

Aus der Abteilung für Osteopathologie
Direktor: Professor Dr. med. G. Delling
Universitätskrankenhaus Eppendorf

**Untersuchungen zur diagnostischen
und differentialdiagnostischen Bedeutung der DNA-Zytometrie
bei primären Knochentumoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anke Christine Heintz
aus Hamburg

Hamburg, 1999

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 25. Aug. 1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg am:

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. G. Delling

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	3
2	Einleitung	5
3	Material und Methoden	7
3.1	Untersuchungsmaterial	7
3.1.1	Imprintzytologien	7
3.1.2	Vorgefärbte Zytologien	7
3.1.3	Zellvereinzellung aus Paraffinblöcken	8
3.1.4	Feulgenreaktion	8
3.1.5	Lösungen	9
3.2	DNA-Image-Zytometrie	9
3.2.1	Meßverfahren	9
3.2.2	Interpretation der DNA-zytometrischen Messungen	10
3.2.2.1	Stammlinieninterpretation	10
3.2.2.2	Einzelzellinterpretation	10
3.2.2.3	DNA-Ploidie-Verteilungsmuster	11
3.3	Regressionsgradbestimmung bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen	11
4	Ergebnisse	13
4.1	Solitäre Knochenzysten	13
4.1.1	Radiologie, Histologie und Zytologie der solitären Knochenzysten	13
4.1.2	DNA-Zytometrie der solitären Knochenzysten	15
4.2	Aneurysmatische Knochenzysten	17
4.2.1	Radiologie, Histologie und Zytologie der aneurysmatischen Knochenzysten	17
4.2.2	DNA-Zytometrie der aneurysmatischen Knochenzysten	18

4.3	Niedrigmaligne zentrale Osteosarkome	22
4.3.1	Radiologie, Histologie und Zytologie der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome	22
4.3.2	DNA-Zytometrie der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome	24
4.4	Hochmaligne zentrale Osteosarkome	28
4.4.1	Radiologie, Histologie und Zytologie der hochmalignen zentralen Osteosarkome .	28
4.4.2	DNA-Zytometrie der hochmalignen zentralen Osteosarkome	32
4.5	Vergleich der DNA-zytometrischen Befunde zwischen den untersuchten Entitäten.	37
5	Diskussion	39
6	Literaturverzeichnis	48

1 Zusammenfassung

Die statische DNA-Zytometrie ist eine quantitative Untersuchungsmethode des DNA-Gehaltes einzelner Zellen. Sie liefert wichtige diagnostische und prognostische Informationen in der morphologischen Diagnostik von Geschwulsterkrankungen.

In dieser Arbeit wurden 116 Knochentumoren DNA-zytometrisch untersucht, um dadurch Hinweise zur Wertigkeit der DNA-Zytometrie im Bereich von Differentialdiagnostik und Prognose von Knochentumoren und tumorähnlichen Knochenläsionen zu erhalten. Es wurden Biopsien von 14 Patienten mit solitärer Knochenzyste, von 31 Patienten mit aneurysmatischer Knochenzyste, von 57 Patienten mit hochmalignem zentralen Osteosarkom und von 14 Patienten mit der seltenen Entität eines niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms ausgewertet. Von dieser Entität ist keine Untersuchung an einer ähnlich großen Fallzahl bekannt. Die erhobenen Meßdaten wurden nach deskriptiven Parametern wie dem $2c$ -Deviation-Index, dem Anteil diploider Zellen und dem DNA-Maximum sowie nach den Parametern der Stammlinien- und der Einzelzellinterpretation ausgewertet und die einzelnen Entitäten wurden einander gegenübergestellt.

Solitäre und aneurysmatische Knochenzysten zeigen DNA-zytometrisch keine relevanten Unterschiede. Beide Entitäten weisen diploide DNA-Verteilungsmuster ohne aneuploide Stammlinien auf. Einzelne aneuploide Zellen sind nur im Ausnahmefall nachweisbar.

Die niedrigmalignen zentralen Osteosarkome unterscheiden sich von diesen benignen Läsionen zum Teil bezüglich ihrer DNA-zytometrischen Parameter. Zwei Fälle zeigten eine zusätzliche tetraploide Stammlinie im DNA-Histogramm, weitere drei Tumoren waren durch das Auftreten aneuploider Einzelzellen gekennzeichnet. Das Auftreten von Einzelzellaneuploidien kann ein Hinweis auf eine genetische Instabilität innerhalb der Tumorzellpopulation sein und sollte Anlaß zu sorgfältiger Nachbeobachtung der betroffenen Patienten sein.

Die Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome zeigte in der Mehrzahl der untersuchten Fälle als wichtigsten Befund das Auftreten einer aneuploiden Stammlinie, womit die Diagnose eines hochmalignen Knochentumors als gesichert angesehen werden kann. Nur in vier Fällen ließ sich keine eigenständige aneuploide Stammlinie nachweisen, zwei dieser Fälle wiesen aber gehäufte Einzelzellaneuploidien auf.

Die Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome war durch die entsprechenden DNA-zytometrischen Parameter sowohl von den zystischen benignen Läsionen als auch den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen mittels DNA-Imagezytometrie abgrenzbar.

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen DNA-Parametern und dem späteren Ansprechen der hochmalignen Osteosarkome auf die neoadjuvante Chemotherapie nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß Osteosarkome mit einem niedrigeren Anteil diploider Tumorzellen ein statistisch signifikantes höheres Risiko eines Therapieversagens besitzen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden der Literatur gegenübergestellt und die Wertigkeit der statischen DNA-Zytometrie mit der Möglichkeit der Einzelzellinterpretation in der Diagnostik besonders schwierig zu beurteilender Knochentumoren diskutiert.

2 Einleitung

Knochtumoren und geschwulstähnliche Läsionen sind innerhalb der menschlichen Tumoren seltene Erkrankungen, deren biologisches Spektrum von einfachen zystischen Läsionen (solitäre Knochenzysten) über lokal aggressive zystische Prozesse unklarer Histogenese (aneurysmatische Knochenzysten) bis zu hochmalignen Sarkomen unterschiedlicher histologischer Differenzierung (z.B. Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome) reicht. Eine Besonderheit stellen die in jüngerer Zeit abgegrenzten niedrigmalignen zentralen Osteosarkome dar, die sich von den hochmalignen zentralen Osteosarkomen durch eine andere Morphologie und einen abweichenden klinischen Verlauf unterscheiden.

Voraussetzung für die Behandlung dieser Erkrankungen ist eine exakte Entitäts- und Dignitätsbestimmung, da sich daraus die Therapieentscheidung zwischen einem konservativen Vorgehen, einer lokalen intraläsionalen chirurgischen Therapie oder aber einer chirurgisch weiten Resektion ggf. mit zusätzlicher Chemotherapie ergibt. Obwohl in spezialisierten Zentren mit einer interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Onkologen, Operateuren, Radiologen und Pathologen in der Regel eine adäquate Diagnostik von Knochtumoren möglich ist, können sich im Einzelfall erhebliche differentialdiagnostische Probleme bei der exakten Einordnung skelettaler Geschwülste ergeben.

Ein weiterer Aspekt im Rahmen der morphologischen Diagnostik bei malignen Knochtumoren stellt die Herausarbeitung prognostischer Kriterien für den Verlauf dieser Erkrankungen dar. Durch die Intensivierung der neoadjuvanten Chemotherapie beim Osteosarkom konnte einerseits eine wesentliche Prognoseverbesserung dieser in der Vergangenheit oft infausten Krankheit erzielt werden. Andererseits ist davon auszugehen, daß die Prognose im Einzelfall neben den Modalitäten des Chemotherapie-Protokolls auch von biologischen Merkmalen des jeweiligen Tumors abhängt. Daher liegt es nahe, zusätzliche Befunde herauszuarbeiten, die über die histologischen Merkmale als Basis der Entitäts- und Dignitätseinschätzung hinaus Aussagen zum biologischen Verhalten ermöglichen.

Bei der Methodenwahl muß den spezifischen Besonderheiten der morphologischen Diagnostik von Knochtumoren Rechnung getragen werden. Wenn die primäre Biopsiediagnostik nicht in einem auf die Diagnostik und Therapie von Skeletterkrankungen spezialisierten Zentrum stattfindet, wird das Untersuchungsmaterial häufig im Rahmen der histopathologischen Eingangsroutine insbesondere durch Entkalkungsmaßnahmen so weit verändert, daß hochspezialisierte tumorbiologische Untersuchungen nur noch eingeschränkt möglich sind. Unfixiertes Biopsiematerial steht dann meist nicht zur Verfügung, so daß Untersuchungen, die lebende Tumorzellen erfordern, ausgeschlossen sind.

Ein Verfahren, das relativ unkompliziert zusätzliche Aussagen im Rahmen tumorbiologischer Untersuchungen ermöglicht, ist die quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe der DNA-Zytometrie. Damit kann das Auftreten numerischer chromosomaler Aberrationen in

Tumorzellpopulationen anhand der entsprechenden quantitativen Veränderungen des DNA-Gesamtgehaltes indirekt nachgewiesen werden. Die Anwendung dieses Verfahrens setzt lediglich die Verfügbarkeit von zytologischen Präparaten, die vom unfixierten Biopsiematerial gewonnen werden (Imprintzytologie) bzw. die Anfertigung von Zellvereinzlungspräparaten aus Paraffinschnitten voraus, anhand derer eine statische DNA-Zytometrie nach Feulgenfärbung durchgeführt werden kann. Die Analyse der Veränderungen erfolgt durch Erstellung einer Häufigkeitsverteilung des DNA-Gehaltes der Tumorzellen in einem sogenannten DNA-Histogramm, das in Abhängigkeit vom Ausmaß und Charakter der Veränderungen unterschiedlichen standardisierten Interpretationsansätzen unterzogen wird.

In der vorliegenden Studie wurde das Verfahren der statischen DNA-Zytometrie an benignen zystischen Läsionen (solitären und aneurysmatischen Knochenzysten) sowie an niedrigmalignen und hochmalignen zentralen Osteosarkomen eingesetzt. Ziel der Arbeit war festzustellen, welche DNA-zytometrisch nachweisbaren Veränderungen in den ausgewählten Gruppen von Läsionen vorkommen und ob sich diese anhand der DNA-zytometrischen Befunde voneinander abgrenzen lassen. Außerdem wurde geprüft, ob in der Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome Beziehungen zwischen dem DNA-zytometrischen Profil und dem Ansprechverhalten dieser Tumoren auf die neoadjuvante Chemotherapie, d.h. zum späteren Regressionsgrad, bestehen.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Studie wurden zytologische Präparate von insgesamt 116 Knochentumoren oder tumorähnlichen Läsionen untersucht. Dabei handelte es sich um 14 solitäre Knochenzysten (SKZ), 31 aneurysmatische Knochenzysten (AKZ), 14 niedrigmaligne zentrale Osteosarkome (lgOSA) und 57 hochmaligne zentrale Osteosarkome (hgOSA). Zur Untersuchung gelangte ausschließlich Material von Primäربيopsien beziehungsweise primären Resektaten und Currettagen. Patienten mit bereits erfolgter Chemotherapie wurden ausgeschlossen, da DNA-zytometrische Befunde durch die Wirkung von Zytostatika beeinflusst werden können. Die histopathologische Diagnose erfolgte in allen Fällen durch einen spezialisierten Knochenpathologen (Prof. Dr. med. G. Dellling) des Hamburger Knochentumor-Registers.

Im Rahmen der DNA-Zytometrie gelangten

- ungefärbte luftgetrocknete Imprintzytologien (87 Fälle)
- Pappenheim (PAP) vorgefärbte Tupfpräparate (23 Fälle)
- Präparate nach Zellvereinzelnung aus Paraffinblöcken (6 Fälle)

zur Verwendung.

3.1.1 Imprintzytologien

Die Anfertigung der Imprintzytologien erfolgte in der Regel im Rahmen der Schnellschnittdiagnostik. Dazu wird ein winziges unfixiertes Gewebstück mit einer Pinzette vorsichtig auf der Oberfläche mehrerer Glasobjektträger unter strikter Vermeidung von austreichenden Bewegungen stempelartig abgetupft. Die abgetupften Tumorzellen müssen dabei morphologisch intakt bleiben. Für die Festlegung des Präparate-internen 2c-Niveaus reichten in der Mehrzahl der Fälle die im Tumor enthaltenen Lymphozyten aus. Bei zellarmen, faser- bzw. matrixreichen Läsionen, die im Tumorgewebe selbst nicht genügend Blutzellen enthalten, war mitunter das gezielte Abtupfen von Blut auch aus tumorfreien Anteilen des Untersuchungsmaterials an einer Stelle der Objektträgeroberfläche erforderlich. Pro Fall wurden in der Regel 10 Imprintzytologien hergestellt, von denen ein Objektträger für die zytopathologische Beurteilung (Pappenheim-Färbung) im Rahmen der Biopsiediagnostik und die übrigen für die DNA-zytometrischen Untersuchungen zur Verfügung standen.

3.1.2 Vorgefärbte Zytologien

Bei einigen Archivfällen standen keine ungefärbten zytologischen Präparate mehr zur Verfügung, so daß auf die aufbewahrten, bereits nach Pappenheim gefärbten Imprintzytologien zurückgegriffen werden mußte. An diesen Präparaten war die Durchführung der Feulgen-Reaktion problemlos möglich, da die primäre Färbung im Rahmen der Feulgen-Hydrolyse

restlos entfernt wird. Die Deckgläser derartiger Präparate ließen sich nach Einstellen in Xylol über Nacht entfernen. Nach Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe konnte die Feulgen-Reaktion wie unter 3.1.4 beschrieben durchgeführt werden.

3.1.3 Zellvereinzellung aus Paraffinblöcken

In Fällen, bei denen keinerlei Imprint-zytologischen Präparate zur Verfügung standen, mußten Zellvereinzellungspräparate aus dem archivierten Paraffinmaterial hergestellt werden, um isolierte Tumorzellkerne für die statische Image-Zytometrie zu gewinnen (Hedley et al., 1983). Schnittmessungen an histologischen Präparaten fanden in der vorliegenden Studie nicht statt.

Nach Auswahl geeigneter Tumorgewebsareale auf den HE-gefärbten Schnittpräparaten wurden fünf je 50µm dicke Schnitte angefertigt. Mitunter mußte dabei das auszuwertende Areal auf der Oberfläche des Paraffinblockes mit einer Präpariernadel eingeritzt werden, um das Tumorgewebe aus den Schnitten von tumorfreiem Gewebe abtrennen zu können. Nach Entparaffinierung in Xylol, Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe und Überführung in physiologische Kochsalzlösung wurde das Gewebe mit Hilfe eines Skalpellens zunächst zerzupft und durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze mechanisch fein zerkleinert. Danach erfolgt die enzymatische Verdauung der Suspension mit temperierter Pepsinlösung für 30 min im Brutschrank bei 37°C. Nach 30 min wurde die Proteolyse durch Zugabe von Tris-Puffer gestoppt.

Anschließend wurden die entstandenen Partikel bei 770g für 10 min abzentrifugiert (Medifuge 200S, Heraeus), dekantiert und das Pellet in 10ml Trispuffer resuspendiert. Nach Filtration durch ein Gazefilter zur Abtrennung größerer Gewebsbestandteile und nochmaliger Zentrifugation bei 770g wurde das Zellpellet mit 3ml Trispuffer erneut resuspendiert und die Suspension auf Objektträger aufgebracht, die abschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet wurden.

3.1.4 Feulgenreaktion

Die Methode der selektiven Anfärbung von DNA durch die Feulgenreaktion ist standardisiert und im Schrifttum dokumentiert (Böcking et al., 1994; Böcking et al., 1995).

Zunächst wurden alle Präparate, d.h. auch die umgefärbten Zytologien sowie die Zellvereinzellungen 50 min in 10%igem gepufferten Formalin fixiert, um eine optimale Stabilisation der DNA während der anschließenden Hydrolyse zu gewährleisten. Nach 10minütigem Spülen in Aqua dest. erfolgte die Hydrolyse in 4n-HCl (Merck) bei 27,5°C für 55 min. Nach dreimaligem Spülen in Aqua dest. wurde die quantitative Farbreaktion der DNA mit Schiff'schem Reagenz (Merck) durchgeführt und nach 60 min durch Überführung in SO₂-Wasser gestoppt. Zuletzt erfolgten die Entwässerung und das Eindecken mit Eukitt in der für mikroskopische Präparate üblichen Weise.

3.1.5 Lösungen

- Pepsinlösung: 7ml 1n HCl auf 100ml mit Aqua dest. verdünnen; pro Fall 5ml verdünnte HCl-Lösung und 25mg Pepsin vermischen
- Tris-Puffer: 274g TrisHCl (Sigma T3253); 32g TrisBase (SigmaT1503); 351,2g NaCl; 250ml davon auf 5l mit Aqua bidest. auffüllen
- 10%iges gepuffertes Formalin: 250 ml 40% Formalin; 750 ml Aqua dest.; 4,0 g NaH₂PO₄; 6,5 g Na₂HPO₄
- SO₂-Wasser-Stammlösung: 100g Kaliumdisulfit; 900ml Aqua dest.
- SO₂-Wasser-Gebrauchslösung: 50ml SO₂-Wasser-Stammlösung; 50ml 1n HCl; 900 ml Aqua dest.

3.2 DNA-Image-Zytometrie

3.2.1 Meßverfahren

Die quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte mit dem statischen DNA-Zytometer CM1 (Fa. Hundt) in monochromatischem Grünlicht (560nm) unter Verwendung eines 40x Objektivs. Zur Vermeidung von Streulichtfehlern wurde die geräteinterne Glare-Korrektur (Haroske et al., 1995) aktiviert. Es wurden in jedem Fall zwischen 200 bis 400 Tumorzellen untersucht. Der DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle wurde gemessen und die vom Frame-Grabber digitalisierten Zellbilder gespeichert. Dadurch besteht sowohl die Möglichkeit des nachträglichen Ausschlusses von Meßartefakten, wie z.B. sich überlappender Zellen, als auch der gemeinsamen Diskussion der Einzelbilder unter Berücksichtigung histomorphologischer Besonderheiten des jeweiligen Falles. Die Festlegung des diploiden Standards (2c) ergab sich aus dem Medianwert des DNA-Gehaltes von 20 bis 30 Lymphozyten, die als Präparat-interne Referenzzellen in jedem Fall separat mitgemessen wurden. Bei umgefärbten Zytologien und Zellvereinzlungspräparaten erfolgte die Ermittlung des DNA-Gehaltes der Referenzzellen unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors von 1,1. Der Variationskoeffizient (CV) der Eichzellen lag im Mittel bei 4,3% und befand sich damit innerhalb des zulässigen publizierten Referenzbereiches (Böcking et al., 1995). Nach Umrechnung der zytometrisch bestimmten absoluten Absorptionswerte der Tumorzellen auf die relative DNA-Ploidie erfolgte die Darstellung der Häufigkeitsverteilungen in DNA-Histogrammen. Außerdem wurden Histogrammunabhängige DNA-zytometrische Parameter bestimmt:

- 2c-Deviation-Index (2c-DI): Charakterisiert die Variabilität der DNA-Einzelwerte um das diploide Vergleichsniveau (Böcking et al., 1984)
- DNA-Maximum: Maximal auftretender DNA-Einzelwert innerhalb einer untersuchten Tumorzellpopulation
- Prozentualer Anteil DNA-diploider Tumorzellen (Zellen mit einem relativen DNA-

Gehalt $>2c$)

- 5c-Exceeding -Events: Anzahl der Tumorzellen mit einem relativen DNA-Gehalt $>5c$
- 9c-Exceeding -Events: Anzahl der Tumorzellen mit einem relativen DNA-Gehalt $>9c$

3.2.2 Interpretation der DNA-zytometrischen Messungen

3.2.2.1 Stammlinieninterpretation

Wenn in einem Tumor klonale numerische chromosomale Aberrationen eintreten, die aufgrund ihrer Ausprägung eine zytometrisch erfaßbare Änderung des Gesamt-DNA-Gehaltes der Tumorzellen bewirken, so führt dies zur Etablierung eines eigenständigen Tumorzellklones mit aneuploidem DNA-Gehalt. Aus zytometrischer Sicht wird dieser Klon als DNA-aneuploide Stammlinie bezeichnet, die sich im DNA-Histogramm als Häufigkeitsmaximum (Peak) außerhalb des DNA-diploiden Bereichs darstellt. Dabei entspricht die Stammlinienploidie dem Modalwert dieses Peaks auf der Ploidie-Achse (c).

In vielen Fällen besteht aber weiterhin auch eine Tumorzellpopulation mit diploidem DNA-Gehalt fort. Es sind dann zwei Häufigkeitsmaxima (im diploiden und im aneuploiden Bereich) nachweisbar. Außerdem können bei entsprechender Proliferationsaktivität Zellen der jeweiligen G_2/M -Phasen zytometrisch nachweisbar sein. Wenn sowohl die diploiden als auch die aneuploiden Tumorzellen mitotisch aktiv sind, sind theoretisch neben den beiden Stammlinien zwei weitere Gipfel im Histogramm abgrenzbar, die der G_2/M -Phase der diploiden Population bzw. der G_2/M' -Phase der aneuploiden Population entsprechen.

