

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
(Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Alexander Kapp)

DNA-Zytometrie von Talgdrüsentumoren der Haut

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades in der Humanmedizin
der
Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Natalja Denisjuk
aus Kysyl-Syr
Hannover, 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident/Präsidentin: Professor / Professorin Dr.

Betreuer der Arbeit:

Referent/Referentin:

Korreferent(en) / Korreferentin(nen):

Tag der mündlichen Prüfung:

Promotionsausschussmitglieder:

Widmung

Meiner Großmutter,

Ada Skladman

* 01.03.1927

† 25.07.1987

in großer Dankbarkeit gewidmet

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
Am 19.06.2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Alexander Kapp
Referent: Prof. Dr. med. Michael Tronnier
Korreferent: PD Dr. Reichard von Wassielewski

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2009

Promotionsausschussmitglieder:
Prof. Dr. Karl Welte
Frau Prof. 'in Dr. Sylvia Glüer
Prof. Dr. Dietrich Peest

I.	EINLEITUNG	7
I.1	ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	7
<i>I.1.1.</i>	<i>Talgdrüsen und Talgdrüsentumoren</i>	<i>7</i>
<i>I.1.1.1.</i>	<i>Histologie der Talgdrüsen.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.1.2.</i>	<i>Definition der Talgdrüsentumoren.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.1.2.1.</i>	<i>Talgdrüsenhyperplasie.....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.1.2.1.1.</i>	<i>Klinisches Bild.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.1.2.1.2.</i>	<i>Histologie.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.1.2.1.3.</i>	<i>Therapie</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.2.1.4.</i>	<i>Differenzialdiagnose</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.2.2.</i>	<i>Naevus sebaceus von Jadassohn (=organoider Naevus)</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.2.2.1.</i>	<i>Klinisches Bild.....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.2.2.2.</i>	<i>Histologie.....</i>	<i>11</i>
<i>I.1.1.2.2.3.</i>	<i>Therapie</i>	<i>11</i>
<i>I.1.1.2.3.</i>	<i>Talgdrüsenadenom</i>	<i>12</i>
<i>I.1.1.2.3.1.</i>	<i>Klinisches Bild.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.1.2.3.2.</i>	<i>Histologie.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.1.2.3.3.</i>	<i>Therapie</i>	<i>13</i>
<i>I.1.1.2.4.</i>	<i>Sebazeom</i>	<i>13</i>
<i>I.1.1.2.4.1.</i>	<i>Klinisches Bild.....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.1.2.4.2.</i>	<i>Histologie.....</i>	<i>14</i>
<i>I.1.1.2.4.3.</i>	<i>Therapie</i>	<i>15</i>
<i>I.1.1.2.5.</i>	<i>Muir-Torre Syndrom.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.1.2.6.</i>	<i>Talgdrüsenkarzinom.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.1.2.6.1.</i>	<i>Klinisches Bild.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.2.6.2.</i>	<i>Histologie.....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.1.2.6.3.</i>	<i>Therapie</i>	<i>17</i>
<i>I.1.2.</i>	<i>DNA-Zytometrie</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.1.</i>	<i>Bisherige Untersuchungsmethoden</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.2.</i>	<i>DNA-Zytometrie</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.2.1.</i>	<i>Indikation</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.2.2.</i>	<i>Biologische Grundlagen</i>	<i>19</i>
<i>I.1.2.2.3.</i>	<i>Material und Methoden</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2.2.3.1.</i>	<i>Untersuchungsgut.....</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2.2.3.2.</i>	<i>DNA-Färbung</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2.2.3.3.</i>	<i>Messverfahren.....</i>	<i>20</i>
<i>I.1.2.2.4.</i>	<i>Diagnostische Interpretation.....</i>	<i>21</i>
I.2	ZIEL- UND FRAGESTELLUNG	22
II.	MATERIAL UND METHODE	23
II.1	PRÄPARATGUT	23
<i>II.1.1.</i>	<i>Auswahl der Präparate.....</i>	<i>23</i>
<i>II.1.2.</i>	<i>Anzahl der Präparate</i>	<i>23</i>
<i>II.1.3.</i>	<i>Kontrollpräparate.....</i>	<i>23</i>
II.2.	TECHNISCHE AUSSTATTUNG	24
<i>II.2.1.</i>	<i>Technische Ausstattung im histologischen Labor.....</i>	<i>24</i>
<i>II.2.2.</i>	<i>Technische Ausstattung für die digitale DNA-Zytometrische Diagnostik.....</i>	<i>24</i>
II.3.	PRAKTISCHES VORGEHEN BEI DER VORBEREITUNG VON ZELLVEREINZELUNG.....	25
<i>II.3.2.</i>	<i>Automatische Rehydratation (1.Tag).....</i>	<i>25</i>
<i>II.3.3.</i>	<i>Enzymatische Zellvereinzelung (2.Tag).....</i>	<i>26</i>
<i>II.3.4.</i>	<i>Mechanische Zellvereinzelung (2.Tag).....</i>	<i>27</i>
<i>II.3.4.1.</i>	<i>Zytozentrifugieren.....</i>	<i>27</i>
II.4.	„FEULGEN-FÄRBUNG“ NACH RICHTLINIEN DER ESACP (EUROPEAN SOCIETY FOR ANALYTICAL CELLULAR PATHOLOGY) (3.TAG).....	29
II.5.	DNA-ZYTOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG	31
<i>II.5.1.</i>	<i>Untersuchungsmaterial.....</i>	<i>31</i>
<i>II.5.2.</i>	<i>Untersuchungsmethode.....</i>	<i>31</i>
<i>II.5.2.1.</i>	<i>DNA-Messung</i>	<i>31</i>
<i>II.5.2.2.</i>	<i>Physikalische Grundlagen und diagnostische Kriterien der DNA-Zytometrie</i>	<i>34</i>
<i>II.5.2.3.</i>	<i>Biologische Grundlagen der DNA-Zytometrie.....</i>	<i>36</i>
<i>II.5.2.4.</i>	<i>DNA-Histogramm.....</i>	<i>38</i>
<i>II.5.3.</i>	<i>Statistische Auswertung.....</i>	<i>40</i>
III.	ERGEBNISSE	41
III.1.	TUMORTYPEN	41
<i>III.1.1.</i>	<i>Benigne Talgdrüsentumoren</i>	<i>41</i>

III.1.2. Borderline Talgdrüsentumoren	42
III.1.3. Talgdrüsenkarzinome	42
III.2. DNA-ZYTOMETRISCHE PARAMETER	42
III.2.1. 5[c]-Exceeding-Events	42
III.2.2. 2[c]-Deviation-Index.....	44
III.2.3. Stammlinie: Modalwert (= modal value) und Ploidie.....	45
III.3. DNA-HISTOGRAMME DER BENIGNEN, BORDERLINE UND MALIGNEN TALGDRÜSENTUMOREN	47
III.3.1. Benigner Talgdrüsentumor (Talgdrüsenhyperplasie)	47
III.3.2. Borderline Tumor (Atypisches Talgdrüsenadenom).....	47
IV. DISKUSSION	49
IV.1. BEDEUTUNG DER DNA-ZYTOMETRIE IN DER DIAGNOSTIK.....	49
IV.2. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	51
IV.2.1. 5[c]-Exceeding-Events	51
IV.2.1.1. 5[c]-Exceeding-Events bei benignen Talgdrüsentumoren	51
IV.2.1.2. 5[c]-Exceeding-Events bei borderline Talgdrüsentumoren.....	51
IV.2.1.3. 5[c]-Exceeding-Events bei malignen Talgdrüsentumoren	52
IV.2.1.4. 5[c]-Exceeding-Events : Schlussfolgerung	52
IV.2.2. 2[c]-Deviation-Index	52
IV.2.2.1. 2[c]-Deviation-Index bei benignen Talgdrüsentumoren	52
IV.2.2.2. 2[c]-Deviation-Index bei borderline Talgdrüsentumoren	52
IV.2.2.3. 2[c]-Deviation-Index bei malignen Talgdrüsentumoren	53
IV.2.2.4. 2[c]-Deviation-Index : Schlussfolgerung	53
IV.2.3. Stammlinie: Modalwert (= modal value) und Ploidie	53
IV.2.3.1. Modalwert bei benignen Talgdrüsentumoren	53
IV.2.3.2. Modalwert bei borderline Talgdrüsentumoren.....	54
IV.2.3.3. Modalwert bei malignen Talgdrüsentumoren	54
IV.3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	54
IV.4. BEDEUTUNG DER DNA-ZYTOMETRIE BEI DER DIAGNOSTIK VON TALGDRÜSENTUMOREN	55
IV.4.1. Korrelation zwischen histopathologischer und DNA-Zytometrischer Befunderhebung.....	55
IV.4.2. Arbeits- und Kostenaufwand	56
V. ZUSAMMENFASSUNG	57
VI. LITERATURVERZEICHNIS:	59
VII. ANHANG.....	71
VIII. LEBENS LAUF	73
IX. DANKSAGUNG	75

Abkürzungsverzeichnis:

2cDI	2[c] deviation index, 2[c]-Abweichungsindex
5cEE	5[c]-exceeding events, 5[c]-Ausreißerzelle
CMV	Cytomegalievirus
CV	Variationskoeffizient
DI	DNA-Index
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-simplex-Virus
IOD	Integrierte optische Dichte
MI	Malignancy Index, Malignitätsindex
MV	Modalwert (= modal value)
STL	Stammlinie

I. Einleitung

I.1 Allgemeine Einführung

I.1.1. Talgdrüsen und Talgdrüsentumoren

I.1.1.1. Histologie der Talgdrüsen

Die Talgdrüsen (Glandulae sebaceae) gehören zu den Anhangsgebilden der Haut.

Sie sind meistens mit den Haarfollikeln assoziiert und bilden mit ihnen zusammen eine follikulär-sebazeöse Einheit (110). Noch präziser wird diese Einheit als follikulär-sebazeös-apokrin bezeichnet, denn sowohl apokrine Schweißdrüsen als auch Talgdrüsen haben ihren Ursprung im Haarfollikelkeimepithel und sind mit dem Haarfollikel auch anatomisch verbunden.

Während der Sprossung des embryonalen Haarfollikels weiter in die Dermis entwickeln sich aus ihm drei Epithelknospen, die als Anlage für die Schweißdrüsen (die obere Knospe), Talgdrüsen (die mittlere Knospe) und den Ansatz des Musculus arrectorius (die untere Knospe) dienen (97). Die Entwicklung der Talgdrüsen aus der mittleren Knospe erfolgt zuerst am Kopf im 4. Schwangerschaftsmonat. Die Entwicklung vollzieht sich wie bei Haarfollikeln nach kaudal (95). Mit der Größenzunahme der mittleren Knospe in dieser Zeit differenziert sich eine basale Keimzellschicht von den anderen Zellschichten mit reifenden, vakuolisierenden Sebozyten (97). Bei der Geburt sind die Talgdrüsen wesentlich größer als im Kindesalter und tragen wesentlich zur Produktion von Vernix caseosa bei (95).

Die Talgdrüsen sind in der weiteren Entwicklung überall auf der Haut anzutreffen. Sie sind besonders zahlreich im Kopf- und Halsbereich, fehlen jedoch auf den Palmar- und Plantarflächen. Die Ausführungsgänge der Talgdrüsen münden auf der Haut in die äußere epitheliale Wurzelscheide des Haars.

Ektopische, nicht mit den Haarwurzeln assoziierte Talgdrüsen befinden sich sowohl an den Brustwarzen und am Brustwarzenhof als auch auf den Labiae minorae, am Präputium und gelegentlich auf der bukkalen Schleimhaut. Bei dieser Talgdrüsenart treten keine Neoplasien auf.

Zusätzlich werden folgende Talgdrüsen der periokulären Region von den anderen unterschieden:

-
- a) Meibom-Drüse des Augenlids
 - b) Zeis-Drüse der Zilien
 - c) Talgdrüsen der Augenbrauen, der Augenlideroberfläche und der Karunkel.

Die Augenliderdrüsen v.a. die Meibom-Drüsen sind von den Talgdrüsenkarzinomen am häufigsten betroffen (97).

Da die Talgdrüsen morphologisch eng mit der Haarwurzel und den apokrinen Drüsengängen verbunden sind, zeigen zahlreiche Talgdrüsenneoplasien eine follikuläre und apokrine Komponente (86).

Eine Talgdrüse besteht aus einigen Läppchen, die einen Haarfollikel im oberen Anteil umgeben und über Talgdrüsenausführungsgänge mit dessen Infundibulum in Verbindung stehen.

Jedes Talgdrüsenläppchen besteht aus einer einzelnen peripheren undifferenzierten germinativen Zellschicht mit kubischen, basophilen Vorläuferzellen und den zentral gelegenen reifen vakuolisierten Sebozyten.

Die Zellen in der Nähe des Ausführungsganges werden apoptotisch und setzen somit ihr Lipid frei. Die gesamte kernlose Talgdrüsenzelle wird als Talg in den Haarfollikel holokrin sezerniert (63,97).

I.1.1.2. Definition der Talgdrüsentumoren

Histopathologisch sind reife Sebozyten als Zeichen für eine talgdrüsige Differenzierung eines Tumors zu werten. Die Zellen der basalen Germinativzellschicht unterscheiden sich kaum von den basaloiden Tumorzellen der Epidermis oder des Haarfollikels.

Die Diagnostik der Talgdrüsentumoren wird ausschließlich nach morphologischen Kriterien am HE-Präparat durchgeführt.

Als Hilfsmittel dient die immunhistochemische Markierung der ausdifferenzierten Sebozyten im sonst überwiegend basaloiden Tumorgewebe mit EMA (63).

Zu den am häufigsten vorkommenden Talgdrüsentumoren wird die Talgdrüsenhyperplasie gezählt.

I.1.1.2.1. Talgdrüsenhyperplasie

Eine Talgdrüsenhyperplasie tritt meistens bei Erwachsenen mittleren Alters im Gesicht auf. Selten wird sie in früherem Alter diagnostiziert (30). Multiple Talgdrüsenhyperplasien

kommen auch bei immunsupprimierten Patienten vor, z.B. bei Zyklosporinbehandlung oder im Rahmen einer Dialyse (66).

Die Talgdrüsenhyperplasie stellt eher eine hamartomatöse Vergrößerung der Drüsen mit verlangsamer Bewegung der Sebozyten von der Basalmembran zu den Drüsenlobuli bzw. Drüsengängen dar (71).

I.1.1.2.1.1. Klinisches Bild

Die Talgdrüsenhyperplasie findet sich hauptsächlich auf der Stirn- oder Wangenautoberfläche in Form einer kleinen, nur wenige Millimeter großen, zentral genabelten, gelblichen, weichen Papel.

I.1.1.2.1.2. Histologie

In der Übersicht erscheint der Tumor symmetrisch, bestehend aus großen reifen Talgdrüsenläppchen um ein zentrales Infundibulum, gefüllt mit Debris und Bakterien.

Die Sebozyten sind kleiner als gewöhnlich und die Basalzellen sind leicht vermehrt (63,68).

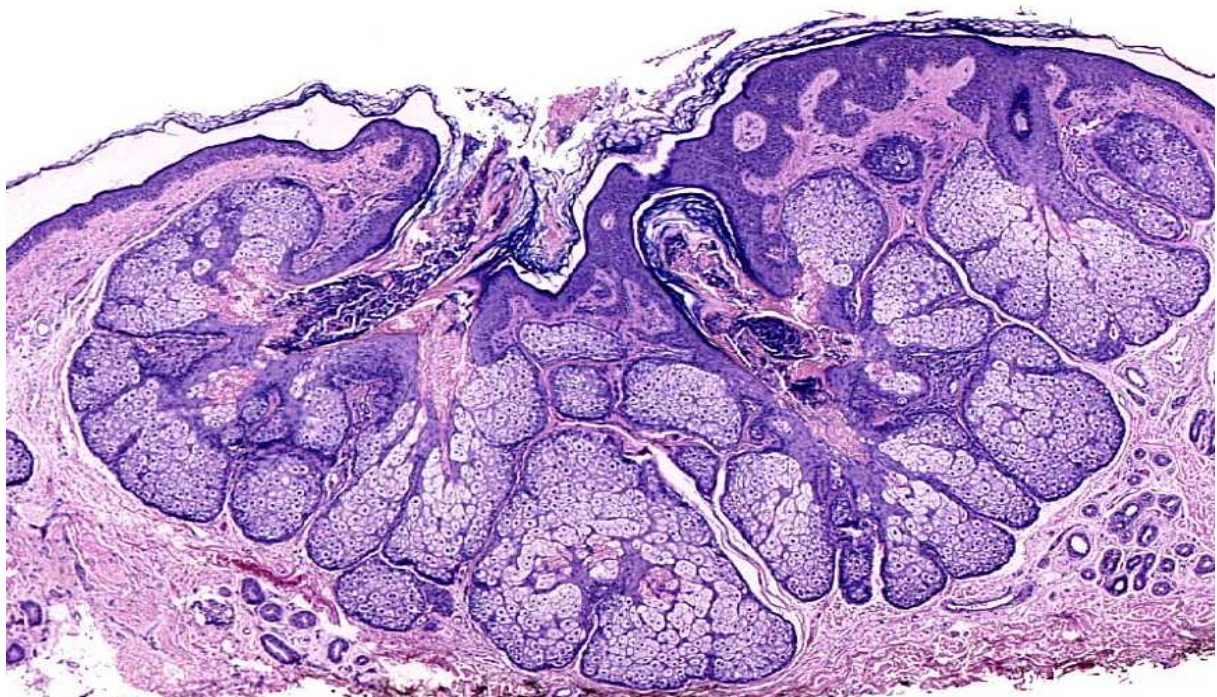


Abbildung 1: Talgdrüsenhyperplasie

I.1.1.2.1.3. Therapie

Eine Therapie ist nicht zwingend erforderlich. Aus kosmetischen Gründen kann die Läsion entweder mechanisch durch z.B. Exzision, Laser oder medikamentös mit Isotretinoin behandelt werden.

I.1.1.2.1.4. Differenzialdiagnose

Zu den Differenzialdiagnosen der Talgdrüsenhyperplasie gehören Naevus sebaceus und Talgdrüsenadenom, an der Nase auch das Rhinophym (70).

I.1.1.2.2. Naevus sebaceus von Jadassohn (=organoider Naevus)

Der Naevus sebaceus tritt als eine angeborene komplexe Fehlbildung im Kopf-Hals-Bereich auf (63,70).

Multiple Naevi sebacei finden sich assoziiert mit Anfallsleiden und geistiger Retardierung (37,72), neurologischen Ausfallserscheinungen (109) bzw. Knochendeformitäten (55) im Rahmen des sog. „neurokutanen Syndroms“.

In der Pubertät entwickelt der Naevus sebaceus sein typisches histologisches Erscheinungsbild.

In einem organoiden Nävus können sich im Erwachsenenalter solche Tumoren wie Syringocystadenoma papilliferum, Trichoblastome, Trichilemmome, Hidradenome (29) und seltenere Hautgeschwülste wie Leiomyome (26), Syringome, Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, naevoide Melanozytenverbände (76), Keratoakanthome, Porokarzinome (102) und weitere Talgdrüsen- und Schweißdrüsentumoren (116) entwickeln.

I.1.1.2.2.1. Klinisches Bild

Aus einem haarlosen gelblichen Fleck am Kapillitium beim Neugeborenen entwickelt sich der Naevus sebaceus unter dem Einfluss der hormonellen Entwicklung in der Pubertät zu einem verrukösen Gebilde mit grau-bräunlich pigmentierter Epidermishyperplasie (63).

I.1.1.2.2.2. Histologie

In der Kindheit sind unreife kleine Follikel-Talgdrüsenkomplexe das Leitmerkmal des Naevus sebaceus. Die Epidermis ist leicht akantotisch, Haarwurzeln und Terminalhaare fehlen fast vollständig.

In der Pubertät nehmen die Talgdrüsen im Tumor deutlich an Größe zu, die Epidermis wird mehr papillomatös und akantotisch und es entwickeln sich häufig zystisch dilatierte Schweißdrüsenverbände (1,63,73,110,116).

Bei älteren Patienten können sich, wie schon oben beschrieben, verschiedene Hauttumoren innerhalb eines Naevus sebaceus entwickeln.

