119 (6), S. 404–410. PubMed ID: 21732550.
- Têtu, B.; Tiguert, R.; Harel, F.; Fradet, Y. (2005): *ImmunoCyt/uCyt+ improves the sensitivity of urine cytology in patients followed for urothelial carcinoma*. Mod. Pathol. 18 (1), S. 83–89. PubMed ID: 15389253.
- Têtu, B. (2009): *Diagnosis of urothelial carcinoma from urine*. Mod Pathol 22, S. S53-S59. PubMed ID: 19494853.

- Tilki, D.; Burger, M.; Dalbagni, G. et al. (2011): *Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer*. *European urology* 60 (3), S. 484–492. PubMed ID: 21684071.
- Todenhöfer, T.; Hennenlotter, J.; Guttenberg, P. et al. (2015): *Prognostic relevance of positive urine markers in patients with negative cystoscopy during surveillance of bladder cancer*. *BMC Cancer* 15, S. 155. PubMed ID: 25884545.
- Tsukamoto, M.; Matsuyama, H.; Oba, K. et al. (2002): *Numerical aberrations of chromosome 9 in bladder cancer. A possible prognostic marker for early tumor recurrence*. *Cancer Genet. Cytogenet.* 134 (1), S. 41–45. PubMed ID: 11996795.
- van der Aa, M. N.; Steyerberg, E. W.; Bangma, C. et al. (2010): *Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence. diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial*. *The Journal of urology* 183 (1), S. 76–80. PubMed ID: 19913254.
- van der Aa, M. N. M.; Steyerberg, E. W.; Sen, E. F. et al. (2008): *Patients' perceived burden of cystoscopic and urinary surveillance of bladder cancer: a randomized comparison*. *BJU Int.* 101 (9), S. 1106–1110. PubMed ID: 17888042.
- van der Meijden, A.; Oosterlinck, W.; Brausi, M. et al. (1999): *Significance of bladder biopsies in Ta,T1 bladder tumors: a report from the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group. EORTC-GU Group Superficial Bladder Committee*. *Eur. Urol.* 35 (4), S. 267–271. PubMed ID: 10419345.
- Van Der Molen, A. J.; Cowan, N. C.; Mueller-Lisse, U. G. et al. (2008): *CT urography. definition, indications and techniques. A guideline for clinical practice*. *European radiology* 18 (1), S. 4–17. PubMed ID: 17973110.
- van Le, T.-S.; Miller, R.; Barder, T. et al. (2005): *Highly specific urine-based marker of bladder cancer*. *Urology* 66 (6), S. 1256–1260. PubMed ID: 16360453.
- van Rhijn, B. W.; van der Poel, H. G.; Van der Kwast, T. H. (2005): *Urine markers for bladder cancer surveillance. a systematic review*. *European urology* 47 (6), S. 736–748. PubMed ID: 15925067.
- van Rhijn, B. W.; van der Poel, Henk G.; van der Kwast, Theo H. (2009a): *Cytology and Urinary Markers for the Diagnosis of Bladder Cancer*. *European Urology Supplements* 8 (7), S. 536–541.
- van Rhijn, B. W. G.; Burger, M.; Lotan, Y. et al. (2009b): *Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy*. *Eur. Urol.* 56 (3), S. 430–442. PubMed ID: 19576682.
- van Tilborg, A. A.; Bangma, C. H.; Zwarthoff, E. C. (2009): *Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening*. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 16 (1), S. 23–30. PubMed ID: 19120523.



- Varella-Garcia, M.; Akduman, B.; Sunpaweravong, P. et al. (2004): *The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer*. Urol. Oncol. 22 (1), S. 16–19. PubMed ID: 14969798.
- Vineis, P.; Esteve, J.; Hartge, P. et al. (1988): *Effects of timing and type of tobacco in cigarette-induced bladder cancer*. Cancer Res. 48 (13), S. 3849–3852. PubMed ID: 3378220.
- von der Maase, H.; Hansen, S. W.; Roberts, J. T. et al. (2000): *Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study*. J. Clin. Oncol. 18 (17), S. 3068–3077. PubMed ID: 11001674.
- Witjes, J.; Compérat, E.; Cowan, N. et al. (2015): *Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. Limited Update 2015 (EAU Guidelines)*. Online verfügbar unter <https://uroweb.org/guideline/bladder-cancer-muscle-invasive-and-metastatic/>, zuletzt geprüft am 03.01.2016.
- Wyszynski, A.; Tanyos, S. A.; Rees, J. R. et al. (2013): *Body mass and smoking are modifiable risk factors for recurrent bladder cancer*. Cancer 120 (3), S. 408–414. PubMed ID: 24122218.
- Yang, C. H.; Lambie, E. J.; Snyder, M. (1992): *NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus*. J. Cell Biol. 116 (6), S. 1303–1317. PubMed ID: 1541630.
- Yates, D. R.; Brausi, M. A.; Catto, James W F et al. (2012): *Treatment options available for bacillus Calmette-Guérin failure in non-muscle-invasive bladder cancer*. Eur. Urol. 62 (6), S. 1088–1096. PubMed ID: 22959049.
- Yeo, J. K.; Cho, D. Y.; Oh, M. M. et al. (2013): *Listening to music during cystoscopy decreases anxiety, pain, and dissatisfaction in patients: a pilot randomized controlled trial*. J. Endourol. 27 (4), S. 459–462. PubMed ID: 23009573.
- Yoder, B. J.; Skacel, M.; Hedgepeth, R. et al. (2007): *Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings*. Am. J. Clin. Pathol. 127 (2), S. 295–301. PubMed ID: 17210520.
- Youssef, R. F.; Lotan, Y. (2011): *Predictors of outcome of non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer*. ScientificWorldJournal 11, S. 369–381. PubMed ID: 21336453.
- Youssef, R. F.; Schlomer, B. J.; Ho, R. et al. (2012): *Role of fluorescence in situ hybridization in bladder cancer surveillance of patients with negative cytology*. Urol. Oncol. 30 (3), S. 273–277. PubMed ID: 20451422.
- Yutkin, V.; Nisman, B.; Pode, D. (2010): *Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance?* Expert Rev Anticancer Ther 10 (6), S. 787–790. PubMed ID: 20553203.