Ein Histogramm wird als multimodal aneuploid mit mehreren aneuploiden Stammlinien definiert, wenn sich neben der diploiden Stammlinie mehr als ein deutlicher aneuploider Peak mit dazugehörigem G_2M' -Gipfel darstellt.

In seltenen Fällen besteht ein Tumor zum überwiegenden Teil aus Zellen mit aneuploidem DNA-Gehalt, während diploide Tumorzellen nicht oder nur einem sehr geringen Anteil vorhanden sind. Wenn der Anteil diploider Tumorzellen höchstens 15 % aller untersuchten Zellen umfaßt, wird das Histogramm als unimodal-aneuploid eingeordnet.

Eine DNA-tetraploide Stammlinie wird bei einem ausgeprägten Peak im $4c$ -Bereich mit einem Anteil an der Zellgesamtzahl von mindestens 20% und dem interaktiven Nachweis von G_2M' -Zellen im oktoploiden Bereich angenommen (Ross, 1996a).

3.2.2.2 Einzelzellinterpretation

Bevor es zur Etablierung einer eigenständigen DNA-aneuploiden Tumorzell-Stammlinie kommt, können innerhalb einer Phase der genetischen Instabilität mitunter bereits einzelne Zellen mit einem aneuploiden DNA-Gehalt nachweisbar sein, deren Identifikation mittels statistischer DNA-Zytometrie im Gegensatz zur Durchflußzytometrie möglich ist. Bei flow-zytometrischen Messungen ist es nicht auszuschließen, daß Einzelereignisse mit einem erhöhten

DNA-Gehalt in Wirklichkeit Zellkonglomerate darstellen. Bei image-zytometrischen Messungen können derartige Fehler durch die visuelle mikroskopische Kontrolle ausgeschlossen werden.

Einzelzellaneuploidie wird dann angenommen, wenn in einem Gewebe keine Hinweise auf eine sogenannte euploide Polyploidisierung vorliegen und der DNA-Gehalt von mindestens 3 Zellen außerhalb des tetraploiden (bei manchen Geweben auch des oktaploiden) Niveaus liegt. Um Meßungenauigkeiten bei der Bewertung auszuschließen, werden die Interpretationsgrenzen bei 5c (bzw. 9c) gelegt. In nichtneoplastischen Knochenzellen ist bisher noch keine euploide Polyploidisierung nachgewiesen worden (Biesterfeld et al., 1994), so daß in der hier vorliegenden Studie Einzelzellaneuploidie dann angenommen wurde, wenn innerhalb der Messung von mindestens 200 Zellen 3 Zellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ gefunden wurden und keine Hinweise auf die Etablierung einer tetraploiden Stammlinie vorlagen. Für die Einzelzellinterpretation wurde der absolute und relative Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ bzw. $>9c$ (5c bzw. 9c-Exceeding-Events bzw.-Rate) bestimmt (Böcking et al., 1984; Böcking et al., 1993).

3.2.2.3 DNA-Ploidie-Verteilungsmuster

Den dargestellten Interpretationsprinzipien folgend, wurden die Meßergebnisse folgenden Ploidie-Verteilungsmustern zugeordnet:

- A ausschließlicher Nachweis einer DNA-diploiden Stammlinie ohne Auftreten DNA-aneuploider Einzelzellen
- B DNA-diploide Stammlinie und Nachweis von Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ (Einzelzell-Aneuploidie)
- C Nachweis einer eigenständigen DNA-hyperdiploiden Stammlinie neben einer DNA-diploiden Stammlinie
- D Nachweis von mehreren (mindestens 2) DNA-hyperdiploiden Stammlinien neben einer DNA-diploiden Stammlinie
- E Nachweis einer oder mehrerer DNA-hyperdiploiden Stammlinien bei gleichzeitigem Fehlen oder nur geringer Ausprägung einer DNA-diploiden Tumorzellpopulation (maximal 15% aller gemessenen Zellen besitzen einen diploiden DNA-Gehalt)

3.3 Regressionsgradbestimmung bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen

Die Beurteilung des Ansprechens hochmaligner zentraler Osteosarkome auf die neoadjuvante Chemotherapie erfolgte nach den Kriterien von Salzer-Kuntschik et al. (1983b; 1983a) bei der Auswertung der Tumorresektate im Rahmen der COSS-Studie. Dazu wurde nach Auftrennung mit einem diamantbeschichteten Sägeblatt eine Gewebescheibe aus dem Operationspräparat entnommen und nach kontaktradiographischer Dokumentation in Methylmetacrylat eingebet-

tet. Nach Anfertigung unentkalkter Schnittpräparate konnte auf diese Weise eine Tumorge-samtebene durch Zusammensetzung dieser Großschnittpräparate rekonstruiert und die Anteile von devitalisiertem bzw. vital erhaltenem Tumorgewebe quantitativ bestimmt werden. Dabei erfolgte die übliche Unterteilung in 6 Regressionsgrade, von denen die Grade 1 bis 3 die Gruppe der Responder und die Grade 4 bis 6 die Gruppe der Nonresponder repräsentieren (Abbildung 19 und Tabelle 6).

4 Ergebnisse

4.1 Solitäre Knochenzysten

4.1.1 Radiologie, Histologie und Zytologie der solitären Knochenzysten

Die solitäre Knochenzyste ist eine metaphysär lokalisierte, meist einkammerige zystische Läsion mit dünnwandiger, scharfer Abgrenzung (Lodwick Klassifikation Ia), die den betroffenen Knochen auftreiben kann. In Einzelfällen findet sich radiologisch nach stattgehabter Infraktion ein knöchernes Fragment innerhalb der Zyste („fallen fragment sign“, Abbildung 3). Histologisch besteht die Zystenmembran aus isomorph-kernigen Stromazellen und einzelnen mehrkernigen Riesenzellen (Abbildung 3). Zelltypen fehlen und die Proliferationsrate ist gering. Mitunter finden sich halbmondartige Abscheidungen einer extrazellulären Matrix.

Untersucht wurden Präparate aus der Zystenmembran von 14 solitären Knochenzysten, die alle den typischen histologischen Wandaufbau zeigten. Die Läsionen traten in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle in der proximalen Humerusmetaphyse auf und wurden überwiegend in der ersten und zweiten Lebensdekade kurretiert (Abbildung 1).

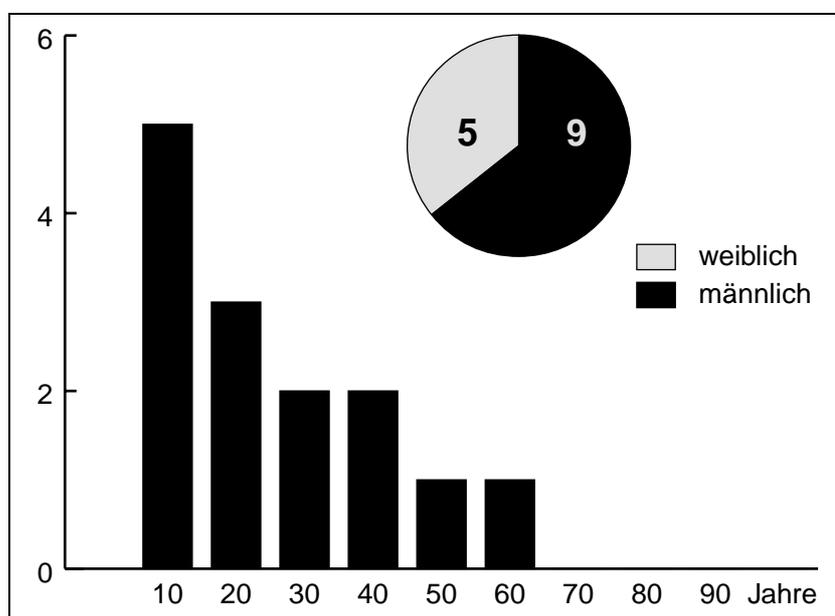


ABB. 1 Altersverteilung der untersuchten solitären Knochenzysten (N = 14)

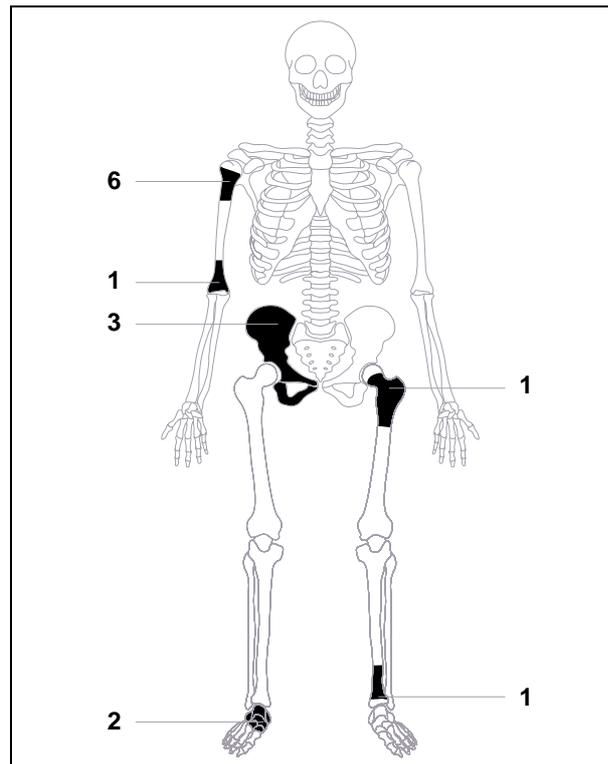


ABB. 2 Lokalisationsverteilung der untersuchten solitären Knochenzysten (N = 14)

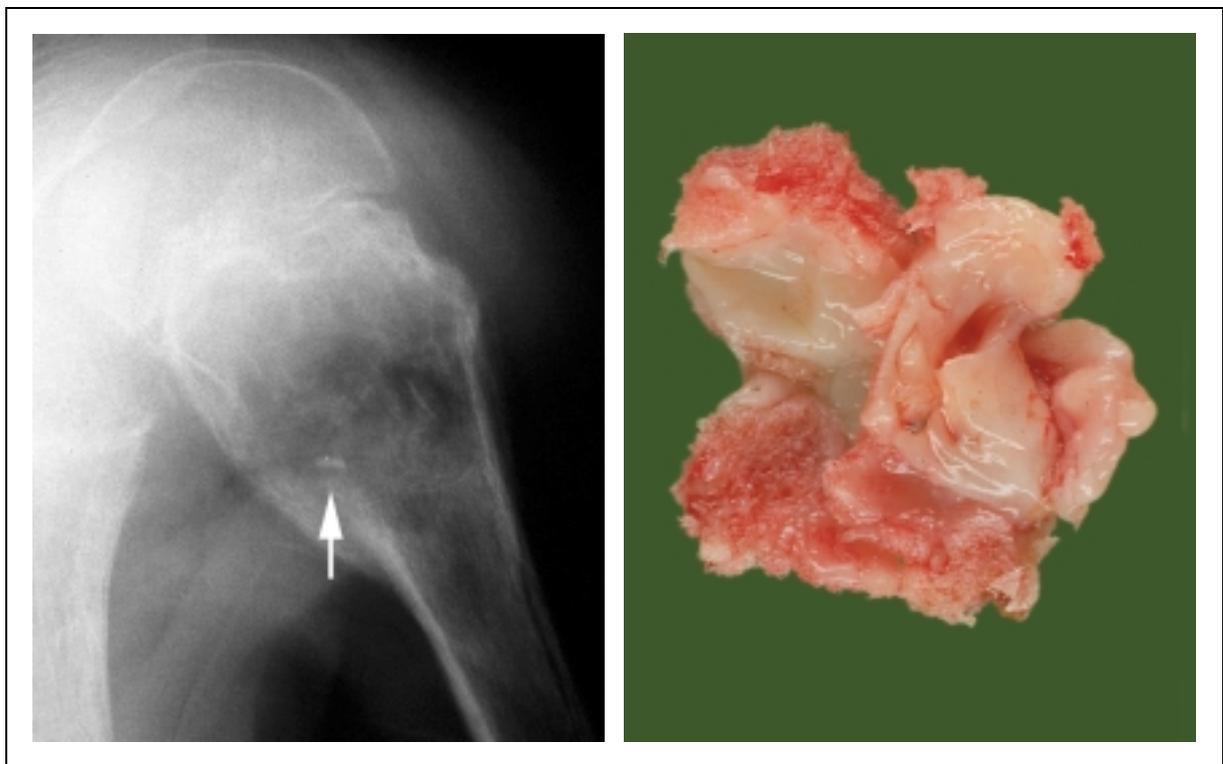


ABB. 3 Solitäre Knochenzyste
 Röntgenbild (links): zystische Auftreibung der proximalen Humerusmetaphyse und sogenanntes „fallen fragment“ 
 Operationspräparat (rechts): glatte Zystenwandung mit anhaftenden Spongiosa-Anteilen

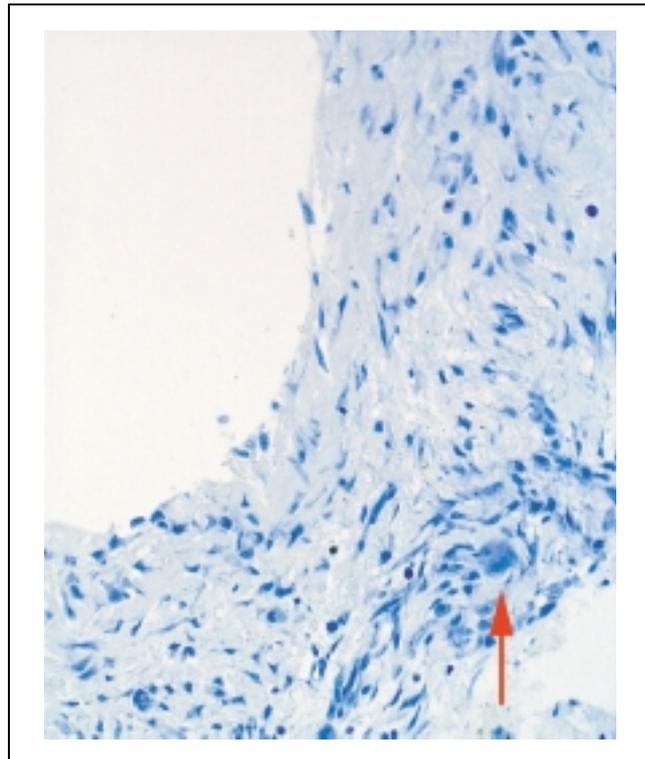


ABB. 4 Solitäre Knochenzyste, Histologie: schmale Wandung aus mononukleären Zellen, vereinzelt mehrkernige Riesenzellen →

4.1.2 DNA-Zytometrie der solitären Knochenzysten

Die untersuchten 14 Fällen zeigen alle eine DNA-diploide Stammlinie. Stammlinien im aneuploiden (einschließlich tetraploiden) Bereich kamen nicht vor. Nur eine der untersuchten Zysten zeigt mehr als drei Zellen mit einem hypertetraploiden DNA-Gehalt (5c-Exceeding-Events) und ist damit nach den Kriterien der Einzelzellinterpretation als aneuploid zu bewerten.

TABELLE 1: DNA-zytometrische Befunde bei 14 solitären Knochenzysten

Nr.	M-Nr	Anzahl aneuploider Stammlinien	Stammlinienploidie 1	Stammlinienploidie 2	Stammlinienploidie 3	Anteil diploider Zellen	DNA-Maximum	2c-Deviation-Index	5c-Exceeding-Events	9c-Exceeding-Events
1	M922453	0	2			81%	4,2	0,57	0	0
2	M950032	0	2			82%	8,7	1,43	7	0
3	M923167	0	2			84%	4,3	0,68	0	0
4	M950263	0	2			86%	4,3	0,40	0	0
5	M923458	0	2			88%	4,5	0,47	0	0
6	M942084	0	2			89%	4,5	0,33	0	0
7	M915097	0	2			89%	9,4	0,80	2	2
8	M871652	0	2			92%	4,2	0,23	0	0
9	M932927	0	2			95%	4,7	0,21	0	0
10	M951573	0	2			97%	4,0	0,10	0	0
11	M954621	0	2			97%	4,2	0,11	0	0
12	M952579	0	2			97%	4,3	0,12	0	0
13	M921578	0	2			98%	4,2	0,11	0	0
14	M923161	0	2			99%	4,3	0,05	0	0

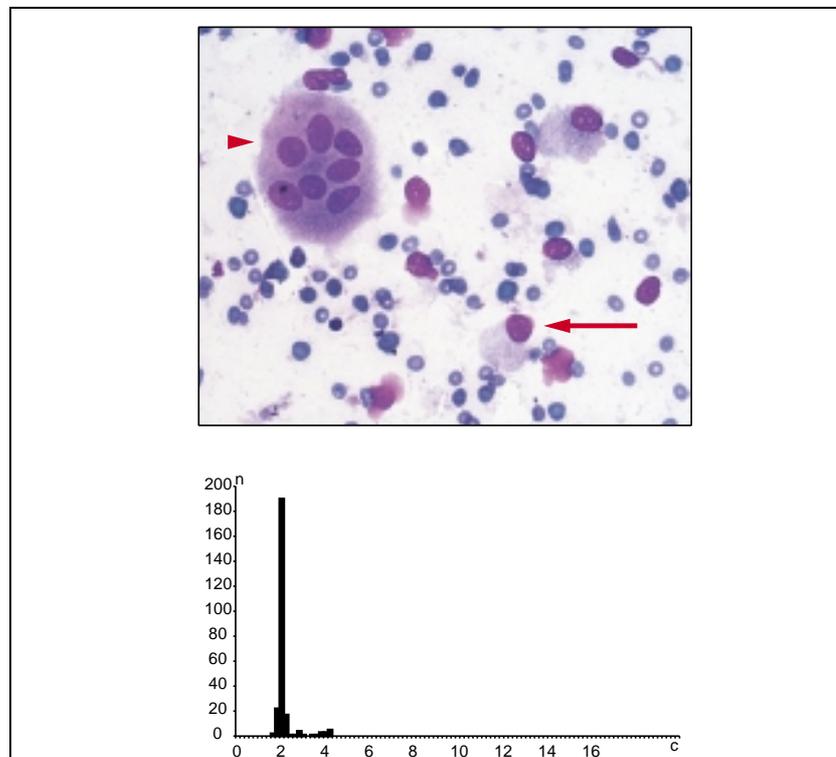


ABB. 5 Solitäre Knochenzyste, Imprintzytologie: mononukleäre Zellen → und einzelne Riesenzellen ◄ ; Histogramm: DNA-diploider Stammlinie

4.2 Aneurysmatische Knochenzysten

4.2.1 Radiologie, Histologie und Zytologie der aneurysmatischen Knochenzysten

Die aneurysmatische Knochenzyste ist eine metaphysär lokalisierte, polyzystische Läsion mit lokal destruierendem Charakter, die ein expansives Wachstum zeigt, den Knochen auftreibt und die Kortikalis schließlich zerstört. Obwohl die Läsion die ursprünglichen Knochengrenzen überschreiten kann, bleibt sie von einer dünnen Zone aus reaktiv neugebildetem Knochengewebe umgeben (Lodwick Klassifikation IIa). Histologisch zeigt sich ein charakteristischer Befund aus teils spindelligen, mononukleären Stromazellen, die in septenartigen Gewebsformationen zahlreiche blutgefüllte Hohlräume umschließen. Zwischen den mononukleären Zellen liegen meist zahlreiche mehrkernige Riesenzellen vom Osteoklastentyp sowie Siderinspeichernde Makrophagen, Kollagenfasern und gelegentlich auch Osteoid- oder Faserknochen trabekel (Abbildung 8).

Die Proliferationsrate der mononukleären Zellen kann mit Auftreten zahlreicher Mitosefiguren erheblich sein. Atypische Mitosefiguren kommen in primären aneurysmatischen Knochenzysten nicht vor.

Neben der primären Form können aneurysmatische Knochenzysten auch sekundär bei anderen benignen oder malignen Knochentumoren auftreten.