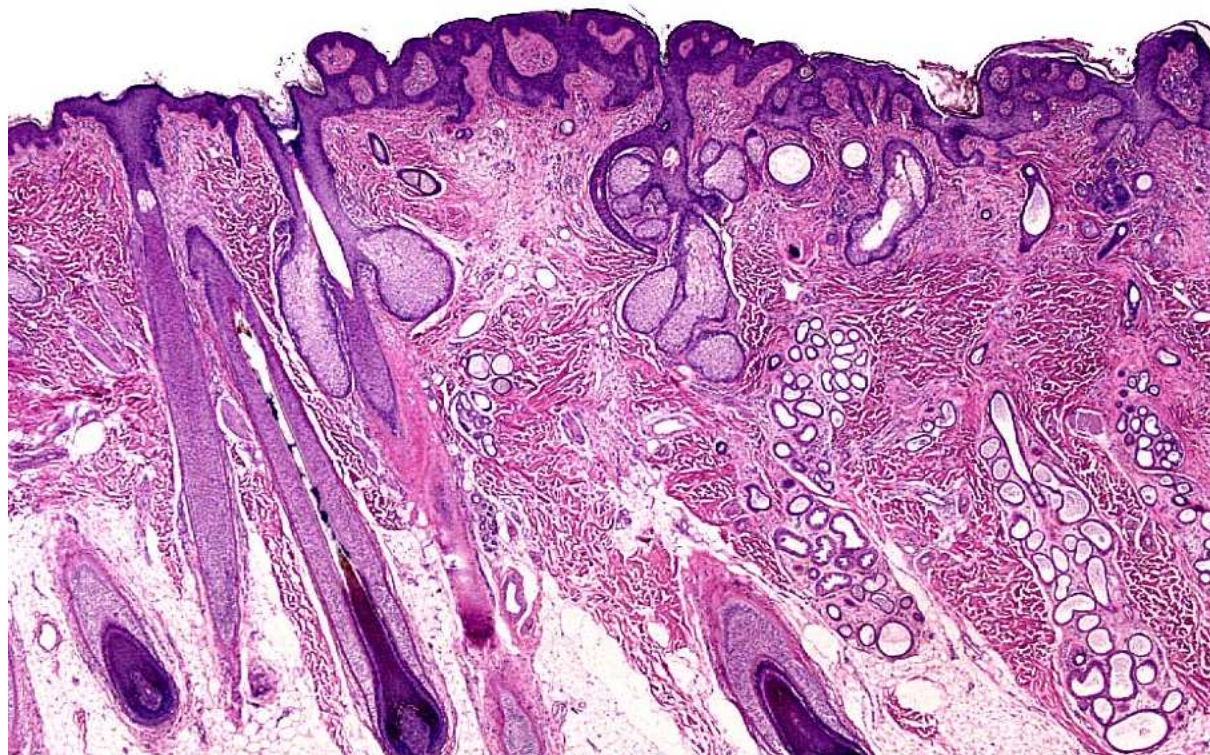


Abbildung 2: Naevus sebaceus

I.1.1.2.2.3. Therapie

Da sich ab dem 2. bis 3. Dezennium auch bösartige Adnextumoren entwickeln können, empfiehlt es sich den organoiden Naevus engmaschig zu kontrollieren bzw. zu exzidieren (63).

I.1.1.2.3. Talgdrüsenadenom

Das Talgdrüsenadenom ist ein seltener gutartiger zumeist solitärer Tumor. Es kann solitär oder multipel in Zusammenhang mit Viszeraltumoren im Rahmen eines Muir-Torre-Syndroms vorkommen (63,110).

I.1.1.2.3.1. Klinisches Bild

Das Talgdrüsenadenom ist meist ein weißlich-gelblicher, runder, ca. 0,5 cm im Durchschnitt großer Tumor im Kopf-Hals-Bereich eines älteren Patienten (83). Selten wird es auch an der Wangenschleimhaut vorgefunden (36). Gelegentlich kommt es zu zentralen Ulzerationen und Blutungen (110).

I.1.1.2.3.2. Histologie

Dieser Talgdrüsentumor ist gut umschrieben und besteht aus scharf begrenzten Drüsenläppchen, die durch ein Bindegewebsseptum voneinander getrennt sind. Der Tumor wird kragenförmig von verlängerten Reteleisten eingefasst. Die Talgdrüsenläppchen weisen einen Randsaum aus kleinen basophilen undifferenzierten Sebozyten, zentral gelegenen reifen Zellen und Übergangsformen zwischen ihnen auf. Somit dominieren die reifen Sebozyten.

Es kommen vereinzelt Mitosen in der Basalzellschicht vor. Strukturen der Talgdrüsenausführungsgänge fehlen fast vollständig. Zentral kommt es häufig zur Bildung einer zystischen Erweiterung, gefüllt mit holokrin abgestoßenen Zellresten. Eine zystische Form des feingeweblichen Tumoraufbaus gilt als wichtiger Hinweis auf ein Muir-Torre-Syndrom (63,110).

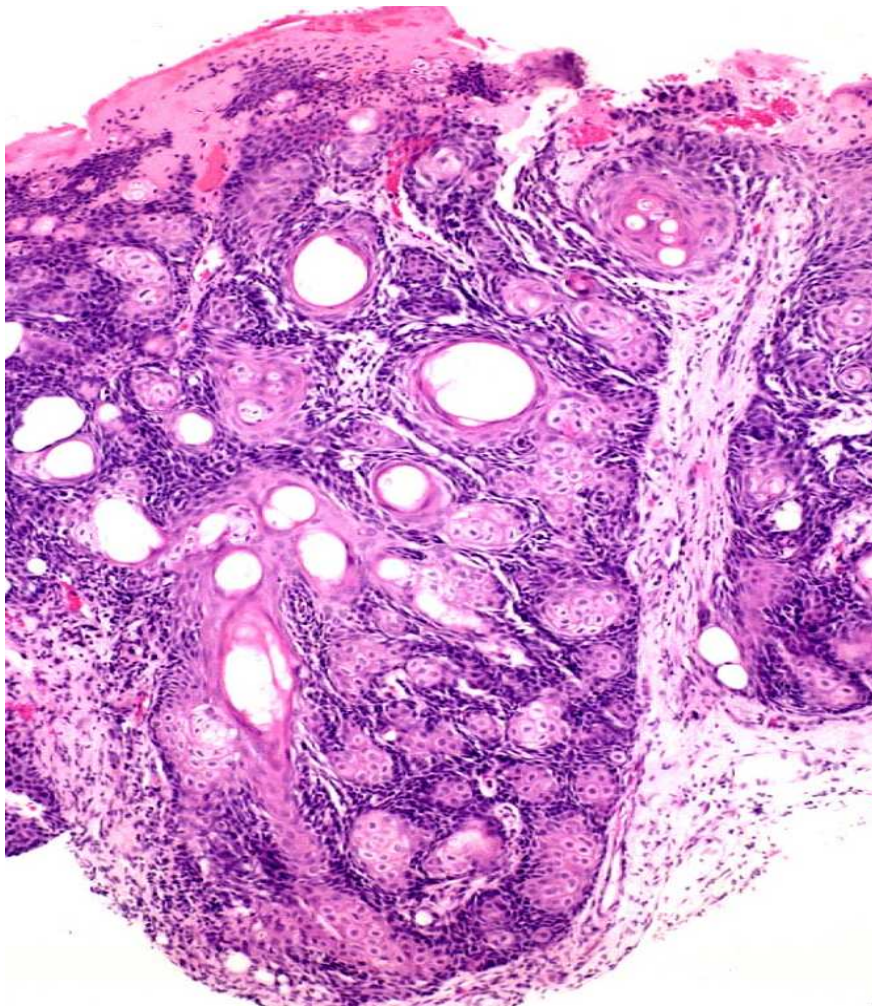


Abbildung 3: Talgdrüsenadenom

I.1.1.2.3.3. Therapie

Das Talgdrüsenadenom erfordert eine komplette Exzision im Gesunden, denn bei einer unvollständigen Tumorentfernung kommt es zu einer Rezidivbildung. Bei der Diagnose eines Talgdrüsenadenoms sollte ein Muir-Torre-Syndrom ausgeschlossen werden.

I.1.1.2.4. Sebazeom

Den Begriff Sebazeom führten 1984 J.L. Troy und A.B. Ackerman für einen gutartigen überwiegend basaloid erscheinenden sebozytären Adnextumor ein (63,105), der in der früheren Fachliteratur als Basalzellkarzinom mit sebozytärer Differenzierung (69,83) bzw. als Talgdrüsenepitheliom bezeichnet wurde (25,31).

I.1.1.2.4.1. Klinisches Bild

Das Sebazeom tritt meistens als ein kleinknotiger, solitärer, gelblicher Tumor im Kopfbereich häufiger bei älteren Frauen als bei Männern auf. Das multiple Auftreten lässt an Muir-Torre-Syndrom denken (83). Das Sebazeom weist ein langsames Wachstum auf.

I.1.1.2.4.2. Histologie

Das Sebazeom besteht aus multiplen, gut abgrenzbaren Nestern aus Talgdrüsenzellen der Basalschicht und ist in der oberen und mittleren Dermis konzentriert. Innerhalb dieser Zellverbände befinden sich einzelne oder kleingruppierte reife Sebozyten. Somit überwiegen die basaloiden Talgdrüsenzellen. Die ungeordneten Talgdrüsenausführungsgänge können zu Zysten verschmelzen, welche Talg enthalten können. Mitosen kommen vereinzelt vor, aber Atypien, die charakteristisch für das Talgdrüsenkarzinom sind, fehlen.

Ein Basalzellkarzinom mit talgdrüsiger Differenzierung ist die wichtigste Differenzialdiagnose für das Sebazeom. Es sind auch Überlappungen im feingeweblichen Bau der beiden Tumoren beschrieben worden (63,105,110).

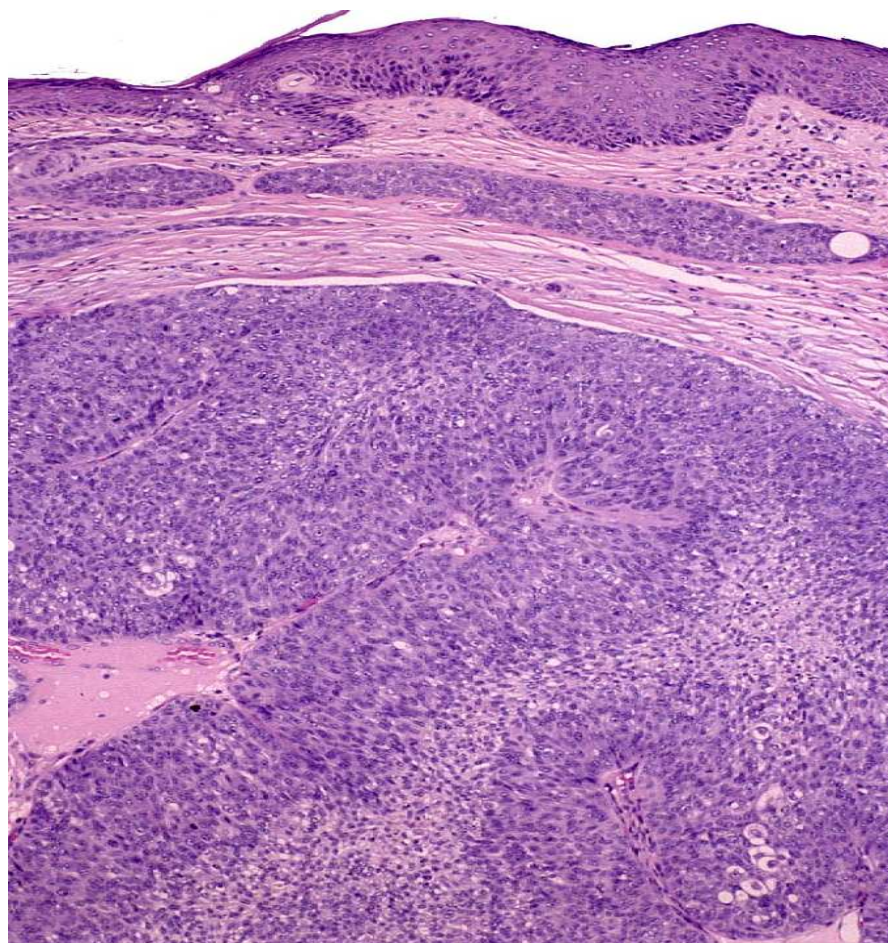


Abbildung 4: Sebazeom

I.1.1.2.4.3. Therapie

Ein Sebazeom erfordert eine vollständige Exzision des Tumors und zeigt meistens eine sehr niedrige Rezidivrate.

I.1.1.2.5. Muir-Torre Syndrom

Über das Muir-Torre-Syndrom wurde zum ersten Mal 1967 berichtet (103). Es bezeichnet das multiple Auftreten von Talgdrüsentumoren assoziiert mit viszeralem Tumoren, v.a. mit gastrointestinalen Karzinomen (6,45,81,82,94,111).

Talgdrüsentumoren sind meistens schwer zu identifizieren, jedoch tragen sie Züge entweder von Talgdrüsenadenom, Sebazeom oder Talgdrüsenkarzinom (44).

Der feingewebliche Bau der Talgdrüsentumoren beim Muir-Torre-Syndrom weist Besonderheiten wie keratoakanthomartigen oder zystischen Aufbau auf (27).

Bei den stärker proliferierenden Tumoren mit Atypien und Ulzeration ist der sichere Ausschluss eines sich entwickelnden Talgdrüsenkarzinoms nicht möglich. Bisher wurden keine Metastasierungen oder Rezidive von Muir-Torre-Talgdrüsenkarzinomen beobachtet, was es von den anderen Talgdrüsenkarzinomen unterscheidet (84).

I.1.1.2.6. Talgdrüsenkarzinom

Das Talgdrüsenkarzinom ist nach der Lokalisation klassifiziert:

1. Talgdrüsenkarzinome im Lidbereich, ausgehend von Meibom-Drüsen, den Zeis-Drüsen oder okulären follikelgebundenen Talgdrüsen.
2. Extraokuläre Talgdrüsenkarzinome (43,78).

Letztere kommen selten vor. Die okulären Talgdrüsenkarzinome dagegen machen 1% aller Tumoren des Augenlides aus und werden am Oberlid häufiger diagnostiziert als am Unterlid. Ein Drittel der Fälle metastasiert in die lokalen Lymphknoten, v.a. präaurikulär und zervikal. Die 5-Jahre-Überlebensrate beträgt ca. 20% (80,117).

Über die Metastasierung der extrokulären Karzinome wurde weit seltener berichtet. Diese Art von Karzinomen ist weniger aggressiv als die von okulären Talgdrüsenkarzinomen (62,65,113).

Vereinzelt kommen Talgdrüsenkarzinome bei Muir-Torre-Syndrom vor (43).

Die Ätiologie dieser Talgdrüsenkarzinome bleibt bisher noch ungeklärt.

I.1.1.2.6.1. Klinisches Bild

Die extraokulären Tumoren kommen in Form einer gelblichen derben Papel, ca. 1-4 cm im Durchmesser und häufig ulzeriert im Kopf- und Halsbereich, vereinzelt an den Füßen, Labien und Penis vor (60,79,113).

I.1.1.2.6.2. Histologie

Der Tumor besteht aus Zellformationen, die voneinander durch ein fibrovaskuläres Stroma getrennt sind. Er ist meistens asymmetrisch und invadiert tief bis an das subkutane Fettgewebe.

Der histologische Befund variiert mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms. Meistens sind die Zellen fein oder schaumig vakuolisiert und färben sich am Gefrierschnitt durch Oil-Red-O bzw. Sudanschwarz. Die Zellkerne sind groß und es finden sich zahlreiche Mitosefiguren. Häufig weist der Tumor Nekroseherde auf.

Ergänzend können die Tumorzellen immunhistochemisch mit Hilfe von EMA (epitheliales Membranantigen), "human milk fat globules subclass 1 and 2" oder Leu-M1 (CD15) markiert werden (80,83,106).

Im Elektronmikroskop werden im Zytoplasma Lipidtröpfchen sichtbar (113,117).

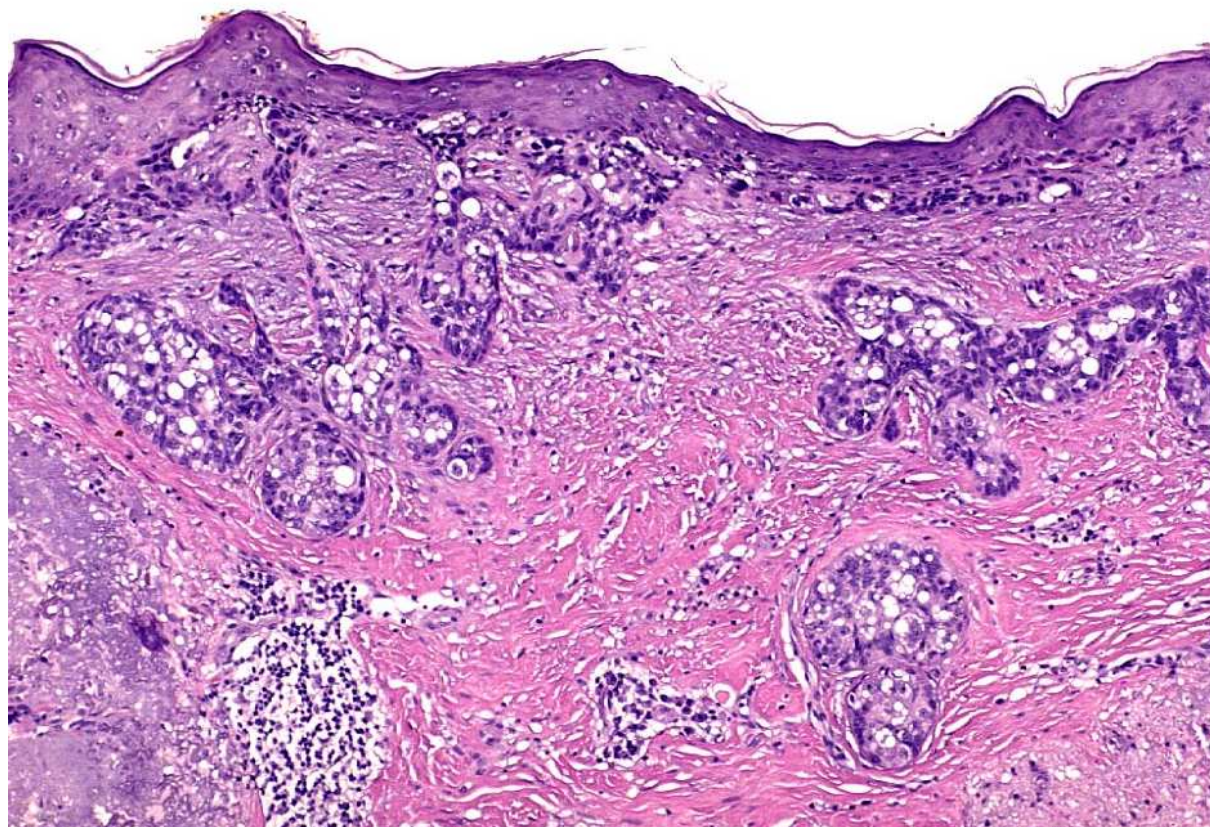


Abbildung 5: Talgdrüsenkarzinom

I.1.1.2.6.3. Therapie

Als primäre kurative Maßnahme gilt eine möglichst großzügige Exzision des Tumors.

Bei einem periorbitalen Befall wird eine Exenteratio orbitae (sprich Ausschälung der Orbita) durchgeführt.

Bei einem extraokulären Befund wird eine Exzision mit einem Sicherheitsabstand von 5-6 mm empfohlen. Dieses Verfahren ist noch nicht ganz optimal, denn bei 1/3 der Fälle kommt es zu einem lokalen Rezidiv.

Bei auffälligen regionalen Lymphknoten ist eine Lymphadenektomie in kurativem Sinne notwendig.

Bei nicht operablen Befunden wird eine Radio- und Chemotherapie als eine palliative Maßnahme durchgeführt.

I.1.2. DNA-Zytometrie

I.1.2.1. Bisherige Untersuchungsmethoden

Die bisherige Diagnostik der Talgdrüsentumoren orientiert sich an die makroskopischen und histopathologischen Untersuchungen. Außer den histologischen Standardmethoden z.B. die HE-Färbung existieren noch andere histochemische Spezialtechniken zur Darstellung von Talgdrüsentumorzellen.

Dazu gehören Oil-Red-O- und Sudanschwarz-Färbungen, die gezielt die Tumorzellen talgdrüsiger Differenzierung zum Vorschein bringen.

