

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

Wertigkeit des nicht-invasiven, urin-basierten Tumormarker Tests NMP22  
Bladdercheck in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Cornelia Eibauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. U. R. Treiber  
2. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 22.04.2009 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009  
angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Ätiologie</b>	<b>1</b>
<b>1.3</b>	<b>Histologie</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Einteilung nach dem TNM-System</b>	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>Symptome</b>	<b>9</b>
<b>1.6</b>	<b>Diagnostik</b>	<b>9</b>
<b>1.7</b>	<b>Therapie</b>	<b>12</b>
1.7.1	Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms	13
1.7.2	Therapie des muskelinvasiven, nicht-metastasierten Harnblasenkarzinoms	15
1.7.3	Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms	19
<b>1.8</b>	<b>Nicht-invasive Blasentumormarker</b>	<b>19</b>
1.8.1	Früherkennung und Screening	19
1.8.2	Urinzytologie	22
1.8.3	BTA	24
1.8.4	BTA stat und BTA TRAK	25
1.8.5	FDP/FDP Accu-Dx	27
1.8.6	ImmunoCyt	28
1.8.7	QuantiCyt	29
1.8.8	UroVysion	29
1.8.9	Telomerase	31
<b>1.9</b>	<b>NMP22</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>40</b>

3.1.1	Untersuchungskollektiv	40
3.1.2	Ausschlusskriterien	40
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungsmethoden</b>	<b>41</b>
3.2.1	Der NMP22 ELISA Test	41
3.2.2	Der NMP22 BladderChek Test (POC)	43
<b>3.3</b>	<b>Statistische Methoden</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungskollektive</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>NMP22 ELISA Werte</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Sensitivität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC)</b>	<b>50</b>
4.3.1	Sensitivität der NMP22 ELISA Version	53
4.3.2	Sensitivität der NMP22 BladderChek POC Version	54
4.3.3	Sensitivitäten der NMP22 Versionen im Vergleich	54
<b>4.4</b>	<b>Spezifität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC)</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AUG	Ausscheidungsurogramm
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BTA	Bladder Tumor Associated Antigen
BTU	Blasentumor
BUGE	Benigne Urogenitale Erkrankungen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CE-MS	Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie
CFHrp	Complement Factor H related Protein
Cis	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
δ-ALA	δ-Aminolävulinsäure
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAU	European Association of Urology
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
G	Grading
GC	Gemcitabin/Cisplatin
HAL	Hexaaminolävulinsäure
HGPUC	High-grade Papillary Urothelial Carcinoma
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase
IgG	Immunglobulin G
ISUP	International Society of Urologic Pathologists
kA	keine Angaben
KI	Konfidenzintervall
LGPUC	Low-grade Papillary Urothelial Carcinoma
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin
MVEC	Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin

MW	Mittelwert
NMP	Nukleäres Matrix Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
POC	Point-of-Care Test
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasmas with Low Malignant Potential
RNA	Ribonukleinsäure
RT PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TNM	Tumor-/Lymphknoten-/Metastasen-Klassifizierung
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom stellt 2% aller malignen Tumoren dar. Es ist der 5. häufigste Tumor insgesamt, der 4. häufigste beim Mann und der 10. häufigste bei der Frau (beim Mann nach Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom). Die Inzidenz wird beim Mann mit 30 neuen Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner, bei der Frau mit 8 neuen Fällen pro Jahr pro 100 000 Einwohner angegeben. Somit bedeutet dies ein Auftreten von etwa 16 000 neuen Fällen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland (Huland, 2006, S. 202).

Männer sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Frauen, wobei der Unterschied mit wachsendem Alter steigt. In der Literatur wird das mittlere Alter von Patienten mit Harnblasenkarzinomen mit 65 bis 70 Jahren angegeben. Etwa 75% aller Patienten haben bei der Erstdiagnose ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom, 20% ein muskulinvasives und 5% ein bereits metastasiertes Harnblasenkarzinom. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms ist in industrialisierten Ländern höher als in ländlichen Regionen. Zwischen den Jahren 1939 und 1971 stieg die Inzidenz um 50% an (Huland, 2006, S. 202).

## 1.2 Ätiologie

Wesentliche Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Harnblasenkarzinom sind Alter und Geschlecht sowie die Zugehörigkeit zu einer Rasse und geographische Gesichtspunkte. So erkrankten weiße Amerikaner mit einer Inzidenz von etwa 21/100 000 Einwohner/Jahr, Amerikaner mit schwarzer Hautfarbe jedoch nur mit einer Inzidenz von 10/100 000 Einwohner/Jahr (Rübber, 2001, S. 86).

Wie bei kaum einem anderen urologischen Tumor sind Toxine im Hinblick auf die Kanzerogenese studiert und erkannt worden. 1895 hat der Chirurg Rehn bei Anilinfabrikarbeitern gehäuft Harnblasentumoren beobachtet (Huland, 2006, S. 202). Hueper et al. zeigten 1938, dass sich bei Hunden nach der Fütterung

von 2-Naphthylamin Transitionalzelltumoren der Harnblase entwickelten (Hueper, 1938, S.46). Dieser Beweis findet auch heute noch versicherungsrechtlich Anerkennung. Die bekanntesten menschlichen Blasenkarzinogene sind in Tabelle 1 angegeben. Die Latenzzeit zwischen Einwirkung der Noxe und Entwicklung des Karzinoms beträgt im Allgemeinen 10 bis 40 Jahre (Huland, 2006, S. 202).

<b>Chemische Farbstoffe</b>	1-Naphthylamin Auramin Fuchsin Benzidin Anilin (umstritten) 4-Amino-biphenyl Dichlorobenzidin Phenacetin Cyclophosphamid Chlornaphazin Orthotolidin
<b>Zigarettenkonsum</b>	
<b>Chronischer Harnwegsinfekt (Nitrosamine)</b>	
<b>Bilharziose</b>	
<b>Endemische (Balkan-)Nephropathie (Mykotoxine)</b>	
<b>Medikamente</b>	Chlornaphazin Phenacetin Cyclophosphamid
<b>Radiatio</b>	
<b>Kaffee (umstritten)</b>	
<b>Süßstoffe (umstritten)</b>	

Tabelle 1: Kanzerogene beim Urothelkarzinom (Huland, 2006, S. 203)

### **Aromatische Amine**

Aromatische Amine werden dadurch kanzerogen, dass sie in der Leber hydroxyliert und glukuronidiert und so über den Urin ausgeschieden werden. Über die N-Acetyltransferase können sie inaktiviert werden. Menschen, die genetisch bedingt schnell acetylieren, haben ein geringeres Krebsrisiko als sogenannte Langsam-Acetylierer (Huland, 2006, S. 202).

## **Rauchen**

Zigarettenraucher haben ein zwei bis sechsfach höheres Risiko, Blasen-tumoren zu entwickeln. Nach 40 Jahren Zigarettenkonsum ist das Risiko doppelt so groß wie nach 20 Jahren Zigarettenrauchen. Auch hierbei spielt das 2-Naphthylamin wohl die entscheidende Rolle (Huland, 2006, S. 202).

## **Medikamente**

Drei Medikamente konnten eindeutig mit der Ausbildung von Harnblasenkarzinomen in Verbindung gebracht werden:

- Chlornaphazin, ein Polyzythaemie-Therapeutikum, welches dem Beta-Naphthylamin chemisch verwandt ist, aber seit 1963 nicht mehr verwendet wird.
- Phenacetin, das außerdem zu einer interstitiellen Nephritis (Analgetika-Nephropathie) führt. Urothelkarzinome entstehen dabei bevorzugt im oberen Harntrakt. Das aktive Karzinogen ist ein Stickstoffhydroxylmetabolit des Phenacetins, welches chemisch die Struktur eines aromatischenamins aufweist.
- Cyclophosphamid: Seit Einführung der Cystitisprophylaxe mit Mesna ist jedoch das Blasen-tumorrisiko dieses Zytostatikums zu vernachlässigen (Huland, 2006, S. 203).

## **Chronische Harnwegsinfekte**

Insbesondere bei Dauerkatheterträgern kommt es häufig zur Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen in der Harnblase. Durch rezidivierende Infekte, Blasensteine und katheterbedingte persistierende Schleimhautirritationen sind besonders Patienten mit neurogenen Blasenentleerungsstörungen gefährdet (Huland, 2006, S. 203).

## **Bilharziose**

Die Bilharziose ist in weiten Teilen Afrikas und in arabischen Ländern endemisch. In der Akutphase der Infektion mit *Schistosoma haematobium* bilden sich in der Blase granulomatöse Polypen, die zunächst noch therapierbar sind. Kommt es zu einer chronischen Infektion, entstehen ebenfalls



Plattenepithelkarzinome. Als Ursache dafür kann man eine Nitrosaminbildung ansehen, die infektbedingt auftritt (Huland, 2006, S. 203).

### **Balkannephropathie**

Ein gehäuftes Auftreten von Urothelkarzinomen wurde in bestimmten Regionen des Balkans in Verbindung mit der Balkannephropathie beobachtet. 90% der Tumoren treten im oberen Harntrakt auf und 10% bilateral. Ätiologisch scheint ein saprophytisch wachsender Pilz im gelagerten Getreide eine Rolle zu spielen, welcher Nephrotoxine und karzinogene Mycotoxine bildet (Huland, 2006, S. 203).

## **1.3 Histologie**

Die Epithelschicht der Blase, das sogenannte Urothel besteht aus 6-7 Zellreihen. Die Schichtdicke des Urothels variiert je nach Lokalisation. Sie nimmt zum Nierenbecken hin ab, wo sich nur noch 2 bis 3 Zellreihen befinden. Dem Lumen zugewandt liegen Deck- oder Schirmzellen, auch „Umbrella cells“ genannt. Diese werden von einer sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht bedeckt, die eine Schleimschicht darstellt. Die der Muskelschicht zugewandten Seite des Epithels wird von einer Basalmembran begrenzt. Beim Harnblasenkarzinom kommt es zu einem Schichtungsverlust bis hin zu nicht mehr erkennbarer Schichtung (Huland, 2006, S. 203). Weitere Malignitätskriterien sind eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und eine Veränderung der Chromatinstruktur und der Kernkörperchen, was zu einer Entrundung der Zellkerne führt (Huland, 2006, S. 206). Über 90% der Harnblasenkarzinome sind histologisch Urothelkarzinome. In 3-5% finden sich Plattenepithel- und in 2-3% Adeno- bzw. undifferenzierte Karzinome. Sekundäre Blasentumoren durch Infiltration (weibliches Genitale, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) sind mit < 1% ausgesprochen selten (Anderström, 1983, S. 1273; Jakse, 1979, S. 86). Eine Sonderform des Blasenkarzinoms stellt das Carcinoma in situ (Cis) dar. Dabei handelt es sich um eine nicht die Lamina propria infiltrierende, intraepithelial wachsende Dysplasie mit Zeichen einer Entdifferenzierung (G3). Histologisch finden sich hierbei große Zellkerne mit hohem Chromatingehalt,

prominente Nukleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Außerdem findet sich eine Erhöhung der Zellschichten der Schleimhaut mit unregelmäßiger Zellanordnung. Das Carcinoma in situ kann sowohl als eigene Tumorentität als auch in Kombination mit einem anderen Blasen-Tumor vorkommen. In 38-83% entwickelt sich aus dem Carcinoma in situ innerhalb von 5 Jahren ein invasives Karzinom (Althausen, 1976, S. 577; Jakse, 1989, S. 213).

<b>Epitheliale Tumoren</b>	benigne	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transitionalzellpapillom (Sonderform diffuse Papillomatose)</li> <li>- invertiertes Transitionalzell-Papillom, plattenepitheliales Papillom</li> </ul>
	maligne	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Urothelkarzinom (herdförmig mit plattenepithelialer und/oder drüsiger Metaplasie)</li> <li>- Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, undifferenziertes Karzinom</li> </ul>
<b>Nichtepitheliale Tumoren</b>	benigne	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leiomyom, Neurofibrom, Hämangiom, Granularzelltumor</li> </ul>
	maligne	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Osteosarkom</li> </ul>
<b>Andere Tumoren („Miscellaneous“)</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phäochromozytom, Lymphom, Karzinosarkom, malignes Melanom</li> </ul>
<b>Metastasen / sekundäre lokale Infiltrationen</b>		
<b>Tumorartige Läsionen</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Follikuläre Zystitis, Malakoplakie, Amyloidose, fibröser (fibroepithelialer) Polyp, Endometriose, Hamartome, Zysten</li> </ul>
<b>Epitheliale Abnormalitäten</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- papilläre (polypoide) Zystitis, von Brunn`sche Zellnester, Cystitis cystica</li> <li>- glanduläre Metaplasie, plattenepitheliale Metaplasie</li> </ul>

Tabelle 2: Histologie von Harnblasenkarzinomen (Mostofi, 1973)

## **1.4 Einteilung nach dem TNM-System**

Die Beschreibung von Tumorausbreitung (TNM) und Differenzierungsgrad (G) der Blasentumoren geschieht gemäß den Richtlinien der Internationalen Union gegen den Krebs (UICC, 2002). Es finden sich häufig innerhalb eines Tumors verschiedene Differenzierungsgrade, wobei man sich bei der Beurteilung an dem Befund mit der am stärksten abweichenden Zellmorphologie orientiert. Der Differenzierungsgrad des Tumors korreliert mit dem Tumorstadium und der Überlebenszeit (Richie, 1989, S. 1012).

Etwa 70-80% der Harnblasenkarzinome werden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als nicht-muskelinvasiv diagnostiziert, d.h. sie sind auf die Mukosa oder die Lamina propria beschränkt (Stadien pTa, pT1 oder pTis). Hierbei wird maximal die Basalmembran infiltriert, die Blasenwandmuskulatur ist dabei jedoch nicht betroffen. Etwa 60-80% der Patienten mit nicht-muskelinvasiven Tumoren entwickeln trotz kompletter transurethraler Elektroresektion innerhalb von 4 Jahren Tumorrezidive, etwa 25% der Patienten erleiden dabei einen Progress (Kausch, 2003, S. 912).

In den folgenden Tabellen sind die Einteilungen des Harnblasenkarzinoms nach dem TNM-System sowie die Einteilung des Gradings gemäß den Vereinbarungen der WHO von 2004 dargestellt.

<b>T-Stadium</b>	<p>pTx Primärtumor kann nicht beurteilt werden</p> <p>pT0 Kein Anhalt für Primärtumor</p> <p>pTis Carcinoma in situ</p> <p>pTa Nicht-invasives papilläres Karzinom</p> <p>pT1 Infiltration subepithelial</p> <p>pT2 Invasion der Blasenmuskulatur</p> <p>pT2a Infiltration der oberflächlichen Muskulatur</p> <p>pT2b Infiltration der tiefen Muskulatur</p> <p>pT3 Infiltration des perivesikalen Gewebes</p> <p>pT3a Mikroskopisch</p> <p>pT3b Makroskopisch</p> <p>pT4 Infiltration von Prostata oder Uterus, Vagina, Becken oder Beckenwand</p> <p>pT4a Infiltration von Prostata, Uterus oder Vagina</p> <p>pT4b Infiltration von Becken- oder Bauchwand</p>
<b>N-Stadium</b>	<p>pN0 Kein Anhalt für regionäre Lymphknoten</p> <p>pN1 Metastase in solitärem Lymphknoten ≤ 2 cm in größter Ausdehnung</p> <p>pN2 Metastase in solitärem Lymphknoten &gt; 2 cm bis 5 cm in größter Ausdehnung oder mehreren Lymphknoten, keiner mehr als 5 cm</p> <p>pN3 Metastasen in Lymphknoten &gt; 5 cm in größter Ausdehnung</p>
<b>Histopathologisches Grading</b>	<p>pG1 Gut differenziert</p> <p>pG2 Mäßig differenziert</p> <p>pG3 Schlecht differenziert</p> <p>pG4 Undifferenziert</p>

Tabelle 3: Einteilung des Harnblasenkarzinoms nach dem TNM-System (Wittekind, 2005)

<p><b><u>Urotheliale Papillome</u></b></p> <p>Papilläre urotheliale Neoplasmen mit geringer Malignität (PUNLMP)</p> <p>Papilläre urotheliale Karzinome niedriger maligner Potenz</p> <p>Papilläre urotheliale Karzinome hoher maligner Potenz</p>
---

Tabelle 4: WHO Grading 2004 (Mostofi, 1999)

Von der WHO wurde in Zusammenarbeit mit der International Society of Urologic Pathologists (ISUP) 1998 eine neue Einteilung für nicht-invasive urotheliale Tumoren erarbeitet, die 2004 nochmals überarbeitet wurde (Hofmann, 2006, S. 92).