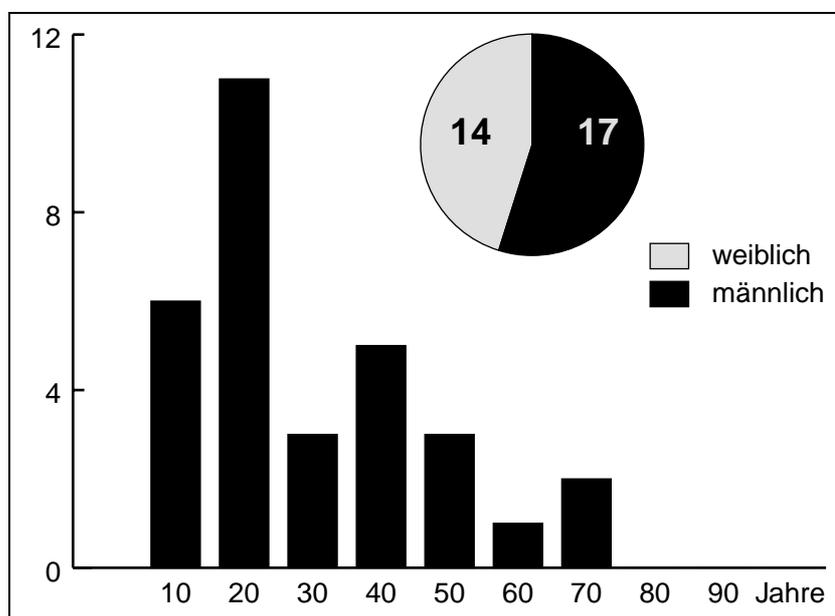


ABB. 6 Altersverteilung der untersuchten aneurysmatischen Knochenzysten (N = 31)

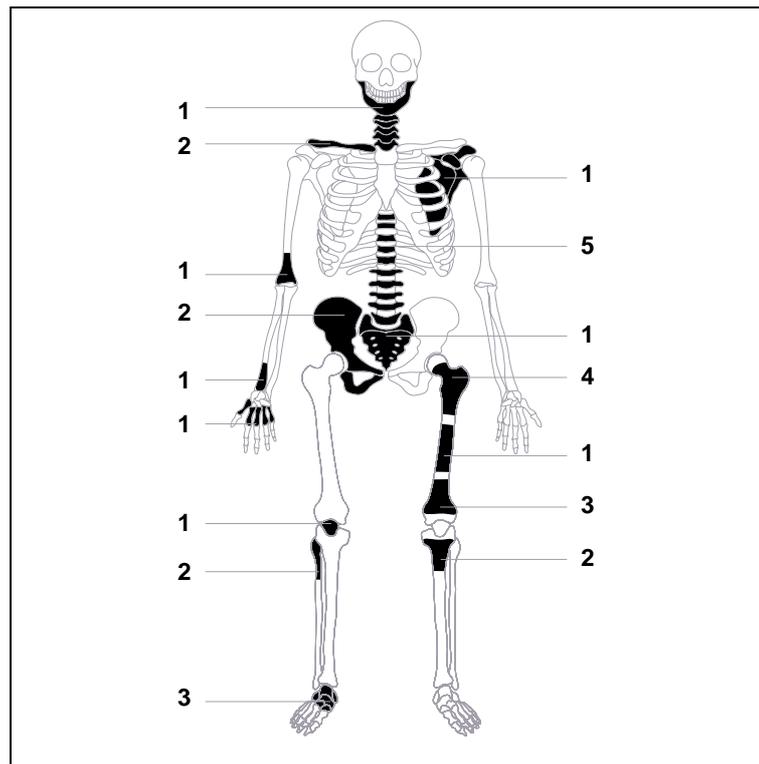


ABB. 7 Lokalisation der untersuchten aneurysmatischen Knochenzysten (N = 31)

Es wurden Präparate von 31 primären aneurysmatischen Knochenzysten image-zytometrisch untersucht. Das Häufigkeitsmaximum in der Altersverteilung der aneurysmatischen Knochenzysten lag in der zweiten Lebensdekade und damit eine Dekade höher als bei den solitären Knochenzysten (Abbildung 6). Bezüglich der Lokalisation waren die Läsionen insbesondere im Femur und in der Wirbelsäule anzutreffen. Andere Knochen, in denen die hier untersuchten aneurysmatische Knochenzysten im Gegensatz zu den solitären Knochenzysten auftraten, waren die Mandibula, die Clavicula, die Scapula und das Os sacrum (Abbildung 7).

4.2.2 DNA-Zytometrie der aneurysmatischen Knochenzysten

Die untersuchten aneurysmatischen Knochenzysten wiesen überwiegend ein unauffälliges diploides DNA-Verteilungsmuster auf. Nur in 2 Fällen (6%) fand sich ein gering ausgeprägter tetraploider Klon, dessen relativer Anteil an der Gesamtzellzahl jedoch wesentlich niedriger als die DNA-diploide Zellpopulation war. Eigenständige Stammlinien im peritriploiden bzw. hypertetraploiden Bereich kamen bei den aneurysmatischen Knochenzysten nicht vor (Tabelle 2 und Abbildung 9).

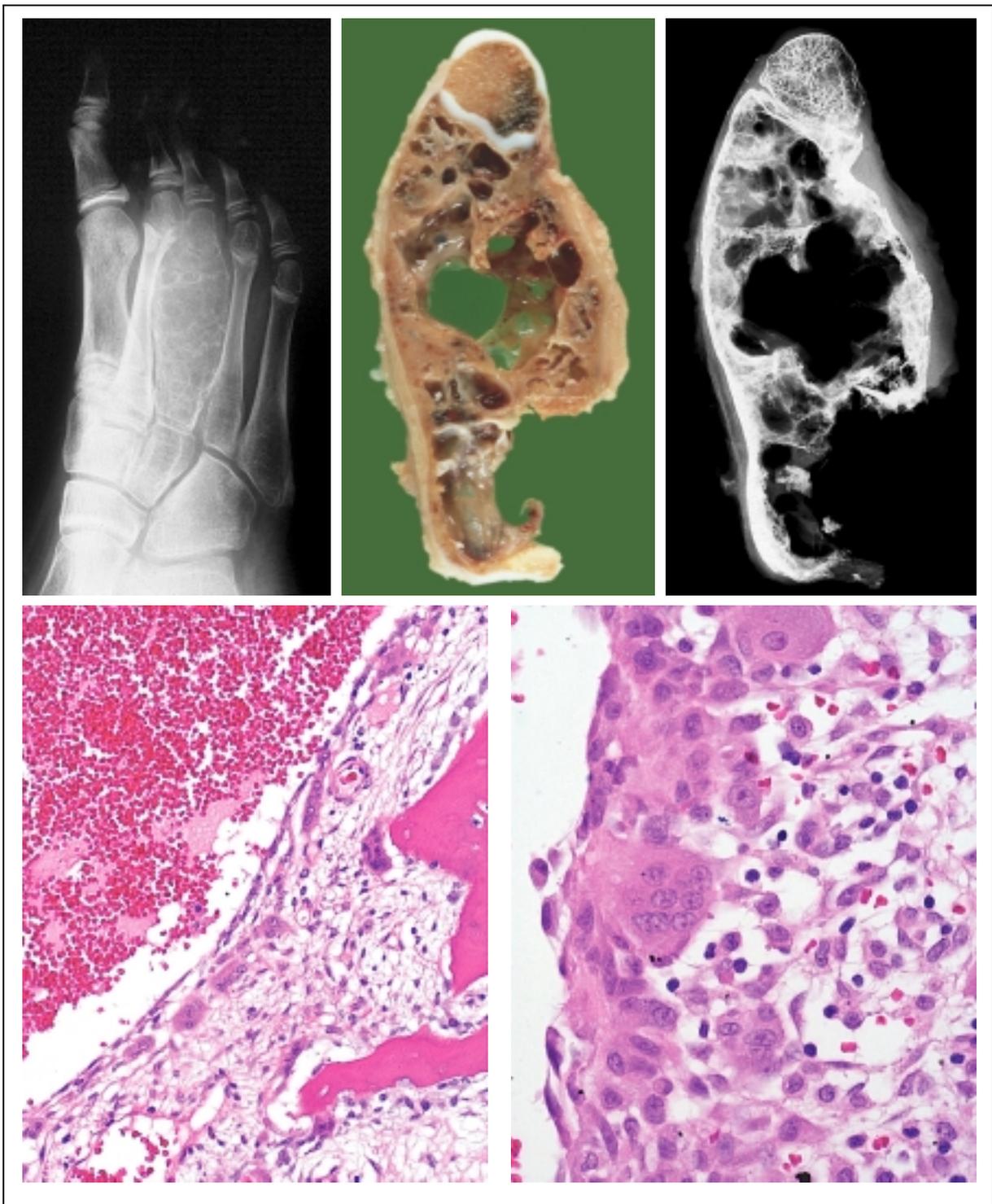


ABB. 8 Aneurysmatische Knochenzyste

Röntgenbild (oben links): polyzystische Läsion im Os metatarsale mit Auftreibung der Kortikalis

Operationspräparat (oben Mitte): multiple Zysten und schmale solidere Anteile, gelbbraune Verfärbung durch Siderinpigment

Kontaktradiographie des Operationspräparates (oben rechts): Kortikalisdestruktion plantar

Histologie: blutgefüllter Hohlraum und Zystenwand mit herdförmiger Osteoidbildung (unten links),

Ausschnitt aus der Zystenwand mit mononukleären Zellen und zahlreichen mehrkernigen Riesenzellen (unten rechts)

TABELLE 2: DNA-zytometrische Befunde bei 31 aneurysmatischen Knochenzysten

Nr.	M-Nr.	Anzahl aneuploider Stammlinien	Stammlinienploidie 1	Stammlinienploidie 2	Stammlinienploidie 3	Anteil diploider Zellen	DNA-Maximum	2c-Deviation-Index	5c-Exceeding-Events	9c-Exceeding-Events
1	M894238	0	2			83%	5,9	0,60	1	0
2	M900591	0	2			85%	4,7	0,57	0	0
3	M883562	0	2			87%	8,5	0,72	2	0
4	M891947	0	2			88%	4,5	0,48	0	0
5	M940437	0	2			88%	7,4	0,58	2	0
6	M941229	0	2			88%	4,2	0,36	0	0
7	M934392	0	2			89%	4,3	0,38	0	0
8	M961204	0	2			89%	4,4	0,38	0	0
9	M881116	0	2			89%	4,9	0,29	0	0
10	M952337	0	2			90%	4,2	0,33	0	0
11	M881790	0	2			90%	4,6	0,08	0	0
12	M894744	0	2			92%	4,3	0,35	0	0
13	M951884	0	2			92%	4,7	0,32	0	0
14	M882901	0	2			92%	6,8	0,38	1	0
15	M951000	0	2			93%	4,2	0,17	0	0
16	M871556	0	2			93%	4,2	0,24	0	0
17	M925070	0	2			94%	4,3	0,16	0	0
18	M950050	0	2			94%	4,2	0,18	0	0
19	M934148	0	2			94%	4,1	0,16	0	0
20	M940414	0	2			95%	4,2	0,18	0	0
21	M920154	0	2			95%	4,5	0,18	0	0
22	M954250	0	2			95%	4,3	0,17	0	0
23	M924356	0	2			96%	4,1	0,17	0	0
24	M933838	0	2			96%	4,1	0,11	0	0
25	M933374	0	2			96%	4,4	0,11	0	0
26	M921822	0	2			96%	4,0	0,09	0	0
27	M890790	0	2			97%	4,2	0,15	0	0
28	M871795	0	2			97%	4,0	0,08	0	0
29	M940351	0	2			99%	2,9	0,01	0	0
30	M914373	1	2	4,2		75%	35,4	6,95	5	2
31	M922153	1	2	4		76%	8,5	1,21	5	0

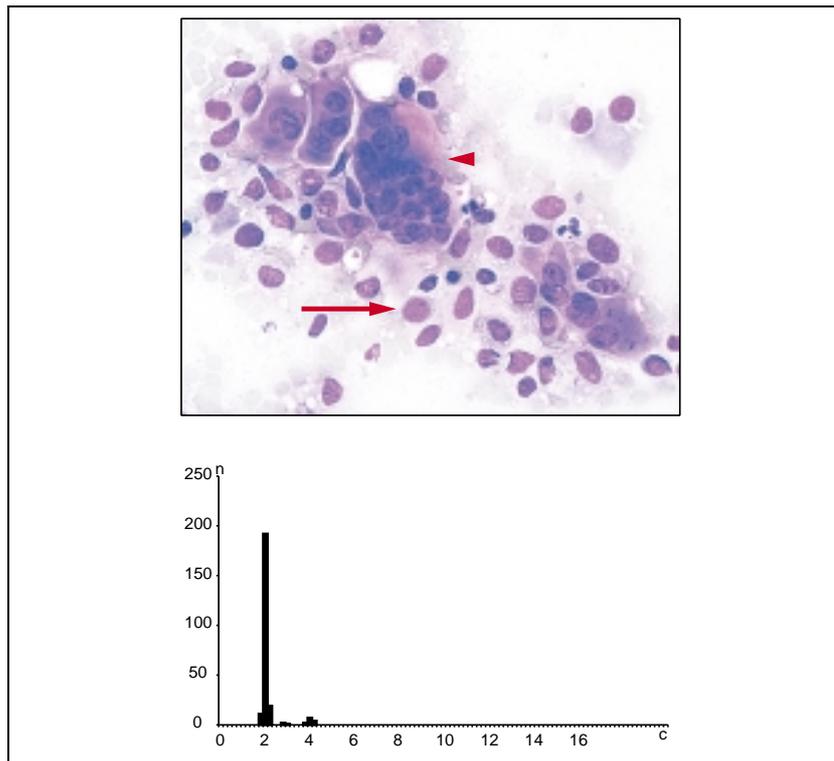


ABB. 9 Aneurysmatische Knochenzyste

Imprintzytologie: zahlreiche mononukleäre Zellen →
und mehrere mehrkernige Riesenzellen ▶, dazwischen einzelne
Lymphozyten und Granulozyten
Histogramm: DNA-diploide Stammlinie

4.3 Niedrigmaligne zentrale Osteosarkome

4.3.1 Radiologie, Histologie und Zytologie der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome

Niedrigmaligne zentrale Osteosarkome sind sehr seltene Tumoren, die sowohl radiologisch als auch feingeweblich das Bild von anderen gutartigen (tumorähnlichen) Knochenläsionen oder anderen Knochentumoren imitieren. Sie kommen in den langen Röhrenknochen in metaphysärer, seltener diaphysärer Lokalisation vor. Auch die Wirbelsäule kann betroffen sein.

Unter den in dieser Studie untersuchten Tumoren war ca. ein Drittel der Fälle spinal lokalisiert, die zweithäufigste Lokalisation stellte das distale Femur dar. Der Altersgipfel lag in der dritten Lebensdekade und damit etwas später als bei den hochmalignen zentralen Osteosarkomen, die häufiger in der zweiten Lebensdekade beobachtet werden (Abbildung 10). Die Geschlechtsverteilung wies ein Überwiegen weiblicher Patienten auf und unterschied sich damit ebenfalls von den untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkomen, bei denen in Übereinstimmung mit allgemeinen Erfahrungen das männliche Geschlecht etwas häufiger betroffen war (Abbildungen 10 und 16).

Aufgrund der Heterogenität innerhalb dieser Geschwulstgruppe existieren keine einheitlichen radiologischen Befundmuster, mit deren Hilfe die Diagnose bereits anhand des Röntgenbildes gestellt werden könnte. Die Röntgenmorphologie hängt im Einzelfall vom histologischen Sub-

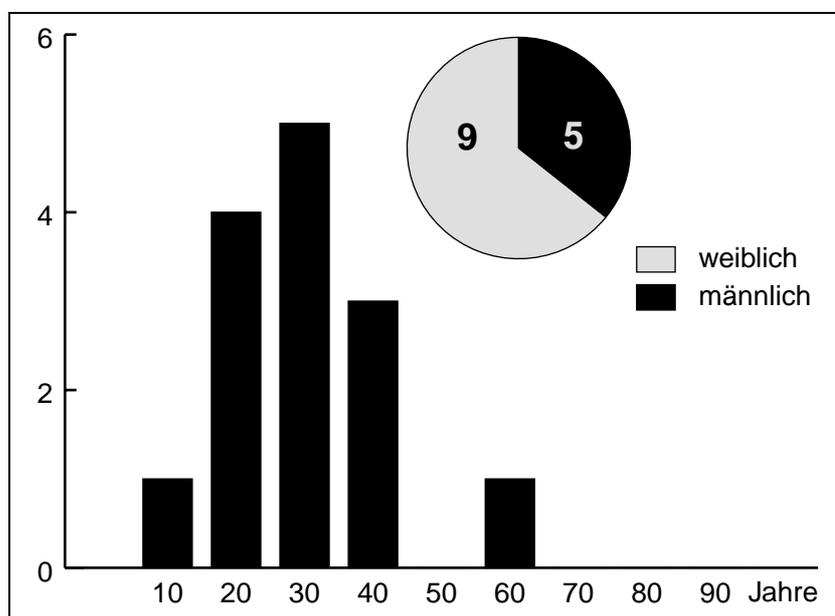


ABB. 10 Altersverteilung der untersuchten niedrigmalignen zentralen Osteosarkome (N = 14)

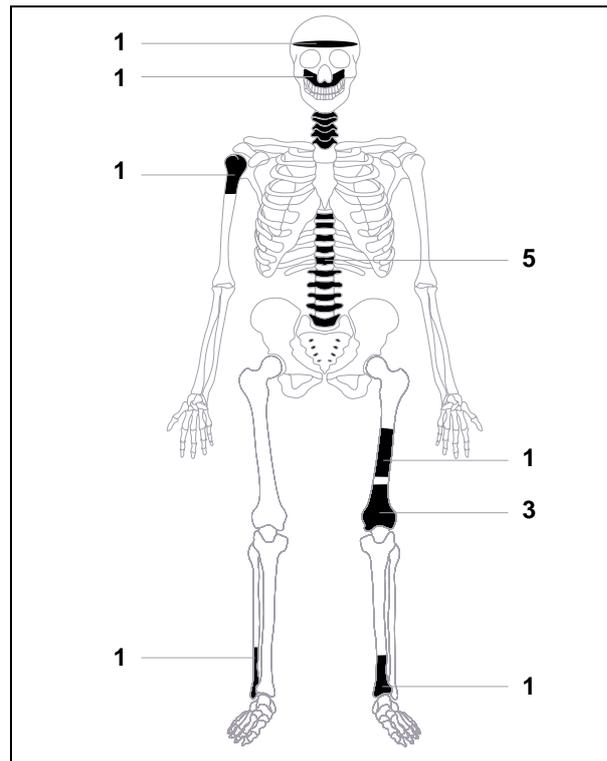


ABB. 11 Lokalisationsverteilung der untersuchten niedrigmalignen zentralen Osteosarkome (N = 14)

TABELLE 3: Subtypen des niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms mit den sogenannten Counterpart-Läsionen

Subtypen des niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms	Counterpart-Läsionen	Fallzahl DNA-Zytometrie
fibrous-dysplasia-like Subtyp	fibröse Dysplasie	8
osteoblastoma-like Subtyp	Osteoblastom	3
aneurysmal-bone-cyst-like Subtyp	aneurysmatische Knochenzyste	2
parosteal-osteosarcoma-like Subtyp (aber zentral entwickelt!)	parossales Osteosarkom	1
non-ossifying-fibroma-like Subtyp	fibröser metaphysärer Defekt	
chondromyxoidfibroma-like Subtyp	Chondromyxoidfibrom	
chondroblastoma-like Subtyp	Chondroblastom	
solitary-bone-cyst-like Subtyp	solitäre Knochenzyste	

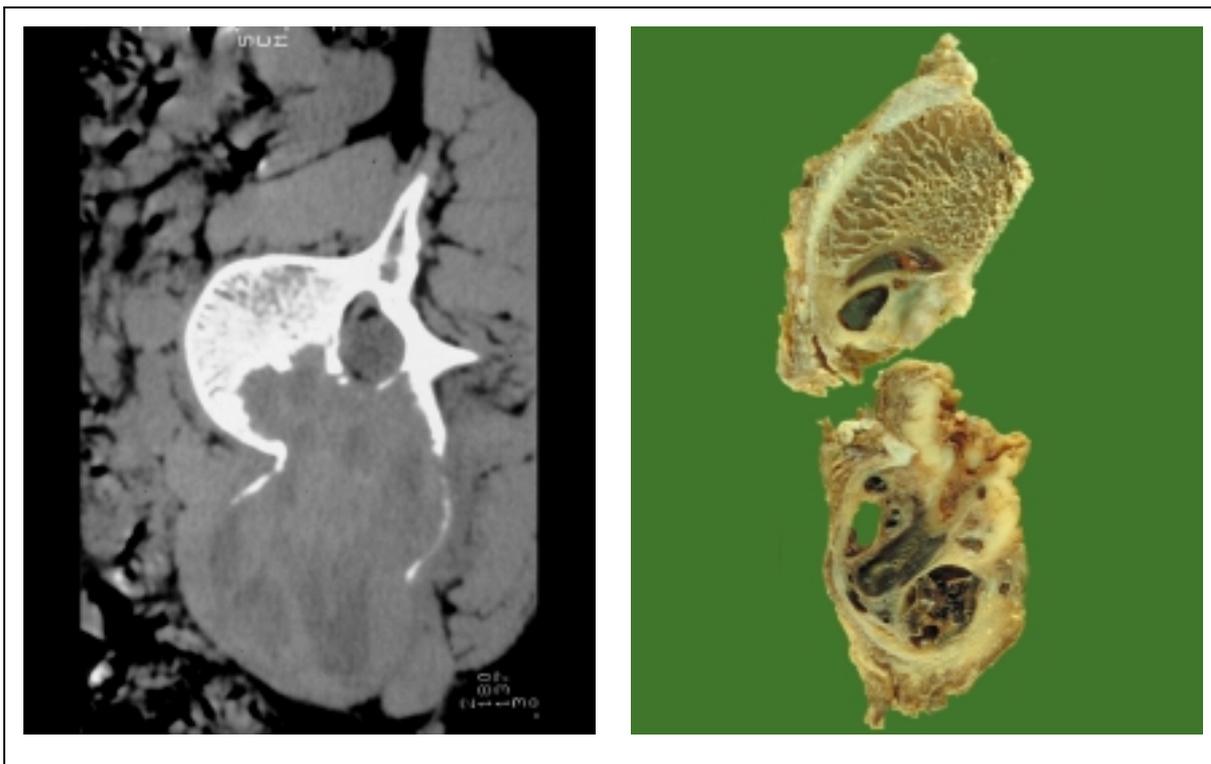


ABB. 12 Niedrigmalignes zentrales Osteosarkom; CT (links): expansiver spinaler Tumor mit ausgedehntem extraossären Anteil; Operationspräparat (rechts): solide und zystische Tumoranteile. Der radiologische und makroskopische Befund ähnelt einer aneurysmatischen Knochenzyste sehr stark.

typ des Tumors innerhalb der Gruppe der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome ab. Dabei kommen sowohl osteolytische Läsionen als auch stark knochenbildende, sklerosierte Tumoren vor. Die Subtypen werden nach den sogenannten Counterpart-Läsionen benannt, denen das histologische Bild mehr oder weniger ähnelt (Tabelle 3). In Abbildung 12 sind der CT-Befund und das Operationspräparat eines niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms dargestellt, das in diesen Aspekten einer aneurysmatischen Knochenzyste ähnelt. Histologisch fand sich in den soliden Abschnitten ein feingewebliches Bild ähnlich einer fibrösen Dysplasie. Im Gegensatz zu den hochmalignen zentralen Osteosarkomen ist die Proliferationsrate bei den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen wesentlich geringer. Atypische Mitosen werden nur vereinzelt beobachtet. Im Unterschied zu den benignen Counterpart-Läsionen können niedrigmaligne zentrale Osteosarkome jedoch zu Fernmetastasen führen und nach einem längeren Verlauf auch in ein Osteosarkom von höherem Malignitätsgrad übergehen.