Dabei ist eine klare Abgrenzung der Borderline-Tumoren, die im weiteren Verlauf entarten können, von den malignen Neoplasien nicht immer sicher festzustellen und bereitet für den beurteilenden Arzt immer wieder Schwierigkeiten. Zu den sogenannten Borderline-Tumoren zählen v.a. die atypischen Adenome.

Außerdem sind Malignitätskriterien wie z.B. große pleomorphe Zellen, prominente Nukleoli, schaumiges bzw. vakuolenreiches Zytoplasma, Asymmetrie des Tumors, Ulzeration für die Diagnose von Talgdrüsenkarzinomen immer wieder unter den Fachhistopathologen umstritten.

I.1.2.2. DNA-Zytometrie

I.1.2.2.1. Indikation

Zellen mit gestörtem Zellzyklus weisen charakteristischerweise Veränderungen in ihrem Genom, z.B. chromosomale numerische oder strukturelle Abweichungen, auf (12,41,48,56). Diese Art von chromosomalen Veränderungen wird als Aneuploidie bezeichnet. Sie tritt in Organismen mit normalen, vollständigen, euploiden Chromosomensätzen v.a. bei (meist malignen) Tumoren auf (15). Die Methode der DNA-Zytometrie basiert auf Bestimmung der Aneuploidie in verschiedenen Tumoren. Dabei gilt die DNA-Aneuploidie als Marker für neoplastische Zellen (87,99). Außerdem kann im Rahmen der DNA-Zytometrie anhand der Veränderungen am DNA-Gehalt eine zytogenetische Tumorprogression bestimmt werden (3,19,20,40,100).

2001 ist auf dem "International Consensus on the Fight against Cervical Cancer" beschlossen worden, die DNA-Zytometrie als eine zuverlässige Methode für die Identifizierung von malignen Zellen in Plattenepithelneoplasien anzuerkennen (48).

I.1.2.2.2. Biologische Grundlagen

Die Grundlage der DNA-Zytometriediagnostik beruht auf numerischen bzw. strukturellen Chromosomenaberrationen, welche einer zytometrischen Aberration bzw. einer Aneuploidie gleichzusetzen sind.

Es werden folgende Aberrationsgrade unterschieden:

- 1) *primäre* chromosomale Aberration. Bei dieser Form handelt sich um die balancierte Translokationen oder um minimale Verluste bzw. Gewinne des Chromosomenmaterials, welche durch die DNA-Zytometrie nicht erkennbar sind.
- 2) *sekundäre* chromosomale Aberration. Sie betrifft nur für den zu untersuchenden Tumor spezifische Chromosomen und ist durch DNA-Zytometrie gut zu ermitteln.
- 3) *tertiäre* chromosomale Aberration. Sie erscheint als Veränderung des tumorunspezifischen Chromosomenmaterials beim Fortschreiten der Neoplasie und stellt eine schlechte Prognose für den Patienten dar (20).

Der DNA-Gehalt wird nicht direkt mit der DNA-Zytometrie gemessen. Hierfür werden die Zellkerne mit der Feulgen-Färbung angefärbt. Dadurch wird der Faktor IOD, Integrated Optical Density, zum zytometrischen Äquivalent für den DNA-Gehalt. Der DNA-Gehalt wird mit Hilfe einer c-Skala gemessen. Dabei ist "1c" gleich der Hälfte des DNA-Gehaltes eines normalen diploiden Chromosomensatzes in einer G_{0/1}- Zellzyklusphase (48).

Bei der Interpretation von DNA-Histogrammen müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die den DNA-Gehalt evtl. verändern können. Das sind z.B. eine euploide Polyploidisierung, d.h. Verdoppelung des normalen Chromosomensatzes, z.B. kurz vor der Mitose in der G₂-Phase und nicht-neoplastische Polyploidisierung wie virale Infektion des Gewebes durch z.B. HPV, CMV, HSV, Therapie mit Zytostatika, Radiatio, Vit B12-Mangel.

Die Malignität eines Tumors wird in der DNA-Zytometrie letztendlich anhand folgender Kriterien festgelegt:

- 1) Anzahl der aneuploiden DNA-Stammlinien, wobei eine DNA-Stammlinie die Fraktion der proliferierenden Zellpopulation in der G_{0/1}- Zellzyklusphase beschreibt;
- 2) Polyploidisierung der euploiden oder aneuploiden Stammlinien;
- 3) Vorkommen von Ausreißerzellen mit enorm hohem DNA-Gehalt bedingt v.a. durch Genomveränderungen(47).

I.1.2.2.3. Material und Methoden

I.1.2.2.3.1. Untersuchungsgut

Als Untersuchungsmaterial können alle zytologischen Präparate sowie formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet werden.

Als allgemeine Ausgangsregel für das Anfärben nach Feulgen gilt eine Andauung von Gewebe mit 1% Pepsin für 30 min bei 37°C und seine Fixierung mit 10%-igem Formalin (47).

I.1.2.2.3.2. DNA-Färbung

Die Feulgen-Reaktion ist seit ihrer Einführung von Feulgen und Rossenbeck 1924 eine der meistbenutzten quantitativen Nachweismethoden von DNA in der Zyto- und Histochemie (38). Sie beruht auf einer zweistufigen Reaktion, bei der im ersten Schritt im DNA-Molekül Aldehydgruppen durch Spaltung der Purinbasen Adenin und Guanin mit Hilfe einer Säure dargestellt werden. Im zweiten Schritt werden die Aldehydgruppen mit Schiff'schem-Reagenz (Pararosanilin = violett und Thionin = blau) durch eine Färbereaktion nachgewiesen. Die Bindung des Farbstoffes ist sehr stabil und kann nicht mehr von der DNA gelöst werden (92).

I.1.2.2.3.3. Messverfahren

Die Messung der optischen Dichte der nach Feulgen gefärbten Zellkerne erfolgt am Monitor eines PC-Fernsehbildanalyse-systems, welches mit einem konventionellen Mikroskop verbunden ist. Das Mikroskop ist mit einer TV-Farbkamera samt Interferenzfilter für Blau (Thionin, z.B. 590+ -10nm) und Violett (Pararosanilin, z.B. 560 +-10nm) ausgestattet.

Nach interner Kalibrierung mit Referenzzellen, in unserem Fall mit Fibroblasten, werden am PC 30 Analyse-/Tumor- und 30 Referenzzellkerne innerhalb einer Zellpopulation markiert und deren optische Dichte gemessen.

Anschließend wird gezielt nach einzelnen Tumorzellen mit auffallend hyperchromatischen Kernen gesucht und durch Anklicken dieser Zellen mit einer Maus auf dem Monitor automatisch gemessen (22).

Die Messungen erfolgen nach Richtlinien der European Society for Analytical Cellular Pathology (48).

Der Variationskoeffizient der DNA-Gehalte der Referenzzellen soll weniger als drei Prozent betragen.

I.1.2.2.4. Diagnostische Interpretation

Die Befundung der DNA-Histogramme zum Zweck der Identifizierung obligater Präkanzerosen bzw. der Frühdiagnose von Malignomen erfolgt qualitativ in die Kategorien DNA-diploid, DNA-aneuploid und DNA-polyploid anhand der unten aufgeführten Begriffe.

DNA-Histogramm	Häufigkeitsverteilung der integrierten optischen Dichte spezifisch mit Feulgen-Reaktion gefärbter Zellkerne in der Einheit "c" ("c" = einfacher Chromosomensatz)
Modalwert, MV	Häufigster Wert (Gipfel) eines DNA-Histogramms
DNA-Stammlinie	G _{0/1} - Phase-Fraktion des DNA-Histogramms einer proliferierenden Zellpopulation
DNA-Euploidie	DNA-Verteilung wie bei einer normalen Zellpopulation
DNA-Diploidie	Stammlinie, STL > 1,80c < 2,20c; euploide DNA-Verteilung mit zweifachem Chromosomensatz
DNA-Polyploidie	Vorkommen von DNA-Stammlinien in den Verdoppelungsregionen a) euploider Stammlinien b) aneuploider Stammlinien
DNA-Aneuploidie	STL < 1,80c > 2,20c oder < 3,60c > 4,40c und/oder Werte > 9c; DNA-Verteilung statistisch signifikant different von euploiden
Exceeding events	Einzelne ausgefallene DNA-Werte > 5c oder >9c (96)

Die Aneuploidie wird durch zwei Kriterien bestimmt:

- a) Abweichung von der Stammlinie (<1,8c>2,2c; <3,6c>4,4c), die ein G_{0/1}-Phase-Häufigkeitsmaximum der Analyse- und Referenzzellen bedeutet (1c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes).
- b) Nachweis von abnorm hohen Einzelzell-DNA-Werten (5c and 9c exceeding events).

Beim Deuten der Aneuploidie in einem DNA-Histogramm ist es wichtig, einige physiologische, z.B. euploide Polyploidie und pathophysiologische Faktoren, z.B. virale Infektionen wie durch Humane-Papilloma-Viren (HPV), Cytomegalie-Virus (CMV), Humane-Herpes-Viren (HHV), Vit B12-Mangel usw., zu berücksichtigen.

Zusätzlich kann die Bestimmung des 2[c]-Deviation-Index (2cDI) für die DNA-Zytometrieinterpretation hilfreich sein. Denn dieser Wert zeigt eine Schwankung der DNA-

Gehalte um den normalen 2[c]-Wert und trägt zur Identifizierung von Chromosomenanomalien in der Zytogenetik bei (13).

I.2 Ziel- und Fragestellung

- 1) Wie ergänzt die DNA-Zytometrie der Talgdrüsentumoren die konventionelle Diagnostik?
- 2) Wie zuverlässig können die Talgdrüsenkarzinome von den gutartigen Talgdrüsentumoren mittels DNA-Zytometrie auseinandergehalten werden?
- 3) Prognostische Validität der DNA-Bild-Zytometrie bei Borderline-Talgdrüsentumoren (wie z.B. Talgdrüsenadenome bzw. Sebazeome)
- 4) Stimmen die DNA-Zytometrischen Ergebnisse mit den histologischen Befunden überein?
- 5) Wie hoch ist der 2c-Deviation-Index-Schwellenwert für benigne bzw. maligne Talgdrüsentumore?

II. Material und Methode

II.1 Präparatgut

II.1.1. Auswahl der Präparate

Die Präparate der benignen Talgdrüsentumoren für unsere Untersuchungen stammen zum größten Teil aus dem histopathologischen Archiv der Hautklinik Hannover.

Alle Karzinom- und teilweise auch Borderlinepräparate wurden uns freundlicherweise von dem Archiv des Einsenderlabors der dermatopathologischen Gemeinschaftspraxis Friedrichshafen von Dr. med. Hügel, Dr. med. Kutzner, Dr. med. Rütten, Dr. med. Hantschke und PD Dr. med. Mentzel und der dermatopathologischen Praxis Heidelberg von Dr. med. Krahl zur Verfügung gestellt.

II.1.2. Anzahl der Präparate

Die Gesamtzahl der untersuchten Präparate beträgt insgesamt 105 Fälle. Davon sind 80 benigne Talgdrüsentumoren, 11 Borderlinetumoren und 14 Karzinome, die von zwei erfahrenen Dermatohistopathologen der Hautklinik Linden in Hannover unabhängig voneinander diagnostiziert wurden. Die Diagnostik erfolgte mit Hilfe der Einstufung nach Wick und Swanson (113) sowie Elder et al (34).

Die 80 benignen Tumoren bestehen aus 32 Talgdrüsenhyperplasien, 21 Naevi sebacei, 15 Adenomen und 12 Sebazeomen.

II.1.3. Kontrollpräparate

Als Kontrollpräparate bezüglich der Färbungsintensität, sprich IOD=image optical density, der jeweiligen Färbungssitzung von ca. 12 Tumorpräparaten verwendeten wir die Gewebsschnitte der normalen Rattenleber.

Die Rattenleberpräparate wurden zusammen mit den Tumorpräparaten gefärbt und anschließend DNA-Zytometrisch gemessen.

II.2. Technische Ausstattung

II.2.1. Technische Ausstattung im histologischen Labor

Die Vorbereitung von Zellvereinzlungspräparaten für die DNA-Zytometrische Diagnostik wurde mit Hilfe folgender Geräte durchgeführt:

- 1) Die Entparaffinierung von histologischen HE-Schnitten (Hämatoxylin-Eosin-Schnitt) mit Färbeautomat Citadel 2000 von Shandon
- 2) Brutschränke von Memmert
- 3) Zentrifuge Hettich von Rotanda/RP
- 4) Zytozentrifuge Cytospin 3 von Shandon
- 5) Eindecken von Präparaten mit Eindeckapparat Consul von Shandon.

II.2.2. Technische Ausstattung für die digitale DNA-Zytometrische Diagnostik

Die DNA-Zytometrische Diagnostik wurde mit Hilfe folgender Gerätschaften durchgeführt:

- 1) Mikroskop BH-2 von Olympus
- 2) An das Mikroskop und den Computer angeschlossene Farbkamera 1/2“ 3-CCD-Chips, Typ MC-3249 von AVT-Horn
- 3) Ein automatisch beweglicher Objektisch Clean Damper Model D4CI-5.0 Vextra von Oriental Motor Co. LTD
- 4) PC Pentium 586/166
- 5) Betriebssystem Windows NT 4.0
- 6) Bildanalyzesystem Image DNA AutoCyte Quic-Immuno, Quic-DNA von AutoCyte Inc. Copyright © 1995-1999

II.3. Praktisches Vorgehen bei der Vorbereitung von Zellvereinzelnung

II.3.1. Festlegung eines für die Untersuchung geeigneten Gewebsareals, (nach Richtlinien der ESACP (European Society for Analytical Cellular Pathology) (3)(5), (1.Tag)

Für die Festlegung eines für die Untersuchung geeigneten Gewebsareals werden ein Paraffinblock eines Tumorpräparates und ein dazugehöriger HE-Schnitt (Hämatoxylin-Eosin-Schnitt) verwendet.

Auf dem HE-Schnitt wird unter dem Mikroskop eine für die Zellkernextraktion geeignete Tumorzellregion mit einem wasserfesten Filzstift markiert.

Für die DNA-Zytometrische Diagnostik werden maximal 12 Präparate in einer Sitzung vorbereitet.

II.3.2. Automatische Rehydratation (1.Tag)

Die markierte Stelle wird genau auf den Paraffinblock übertragen und vorsichtig mit einem Skalpell etwa 0.5 mm tief eingeritzt.

Danach gewinnt man etwa 2-3 Gewebsschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms mit eingestellter Schneidedicke von 100 µm. Das eingeritzte Areal wird von dem Rest abgetrennt und in ein ca. 2 x 1,5 cm großes feinmaschiges Netzbeutelchen aus Nylongaze mit Maschenbreite von 70 µm hineingebracht. Die Nylongaze wird ganz verschlossen und in einer Biopsiekassette hineingelegt, mit der Präparatnummer versehen und in eine Entwässerungsmaschine zum Entparaffinieren für ca. 24 h hineingebracht.

In einem Vorgang werden maximal 12 Biopsiekassetten bearbeitet.

Die Gewebsschnitte laufen im Rahmen einer Rehydrierung folgende Lösungen in unten stehender Reihenfolge durch:

Tabelle 1: Rehydrierung

KÜVETTE	LÖSUNG	ZEIT
1	Xylol	30 min
2	Xylol	30 min
3	100%-iger Alkohol	30 min
4	96%-iger Alkohol	30 min
5	70%-iger Alkohol	30 min
6	Aqua bidest.	30 min
7	Aqua bidest.	30 min

Die Kassetten können dann anschließend über die Nacht in bidestilliertem Wasser stehenbleiben.

II.3.3. Enzymatische Zellvereinzlung (2.Tag)

Zum Durchführen einer enzymatischen Zellseparation hat sich anhand der Vorstudien des Institutes für Pathologie der Technischen Hochschule Aachen (15) das Enzym Pepsin bewährt.

Die Zellkernvereinzlung erfolgt durch die Denaturierung zytoplasmatischer Proteine mittels Pepsin.

Zuerst Ansetzen einer Porcin-Pepsin-Lösung:

Es werden 7 ml 1 N HCl mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Pro Zentrifugenröhrchen werden 25 mg Porcin-Pepsin (Pepsin porcine 17,2 mA/mg von Fa. Serva) abgewogen und mit jeweils 5 ml verdünnter HCl-Lösung (s.o.) aufgelöst. Die gesamte Menge des aufgelösten Porcin-Pepsins für max. 12 Zentrifugeröhrchen: (Anzahl der Röhrchen x 25 mg Pepsin porcine) + (Anzahl der Röhrchen x 5 ml verdünnter HCl) kommt in ein großes Reagenzglas und wird auf einem Rüttler bei 150 U/min (U/min=Umdrehung pro Minute) in einen Brutschrank bei 37°C für etwa 30-45 min gestellt.

Anschließend werden jeweils 5 ml fertiger Porcin-Pepsin-Lösung auf max. 12 Zentrifugenröhrchen verteilt.

Danach werden die Biopsiekassetten aus dem Entwässerungsautomat herausgenommen und geöffnet. Die darin enthaltenen Nylongazebeutelchen werden in die Zentrifugenröhrchen mit abgefüllter HCl-Porcin-Pepsin-Lösung überführt und wieder mit der entsprechenden Präparatnummer versehen.

Diese Zentrifugenröhrchen werden wieder auf den Rüttler bei 100 U/min in den Brutschrank bei 37°C für 1 Stunde gestellt.

Tabelle 2: Enzymatische Zellvereinzelung

Schritt	Menge	Substanz	Vorgang	Temp.	Zeit
1	1) 7 ml	1) 1 N HCl 2) aqua dest.	7 ml 1N HCl mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen		
2	1) 25 mg/ Röhrchen 2) jeweils 5 ml	1) Porcin- Pepsin 2) verdünnte HCl (s. Schritt 1)	25 mg pro Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml verdünnter HCl in einem großen Reagenzglas (für max. 12 Röhrchen) auflösen und auf Rüttler bei 150 U/min in einen Brutschrank stellen	37 °C	30-45 min
3	jeweils 5 ml	Fertige Porcin- Pepsin- Lösung (s. Schritt 2)	Jeweils 5 ml fertige Porcin-Pepsin-Lösung auf max. 12 Zentrifugenröhrchen verteilen		
4			Nylongazebeutelchen aus den Biopsiekassetten in je eine Zentrifugenröhrchen mit abgefüllter fertiger HCl-Porcin-Pepsin-Lösung verteilen (s. Schritt 3), mit jeweiliger Präparatnummer versehen und auf Rüttler bei 100 U /min in den Brutschrank stellen	37 °C	60 min

II.3.4. Mechanische Zellvereinzelung (2.Tag)

Durch die mechanische Zellvereinzelung werden die Verbindungen zwischen den Zytoplasma- und Zellkernbestandteilen endgültig gelöst und es treten durch das Netz von Nylongazesäckchen mit Maschenbreite von 70 µm nur die Zellkerne aus.

II.3.4.1. Zytozentrifugieren

In jedes unserer Zentrifugenröhrchen mit Nylongazesäckchen werden jeweils 5 ml PBS-Pufferlösung zu den vorhandenen 5 ml HCl-Porcin-Pepsin-Lösung abpipettiert. Die Röhrchen werden anschließend bei 1520 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Im zweiten Schritt werden die Nylongazesäckchen mit der Pinzette aus den Röhrchen entnommen und verworfen. Die Röhrchen werden noch mal 10 Minuten mit 1520 U/min Drehgeschwindigkeit zentrifugiert. Im Röhrchen setzen sich die Zellkerne auf dem Boden ab, so dass sich eine flüssige und eine sehr schmale feste Phase bildet.

Die flüssige Phase wird vorsichtig bis auf ca. 1 ml mit einer Einwegglaspipette entfernt und verworfen.

Im letzten Schritt werden die restliche flüssige Phase mit dem Sediment durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 1000 µl-Meßpipette mit Einwegplastikspitzen miteinander vermischt. Die entstandene Zellkernsuspension kommt anschließend in einen so genannten Zytoklip (cytoclip®) mit von einer Seite eingerastetem Objektträger und von anderer Seite angebrachtem Zytotrichter (cytofunnel®) mit einer runden etwa 5 mm im Durchmesser großen Öffnung von innen. Zwischen dem Objektträger und dem Zytotrichter befindet sich ein angepasstes Kammerfilterkärtchen. Der Zytoklip mit dem Inhalt wird in die Zytozentrifuge eingebracht und bei 1500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Während des Zentrifugiervorgangs werden die Zytotrichter senkrecht gekippt, so dass die Zellkerne aufgrund der Zentrifugalkraft gleichmäßig auf die klardefinierte Kreisfläche eines Objektträgers mit Durchmesser von ca. 5 mm verteilt werden und die Flüssigkeit von dem Filterkärtchen absorbiert wird.