<u>Art der Läsion</u>	<u>Begriff</u>	<u>Beschreibung</u>
<u>Flache Läsionen</u>	<b>Urotheliale Hyperplasie</b>	Ausgesprochen verdickte Mukosa ohne zytologische Atypie
	<b>Urotheliale Atypie</b> Reaktive Atypie  Atypie unbekannter Wertigkeit	Veränderung im Zusammenhang mit akut oder chronisch entzündetem Urothel mit Zellkernveränderungen in eindeutigen Zusammenhang mit reaktiven/regenerativen Prozessen  Keine diagnostische Entität, deskriptive Kategorie für Entzündungen, bei denen die Ausprägung der Atypie das Ausmaß der Entzündung übersteigt und eine Dysplasie nicht ausgeschlossen werden kann
	<b>Urotheliale Dysplasie</b>	Dysplasie (gut differenzierte intraurotheliale Neoplasie) mit deutlichen Veränderungen in der Zytoarchitektur mit scheinbar präneoplastischem Charakter, geringer jedoch als ein Carzinoma in situ
	<b>Urotheliales Carcinoma in situ</b>	Eine nicht-papilläre, d.h. flache Läsion mit zytologisch malignen Zellen in der Epitheloberfläche
<u>Papilläre Läsionen</u>	<b>Urotheliale Papillome</b>	Exophytisch urotheliales Papillom mit einem feinen fibrovaskulärem Kern, bedeckt mit Urothel, das von normalem Urothel nicht zu unterscheiden ist
	<b>Inverse Papillome</b>	Benigner urothelialer Tumor mit einem inversen Wachstumsmuster mit normalen bis minimal atypischen neoplastischen Zellen
	<b>Papilläre urotheliale Neoplasmen mit geringer Malignität (PUNLMP)</b>	Papillärer urothelialer Tumor, vergleichbar mit einem exophytischen urothelialen Papillom, jedoch mit gesteigerter zellulärer Proliferation und daraus folgender übermäßiger Höhe des Urothels
	<b>Nicht-invasive papilläre urotheliale Karzinome, gut differenziert (LGPUC)</b>	Eine urotheliale Neoplasie entlang papillären Ausstülpungen mit einer geordneten Erscheinung, jedoch leicht zu identifizierenden Variationen in der Zytoarchitektur
	<b>Nicht-invasive papilläre urotheliale Karzinome, schlecht differenziert (HGPUC)</b>	Eine urotheliale Neoplasie entlang papillären Ausstülpungen mit einem ungeordnetem Wachstumsmuster mit mäßigen bis ausgeprägten zytologisch und architektonischen Atypien

Tabelle 5: Histopathologische Definitionen für nicht-invasive urotheliale Läsionen gemäß der WHO Klassifikation 2004 (Hofmann, 2006, S. 92)

## 1.5 Symptome

Blasentumoren bleiben in 20% zunächst ohne Symptome und werden lediglich anlässlich der Abklärung einer Mikrohämaturie, Makrohämaturie oder Leukozyturie entdeckt (Huland, 2006, S. 205). Das häufigste Symptom des Harnblasenkarzinoms ist die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie. Jede schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie muss solange als Zeichen für einen Tumor im Urogenitaltrakt angesehen werden, bis das Gegenteil bewiesen ist. Weitere Symptome sind Miktionsbeschwerden, wie Dysurie, Nykturie, Urgesymptomatik und Pollakisurie, sowie Schmerzen im Blasen- und Perinealbereich (Rübben, 2001, S. 103). Tumorwachstum im Bereich der Ureterostien verursacht eine uni- und/oder bilaterale Obstruktion, konsekutiven Harnstau und mögliche Flankenschmerzen bzw. Koliken.

## 1.6 Diagnostik

Die Diagnostik des Harnblasenkarzinoms zielt auf die Erfassung des Primärtumors sowie auf die Beurteilung des lokalen Tumorstadiums ab. Damit hat die Diagnostik auch das Ziel, Patienten mit unterschiedlicher Prognose voneinander abzugrenzen. Folgende nicht-invasive und invasive Untersuchungen werden bei dem Verdacht auf einen Blasentumor durchgeführt:

### **Nicht-invasive Diagnostik**

- Anamnese
- Körperliche Untersuchung, inkl. bimanueller Palpation
- Urinuntersuchung
- Zytologie: Spontanurin, Blasenspülung
- Ultraschall von Niere und Blase
- Ausscheidungsurogramm (AUG)
- CT, ggf. MRT

### **Invasive Diagnostik**

- Zystoskopie
- Fluoreszenzzystoskopie
- TUR-Blase, kalte Biopsie

### **Anamnese**

Die Anamnese beinhaltet Fragen zur klinischen Symptomatik wie Pollakisurie, Dysurie, Hämaturie und Schmerzen über der Blasen- sowie Dammregion. Zudem erfolgen Fragen zu Zweittumoren, insbesondere nach früheren Blasen-erkrankungen, so dass die Unterscheidung zwischen Primär- und Rezidivtumor möglich ist. Die Frage nach den Risikofaktoren ermöglicht den Bezug zu einer Berufskrankheit und bietet Möglichkeiten, über den Entzug einer noch bestehenden Karzinogenexposition den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen (Rübben, 2001, S. 103).

### **Untersuchung**

Die körperliche Untersuchung beinhaltet neben der Untersuchung der Nieren, der gefüllten Blase, der inguinalen Lymphknoten und des äußeren Genitales beim Mann auch eine digital-rektale Untersuchung der Prostata.

### **Urinanalyse**

Bei der Urinanalyse erfolgt zunächst die makroskopische Beurteilung. Grob-orientierend werden Farbbeschaffenheit (Hämaturie) und Trübung (Pyurie, Phosphate) beurteilt. Daran schließen sich die Bestimmung des spezifischen Gewichtes, des pH-Wertes und chemische Untersuchungen an, die als Streifen-teste durchgeführt werden. Hier ist auch das Erkennen einer Mikrohämaturie möglich. Zusätzlich erfolgt eine mikroskopische Beurteilung des Sediments.

### **Urinzytologie**

- Spontanurinzytologie:  
Spontanurin wird nach Zentrifugation, Fixierung und Färbung mikroskopisch untersucht.
- Blasenspülzytologie:  
Im Rahmen einer Zystoskopie wird die Blase mit NaCl 0.9% angespült und die Spüllösung in gleicher Technik wie der Spontanurin untersucht.

Bei der exfoliativ-zytologischen Untersuchung des Urins werden die mit dem Urin ausgeschiedenen Zellen (abgeschilferte Transitionalepithelzellen wie auch Karzinomzellen) nach zytologischen Kriterien wie Anisonukleose, Polymorphie, Hyperchromasie, Anisozytose, erhöhte Mitosezahl und vermehrtem Nukleolen-

gehalt beurteilt und somit auf Malignitätskriterien untersucht und graduiert (Weidner, 2006, S. 46).

### **Ausscheidungsurographie und Sonographie**

Tumoren des oberen Harntraktes finden sich in ca. 3% aller Fälle. Mit der Ausscheidungsurographie und Sonographie können pathologische Anomalien des Harntraktes detektiert werden. Sonographisch können Lebermetastasen sowie retroperitoneale Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (Rübben, 2001, S. 104).

### **Computertomographie/ Magnetresonanztomographie**

Eine Computertomographie kann einen Blasentumor zumeist darstellen und kann ebenso wie ein MRT Aufschluss über die Ausbreitung eines Tumors geben und gegebenenfalls eine Infiltration in benachbartes Gewebe oder metastasierendes Geschehen geben. Sie dient damit der Beurteilung der Tumorausbreitung. Diese wird dann gegebenenfalls durch ein CT des Thorax ergänzt.

### **Skelettszintigraphie**

Eine Skelettszintigraphie erfolgt zum Nachweis von Skelettfilae bei metastasierten Erkrankungen.

### **Bimanuelle Palpation**

Die bimanuelle Palpation erfolgt im Rahmen der TUR-B (Transurethrale Resektion der Harnblase). Fragestellung bei dieser Untersuchung ist, ob der Tumor im kleinen Becken fixiert ist und damit bereits ein Stadium T4b vorliegt. Die Untersuchung ist in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, insbesondere wenn der Patient sehr adipös oder im kleinen Becken voroperiert ist.

### **Zystoskopie/TUR-Blase**

Die größte Bedeutung in der Diagnostik hat die endoskopische Untersuchung der Blase, durch die die Lokalisation, die Anzahl und der Wachstumstyp der Tumoren ermittelt sowie die Differenzierung von nicht-muskelinvasiven und muskelinfiltrierenden Tumoren vorgenommen werden können.

Bei der TUR-B werden zunächst die exophytischen Tumoranteile reseziert. Resektionsanteile aus dem Tumorgrund und -rand sollten gesondert



histologisch untersucht werden, um die Infiltrationstiefe eindeutig zu bestimmen und Tumorfreiheit zu dokumentieren („differenzierte TUR-B“). Die TUR-B erlaubt die Beurteilung von Tumorart, Tumordifferenzierung und Blasenwandinfiltration. Die transurethrale Resektion von Harnblasenkarzinomen kann fluoreszenzkontrolliert nach intravesikaler Applikation von  $\delta$ -Aminolävulinsäure ( $\delta$ -ALA) durchgeführt werden. Die Fluoreszenzendoskopie erleichtert dabei das Auffinden kleiner papillärer Tumoren, insbesondere bei multifokalem Befall und das Auffinden von flachen Urothelneoplasien, wie dem Carcinoma in situ (Kriegmair, 1996, S. 665). Hierbei wird  $\delta$ -ALA in Natriumbikarbonatlösung gelöst und zwei Stunden vor der Zystoskopie intravesikal instilliert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mittels blauvioletter Licht, wobei die Fluoreszenz der Tumoren unter der Verwendung eines gelben Langpassfilters, welcher in das Okular der Beobachtungsoptik des Zystoskops eingebaut ist, erkannt werden kann (Kriegmair, 1995, S. 1340). Als biologisch verbesserter Fluoreszenzfarbstoff kommt derzeit die Hexaaminolävulinsäure (HAL) zum klinischen Einsatz (Hexvix<sup>R</sup>). Insbesondere bei Vorliegen eines Carcinomas in situ gelingt mit HAL eine deutlich verbesserte Tumordetektion (Schmidbauer, 2004, S. 135).

## **1.7 Therapie**

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms ist abhängig von verschiedenen Faktoren: Entscheidend sind die Zuordnung zum TNM-System, der Differenzierungsgrad und die Histologie des Tumors sowie die Anzahl der Tumoren und das Auftreten weiterer Tumoren in Nierenbecken, Harnleiter oder Urethra. Daneben spielen das Alter des Patienten, der Allgemeinzustand sowie die Compliance des Patienten eine wichtige Rolle.

Als Behandlungsmöglichkeit stehen Operation, intravesikale Chemo- oder Immuntherapie, Laserbestrahlung, systemische Chemotherapie und Strahlentherapie zur Verfügung. Diese Verfahren werden entweder als Monotherapie oder in Kombination miteinander eingesetzt.

### **1.7.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms**

Etwa 70% der Patienten mit einem Harnblasenkarzinom haben einen nicht-muskelinvasiven, gut differenzierten Tumor (Lahme, 2001, S. 75). Zu den nicht-muskelinvasiven Tumoren zählten bisher die pTa- und die pT1-Tumoren sowie das Carcinoma in situ (pTis, Cis). Neuerdings wird der pT1-Tumor als „invasiver“ Tumor eingestuft. Die Tumoren können einzeln oder multipel auftreten (Huland, 2006, S. 203). Ziel der Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist ein tumorfreies Überleben möglichst unter Erhalt einer funktionsfähigen Blase. Je früher ein Blasentumor diagnostiziert wird, desto weniger aggressiv ist die chirurgische Therapie, dies gilt vor allem für Patienten mit nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (Sharma, 1999, S. 53). Die TUR-B erfolgt zur Diagnosesicherung und dient damit dem Staging eines Blasentumors. Bei nicht-muskelinvasiven Tumoren stellt sie gleichzeitig die Therapie dar.

Zur Prognoseeinschätzung nicht-invasiver Harnblasenkarzinome dient der von der EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) entwickelte „Bladder-Calculator“. Ein Punktesystem teilt die Tumoren gemäß ihrem Risikoprofil hinsichtlich Rezidiv und Progression in drei Gruppen ein: niedriges, intermediäres und hohes Risiko (Sylvester, 2006, S. 473; Babjuk 2008, S. 309).

Die adäquate Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist die komplette chirurgische Entfernung, meist durch die fraktionierte transurethrale Resektion (TUR-B) (Huland, 2006, S. 209). Es erfolgt dabei zunächst die Resektion exophytischer Tumoranteile. Da das intramurale Wachstum über die Resektionsgrenzen des exophytischen Anteils hinausgehen kann („Eisbergphänomen“), schließt sich eine tiefe Resektion des Tumorgrundes und der Randgebiete an. Gleichzeitig kann in ausgewählten Fällen ein sogenanntes Mapping durchgeführt werden. Dabei werden zur Beurteilung der übrigen Blasenwand Probenbiopsien aus dem Blasenboden, den Seitenwänden, dem Blasendach und beim Mann aus der prostatistischen Harnröhre entnommen, um Begleittumoren, ein Carcinoma in situ oder Epitheldysplasien identifizieren zu

können (Hartung, 2006, S. 84). Ferner sollten zusätzlich alle suspekten Schleimhautareale biopsiert werden.

Bei unifokalen low-risk Tumoren (pTaG1 < 3 cm) ist aufgrund des geringen Risikos einer Progression oder einer Metastasierung bei vollständiger Resektion durch eine TUR-B die Prognose sehr gut. Zudem wird die Prognose durch das Auftreten eines Rezidivs nicht verschlechtert, so dass die Indikation zu einer längerdauernden, adjuvanten Chemotherapie als Rezidivprophylaxe nicht gestellt wird (Rübben, 2001, S. 124). Gemäß den Therapierichtlinien der European Association of Urology (EAU) zur Behandlung nicht invasiver Blasen Tumoren gilt die TUR-B zusammen mit einer adjuvanten intravesikalen Chemotherapie innerhalb der ersten sechs Stunden nach Resektion (Frühinstillation) als Standard. Als mögliche Chemotherapeutika stehen dabei Mitomycin C, Epirubicin oder Doxorubicin zur Verfügung (van der Meijden, 2002, S. 105).

Bei intermediate-risk Tumoren (Ta-1, G1-2, multifokale Tumoren oder Tumoren größer 3 cm) gilt als Standardtherapie die TUR-B mit initialer Frühinstillation eines Chemotherapeutikums. In der Regel erfolgt in dieser Gruppe eine erneute TUR-B nach 4-6 Wochen als Nachresektion. Es folgt eine adjuvante intravesikale Chemotherapie über maximal 6-12 Monate. Aufgrund geringer Nebenwirkungen wird zumeist Mitomycin verwendet. Therapeutisch wirksamer bezüglich der Reduktion der Tumorprogression und Rezidivprophylaxe ist in ausgewählten Fällen dieser Gruppe eine intravesikale Immuntherapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guérin), die jedoch auch mit mehr Nebenwirkungen verbunden ist (van der Meijden, 2002, S.105).

Zur Standardtherapie von high-risk Tumoren (Ta-T1, G3 mit oder ohne Cis oder bei solitärem Cis) gehören TUR-B, Frühinstillation von Chemotherapeutika, Nachresektion nach 4-6 Wochen und Beginn einer adjuvanten intravesikalen Immuntherapie mit BCG für die Dauer von mindestens einem Jahr (BCG-Erhaltungstherapie). Sollte sich darunter keine komplette Remission zeigen, ist eine radikale Zystektomie erforderlich (van der Meijden, 2002, S. 105).