4.3.2 DNA-Zytometrie der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome

Die untersuchten niedrigmalignen Osteosarkome waren überwiegend durch eine Stammlinie im DNA-diploiden Bereich gekennzeichnet. In 3 der 14 Fälle waren jedoch die Kriterien der Einzelzellaneuploidie (Nachweis von 3 oder mehr Tumorzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$) erfüllt. Bei weiteren 2 Fällen war eine Stammlinie im DNA-tetraploiden Bereich ausgebildet.

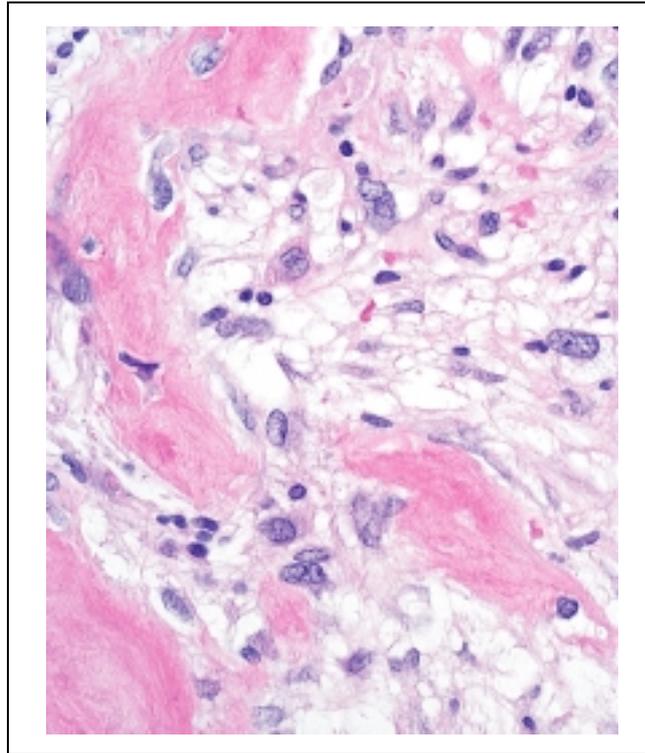


ABB. 13 Niedrigmalignes zentrales Osteosarkom
Histologie: unregelmäßige Matrixtrabekel, einzelne atypische Kerne, nur mäßige Zelldichte

Zusammenfassend zeigten damit 5 der 14 Tumoren (36%) Auffälligkeiten im DNA-zytometrischen Befund. 9 Tumoren wiesen ein unauffälliges diploides DNA-Verteilungsmuster auf (Tabelle 4).

Im Fall eines niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms vom fibrous-dysplasia-like Subtyp konnten neben dem Primärtumor, der durch ein rein diploides DNA-Verteilungsmuster gekennzeichnet war, im weiteren Verlauf über insgesamt 7 Jahre auch 3 Lokalrezidive sowie Material von einer Lungenmetastase untersucht werden. Die histologischen Befunde der ersten 2 Lokalrezidive waren mit denen des Primärtumors identisch. Im dritten Lokalrezidiv fand sich im Gegensatz dazu ein zellreicheres Tumorgewebe mit höherer Proliferationsrate und Nachweis einer zusätzlichen chondroblastischen Tumorkomponente. DNA-zytometrisch wiesen die ersten beiden Lokalrezidive im Unterschied zum Primärtumor eine Zunahme von Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ auf. Das letzte Lokalrezidiv und die Lungenmetastase waren hingegen übereinstimmend durch eine neu etablierte Tumorzellstammlinie im peritetraploiden Bereich gekennzeichnet (Abbildung 15).

TABELLE 4: DNA-zytometrische Befunde bei 14 niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen

Nr.	M-Nr.	Subtyp	Anzahl aneuploider Stammlinien	Stammlinienploidie 1	Stammlinienploidie 2	Stammlinienploidie 3	Anteil diploider Zellen	DNA - Maximum	2c-Deviation-Index	5c-Exceeding-Events	9c-Exceeding-Events
1	M944459	fibrous-dysplasia-like	0	2			82%	13,9	2,53	13	1
2	M941937	fibrous-dysplasia-like	0	2			84%	4,5	0,52	0	0
3	M924189	fibrous-dysplasia-like	0	2			87%	4,2	0,40	0	0
4	M953255	parosteal-osteosarcoma-like	0	2			88%	8,8	0,82	3	0
5	M893573	fibrous-dysplasia-like	0	2			89%	5,0	0,36	0	0
6	M942978	aneurysmal-bone-cyst-like	0	2			90%	4,5	0,36	0	0
7	M934177	aneurysmal-bone-cyst-like	0	2			90%	4,5	0,34	0	0
8	M933654	osteoblastoma-like	0	2			91%	12,1	1,31	6	1
9	M941765	osteoblastoma-like	0	2			91%	7,8	0,55	2	0
10	M941687	fibrous-dysplasia-like	0	2			93%	4,5	0,30	0	0
11	M950569	fibrous-dysplasia-like	0	2			96%	4,1	0,08	0	0
12	M921496	fibrous-dysplasia-like	0	2			97%	4,3	0,13	0	0
13	M942310	osteoblastoma-like	1	2	4		63%	9,7	2,13	8	1
14	M942566	fibrous-dysplasia-like	1	2	4		76%	9,5	2,39	9	4

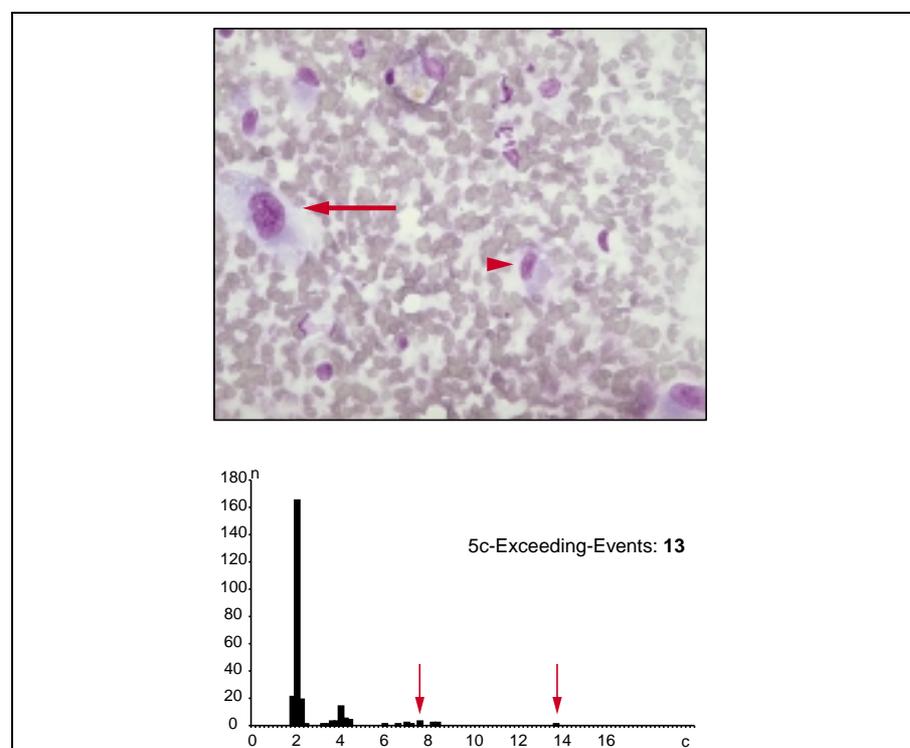


ABB. 14 low-grade central Osteosarkom, Imprintzytologie: diploide Tumorzellen ▶, einzelne Tumorzellen mit atypischen Kernen und aneuploidem DNA-Gehalt ▶▶

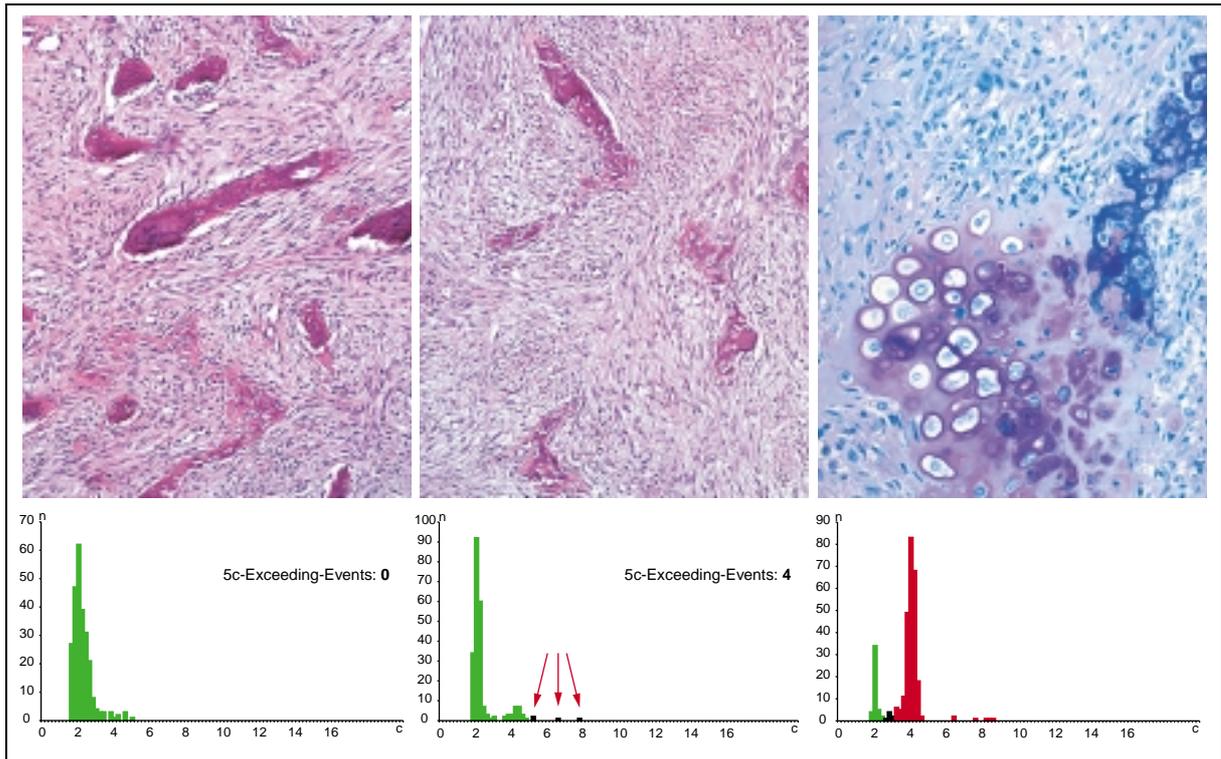


ABB. 15 Niedrigmalignes zentrales Osteosarkom, fibrous-dysplasia-like Subtyp (Fall Nr. 5)

Primärtumor: feingewebliches Bild ähnlich einer fibrösen Dysplasie, DNA-diploide Tumorzellstammlinie

erstes Lokalrezidiv: feingewebliches Bild identisch wie im Primärtumor, DNA-aneuploide Einzelzellen

drittes Lokalrezidiv: feingeweblich zellreicherer Tumor mit herdförmig chondroblastischen Anteilen, DNA-tetraploide Tumorzellstammlinie

4.4 Hochmaligne zentrale Osteosarkome

4.4.1 Radiologie, Histologie und Zytologie der hochmalignen zentralen Osteosarkome

Hochmaligne zentrale Osteosarkome sind metaphysär lokalisierte Tumoren, die häufig die Wachstumsfuge unter Infiltration der Epiphyse überschreiten und sich auch auf den metadiaphysären Übergang erstrecken können. Sie befallen am häufigsten die langen Röhrenknochen mit besonderer Prädisposition des distalen Femurs und der proximalen Tibia. Radiologisch werden osteolytische, osteoblastische und Mischformen unterschieden. Die Grenzen des Knochens werden in Abhängigkeit von der Tumorgroße nicht respektiert, sondern die Kortikalis wird permeativ überschritten (Lodwick Klassifikation III). Das Periost wird dabei zunächst vom Tumor abgehoben und gedehnt, jedoch in der Regel nicht sofort überschritten, was zu reaktiven subperiostalen Knochenneubildungen in Form der radiologisch erkennbaren Codman Dreiecke führt.

Das histologische Charakteristikum des hochmalignen zentralen Osteosarkoms ist die Osteoidabscheidung durch maligne polymorphe Tumorzellen bei einer meist hohen Proliferationsrate. Die Kern- und Zellpleomorphie wird in imprintzytologischen Präparaten besonders deutlich. Aufgrund der Unterschiede in Zellgehalt und Matrixbildung werden der osteoblastische, chondroblastische, teleangiektatische, mfh-artige und fibroblastische Subtypen unterschieden.

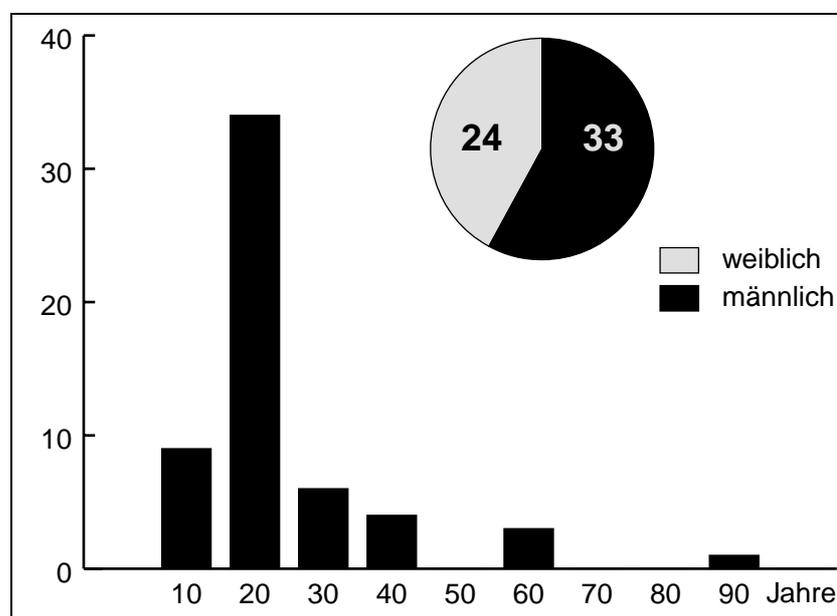


ABB. 16 Altersverteilung der untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkome (N = 57)

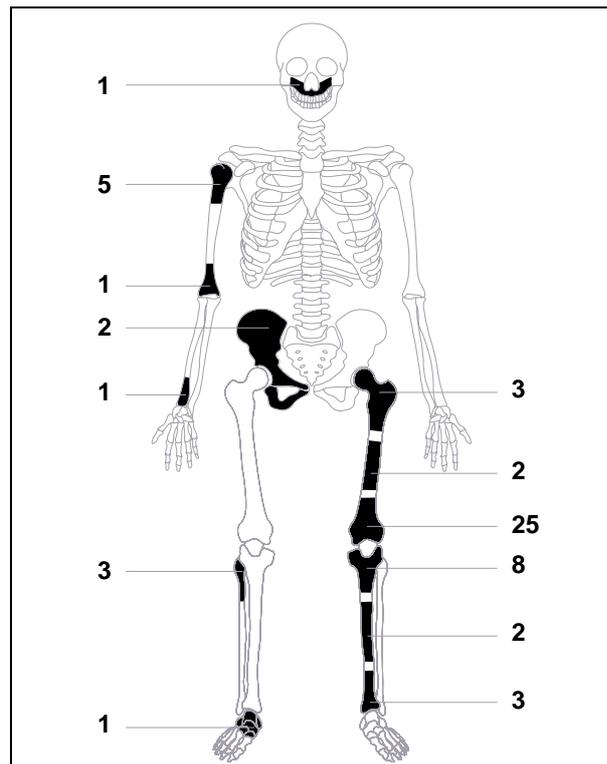


ABB. 17 Lokalisationsverteilung der untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkome (N = 14)

In der Mehrzahl der Fälle sind hochmaligne zentrale Osteosarkome aus unterschiedlichen feingeweblichen Anteilen zusammengesetzt (mixed type). Das teleangiektatische Osteosarkom stellt radiologisch einen expansiven und ausgeprägt osteolytischen Tumor mit erhöhter pathologischer Frakturneigung dar, der histologisch aufgrund der Ausprägung großer blutgefüllter Hohlräume der aneurysmatischen Knochenzyste ähnelt. Im Gegensatz zur aneurysmatischen Knochenzyste ist beim teleangiektatischen Osteosarkom die Polymorphie der Tumorzellen wesentlich größer und es finden sich atypische Mitosen. Die differentialdiagnostische Abgrenzung eines teleangiektatischen Osteosarkoms von einer aneurysmatischen Knochenzyste kann aber insbesondere bei kleinen Gewebsmengen sehr schwierig sein.

Die untersuchten hochmalignen Osteosarkome traten überwiegend bei Patienten in der zweiten Lebensdekade und mit einer leichten Bevorzugung des männlichen Geschlechts auf (Abbildung 16). Die häufigste Lokalisation war das distale Femur, gefolgt von der proximalen Tibia und dem proximalen Humerus (Abbildung 17).