Die beschichteten Objektträger mit den Präparatnummern werden aus den Zytoklips herausgenommen und zum Trocknen über Nacht in die Präparatmappe hineingelegt.

Tabelle 3: Mechanische Zellvereinzelung

Schritt	Substanz	Vorgang	Umdrehung	Zeit
1	5 ml PBS-Puffer	Jeweils 5 ml PBS-Pufferlösung zu den 5 ml HCL-Porcin-Pepsin-Lösung in jedes Zentrifugenröhrchen abpipettieren, anschließend zentrifugieren	1520 U/min	10 min
2		Nylongazesäckchen aus dem Röhrchen entfernen und wiederholt zentrifugieren	1520 U/min	10 min
3		Es bildet sich eine weiße feste Phase auf dem Boden eines Zentrifugenröhrchens. Die flüssige Phase darüber wird bis auf ca. 1 ml reduziert		
4		Die feste Phase wird mit der übriggebliebenen flüssigen Phase durchmischt, jeweils in einen Zytoklip mit einem Objektträger abgefüllt und in einer Zytozentrifuge zentrifugiert	1500 U/min	10 min
5		Objektträger aus jeweiligem Zytoklip herausnehmen und über Nacht trocknen lassen		

II.4. „Feulgen-Färbung“ nach Richtlinien der ESACP (European Society for Analytical Cellular Pathology) (3)(5),(3.Tag)

Nach der Durchführung der Zellvereinzelnung wird am nächsten Tag die „Feulgen-Färbung“ unserer Präparate durchgeführt. Die „Feulgen-Färbung“ der Zellkerne erlaubt eine digitale DNA-Zytometrische Farbintensitätsmessung.

Die „Feulgen-Färbung“ beruht auf einer zweistufigen Reaktion, bei der im ersten Schritt die Aldehydgruppen des DNS-Moleküls dargestellt werden, die im zweiten Schritt durch das Schiff'sche Reagenz sichtbar gemacht werden.

Die Darstellung der Aldehydgruppen erfolgt durch das Verbringen des zytologischen oder fixierten histologischen Präparates in einer Säure und Spaltung der Purinbasen Adenin und Guanin vom DNS-Molekül. An deren ehemaligen Bindungsstellen werden die Aldehydgruppen dargestellt, an welche sich der Farbstoff aus dem Schiff'schen Reagenz bindet. Diese Bindung ist sehr stabil und lässt sich von der DNS nicht mehr lösen.

Unsere Objektträger mit den Zellkernen von Talgdrüsentumoren werden zusammen mit einem HE-Präparat einer Rattenleber gefärbt. Die Rattenleber dient zur Farbintensitätskontrolle.

In folgendem Schema werden die einzelnen Färbeschritte genau aufgelistet:

Tabelle 4: Feulgen-Färbung

„Feulgen-Färbung“			
Küvette	Lösung	Zeit	Vermerk
1	10% gepuffertes Formalin	50 min	Mehrmals verwendbar
2	Aqua dest.	10 min	
3	Aqua dest.	5 min	
4	5N HCl	60 min	In Brutschrank bei 25°C
5	Aqua dest.	2 min	
6	Aqua dest.	2 min	
7	Aqua dest.	2 min	
8	Schiff'sches Reagenz	60 min	In Brutschrank bei 25°C; mehrmals verwendbar
9	SO ₂ -Wasser	5 min	Einmalig verwendbar
10	SO ₂ -Wasser	5 min	Einmalig verwendbar
11	SO ₂ -Wasser	5 min	Einmalig verwendbar
12	Aqua dest.	1 min	
13	Aqua dest.	1 min	
14	70% Alkohol	3 min	
15	96% Alkohol	3 min	
16	100% Alkohol	3 min	
17	Xylol	10 min	Kann auch länger darin bis zum Eindecken bleiben

Je nach Ausgangsmaterial kann die Färbung mit dem Schritt 1 bzw. Schritt 4 gestartet werden.

Nach Papanicolaou, Giemsa bzw. Hämatoxylin-Eosin vorgefärbte Präparate sollten mit Schritt 1 in den gesamten Färbeprozess eingeleitet werden, um die eventuell noch vorhandenen Paraffin- bzw. Deckmediumsreste zu entfernen.

Alle unfixierten, formalinfixierten und paraffineingebetteten Präparate werden ab dem Schritt 4 verarbeitet.

Es sollte darauf geachtet werden, dass keine Spülreste in den Küvetten verbleiben, um eine Beeinträchtigung des Färbeprozesses zu verhindern.

Formalin-Lösung und Schiff'sches Reagenz können mehrmals (bis max. 5-mal) verwendet werden, dagegen sollen HCl und SO₂-Wasser nach jedem Vorgang verworfen werden.

Fertige Präparate können nach jeweiligem Färbeprozess für mehrere Tage in Xylol verbleiben und anschließend mit Cargille-Oil eingedeckt werden.

II.5. DNA-Zytometrische Untersuchung

II.5.1. Untersuchungsmaterial

Für die DNA-Zytometrische Untersuchung wurden 102 nach Feulgen gefärbte Zellvereinzelungspräparate angefertigt. Zusätzlich waren von jedem zu untersuchendem Talgdrüsentumor histologische HE-Schnittpräparate vorhanden, anhand welcher die Eingangsdiagnose festgelegt wurde.

II.5.2. Untersuchungsmethode

II.5.2.1.DNA-Messung

Die DNA-Zytometrischen Untersuchungen der Feulgen-gefärbten Zellvereinzelungspräparate erfolgten an einem interaktiven TV-Bildanalysesystem für DNA-Messungen, bestehend aus einem Olympus BH-2 Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung (numerische Blende von 0,7) unter Verwendung einer Kondensorblende von 0,3, einer AVT-Horn 3-CCD-Chip Farbvideokamera, einem automatisch beweglichen Objektisch Clean Damper Model D4CI-5.0 Vextra von Oriental Motor Co. LTD und AutoCyte QUIC-DNA Software (AutoCyte, Elon College, NC, U.S.A.) (19,107).

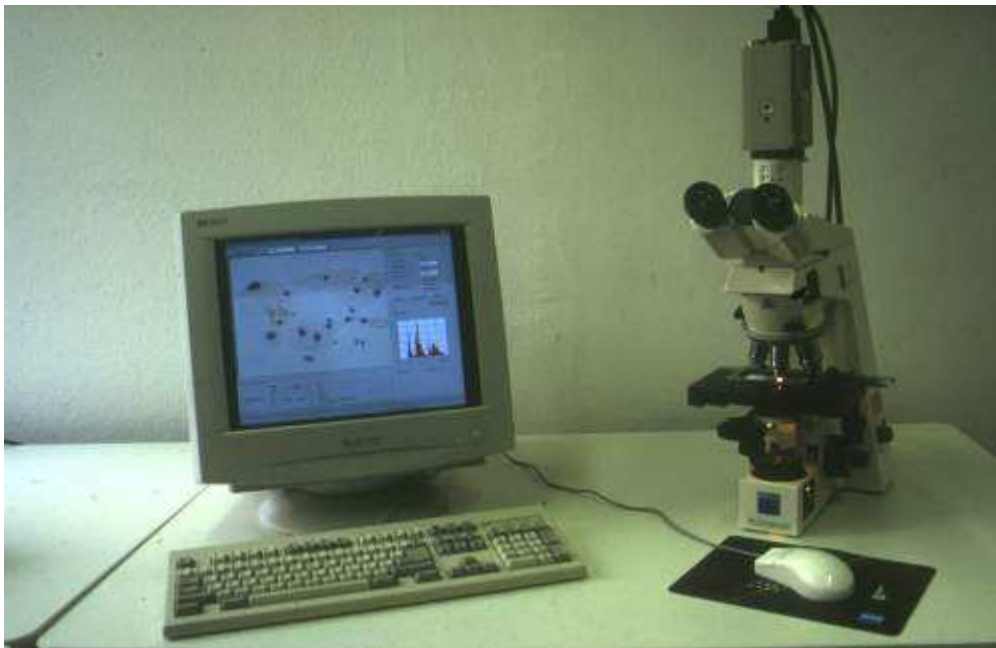


Abbildung 6: TV-Bildanalysesystem AutoCyte QUIC-DNA (7).

Folgende technische Voraussetzungen sollen vor jedem Starten des Bildanalyse-Systems erfüllt werden:

- 1) Verwendung von verschiedenen Interferenzfiltern für Blau (Thionin, z. B. 590 ± 10 nm) oder Rot (Pararosanilin aus Schiff'schem Reagenz, z.B. 560 ± 10 nm)
- 2) Anwendung von Köhler-Illumination
- 3) Analoge und digitale Abstimmung
- 4) Gewährleistung von Stabilität während des Messganges
- 5) Überprüfung von densitometrischer Linearität, z. B. durch Verwendung von neutralen Gläsern definierter Durchlassquoten
- 6) Kontrolle der Shadingphänomene
- 7) Kontrolle der Streulichtphänomene (Glarephänomene)
- 8) Kontrolle der Fraktionsmöglichkeiten

Zusätzlich sollten folgende Kriterien der densitometrischen Messung beachtet werden:

- 1) Messung von Kernen nur im Fokus
- 2) Kontrolle der Zellkernbildgalerie nach jedem Messvorgang
- 3) Keine Veränderung des Systems während der Messung (insbesondere Köhler-Illumination, analoge und digitale Justierung)
- 4) Shadingkorrektur in Softwareeinstellungen
- 5) Korrektur von lokalem Hintergrund pro Zellkern in Softwareeinstellungen
- 6) Korrektur des Streulichtes (glare) in Softwareeinstellungen
- 7) Korrektur von Fraktionsfehlern in Softwareeinstellungen
- 8) Visuelle Kontrolle der Zellkernbildgalerie während/nach der Messung
- 9) Kontrolle der Linearität der IOD-Werte, z. B. mit Hilfe von Hepatozytenpräparaten aus Rattenleber
- 10) Vermeidung von Kernaussbleichung unter der Mikroskopbeleuchtung
- 11) Bildabspeicherung von gemessenen Zellkernen in einer Bildgalerie zur Qualitätskontrolle
- 12) Entfernung von überlagerten, autolytischen, nekrotischen oder fragmentierten Zellkernen (8,21,28,32,33,42,64,67,75,85)

Messungen erfolgten zweimal an jedem Präparat.

Zuerst wurden mindestens 300 Tumorzellkerne nach Zufallskriterien gemessen. Anschließend wurde der ganze Objektträger nach hyperchromatischen Tumorkernen durchsucht. Auffällige Kerne wurden markiert, ausgemessen und bei pathologisch erhöhtem DNA-Gehalt über der 5

[c]-Marke dazugezählt (1c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes). Die Messung erfolgte automatisch nach Markierung relevanter Zellkerne mit einer Maus auf dem Monitor.

Als Referenzzellen wurden ca. 30 interne, morphologisch unauffällige diploide Fibroblastenkerne gemessen (22). Ihr DNA-Gehalt diente zum Festlegen der 2[c]-Marke (Normwert für den diploiden Chromosomensatz). Der Variationskoeffizient (CV, *coefficient of variation*=*Standardabweichung* der IOD-Werte der G0/1-Referenzzellen / *Mittelwert* der IOD-Werte der G0/1-Referenzzellen * 100) der DNA-Gehalte der jeweiligen Referenzzellpopulation sollte weniger als 5% betragen (19,21,46,77,104).

Zum Schluss wird ein DNA-Histogramm nach folgenden Kriterien interpretiert:

- 1) Diagnose der Neoplasie
- 2) Prognose der Neoplasie
- 3) Therapieplanung (19).

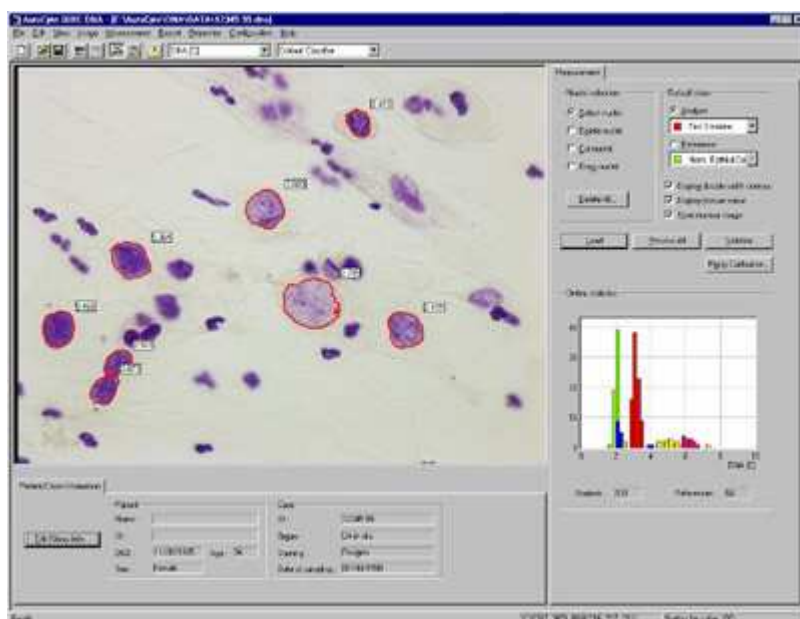


Abbildung 7: Interaktiver Monitor des TV-Bildanalysestystems AutoCyte QUIC-DNA.

Umrandete Zellkerne stellen Analysezellen (Tumorzellen) dar. Rechts unten DNA-Histogramm der Referenz- und Analysezellen (8).

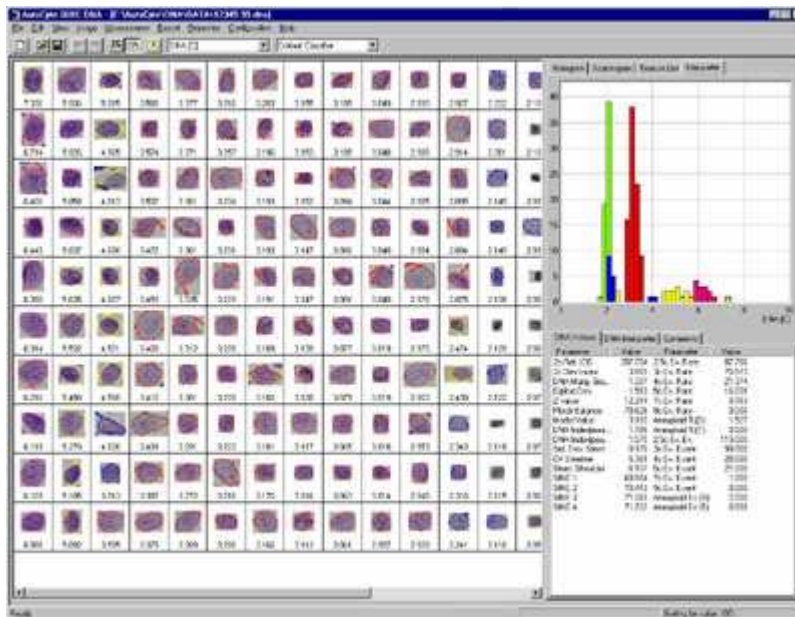


Abbildung 8: Analysezellgalerie nach abgeschlossener DNA-Zytometrischer Messung. Rechts oben DNA-Histogramm der Referenz-(blau) und Analysezellen (rot). Rechts unten die ausgemessene Parameter (8).

II.5.2.2. Physikalische Grundlagen und diagnostische Kriterien der DNA-Zytometrie

a) Physikalische Grundlagen

Als physikalische Grundlage der DNA-Bild-Zytometrie dient die Bestimmung des DNA-Gehaltes analog dem Absorptionsgrad von Lichtwellen, z.B. im Falle der Absorptionsphotometrie, mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (74). Dabei beruht die Absorptionsphotometrie auf einem Prinzip, dass die Lichtintensität beim Durchdringen einer Substanz durch diese reduziert wird.

Gleichung 1: Lambert-Beersches Gesetz

$$E\lambda = \epsilon\lambda c d$$

Die Absorption $E\lambda$ ist eine dimensionslose physikalische Messgröße, die bei konstanter Wellenlänge λ und Schichtdicke d direkt proportional zur Färbekonzentration c ist.

Werden nur relative Werte gemessen, so kann der molare Absorptionskoeffizient $\epsilon\lambda$ als Proportionalitätsfaktor durch eine konstante Größe, z. B. "1" ersetzt werden. Sofern der molare Absorptionskoeffizient $\epsilon\lambda$ (substanzspezifische Konstante bei einer bestimmten Wellenlänge) für eine Substanz bekannt ist, kann die absolute Konzentration derselben unter Verwendung der bekannten Absorptionsgröße $E\lambda$ berechnet werden.

Jeder mit der Videokamera gemessene Zellkern wird in Form eines digitalisierten Bildes an den Computer übermittelt. Hierbei ist ein Bildschirmbild aus einzelnen kleinen Bildpunkten, Pixel, zusammengesetzt. Die optische Auflösung eines solchen Bildes wird in Anzahl der

sogenannten Pixel pro μm^2 Bildfläche gemessen. Jedem Pixel wird eine entsprechende optische Dichte bzw. Graustufe zugeteilt und anschließend für den ganzen Zellkern summiert. Zur Berechnung der optischen Dichte wird das Lambert-Beersche Gesetz, welches die stöchiometrische Farbintensität zur Transmission des Lichtes ins Verhältnis setzt, angewendet (52).

b) Diagnostische Kriterien

Der ermittelte Wert der integrierten optischen Dichte (IOD) ist proportional zum jeweiligen DNA-Gehalt. IOD dient außerdem als Ausgangswert für weitere Parameter, wie z.B. DNA-Index (39).

Der DNA-Index (DI), auch bekannt als "stemline quotient" (54), bezeichnet das Verhältnis des Modal- bzw. Mittelwertes des relativen DNA-Gehaltes der G_{0/1}-Analysezellen zum Modal- bzw. Mittelwert des DNA-Gehaltes der diploiden G_{0/1}-Referenzzellen.

Zellen mit einem regelrechten diploiden Karyotyp (zweifacher Chromosomensatz) weisen einen DNA-Index von 1,0, Zellen mit DNA-Gehalt gleich 5c (fünffacher Chromosomensatz) einen DNA-Index von 2,5 auf. Beim Auftreten von mindestens zwei separaten G_{0/1}-Spitzen wird von einer DNA-Aneuploidie gesprochen (39,53).

Allgemein werden die DNA-Histogramme entweder als DNA-diploid, DNA-polyloid oder DNA-aneuploid befundet.

Tabelle 5: Diagnostische Beurteilung von DNA-Histogrammen

Typ	Zytometrische Definition
Diploid	STL > 1,80c < 2,20c
Polyloid	STL > 1,80c < 2,20c und > 3,60c < 4,40c
Aneuploid	STL < 1,80c > 2,20c oder < 3,60c > 4,40c und/oder Werte > 9c

STL = DNA-Stammlinie

1c = DNA-Gehalt eines einfachen Chromosomensatzes (22)

Eine Feststellung von DNA-Polyloidie weist am ehesten auf das Vorliegen eines HPV- (Humanes-Papilloma-Virus-)Infektes (22,35).

DNA-Aneuploidie wurde nach in der Tabelle 5 aufgeführten Kriterien diagnostiziert (17).

Außerdem wurde die DNA-Aneuploidie im Rahmen der Einzelzellinterpretation bei mindestens drei Zellen > 5[c] (=5[c]-exceeding events, 5cEE) gezeigt (17).

Zusätzlich wurde der 2[c]-Abweichungsindex (=2[c] deviation index, 2cDI) von uns ausgemessen. 2cDI bezeichnet eine Varianz von Werten des DNA-Gehaltes um den 2[c]-Wert (= diploider Chromosomensatz) innerhalb eines Falles (13,108).

Gleichung 2: 2c deviation index

$$2cDI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (c_i - 2c)^2$$

c = Menge des Chromosomensatzes

Die statistische Bewertung der 2cDI-Wertdifferenzen zwischen benignen, borderline und malignen Tumoren erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test. Das Signifikanzniveau lag bei $P < 0,05$.

Alle Werte wurden automatisch von der AutoCyte QUIC-DNA Software ausgerechnet (108).