### **1.7.2 Therapie des muskelinvasiven, nicht-metastasierten Harnblasenkarzinoms**

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zeigen 12% aller Harnblasenkarzinome ein so weit fortgeschrittenes Tumorstadium, dass neben dem Urothel und der Lamina propria die Blasenwandmuskulatur bereits infiltriert ist (Rübben, 2001, S. 130).

#### **Radikale Zystektomie**

Die radikale Zystektomie ist Therapie der Wahl bei muskelinvasiven, nicht-metastasierten Harnblasenkarzinomen sowie bei nicht-muskelinvasiven high-risk-Tumoren. Ziel ist dabei eine kurative Behandlung mit Verlängerung der Überlebenszeit unter weitgehender Erhaltung der Lebensqualität (Rübben, 2001, S. 111).

Beim Mann werden zusätzlich zur Blase die Prostata und die Samenblase entfernt, bei der Frau die Harnblase, Teile der vorderen Vaginalwand, sowie fakultativ eine oder beide Adnexe, der Uterus und gegebenenfalls die Urethra (Huland, 2006, S. 210). Die Indikation zur Entfernung der Urethra wird gestellt, wenn im Rahmen der TUR-B durch eine Biopsie ein invasiver Tumor oder ein Carcinoma in situ der Harnröhre gesichert wird. Allerdings erfolgt die endgültige Entscheidung während der Zystektomie in Abhängigkeit vom Ergebnis der Schnellschnitte des Harnröhrenabsetzungsrandes.

Zum Ausschluss einer lymphogenen Metastasierung wird im Rahmen der Zystektomie eine bilaterale pelvine Lymphadenektomie gegebenenfalls mit Schnellschnittuntersuchung der pelvinen Lymphknoten durchgeführt (Rübben 2001, S. 132). Der Einfluss der radikalen Zystektomie auf die 5-Jahres-Überlebensrate ist abhängig von dem zugrundeliegenden Tumorstadium und wird bestimmt durch die Infiltrationstiefe und die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung. Bei pT2-Tumoren finden sich hierfür in der Literatur Angaben von 64-76%, bei T3-Tumoren betragen die 5-Jahres-Überlebensraten 20-36%, sowie lediglich 6-25% bei T4-Tumoren (Rübben, 2000, S. 136). Bei Vorliegen von lokal weit fortgeschrittenen Tumorstadien mit entsprechender klinischer Symptomatik (z.B. Makrohämaturie) wird die Zystektomie auch als Palliativmaßnahme durchgeführt.

## Harnableitung

Wichtig für die Lebensqualität der Patienten, bei denen eine radikale Zystektomie als Therapie durchgeführt wird, ist die damit eng verknüpfte Frage nach der Harnableitung. Grundsätzlich wird bei der Harnableitung zwischen einer inkontinenten („nassen“) Form und einer kontinenten Form unterschieden.

Bei der kontinenten Form der Harnableitung wird ein neues natürliches Reservoir meist aus Darm gebildet. Folgende Methoden stehen zur Verfügung:

- Orthotoper Blasenersatz:           - Ileum-Neoblase
- Heterotoper Blasenersatz:       - Pouch mit katheterisierbarem Stoma  
  - Ureterosigmoidostomie  
  - Sigma/Rektum-Pouch (Mainz-II)

Bei der inkontinenten Form wird der Urin direkt aus dem Nierenbecken oder dem Harnleiter nach außen in ein externes Reservoir abgeleitet. Folgende Methoden stehen zur Verfügung:

- Ileum-Conduit
- Kolon-Conduit
- Ureterokutaneostomie
- Perkutane Nephrostomie

### Orthotoper Blasenersatz

Der Blasenersatz erfolgt mittels eines ausgeschalteten, 50-60 cm langen Dünndarmsegmentes, welches ca. 20 cm proximal der Ileozökalklappe ausgeschaltet wird. Daraus wird dann eine annähernd kugelförmige Neoblase konstruiert, die dann an den Stumpf der erhaltenen Urethra anastomosiert wird. Die beiden Harnleiter werden an bestimmten Stellen der Neoblase eingenäht. Die Neoblase kann unter Einsatz der Bauchpresse restharnfrei entleert werden (Huland, 2006, S. 210). Die Kontinenzergebnisse der Darmersatzblasen sind sehr gut und das zunächst nur beim Mann eingesetzte Operationsverfahren wird auch bei Frauen mittlerweile mit gutem Erfolg angewandt.

### Darmpouch mit kontinentem Stoma

Bei dieser Technik wird ein Stück Darm ausgeschaltet, antimesenterial eröffnet und in Form eines W oder V zu einer Kugel vernäht, in welche die Harnleiter implantiert werden. Es wird ein kontinentes Stoma konstruiert, das in die Bauchdecke oder den Nabel anastomosiert wird und vom Patienten selbst per Einmalkatheter entleert wird. Bei der Sonderform des Appendixpouches wird die Appendix antirefluxiv in die Darmwand eingebracht und mit dem Nabel verbunden (Huland, 2006, S. 211). Die Kontinenz wird dadurch erreicht, dass der Druck des Stomas den Druck im Reservoir jederzeit übersteigt (Rübben, 2001, S. 614).

### Ureterosigmoidostomie

Bei der Ureterosigmoidostomie handelt es sich um eine Form der kontinenten Harnableitung, bei der die Harnleiter antirefluxiv in das Sigma implantiert werden, das somit zugleich als Harn- und Stuhlreservoir dient. Voraussetzung für diese Art der Ableitung ist eine intakte Funktion des Analsphinkters. Als Spätkomplikation gilt das Kolonkarzinom, das bei 5% der Patienten auftritt (Rübben, 2001, S. 603). Indiziert ist die Ureterosigmoidostomie bei Patienten, bei denen die Harnröhre aufgrund eines Tumorbefalls nicht zur kontinenten Harnableitung herangezogen werden kann und andere Formen der Harnableitung nicht durchführbar sind.

### Rektumblase

Die Rektumblase gilt als eine Weiterentwicklung der Ureterosigmoidostomie. Dabei wird die Kapazität des Urinreservoirs vergrößert durch das Anbringen eines sogenannten Hemi-Kock-Pouches. Dabei wird ein ca. 45 cm langes Ileumsegment aus der Kontinuität ausgeschaltet und zu einem Pouch geformt, in den die Harnleiter implantiert und ca. 4-5 cm vom Anus entfernt seitlich an das Sigma anastomosiert werden. Dies wird als augmentierte Rektumblase bezeichnet.

Bei dem sogenannten Mainz-II-Pouch wird mit einem Stück Sigma zusammen mit dem Rektum ein Pouch gebildet.

Bei Rektumblasen besteht die Gefahr einer Karzinombildung im Bereich der ureterointestinalen Anastomose (Rübben, 2001, S. 605).

#### Ileum-Conduit

Bei der Bildung eines Ileum-Conduits oder einer sogenannten „Brickerblase“ wird ein ca. 15 cm langes Stück des terminalen Ileums ausgeschaltet und meist in den rechten Mittel-/Unterbauch als Stoma implantiert. Das Conduit hat hier die Funktion eines Durchlaufreservoirs (Huland, 2006, S. 210). Das Ileum-Conduit galt lange Zeit als Goldstandard der supravvesikalen Harnableitung, an dem jedes neue Verfahren gemessen wurde. Die allgemeine Zufriedenheit bei den Patienten ist hoch und das Verfahren ist immer noch Mittel der ersten Wahl, wenn andere Formen der Harnableitung nicht durchführbar sind oder vom Patienten abgelehnt werden (Bjerre, 1995, S. 204).

#### Kolon-Conduit

Das Kolon-Conduit wird im Prinzip nach dem gleichen Verfahren aufgebaut. Es werden dabei 10-15 cm aus der Kolonkontinuität ausgeschaltet und als Stoma in den Mittel-/Unterbauch implantiert. Die ursprünglich erwarteten Vorteile einer Reduktion der Stomastenosenkomplikationen und einer besseren Protektion des oberen Harntrakts konnten sich nach Langzeiterfahrung nicht bestätigen und somit konnte das Ileum-Conduit als Standard nicht abgelöst werden (Richie, 1986, S. 2611).

#### Perkutane Nephrostomie/ Ureterokutaneostomie

Bei der perkutanen Nephrostomie wird das Nierenhohlssystem perkutan unter Ultraschallkontrolle punktiert und der Urin nach außen abgeleitet.

Bei der Ureterokutaneostomie erfolgt die Ableitung über einen der Harnleiter, der von der Blase abgetrennt wird und in Form eines nach außen ableitenden Stomas im Hautniveau der ventrolateralen Bauchwand eingenäht wird. Beide Techniken werden zumeist nur palliativ angewandt oder wenn vorbestehende Darmerkrankungen als Kontraindikation für die zuvor beschriebenen Techniken bestehen (Rübben, 2001, S. 592).

### **1.7.3 Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms**

Die Langzeitüberlebensrate von Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen gilt als äußerst gering. Operative Maßnahmen haben sich nicht als sinnvoll erwiesen, auch Monochemotherapien führen nur selten zu einer klinischen Remission. Die höchsten objektiven Remissionsraten zeigten Cisplatin-basierte Kombinationstherapien. Seit langer Zeit galt das MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) (oder MVEC)-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin) als Goldstandard in der Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms. Diese wurde jedoch von der Kombination Gemcitabin und Cisplatin (GC) als primäre Therapie abgelöst (von der Maase, 2000, S. 3072), weil sich das mediane Überleben von etwa 14 Monaten in den beiden Armen dieser Studie (GC vs. MVAC) nicht signifikant unterschied, die klinische Toxizität der Kombination Gemcitabin/Cisplatin jedoch deutlich niedriger war als die des MVAC-Schemas.

Derzeit befinden sich eine große Anzahl von Chemotherapeutika und Substanzen zur sogenannten „targeted therapy“ meist in Form von Kombinationstherapien in klinischer Überprüfung, um Verbesserungen hinsichtlich Ansprechen, Überleben und Toxizität in first und second line Therapien beim metastasierten Urothelkarzinom zu erreichen.

## **1.8 Nicht-invasive Blasentumormarker**

### **1.8.1 Früherkennung und Screening**

Ausschlaggebend für die Prognose einer Tumorerkrankung ist der Zeitpunkt der Diagnose. Es wird allgemein angenommen, dass die Früherkennung von Krebs (auch sogenannte „Vorsorge“) ein ganz wesentlicher Faktor ist, der die Heilungschancen eines Patienten beeinflusst. Man nimmt an, dass theoretisch der Zeitraum von der Entartung einer einzelnen Zelle bis zu einer Tumorgroße, die diagnostisch nachweisbar ist, ca.  $\frac{3}{4}$  der Zeit umfasst, während die Phase, in der die Tumormasse letztendlich ein Ausmaß erreicht, das für den Patienten tödlich ist, nur noch  $\frac{1}{4}$  der Zeit beträgt (Cohen, 1990, S. 1009). Die Früherkennungsphase liegt zwischen der prinzipiellen Erkennbarkeit einer Krebserkrankung (z.B. durch Labortests, klinische Untersuchungen, bildgebende Ver-



fahren) und dem Auftreten von ersten Symptomen. Sind einmal Symptome durch eine Krebserkrankung aufgetreten, handelt es sich selten um eine wirkliche Früherkennung, sondern meist nur noch um die Erkennung einer Krebserkrankung (Hertle, 2006, S. 184). Zur eigentlichen Früherkennung werden sogenannte Screening-Verfahren eingesetzt. Unter Screening (= aussuchen, untersuchen, überprüfen) versteht man die Untersuchung möglichst zahlreicher asymptomatischer Personen nach deren Wahrscheinlichkeit erkrankt zu sein. Bei der Diagnostik und Behandlung des Prostatakarzinoms hat sich der Einsatz eines Tumormarkers, des prostataspezifischen Antigens (PSA), bewährt. Der Nachweis des prostataspezifischen Antigens im Serum erfordert bis auf die Entnahme venösen Blutes keine invasiven Untersuchungen, so dass sich für den Patienten dadurch keine Auswirkungen auf die Lebensqualität ergeben.

Ein idealer Tumormarker sollte kostengünstig und einfach anwendbar sein sowie hohe Werte für Sensitivität und Spezifität aufweisen. Zudem sollte das Ergebnis gut reproduzierbar, frei von subjektiven Interpretationsmöglichkeiten sowie vom Untersucher unabhängig sein und ohne großen technischen Aufwand flächendeckend eingesetzt werden können (Lokeshwar, 2001, S. 1068). Ein Tumormarker kann definiert werden als Substanz oder als Testsystem, das spezifisch ist für eine bestimmte Tumorart, d.h. der Nachweis einer Substanz muss sich deutlich unterscheiden von gesundem Gewebe desselben Organs, bzw. darf idealerweise in gesundem Gewebe nicht nachweisbar sein und muss abgrenzbar sein von Tumoren anderer Organe. Die Messung der Substanz muss zuverlässig und reproduzierbar möglich sein und das Messergebnis sollte möglichst unbeeinflusst von anderen Erkrankungen sein.

Das Ziel von Tumormarkern ist es im Allgemeinen, bei Patienten mit Risikofaktoren Screening-Untersuchungen zu ermöglichen, Primärtumoren zu diagnostizieren, Rezidive zu erkennen und die Prognose in Bezug auf einen Tumorprogress bei erkrankten Patienten zu bestimmen.

Bei Blasentumoren hat sich gezeigt, dass gut differenzierte, sogenannte low-grade Tumoren selten invasiv werden oder metastasieren sowie kaum Neigung zu Rezidiven zeigen. Anders dagegen verhalten sich schlecht differenzierte, sogenannte high-grade Tumoren. Ziel eines Blasentumormarkers sollte es sein, insbesondere high-grade Tumoren mit einer hohen Sensitivität nachzuweisen, bevor sie die Basalmembran durchbrechen. Ferner sollte er im Rahmen der Tumornachsorge eingesetzt werden können, um Rezidive ausschließen oder zumindest deren Auftreten frühzeitig erkennen zu können (Lokeshwar, 2001, S. 1068).

Da Urin mit Blasentumoren in Kontakt kommt, wurden viele Tests darauf ausgerichtet, Substanzen, die mit dem Wachstum oder der Invasivität von Harnblasentumoren in Verbindung stehen, im Urin nachzuweisen. Die bisher beim Harnblasenkarzinom entwickelten nicht-invasiven, urin-basierten Tumormarker nutzen die Untersuchung von Zellen, Proteinen oder DNA/RNA (Simon, 2003, S. 92). Eine Zusammenfassung bislang erforschter Marker und Markersysteme zeigt Tabelle 6.

<b>Basis des Tumormarkers</b>	<b>Tumormarker</b>
<b>Zellen</b>	Urinzytologie, ImmunoCyt, Quanticyt
<b>Proteine</b>	BTA, BTA stat, BTA TRAK, NMP22 ELISA, NMP22 BladderChek, BLCA 4, Survivin, FDP Accu-Dx, Hyaluronsäure, Lewis-X-Antigen, Cyfra 21-1, Tissue Polypeptide Antigen (TPA), UBC Test (Urine-bladder-cancer Test), Uroplakine, CD44
<b>DNA/RNA</b>	Telomerase, Mikrosatellitenanalyse, UroVysion

Tabelle 6: Urin-basierte, nicht-invasive Tumormarker beim Harnblasenkarzinom (Simon, 2003, S. 102; Kausch, 2003, S. 917)

Von der Food and Drug Administration (FDA), der amerikanischen Zulassungsbehörde für Medikamente, sind folgende Tumormarker für das Harnblasenkarzinom anerkannt: BTA stat, BTA TRAK, NMP22, Accu-Dx und ImmunoCyt (Simon, 2003, S. 102). BTA, BTA stat, BTA TRAK, NMP22 und FDP sind kommerziell erhältliche Testverfahren (Glas, 2003, S. 1976). Wegen technischer Probleme wurde der FDP Test von der Produktionsfirma jedoch wieder vom Markt genommen (Simon, 2003, S. 96).