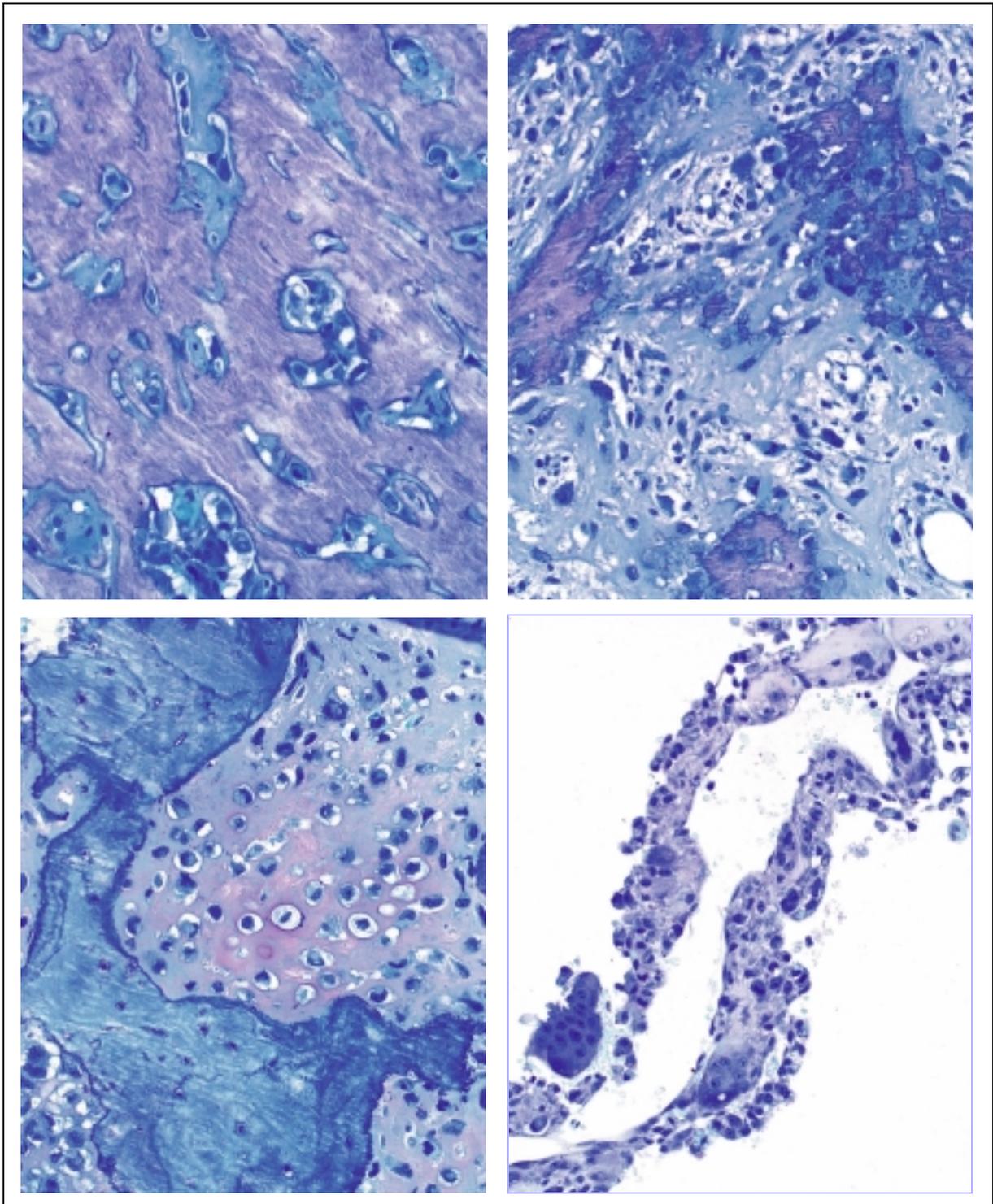


ABB. 18 Hochmalignes zentrales Osteosarkom, histologische Differenzierungsmuster
 sklerosiertes Osteosarkom mit flächenhafter Bildung einer hochgradig mineralisierten Tumormatrix, in der nur wenige Tumorzellen eingeschlossen sind (links oben)
 osteoblastisches Osteosarkom mit zahlreichen polymorphkernigen Tumorzellen sowie der Bildung unregelmäßiger osteoider Matrixtrabekel, die zum Teil mineralisieren (rechts oben)
 chondroblastisches Osteosarkom mit atypischen Tumorchondrozyten innerhalb einer metachromatischen chondroiden Matrix (links unten)
 teleangiektatisches Osteosarkom mit schmalen Septen aus Tumorzellen und mehrkernigen Riesenzellen sowie minimaler osteoider Matrixbildung und ausgedehnten blutgefüllten Pseudozysten (rechts unten)

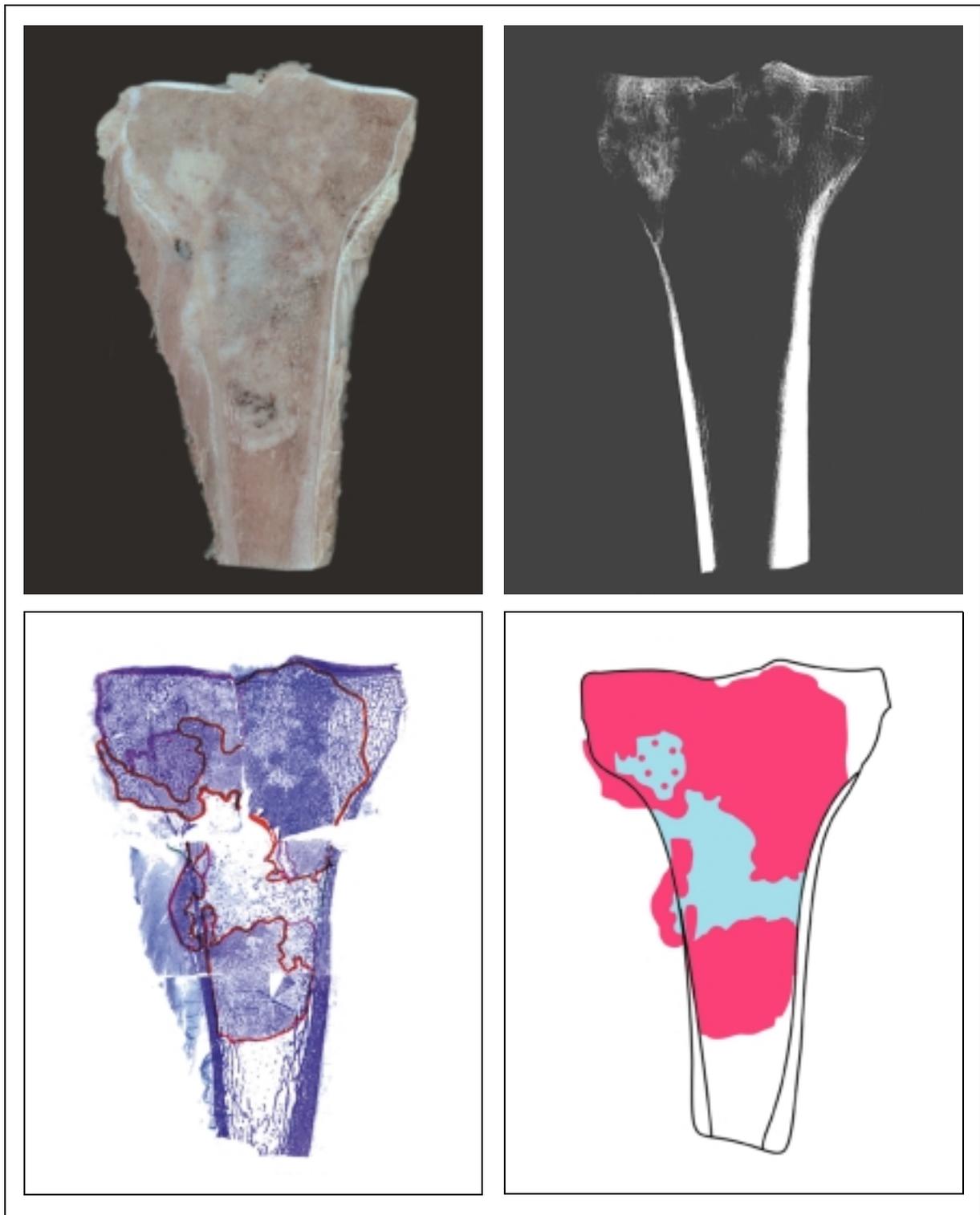


ABB. 19 Hochmalignes zentrales Osteosarkom nach Polychemotherapie, Regressionsgrad 4

Operationspräparat (links oben) mit ausgedehnten Tumorformationen in der proximalen Meta- und Epiphyse
 Kontaktradiographie (rechts oben) einer Präparatscheibe zur exakten Bestimmung der Geschwulstausdehnung
 Rekonstruktion einer Gesamttumor-Ebene (links unten) unter Verwendung unentkalkter Großschnittpräparate
 mit Einzeichnung der mikroskopisch bestimmten Ausdehnung des gesamten Tumorareals und der vital
 erhaltenen Tumorgewebsanteile

Mappingskizze (rechts unten) zur quantitativen planimetrischen Bestimmung der vitalen (rot) und
 devitalisierten (blau) Tumorgewebsanteile

TABELLE 5: DNA-Ploidie-Verteilungsmuster bei den Subtypen des hochmalignen zentralen Osteosarkoms (N = 57)

Ploidie-Verteilungsmuster	Histologischer Subtyp							
	osteoblastisch	mixed-type	chondroblastisch	teleangi-ektatisch	sklerosiert	osteoblastom-ähnlich	MfH-artig	fibroblastisch
A: diploide Stammlinie		1						1
B: diploide Stammlinie + aneuploide Einzelzellen		1				1		
C: diploide Stammlinie + aneuploide Stammlinie	9	11	1	2		1		1
D: diploide Stammlinie + mehrere aneuploide Stammlinien	8	3		2			1	
E: diploide Stammlinie < 15% + aneuploide Stammlinie	7	3	3		1			

4.4.2 DNA-Zytometrie der hochmalignen zentralen Osteosarkome

DNA-zytometrisch konnte in 53 der 57 untersuchten hochmalignen Osteosarkome (92%) der Nachweis eigenständiger aneuploider Tumorzellklone in Form von einer oder von mehreren DNA-aneuploiden Stammlinien erbracht werden. Die dabei beobachteten DNA-Verteilungsmuster wurden entsprechend den im Abschnitt „Material und Methoden“ dargestellten Prinzipien in verschiedene Ploidie-Verteilungstypen gegliedert (Tabelle 5 und Abbildung 20).

Innerhalb dieser Fälle mit Stammlinienaneuploidie wiesen 25 Fälle neben einer diploiden Stammlinie eine aneuploide Stammlinie im peritriploiden, peritetraploiden bzw. hypertetraploiden Bereich auf (Ploidie-Verteilungstyp C). Bei 14 Tumoren fanden sich neben einer diploiden Stammlinie zwei zusätzliche aneuploide Stammlinien, wobei die Zellen der jeweiligen zweiten aneuploiden Stammlinie den doppelten DNA-Gehalt der Zellen der ersten aneuploiden Stammlinie aufwiesen (Ploidie-Verteilungstyp D). Bei 14 hochmalignen zentralen Osteosarkomen, die sich durch eine oder zwei DNA-aneuploide Stammlinien auszeichneten, war jedoch im Gegensatz zu den Fällen der Ploidie-Verteilungstypen C und D nur ein geringer Anteil diploider Tumorzellen, der maximal 15% aller untersuchten Zellen erreichte, nachweisbar (Ploidie-Verteilungstyp E).

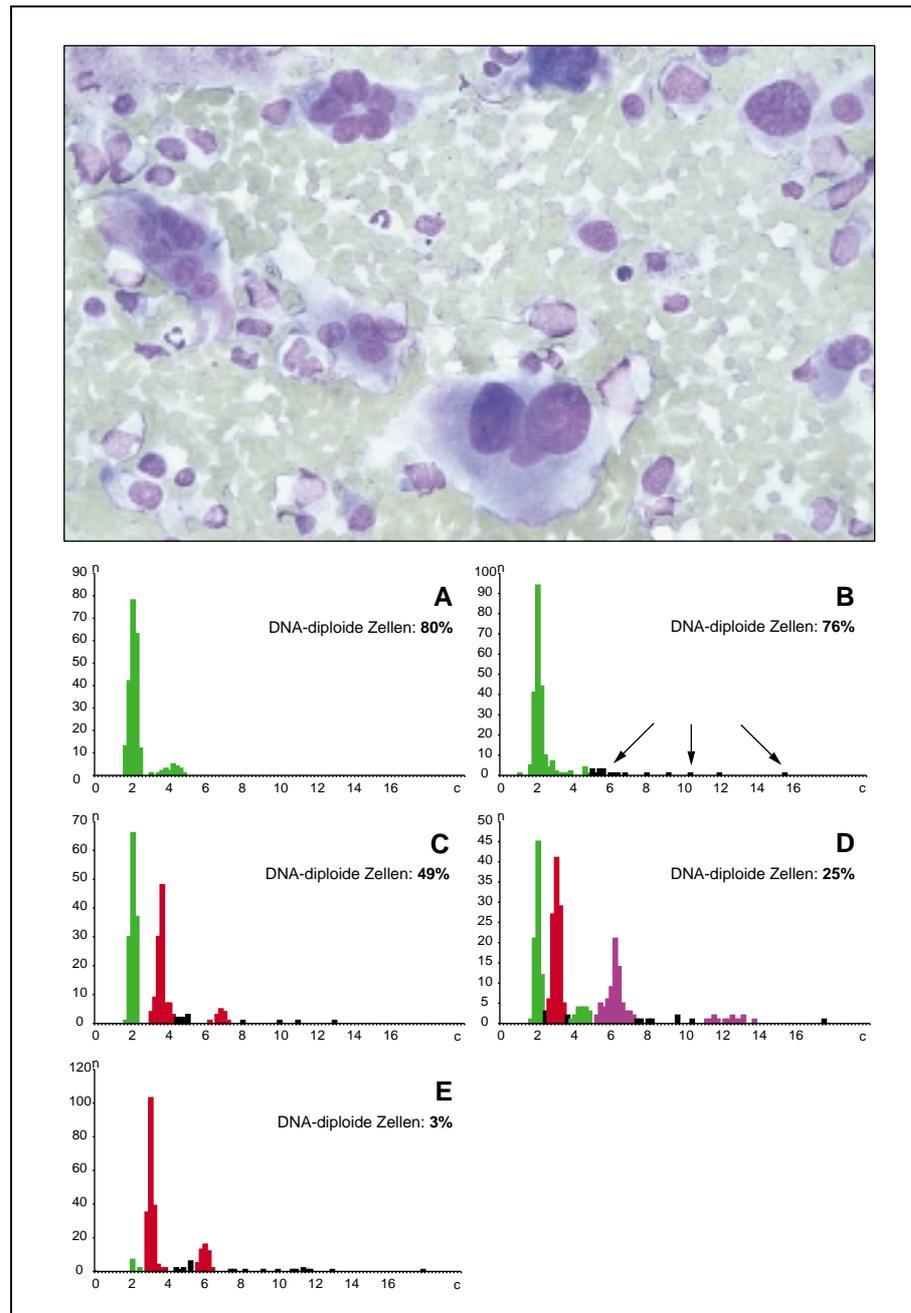


ABB. 20 Hochmalignes zentrales Osteosarkom

Imprintzytologie mit zahlreichen atypischen Tumorzellen und einzelnen mehrkernigen Riesenzellen vom Osteoklastentyp

Beispielhistogramme der unterschiedlichen Ploidie-Verteilungstypen, die beim hochmalignen Osteosarkom beobachtet werden

A - ausschließlicher Nachweis einer diploiden Stammlinie (grün)

B - Nachweis einer diploiden Stammlinie (grün) und einzelner Tumorzellen, die einen höheren DNA-Gehalt als 5c aufweisen (Einzelzellaneuploidie) →

C - Nachweis einer diploiden Stammlinie (grün) und einer zusätzlichen aneuploiden Stammlinie (rot)

D - Nachweis einer diploiden Stammlinie (grün) und zweier aneuploider Stammlinien, wobei die Tumorzellen in der zweiten aneuploiden Stammlinie (violett) einen doppelt so hohen DNA-Gehalt wie die Zellen in der ersten aneuploiden Stammlinie (rot) besitzen

E - Nachweis einer aneuploiden Stammlinie (rot) bei minimalem diploiden Tumorzellanteil

TABELLE 6: DNA-zytometrische Befunde bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen (N = 57)

Nr.	M-Nr.	Subtyp	Anzahl aneuploider Stammlinien	Stammlinienploidie 1	Stammlinienploidie 2	Stammlinienploidie 3	Anteil diploider Zellen	DNA-Maximum	2c-Deviation-Index	5c-Exceeding-Events	9c-Exceeding-Events	Ploidie- Verteilungstyp	Regressionsgrad	Ansprechen
1	M941383	fibroblastisch	0	2			75%	8,6	0,79	2	0	A	1	Responder
2	M863913	mixed	0	2			76%	15,6	2,90	19	4	B	3	Responder
3	M911677	mixed	0	2			80%	4,9	0,46	0	0	A	5	Nonresponder
4	M914965	osteoblastomähnlich	0	2			81%	8,7	1,31	5	0	B		
5	M933376	osteoblastisch	1	2	3,6		1%	7,3	3,92	25	0	E	5	Nonresponder
6	M944929	osteoblastisch	1	2	3		3%	43,6	18,10	70	13	E		
7	M950723	chondroblastisch	1	2	3		5%	7,1	2,53	28	0	E	4	Nonresponder
8	M873158	osteoblastisch	1	2	3,2		5%	6,5	1,77	7	0	E	5	Nonresponder
9	M903356	mixed	1	2	3		5%	10,4	3,72	40	1	E	3	Responder
10	M953921	osteoblastisch	1	2	2,6		7%	20,4	3,84	45	3	E	5	Nonresponder
11 ^a	M951917	osteoblastisch	1	2	3		8%	12,3	5,31	65	3	E		
12	M883535	osteoblastisch	1	2	6,4		9%	16,7	45,00	235	65	E	1	Responder
13	M904512	sklerosiert	1	2	3		13%	19,7	6,90	48	4	E	3	Responder
14	M934793	chondroblastisch	1	2	5,8		14%	16,2	19,30	181	15	E	2	Responder
15	M943060	chondroblastisch	1	2	3		15%	49,3	14,22	33	3	E	4	Nonresponder
16	M863644	osteoblastisch	1	2	3,4		16%	17,3	9,75	62	7	C	2	Responder
17	M882899	teleangiektatisch	1	2	4,6		16%	20,6	15,38	56	25	C		
18	M942385	osteoblastisch	1	2	3		19%	11,5	5,79	46	7	C		
19	M870638	mixed	1	2	6,2		22%	56,8	37,65	212	50	C	3	Responder
20	M945063	fibroblastisch	1	2	3		22%	13,2	4,88	49	4	C	3	Responder
21	M911321	mixed	1	2	3,4		23%	24,9	15,58	59	16	C	2	Responder
22	M900625	mixed	1	2	3,6		23%	16,7	5,08	28	1	C	3	Responder
23	M860106	osteoblastisch	1	2	2,8		23%	23,6	4,96	36	3	C	1	Responder
24	M931132	mixed	1	2	3,2		27%	6,6	1,96	17	0	C		
25	M880914	mixed	1	2	3,8		28%	20,7	11,49	51	7	C	2	Responder
26	M952945	mixed	1	2	2,8		28%	8,4	1,97	26	0	C	5	Nonresponder
27	M942785	osteoblastisch	1	2	6,4		36%	25,5	24,94	155	25	C	3	Responder
28	M883916	mixed	1	2	3,6		36%	27,3	11,45	58	10	C	1	Responder
29	M954405	osteoblastisch	1	2	6		39%	15,1	17,62	159	34	C	2	Responder
30	M863914	osteoblastisch	1	2	2,8		41%	10,9	1,81	15	1	C	3	Responder
31	M880872	mixed	1	2	3,2		49%	26,2	9,02	34	7	C	3	Responder
32	M950123	osteoblastisch	1	2	3,6		49%	31,0	6,67	21	4	C	3	Responder
33	M943010	mixed	1	2	4		56%	11,1	3,93	22	1	C	3	Responder
34	M932093	mixed	1	2	3,2		57%	6,7	3,31	40	40	C		
35	M942485	teleangiektatisch	1	2	4		58%	59,3	35,53	36	17	C	5	Nonresponder
36	M853947	chondroblastisch	1	2	4		65%	10,2	2,29	13	1	C	2	Responder
37	M943678	osteoblastisch	1	2	3,8		66%	24,7	4,46	13	1	C	3	Responder
38	M943953	osteoblastisch	1	2	4		77%	7,9	1,42	12	0	C	2	Responder
39	M942564	osteoblastomähnlich	1	2	4		78%	17,3	3,89	23	4	C		
40	M933455	mixed	1	2	6,6		83%	14,3	5,87	31	5	C	3	Responder
41	M872803	mixed	2	2	3	6,6	6%	16,2	8,45	60	5	E		
42	M953454	osteoblastisch	2	2	2,8	5,6	12%	23,9	8,24	83	13	E	4	Nonresponder
43	M812283	mixed	2	2	3,4	7	14%	40,2	36,35	96	29	E	5	Nonresponder
44	M951993	osteoblastisch	2	2	2,8	5,6	18%	44,4	12,51	55	12	D	4	Nonresponder
45	M943157	osteoblastisch	2	2	3	5,8	20%	26,9	22,88	138	37	D	3	Responder
46	M941213	osteoblastisch	2	2	2,8	5,6	22%	23,2	10,17	73	9	D	3	Responder
47	M952862	osteoblastisch	2	2	3	6,2	25%	39,4	22,92	100	22	D	1	Responder
48	M910837	osteoblastisch	2	2	3,2	6,8	26%	15,5	10,56	54	6	D	4	Nonresponder
49	M864371	teleangiektatisch	2	2	3,2	7	31%	14,2	13,54	74	19	D		
50	M932471	osteoblastisch	2	2	2,8	5,4	35%	48,8	29,64	117	28	D	5	Nonresponder
51	M852807	mixed	2	2	3,4	7	47%	13,1	4,37	29	1	D	3	Responder
52	M942787	mixed	2	2	2,8	5,6	50%	25,5	12,33	45	15	D	1	Responder
53	M891422	teleangiektatisch	2	2	3	5,8	52%	11,8	5,09	70	5	D		
54	M940198	osteoblastisch	2	2	3,2	6,2	54%	13,0	2,86	19	1	D	6	Nonresponder
55	M940389	MfH-ähnlich	2	2	3,6	7,2	55%	26,7	9,39	46	9	D		
56	M914121	osteoblastisch	2	2	2,8	5,8	61%	24,0	6,47	47	7	D	2	Responder
57	M861357	mixed	2	2	2,8	5,8	77%	48,9	11,13	25	5	D	1	Responder

a. sekundäres, strahleninduziertes Osteosarkom

Von den verbleibenden 4 Fällen, bei denen kein eigenständiger DNA-aneuploider Tumorzellklon existierte, waren 2 Fälle durch den Nachweis aneuploider Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ gekennzeichnet (Einzelzellaneuploidie, Ploidie-Verteilungstyp B). Nur 2 der untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkome wiesen keine vom diploiden Verteilungsmuster abweichenden Auffälligkeiten auf (Ploidie-Verteilungstyp A).