II.5.2.3. Biologische Grundlagen der DNA-Zytometrie

Alle somatischen menschlichen Zellkerne enthalten einen diploiden Chromosomensatz, 2c, d.h. $2 \times 22 + xx$ bzw. xy Chromosomen.

Kurz vor Zellteilung liegt in der G2-Phase des Zellzyklus ein vierfacher Chromosomensatz, 4c vor.

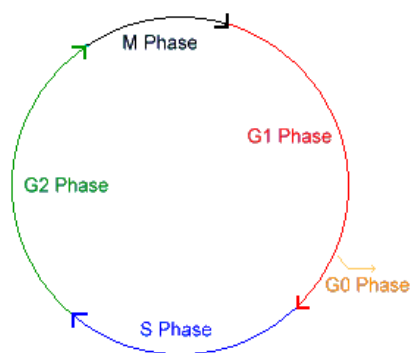


Abbildung 9: Zellzyklus einer somatischen Zelle (aus Roche Lexikon Medizin (4.Aufl.))

1. **G1-Phase:**
Im allgemeinen die längste Phase des Zellzyklus. Dies ist die Zeit in der die Zelle wächst, Stoffwechsel betreibt und in einem vielzelligen Organismus ihre spezielle Funktion ausübt. In der G1-Phase hat die Zelle ihren "normalen" Chromosomensatz, 2c.
2. **S-Phase:**
In der S-Phase werden die chromosomalen DNA-Moleküle repliziert.
3. **G2-Phase:**
Ist eine zweite gap(Ruhe-)Phase, in der die Zelle allerdings bereits auf die Zellteilung ausgerichtet ist. Während der G2-Phase ist die Zelle eigentlich tetraploid, 4c, denn jedes Chromosom (von dem zwei Kopien vorliegen) hat sich repliziert und enthält somit zwei DNA-Moleküle. Am Ende von G2 kondensieren die Chromosomen zu den Metaphasechromosomen.
4. **M-Phase:**
Umfasst den Zeitraum in dem Kern- (Karyokinese) und Zellteilung (Cytokinese) stattfinden. Man unterscheidet zwei Typen von Kernteilung, Mitose und Meiose.

In manchen Geweben kommt es im Rahmen einer euploiden Polyploidisierung zu einer physiologischen Vervielfachung des Chromosomensatzes, z. B. 4c, 8c, 16c, 32c.

Tabelle 6: Gewebe/Zellen mit euploider Polyploidisierung

Endometrium (Hypersekretionsphase)
β-Zellen der Langerhansschen Inseln
Bronchiale Zylinderepithelien
Zervikale Zylinderepithelien
Magenschleimhautepithelien
Herzmuskelgewebe
Hepatozyten
Mesothelien
Schilddrüsenepithelien
Mammaonkozyten
Samenblasenepithelien
Urothelzellen

aus (19)

Folgende Faktoren und einige gutartige Tumoren weisen ebenfalls eine euploide Polyploidisierung auf.

Tabelle 7: Auslöserfaktoren für euploide Polyploidisierung

Physiologisch	Pathologisch
Replikation	Virusinfekte (z. B. HPV, CMV, etc.)
Apoptose	Strahlentherapie
Nekrose	Chemotherapie
Entzündung	Vitamin-B12-Mangel

aus (19)

Numerische oder strukturelle Abweichung von diesen Chromosomensätzen wird Aneuploidie genannt (15) und gilt besonders in der DNA-Zytometrie als Marker für neoplastische Zelltransformation (2,7,9,49,50,59,91,96,114).

Dass die Mehrheit der malignen Tumoren einen aneuploiden DNA-Gehalt aufweist, ist schon lange bekannt (23,88,89,90).

In der DNA-Zytometrie werden in nicht polyploidisierenden Geweben Zellkern-DNA-Gehalte größer als 4c im Prinzip als „aneuploid“ und unter Berücksichtigung des Gesamtmessfehlers größer als 5c bezeichnet (15).

Die absolute Zahl so definierter, aneuploider Zellen über 5c heißt "5c exceeding events" (14). Als Marker für Malignität gilt der Nachweis von mindestens drei Zellkernen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$. Im Prinzip reicht eine aneuploide Zelle aus, um eine maligne Neoplasie zu diagnostizieren (51,96). Es werden aber drei aneuploide Zellen mit DNA-Gehalt $\geq 5c$ als Grenzwert angenommen, um mögliche Methodenfehler zu vermeiden (14).

Bei der klassischen DNA-Zytophotometrie bezieht sich der Begriff Aneuploidie auf den Modalwert, d.h. auf den am häufigsten vorkommenden Wert (= peak) einer Zellpopulation. Ein aneuploider Tumor weist einen Modalwert im aneuploiden Bereich, d.h. außerhalb von $2c \pm 2 \times CV$ (=Variationskoeffizient der Referenzzellen), auf.

II.5.2.4. DNA-Histogramm

Die Ergebnisse einer DNA-Zytometrischen Untersuchung werden in einem DNA-Histogramm erfasst.

Ein DNA-Histogramm zeigt den Ablauf des Zellzyklus, insbesondere die Ausprägung einzelner Zyklusphasen.

Ein euploides DNA-Histogramm geht mit einem Häufigkeitsgipfel im G0/1-Bereich einher.

Aneuploide DNA-Histogramme sind durch multiple Häufigkeitsgipfel, Verschiebungen des Häufigkeitsgipfels in aneuploide Bereiche und erhöhte S-Phase-Fractionen gekennzeichnet und durch Parameter wie DNA-Index, 2c-Deviation-Index und 5cEE ausgedrückt.

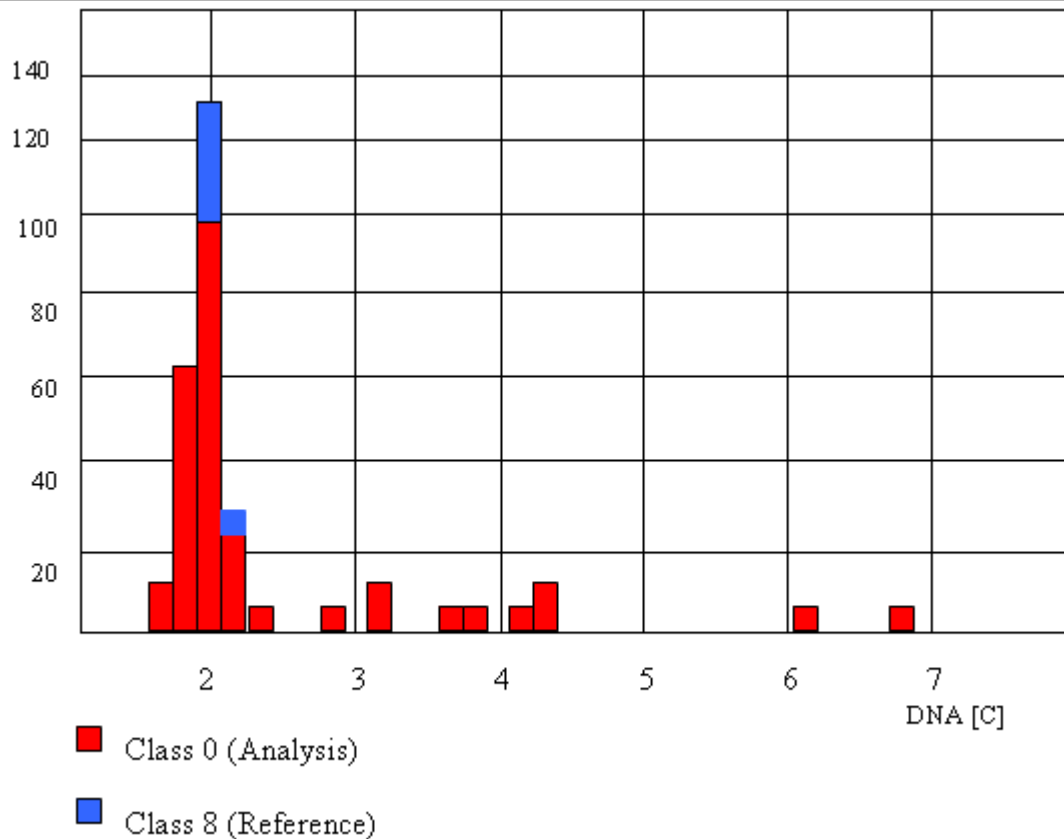
DNA-Zytometrieprotokoll

Die DNA-Zytometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Software Quic-DNA von AutoCyte ausgewertet. Die Ergebnisse wurden dann in folgender Form festgehalten:

Patient/Case Information

Patient ID:		Case ID:
Last Name:		Organ:
First Name:		Staining:
Birth Date:	Sex:	Date of Sampling:

DNA Histogramm



DNA Statistics

Reference Cells

Number
Correction Factor
CV [%]
REM[%]

Basic indices

2c Ref. IOD
2c Dev.Index
DNA Malig.Grade
Diploid Dev.
Z value
Ploidy Balance

Analysis Cells

Number
Min. [c]
Max. [c]

Stemline indices

Modal Value
DNA Index (mean)
DNA Index (peak)
Std. Dev. Steml
CV Stemline
Steml. Shoulder

Absolute indices

2.5c Ex. Ev.
3c Ex. Ev.
4c Ex. Ev.
5c Ex. Ev.
7c Ex. Ev.
9c Ex. Ev.
Aneuploid Ev.(D)
Aneuploid Ev.(T)

Relative indices

2.5c Ex. Ev.
3c Ex. Ev.
4c Ex. Ev.
5c Ex. Ev.
7c Ex. Ev.
9c Ex. Ev.
Aneuploid Ev.(D)
Aneuploid Ev.(T)

SINE indices

SINE 1
SINE 2
SINE 3
SINE 4

II.5.3. Statistische Auswertung

Die im Rahmen der randomisierten Studie ermittelten Werte wurden computertechnisch bearbeitet und analysiert.

Die statistische Auswertung bezog sich auf folgende Tumorgruppen:

- 1) **Benigne Talgdrüsentumoren**
- 2) **Borderline Talgdrüsentumoren**
- 3) **Maligne Talgdrüsentumoren.**

Aufgrund ihrer optimalen Aussagekraft bezüglich der Atypie bzw. Dignität wurden folgende DNA-Zytometrische Parameter statistisch ausgewertet

- 1) **5[c]-Ausreißerzellen (5[c]-Exceeding-Events)**
- 2) **2[c]-Abweichungsindex (2[c]-Deviation-Index)**
- 3) **Modalwert (Modal Value).**

III. Ergebnisse

III.1. Tumortypen

Innerhalb der Studie wurden insgesamt 105 Talgdrüsentumoren untersucht. Das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 87 Jahren mit einem Durchschnitt von 54 Jahren.

Davon waren histologisch 80 Fälle (77%) als benigne, 11 Fälle (10%) als borderline und 14 Fälle (13%) als maligne diagnostiziert worden.

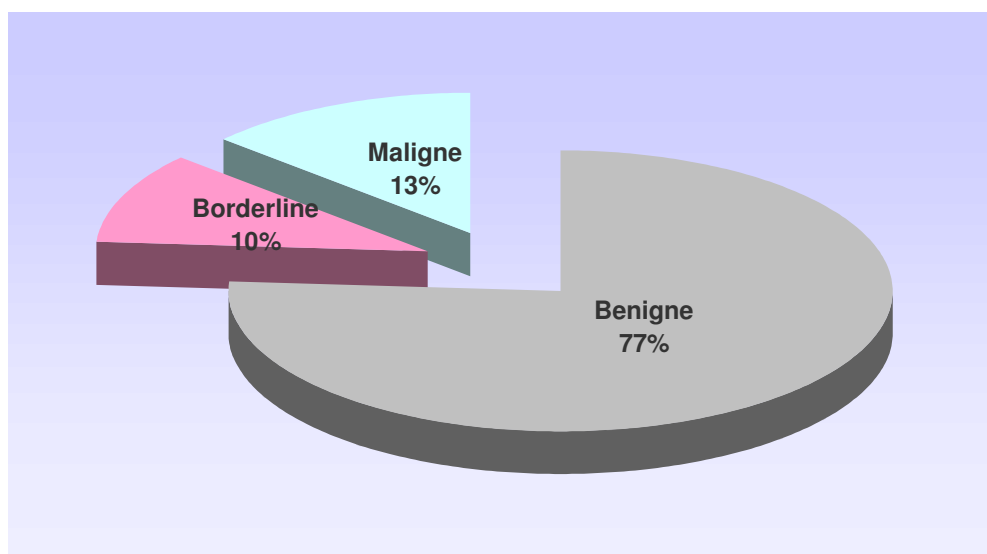
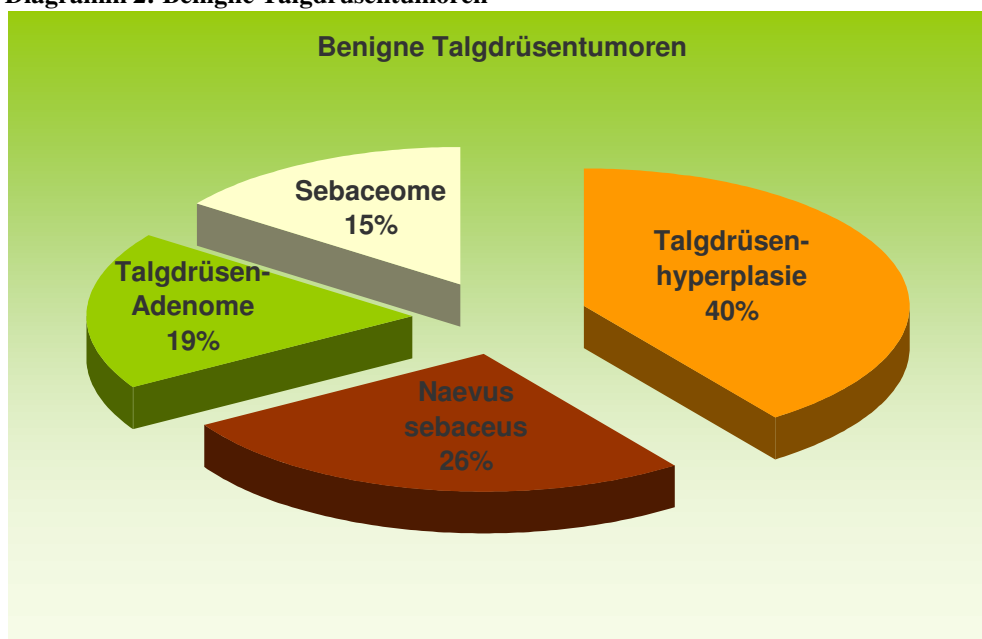


Diagramm 1: Talgdrüsentumortypen

III.1.1. Benigne Talgdrüsentumoren

Von den benignen Talgdrüsentumoren wurden 15 (19%) als Talgdrüsenadenome, 32 (40%) als Talgdrüsenhyperplasie, 21 (26%) als Naevus sebaceus und 12 (15%) als Sebazeom diagnostiziert.

Diagramm 2: Benigne Talgdrüsentumoren



III.1.2. Borderline Talgdrüsentumoren

Als borderline Talgdrüsentumoren bzw. atypische Talgdrüsenadenome wurden histologisch v. a. Tumoren mit Atypien, vermehrten Mitosefiguren und unklarer Dignität diagnostiziert.

III.1.3. Talgdrüsenkarzinome

Talgdrüsenkarzinome wiesen eine schlecht abgrenzbare Läppchenstruktur, Invasivität und Fehlen von Sebozytendifferenzierung auf.

III.2. DNA-Zytometrische Parameter

III.2.1. 5[c]-Exceeding-Events

Aus diagnostischen Gründen wurde eine Interpretation der Einzelzellen durchgeführt.

Eine normale Zelle weist in der G₀/G₁-Phase einen zweifachen Chromosomensatz bzw. einen DNA-Gehalt von 2[c] auf. Während der S-Phase schwankt der DNA-Gehalt je nach Replikationsrate zwischen 2[c] und 4[c]. In der G₂/M-Phase liegt der normale DNA-Gehalt bei vierfachem Chromosomensatz, d.h. bei 4[c].

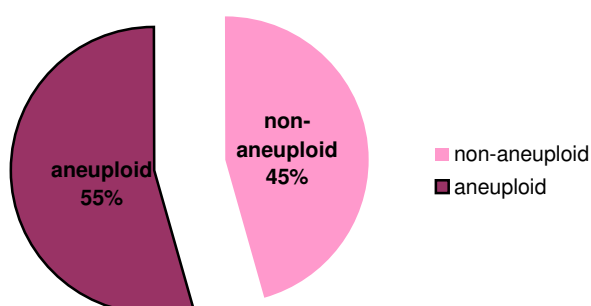
Unter Berücksichtigung von Messfehlern wurden Zellkerne von $\geq 5[c]$ (5[c] Exceeding Events), d.h. weit über G₂/M-Schwelle als pathologisch betrachtet.

Tumoren mit mindestens 3 pathologischen DNA-Gehalten von $\geq 5[c]$ werden als *aneuploid* ($5[c] \geq 3$), solche mit 1 bis 2 pathologischen DNA-Gehalten als *suspekt* ($0 < 5[c] < 3$) und Neoplasien bei fehlenden 5[c] Exceeding Events als *non-aneuploid* diagnostiziert.

In unserer Studie konnte bei benignen Tumoren kein 5[c]EE gemessen werden.

6 von 11 borderline Tumoren und 13 von 14 Talgdrüsenkarzinomen wiesen ≥ 1 5[c]EE auf. Somit liegt die Sensitivität für Aneuploidie der borderline Tumoren bei 55% (6 von 11) und

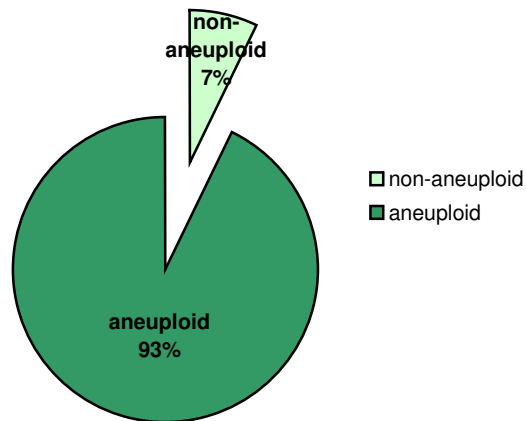
Diagramm 3: 5[c]EE der borderline Tumoren



der Talgdrüsenkarzinome bei 93 % (13 von 14), zusammen bei 76 % (19 von 25).

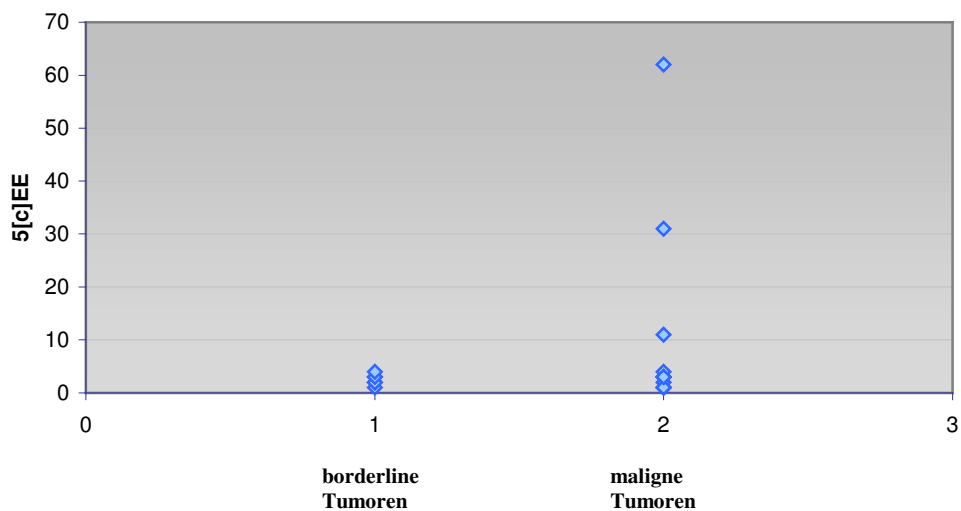
Die Spezifität liegt bei 100 % (80 von 80 benignen Tumoren).

Diagramm 4: 5[c]EE der Talgdrüsenkarzinomen



Der kleinste Wert des 5[c]EE betrug sowohl für borderline Tumoren als auch für Karzinome 1, der höchste Wert betrug für borderline Tumoren 4 und für Karzinome 62.