### **1.8.2 Urinzytologie**

Derzeit ist unverändert die Urinzytologie zusammen mit der Zystoskopie als Goldstandard in der Diagnostik und der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms anzusehen. Sie wird seit 1945 in der Diagnostik von Harnblasenkarzinomen eingesetzt (Glas, 2003, S. 1975). Bei der Zytologie werden Zellen mikroskopisch untersucht, die sich vom Urothel in den Urin oder in eine Blasenspülflüssigkeit abgeschilfert haben. Die Untersuchung dient somit der Suche nach Tumorzellen im Harntrakt. Die ausgeschiedenen oder im Rahmen der Zystoskopie ausgespülten Zellen werden nach zytologischen Kriterien wie Anisonukleose, Polymorphie, Hyperchromasie, Anisozytose, erhöhte Mitosezahl und vermehrter Nukleolengehalt bezüglich ihrer Dignität beurteilt und graduiert. Spontanurin ist für eine Routineuntersuchung ausreichend, zum Teil wird jedoch die Gewinnung von Zellen durch eine Spülzytologie bevorzugt (Roth, 1991, S. 65).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
O'Donoghue	1991	265	82	98
Mondal and Banerjee	1992	139	94	93
Cajulis	1995	40	61	100
Kirollos	1997	54	100	100
Murphy	1997	62	54	100
Johnston	1997	130	35	90
Landman	1998	47	47	94
Wiener	1998	291	59	100
Van der Poel	1998	138	45	93
Pode	1998	260	48	98
Zippe	1999	330	33	100
Mian	1999	107	61	99
Sharna	1999	199	33	96
Ramakumar	1999	113	44	93
Miyanaga	1999	309	55	100
Nasuti	1999	100	100	96
Paoluzzi	1999	90	75	62
Casetta	2000	94	60	93
Planz	2000	80	48	100
Lee	2001	106	56	89
Zhang	2001	101	51	65
Chahal	2001	96	31	95
Priolo	2001	194	71	74
Lahme	2001	169	45	96
<b>Summe</b>	–	<b>3514</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>55</b>	<b>96</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>58</b>	<b>93</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>50-66</b>	<b>88-97</b>

Tabelle 7: Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie beim Harnblasenkarzinom

Die Spezifität der Urinzytologie beträgt in der Literatur 93% (88-97%), d.h. es treten kaum falsch positive Ergebnisse auf (Sanchez-Carbayo, 2001, S. 1465). Die Gesamtsensitivität in der Literatur beträgt 58% (50-66%). Diagnostische Versager sind durch hochdifferenzierte Tumoren bedingt, die in ihrem Zellbild normalem Urothel oder entzündlichen Veränderungen gleichen. Betrachtet man isoliert die Sensitivität für schlecht differenzierte Tumoren, finden sich Werte

von 80-90% (Landmann, 1998, S. 401; Soloway, 1996, S. 363). Die Zytologie hat somit eine hohe Sensitivität für die Entdeckung schlecht differenzierter Tumoren. Bei gut differenzierten Tumoren zeigt die Zytologie eine geringe Sensitivität von 12% (4-31%) für G1 Tumoren und 26% (17-37%) für G2 Tumoren (Lotan, 2003, S. 112). Aufgrund der geringen Sensitivität ist die Zytologie nicht geeignet zur Erkennung gut differenzierter Tumoren. Die Ergebnisse der Untersuchung sind zudem nicht sofort verfügbar und abhängig von der subjektiven Beurteilung durch den Untersucher (Konety, 2001, S.600).

### **1.8.3 BTA**

Unter dem Begriff BTA Test (Blasentumorantigen Test) lassen sich 3 verschiedene Tests subsumieren. Beim ursprünglichen BTA Test handelt es sich um einen Latex-Agglutinationstest zur qualitativen Erkennung von Basalmembranantigenen im Urin. Die epitheliale Basalmembran ist eine wichtige strukturelle Barriere zum Schutz gegen die Ausbreitung von Tumoren. Ein epithelialer Tumor kann nur invasiv wachsen und metastasieren, wenn er eine oder mehrere Schichten der Basalmembran durchbrechen kann. Die Basalmembran besteht hauptsächlich aus Laminin, einem Glykoprotein und Kollagen Typ IV. Kollagen Typ IV findet sich ausschließlich in Basalmembrangewebe und kann nicht durch interstitielle Kollagenasen zerstört werden (Conn, 1987, S. 536). Zellen von invasiv wachsenden Tumoren produzieren Enzyme, sogenannte Gewebsproteasen (Kollagenasen oder Laminasen), die die Basalmembran aufbrechen und Basalmembranfragmente in den Urin freigeben. Da der BTA Test auf dem Nachweis der Ausscheidung von Basalmembranfragmenten in den Urin beruht, ist die Sensitivität prinzipiell abhängig von dem Ausmaß der Gewebeerstörung, d.h. von der Invasivität des Tumors. In einer Studie von D´Hallewin zeigte sich jedoch auch eine Sensitivität von 65% für oberflächliche Tumoren. Möglicherweise kommt es bereits hier zu einer teilweisen Beschädigung der Basalmembran (D´Hallewin, 1996, S. 476).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Sarosdy	1995	499	40	96
D´Hallewin	1996	60	65	kA
Ianari	1997	75	59	91
Johnston	1997	130	28	87
Murphy	1997	62	29	79
Kirollos	1997	54	50	71
Landman	1998	kA	40	73
Van der Poel	1998	138	34	81
Zimmermann	1998	22	65	40
Nasuti	1999	100	100	84
Leyh	1999	345	80	91
Chong	1999	47	67	66
<b>Summe</b>	–	<b>1532</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>55</b>	<b>81</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>54</b>	<b>78</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>42-66</b>	<b>69-87</b>

Tabelle 8: Sensitivität und Spezifität des BTA Tests beim Harnblasenkarzinom

#### 1.8.4 BTA stat und BTA TRAK

Es folgte die Entwicklung des BTA stat Tests und des BTA TRAK Tests (Bard Diagnostics, Redmont, Washington). Diese sind jedoch aufgrund des völlig anderen Zielantigens nicht mit dem initialen BTA Test vergleichbar. Beide Tests weisen durch monoklonale Antikörper entweder das Komplementfaktor-H-Protein oder ein in seiner Struktur und Funktion sehr ähnliches Protein (Complement Factor H related protein: CFHrp) nach (Kinders, 1998, S. 2513). Der BTA stat Test ist ein qualitativer Point-of-Care Test, bei dem fünf Tropfen Urin in eine Vertiefung des Testsets eingebracht werden und das Ergebnis nach fünf Minuten abgelesen werden kann. Beim BTA TRAK Test handelt es sich um einen ELISA Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay Test) bei dem der humane Komplementfaktor H und das ihm verwandte Protein quantitativ nachgewiesen werden.

Mehrere Fallkontrollstudien und Kohortenstudien haben gezeigt, dass die Sensitivität der beiden Tests stark variiert und abhängig ist von T Stadium, Grading und Tumorgröße. Die Spezifität ist hoch bei gesunden Probanden,

jedoch weniger hoch bei Patienten mit benignen Erkrankungen (Lokeshwar, 2003, S. 45).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Ellis	1997	216	72	75
Irani	1997	81	78	63
Abbate	1998	109	62	98
Heicappell	1999	411	72	55
Mahnert	1999	134	62	53
Thomas	1999	96	76	53
Casetta	2000	94	57	57
Heicappell	2000	298	72	51
Priolo	2001	194	64	64
<b>Summe</b>	–	<b>1633</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>72</b>	<b>57</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>68</b>	<b>63</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>64-73</b>	<b>53-73</b>

Tabelle 9: Sensitivität und Spezifität des BTA TRAK Tests beim Harnblasenkarzinom

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Sarosdy	1997	220	58	72
Irani	1997	81	65	72
Wiener	1998	291	57	68
Pode	1998	250	83	69
Sozen	1999	140	70	68
Leyh	1999	105	73	52
Sharma	1999	278	67	82
Ramakumar	1999	196	74	73
Pode	1999	88	90	76
Nasuti	1999	100	100	84
Giannopoulos	2001	213	74	56
<b>Summe</b>	–	<b>1962</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>73</b>	<b>72</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>74</b>	<b>70</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>66-81</b>	<b>64-76</b>

Tabelle 10: Sensitivität und Spezifität des BTA stat Tests beim Harnblasenkarzinom

### 1.8.5 FDP/FDP Accu-Dx

Blasentumorzellen produzieren einen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF = vascular endothelial growth factor), der die Gefäßpermeabilität der kleinen Gefäße für Plasmaproteine erhöht, unter anderem für Plasminogen, Fibrinogen und andere Gerinnungsfaktoren. Diese Gerinnungsfaktoren wandeln Fibrinogen in Fibrin und Fibrinogenspaltprodukte (Fibrin degradation products = FDP) um. Es hat sich gezeigt, dass Fibrin und Fibrinogenspaltprodukte im Urin von Patienten mit Blasen Tumoren vermehrt vorkommen (Wajsman, 1978, S. 660). Der Accu-Dx (früher bekannt als Aura Tek FDP Test) ist ein Immunoassay Test zur qualitativen Messung von Fibrin und Fibrinogenspaltprodukten. Er ist sehr einfach durchzuführen und das Ergebnis ist innerhalb von zehn Minuten ablesbar (Schmetter, 1997, S. 801). Obwohl der Accu-Dx Test in Studien vielversprechende Werte für Sensitivität und Spezifität gezeigt hat (siehe Tabelle 11), wurde das Produkt vom Hersteller wegen aufgetretener Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse vom Markt genommen (Simon, 2003, S. 96).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
McCabe	1984	242	83	66
Ewing	1987	210	33	84
Schmetter	1997	192	76	86
Johnston	1997	130	81	75
Ramakumar	1999	196	52	91
<b>Summe</b>	–	<b>970</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>76</b>	<b>84</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>65</b>	<b>80</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>46-84</b>	<b>71-89</b>

Tabelle 11: Sensitivität und Spezifität des FDP Tests beim Harnblasenkarzinom



### 1.8.6 ImmunoCyt

Der ImmunoCyt Test kombiniert die Urinzytologie mit einem Fluoreszenztest. Der Test weist mit Hilfe von drei fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern zelluläre Tumorbestandteile in abgeschilferten Urothelzellen nach. Eine hochmolekulare Form des karzinoembryonalen Antigens (CEA) wird durch den Antikörper 19A211 nachgewiesen. Die Antikörper M344 und LDQ10 erkennen Muzine und hochmolekulare Glykoproteine, die sich auf der Oberfläche der meisten Blasenzellkarzinome befinden, nicht aber auf gesunden Zellen. Beim Blasenkarzinom wird ein Teil des Glykoproteingerüsts der Epithelzellen exponiert, da weniger Glycosylierung stattfindet als bei normalem Urothelgewebe (Bergeron, 1996, S. 6937). An die Proteine der Zelloberfläche können die beiden Antikörper M344 und LDQ10, die mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszin markiert sind, binden. Für den ImmunoCyt Test benötigt man 20-40 ml Urin, der sofort mit 50%igem Ethanol fixiert wird. Danach wird eine testeigene spezielle Fixationslösung hinzugegeben, die Zellen werden filtriert und auf Objektträgern zur immunocytochemischen Analyse fixiert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, so dass die Durchführung nur in einem speziellen Labor mit geschultem Personal erfolgen kann (Simon, 2003, S. 96).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Mian	1999	264	86	79
Olsson	2001	114	100	69
Vriesema	2001	86	50	73
Toma	2004	126	78	74
Hautmann	2004	94	63	75
<b>Summe</b>	–	<b>684</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>78</b>	<b>74</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>75</b>	<b>74</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>58-93</b>	<b>71-77</b>

Tabelle 12: Sensitivität und Spezifität des ImmunoCyt Tests beim Harnblasenkarzinom

### 1.8.7 QuantiCyt

QuantiCyt ist ein automatisiertes Testsystem, das Bildanalysen des Zellkerns erstellt. Es erkennt die Form des Zellkerns und den DNA-Gehalt abgeschilfter Zellen aus Spülflüssigkeit und teilt das Ergebnis in einen Score ein, der die Zellen in „gering-, mittel oder hochrisikoverdächtig“ bezüglich einer Tumorerkrankung klassifiziert (van der Poel, 1998, S. 51). Der Test beinhaltet das Fixieren und Färben einer Blasenspülflüssigkeit und das Importieren der Bilder in ein computergestütztes Bildanalyzesystem, das mit einem Mikroskop verbunden ist. Danach werden die Proben bezüglich verschiedener Zellkerncharakteristika beurteilt (van Rhijn, 2000, S. 366). Der Test erfordert im Idealfall eine Urinprobe, die durch eine Blasenspülung gewonnen wird und erfüllt damit nicht das Kriterium eines nicht-invasiven Blasentumormarkers. Darüber hinaus erfordert er ein hohes Maß an technischer Sachkenntnis und kostenintensiver Ausrüstung (Simon, 2003, S. 96).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Van der Poel	1998	138	69	73
Wiener	1998	291	59	93
Witjes	1998	50	45	71
Vriesema	2000	128	69	kA
<b>Summe</b>		<b>607</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>64</b>	<b>73</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>61</b>	<b>79</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>59-72</b>	<b>65-93</b>

Tabelle 13: Sensitivität und Spezifität des Quanticyt Tests beim Harnblasenkarzinom

kA = keine Angaben

### 1.8.8 UroVysion

Der UroVysion Test der Firma Abbott basiert auf der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Bei dieser molekulargenetischen Technik werden fluoreszenz-markierte DNA-Sonden genutzt, um eine bestimmte Zielsequenz in der DNA im Zellkern sichtbar zu machen. Die häufigste genetische

Veränderung bei malignen Tumoren des Urothels ist ein partieller oder kompletter Verlust des Chromosoms 9. Es wird vermutet, dass das p16-Gen auf 9p21 im Urothel als Tumor-Suppressor wirkt und unmittelbar durch Funktionsverlust infolge von Mutation und /oder Genverlust (Deletion) direkt an der Tumorentstehung beteiligt ist (Bubendorf, 2003, S. 5). Bei zunehmendem Progress des Tumors nimmt die chromosomale Instabilität und die Aneuploidie der Tumorzellen zu, meist sind dabei die Chromosomen 1, 3, 7, 9, 11 und 17 betroffen. Die FISH-Technik ist das beste Verfahren, charakteristische numerische und strukturelle Veränderungen von Chromosomen innerhalb der Zellen nachzuweisen und mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierten Gensonden sichtbar zu machen (Halling, 2000, S. 1769). Der UroVysion-FISH Test enthält eine Kombination von vier FISH-Sonden gegen die Chromosomen 3, 7, 17 und 9p21. Der UroVysion Test ist der erste von der FDA zugelassene molekulargenetische Urintest.