Zellweger, T.; Benz, G.; Cathomas, G. et al. (2006): *Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer*. Int. J. Cancer 119 (7), S. 1660–1665. PubMed ID: 16646074.

## 7 Anhang

### 7.1 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde vom Doktorand Lutz Philipp Guttenberg im Rahmen einer retrospektiven Studie im Zeitraum von April 2013 bis Dezember 2015 unter Betreuung von Professor Dr. med. Schwentner erstellt. Herr Dr. med. Todenhöfer war zusammen mit Herrn Hennenlotter am Konzept des Studiendesigns der vorliegenden Arbeit beteiligt. Das Kollektiv basiert auf einer Datensammlung fortlaufender Einträge von Patienten, deren Urin im Rahmen der klinischen Routine untersucht wurde.

Die dabei entstandenen Urinproben wurden von Frau Gerber und Frau Senger entsprechend den Vorgaben des UroVysion™-Kit gefärbt, unter dem Fluoreszenzmikroskop befundet und die Ergebnisse handschriftlich dokumentiert. Im Rahmen der Datenerhebung wurden diese Befunde vom Doktorand codiert, digital aufgearbeitet und in eine Basisdatenbank eingebunden. Diese Basisdatenbank ist teilweise von Mitarbeiterinnen des Urologischen Labors, teilweise von früheren Doktorandinnen und Doktoranden der Klinik für Urologie aufgebaut und fortgeführt worden. Weitere Patientendaten (wie Arztbriefe, Operationsprotokolle und pathologische Befunde) wurden durch die Klinik für Urologie an einem internen Rechner für die abschließende Datenrecherche zur Verfügung gestellt.

Die statistische Auswertung der zugrundeliegenden Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Todenhöfer. Herr Professor Dr. med. Schwentner hat in Kooperation mit Herrn Dr. med. Todenhöfer und Herrn Hennenlotter die vorliegende Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

In Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurde eine Schrift unter dem Titel *‘Prognostic relevance of positive urine markers in patients with negative cystoscopy during surveillance of bladder cancer’* bei der Zeitschrift BMC Cancer eingereicht.

Eine weitere wurde unter dem Titel *Validation and critical evaluation of the diagnostic and prognostic value of multitarget fluorescence in situ hybridization in bladder cancer – Comparison of different analysis concepts* der Zeitschrift *Urologic Oncology* vorgelegt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 7.2 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Professor Dr. med. A. Stenzl, Ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Urologie der Universität Tübingen, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. med. C. Schwentner danke ich für die Betreuung während der Datengewinnung und der Erstellung der Arbeit. Als Ansprechpartner stand er mir jederzeit hilfsbereit zur Verfügung.

Ganz besonderer Dank geht an meine Betreuer Dr. med. Tilman Todenhöfer und Herrn Jörg Hennenlotter. Als Team waren sie von Beginn an entscheidend an der Entstehung der vorliegenden Thematik beteiligt und standen mir mit ihrer enormen Fachkenntnis jederzeit hilfsbereit zur Seite. Sie betreuten mich nicht nur bei inhaltlichen Fragen, sondern auch bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten exzellent. Sie setzten sich stets dafür ein, dass ich die Arbeit in einem angemessenen Rahmen und unter optimalen Bedingungen durchführen konnte. Auch für ihre konstruktive Kritik bei der Korrektur meiner Arbeit bin ich sehr dankbar.

Dem gesamten Laborteam der Universitätsklinik für Urologie und ganz besonders Frau Valentina Gerber danke ich für die stets freundliche und aufgeschlossene Atmosphäre. Bei der Datenerhebung und dem Verständnis der Fluoreszenz in-Situ Hybridisierung hat sie mir sehr weitergeholfen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern Margot und Klaus sowie meiner Schwester Verena für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Entstehung dieser Arbeit.

Ich möchte vor allem aber auch meiner Freundin Teresa von ganzem Herzen danken. Sie half mir bei der Suche einer passenden Dissertation und musste während der Erstellung dieser Arbeit oft genug auf mich verzichten. Ohne ihre Motivation und Unterstützung hätte ich diese Arbeit vermutlich erst gar nicht in Angriff genommen.