Diagramm 5: 5[c]EE der borderline und malignen Tumoren



III.2.2. 2[c]-Deviation-Index

Als weiterer aussagekräftiger DNA-Zytometrischer Parameter wurde der 2[c]-Deviation – Index ausgerechnet. Dieser Wert zeigt die Varianz der DNA-Gehalte um den normalen 2[c]-Wert und entspricht der Variabilität der Chromosomenanomalien in der Zytogenetik. Je höher der gemessene 2[c]DI, desto stärker ist die Schwankung der DNA-Gehalte um den 2[c]-Wert.

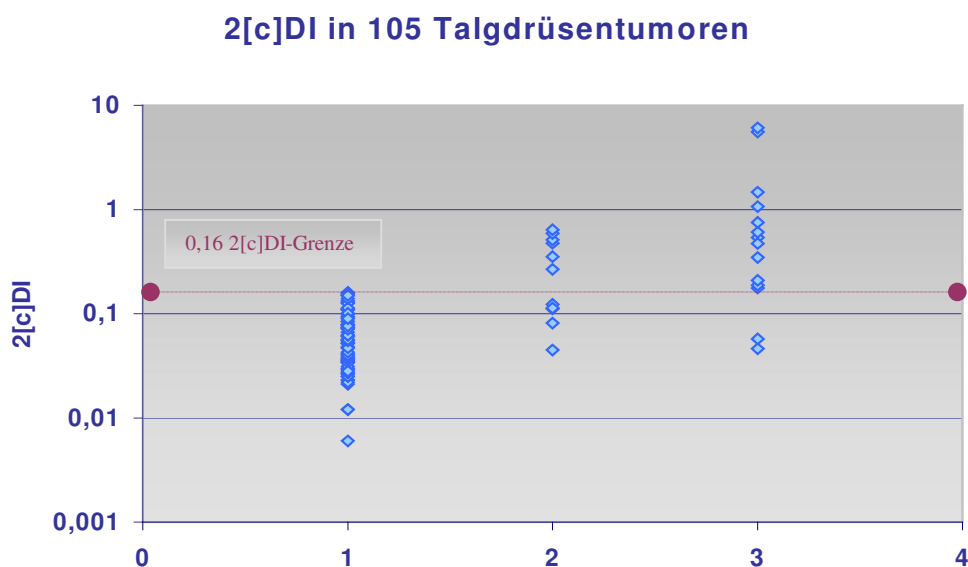
In der folgenden Tabelle sind Maximal-/Minimal-, Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes für verschiedene Tumortypen dargestellt.

Tabelle 8: Statistische Werte des 2[c]DI

Tumortyp	Anzahl	Maximum	Minimum	Mittelwert	Standardabweichung	SFM*
Benigne	80	0,16	0,006	0,068	0,04	0,005
Maligne	14	6,073	0,046	1,256	1,98	0,529
Borderline	11	0,639	0,045	0,301	0,22	0,067

* SFM = Standardfehler des Mittelwertes

Diagramm 6: 2[c]DI in 105 Gewebeproben; logarithmische Skalierung der y-Achse. 1= benigne (80), 2 = borderline (11) und 3 = maligne (14) Talgdrüsentumoren



In diesem Diagramm ist der maximale 2[c]DI-Wert der benignen Talgdrüsentumoren ein Grenzwert für die Euploidität. D. h. Werte oberhalb der 0,16 2[c]DI-Grenze sind als aneuploid zu betrachten.

Somit liegt die Spezifität bei 100% und die Sensitivität für borderline Tumoren bei 55% (6 von 11), für Talgdrüsenkarzinome bei 71% (10 von 14) und zusammen bei 64% (16 von 25).

Die Differenz der 2cDI-Werte zwischen benignen und malignen bzw. benignen und borderline bzw. borderline und malignen Talgdrüsentumoren zeigte im Mann-Whitney U-Test für die zwei ersten Paare signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$ und für das dritte Paar keine statistisch relevanten Unterschiede.

III.2.3. Stammlinie: Modalwert (= modal value) und Ploidie

Die Stammlinieninterpretation ist ein weiteres Kriterium für Aneuploidie und erfolgt mit Hilfe des Modalwertes (= modal value).

Der Modalwert (MV) bezeichnet den am häufigsten vorkommenden DNA-Wert in einer Zellpopulation. Liegt der Modalwert in einem "aneuploiden" Bereich außerhalb von $2c \pm 2 \times CV$ ($CV = \text{Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation, Standardabweichung der IOD-Werte der G0/1-Referenzzellen}$), nämlich $> 1,8 < 2,2c$ für diploide und von $> 3,6 < 4,4c$ für tetraploide, wird der Tumor in diesem Fall als aneuploid bezeichnet. Dabei weisen die meisten Zellkerne Abweichungen von den normalen DNA-Gehalten, z.B. diploiden Chromosomensätzen, auf.

Tabelle 9: Statistische Werte des Modalwertes (MV)

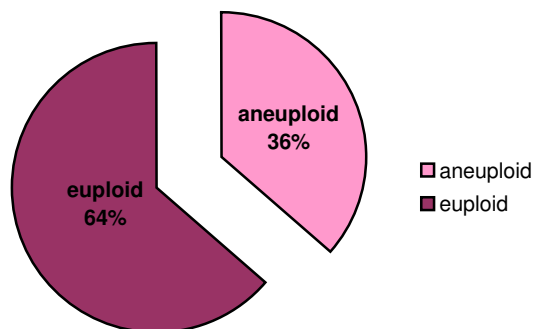
Tumortyp	Anzahl	Maximum	Minimum	Mittelwert	Standardabweichung	SFM*
Benigne	80	2,15	1,836	2,038	,061	,007
Maligne	14	3,78	1,921	2,258	,578	,155
Borderline	11	2,27	1,955	2,109	,115	,035

* SFM = Standardfehler des Mittelwertes

Die oben stehende Tabelle zeigt die wichtigsten Ergebnisse von der Modalwertausmessung. In unserer Studie lagen alle MV-Werte der benignen Talgdrüsentumoren im Normbereich, zwischen $1,8c$ und $2,2c$.

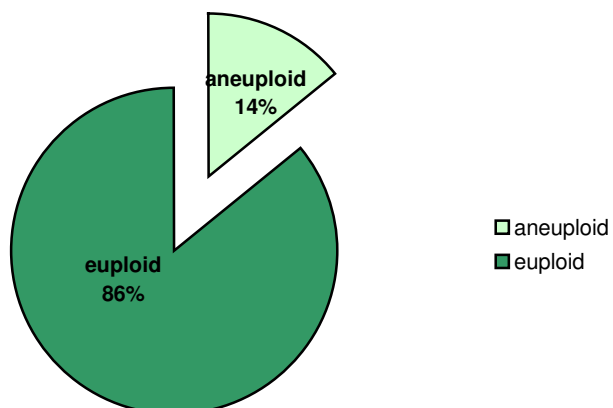
Dagegen wiesen 4 von 11 borderline Tumoren und 2 von 14 Talgdrüsenkarzinomen abweichende MV-Werte $> 2,2 < 3,6$ auf.

Somit liegt die Sensitivität für Aneuploidie der borderline Tumoren bei 36% (4 von 11) und

Diagramm 7: MV der borderline Tumoren

der Talgdrüsenkarzinome bei 14% (2 von 14), zusammen bei 24% (6 von 25).

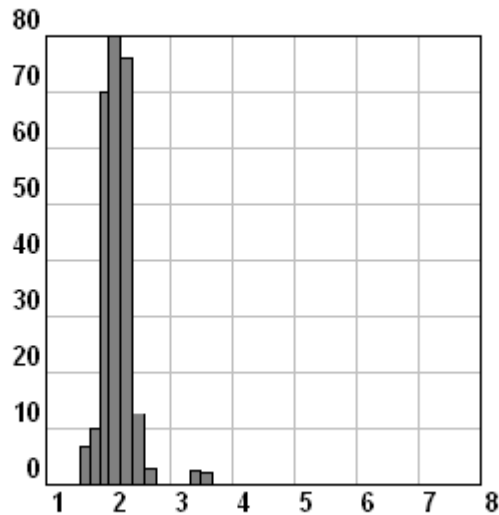
Die Spezifität liegt bei 100% (80 von benignen 80).

Diagramm 8: MV der Talgdrüsenkarzinomen

III.3. DNA-Histogramme der benignen, borderline und malignen Talgdrüsentumoren

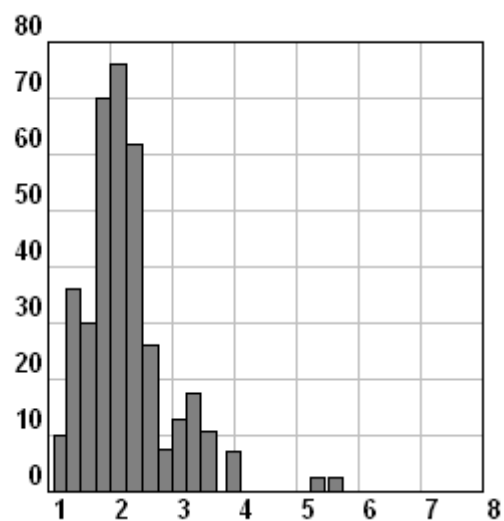
III.3.1. Benigner Talgdrüsentumor (Talgdrüsenhyperplasie)

Diagramm 9: Talgdrüsenhyperplasie mit einer nicht-aneuploiden Stammlinie, einem niedrigen 2cDI-Wert und ohne 5cEE*



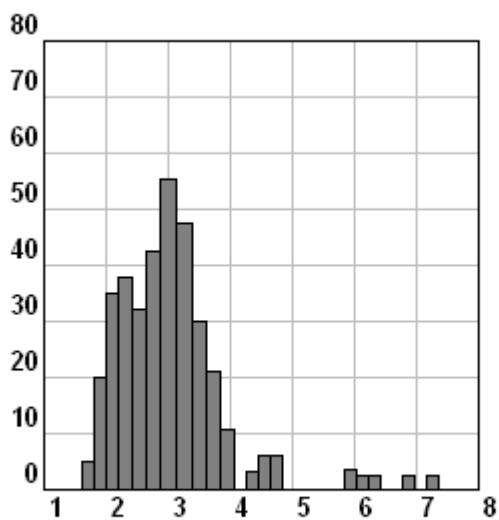
III.3.2. Borderline Tumor (Atypisches Talgdrüsenadenom)

Diagramm 10: Atypisches Adenom mit einem hohen 2cDI-Wert und einzelnen 5cEE*



III.3.3. Talgdrüsenkarzinom

Diagramm 11: Talgdrüsenkarzinom mit einer aneuploiden Stammlinie und mehreren 5cEE*



* y-Achse = Anzahl der gemessenen Zellkerne

x-Achse = gemessene DNA-Werte; 2c-Wert = DNA-Wert mit einem normalen diploiden G0/1-Gipfel

IV. Diskussion

IV.1. Bedeutung der DNA-Zytometrie in der Diagnostik

Die Dignitätsbestimmung menschlicher Tumoren wird bis heute noch überwiegend durch histopathologische Kriterien festgelegt und ist abhängig von der subjektiven Interpretation des diagnostizierenden Pathologen.

Es ist bekannt, dass zwei Pathologen zwei unterschiedliche Meinungen über Dignität und sogar über Tumortyp eines und desselben Präparates haben können.

Durch zahlreiche zytometrische und zytogenetische Studien ist bekannt geworden, dass viele Neoplasien eine DNA-Aberration aufweisen. Der DNA-Gehalt kann wiederum durch Replikation, Polyploidisierung, Gewinn oder Verlust der Chromosomen verändert werden. Numerische oder strukturelle Abweichungen der Chromosomen werden als Aneuploidie bezeichnet (12,15,41,51). Das zytometrische Äquivalent für chromosomale Aneuploidie die DNA-Aneuploidie gilt als harter Marker für maligne neoplastische Zellen (15,87,93).

Die zytometrische Quantifizierung des DNA-Gehaltes gewinnt daher als adjuvante Methode zur sicheren Tumordiagnostik und Malignitätseinstufung immer mehr an Bedeutung in der Histopathologie (4,5,16,20).

Die DNA-Zytometrie ermittelt zusätzlich die zytogenetische Tumorprogression anhand des DNA-Gehaltes und dient dadurch als prognostischer Tumormarker (3,18,19,40,100).

Folgende Tabellen verschaffen einen Einblick in die Einsatzmöglichkeiten der DNA-Zytometrie (115).

Tabelle 10: Einsatzmöglichkeiten der DNA-Zytometrie bei präkanzerösen bzw. borderline Tumoren

Zahlreiche Untersuchungen	Einzelne Publikationen
zervikale Dysplasien	Knochentumoren
Dysplasien der Larynx-Mukosa	borderline Tumoren des Ovars
Dysplasien der Ösophagus-Mukosa	Dysplasien des Endometriums
Dysplasien der oralen Mukosa	Dysplasien der Magenschleimhaut
Dysplasien der Vulva	Mastopathien
	Mesotheliome
	Myelodysplasien
	Bindegewebstumoren
	Dysplasien des Urothels
	Monoklonale Gammopathien mit umstrittener Wertigkeit (MGUS)

Tabelle 11: Malignitätsgrading bei Tumoren mit morphologisch oder DNA-Zytometrisch nachgewiesener Aneuploidie

Zahlreiche Untersuchungen	Einzelne Publikationen
Mammakarzinom	Karzinoidtumoren
Prostatakarzinom	Pankreaskarzinom
Harnblasenkarzinom	Zervixkarzinom
	Chronische myeloische Leukämie
	Riesenzelltumoren des Knochens
	Kolonkarzinom
	Larynxkarzinom
	Malignes Lymphom
	Nierenzellkarzinom
	Speicheldrüsentumoren

IV.2. Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer DNA-Zytometrischen Studie beziehen sich auf drei Parameter: 5[c]-Exceeding-Events, 2[c]-Deviation-Index und Stammlinie bzw. Modalwert.

Nach unserem Wissensstand wurde bisher nur eine kleine Studie über Talgdrüsentumoren beim Muir-Torre-Syndrom und eine große Studie über Flow-Zytometrie von okulären Talgdrüsenkarzinomen veröffentlicht. Bei unserer Studie handelt sich um eine erste große Studie über DNA-Zytometrie von Talgdrüsentumoren.

IV.2.1. 5[c]-Exceeding-Events

Zur Befunderhebung wird vor allem die Einzelzellinterpretation, die so genannten 5[c]-Exceeding-Events verwendet. Bei mehr als drei Zellen mit DNA-Gehalt von 5[c] handelt es sich um Aneuploidie, bei einer oder zwei solchen Zellen um einen suspekten Befund (11). Wobei aus den anderen Quellen hervorgeht, dass in der Tumorzytogenetik im Prinzip eine eindeutig als aneuploid erkannte Zelle ausreicht, um die Neoplasie als maligne einzustufen (51,57,96).

Es handelt sich hier um Zellen mit dem pathologischen DNA-Gehalt eindeutig über dem G2/M-Niveau, während normale Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus eine DNA-Diploidie 4[c] aufweisen (11).

In unserer Studie wurden alle Tumore mit ≥ 1 5[c]EE als aneuploid diagnostiziert.

IV.2.1.1. 5[c]-Exceeding-Events bei benignen Talgdrüsentumoren

Von 105 Talgdrüsentumoren wurden 80 benigne, darunter 15 Talgdrüsenadenome, 32 Talgdrüsenhyperplasien, 21 Naevi sebacei und 12 Sebazeome untersucht.

Bei keiner der benignen Talgdrüsenneoplasien wurde ein 5[c]EE nachgewiesen, was einer Spezifität von 100% entspricht.

IV.2.1.2. 5[c]-Exceeding-Events bei borderline Talgdrüsentumoren

Von den 11 untersuchten borderline Tumoren bzw. atypischen Talgdrüsenadenomen zeigten 6 Läsionen ≥ 1 5[c]EE, was einer Sensitivität von 55% entspricht.

Die borderline Tumoren mit ≥ 1 5[c]EE wurden als maligne bzw. als Talgdrüsenkarzinome eingestuft.

IV.2.1.3. 5[c]-Exceeding-Events bei malignen Talgdrüsentumoren

Bei den Talgdrüsenkarzinomen wiesen 13 von 14 ≥ 1 Zelle mit einem DNA-Gehalt über 5[c] auf, entsprechend einer Sensitivität für Talgdrüsenkarzinome von 93%.

IV.2.1.4. 5[c]-Exceeding-Events : Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse mit den Werten für Spezifität von 100% und Sensitivität von 93% entsprechen ungefähr den Ergebnissen der früheren Studien über andere Hautadnextumoren (107,108).

IV.2.2. 2[c]-Deviation-Index

Als ein weiteres und das wichtigste Aneuploidiekriterium unserer Studie wurde der 2[c]-Deviation-Index untersucht. Diese Variable berechnet eine biologische Varianz um den normalen 2c-Wert für eine Tumorzellpopulation.

Es konnte in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden, dass der 2[c]DI als ein verlässliches Kriterium für das Malignitätspotenzial gilt (13,101).

Die 2[c]DI-Grenzwerte für benigne und maligne Tumore wurden von uns durch Stichprobenverfahren bestimmt.

IV.2.2.1. 2[c]-Deviation-Index bei benignen Talgdrüsentumoren

Die jeweiligen Grenzwerte für Talgdrüsentumoren wurden durch ihre Minimal- bzw. Maximalwerte festgelegt.

Die 2[c]DI-Wertspanne für die benignen Talgdrüsentumoren liegt zwischen 0,006 und 0,16.

IV.2.2.2. 2[c]-Deviation-Index bei borderline Talgdrüsentumoren

Obwohl die 2[c]DI-Wertspanne für die borderline Tumoren in unserer Studie nicht aussagekräftig ist und zu den Grenzwerten keinen Beitrag leistet, wurde sie für die ergänzende Malignitätseinstufung von atypischen Adenomen bestimmt.

Sie umfasst den Wertebereich zwischen 0,045 und 0,639. Die Sensitivität liegt bei etwa 73%.

IV.2.2.3. 2[c]-Deviation-Index bei malignen Talgdrüsentumoren

Die 2[c]DI-Wertspanne für die Talgdrüsenkarzinome befindet sich zwischen 0,046 und 6,037. Dabei wiesen 2 Läsionen einen 2[c]DI-Wert unter der Maximalschwelle von benignen Tumoren von 0,16 auf. Dadurch liegt die Sensitivität für 2[c]DI bei 86% und die Spezifität bei 100%.

IV.2.2.4. 2[c]-Deviation-Index : Schlussfolgerung

Die Festlegung des 2cDI-Grenzwertes bei 0,16 für die Talgdrüsentumoren war, wie auch in den anderen Studien (98,101,108), eines der wichtigsten Ergebnisse in unserer Studie. Denn mit der Spezifität von 100% und Sensitivität von 86% (12 von 14 Talgdrüsenkarzinomen zeigten einen 2cDI-Wert>0,16) ist dieser Wert ein genaues Malignitätskriterium für Talgdrüsentumoren. Gerade für histologische borderline Tumoren ist es sinnvoll, die Läsionen mit Hilfe des 2cDI-Wertes über der 0,16-Marke als prospektiv maligne einstufen zu können.

Der Unterschied der 2cDI-Durchschnittswerte bei benignen Talgdrüsentumoren einerseits und histologisch eindeutig malignen und auch histologischen borderline Tumoren andererseits konnte im Mann-Whitney-U-Test als hochsignifikant ($p < 0,001$) nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die borderline und auch die malignen Tumoren aufgrund ihrer großen Überlappungen der 2cDI-Werte keine signifikanten Unterschiede untereinander.

IV.2.3. Stammlinie: Modalwert (= modal value) und Ploidie

Der Modalwert ist zwar als ein sicheres, jedoch nicht sehr sensitives Aneuploidiekriterium anzusehen. Denn die Aneuploidie verändert die Modalwerte erst dann, wenn die Mehrzahl der Zellen die entsprechenden Chromosomensatzveränderungen aufweist.

Der Nachweis einer aneuploiden Stammlinie als Malignitätskriterium kann bei vielen Tumoren relativ spät erfolgen, weil bei vielen neoplastischen Läsionen am Anfang ihrer Entartung nur eine geringe Anzahl von „aneuploiden“ Zellen vorkommt (15).

IV.2.3.1. Modalwert bei benignen Talgdrüsentumoren

Bei den benignen Talgdrüsentumoren waren alle Modalwerte im Normbereich. Die Spezifität lag somit bei 100%.