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Sokolova	2000	179	84	92
Ishiwata	2001	64	85	95
Halling	2002	265	81	96
Sarosdy	2002	451	71	95
Friedrich	2003	103	69	89
Varela-Garcia	2004	19	87	100
Toma	2004	126	69	89
Junker	2006	141	60	83
Akkad	2007	16	88	80
Moonen	2007	105	39	90
Riesz	2007	55	87	100
<b>Summe</b>	–	<b>1524</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>81</b>	<b>92</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>75</b>	<b>92</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>64-85</b>	<b>87-98</b>

Tabelle 14: Sensitivität und Spezifität des UroVysion Tests beim Harnblasenkarzinom

### 1.8.9 Telomerase

Telomere sind die natürlichen einzelsträngigen Chromosomenenden linearer Chromosomen. Sie sind ein wesentliches Strukturelement der DNA und für die Stabilität der Chromosomen verantwortlich. Mit jeder Zellteilung werden die Telomere verkürzt. Unterschreitet die Telomerlänge ein kritisches Minimum, so kann sich die Zelle nicht mehr weiter teilen, oft tritt dann der Zelltod ein oder ein permanenter Wachstumsstop. Das Enzym Telomerase ist ein RNA-Protein-komplex mit reverser Transkriptaseaktivität, das die Verkürzungen wieder ausgleichen kann. Aktiv ist die Telomerase in Embryonalzellen sowie in Stammzellen des Erwachsenen und in proliferierenden Krebszellen. Zellen, in denen dieses Enzym aktiv ist, können sich viel häufiger teilen als andere Körperzellen. Diesen Mechanismus machen sich Tumorzellen zu Nutze, um eine fortwährende Proliferation zu gewährleisten (Yoshida, 1997, S. 362). Da die Telomerase in den meisten Körperzellen nicht vorhanden ist, ist die Messung der Aktivität in den abgeschilferten Zellen im Urin ein möglicher Marker zum Nachweis von Harnblasenkarzinomzellen (Lokeshwar, 2001, S. 1073). Kim et al. entwickelten eine extrem sensitive Nachweismethode für die Telomerase mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die sogenannte TRAP (Telomeric repeat amplification protocol) - Methode (Kim, 1994, S. 2011). Der Test muss in speziellen Labors mit entsprechend ausgebildetem Personal und technischer Ausstattung durchgeführt werden. Kommerzielle Testsets mit speziellen Testprimern und Reagenzien optimieren dabei das Testergebnis (Lokeshwar, 2005, S. 48). Neben dem TRAP Test wurde der RT-PCR Test entwickelt, der den Gehalt an hTERT mRNA misst. hTERT ist eine Untereinheit der Telomerase und die Expression von hTERT mRNA steht in enger Verbindung mit der Aktivität der Telomerase (Ulaner, 1998, S. 4168).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Yoshida	1997	109	62	96
Ito	1997	59	76	96
Kinoshita	1997	45	55	100
Lance	1998	66	81	60
Landmann	1998	kA	80	80
Rahat	1999	33	81	79
Kavaler	1999	151	85	66
Ramakumar	1999	196	70	99
Gelmini	2000	53	82	90
Cheng	2000	49	82	91
Cassel	2001	73	84	24
<b>Summe</b>	–	<b>834</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	<b>81</b>	<b>90</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	<b>76</b>	<b>80</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	<b>69-82</b>	<b>65-95</b>

Tabelle 15: Sensitivität und Spezifität des Telomerase Tests beim Harnblasenkarzinom

kA = keine Angaben

## 1.9 NMP22

Ronald Berezney und Donald S. Coffey beschrieben 1974 erstmals die nukleäre Proteinmatrix im Zellkern von Rattenleberzellen. Sie hatten beobachtet, dass durch die chemischen Prozesse, die zur Extraktion der Zellkerne nötig waren, viele der wichtigen Zellkernbestandteile herausgelöst wurden, aber eine stabile Kernstruktur übrig und unbeschadet blieb. Diese Struktur wurde jedoch leicht durch das Hinzufügen von milden Proteasen, wie z.B. Trypsin oder Pronasen, zerstört. Dies ließ vermuten, dass der Zellkern aus einer Proteinmatrix besteht, die als struktureller Rahmen zur Aufrechterhaltung der sphärischen Form des Zellkerns dient und dass das eigentliche Skelett der Matrix aus spezifischen Kernproteinen besteht, den nukleären Matrixproteinen (NMP). Weitere Analysen ergaben, dass die Kernmatrix zu 98,4% aus Proteinen, zu 0,1% aus DNA, zu 1,2% aus RNA und zu 0,5% aus Phospholipiden besteht. Die Matrix besteht hauptsächlich aus drei verschiedenen Polypeptidfraktionen mit einem Molekulargewicht von 60-70 kD

sowie mehreren kleinen Polypeptiden (Berezney, 1974, S. 1411). Weitere Forschungen zur Funktion der NMPs ergaben, dass nukleäre Matrix als dynamisches Skelett die Form des Zellkerns bestimmt. Sie bildet die strukturelle Komponente des Zellkerns, welche die Morphologie bestimmt, sie organisiert den dreidimensionalen Aufbau der DNA, der gewebespezifisch ist und sie spielt eine zentrale Rolle bei der DNA-Replikation und Genexpression (Pardoll, 1980, S. 528). Die Untersuchungen von Fey und Penman haben gezeigt, dass es in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Matrixproteinmuster gibt (Fey, 1989, S. 123). Die gleichen Studien zeigten, dass sich die nukleäre Proteinmatrix entarteter Zellen unterscheidet von der Matrix gesunder Zellen, auch wenn sie aus derselben Zelllinie stammen. Der Unterschied in der Zusammensetzung der nukleären Proteinmatrix zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen bedingt eine veränderte Genexpression, die man bei malignen Zellen findet. Die Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen gleichen Ursprungsgewebes wurden von Partin (Partin, 1993, S. 744) beim Prostatakarzinom und von Khanuja et al. beim Mammakarzinom gefunden (Khanuja, 1993, S. 3397). Zwischenzeitlich wurden tumorspezifische nukleäre Matrixproteine für verschiedene andere Tumorarten identifiziert, darunter Nieren-, Kolon-, Zervix- und Lungentumoren sowie squamöse Zelltumoren von Hals und Kopf (Brünagel, 2002, S. 2441). Getzenberg et al. identifizierten für das Blasenkarzinom sechs nukleäre Matrixproteine in den Tumorzellen, die in normalem Urothel nicht nachweisbar waren und drei NMPs, die nur in normalem Gewebe nachweisbar waren, nicht aber in Tumorgewebe. Fünf der sechs tumorspezifischen NMPs waren in allen Tumorzelllinien von Harnblasenkarzinomen nachweisbar (Getzenberg, 1996, S. 1693). Diese spezifischen NMPs, darunter das NMP22, können sozusagen als „onkologische Fingerabdrücke“ der Tumoren angesehen werden, da mit ihrem Nachweis auf das Vorliegen von Tumorzellen geschlossen werden kann. Stirbt eine Tumorzelle (z.B. durch Apoptose), wird das Protein in messbaren Mengen freigesetzt. Die Konzentration von NMP22 konnte bei Patienten mit Blasentumoren in bis zu 25-facher Höhe gegenüber gesunden Probanden im Urin nachgewiesen werden (Keese, 1996, S.189). Aus Blasentumorzellen freigesetztes NMP22 wird mittels monoklonaler Antikörper bestimmt, die

spezifische Domänen des Proteins erkennen. Die Antikörper werden mit einem speziellen Verfahren, der sogenannten „genetischen Immunisierung“ gewonnen. Dabei wird das genetische Material des Testproteins in ein Tier eingebracht, die Zellen des Tiers produzieren daraufhin das Protein. Das Immunsystem erkennt jedoch das Protein als fremd und reagiert mit der Produktion von Antikörpern gegen das Testprotein. Die Zellen werden entfernt und mit Myelomzellen einer Maus verschmolzen. Somit erhält man Hybridzellen, die fortwährend Antikörper gegen das Zielprotein produzieren. Durch Klonen erhält man eine stabile Zelllinie, die nur eine Art von Antikörpern produziert. Eine genetische Immunisierung benötigt nur die Gensequenz des Proteins, nicht aber das Protein selbst. NMP22 ist ein nukleäres Matrixprotein, das mit Hilfe von 2D-PAGE Gelelektrophorese isoliert wurde (Brünagel, 2002, S. 2441). Das nukleäre Matrixprotein (NMP) ist in Tumorzellen in messbar erhöhter Konzentration vorhanden und wird beim Tod der Zelle mit dem Urin ausgeschieden. Die beiden Antikörper, welche in diesem Test enthalten sind, erkennen den Hauptanteil des nukleären Matrixproteins, das nukleäre Protein des Mitoseapparates mit einem Proteingewicht von 240 kD (Lokeshwar, 2001, S. 1072). Der Test erkennt sowohl Komplexe (>1000 kD) als auch Fragmente (~30kD) des nukleären Matrixproteins.

NMP22 wurde 1996 von der FDA (Food and Drug Administration), der amerikanischen Zulassungsbehörde, für die Diagnostik und die Nachsorge von Harnblasentumoren zugelassen.

Für den Nachweis von NMP22 stehen zwei verschiedene kommerzielle Tests zur Verfügung: der NMP22 ELISA Test der Firma Matritech Freiburg sowie der Point-of-Care Test derselben Firma, der NMP22 BladderChek. Die Durchführung wird unter 2.2 beschrieben.

Tabelle 16 und Tabelle 17 zeigen die Werte für Sensitivität und Spezifität der NMP22 ELISA Testversion und der NMP22 BladderChek POC Version, wie sie in der Literatur zu finden sind.

Autor	Jahr	Cut-off (U/ml)	Tumorart Prim/Rez.	Anzahl Patienten (n)	Anzahl BTU (n)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Abbate	1998	12	Prim	182	109	54	95
Miyanaga	1997	10	Prim/Rez	300	117	82	64
Landman	1998	7	Prim	kA	47	81	77
Del Nero	1999	6	Prim/Rez	105	75	82	87
Sharma	1999	10	Prim	278	34	82	82
Sözen	1999	12	Prim/Rez	140	40	73	85
Ramakumar	1999	3,6	Prim/Rez	196	57	53	60
Zippe	1999	10	Prim	330	18	100	85
Casella	2000	10	Prim	235	130	51	83
Menendez	2000	10	Prim/Rez	92	45	38	90
Chahal	2001	10	Prim/Rez	211	33	33	92
Giannopoulos	2001	8	Prim/Rez	213	118	64	75
Lahme	2001	10	Prim/Rez	169	40	63	79
Öge	2001	10	Prim/Rez	114	50	74	73
Ponsky	2001	10	Prim/Rez	608	52	89	84
Poulakis	2001	8,25	Prim/Rez	739	406	86	68
Sanchez-Carbayo	2001	10	Prim	187	43	61	90
Hautmann	2005	10	kA	75	52	87	83
<b>Summe</b>	–	–	–	<b>4174</b>	<b>1573</b>	–	–
<b>Median</b>	–	<b>10</b>	–	–	–	<b>74</b>	<b>83</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	<b>9,3</b>	–	–	–	<b>70</b>	<b>81</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	–	–	–	<b>61-79</b>	<b>76-86</b>

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität der NMP22 ELISA Version beim Harnblasenkarzinom

kA = keine Angaben

Die durchschnittliche Sensitivität aller Tumormarker einschließlich der Urinzytologie beträgt 72% (67-78%), die Spezifität 79% (74-85%). Die Vergleichbarkeit der Studien ist eingeschränkt durch die oft fehlenden Angaben zur Art der untersuchten Tumoren (Primär- oder Rezidivtumoren). Bei Rezidivtumoren ist die Sensitivität des Testverfahrens möglicherweise dadurch niedriger, dass eher Tumoren mit niedrigeren T-Stadien und Grading (1-2) auftreten als bei Kollektiven mit Primärtumoren.



<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Tumorart Prim/Rez.</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Anzahl BTU (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
Tomera	2003	Primär	248	18	61	99
Moonen	2005	Prim/Rez	106	29	62	91
Hautmann	2005	kA	75	52	85	91
Grossmann	2005	Primär	1331	79	56	86
Akkad	2005	Prim/Rez	90	kA	55	80
Grossman	2006	Rezidiv	668	103	50	87
Kumar	2006	Rezidiv	131	46	85	77
Tritschler	2007	Prim/Rez	100	40	65	40
<b>Summe</b>	–	–	<b>2749</b>	<b>367</b>	–	–
<b>Median</b>	–	–	–	–	<b>62</b>	<b>87</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	–	–	–	–	<b>65</b>	<b>81</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	–	–	–	–	<b>56-74</b>	<b>69-94</b>

Tabelle 17: Sensitivität und Spezifität der NMP22 BladderChek POC Version beim Harnblasenkarzinom

kA = keine Angaben

Tabelle 18 zeigt eine Zusammenfassung von publizierten Daten nicht-invasiver urin-basierter Tumormarker für das Harnblasenkarzinom ohne die Urinzytologie.

Tabelle 19 zeigt eine Zusammenfassung aller Studien über Urinzytologie und urin-basierte Tumormarker für das Harnblasenkarzinom.

<b>Tumormarker</b>	<b>Anzahl Studien (n)</b>	<b>Anzahl Patienten (n)</b>	<b>Sensitivität (%)</b>	<b>Spezifität (%)</b>
BTA	12	1532	54	78
BTA stat	11	1962	74	70
BTA TRAK	9	1633	68	63
FDP	5	970	65	80
ImmunoCyt	5	684	75	74
Quanticyt	4	607	61	79
Telomerase	11	834	76	80
NMP22 ELISA	18	4174	70	81
NMP22 BC	8	2749	65	81
Lewis-X-Antigen	1	260	79	86
Hyaluronsäure	1	144	92	93
Cyfra 21-1	3	225	94	69
TPA	1	111	88	55
BLCA 4	1	53	67	85
UBC Test	2	107	66	91
UroVysion	11	1524	75	92
<b>Summe</b>	<b>103</b>	<b>17569</b>	<b>–</b>	<b>–</b>
<b>Median</b>	<b>–</b>	<b>--</b>	<b>72</b>	<b>80</b>
<b>Mittelwert (MW)</b>	<b>–</b>	<b>–</b>	<b>73</b>	<b>79</b>
<b>95%-KI (vom MW)</b>	<b>–</b>	<b>–</b>	<b>68-78</b>	<b>73-84</b>

Tabelle 18: Sensitivität und Spezifität nicht-invasiver, urin-basierter Tumormarker beim Harnblasenkarzinom

	Urinzytologie	NMP22	Andere Tumormarker	Alle Tumormarker
<b>Anzahl Studien (n)</b>	24	26	77	127
<b>Anzahl Patienten (n)</b>	3514	6923	10646	21083
<b>Sensitivität (%)</b>				
<b>Median</b>	55	65	75	70
<b>Mittelwert (MW)</b>	58	68	74	72
<b>95% KI (vom MW)</b>	50-66	62-75	68-80	67-78
<b>Spezifität (%)</b>				
<b>Median</b>	96	84	80	80
<b>Mittelwert (MW)</b>	93	81	78	79
<b>95% KI (vom MW)</b>	88-97	76-86	72-84	74-85

Tabelle 19: Zusammenfassung der Sensitivität und Spezifität für Urinzytologie und nicht-invasive, urin-basierte Tumormarker beim Harnblasenkarzinom

## 2 Fragestellung

Das Harnblasenkarzinom wird oft erst in einem relativ späten Stadium symptomatisch und einer entsprechenden Diagnostik zugeführt. Goldstandard in der Primärdiagnostik und der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms sind derzeit die Urethrozystoskopie und die Urinzytologie. Die konventionelle Urinzytologie ist jedoch bei hoch- und mittelgradig differenzierten Karzinomen und bei nicht-muskelinvasiven Tumoren durch eine relativ niedrige Sensitivität gekennzeichnet und unterliegt einer deutlichen Untersucherabhängigkeit (Lokeshwar, 2005, S. 36). Die Zystoskopie ist invasiv, teuer und für den Patienten belastend. Derzeit existieren keine geeigneten nicht-invasiven urin-basierten Tumormarker, die für das Harnblasenkarzinom sowohl für die Primärdiagnostik als auch für die Tumornachsorge mit ausreichender Sicherheit ergänzend oder ersatzweise für die vorgenannten beiden Methoden eingesetzt werden können. Ziel der vorliegenden Studie war es, die diagnostische Wertigkeit (Sensitivität und Spezifität) des NMP22 BladderChek Tests, einer neuen Point-of-Care (POC) Version des NMP22 Tests, mit der bereits in klinischem Gebrauch befindlichen und von der FDA zugelassenen NMP22 ELISA Version als Tumormarker für Harnblasentumoren zu vergleichen.

Diese beiden Testversionen wurden vergleichend an einem Kollektiv von n=100 Patienten mit Primär- und Rezidivtumoren eines Harnblasenkarzinoms sowie an einem Kollektiv gesunder Probanden (n=30) und Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen (n=70) untersucht.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Patienten**

#### **3.1.1 Untersuchungskollektiv**

Im Rahmen einer prospektiven monozentrischen Studie wurden an der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München im Zeitraum von März 2004 bis Februar 2006 präoperative Proben des Spontanurins von n=100 Patienten mit einem nachfolgend histologisch gesichertem Urothelkarzinom der Harnblase vor transurethraler Resektion mittels des NMP22 ELISA Tests und der NMP22 BladderChek POC Version der Firma Matritech, Freiburg, untersucht. Bei n=71 Patienten lag ein Primärtumor vor, bei n=29 Patienten fanden sich Rezidivtumoren. Weiterhin wurden auf gleiche Weise die Proben von n=30 gesunden Probanden und n=70 Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen (Hydrocele, Spermatocele, benigne Prostatahyperplasie, Harninkontinenz, Harnröhrenstrikturen) untersucht.