Zwischen den histologischen Subtypen des hochmalignen zentralen Osteosarkoms und den DNA-zytometrischen Befunden ergaben sich keine Zusammenhänge. (Tabelle 6).

Unter den hochmalignen zentralen Osteosarkomen fanden sich als Sonderformen 2 osteoblastomähnliche Osteosarkome und ein sekundäres, strahleninduziertes Osteosarkom. Im Falle des strahleninduzierten, sekundären hochmalignen Osteosarkoms (Nr. 11) zeigte sich ebenfalls eine DNA-aneuploide Stammlinie, wobei der Anteil an diploiden Zellen weniger als 15 % betrug (Ploidie-Verteilungstyp E). Die osteoblastomähnlichen Osteosarkome waren durch Einzelaneuploidie (Nr. 4) bzw. eine peritetraploide Stammlinie (Nr. 39) gekennzeichnet (Tabelle 6).

Bei insgesamt 42 der DNA-zytometrisch untersuchten primären hochmalignen Osteosarkomen wurde das Ansprechen der Tumoren auf die neoadjuvante Chemotherapie durch morphologische Aufarbeitung der chirurgischen Tumorsektate bestimmt. Dazu erfolgte die Bestimmung des sogenannten Regressionsgrades (Salzer-Kuntschik et al., 1983b).

Zur Prüfung auf mögliche Zusammenhänge zwischen den an den Tumorbiopsien erhobenen DNA-zytometrischen Befunden und dem späteren Ansprechen auf die Chemotherapie erfolgte die Zusammenstellung dieser Fälle in einer 3x2-Feldertafel, die mittels χ^2 -Test ausgewertet wurde. Dabei zeigte sich, daß in der Gruppe der Osteosarkome mit niedrigem diploiden Tumorzellgehalt der Anteil an Fällen, die schlecht auf die Chemotherapie ansprechen (Nonresponder), überzufällig höher als in den beiden DNA-zytometrischen Gruppen ist, bei denen der diploide Tumorzellanteil 15% aller untersuchten Zellen überschreitet (Tabelle 7 und Abbildung 21).

Aufgrund des bestimmten empirischen χ^2 -Wertes wurde die Nullhypothese abgelehnt: Bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem DNA-Verteilungsmuster und dem Ansprechen auf die Chemotherapie.

TABELLE 7: Beziehung zwischen Ploidie-Verteilungstyp und Ansprechverhalten bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen mit DNA-aneuploiden Stammlinien (N = 42; $\chi^2 = 9,7$; $p = 0,008$)

Ploidie-Verteilungstyp	Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie	
	Responder	Nonresponder
C: diploide Stammlinie + aneuploide Stammlinie	18	2
D: diploide Stammlinie + mehrere aneuploide Stammlinien	7	4
E: diploide Stammlinie < 15% + aneuploide Stammlinie	4	7
Summe	29	13

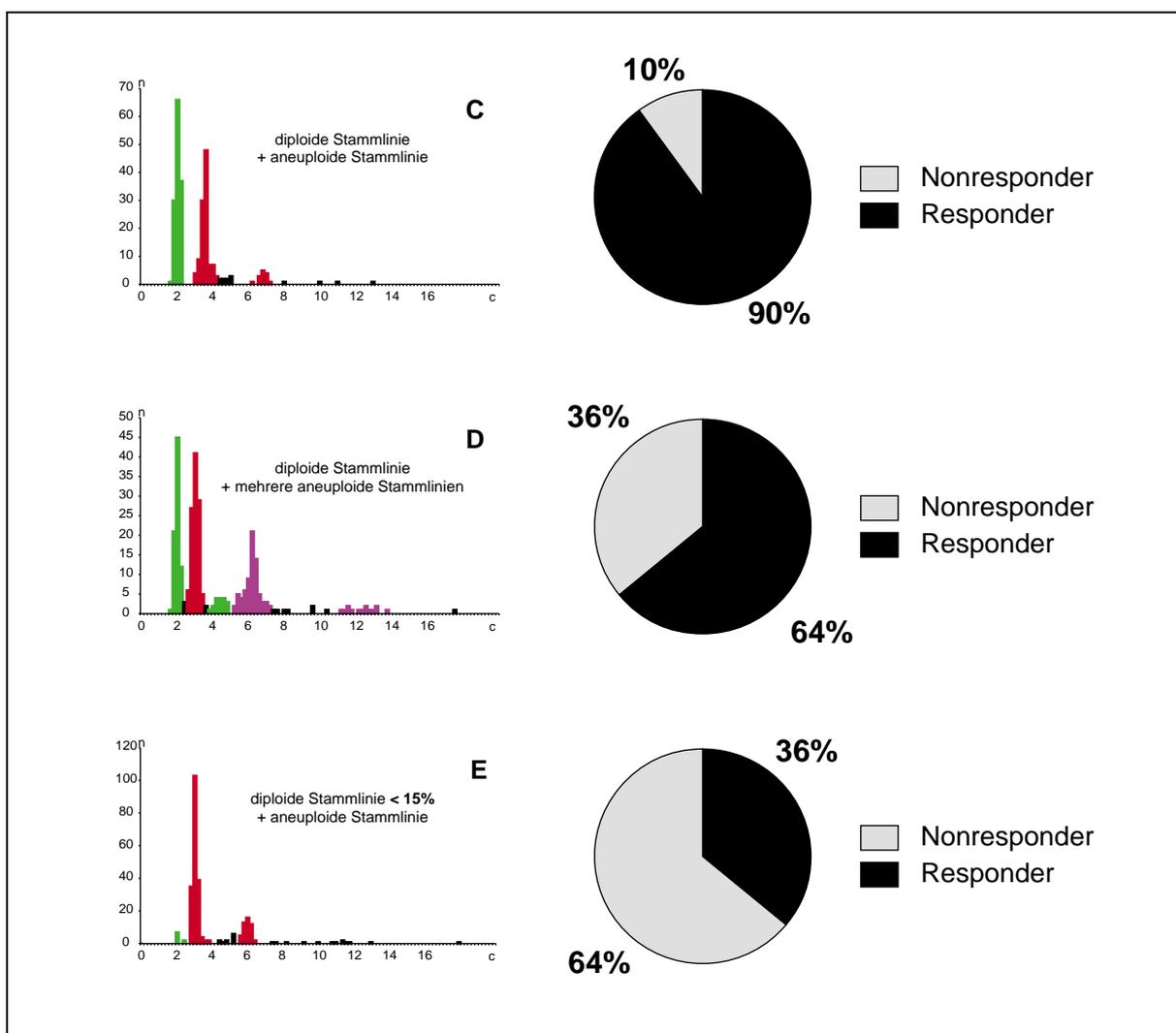


ABB. 21 Beziehung zwischen Ploidie-Verteilungstyp und Ansprechverhalten bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen mit DNA-aneuploiden Stammlinien (N = 42; $\chi^2 = 9,7$; $p = 0,008$)

4.5 Vergleich der DNA-zytometrischen Befunde zwischen den untersuchten Entitäten

Abschließend wurden die in diese Studie einbezogenen Gruppen von Knochentumoren bzw. tumorähnlichen Knochenläsionen hinsichtlich ihrer DNA-zytometrischen Befunde miteinander verglichen.

Alle untersuchten solitären Knochenzysten wiesen ausschließlich diploide Stammlinien auf, nur in einem Fall waren in dieser Gruppe Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ detektierbar. Auch in der Gruppe der aneurysmatischen Knochenzysten überwogen Läsionen, die ausschließlich durch eine DNA-diploide Stammlinie gekennzeichnet waren. Im Gegensatz zu den solitären Knochenzysten wurde bei zwei aneurysmatischen Knochenzysten jedoch ein gering ausgeprägter, DNA-tetraploider Klon beobachtet. Beim Gruppenvergleich DNA-zytometrischer Parameter (Anteil diploider Zellen, DNA-Maximum, 2c-Deviation-Index) ergaben sich zwischen den beiden Gruppen der benignen zystischen Läsionen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der wichtigste und diagnostisch aussagekräftigste DNA-zytometrische Befund in der Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome war der Nachweis einer DNA-aneuploiden Tumorzellstammlinie. Auch hinsichtlich der zusätzlich berechneten DNA-zytometrischen Parameter ließ sich diese Gruppe eindeutig von den benignen zystischen Läsionen und den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen abgrenzen.

Die niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen nahmen nach ihren DNA-zytometrischen Parametern eine intermediäre Stellung zwischen den zystischen Läsionen und den hochmalignen Osteosarkomen ein. Im Gegensatz zu den hochmalignen zentralen Osteosarkomen wurde in dieser Gruppe nur in 2 Fällen im Primärtumor eine zusätzliche Stammlinie im tetraploiden Bereich nachgewiesen. Peritriploide oder hypertetraploide Stammlinien, wie sie bei den hochmalignen Osteosarkomen meist auftraten, kamen bei den untersuchten niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen nicht vor. Dagegen konnte in 3 Fällen der Nachweis von Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ erbracht werden.

Im Gruppenvergleich mittels U-Test ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des 2c-Deviation-Index und der DNA-Maximalwerte zwischen den benignen zystischen Läsionen und den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen einerseits sowie den niedrigmalignen und den hochmalignen zentralen Osteosarkomen andererseits (Tabelle 8 und Abbildung 22).

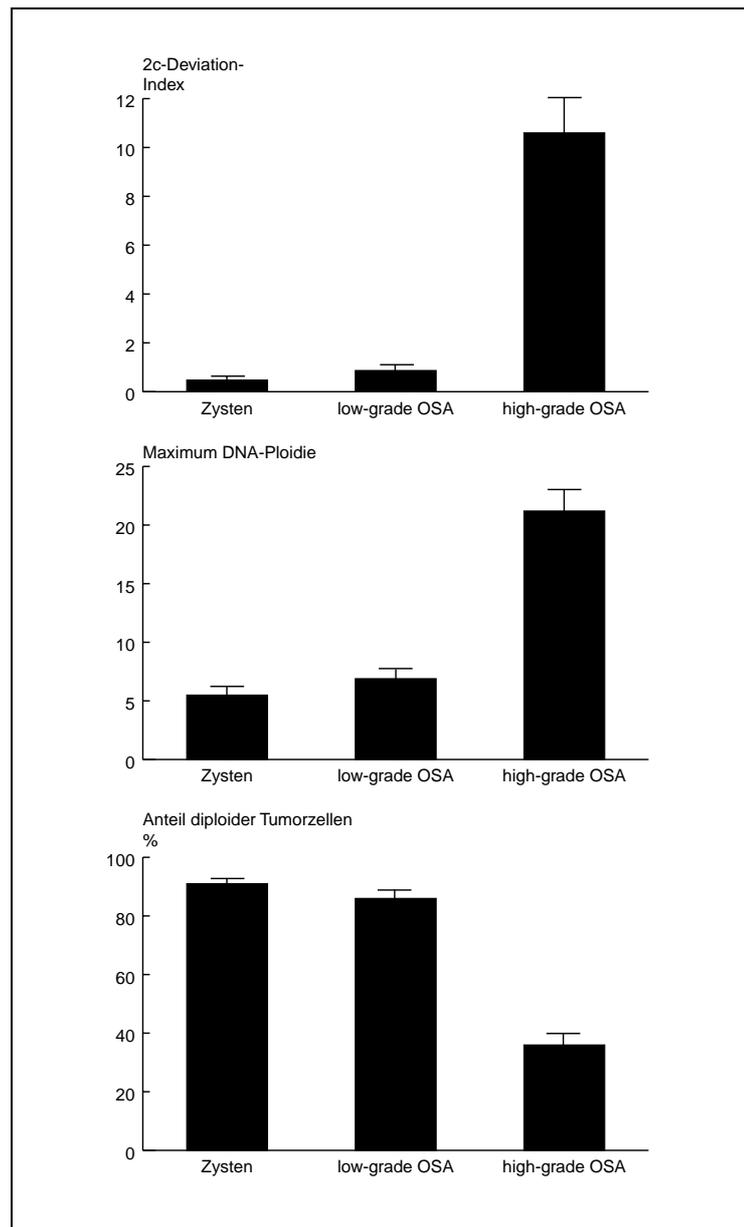


ABB. 22 Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten in der zentralen Tendenz DNA-zytometrischer Parameter

TABELLE 8: Ergebnisse der Signifikanz-Prüfungen (U-Test nach Mann-Whitney)

	solitäre Knochenzysten versus aneurysmatische Knochenzysten	benigne zystische Läsionen versus niedrigmaligne zentrale Osteosarkome	benigne zystische Läsionen versus hochmaligne zentrale Osteosarkome
Anteil diploider Tumorzellen	nicht signifikant	nicht signifikant	$p < 0,01$
Maximum DNA-Ploidie	nicht signifikant	$p < 0,05$	$p < 0,01$
2c-Deviation-Index	nicht signifikant	$p < 0,05$	$p < 0,01$

5 Diskussion

Die Diagnostik von Knochentumoren erfordert neben einer interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Radiologen und Pathologen die Anwendung spezieller morphologischer Untersuchungsmethoden, um den spezifischen Besonderheiten dieser im Vergleich zu anderen Geschwulsterkrankungen relativ seltenen Tumoren gerecht zu werden. Im Gegensatz zu Tumoren anderer Organe erfolgt die morphologische Einordnung und die Dignitätsbeurteilung bei Knochentumoren nicht ausschließlich anhand des konventionellen histologischen Befundes, sondern aus der zusammenfassenden Bewertung der radiologischen und feingeweblichen Veränderungen. Dennoch ist es nicht in jedem Falle eines Knochentumors möglich, zum Zeitpunkt der Primärmanifestation anhand dieser Kriterien eine endgültige diagnostische Einordnung und prognostische Abschätzung vorzunehmen.

Dafür gibt es verschiedene Ursachen. Die Gewinnung einer diagnostisch aussagekräftigen Biopsie aus dem tumortragenden Knochen kann in Abhängigkeit von der Lokalisation (z.B. Becken, Wirbelsäule, Schädel) und von der Beschaffenheit des Tumors bzw. des umgebenden Knochengewebes (stark sklerosierte bzw. ausgeprägt zystische Läsionen) sehr schwierig sein. Die weiterführende Bearbeitung bei der Herstellung histologischer Schnittpräparate kann in weniger spezialisierten Einrichtungen, in denen nicht die vollständige Palette der für die Bearbeitung von Knochengewebe notwendigen Spezial-Labora-ausrüstung zur Verfügung steht, insbesondere durch Entkalkungsartefakte zu erheblichen Einschränkungen der Qualität des Untersuchungsmaterials führen. Eine Biopsiewiederholung ist jedoch insbesondere bei Verdacht auf einen hochmalignen Knochentumor unerwünscht, so daß auch in derartigen Fällen die bestmögliche diagnostische Aussagekraft anhand des zur Verfügung stehenden Materials angestrebt werden muß.

Ein anderer Grund für Probleme bei der Dignitätsbestimmung von Knochentumoren ergibt sich aus der Tatsache, daß sich auch hinter Läsionen mit einem scheinbar benignen Erscheinungsbild maligne Tumoren verbergen können. Es handelt sich dabei um die heterogene Gruppe der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome. Die Diskrepanz zwischen benignem Erscheinungsbild und davon abweichendem biologischen Verhalten verdeutlicht die Notwendigkeit einer frühzeitigen, sicheren Diagnose für die betroffenen Patienten. Daraus leitet sich die Bedeutung weitergehender diagnostischer Kriterien für die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen den einzelnen Tumorentitäten ab.

Bei hochmalignen Knochentumoren spielt neben der histogenetischen Einordnung auch die Abschätzung der Prognose im Rahmen der morphologischen Diagnostik eine Rolle. In der Gruppe der hochmalignen zentralen Osteosarkome ist eine Aussage zur Prognose bisher nur anhand der quantitativen Auswertung der Tumorzerstörung im Rahmen der neoadjuvanten Chemotherapie (COSS-Protokoll) möglich. Der daraus abgeleitete sogenannte Regressionsgrad stellt gegenwärtig den wichtigsten Prognosefaktor bei dieser Tumorgruppe dar. Allein

anhand des histologischen Befundes vom Biopsiepräparat vor Chemotherapiebeginn ist bisher keine Aussage zum späteren Ansprechverhalten dieser hochaggressiven Tumoren oder zur Überlebenswahrscheinlichkeit möglich.

Die DNA-Zytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der DNA-Ploidie, die in den letzten Jahren bei Karzinomen verschiedener Organe, wie Zervix-, Magen-, Nieren- und Prostatakarzinomen (Böcking, Chatelain, 1989; Böcking et al., 1993; Eskelinen et al., 1995; Lee et al., 1997; Lieber, 1992; Motherby et al., 1998b; Motherby et al., 1998a), aber auch bei verschiedenen Weichteilsarkomen (Bauer et al., 1991; Huuhtanen et al., 1996; Bauer et al., 1991; De Zen et al., 1997) diagnostische und prognostische Bedeutung gewonnen hat.

In der vorliegenden Studie wurden 116 primäre Knochentumoren bzw. tumorähnliche Läsionen aus vier verschiedenen Entitäten (solitäre Knochenzysten, aneurysmatische Knochenzysten, niedrigmaligne zentrale Osteosarkome und hochmaligne zentrale Osteosarkome) DNA-zytometrisch untersucht, um die entsprechenden Knochentumoren hinsichtlich ihrer Ploidieverteilungsmuster weiter zu charakterisieren und um die Bedeutung der DNA Zytometrie für die Diagnostik und die Einschätzung des biologischen Verhaltens dieser Läsionen zu bestimmen.

Für DNA-zytometrische Analysen stehen prinzipiell zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung: Die statische oder Image-zytometrische DNA-Analyse und die Flußzytometrie.

Die flow-zytometrische DNA-Analyse benötigt Zellsuspensionen, die bei soliden Tumoren durch mechanische und enzymatische Verfahren hergestellt werden müssen. Dies bietet den Vorteil, daß eine große Zellzahl untersucht wird, worauf eine sehr präzise Bestimmung der Stammlinienploidie beruht. Darüber hinaus können mehrere Parameter mittels Mehrfachmarkierung derselben Zelle und der Messung auf verschiedener Wellenlängen gleichzeitig bestimmt werden, wie z.B. die Zellkerngröße, der Zellproteingehalt und immunologische Marker. Von einigen Autoren als prognostisch bedeutsam beschrieben ist auch die Analyse des Zellzyklus durch Bestimmung des Anteils an S-Phase-Zellen (Marchevsky et al., 1996; Niezabitowski et al., 1996; Bowman et al., 1995; Krug, 1983; Krug, 1975; D'hautcourt et al., 1996).

Diesen methodischen Vorteilen der Durchflußzytometrie stehen aber die fehlende Möglichkeit der morphologischen Identifikation der analysierten Zellen durch eine visuelle Kontrolle entgegen. Dadurch können Zellen, die nicht dem Tumor entsprechen, Zellkernagglomerate und Artefakte nicht von der Messung ausgeschlossen werden. Zellpopulationen, die einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtzellzahl haben, aber von Bedeutung für die Einschätzung des biologischen Verhaltens der untersuchten Läsionen sein könnten, sind nicht identifizierbar. So kann der Nachweis einzelner aneuploider Zellen einen Hinweis für eine genetische Instabilität innerhalb einer Zellpopulation geben, obwohl noch keine eigenständigen aneuploiden Stammlinien ausgebildet sind. Die sogenannte Einzelzellinterpretation, die auf der Identifikation ein-

zelter Zellen mit einem aneuploiden DNA-Gehalt beruht, ist insbesondere für die Einschätzung von präneoplastischen Veränderungen von besonderer Bedeutung (Böcking et al., 1993; Böcking et al., 1994). Derartige Veränderungen sind der Durchflußzytometrie unzugänglich und können nur durch die statische DNA Zytometrie erfaßt werden.

Aufgrund der Möglichkeit von visueller Kontrolle und Einzelzellinterpretation wurde für die vorliegenden Untersuchungen an Knochtumoren die statische DNA-Zytometrie gewählt. Nachteilig ist der größere Zeitaufwand und die geringere Zellzahl pro Fall. Sofern es sich um Messungen an zytologischen Präparaten handelt, erzielt man trotz der niedrigeren Zellzahl im Vergleich zur Durchflußzytometrie keine bedeutsam abweichenden Modalwerte in der Bestimmung der Stammlinienploidie (Kreicbergs et al., 1981).

Für die statische DNA-Zytometrie sind vor allem die im Rahmen der Schnellschnittdiagnostik hergestellten zytologischen Präparate, aber auch in Paraffin eingebettetes Material nach Anfertigung von Zellvereinzlungen geeignet (Hedley et al., 1983; Driel-Kulker et al., 1987; Hedley, 1989). Die Messung an histologischen Schnittpräparaten ist aufgrund schnittbedingter Meßartefakte in der Regel abzulehnen (Böcking et al., 1995; Giroud et al., 1999).