IV.2.3.2. Modalwert bei borderline Talgdrüsentumoren

4 von 11 borderline Tumoren zeigten abweichende Modalwert im Bereich von $> 2,2 < 3,6$. Die Sensitivität für diese Tumoren ist 36%.

IV.2.3.3. Modalwert bei malignen Talgdrüsentumoren

2 von 14 Talgdrüsenkarzinomen waren anhand ihrer Modalwerte im Bereich von $> 2,2 < 3,6$ aneuploid. Die Sensitivität für maligne Talgdrüsentumoren liegt bei 14%.

Damit ist die Stammlinieninterpretation am wenigsten aussagekräftig in unserer Studie.

IV.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Metastasierung ist der sichere Nachweis der Malignität eines Tumors.

Hauttumore, auch Talgdrüsentumore werden jedoch in der Regel vor Manifestation einer Metastasierung exzidiert.

Die Dignitätsbeurteilung obliegt der histopathologischen Begutachtung.

In unserer Studie wurden alle Tumoren von zwei erfahrenen Dermatohistopathologen unabhängig voneinander diagnostiziert.

Das Ziel unserer Studie war es, die Dignitätsbeurteilung von Talgdrüsentumoren mittels der DNA-Zytometrie vorzunehmen.

Unsere Ergebnisse ermittelten zwei aussagekräftige Aneuploidiekriterien: 2cDI und 5cEE, deren abweichende Werte auf frühe Veränderungen in der Tumorbiologie hinweisen können (98,107).

Von allen Parametern ist der Modalwert mit einer Sensitivität von 24% am wenigsten aussagekräftig für die Dignität der Talgdrüsentumoren (Tabelle 12).

Tabelle 12: Sensitivität und Spezifität der drei Aneuploidiekriterien

	DNA-aneuploide Stammlinie (%)	5[c]EE ≥ 1 (%)	2cDI $> 0,16$ (%)
Sensitivität	24	76	86
Spezifität	100	100	100

IV.4. Bedeutung der DNA-Zytometrie bei der Diagnostik von Talgdrüsentumoren

Die Talgdrüsentumoren, v.a. Talgdrüsenkarzinome sind seltene Adnextumoren. Ihre Diagnose und besonders Dignitätsbeurteilung ist allein nach histopathologischen Kriterien durch große Schwierigkeiten gekennzeichnet (34,97,113).

Unsere Studie erbrachte bezüglich der Aneuploidiekriterien (Tabelle 12) eine Spezifität von 100% in allen untersuchten Parametern. Dies belegt eine außerordentliche Bedeutung der DNA-Zytometrie in der Dignitätsbeurteilung von Adnextumoren (107,108).

Vor allem mit Hilfe der Parameter 2cDI und 5cEE kann relativ sicher und früh Malignität eines Talgdrüsentumors nachgewiesen werden.

Dabei ist es immer sinnvoll, gleichzeitig sowohl mit 2cDI, 5cEE als auch mit Modalwert zu arbeiten, denn jeder einzelne von ihnen kann eine Aneuploidie identifizieren und somit die Sicherheit für den Malignitätsnachweis erhöhen.

Jede Normwertabweichung dieser Parameter weist sofort auf das Malignitätspotenzial des Tumors hin. Dagegen schließt das Fehlen von aneuploiden Werten eine Bösartigkeit nicht aus (107,108).

IV.4.1. Korrelation zwischen histopathologischer und DNA-Zytometrischer Befunderhebung

Unsere Untersuchungen zeigen eine hohe Korrelation zwischen histologischen und DNA-Zytometrischen Befunden von benignen Talgdrüsentumoren. Keiner von ihnen wies Aneuploidie auf. Auch 93% der Talgdrüsenkarzinome stimmten in ihrer Dignitätsbeurteilung durch die DNA-Zytometrie mit der feingeweblichen Dignitätsbeurteilung überein. Nur ein Talgdrüsenkarzinom war euploid.

Neun von elf histologisch atypischen Talgdrüsenadenomen waren aneuploid, was ihr borderline Charakter im morphologischen Befund bestätigte. Eine Aneuploidie in solchen histologischen Grenzfällen weist auf das große Entartungsrisiko bzw. auf beginnende Malignität dieser Tumoren hin. In diesem Fall ist es aufgrund der DNA-Zytometrischen Ergebnisse sinnvoll die histologische Diagnose "atypisches Adenom" auf "Talgdrüsenkarzinom" zu ändern.

Eine Hauptindikation der DNA-Zytometrie sind borderline Tumore, da es wichtig ist, das Malignitätspotenzial frühzeitig zu erkennen.

IV.4.2. Arbeits- und Kostenaufwand

Obwohl die DNA-Zytometrie eine hilfreiche Ergänzung zur konventionellen Tumordiagnostik darstellt, ist sie jedoch mit einem hohen Kosten- und Arbeitsaufwand verbunden. Vor allem die Gerätschaften zur DNA-Zytometrischen Ausmessung aber auch das Softwareprogramm zum Ausmessen erfordern eine beachtliche Investition.

Auch eine lange Aufarbeitung und eingeschränkte Anzahl der zu diagnostizierenden Läsionen (max. 12) beeinträchtigt die Schnelligkeit der Befundung.

Die Qualität und Verlässlichkeit der Diagnose ist von der Erfahrung des untersuchenden Arztes abhängig. Außerdem müssen zusätzlich eingearbeitete Arbeitskräfte (MTA bzw. Arzt) für die Präparatherstellung eingeplant werden.

V. Zusammenfassung

Talgdrüsentumoren kommen relativ selten vor und ihre histologische Klassifizierung ist schwer. Vor allem für die Dignitätsbeurteilung gibt es keine ausreichend reproduzierbaren histopathologischen Kriterien.

Aus diesem Grund sind weitere adjuvante diagnostische Methoden notwendig, um maligne Talgdrüsentumoren eindeutig abzugrenzen.

In früheren Studien mit Untersuchungen von Schweißdrüsen- und follikulären Hautanhangstumoren mittels DNA-Zytometrie konnte eine hohe diagnostische Wertigkeit dieser Methode gezeigt werden.

Das Prinzip der DNA-Bildzytometrie beruht auf Bestimmung von DNA-Gehalten der jeweiligen Zellpopulation nach der Färbung der Zellkerne durch Feulgen-Reaktion und anschließender TV-Bildanalyse. Es ist schon seit langem bekannt, dass die Mehrheit der humanen malignen Tumoren eine erhöhte Anzahl von abweichenden bzw. aneuploiden DNA-Gehalten aufweist.

In unserer Arbeit wurden insgesamt 105 Talgdrüsentumoren, davon 80 benigne, 11 borderline und 14 maligne, DNA-Zytometrisch untersucht und mit histologischen Diagnosen zweier erfahrener Dermatohistopathologen verglichen. Als Aneuploidieparameter wurden der Modalwert, der 2[c]-Deviation-Index und die 5[c]-Exceeding-Events gewählt. Durch unsere Studie wurde der 2cDI-Grenzwert für die Talgdrüsentumoren in Höhe von 0,16 festgelegt.

Anhand unserer Ergebnisse waren alle benignen Talgdrüsentumoren euploid.

Nach ihrem aussagekräftigsten Parameter 2cDI erwiesen sich 73% der borderline Tumoren als aneuploid.

Der aussagekräftige Parameter für die Aneuploidiebestimmung bei Talgdrüsenkarzinomen lag bei 5cEE.

Anhand dieses Parameters waren 93% der malignen Talgdrüsentumoren aneuploid.

Es ergab sich außerdem eine hohe Übereinstimmung zwischen den histologischen und den DNA-Zytometrischen Befunden.

Wie schon durch frühere Studien und unsere hohe Spezifität und Sensitivität gezeigt werden konnte, kann die DNA-Zytometrie v.a. bei atypischen bzw. borderline Talgdrüsentumoren als

eine hilfreiche ergänzende Methode in der Routinediagnostik zur Bestimmung des Malignitätspotenzials dienen.

Dagegen ist eine zusätzliche DNA-Zytometrische Untersuchung von klar diagnostizierten benignen Talgdrüsentumoren überflüssig.

VI. Literaturverzeichnis:

1	Alessi E, Sala F. Nevus sebaceus. A clinicopathologic study of its evolution. <i>Am J Dermatopathol</i> 1986; 8: 27-31.
2	Atkin NB. Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia. A clinical and histopathologic assessment. <i>Cancer</i> 1971; 27: 1964-1974.
3	Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. <i>Analyt Quant Cytol</i> 1980; 2: 161-165.
4	Auer G, Askenstein U, Ahrens O. Cytophotometry. <i>Hum Pathol</i> 1989; 20: 518-527.
5	Auffermann W, Reppes R, Böcking A. Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a image-analysis system. <i>Analyt Quant Cytol</i> 1984; 6: 179-188.
6	Banse-Kupin L, Morales A, Barlow M. Torre's syndrome: report of two cases and review of the literature. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1984; 10: 803-817.
7	Barlogie B, Drewinko B, Schuman J. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. <i>Am J Med</i> 1980; 69: 195-203.
8	Bedi KS, Goldstein DY. Apparent anomalies in nuclear Feulgen-DNA contents: Role of systematic microdensitometric errors. <i>J Cell Biol</i> 1976; 71: 68-88.
9	Beust M, Barten M, Kreuzberg M, Krieger-Stojalowska A, Rohde E. Comparative cytophotometric and cytomorphometric investigations on koilocytes and atypical squamous epithelium of the cervix uteri. <i>Zent Allg Pathol Anat</i> 1986; 131: 517-521.
10	Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A. Polyploidy in non-neoplastic tissues. <i>J Clin Pathol</i> 1994; 47: 38-42.

11	Biesterfeld S, Pennings K, Grussendorf-Conen EI, Böcking A. Aneuploidy in actinic keratosis and Bowen's disease - increased risk for invasive squamous cell carcinoma? <i>Br J Dermatol</i> 1995; 133: 557-560.
12	Blegen H, Ghadimi BM, Jauho A et al. Genetic instability prompts the acquisition of chromosomal imbalances in T1b and T1c breast adenocarcinomas. <i>Analyt Cell Pathol</i> 2001; 22: 123-131.
13	Böcking A, Adler CP, Common HH et al. Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. <i>Analyt Quant Cytol</i> 1984; 6: 1-8.
14	Böcking A, Chatelain R. Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecological cytology. <i>Analyt Quant Cytol Histol</i> 1988; 11: 177-186.
15	Böcking A. DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. <i>Beitr Onkol</i> 1990; 38: 298-347
16	Böcking A. Präzise Krebsdiagnostik durch Zytometrie. Sonderdruck aus dem Wissenschaftsmagazin "RWTH-Themen".
17	Böcking A, Biesterfeld S, Liu S. DNA distribution in gastric cancer and dysplasia. <i>Precancerous Conditions and Lesions of the Stomach</i> (Zhang YC, Kawai K, eds). Berlin: Springer-Verlag 1993; 103-120.
18	Böcking A, Striepecke E, Füzesi L. Cytogenetic and cellkinetic basis of diagnostic DNA cytometry. <i>Verh Dtsch Ges Path</i> 1994; 78.
19	Böcking A. DNA Measurements. When and Why? In: <i>Compendium on Quality Assurance. Proficiency Testing and Workload Limitations in Clinical Cytology</i> (Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, eds). Chicago: Tutorials of Cytology 1995; 170-88.
20	Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. <i>Analyt Cell Pathol</i> 1995; 8: 67-74.

21	Böcking A. Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. In: <i>Fortschritt und Fortbildung in der Medizin, Band 21, Köln, Dt. Ärzteverlag</i> 1997; 21-49.
22	Jarvis JR. A microcomputer system for video image analysis and diagnostic microdensitometry. <i>Analyt Quant Cytol Histol</i> 1986; 8: 201-209.
23	Böcking A. Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. <i>Deutsches Ärzteblatt</i> 1998; 12: 658-663.
24	Böhm N, Sandritter W. DNA in human tumors: A cytophotometric study. <i>Curr Top Pathol</i> 1975; 60: 151-219.
25	Broders AC. The grading of carcinoma. <i>Minn Med</i> 1925; 8: 726-730.
26	Brownstein MH, Shapiro L. The pilosebaceous tumors. <i>Int H Dermatol</i> 1977; 16: 340-352.
27	Burden PA, Gentry RH et al. Piloleimyoma arising in an organoid nevus: a case report and review of the literature. <i>J Dermatol Surg Oncol</i> 1987; 13: 1213-1218.
28	Burgdorf WHC, Pitcha J, Fahmy A. Muir-Torre syndrome. Histologic spectrum of sebaceous proliferations. <i>Am J Dermatopathol</i> 1986; 8: 202-208.
29	Chieco P, Jonker A, Melchiorri C, Vanni G, van Noorden CJF. A users guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: A review with organized experimental observations. <i>Histochem J</i> 1994; 26: 1-19.
30	Chun K, Vázquez M, Sánchez JL. Nevus sebaceus: clinical outcome and considerations for prophylactic excision. <i>Int J Dermatol</i> 1995; 34: 538-541.
31	De Villez RL, Roberts LE. Premature sebaceous gland hyperplasia. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1982; 6: 933-935.
32	Dinneen AM, Mehregan DR. Sebaceous epithelioma: a review of twenty-one cases. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1996; 34: 47-50.

33	Duijndam WAL, Smeneders AWM, van Duijn P, Verweij AC. Optical errors in scanning stage absorbance cytophotometry: I. Procedures for correcting apparent integrated absorbance values for distributional glare and diffraction errors. <i>J Histochem Cytochem</i> 1980; 28: 388-394.
34	Echsner G, Schreiber W. Zur Bestimmung des Falschlichtanteils. <i>Optik und Spektroskopie aller Wellenlängen</i> . Akademie-Verlag, Berlin 1962.
35	Elder DE, Elenitsas R, Ragsdale BD. Tumours of the epidermal appendages. <i>Lever's Histopathology of the Skin</i> (Elder DE, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson b Jr, eds), 8 th edn. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997.
36	Evans AS, Monaghan JM. Nuclear DNA content of normal, neoplastic, and wart affected cervical biopsies. <i>Analyt Quant Cytol</i> 1983; 5: 112-116.
37	Ferguson JW, Geary CP, MacAlister AD. Sebaceous cell adenoma. Rare intra-oral occurrence of a tumor which is a frequent maker of Torre`s syndrome. <i>Pathology</i> 1987; 19: 204-208.
38	Feuerstein R, Mims L. Linear nevus sebaceus with convulsions and mental retardation. <i>Am J Dis Child</i> 1962; 104: 675-679.
39	Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. <i>Hoppe Seylers Z Physiol Chem</i> 1924; 135: 203-248.
40	Fleming MG, Friedman RJ. Multiparametric image cytometry of nevi and melanoma. <i>Am J Dermatopathol</i> 1993; 15(2): 106-113.
41	Füzesi L, Zytogenetik und DNA-Zytometrie der Tumorprogression bei Nierenzellkarzinomen. <i>Med Habil Schrift RWTH, Aachen</i> 1993.

42	Ghadimi BM, Sacket DL, Difilippantonio E et al. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 2000; 27: 183-190.
43	Goldstein GJ. Aspects of scanning microdensitometry: I. Stray light (glare). <i>J Microscop</i> 1970; 92: 1-16.
44	Graham RM, McKee PH, McGibbon D. Sebaceous carcinoma. <i>Clin Exp Dermatol</i> 1984; 9: 466-471.
45	Graham R, McKee P, McGibbon D Heyderman E. Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. <i>Cancer</i> 1985; 55: 2868-2873.
46	Gregory B, Ho VC. Cutaneous manifestations of gastrointestinal disorders. Part 1. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1992; 26: 153-166.
47	Haroske G, Dimmer V, Meyer W, Kunze KD. DNA histogram interpretation based on statistical approaches. <i>Analyt Cell Pathol</i> 1997; 15: 157-173.
48	Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I. Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. <i>Anaytl Cell Pathol</i> 1999; 17: 189-200.
49	Haroske G, Baak JPA, Danielsen H et al. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. <i>Analyt Cell Pathol</i> 2001; 23: 89-95.
50	Hedley DW, Rugg CA, Ng ABP, Tylor IW. Influence of cellular DNA content on disease free survival of stage II breast cancer patients. <i>Cancer Res</i> 1984; 44: 5395-5398.
51	Hedley DW, Philips J, Rugg CA, Taylor IW. Measurement of cellular DNA content as an adjunct to diagnostic cytology in malignant effusions. <i>Eur J Cancer Clin Oncol</i> 1984; 20: 749-752.

52	Heim S, Mittelman F. <i>Cancer cytogenetics</i> . New York, Alan R Liss 1987.
53	Herzberg AJ. Significance of DNA ploidy in cutaneous lesions. <i>Arch Dermatol</i> . 1992; 128: 663-672.
54	Hiddemann W, Schumann J, Andreeff M, Barlogie B et al. Convention on nomenclature for DNA cytometry. <i>Cytometry</i> 1984; 5: 445-446.
55	Hofstädter F, Jaske G, Lederer B, Mikuz G, Delgado R. Biological behaviour and DNA cytophotometry of urothelial bladder carcinoma. <i>Br J Urol</i> 1984; 56: 289-295.
56	Hornstein OP, Knickenberg M. Zur Kenntnis des Schimmelpenning-Feuerstein-Mims-Syndroms. <i>Arch Dermatol Forsch</i> 1974; 250: 33-50.
57	http://www.fairimag.co.uk/fairfield/dna-cytometry/dna-ploidy.bak
58	http://www.med.uni-duesseldorf.de/cytopathologie/Sputum/9dna-bild-zytometrie.htm
59	http://www.triathimaging.com/usproducts/quic-dna.htm
60	Huber JC. Numerische und strukturelle Chromosomen-Aberrationen bei gynäkologischen Malignomen. Stuttgart. Thieme 1986.
61	Jacobs DM, Sandles LG, LeBoit PE. Sebaceous carcinoma arising from Bowen's disease of the vulva. <i>Arch Dermatol</i> 1986; 122: 1191-1193.
62	Jensen ML. Extraocular sebaceous carcinoma of the skin with visceral metastases: case report. <i>J Cutan Pathol</i> 1990; 17: 171-121.
63	Kerl H, Garbe C, Cerroni L et al. <i>Histopathologie der Haut</i> . Springer Verlag, Heidelberg 2003.

64	Kindermann D, Hilgers CH. Glare correction in DNA image cytometry. <i>Analyt Cell Path</i> 1994; 6: 165-180.
65	King DT, Hirose FM, Gurevitch AW. Sebaceous carcinoma of the skin with visceral metastases. <i>Arch Dermatol</i> 1979; 115: 862-863.
66	Köhler K, Kautzky F, Vogt HJ. Multiple kutane Neoplasien bei Cyclosporin-Therapie nach Nierentransplantation. <i>Hautarzt</i> 1995; 46: 638-642.
67	Krug A. Histo- und Zytophotometrie. VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena 1980.
68	Kumar P, Barton SP, Marks R. Tissue measurements in senile sebaceous gland hyperplasia. <i>Br J Dermatol</i> 1988; 118: 397-402.
69	Lasser A, Carter DM. Multiple basal cell epitheliomas with sebaceous differentiation. <i>Arch Dermatol</i> 1973; 107: 91-93.
70	Lever WF, Schaumburg-Lever G. <i>Histopathology of the skin</i> . Lippincott, Philadelphia 1990.
71	Luderschmidt C, Plewig G. Circumscribed sebaceous gland hyperplasia: Autoradiographic and histoplanometric studies. <i>J Invest Dermatol</i> 1978; 70: 207-209.
72	Marden PM, Venters HD. A new neurocutaneous syndrome. <i>Am J Dis Child</i> 1966; 112: 79-81.
73	Mehregan AH, Pinkus H. Life history of organoid nevi. <i>Arch Dermatol</i> 1965; 91: 574-588.
74	Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. <i>Pathol Res Pract</i> 1990; 186(1): 37-62.