#### **3.1.2 Ausschlusskriterien**

Sharma stellte in seiner Untersuchung bei der Analyse der falsch positiven Ergebnisse sowohl beim NMP22 Test als auch für den BTA stat Test fest, dass mehr als 80% der Patienten mit falsch positiven Testergebnissen in sechs Kategorien eingeteilt werden können:

- Harnwegsinfekt
- Fremdkörper im Harntrakt
- Steine im Harntrakt
- andere Karzinome als Harnblasenkarzinome
- Z.n. intravesikaler Chemo-/Immuntherapie
- Darminterponate im Harntrakt

Bei diesen Erkrankungen kommt es jeweils zu einem erhöhten Umsatz von epithelialeem Gewebe. Das NMP22 ist ein unspezifisches Protein, das bei

erhöhtem Zellumsatz vermehrt ausgeschieden wird. Somit kann jede dieser Erkrankungen zu einem erhöhten Wert für NMP22 im Urin führen und damit auch in Abwesenheit eines Tumors ein falsch positives Testergebnis erbringen (Sharma, 1999, S. 56). Patienten mit den oben genannten Erkrankungen wurden zur Vermeidung falsch positiver Testergebnisse in der vorliegenden Studie ausgeschlossen.

## **3.2 Untersuchungsmethoden**

Zur Durchführung der Urinuntersuchungen wurde von jedem Patienten oder Probanden eine Urinprobe (ca. 100 ml) aus dem Mittelstrahlurin des zweiten Morgenurins in einem sterilen Kunststoffsammlgefäß aufgefangen und unmittelbar nach Probengewinnung weiterverarbeitet. Zur Durchführung des ELISA Tests wurde unmittelbar auf Station ein spezielles Urinsammelgefäß, das vom Hersteller bereits mit einer spezifischen Stabilisatorlösung versetzt wurde, mit einem Teil der Urinprobe bis zur Füllmarke des Sammelgefäßes aufgefüllt und in das Forschungslabor der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München gebracht. Die Stabilisatorlösung dient der Stabilisierung des ansonsten im Urin instabilen NMP22. Von dem verbleibenden nativen Urin wurden unmittelbar 4 Tropfen auf die Testkassette der NMP22 POC Version getropft.

### **3.2.1 Der NMP22 ELISA Test**

Angewandt wurde der NMP22 Test Kit der Firma Matritech, Freiburg. Dieser ist ein leicht durchzuführender ELISA Test auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte. Er verwendet zwei monoklonale Antikörper, die spezifisch für das nukleäre Matrixprotein NMP22 sind. Auf der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte ist einer der Antikörper aufgetragen, der jeweils mit den Kalibratoren, den Kontrollen und der mit dem Stabilisator versetzten Urinprobe des Patienten zur Reaktion gebracht wird. Die Mikrotiterplatte wird ausgewaschen und das darauf gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, der an Digoxigenin (DIG) gebunden ist, erneut zur Reaktion gebracht. Nach nochmaligem Auswaschen wird der an Digoxigenin gebundene Antikörper mit Hilfe eines Antidigoxigenin-Antikörpers sichtbar gemacht, der an Meerrettichperoxidase

gekoppelt ist und O-Phenylendiamin als Substrat verwendet. Die Reaktion wird mit Hilfe von 2 molarer Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) beendet.

Die Konzentration des Antigens im Urin ist direkt proportional zur Intensität der Farbe der Lösung. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt dann mit Hilfe einer zu erstellenden Standardkurve. Die Standardkurven werden durch die gleichzeitige Testung der NMP22 Kalibratoren festgelegt, die nominal Werte zwischen 0 und 120 U/ml annehmen. Die entsprechenden Werte der Kalibratoren sind auf die Etiketten der Kalibratorfläschchen gedruckt (Matritech, Product Information, 2000).

Für die Durchführung des NMP22 ELISA Tests wurde unmittelbar nach der Uringewinnung auf den Stationen der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München das Urinsammelgefäß, das vom Hersteller bereits mit Stabilisator versetzt wurde, mit der Urinprobe bis zur Füllmarke aufgefüllt. Die stabilisierten Urinproben können hitzegeschützt ( $< 35^\circ\text{C}$ ) bis zu 48 h und bei  $+2-8^\circ\text{C}$  bis zu 72 h aufbewahrt werden. Zentrifugiert kann der Überstand bis zu einer Woche vor der Messung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bis zu 8 Wochen ist das Aufbewahren bei  $-20^\circ\text{C}$  möglich, für längere Aufbewahrungszeiten sind Temperaturen von  $-80^\circ\text{C}$  notwendig. Das Auftauen sollte bei Raumtemperatur erfolgen. Vor der Messung wird nach einer Tiefkühlagerung ein erneutes Abzentrifugieren empfohlen (Matritech, Product Information, 2000). Mit einem Test Kit können 40 Urinproben untersucht werden. 16 Positionen der 96-Lochplatte werden als Kontrollpositionen zur Testung der Kalibratoren verwendet. In die verbleibenden 80 Positionen werden die Proben von 40 Patienten gefüllt, so dass von jeder Urinprobe eine doppelte Messung durchgeführt werden kann. Aus den beiden Testergebnissen wird dann der Mittelwert errechnet. Bei der vorliegenden Untersuchung erfolgt die Stabilisierung des Urins der Patienten unmittelbar nach dessen Gewinnung. Die Proben wurden dann ebenfalls unmittelbar weiterverarbeitet und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Durchführung des ELISA Tests erfolgte innerhalb von 3 Monaten nach Probengewinnung. Als Cut-off wurde der Wert 10 U/ml verwendet. Messwerte von  $\geq 10$  U/ml wurden als positiv (= Tumornachweis) eingestuft.



Abbildung 1: Test Kit der NMP22 ELISA Version

### 3.2.2 Der NMP22 BladderChek Test (POC)

Bei dem NMP22 BladderChek Test der Firma Matritech, Freiburg, handelt es sich um einen Point-of-Care (POC) Test zum qualitativen immunochromatographischen Nachweis des nukleären Matrixproteins 22 im Urin (Abbildung 2). Der Test besteht aus einer Testkassette aus Kunststoff mit einem Teststreifen, der zwei monoklonale Antikörper enthält. Beide Antikörper sind gegen das nukleäre Matrixprotein gerichtet. Der Capture-Antikörper bindet das NMP22 aus dem Urin des Patienten, der zweite Antikörper ist mit kolloidalem Gold konjugiert und fungiert als Reporter-Antikörper. Die Urinprobe wird ohne Vorbehandlung auf die Auftragestelle der Testkassette aufgebracht und für 30 Minuten inkubiert (Abbildung 3 A). Enthält der Testurin Antigene, bilden diese mit dem Reporter-Antikörper Immunkomplexe, die über den Teststreifen wandern und die Testzone T erreichen, wo sie von Capture-Antikörpern „eingefangen“ werden. Bei einer erhöhten Antigenkonzentration (ab  $\geq 10$  U/ml Urin) im Harn wird eine Bande sichtbar (Abbildung 3B). In der Kontrollzone C befinden sich an die Festphase gebundene Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper, welche die Reporter-Antikörper binden und ebenfalls eine sichtbare Bande bilden. Damit wird der ordnungsgemäße Ablauf des Tests für den Anwender



sichtbar (Matriech, Product Information, 2000, Abbildung 3 B). Die NMP22 BladderChek Version ist somit in der Durchführung wesentlich einfacher als die ELISA Version und zudem unabhängig von einem spezialisierten Labor und das Ergebnis ist schnell verfügbar. Die Durchführung des Tests erfolgte unmittelbar nach Gewinnung des Urins (<10 Minuten). Zudem ist der BladderChek Test mit Kosten von etwa € 15-18 pro Untersuchung etwas kostengünstiger als eine Untersuchung per ELISA Test, welche im Durchschnitt etwa € 20-25 kostet (Firma Matriech, 2008).

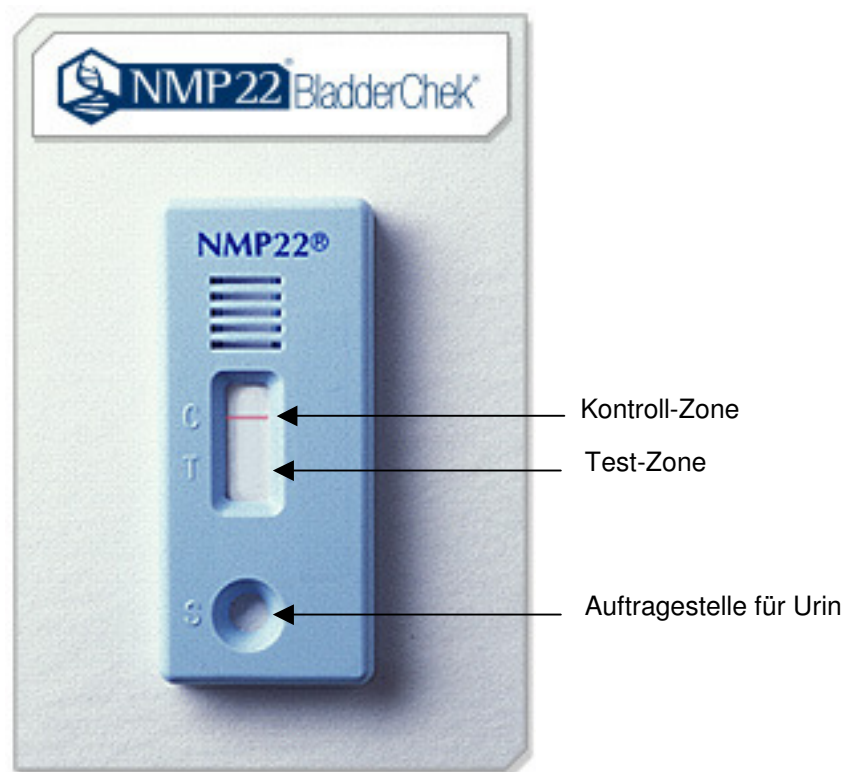


Abbildung 2: Testset der NMP22 BladderChek Version (Matriech, Freiburg)

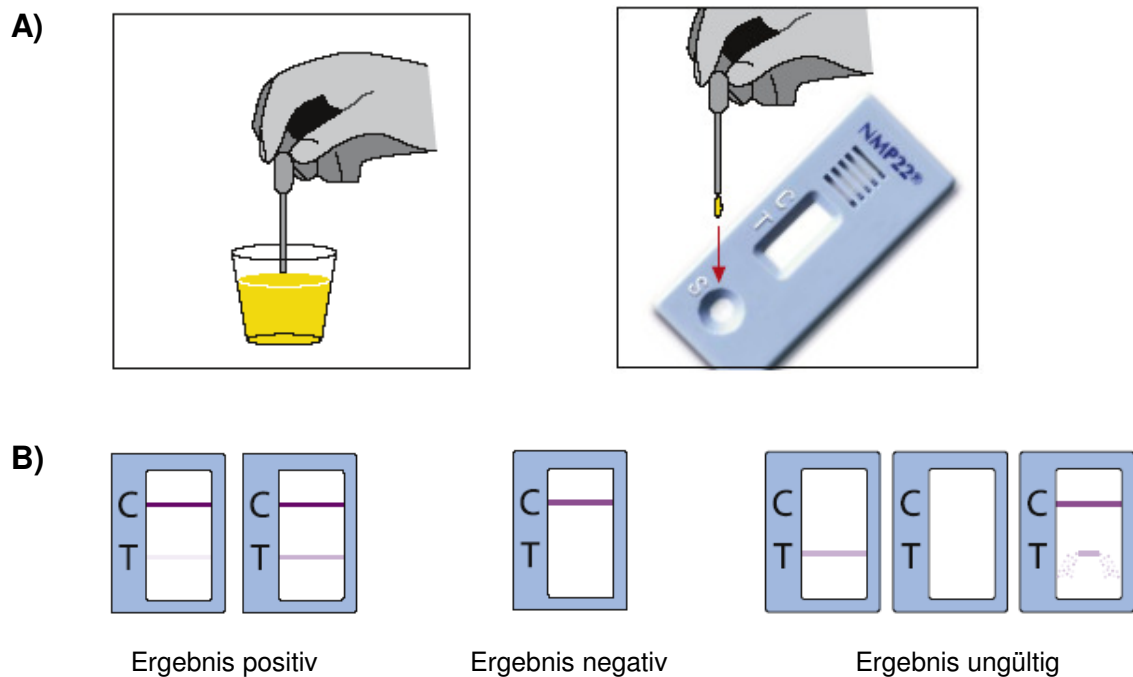


Abbildung 3: Durchführung des NMP22 BladderChek Tests

### 3.3 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. S. Wagenpfeil, Frau R. Hollweg und Herrn T. Schuster des Institutes für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. K. Kuhn). Verwendet wurde zudem das Buch „Angewandte Statistik“ von Lothar Sachs, Springer Verlag, 2002.

Zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der NMP22 BladderChek POC Version und der NMP22 ELISA Version wurde die Sensitivität und die Spezifität für die unterschiedlichen Kollektive von Patienten und Probanden berechnet (Sachs, 2002, S. 84):

Sensitivität = Richtig positive Tests / Alle getesteten Tumorpatienten

Spezifität = Richtig negative Tests / Alle getesteten tumorfreien Patienten  
bzw. Probanden

Für die Sensitivität und die Spezifität wurde jeweils das 95%-Konfidenzintervall ( $\alpha=0,05$ ) berechnet. Verwendet wurde dazu das Programm Microsoft Excel 2000.

Zur statistischen Auswertung der Messergebnisse für den NMP22 ELISA Test wurde der Kruskal-Wallis Test als nichtparametrischer Test für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben verwendet sowie der Mann-Whitney Test für den Vergleich von zwei unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Der Cut-off Wert für den NMP22 ELISA Test ist auf 10 U/ml festgelegt (Soloway, 1996, S. 363).

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Berechnungen für die NMP22 ELISA Werte, die Sensitivität und die Spezifität wurden jeweils nach Patientenkollektiven (Gesamttumorkollektiv, Primärtumoren, Rezidivtumoren, gesunde Probanden, Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen = BUGE) und nach T-Stadien und Grading unterteilt, in den Tabellen 21 und 22 zusammengefasst und in Form von Mittelwerten und 95%-Konfidenzintervallen graphisch dargestellt (Abbildungen 4 und 5).

### 4.1 Untersuchungskollektive

Bei den 100 Patienten mit Harnblasenkarzinomen lagen bei 71 Patienten Primärtumore und bei 29 Patienten Rezidivtumore vor. Der Anteil an Männern betrug 71 %, der Anteil an Frauen betrug 29%. Der Altersmittelwert aller Tumorpatienten betrug 67 Jahre (61-73 Jahre). Eine Aufteilung des Patientenkollektivs mit Harnblasenkarzinomen hinsichtlich Tumor-Art, T-Stadien und Grading ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tumorkollektiv	pTis	pTa	PT1	pT2-4	G1	G2	G3
<b>Gesamt (n)</b>	4	62	18	16	37	34	29
<b>Primär (n)</b>	0	40	16	15	22	25	14
<b>Rezidiv (n)</b>	4	22	2	1	15	9	15

Tabelle 20: Aufteilung des Patientenkollektivs mit Harnblasenkarzinomen nach Tumor-Art, T-Stadien und Grading (n=100)

Das Kollektiv der 70 Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen (BUGE), welche einer operativen Maßnahme unterzogen wurden, umfasste Patienten mit Hydrozelen, Spermatozelen, benignen Prostatahyperplasien und Harninkontinenz. Der Altersmittelwert dieser Patienten betrug 55 Jahre (49-71 Jahre).