Die DNA-Zytometrie beruht im Gegensatz zur Tumorzytogenetik auf einer quantitativen Bestimmung des gesamten DNA-Gehaltes von Zellen und der Auswertung dieser Messungen anhand von Häufigkeitsverteilungen der DNA-Ploidie. Als Maßeinheit wird entweder die Ploidie in c ($2c$ entspricht dem DNA-Gehalt einer Zelle mit diploidem Chromosomensatz) oder häufig auch der DNA-Index (DI) verwendet, der bei einer diploiden Zelle definitionsgemäß den Wert 1 besitzt.

Bei der DNA-zytometrischen Analyse von Tumorgewebe ist es notwendig, Zellen mit normalem DNA-Gehalt als Vergleichszellen mitzumessen. Im Idealfall sollten dafür nichtneoplastische Zellen gleicher Histogenese wie die Tumorzellen (z.B. normale Oberflächenepithelien der Zervix bei der Untersuchung gynäkologischer Abstrichpräparate auf dysplastische bzw. neoplastische Veränderungen) verwendet werden (sogenannte Gewebe-interne Referenzzellen). Dieser Idealforderung kann in der Praxis insbesondere bei der Analyse nichtepithelialer Gewebe nicht immer entsprochen werden. Es ist dann zweckmäßig, im Präparat enthaltene Lymphozyten als sogenannte Präparat-interne Referenzzellen zu verwenden (Böcking et al., 1995; Giroud et al., 1999).

Bei der Auswertung der DNA-zytometrischen Messungen wird zunächst die Häufigkeitsverteilung der DNA-Ploidie der Einzelzellen als sogenanntes DNA-Histogramm dargestellt. Daran erfolgt interaktiv die Festlegung der Grenzen der einzelnen Peaks, die die aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts abgrenzbaren Zellpopulationen als sogenannte Stammlinien repräsentieren. Bei der Messung von Normalgewebe werden sich außer den Zellen der Synthesephase mit einem DNA-Gehalt zwischen $2c$ und $4c$ auch Zellen aus der G_2M -Phase mit einem DNA-Gehalt um $4c$ darstellen. Der DNA-tetraploide Anteil überschreitet selbst bei

reaktiven, stark proliferierenden Geweben aufgrund der kurzen Dauer der G₂M-Phase nicht 15% (Kreicbergs et al., 1984; Ross, 1996a). Deshalb wird ein Peak im Histogramm mit einem Modalwert von 4c, der 20% oder mehr der untersuchten Zellen umfaßt, und dessen G₂M'-Peak bei 8c nachweisbar ist, als eigenständige tetraploide Stammlinie akzeptiert. Peaks zwischen 2c und 4c sowie jenseits von 4c sind stets Ausdruck einer Tumorzellpopulation mit numerischen chromosomalen Aberrationen, die in einem vom diploiden Zellzyklus unabhängigen, eigenen Zellzyklus proliferiert.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß ein DNA-diploides Histogramm nicht den absoluten Ausschluß einer numerischen Aberration bedeutet, da geringe Chromosomenabweichungen sich nicht in einer Veränderung der zytometrisch bestimmbaren DNA-Ploidie ausdrücken müssen.

Die in der statischen DNA-Zytometrie mögliche Einzelzellinterpretation stellt eine wichtige Erweiterung der Auswertungsprinzipien dar. Grundsätzlich kann eine Einzelzellinterpretation nur vorgenommen werden, wenn externe Einflüsse, wie eine Virusinfektion, Strahlenbelastung, Chemotherapie oder Vitamin-B12-Mangel ausgeschlossen sind und eine sogenannte euploide Polyploidisierung in der untersuchten Zellpopulation nicht vorkommt (Böcking et al., 1994). Die euploide Polyploidisierung, d.h. die Verdopplung des DNA-Gehalts durch Endomitose, kommt in verschiedenen stoffwechselaktiven Geweben, wie zum Beispiel Leber, Herz, Schilddrüse und blutbildendem Knochenmark vor. Im Knochengewebe wurde eine derartige Veränderung bisher nicht beobachtet (Biesterfeld et al., 1994), wenn man von den multinukleären Osteoklasten absieht. Für die Bewertung eines Gewebes als DNA-aneuploid im Sinne der Einzelzellinterpretation wird der Nachweis von mindestens 3 Zellen mit einem DNA-Gehalt >5c gefordert (Böcking et al., 1994; Coleman et al., 1995).

Zusätzlich zu den aus der interaktiven Histogramminterpretation ableitbaren Parametern lassen sich aus den DNA-Einzelwerten statistische Größen ableiten, die den Anteil von Zellen innerhalb bestimmter Grenzen (z.B. hyperdiploide Zellen) oder Streuungsparameter der Häufigkeitsverteilung, z.B. die Streuung um das diploide Vergleichsniveau (2c-Deviation-Index) wiedergeben. Diese Parameter der DNA-zytometrischen Parameter wurden im Rahmen der vorliegenden Studie an 4 verschiedenen Knochentumorentitäten erhoben.

Erwartungsgemäß zeigte die Gruppe der solitären Knochenzysten für alle Auswertungsparameter die niedrigsten Werte (Tabelle 1 und Abbildung 22). DNA-aneuploide Stammlinien kamen bei dieser Läsion nicht vor. Lediglich in einem einzigen Fall wurden bei einer solitären Knochenzyste Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt >5c nachgewiesen. Die genaue Bedeutung dieses Befundes ist nicht abschließend geklärt. Möglicherweise handelt es sich tatsächlich um ein zufälliges Ereignis. Andererseits ist aus eigenen Erfahrungen im Hamburger Knochentumor-Register bekannt, daß es zystische Läsionen gibt, hinter denen sich trotz eines morphologischen Bildes, das dem einer solitären Knochenzyste entspricht, ein niedrigmalignes zentrales Osteosarkom verbergen kann. Da die Erfahrungen in der Interpretation derartiger morphologi-

scher und DNA-zytometrischer Befunde bei solitären Knochenzysten noch zu gering sind, sollte der Nachweis einzelner aneuploider Zellen bei derartigen Läsionen beim heutigen Erkenntnisstand Anlaß zu einer besonders sorgfältigen klinischen Verlaufsbeobachtung sein.

In der Gruppe der aneurysmatischen Knochenzysten können sich aufgrund des lokal aggressiven Erscheinungsbildes erhebliche differentialdiagnostische Abgrenzungsschwierigkeiten zum hochmalignen Osteosarkom sowohl aus radiologischer als auch aus pathologisch-anatomischer Sicht ergeben. Diese Situation wird durch die Tatsache erschwert, daß Strukturen einer aneurysmatischen Knochenzyste auch sekundär neben einem anderweitigen benignen oder malignen Knochentumor vorkommen können (Kransdorf, Sweet, 1995; Salzer-Kuntschik, 1996). Differentialdiagnostische Probleme treten auch dann auf, wenn in aneurysmatischen Knochenzysten mehr oder weniger ausgedehnte solide Gewebsanteile enthalten sind, die dann den makroskopischen und histologischen Befund wesentlich bestimmen (Sanerkin et al., 1983; Edel et al., 1992; Gipple et al., 1992; Oda et al., 1992; Vergel De Dios et al., 1992; Kransdorf, Sweet, 1995).

Unter den in der vorliegenden Studie untersuchten aneurysmatischen Knochenzysten fand sich in 29 Fällen (94%) ein unauffälliges diploides DNA-Verteilungsmuster und nur in 2 Fällen (6%) ein niedriger DNA-tetraploider Peak. Damit unterschied sich diese Läsion eindeutig hinsichtlich der Stammlinienploidie von der wichtigsten differentialdiagnostisch abzugrenzenden Entität, dem hochmalignen zentralen Osteosarkom, bei dem nur in 2 Fällen (4%) eine ausschließliche DNA-diploide Stammlinie nachgewiesen wurde. Eigenständige Stammlinien im hyperdiploiden bzw. hypertetraploiden Bereich kamen bei den untersuchten aneurysmatischen Knochenzysten nicht vor und wurden auch in den in der Literatur publizierten Studien, bei denen allerdings jeweils nur geringe Fallzahlen untersucht wurden, bisher niemals mitgeteilt (Kreicbergs et al., 1984; Heliö et al., 1985; Bodensteiner et al., 1991; El-Naggar et al., 1995). In Übereinstimmung damit ergaben auch die zytogenetischen Analysen von aneurysmatischen Knochenzysten, die an bisher 8 Fällen publiziert wurden, normale Karyotypen (Pfeifer et al., 1991). Eine Abgrenzung der Gruppe der aneurysmatischen Knochenzysten von der Gruppe der solitären Knochenzysten allein anhand DNA-zytometrischer Parameter ist nicht möglich (Tabelle 8 und Abbildung 22).

Die Mehrzahl der in der vorliegenden Studie untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkome wiesen ein DNA-aneuploides Ploidieverteilungsmuster auf. Dabei war in 53 der 57 gemessenen Präparate (93%) eine Stammlinienaneuploidie nachweisbar, 2 weitere Fälle (3%) wurden gemäß den Kriterien der Einzelzellinterpretation als DNA-aneuploid bewertet. Lediglich 2 hochmaligne zentrale Osteosarkome wiesen ein unauffälliges diploides DNA-Verteilungsmuster auf. Bei einer Aufschlüsselung der hochmalignen zentralen Osteosarkome nach der Stammlinienverteilung ist die Kombination aus einer diploiden und einer aneuploiden Stammlinie in 25 Fällen (44%) am häufigsten. Dabei ist die aneuploide Stammlinie meist im peritriploiden bzw. hypotetraploiden Bereich lokalisiert, hypertetraploide Stammlinien sind bei

diesem Ploide-Verteilungsmuster seltener. In 14 Fällen (25%) bestanden neben der diploiden Tumorzellstammlinie noch mehrere (in der Regel 2) aneuploide Stammlinien. Die zweite aneuploide Stammlinie ist bei den in dieser Studie bearbeiteten Tumoren durch einen weiteren aneuploiden Polyploidisierungsschritt aus der ersten aneuploiden Stammlinie hervorgegangen. Letztlich konnte eine Gruppe von 14 (25%) hochmalignen zentralen Osteosarkomen DNA-zytometrisch abgegrenzt werden, bei denen im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Fällen neben einer oder mehreren deutlich ausgeprägten aneuploiden Stammlinien nur ein anteilmäßig geringer Tumorzellklon mit diploidem DNA-Gehalt (<15% der untersuchten Zellen) vorhanden war. Zwischen dem histologischen Subtyp des jeweiligen Einzelfalles und dem Ergebnis der DNA-Zytometrie fanden sich in Übereinstimmung mit Literaturangaben keine Zusammenhänge (Kreicbergs et al., 1982; Hiddemann et al., 1987; Bauer, 1988; Bauer et al., 1989; Mellin et al., 1989).

Beim Vergleich der hier erhobenen Befunde mit den Angaben im Schrifttum ergibt sich die Schwierigkeit einer bisher mangelnden Standardisierung der Auswertung DNA-zytometrischer Meßergebnisse sowie das Problem der vollständigen Vergleichbarkeit von image-zytometrischen und flow-zytometrischen Befunden. So wird in einigen Publikationen lediglich zwischen „diploiden“ und „aneuploiden“ Tumoren unterschieden, wobei die entsprechenden Kriterien von Studie zu Studie unterschiedlich sind.

Der Anteil diploider hochmaligner zentraler Osteosarkome in langen Röhrenknochen wird in älteren Studien mit weniger als 10 % angegeben (Kreicbergs et al., 1982; Bauer, 1988; Bauer et al., 1989), was mit den Ergebnissen der hier vorgelegten Studie an einer größeren Fallzahl weitgehend übereinstimmt. In hochmalignen Osteosarkomen der Kieferknochen ist der Anteil an Fällen mit diploidem DNA-Verteilungsmuster möglicherweise höher (Oliveira et al., 1997). Die Angabe von bis zu 15% diploiden Osteosarkomen in 3 flow-zytometrischen Publikationen aus einer gemeinsamen Arbeitsgruppe, die übereinstimmend das gleiche Material beschreiben (Hiddemann et al., 1987; Mellin et al., 1989; Roessner et al., 1991) stellt allerdings gewisse Abweichung von den bisherigen Mitteilungen dar und erklärt sich möglicherweise aus methodischen Unterschieden. Eine weitere flow-zytometrische Studie an 6 Osteosarkomen mit 3 diploiden Fällen ist ebenfalls nicht vergleichbar, denn die Messungen erfolgten ausschließlich an Untersuchungsmaterial von Patienten nach Chemotherapie.

Während bei Karzinomen verschiedener Organsysteme sowie bestimmten Weichteilsarkomen DNA-zytometrische Parameter als prognostisch bedeutsam erkannt wurden (Opfermann et al., 1987; Aziz, Peter, 1991; Heidenreich et al., 1995; Jeffers et al., 1996; Ljungberg et al., 1996; Ross, 1996b; Collin et al., 1997; De Zen et al., 1997; Motherby et al., 1998a; Motherby et al., 1998b; Böcking, Motherby, 1999), spielen diese Kriterien in der Prognosebewertung bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen bisher keine Rolle. Diese richtet sich seit der Einführung der neoadjuvanten Chemotherapie in erster Linie nach der morphologischen Bestimmung des sogenannten Regressionsgrades am Resektionspräparat (Winkler et al., 1987; Winkler et al.,

1988; Bielack et al., 1989; Delling et al., 1989; Bieling et al., 1991; Winkler et al., 1993; Bieling et al., 1996; Fuchs et al., 1998). Weitere Kriterien sind die Größe des Primärtumors (Rehan et al., 1993) und das Fehlen von primären Lungenmetastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Sluga et al., 1999) sowie die Tumorfreiheit der Resektionsränder zur Vermeidung von Lokalrezidiven (Kempf-Bielack et al., 1997). Feingewebliche Befunde an der Biopsie vor Chemotherapiebeginn haben hingegen bisher keinen Eingang in die Einschätzung der Prognose gefunden.

In verschiedenen Studien ist bereits versucht worden, Zusammenhänge zwischen der klonalen zellulären Zusammensetzung des Tumorgewebes bei hochmalignen zentralen Osteosarkomen und dem weiteren Verlauf darzustellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind zum Teil widersprüchlich. El-Naggar et al. (1995) konnten bei 29 flußzytometrisch untersuchten hochmalignen zentralen Osteosarkomen keinen Zusammenhang zwischen DNA-Ploidie und Prognose feststellen. Im Gegensatz dazu wird in anderen Studien ein günstigerer Verlauf von „diploiden“ im Vergleich zu „aneuploiden“ Tumoren dargestellt. Mellin et al. (1989) berichten von 3 Osteosarkompatienten mit diploidem DNA-Verteilungsmuster im Primärtumor, die trotz Entwicklung von Metastasen und lokalem Rezidiv eine längere Überlebensdauer als Patienten hatten, deren Osteosarkome Stammlinienaneuploidie aufwiesen. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Bauer et al. (1989), die bei 4 diploiden hochmalignen zentralen Osteosarkomen einen rezidivfreien Verlauf beschreiben.

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Untersuchungen wird in einer Studie von Look et al. (1988) eine differenziertere Beurteilung der DNA-Ploidieverteilungsmuster vorgenommen. Die Autoren fanden mittels DNA-Flow-Zytometrie in 13 von 26 hochmalignen Osteosarkomen (50%) das Auftreten eines diploiden und eines aneuploiden Tumorzellklons, während in 10 hochmalignen Osteosarkomen (38%) der diploide Klon fehlte. Dabei stellte sich in der Überlebenswahrscheinlichkeitsanalyse ein deutlich ungünstigeres Verlaufsverhalten für die Tumoren mit fehlendem diploiden Anteil dar. Diese Studie basiert allerdings auf einem adjuvanten Chemotherapieprotokoll, wie es gegenwärtig nicht mehr eingesetzt wird.

In der hier vorgelegten Untersuchung konnte, wie bereits diskutiert, ebenfalls eine Gruppe von hochmalignen zentralen Osteosarkomen herausgearbeitet werden, die durch einen fehlenden oder gering ausgeprägten diploiden Tumorzellklon gekennzeichnet ist. Der relative Anteil dieser besonderen Osteosarkome ist bei der größeren Gesamtfallzahl mit 14 von 57 Fällen (25%) geringer als in der erwähnten Studie von Look et al. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ploidie-Verteilungsmuster und dem Regressiongrad (Tabelle 7). Dieses Resultat verweist auf die Bedeutung der klonalen Zusammensetzung von hochmalignen zentralen Osteosarkomen und die Prognose der Patienten, wenngleich aufgrund der insgesamt relativ kurzen Nachbeobachtungszeit eine Überlebenswahrscheinlichkeitsanalyse noch nicht durchgeführt werden konnte.

Neben dem hochmalignen Osteosarkom stellt das niedrigmaligne zentrale Osteosarkom eine seltene Gruppe von Knochentumoren dar (Unni et al., 1977; Campanacci et al., 1981; Xipell, Rush, 1985; Sundaram et al., 1986; Mirra, 1989), die von besonderer Bedeutung in ihrer differentialdiagnostischen Abgrenzung gegen benigne Knochenläsionen sind. Kurt et al. (1990) beschrieben 80 niedrigmaligne zentrale Osteosarkome der Mayo Clinic, ohne daß jedoch eine DNA-Zytometrie durchgeführt wurde. Diese Autoren geben für das niedrigmaligne Osteosarkom eine Inzidenz von 1,9% unter allen Osteosarkomen an. Bisherige DNA-zytometrische Untersuchungen an osteogenen Tumoren niedrigen Malignitätsgrades betreffen parossale und periostale, d.h. von der Knochenoberfläche ausgehende Tumoren (Kreicbergs et al., 1982; Kreicbergs et al., 1984; Hiddemann et al., 1987; Roessner et al., 1991).

Die in der vorliegenden Arbeit enthaltenen 14 niedrigmalignen Osteosarkome stellen somit das größte DNA-zytometrisch untersuchte Kollektiv dieser seltenen Tumorentität dar. Im Gegensatz zu den hochmalignen zentralen Osteosarkomen, deren bestimmendes Merkmal in der DNA-Zytometrie das Auftreten einer aneuploiden Stammlinie ist (93% der Fälle), konnte bei den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen nur bei 2 Fällen (14%) eine eigenständige Stammlinie im tetraploiden Bereich nachgewiesen werden, während 12 Fälle (86%) durch eine diploide Stammlinie gekennzeichnet waren. Bei 3 Tumoren mit diploider Stammlinie konnten zusätzlich Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt $>5c$ nachgewiesen werden, so daß diese Tumoren die Kriterien der Einzelzellaneuploidie erfüllten (Böcking et al., 1994). Zusammenfassend waren damit 5 von 14 niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen (36%) durch DNA-zytometrische Auffälligkeiten gekennzeichnet.

Darüber hinaus konnte im Gruppenvergleich zwischen den benignen zystischen Läsionen und den niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen ein statistisch signifikanter Unterschied für die Parameter DNA-Maximum und $2c$ -Deviation-Index herausgearbeitet werden: Die Gruppe der niedrigmalignen zentralen Osteosarkome zeichnet sich durch höhere DNA-Maximalwerte und eine größere Streuung der DNA-Einzelwerte um das jeweilige diploide Vergleichsniveau in den Primärtumoren aus.

In einem Fall eines niedrigmalignen zentralen Osteosarkoms vom fibrous-dysplasia-like Subtyp war neben der DNA-zytometrischen Untersuchung des Primärtumors auch die Analyse von Gewebe aus Lokalrezidiven bzw. Lungenmetastasen möglich. Dabei ergaben sich im Verlauf der Tumorerkrankung Veränderungen der feingeweblichen und DNA-zytometrischen Befunde. Während der Primärtumor ausschließlich durch eine DNA-diploide Stammlinie gekennzeichnet war, kam es über das Auftreten von DNA-aneuploiden Einzelzellen im ersten Lokalrezidiv zur eindeutigen Etablierung eines ausgeprägten DNA-tetraploiden Klons, dessen Zellen schließlich auch im Material einer Lungenmetastase nachgewiesen werden konnten. Parallel zu Veränderungen der klonalen zellulären Zusammensetzung änderte sich auch das histologische Bild (Abbildung 15).

Diese Beobachtung ist mit der Mitteilung von Heliö et al. (1985) vergleichbar, die über einen Tumor berichten, der primär zunächst als Osteoblastom fehlinterpretiert wurde. 17 Monate später war eine aneuploide Stammlinie nachzuweisen und anhand einer dritten Biopsie wurde dieser Tumor schließlich als niedrigmalignes zentrales Osteosarkom eingeordnet. Es ist möglich, daß in Fällen, die vormalig als maligne Transformation benigner Läsionen bewertet wurden, in der Tat ein niedrigmalignes Osteosarkom zugrunde lag. Dies könnte beispielsweise auf sehr selten beobachtete maligne Transformationen von aneurysmatischen Knochenzysten zutreffen (Reed, Rothenberg, 1964; Adler, Schmidt, 1978; Kyriakos, Hardy, 1991).