75	Mikel UV, Becker RL. A comparative study of quantitative stains for DNA in image cytometry. <i>Analyt Quant Cytol Histol</i> 1991; 13: 253-260.
76	Misago N, Narisawa Y et al. Association of nevus sebaceous with an unusual type of « combined nevus ». <i>J Cutan Pathol</i> 1994; 21: 76-81.
77	Munck Wikland E, Rubiro CA, Auer GU, Kuylenstierna R, Lindham J. Control cells for image cytometric DNA analysis of oesophageal tissue and the influence of preoperative treatment. <i>Analyt Quant Cytol Histol</i> 1990; 12: 267-274.
78	Nelson BR, Hamlet KR, Gillard M et al. Sebaceous carcinoma. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1995; 33: 1-15.
79	Pricolo VE, Rodil JV, Vezeridis MP. Extraorbital sebaceous carcinoma. <i>Arch Surg</i> 1985; 120: 853-855.
80	Rao NA, Hidayat A, McLean IW, Zimmermann LE. Sebaceous carcinomas of the ocular adnexa: a clinicopathologic study of 104 cases with five-year follow-up data. <i>Hum Pathol</i> 1982; 13: 113-122.
81	Ródenas JM, Herranz MT, Tercedor J et al. Muir-Torre syndrome associated with a family history of hyperlipidemia. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1993; 28: 285-288.
82	Rothenberg J, Lambert WC, Vail JT et al. The Muir-Torre (Torre's) syndrome: the significance of a solitary sebaceous tumor. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1990; 23: 638-640.
83	Rulon DB, Helwig EB. Cutaneous sebaceous neoplasms. <i>Cancer</i> 1974; 33: 82-102.
84	Rütten A, Burgdorf W, Hügel H, Kutzner H et al. Cystic sebaceous tumors as marker lesions for the Muir-Torre syndrome. A histopathological and molecular genetic study. <i>Am J Dermatopathol</i> 1999; 21: 405-414.

85	Sanchez L, Regu M, Biesterfeld S, Chatelain R, Böcking A. Performance of a TV image analysis system as a microdensitometer. <i>Analyt Quant Cytol Histol</i> 1990; 12: 279-284.
86	Sánchez Yus E, Requena L, Simón P, Sánchez M. Complex adnexal tumor of the primary epithelial germ with distinct patterns of superficial epithelioma with sebaceous differentiation, immature trichoepithelioma, and apocrine adenocarcinoma. <i>Am J Dermatopathol</i> 1992; 14: 245-252.
87	Sandberg AA. The chromosomes in human cancer and leukemia. 2nd edn, Elsevier, New York, Amsterdam, Oxford 1990.
88	Sandritter W. Über den Nukleinsäuregehalt in malignen Geschwülsten. <i>Naturwissenschaften</i> 1952; 39: 46-47.
89	Sandritter W. Über den Nukleinsäuregehalt in verschiedenen Tumoren. <i>Frankf Z Pathol</i> 1952; 63: 423-446.
90	Sandritter W. Über den Nukleinsäurestoffwechsel in Plattenepithel- und kleinzelligen Bronchialkarzinomen 1952; 63: 387-422.
91	Sandritter W, Böhm N. DNA in human tumors: A cytophotometric study. <i>Curr Top Pathol</i> 1975; 60: 151-219.
92	Schulte EKW. Standardization of the Feulgen reaction for absorption DNA image cytometry: a review. <i>Analyt Cell Pathol</i> 1991; 3: 167-182.
93	Schulte EKW, Seigneuring F, Giroud F, Brugal G. DNA densitometry. <i>Quantitative Clinical Pathology</i> , P.W. Hamilton and D.C. Allen, eds, Blackwell Science, 1995; 140-169.
94	Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. <i>J Am Acad Dermatol</i> 1995; 33: 90-104.

95	Serri F, Montagna W, Mescon H. Studies of the skin of the fetus and the child. <i>J Invest Dermatol</i> 1962, 39: 199-217.
96	Smeets AWGB. Chromosome and flow cytometric studies of urinary bladder cancer. <i>Med. Diss. Univ. Maastricht</i> 1987.
97	Steffen C, Ackermann AB. <i>Neoplasms with sebaceous differentiation</i> . Lea & Febiger, Philadelphia 1994.
98	Stolz W, Vogt T, Braun-Falco O et al. Differentiation between lymphomas and pseudolymphomas of the skin by computerized DNA-image cytometry. <i>J Invest Dermatol</i> 1990; 94: 254-60.
99	Sudbo J, Bryne M, Johannessen AC et al. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy), as prognostic tools in oral dysplasia. <i>J Pathol</i> 2001; 194: 303-310.
100	Sudbo J, Kildal W, Risberg B et al. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. <i>N Engl J Med</i> 2001; 344: 1270-1278.
101	Sun D, Biesterfeld S, Adler CP, Böcking A. Prediction of Recurrence in Giant Cell Bone Tumors by DNA cytometry. <i>Analyt Quant Cytol</i> 1992; 14: 341-346.
102	Tarkhan II, Domingo J. Metastisizing eccrine porocarcinoma developing in a sebaceous nevus of Jadassohn. Report of a case. <i>Arch Dermatol</i> 1985; 121: 413-415.
103	Torre D. Multiple sebaceous tumors. <i>Arch Dermatol</i> 1968; 98: 549-551.
104	Tribukait B, Moberger G, Zetterberg A. Methodological aspects of rapid flow cytofluorometry for DNA analysis of human urinary bladder cells. <i>Pulse Cytophotometry: Part I</i> . Edited by Haenen C, Hillen H, Wessels S. European Press Medicon, Ghent 1975; 55-60.

105	Troy JL, Ackerman AB. Sebaceoma. A distinctive benign neoplasm of adnexal epithelium differentiating toward sebaceous cells. <i>Am J Dermatopathol</i> 1984; 6: 232-242.
106	Urban FH, Winkelmann RK. Sebaceous malignancy. <i>Arch Dermatol</i> 1961; 84: 63-72.
107	Vogelbruch M, Böcking A, Rütten A et al. DNA image cytometry in malignant and benign sweat gland tumours. <i>Br J Dermatol</i> 2000; 142: 688-693.
108	Vogelbruch M, Rütten A, Böcking A, Kapp A, Kiehl P. Differentiation between malignant and benign follicular adnexal tumours of the skin by DNA image cytometry. <i>Br J Dermatol</i> 2002; 146: 238-243.
109	Wauschkuhn J, Rohde B. Systematisierte Talgdrüsen-, Pigment- und epitheliale Naevi mit neurologischer Symptomatik; Feuerstein-Mimssches neuroektodermales Syndrom. <i>Hautarzt</i> 1971; 22: 10-33.
110	Weedon D, Strutton, G. <i>Skin Pathology</i> . Churchill Livingstone, New York 1997.
111	Weitzer M, Pokos V, Jeevaratnam P et al. Isolated expression of the Muir-Torre phenotype in a member of a family with hereditary non-polyposis colorectal cancer. <i>Histopathology</i> 1995; 27: 573-575.
113	Wick MR, Swanson PE. Cutaneous Adnexal Tumours. <i>A Guide to Pathologic Diagnosis</i> . Chicago: ASCP Press, 1991.
113	Wick MR, Goellner JR, Wolfe JT, Su WPD. Adnexal carcinomas of the skin. II. Extraocular sebaceous carcinomas. <i>Cancer</i> 1985; 56: 1163-1172.
114	Wied GL, Bartels PH et al. Rapid DNA evaluation in clinical diagnosis. <i>Acta Cytol</i> 1976; 20: 336-371.

115	Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DI, Schenck U. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. <i>Tutorials of cytology</i> , Chicago, USA 1994.
116	Wilson Jones E, Heyl T. Nevus sebaceus. A report of 140 cases with special regard to the development of secondary malignant tumors. <i>Br J Dermatol</i> 1970; 82: 99-117.
117	Wolfe JT, Campbell RJ, Yeatts RP et al. Sebaceous carcinoma of the eyelid. Errors in clinical and pathologic diagnosis. <i>Am J Surg Pathol</i> 1984; 8: 597-606.

VII. Anhang

Nr.	E-Nr.	Diagnose	n(T)	n(R)	IOD	MV	CV	n(5cEE)	2c,d.I
1	9609218-IV	Adenom	322	30	145,35	1,933	1,39		0,021
2	9801814	Adenom	339	30	215,16	2,07	2,52		0,03
3	9902809	Adenom	307	30	208,59	1,92	2,84		0,035
4	9701040-V	Adenom	326	30	156,35	2,045	1,85		0,052
5	9706786	Adenom	317	30	138,99	2,055	2,19		0,053
6	9708826-I	Adenom	330	30	156,77	2,097	2,11		0,056
7	9910189-I	Adenom	309	30	197,58	1,999	3,18		0,061
8	9702909-II	Adenom	324	30	122,8	1,947	1,46		0,066
9	59792-98	Adenom	339	30	152,12	2,068	2,89		0,078
10	9702909-I	Adenom	313	30	128,3	1,91	2,09		0,084
11	9707292-X	Adenom	352	30	135,43	2,139	2,68		0,108
12	9510226-VI	Adenom	332	30	137,06	2,062	4,1		0,127
13	9908707(V)	Adenom	333	30	210,49	2,09	3,12		0,129
14	190366-93	Adenom	315	30	159,92	2,022	2,16		0,158
15	106945	Adenom	—	—	—	1,96	—		0,06
16	9911125	atyp.Adenom	308	30	291,14	2,12	2,38		0,045
17	9904336-V	atyp.Adenom	300	30	231,65	2,251	1,56		0,081
18	2000-1581	atyp.Adenom	307	30	144,74	2,106	4,39		0,123
19	9901409	atyp.Adenom	330	30	274,23	2,017	2,29	4	0,267
20	9609218-I	atyp.Adenom	315	30	289,07	1,967	0,51	1	0,352
21	9712302-I	atyp.Adenom	331	30	144,91	1,989	1,54	3	0,476
22	9815252	atyp.Adenom	320	30	210,76	2,178	6,11	2	0,512
23	9802904	atyp.Adenom	302	30	123,1	2,271	4,93	2	0,592
24	9904405	atyp.Adenom	312	30	168,29	2,23	4,69	3	0,639
25	138698-98	atyp.Adenom	335	30	147,53	2,119	4,67		0,111
26	46710-I-92	atyp.Adenom	318	30	157,54	1,955	2,95		0,113
27	9509153	Hyperplasie	340	30	141,34	2,014	4,03		0,079
28	9712206	Hyperplasie	339	30	158,72	2,041	4,66		0,012
29	9808776	Hyperplasie	347	30	213,34	2,05	2,42		0,012
30	9704554-I	Hyperplasie	346	30	155,42	2,02	2,28		0,023
31	9702482-III	Hyperplasie	321	30	156,33	2,075	3,7		0,023
32	9714604	Hyperplasie	342	30	153,12	2,084	3,53		0,025
33	9712160	Hyperplasie	326	30	151,37	2,028	3,53		0,029
34	9711244-II	Hyperplasie	341	30	167,98	2,064	2,9		0,034
35	9707292-V	Hyperplasie	337	30	139,37	2,051	2,32		0,035
36	9706023-V	Hyperplasie	332	30	158,24	2,06	2,93		0,035
37	9700221-II	Hyperplasie	337	30	153,62	2,036	3,06		0,036
38	9814129-IV	Hyperplasie	330	30	163,65	2,039	1,32		0,037
39	9711765-XII	Hyperplasie	333	30	152,63	1,981	3,52		0,038
40	9508932	Hyperplasie	344	30	125,73	2,085	3,8		0,047
41	9703688	Hyperplasie	335	30	154,22	2,108	3,21		0,048
42	9703334	Hyperplasie	335	30	155,51	2,149	3,77		0,052
43	9702207	Hyperplasie	312	30	139,02	2,034	3,98		0,072
44	9709641	Hyperplasie	355	30	160,31	2,12	2,68		0,073
45	9711299-V	Hyperplasie	327	30	153,61	2,077	3,59		0,074
46	9807095-I	Hyperplasie	326	30	282,61	2,15	1,24		0,079
47	9809626	Hyperplasie	304	30	259,76	2,09	0,99		0,084
48	9508642-C	Hyperplasie	301	30	134,59	2,006	3,83		0,099
49	9815415	Hyperplasie	323	30	288,06	2,021	0,82		0,1
50	9800324(I)	Hyperplasie	348	30	214,06	2,004	2,85		0,109
51	9803545	Hyperplasie	317	30	299,38	2,04	0,63		0,11
52	9507200	Hyperplasie	342	30	137,59	2,139	3,86		0,111

53	9808838	Hyperplasie	347	30	138,76	2,146	4,59		0,132
54	9908707(X)	Hyperplasie	305	30	97,45	1,898	4,73		0,149
55	9505955	Hyperplasie	310	30	102,85	1,836	4,12		0,16
56	9714330	Hyperplasie	342	30	169,38	1,987	2,42		0,02
57	9709094	Hyperplasie	322	30	156,48	2,035	4,17		0,026
58	9701604	Hyperplasie	331	30	160,74	2,039	2,64		0,041
59	617032	Karzinom	341	30	143,53	2,099	3,59	2	0,046
60	353010-94	Karzinom	305	30	162,89	1,997	2,74		0,057
61	255486-I-94	Karzinom	302	30	165,84	2,072	3,64	1	0,177
62	9910455-VII	Karzinom	315	30	231,96	2,193	4,66	3	0,188
63	95273-B-98	Karzinom	316	30	157,15	1,991	4,4	1	0,209
64	487201-95	Karzinom	312	30	147,68	2,029	3,2	1	0,348
65	60014-97	Karzinom	300	30	100,66	1,921	2,85	3	0,54
66	29609-98	Karzinom	308	30	100,59	2,091	4,6	1	0,608
67	135299-98	Karzinom	326	30	110,22	1,983	4,6	4	0,751
68	217016-F	Karzinom	317	30	167,43	2,018	2,84	11	1,067
69	58206-2-96	Karzinom	303	30	151,24	1,968	4,83	3	1,472
70	9708454	Karzinom	308	30	200,73	3,781	4,55	31	5,581
71	21679-1-A-96	Karzinom	324	30	111,27	3,425	3,77	62	6,073
72	9809322	Karzinom	—	—	—	2,037	—	3	0,471
73	9811543-V	Naevus	315	30	145,58	2,017	2,39		0,041
74	9702992-AC	Naevus	332	30	158,64	1,972	3,77		0,09
75	9808083	Naevus	308	30	308,61	2,04	1,82		0,006
76	9713719-VII	Naevus	342	30	167,02	2,04	2,76		0,022
77	9707706-IX	Naevus	315	30	163,01	1,993	2,78		0,025
78	9812805-X	Naevus	338	30	163,65	2,039	1,32		0,027
79	9812166-A	Naevus	335	30	260,68	2,129	1,26		0,031
80	9910457	Naevus	327	30	232,09	2,089	3,18		0,034
81	9711987-V	Naevus	338	30	162,91	2,059	3,43		0,036
82	9703964-VII	Naevus	323	30	158,97	2,016	2,98		0,038
83	9700070-X-B	Naevus	332	30	158,42	2,011	2,84		0,04
84	9708223-IX	Naevus	338	30	164,2	2,032	3,35		0,043
85	9814884A	Naevus	325	30	256,05	2,08	1,9		0,047
86	9903287	Naevus	326	30	276,9	2,04	1,7		0,055
87	9801033-VII	Naevus	338	30	144,83	2,099	1,73		0,056
88	9704947-VI	Naevus	322	30	166,31	1,999	2,55		0,062
89	9509285-VII	Naevus	341	30	150,03	2,104	4,03		0,062
90	9804238	Naevus	315	30	298,13	2,064	0,5		0,073
91	9901402	Naevus	360	30	232,34	2,093	3,61		0,1
92	9803901-A	Naevus	321	30	311,22	2,04	0,91		0,125
93	9506385-V	Naevus	318	30	106,66	2,141	3,95		0,151
94	9803785(I)	Sebazeom	326	30	206,75	2,038	1,28		0,113
95	90699-I-93	Sebazeom	323	30	146,06	1,971	3,21		0,027
96	484525-95	Sebazeom	336	30	151,36	2,027	2,57		0,028
97	9903577-X	Sebazeom	322	30	217,72	2,066	3,19		0,071
98	9803785(II)	Sebazeom	317	30	324,5	2,01	1,52		0,076
99	9903577-V	Sebazeom	321	30	250,31	2,054	4,63		0,093
100	9910189-II	Sebazeom	304	30	222,2	1,906	2,65		0,095
101	102767-98	Sebazeom	306	30	139,05	2,041	4,63		0,101
102	423881-I-95	Sebazeom	352	30	167,64	2,014	3,53		0,156
103	106505	Sebazeom	—	—	—	2	—		0,14
104	0009394	Sebazeom	—	—	—	1,94	—		0,15
105	102329	Sebazeom	—	—	—	2,01	—		0,09

rot = abweichende Werte

VIII. Lebenslauf

Persönliche Daten

Natalja Denisjuk
geb. am 19.06.1975 in Kysyl-Syr, Russland
verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1982-1990

Grund- und Mittelstufe an der Staatlichen
Schule in Riga, Lettland

1990-1991

9. Klasse an der Schule in Berlin-Ost

1991-1993

10.-11. Klasse am Philipp-Emanuel-Bach-
Gymnsaium für Musik in Berlin

1993-1995

Abitur an der Gesamtschule Kirchhain

Studium

1996-1998

Studium der Humanmedizin an der
Philipps-Universität Marburg

1998-2000

Studium der Humanmedizin an der
Medizinischen Hochschule Hannover

2000-2001

Studium der Humanmedizin an der
Universität Gesamthochschule Essen

2001-2002

Studium der Humanmedizin an der
Ruhr-Universität Bochum

Krankenpflegepraktikum

01.08.-01.10.1996

Central Health Group, Glendale, Los Angeles

Famulatur

27.08-01.10.1997

Cedars-Sinai Medical Center, Procedure Center,
Los Angeles

13.07-12.08.1998

Anästhesiologie, Praxis Dr. med. P. von Geyer,
Marburg

02.08-02.09.1999

Dermatologie, Hautklinik der Philipps-Universität
Marburg

06.09-06.10.1999

Dermatologie, Hautklinik der Medizinischen
Hochschule Hannover

21.02-21.03.2001

Pädiatrie, Kinderklinik, Remscheid

Praktisches Jahr

15.10-03.02.2002

Klinik für Chirurgie, Bethesda Krankenhaus
Wuppertal GmbH

04.02-26.05.2002

Klinik für Innere Medizin, Bethesda Krankenhaus
Wuppertal GmbH

27.05-15.09.2003

Universitäts-Hautklinik, St.Josef-Hospital, Bochum

Arzt im Praktikum

15.01-30.07.2003

Universität Osnabrück, Dermatologie-Umweltmedizin
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. H.J. Schwanzitz

01.08-15.07.2004

Institut für Dermatohistologie
Herrn Dr. med. D. Krahl

Assistenzärztin
16.07-14.10.2004

Seit 15.10.2004

Promotion
1999-2007

**Institut für Dermatohistologie
Herrn Dr. med. D. Krahl
Hautklinik für Dermatologie des
Universitätsklinikums Essen**

**An der Hautklinik Hannover bei Prof. Dr. med. A. Kapp
Thema: "DNA-Zytometrische Diagnostik von
Talgdrüsentumoren"**

Doktorväter: PD Dr. med. P. Kiehl

Prof. Dr. med. A. Kapp

Betreuer: Dr. med. M. Vogelbruch,

Dr. med. B. Völker

IX. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. P. Kiehl, der mir ein sehr interessantes Thema für meine Dissertationsarbeit gab und es mir ermöglichte den experimentellen Teil dieser Arbeit unter einmaligen Bedingungen und einer hervorragende Einleitung in das Arbeitsweise durch das MTA-Team in seinem histopathologischen Labor durchzuführen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Dr. med. M. Vogelbruch und Herrn Dr. med. B. Völker für Ihre enorme Arbeit während des experimentellen und des theoretischen Teils meiner Dissertation bedanken.

Danke an das Laborteam für die wunderbare Unterstützung und fabelhafte Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an die dermatohistopathologische Gemeinschaftspraxis Friedrichshafen und an das Institut für Dermatohistologie Herrn Dr. med. Krahl für die Bereitstellung von seltenen Präparaten der Talgdrüsentumoren.

Ein riesiges Dankeschön an Herrn Dr. med. C. Rose, der immer mich motiviert und an mich geglaubt hat.

Ein ganz großes Dankeschön an meine Familie: besonders an meine Mutter, an meinen Onkel Eduard und an meinen Großvater Alexander, die mich immer herausgefordert und unterstützt haben und für mich große Vorbilder sind.

Ein ganz liebes Dankeschön an meine Brüder Gennadij und Larry und an meinen Stiefvater, die immer für mich da waren.

Einen ganz lieben Dank an meine Kinder Rina und Michael, die mir viel Geduld und viel Ausdauer beigebracht haben.

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel "DNA-Zytometrie von Talgdrüsentumoren der Haut" in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Dr. med. M. Vogelbruch, PD Dr. med. P. Kiehl und Dr. med. B. Völker ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den 25.08.2008