Das Kollektiv der 30 gesunden Probanden hatte einen Altersdurchschnitt von 57 Jahren (48-69 Jahre).

## 4.2 NMP22 ELISA Werte

Für die NMP22 ELISA Werte wurden für jedes Patientenkollektiv der Mittelwert, der Medianwert und das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes berechnet und in der Tabelle 21 zusammengefasst. Tabelle 22 zeigt die Mittelwerte und die Medianwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall des Mittelwertes unterteilt nach T-Stadien und Grading für alle Tumorpatienten.

Kollektive	Alle-Tumoren n=100	Primär-Tumoren n=71	Rezidiv-Tumoren n=29	Gesunde Probanden n=30	BUGE-Patienten n=70
Median (U/ml)	5,3	5,1	5,5	1,6	2,6
Mittelwert (U/ml)	43,1	51,5	22,7	2,1	3,3
95%-KI (von MW)	18,6-67,6	17,8-84,9	3,7-41,7	1,4-2,7	2,7-3,8

Tabelle 21: NMP22 ELISA Werte des Gesamtkollektivs

T-Stadien/ Grading	pTis n=4	pTa n=62	pT1 n=18	pT2-4 n=16	G1 n=37	G2 n=34	G3 n=29
Median (U/ml)	1,7	3,6	26	63,2	2,8	10,8	17,7
Mittelwert (U/ml)	1,7	15,9	49,9	150,7	4,5	41,8	93,8
95%-KI (von MW)	0,4-3,0	5,5-26,5	19,5-80,3	16,2-285,1	3,0-5,9	18,2-65,4	16,7-170,9

Tabelle 22: NMP22 ELISA Werte in Abhängigkeit von T-Stadium und Grading für alle Patienten mit Harnblasenkarzinomen

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

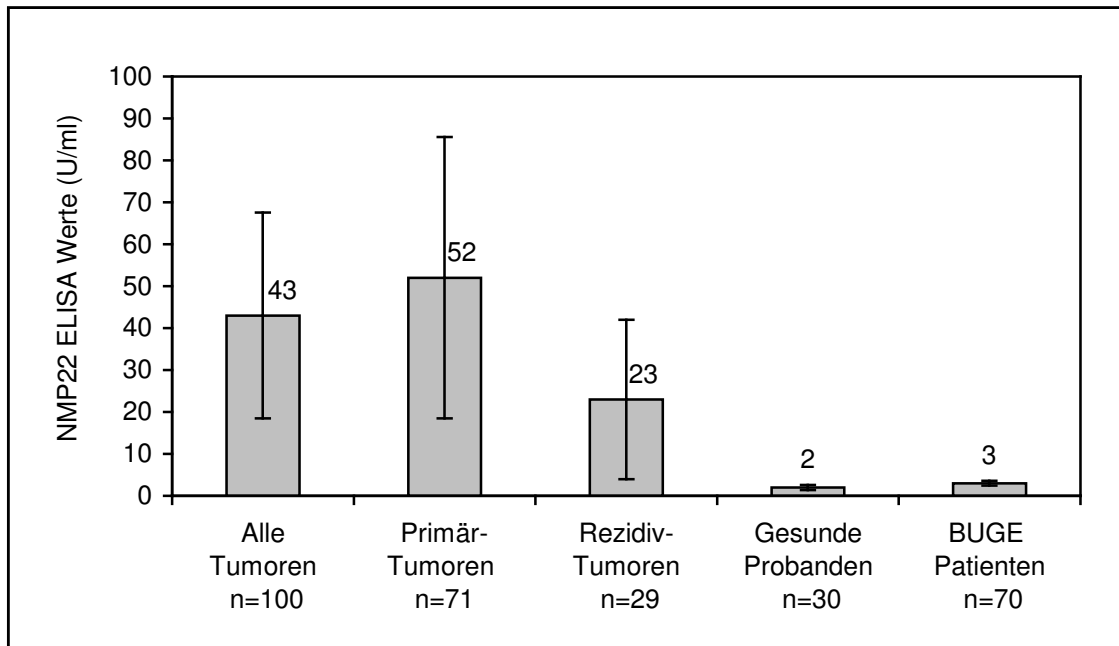


Abbildung 4: NMP22 ELISA Werte des Geamtkollektivs (Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

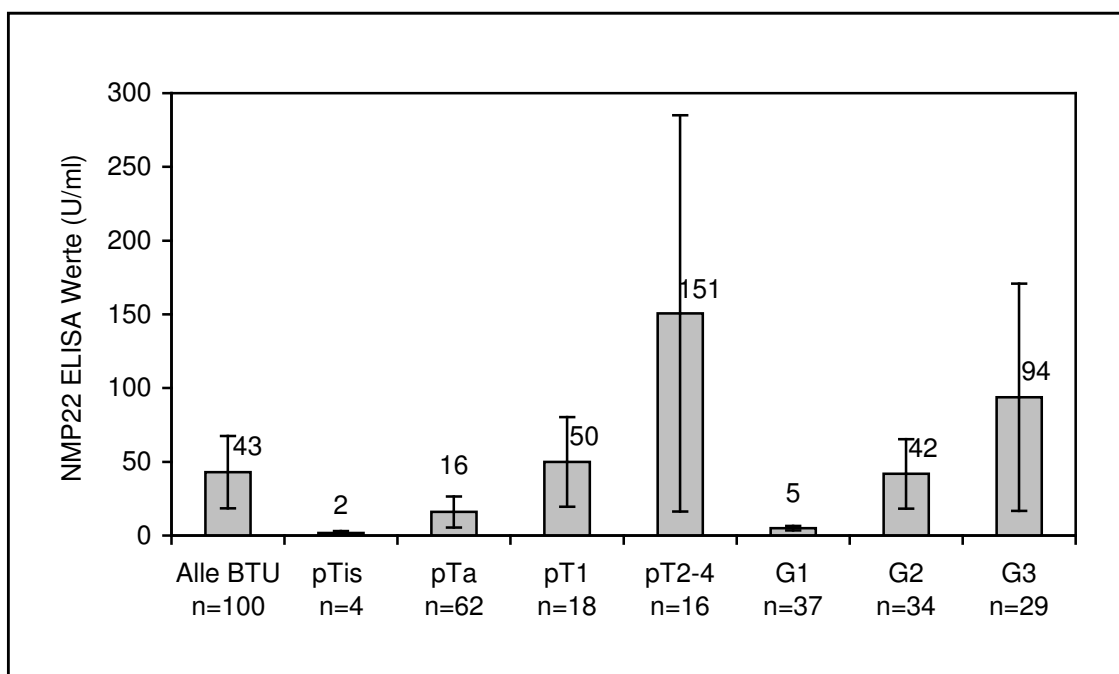


Abbildung 5: NMP22 ELISA Werte in Abhängigkeit von T-Stadium und Grading für alle Patienten mit Harnblasenkarzinomen (Mittelwert und 95% Konfidenzintervall)

Zwischen der Gruppe der Primärtumoren und der Gruppe der Rezidivtumoren ergab sich hinsichtlich der NMP22 ELISA Werte kein signifikanter Unterschied. Für das Gesamtkollektiv aller Patienten mit Harnblasenkarzinomen zeigte sich, dass mit zunehmendem T-Stadium und mit zunehmendem Grading die NMP22 Werte tendenziell anstiegen, d.h. der NMP22 Wert war abhängig von T-Stadien und Grading. Signifikant waren die Unterschiede beim Vergleich zwischen nicht-invasiven (pTis/pTa) und invasiven (pT1/pT2-4) Tumoren. Zudem bestand ein signifikanter Unterschied zwischen gut differenzierten Tumoren (G1) und mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren (G2 oder G3).

Signifikant verschieden von der Gruppe der Tumorpatienten waren jedoch die Werte des Kollektivs der Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen und der Gruppe der gesunden Probanden.

### **4.3 Sensitivität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC)**

Die Ergebnisse hinsichtlich der Sensitivität der beiden NMP 22 Testversionen (ELISA vs. POC) sind in der Tabelle 23 für das Gesamtkollektiv der Patienten mit Harnblasenkarzinomen zusammengefaßt und in den Abbildungen 6 und 7 jeweils im Vergleich dargestellt.

T-Stadien/Grading		pTis	pTa	pT1	pT2-4	G1	G2	G3
<b>Kollektiv aller Tumorpatienten</b>								
Anzahl Fälle (n)	100	4	62	18	16	37	34	29
Test + (n) ELISA	40	0	16	12	12	6	17	17
Test + (n) POC	59	1	27	15	16	10	26	23
Sens. (%) ELISA	40	0	26	67	75	16	50	59
Sens. (%) POC	59	25	44	83	100	27	77	79
<b>Primärtumoren</b>								
Anzahl Fälle (n)	71	0	40	16	15	22	25	24
Test + (n) ELISA	30	-	8	11	11	2	12	16
Test + (n) POC	45	-	17	13	15	5	19	21
Sens. (%) ELISA	42	-	20	69	73	9	48	67
Sens. (%) POC	63	-	43	81	100	23	76	88
<b>Rezidivtumoren</b>								
Anzahl Fälle (n)	29	4	22	2	1	15	9	5
Test + (n) ELISA	10	0	8	1	1	4	5	1
Test + (n) POC	14	1	10	2	1	5	7	2
Sens. (%) ELISA	34	0	36	27	100	20	34	36
Sens. (%) POC	48	25	46	100	100	33	78	40

Tabelle 23: Sensitivität (%) der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC) des Gesamtkollektivs der Patienten mit Harnblasenkarzinomen nach Subgruppen (Primärtumore vs. Rezidivtumore) unterteilt



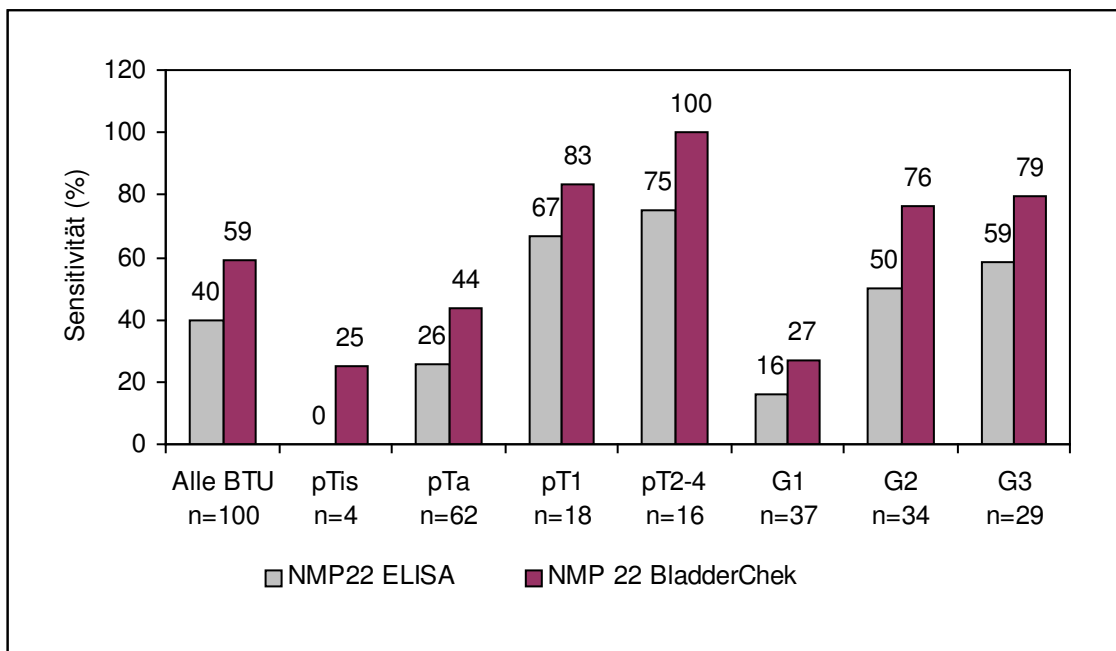


Abbildung 6: Sensitivität der NMP22 BladderChek POC Version und der NMP22 ELISA Version (Mittelwerte) im Vergleich für das Gesamttumorkollektiv

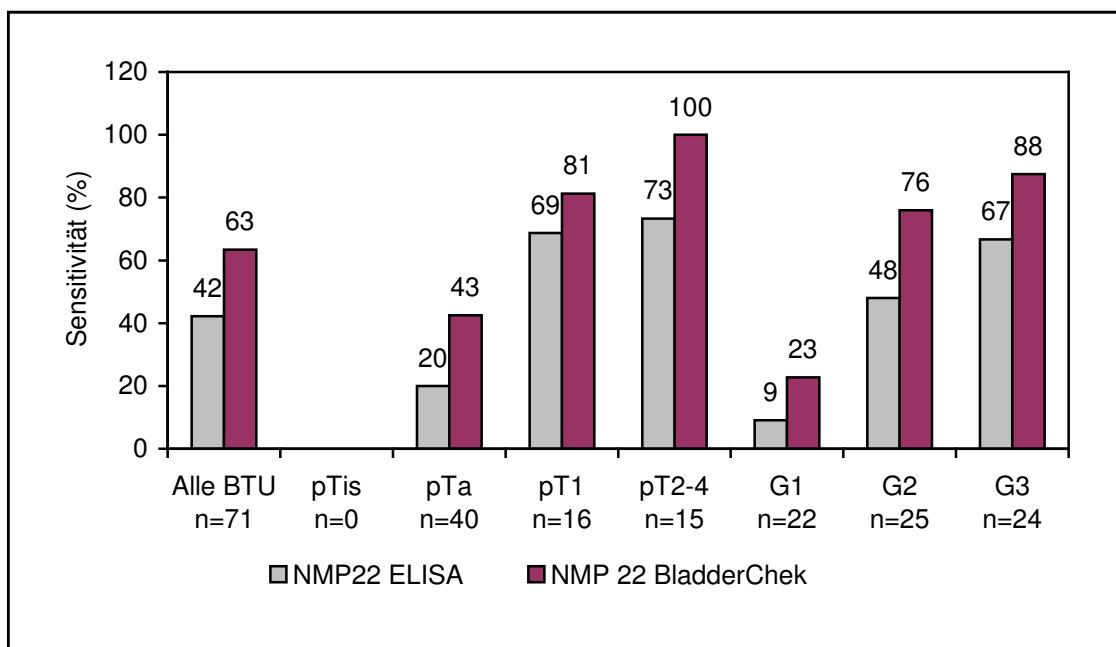


Abbildung 7: Sensitivität der NMP22 ELISA Version und der NMP22 BladderChek POC Version (Mittelwerte) im Vergleich für das Kollektiv der Primärtumoren

#### **4.3.1 Sensitivität der NMP22 ELISA Version**

Die Sensitivitäten für die NMP22 ELISA Version im Gesamttumorkollektiv (n=100) bzw. im Kollektiv der Primärtumoren (n=71) betragen 40% bzw. 42%. Der Unterschied zwischen den Werten war statistisch nicht signifikant. Die Werte für die Sensitivität der NMP22 ELISA Version zeigten für das Kollektiv aller Harnblasenkarzinome und für das Kollektiv der Primärtumoren eine Zunahme in Abhängigkeit von Tumorstadium und Grading. Signifikant waren die Unterschiede zwischen nicht-invasiven (pTis/pTa) und invasiven (pT1/pT2-4) Tumoren. Zudem bestand ein signifikanter Unterschied zwischen gut differenzierten Tumoren (G1) und mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren (G2 oder G3).

Die Sensitivität des NMP22 ELISA Tests für das Kollektiv der Rezidivtumoren (n=29) betrug 34% und war damit tendenziell niedriger als die Sensitivität des Gesamtkollektivs (40%) und des Kollektivs der Patienten mit Primärtumoren (42%). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Die Gruppe der Rezidivtumoren umfasste allerdings nur n=29 Patienten. Die weitere Aufteilung in Subgruppen bezüglich des Tumorstadiums und des Gradings führte zu so kleinen Patientenzahlen in den jeweiligen Untergruppen, dass eine weitere statistische Analyse des Kollektivs mit Rezidivtumoren nicht sinnvoll war.