Mellin et al. (1989) diskutieren die Möglichkeit, daß die bei zwei sogenannten „aggressiven“ Osteoblastomen gefundenen tetraploiden Stammlinien für ein malignes Potential vor der klinischen Manifestation sprechen und stellen die histologische Abgrenzung des „aggressiven“ Osteoblastoms zu dem niedrigmalignen zentralen Osteosarkom in Frage.

Bauer et al. (1988) beschreiben unter 158 primären Knochentumoren 17 Fälle als diagnostisch schwierig. Darunter befanden sich 9 zunächst als benigne eingeordnete Tumoren, von denen die 4 DNA-zytometrisch diploiden Tumoren einen benignen Verlauf zeigten. Von den 5 hyperdiploiden Tumoren waren 1 Fall als Riesenzelltumor, 2 als aneurysmatische Knochenzysten, und 2 als Osteoblastome diagnostiziert worden. Alle diese Patienten entwickelten ein Lokalrezidiv, bei dem sich DNA-zytometrisch eine hyperdiploide Stammlinie und histologisch ein hochmalignes Osteosarkom zeigte. Hier stellt sich die Frage, ob es sich nicht zumindest bei den zunächst als Osteoblastom klassifizierten Tumoren um Osteoblastom-ähnliche niedrigmaligne zentrale Osteosarkome gehandelt hat. Diese Entität ist erstmals von Bertoni et al. (1985) an 17 Fällen beschrieben worden, von denen 7 einen letalen Verlauf nahmen.

Die differentialdiagnostischen Schwierigkeiten bei der primären Diagnostik von niedrigmalignen zentralen Osteosarkomen wurden erst in den letzten 15 Jahren weitgehend erkannt. Angesichts der damit verbundenen erheblichen Konsequenzen für die Therapieentscheidung und das Verlaufs-Management ist zu empfehlen, Tumoren mit unsicherer radiologischer und histologischer Einordnung in Zentren für die Behandlung von Knochentumoren zu betreuen und bei der morphologischen Diagnostik Zusatzverfahren, wie z.B. die DNA-Zytometrie einzusetzen, um eine bessere Charakterisierung der entsprechenden Tumoren zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adler P, Schmidt A (1978) Aneurysmale Knochenzyste des Femurs mit malignem Verlauf. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 62, 487.
2. Aziz DC, Peter JB (1991) DNA ploidy and cell-cycle analysis: tools for assessment of cancer prognosis. *J Clin Lab Anal*, 5, 422-438.
3. Bauer HCF (1988) DNA cytometry of osteosarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl*, 228, 1-39.
4. Bauer HCF, Kreicbergs A, Silfverswärd C (1989) Prognostication including DNA analysis in osteosarcoma. *Acta Orthop Scand*, 60, 353-360.
5. Bauer HCF, Kreicbergs A, Silfverswärd C, Tribukait B (1988) DNA analysis in the differential diagnosis of osteosarcoma. *Cancer*, 61, 2543-2540.
6. Bauer HCF, Kreicbergs A, Silfverswärd C, Tribukait B (1989) Ploidy and morphology in osteosarcoma. *Anal Quant Cytol Histol*, 11, 96-103.
7. Bauer HCF, Kreicbergs A, Tribukait B (1991) DNA content prognostic in soft tissue sarcoma. 102 patients followed for 1-10 years. *Acta Orthop Scand*, 62, 187-194.
8. Bertoni F, Unni KK, McLeod RA, Dahlin DC (1985) Osteosarcoma resembling osteoblastoma. *Cancer*, 55, 416-426.
9. Bielack S, Beck J, Delling G, Gerein V, Grümayer R, Hiddemann W, Jobke A, Jürgens H, Kornhuber G, Kotz R, Kusnierz-Glaz C, Ritschl P, Ritter J, Russe W, Salzer-Kuntschik M, Schellong G, Schmoll HJ, Steinhoff A, Winkelmann W, Winkler K (1989) Neoadjuvante Chemotherapie des Osteosarkoms. Ergebnisse der kooperativen Studien COSS-80 und COSS-82 nach 7 bzw. 5 Jahren. *Klin Pädiatr*, 4, 275-284.
10. Bieling P, Bielack S, Delling G, Jürgens H, Kotz R, Dose C, Astheimer H, Exner G, Gadner H, Graf N, Ritter J, Salzer-Kuntschik M, Weinel P, Winkler K (1991) Neoadjuvante Chemotherapie des Osteosarkoms. Vorläufige Ergebnisse der kooperativen Osteosarkom-Studie COSS-86. *Klin Pädiatr*, 203, 220-230.
11. Bieling P, Rehan N, Winkler P, Helmke K, Maas R, Fuchs N, Bielack S, Heise U, Jürgens H, Treuner J, Romanowski R, Exner U, Kotz R, Winkler K (1996) Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 14, 848-858.
12. Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A (1994) Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol*, 47, 38-42.
13. Bodensteiner D, Reidinger D, Rosenfeld C, Neff J, Lin F (1991) Flow cytometry of needle aspirates from bone and soft tissue tumors. *South Med J*, 84, 1451-1454.
14. Bowman R, Kanacki ZA, Garberoglio C, Chase DR (1995) Comparison between image and flow cytometry: A priori factors that influence technique. *Anal Quant Cytol Histol*, 17, 276-283.

15. Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W (1984) Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol*, 6, 1-8.
16. Böcking A, Biesterfeld S, Liu S (1993) DNA distribution in gastric cancer and dysplasia. In: *Precancerous conditions and lesions of the stomach*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 103-120.
17. Böcking A, Chatelain R (1989) Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecologic cytology. *Anal Quant Cytol Histol*, 11, 177-186.
18. Böcking A, Giroud F, Reith A (1995) Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol*, 17, 1-5.
19. Böcking A, Motherby H (1999) Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie. *Pathologe*, 20, 25-33.
20. Böcking A, Striepecke E, Auer H, Füzesi L (1994) Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In: *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: *Tutorials of Cytology*. 107-128.
21. Campanacci M, Bertoni F, Capanna R, Cervellati C (1981) Central osteosarcoma of low grade malignancy. *Ital J Orthop Traumatol*, 7, 71-78.
22. Coleman K, Baak JP, van Diest PJ, Curran B, Mullaney J, Fenton M, Leader M (1995) DNA ploidy status in 84 ocular melanomas: a study of DNA quantitation in ocular melanomas by flow cytometry and automatic and interactive static image analysis. *Hum Pathol*, 26, 99-105.
23. Collin F, Chassevent A, Bonichon F, Bertrand G, Terrier P, Coindre JM (1997) Flow cytometric DNA content analysis of 185 soft tissue neoplasms indicates that S-phase fraction is a prognostic factor for sarcomas. *Cancer*, 79, 2371-2379.
24. D'hautcourt JL, Spyrtos F, Chassevent A (1996) Quality control study by the French cytometry association on flow cytometric DNA content and S-phase fraction (S%). *Cytometry*, 26, 32-39.
25. De Zen L, Sommaggio A, D'Amore ESG, Masiero L, Di Montezemolo LC, Linari A, Madon E, Dominici C, Bosco S, Bisogno G, Carli M, Ninfo V, Basso G (1997) Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: A retrospective analysis of patients enrolled onto the Italian cooperative rhabdomyosarcoma study RMS88. *J Clin Oncol*, 15, 1198-1205.
26. Delling G, Winkler K, Heise U, Salzer-Kuntschik M (1989) Quantitative analysis of tumour regression and distribution of viable tumour areas in osteosarcomas following polychemotherapy. *Med.Pediatr.Oncol.*, 17, 305

27. Driel-Kulker AMJ, Mesker WE, Burg MJM, Ploem JS (1987) Preparation of cells from paraffin-embedded tissue for cytometry and cytomorphologic evaluation. *Anal Quant Cytol Histol*, 9, 225-231.
28. Edel G, Roessner A, Blasius S, Erlemann R (1992) "Solid" variant of aneurysmal bone cyst. *Pathol Res Pract*, 188, 791-796.
29. El-Naggar AK, Hurr K, Tu ZN, Teague K, Raymond KA, Ayala AG, Murray J (1995) DNA and RNA content analysis by flow cytometry in the pathobiologic assessment of bone tumors. *Cytometry*, 19, 256-262.
30. Eskelinen M, Lipponen P, Nordling S (1995) Prognostic evaluation of DNA flow cytometry and histomorphological criteria in renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 15, 2279-2283.
31. Fuchs N, Bielack SS, Epler D, Bieling P, Delling G, Körholz D, Graf N, Heise U, Jürgens H, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Weinel P, Werner M, Winkler K (1998) Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol*, 9, 893-899.
32. Gipple JR, Pritchard DJ, Unni KK (1992) Solid aneurysmal bone cyst. *Orthopedics*, 15, 1433-1436.
33. Giroud, F, Haroske, G, Reith, A, Böcking, A (1999) Updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry.
34. Haroske G, Meyer WD, Theissig F, Kunze KD (1995) Increase of precision and accuracy of DNA cytometry by correcting diffraction and glare errors. *Anal Cell Pathol*, 9, 1-12.
35. Hedley DW (1989) Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry*, 10, 229-241.
36. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA (1983) Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*, 31, 1333-1335.
37. Heidenreich A, Zumbé J, Engelmann UH (1995) Diagnosis and follow-up of testicular carcinoma in situ by DNA image cytometry. *Eur Urol*, 28, 13-18.
38. Heliö H, Karaharju E, Nordling S (1985) Flow cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumors. *Cytometry*, 6, 165-171.
39. Hiddemann W, Roessner A, Wörmann B, Mellin W, Klockenkemper B, Bösing T, Büchner T, Grundmann E (1987) Tumor heterogeneity in osteosarcoma as identified by flow cytometry. *Cancer*, 59, 324-328.

40. Huuhtanen RL, Blomqvist CP, Wiklund TA, Virolainen MJ, Elomaa AI, Pan Y, Tribukait B (1996) S-Phase fraction of 155 soft tissue sarcomas - Correlation with clinical outcome. *Cancer*, 77, 1815-1822.
41. Jeffers MD, Oakes SJ, Richmond JA, Macaulay EM (1996) Proliferation, ploidy and prognosis in uterine smooth muscle tumours. *Histopathology*, 29, 217-223.
42. Kempf-Bielack B, Bielack S, Epler D, Becker W, Delling G, Fuchs N, et al (1997) Risk factors for and prognosis after local relapse of osteosarcoma. International society of pediatric oncology (SIOP) XXVIIIth meeting, Vienna.
43. Kransdorf MJ, Sweet DE (1995) Aneurysmal bone cyst: Concept, controversy, clinical presentation, and imaging. *AJR Am J Roentgenol*, 164, 573-580.
44. Kreicbergs A, Broström LÅ, Cewrien G, Einhorn S (1982) Cellular DNA content in human osteosarcoma: aspects on diagnosis and prognosis. *Cancer*, 50, 2476-2481.
45. Kreicbergs A, Cewrien G, Tribukait B, Zetterberg A (1981) Comparative single cell and flow DNA analysis of bone sarcomas. *Anal Quant Cytol Histol*, 3, 121-127.
46. Kreicbergs A, Silvferswård C, Tribukait B (1984) Flow DNA analysis of primary bone tumors. Relationship between cellular DNA content and histopathologic classification. *Cancer*, 53, 129-136.
47. Krug H (1975) Die Impulszytometrie als quantitative Methode der Zytochemie. *Acta Histochem Suppl*, 15, 377-396.
48. Krug H (1983) Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse. *Acta Histochem Suppl*, 27, 43-61.
49. Kurt AM, Unni KK, McLeod RA, Pritchard DJ (1990) Low-grade intraosseous osteosarcoma. *Cancer*, 65, 1418-1428.
50. Kyriakos M, Hardy D (1991) Malignant transformation of aneurysmal bone cyst, with an analysis of the literature. *Cancer*, 68, 1770-1780.
51. Lee JS, Lee MC, Park CS, Juhng SW (1997) Diagnostic value of p53 protein and flow cytometric DNA analysis in the study of serous effusions. *Acta Cytol*, 41, 1719-1725.
52. Lieber MM (1992) DNA ploidy: early malignant lesions. *J Cell Biochem Suppl*, 16, 44-46.
53. Ljungberg B, Mehle C, Stenling R, Roos G (1996) Heterogeneity in renal-cell carcinoma and its impact on prognosis - A flow cytometric study. *Br J Cancer*, 74, 123-127.
54. Look AT, Douglass EC, Meyer WH (1988) Clinical importance of near diploid tumor stem lines in patients with osteosarcoma of an extremity. *N Engl J Med*, 318, 1567-1572.

55. Marchevsky A, Tolmachoff T, Lee S (1996) Quality assurance issues in DNA image cytometry. *Cytometry*, 26, 101-107.
56. Mellin W, Dierschauer W, Hiddemann W, Roessner A, Edel G, Wuisman P, Harle A, Grundmann E (1989) Flow cytometric DNA analysis of bone tumors. *Curr Top Pathol*, 80, 115-152.
57. Mirra JM (1989) Bone tumors. Clinical, radiologic, and pathologic correlations. Philadelphia: Lea & Febiger. 476-535.
58. Motherby H, Marcy T, Hecker M, Ross B, Nadjari B, Auer H, Müller KM, Haussinger D, Strauer BE, Böcking A (1998a) Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes. *Anal Quant Cytol Histol*, 20, 153-161.
59. Motherby H, Nadjari B, Remmerbach T, Marcy T, Pomjanskaja N, Müller W, Knops K, Häussinger D, Strauer BE, Böcking A (1998b) Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions. *Anal Quant Cytol Histol*, 20, 162-168.
60. Niezabitowski A, Lackowska B, Gruchala A, Rys J, Jaszcz A, Szklarski W, Wasilewska A, Herman K (1996) Flow cytometric DNA-analysis of cells obtained with fine needle aspiration biopsy of the breast. *Gen Diagn Pathol*, 142, 3339.
61. Oda Y, Tsuneyoshi M, Shinohara N (1992) "Solid" variant of aneurysmal bone cyst (extragnathic giant cell reparative granuloma) in the axial skeleton and long bones. A study of its morphologic spectrum and distinction from allied giant cell lesions. *Cancer*, 70, 2642-2649.
62. Oliveira P, Nogueira M, Pinto A, Almeida MO (1997) Analysis of *p53* expression in osteosarcoma at the jaw: Correlation with clinicopathologic and DNA ploidy findings. *Hum Pathol*, 28, 1361-1365.
63. Opfermann M, Brugal G, Vassilakos P (1987) Cytometry of breast carcinoma: Significance of ploidy balance and proliferation index. *Cytometry*, 8, 217-224.
64. Pfeifer FM, Bridge JA, Neff JR, Mouron BJ (1991) Cytogenetic findings in aneurysmal bone cysts. *Genes Chromosom Cancer*, 3, 416-419.
65. Reed RJ, Rothenberg M (1964) Lesions of bone that may be confused with aneurysmal bone cyst. *Clin Orthop*, 35, 150-162.
66. Rehan N, Bieling P, Winkler P, Helmke K, Maas R, Baldini N, Heise U, Fuchs N, Winkler K (1993) Die prognostische Bedeutung des Tumorumens beim Osteosarkom unter neoadjuvanter Chemotherapie. *Klin Pädiatr*, 205, 200-209.
67. Roessner A, Ueda Y, Dockhorn-Dworniczak B, Edel G, Mellin W, Vollmer E, Blasius S, Wuisman P, Böcker W (1991) Klassifikation und Zellbiologie des Osteosarkoms - Erfahrungen aus dem Knochenschwulstregister Westfalen. *GBK Fortbildung aktuell*, 19, 17-22.

68. Ross JS (1996a) Background, Basic principles, and techniques. In: DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology. New York, Tokyo: Igaku-Shoin Ltd. 1-27.
69. Ross JS (1996b) DNA ploidy and cell cycle analysis: Prediction of tumor aggressiveness and clinical outcome. In: DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology. New York, Tokyo: Igaku-Shoin Ltd. 61-140.
70. Salzer-Kuntschik M (1996) "Pitfalls" und typische Fehlinterpretationen bei Knochentumoren. *Pathologe*, 17, 1-5.
71. Salzer-Kuntschik M, Brand G, Delling G (1983a) Bestimmung des morphologischen Regressionsgrades nach Chemotherapie bei malignen Knochentumoren. *Pathologe*, 4, 135-141.
72. Salzer-Kuntschik M, Delling G, Beron G, Sigmund R (1983b) Morphological grades of regression in osteosarcoma after polychemotherapy - COSS 80 study. *J Cancer Res Clin Oncol Suppl*, 106, 21-24.
73. Sanerkin NG, Mott MG, Roylance J (1983) An unusual intraosseous lesion with fibroblastic, osteoclastic, osteoblastic, aneurysmal and fibromyxoid elements. "Solid" variant of aneurysmal bone cyst. *Cancer*, 51, 2278-2286.
74. Sluga M, Windhager R, Lang S, Heinzl H, Bielack S, Kotz R (1999) Local and systemic control after ablative and limb sparing surgery in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop*, 358, 120-127.
75. Sundaram M, Herbold D, McGuire MH (1986) Case report 370: low grade intramedullary osteosarcoma. *Skeletal Radiol*, 15, 338.
76. Unni KK, Dahlin DC, McLeod RA, Pritchard DJ (1977) Intraosseous well-differentiated osteosarcoma. *Cancer*, 40, 1337-1347.
77. Vergel De Dios AM, Bond JR, Shives TC, McLeod RA, Unni KK (1992) Aneurysmal bone cyst. A clinicopathologic study of 238 cases. *Cancer*, 69, 2921-2931.
78. Winkler K, Beron G, Delling G, Heise U, Kabisch H, Purfürst C, Berger J, Ritter J, Jürgens H, Gerein V, Graf N, Russe W, Gruemayer ER, Ertelt W, Kotz R, Preusser P, Prindull G, Brandeis W, Landbeck G (1988) Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized cooperative trial (COSS 82) with salvage chemotherapy bases on histological tumor response. *J Clin Oncol*, 6, 329-337.
79. Winkler K, Delling G, Knop J, Kotz R, Purfürst C (1987) Zur Chemotherapie des Osteosarkoms: 10 Jahre Deutsch-Österreichische Cooperative Osteosarkomstudien-gruppe (COSS) der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (GPO). *SICOT 87, Societe Internationale de Chirurgie Orthopedique et de Traumatologie, XVII. World Congress Munich*, 16.-21.08.1987, 145-145.
80. Winkler K, Delling G, Salzer-Kuntschik M, Kotz R, Graf N, Jürgens H, et al (1993) Chemotherapy of osteosarcoma - the COSS-experience. *EFORT Paris* 20.-23.4.93,

81. Xipell JM, Rush J (1985) Well-differentiated intraosseous osteosarcoma of the left femur. *Skeletal Radiol*, 14, 312-316.
82. Zalupski M, Ryan JR, Ensley J, Baker L (1990) Cellular yields and DNA content parameters in osteogenic sarcomas. *Chir Organi Mov*, 75, 15-17.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken,

an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. G. Delling für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine anhaltende sehr engagierte Förderung und persönliche Motivation,

bei Herrn Dr. med. M. Werner, der mich rasch und gründlich in die Thematik einarbeitete, meine Begeisterung für diese Fragestellung zu wecken wußte und für Fragen und Diskussionen bereitwillig zur Verfügung stand,

und bei allen Mitarbeitern der Abteilung Osteopathologie, insbesondere Frau B. Geilhaupt und Frau J. Nebig, für die selbstverständliche und interessierte Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Horst und Margarete Heintz widmen, die schon früh mein naturwissenschaftliches Interesse zu wecken wußten und mich jederzeit bedingungslos unterstützt und gefördert haben.

Lebenslauf

Geboren am 5. Januar 1972 in Heidelberg, Tochter des Diplombiologen Horst Heintz und seiner Frau Margarete, Diplomübersetzerin

Schulbesuch 1978 - 1982 Grundschule Neckargemünd
1982-1991 Gymnasium Oberalster in Hamburg mit Abitur 1991

Studium Oktober 1991 - Mai 1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

Famulaturen:

Oktober 1993

Neurologie, Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien

August 1994

Innere Medizin, Ev. Krankenhauses Alsterdorf, Hamburg

September 1995

Gynäkologie, Pädiatrie und Notfallversorgung im St. Mary's Hospital, Mel-mouth, Südafrika

März/Februar 1996

Innere Medizin in Praxis Drs. Neuburger/Windler Hamburg

September 1996

Psychiatrie, Ev. Krankenhauses Alsterdorf, Hamburg

August 1993 Ärztliche Vorprüfung

April 1995 Erstes Staatsexamen

April 1997 Zweites Staatsexamen

Praktisches Jahr:

1. Tertial:

Anästhesiologie, AK Barmbek, Komm. Leitung: Dr. K. Lorenz

2. Tertial:

Chirurgie, University of Western Ontario, London, Canada,

Chairman: Dr. J. Harris

3. Tertial:

Innere Medizin, AK Wandsbek, Chefarzt: Prof. Dr. Sill

Mai 1998 Drittes Staatsexamen

Beruf: Seit Juni 1998 Ärztin im Praktikum in der Anästhesiologischen Abteilung des AK Harburg, Chefarzt PD Dr. med. Th. Klöss

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Anke Heintz