#### **4.3.2 Sensitivität der NMP22 BladderChek POC Version**

Der Wert der Sensitivität der NMP22 BladderChek POC Version betrug im Gesamttumorkollektiv (n=100) 59%. Für die Primärtumoren (n=71) ergab sich ein Wert von 63% und für die Rezidivtumoren ein Wert von 48%. Der Unterschied zwischen den einzelnen Kollektiven war jedoch nicht signifikant. Die Werte für die Sensitivität der NMP22 BladderChek POC Version zeigten für das Kollektiv aller Harnblasenkarzinome und für das Kollektiv der Primärtumoren wie bei der NMP22 ELISA Version eine Zunahme der Sensitivität in Abhängigkeit von Tumorstadium und Grading. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen nicht-muskelinvasiven (pTa/pTis) und invasiven Tumoren (pT1/pT2-4) sowie zwischen gut differenzierten G1 Tumoren und schlecht differenzierten G2 oder G3 Tumoren.

Die Gruppe der Rezidivtumoren umfasste nur n=29 Patienten. Eine weitere statistische Auswertung der Subgruppen (T-Stadien und Grading) war aufgrund der geringen Anzahl der Fälle nicht sinnvoll.

#### **4.3.3 Sensitivitäten der NMP22 Versionen im Vergleich**

Der Vergleich der Sensitivitäten für ELISA- vs. POC-Version für die NMP22 Tests ergab für die POC-Version in allen drei Gruppen (Gesamtkollektiv, Primärtumoren, Rezidivtumoren) höhere Werte (59% vs. 63% vs. 48%) als für die ELISA-Version (40% vs. 42% vs. 34%). Ein statistisch signifikanter Unterschied fand sich zwischen den beiden Testversionen jedoch für keine der drei Gruppen.

#### 4.4 Spezifität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC)

Zur Beurteilung der Spezifität wurden die beiden Testversionen für NMP22 (ELISA und POC) an n=100 Personen durchgeführt. Dazu wurden n=70 Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen sowie n=30 gesunde, altersgleiche Probanden untersucht.

Hinsichtlich der Spezifität bestand in der vorliegenden Untersuchung kein diagnostischer Unterschied zwischen der NMP22 ELISA Version und der NMP22 BladderChek POC Version. Dies galt sowohl für das Gesamtkontrollkollektiv als auch für die beiden vorgenannten Untergruppen (gesunde Probanden und Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen). Bei den gesunden Probanden fanden sich bei beiden Testversionen Spezifitäten von jeweils 100%.

Bei den Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen waren die Werte für die Spezifität des NMP22 BladderChek POC Tests nominal etwas geringer als die Werte für den NMP22 ELISA Test (93% vs. 99%). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

	NMP22 ELISA	NMP22 BladderChek
<b>Gesamtkontrollkollektiv</b>		
Anzahl Fälle (n)	100	100
Test negativ (n)	99	95
Spezifität (%)	99	95
<b>Gesunde Probanden</b>		
Anzahl Fälle (n)	30	30
Test negativ (n)	30	30
Spezifität (%)	100	100
<b>Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen (BUGE)</b>		
Anzahl Fälle (n)	70	70
Test negativ (n)	69	65
Spezifität (%)	99	93

Tabelle 24: Spezifität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC) im Vergleich (n=100)

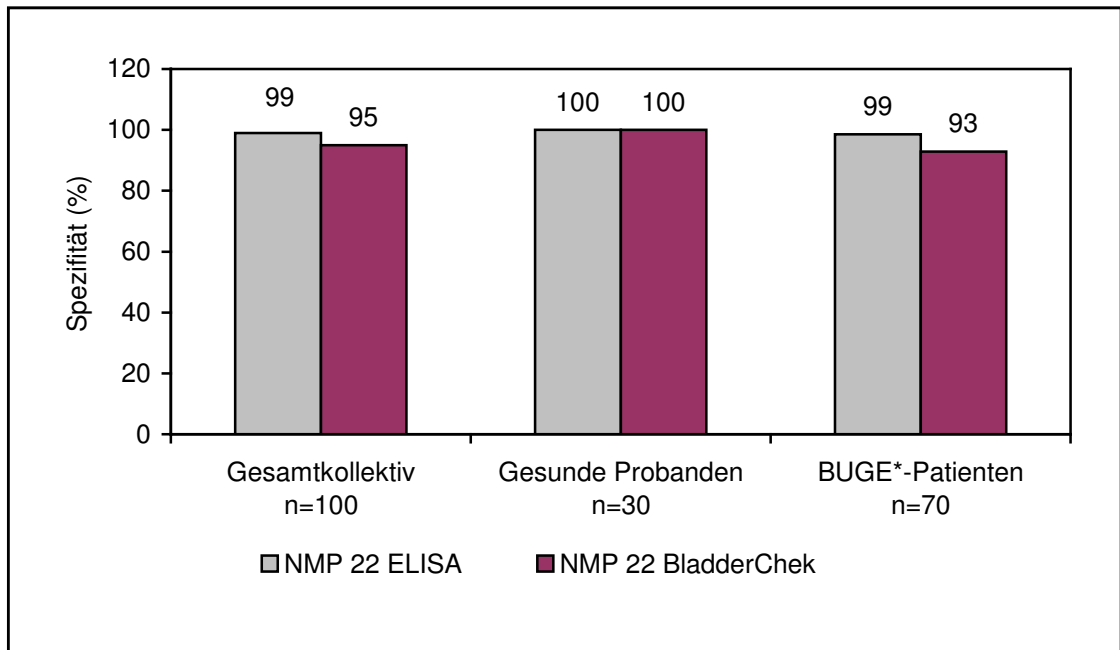


Abbildung 10: Spezifität der NMP22 Versionen (ELISA vs. POC) im Vergleich (Mittelwerte)

\*BUGE = Benigne urogenitale Erkrankungen

## 5 Diskussion

In der Diagnostik und der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms ist der Goldstandard derzeit die Urethrozystoskopie in Kombination mit der Urinzytologie. Anders als z.B. beim Prostatakarzinom, in dessen Diagnostik und Nachsorge das prostataspezifische Antigen (PSA) als Tumormarker etabliert ist, konnte für das Harnblasenkarzinom bisher kein geeigneter Marker für Diagnostik und Nachsorge etabliert werden.

Der NMP22 BladderChek Test der Firma Matritech, Freiburg, ist eine Weiterentwicklung des NMP22 ELISA Tests. Das neue Testformat ist ein semiquantitativer Point-of-Care Test (POC), der gegenüber der ELISA Version Vorteile in der Anwendung und Auswertung bietet (siehe 2.2.3).

Die bislang untersuchten „Tumormarker“ für das Harnblasenkarzinom (Tabelle 18) zeigten in der Literatur im Durchschnitt eine Gesamtsensitivität von 72% (66-78%) sowie eine Gesamtspezifität von 79% (73-84%). Die mittlere Sensitivität des NMP22 ELISA Tests in der Literatur lag bei 70% (61-79%), die Spezifität lag bei 81% (76-86%). Damit weisen Sensitivität und Spezifität des NMP 22 ELISA Tests keine Unterschiede zu den übrigen Markern auf. Für den NMP22 BladderChek Test lag die mittlere Sensitivität bei 65% (56-74%), d.h. etwas unter dem Mittelwert aller Tumormarker, und die Spezifität bei 81% (69-94%) und damit im Niveau des Mittelwertes der Spezifitäten für alle Tumormarker. Die Unterschiede waren jedoch statistisch jeweils nicht signifikant.

In der vorliegenden Studie wurde die Wertigkeit des NMP22 ELISA Tests mit der Wertigkeit des NMP22 BladderChek Tests anhand von Sensitivität und Spezifität verglichen. Die Sensitivität des NMP22 ELISA Tests betrug im gesamten Tumorkollektiv 40%. Für den BladderChek Test lag die Gesamtsensitivität bei 59%. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Gesamtspezifität des NMP22 ELISA Tests betrug 99% und die Gesamtspezifität des NMP22 BladderChek Tests erreichte 95%. Der Unterschied war ebenfalls nicht signifikant. Damit lag die Gesamtsensitivität des NMP22 ELISA Tests in der vorliegenden Studie (40%) deutlich unter dem

---

Durchschnittswert des NMP22 ELISA Wertes von 70% (61-79%) in der Literatur, während die Spezifität des NMP22 ELISA Tests in der vorliegenden Arbeit mit 99% über dem Vergleichswert von 81% (76-86%) in der Literatur lag. Für den NMP22 ELISA Test wurden ähnlich niedrige Ergebnisse für die Sensitivität auch bei anderen Autoren beschrieben (Chahal, 2001, S. 415; Menendez, 2000, S. 1169, Mahnert, 2003, S. 105). Der Mittelwert der Sensitivität in diesen Studien lag bei 34%. Als mögliche Ursache der niedrigen Sensitivität des NMP22 ELISA Tests kommen folgende Faktoren in Frage: eine lange Standzeit des Urins vor Beginn der Bearbeitung und damit eine verspätete Stabilisierung des Urins. Beides führt zu einem Zerfall des Antigens und damit potentiell zu falsch negativen Testergebnissen. Diese Störanfälligkeiten des Testverfahrens stellen Defizite dar und erschweren dessen Einsatz in Klinik und Praxis.

Ferner wurden in den in Tabelle 16 zusammengefaßten Studien für den NMP22 ELISA Test unterschiedliche Cut-off Werte verwendet. Diese betragen 3,6-12 U/ml, wobei in 11 von 18 Studien der Cut-off mit 10 U/ml festgelegt wurde.

Die Gesamtsensitivität des NMP22 BladderChek Tests der vorliegenden Untersuchung lag mit 59% nominal ebenfalls unter den Angaben von 65% (56-74%) in der Literatur. Die Spezifität lag mit 95% über dem mittleren Vergleichswert von 81% (69-94%) in der Literatur (Tabelle 17).

In der vorliegenden Studie fand sich eine Zunahme der Sensitivität bei einer Auftrennung des Tumorkollektivs nach T-Stadien und Grading. Die Sensitivität nahm für beide Testversionen jeweils von pTis nach pT2-4 zu, ebenso von G1 nach G3. Statistisch signifikant war der Unterschied der Sensitivitäten zwischen den Stadien pTis/pTa vs. pT1-4 und im Grading zwischen G1 vs. G2-3. Diese Korrelationen fanden sich auch in der Literatur für den NMP22 ELISA Test sowohl für die pT-Stadien<sup>1</sup> als auch für das Grading<sup>2</sup> bestätigt (<sup>1,2</sup>Chahal, 2001, S. 415; <sup>1</sup>Menendez, 2000, S. 1171; <sup>1</sup>Poulakis, 2001, S. 693; <sup>2</sup>Casella, 2000, S. 1926; <sup>2</sup>Sanchez-Carbayo, 2001, S. 1462; <sup>2</sup>Lahme, 2001, S. 72).

Teilte man das Gesamtkollektiv der Tumorpatienten der vorliegenden Untersuchung nach Primär- und Rezidivtumoren ein, ergaben sich für den NMP22 ELISA Test Sensitivitäten von 42% bzw. 34%, für den NMP22 Bladder-Chek Test Sensitivitäten von 63% bzw. 48%. Die Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität zwischen Primär- und Rezidivtumoren waren jeweils nicht statistisch signifikant. Auch der Vergleich der beiden Testverfahren in den einzelnen Gruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Bei einer weiteren Unterteilung des Primärkollektivs innerhalb der pT-Stadien und des Gradings fanden sich für die Sensitivitäten bei beiden Testverfahren statistisch die gleichen Ergebnisse wie für das Gesamtkollektiv. Eine Unterteilung und statistische Auswertung der Rezidivtumoren in Subgruppen (T-Stadien/Grading) war aufgrund der geringen Fallzahl (n = 29) statistisch nicht sinnvoll.

Unterteilte man das Gesamtkontrollkollektiv zur Bestimmung der Spezifität in zwei Kollektive (gesunde Probanden vs. Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen), ergaben sich für den NMP22 ELISA Test Spezifitäten von 100% bzw. 99%, während für den NMP22 BladderChek Test die Spezifitäten 100% bzw. 93% betragen. Der Unterschied hinsichtlich der Spezifität zwischen dem Kollektiv der Gesunden und dem Kollektiv der benignen urogenitalen Erkrankungen war für beide Testverfahren statistisch nicht signifikant. Vergleich man die Spezifität des BladderChek Tests mit der Spezifität des NMP22 ELISA Tests in den beiden Untergruppen, zeigte sich ebenfalls keine statistische Signifikanz.

Die beiden NMP22 Testverfahren der vorliegenden Untersuchung waren somit den Ergebnissen der Urinzytologie aus der Literatur bezüglich der Sensitivität bei low-grade und low-stage Tumoren überlegen. Die Gesamtsensitivität der Zytologie betrug in der Literatur 58% (50-66%) (siehe Tabelle 7) und war ebenfalls abhängig von T-Stadium und Grading mit einem Maximum von 64% für G3 Tumoren und von 55% für pT2-4 Tumoren (Lotan, 2003, S. 114).

Die mittlere Spezifität der Urinzytologie in der Literatur war mit 93% (88-97%) (siehe Tabelle 7) höher als die mittleren Spezifitäten des NMP22 ELISA und



des NMP22 BladderChek, welche mittels der Literaturstellen mit jeweils 81% (76-86% bzw. 69-94%) berechnet wurden.

Die für die vorliegende Untersuchung errechneten Werte für die Spezifitäten von NMP22 ELISA (99%) und NMP22 BladderChek (95%) wiesen damit keinen Unterschied zu dem in der Literatur berechneten mittleren Wert für die Spezifität der Urinzytologie (93%) auf.

Die einzige in der Literatur verfügbare Vergleichsstudie von NMP22 ELISA vs. NMP22 BladderChek (POC-Version) erfolgte durch Hautmann und Mitarbeiter (Hautmann, 2005, # 63). Die Sensitivitäten betragen bei einer geringen Anzahl von Tumorpatienten (n=52) 87% vs. 85% und waren nicht signifikant unterschiedlich. Ebenso keinen Unterschied ergaben die Spezifitäten für beide Testversionen (ELISA: 83% vs. POC: 91%) bei einem kleinen Kollektiv von nur 23 Patienten mit verschiedenen urogenitalen Erkrankungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigten niedrigere Sensitivitäten (40% vs. 59%) und Spezifitäten, die für die ELISA-Version mit 99% etwas über und für die POC-Version mit 95% etwa gleich den Werten von Hautmann und Mitarbeiter waren.

Allgemein ist bei Auswertung und Vergleich publizierter Studien zur diagnostischen Wertigkeit von Tumormarkern zu bemängeln, dass oft Angaben zur Zusammensetzung des Patientenkollektivs (Anzahl Primär-, Rezidivtumoren, Verteilung des Kollektivs nach pT-Stadien und Grading) fehlen. Dies erschwert die Vergleichbarkeit erheblich, ebenso wie die Verwendung unterschiedlicher Cut-off Werte für den NMP22 ELISA Test.

Aufgrund der bereits beschriebenen deutlichen Vorteile bei der Anwendung des NMP22 BladderChek Tests gegenüber der NMP22 ELISA Version, die durch die größere Anzahl präanalytischer Schritte störanfälliger ist, scheint die POC Version des NMP22 vorteilhafter zu sein. Die Durchführung von Multicenterstudien zum direkten Vergleich der beiden Verfahren mit wesentlich größeren Patientengruppen sind zur besseren Beurteilung der diagnostischen Effektivität der POC Version sinnvoll. Im Vergleich zu den mittleren Werten der

---

bisher untersuchten Tumormarker des Harnblasenkarzinoms mit einer mittleren Sensitivität von 73% (68-78%) und einer mittleren Spezifität von 79% (73-84%) kommt der BladderChek als POC Version mit einer Gesamtsensitivität von 59% und einer Gesamtspezifität von 95% den Ergebnissen der bisher untersuchten Tumormarker näher als die ELISA Version des NMP22.

Allerdings sind bisher weder eine der beiden NMP22 Testversionen noch andere sogenannte Blasentumormarker geeignet, eine oder gar beide der Goldstandards in der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, die Urethrozystoskopie und die Urinzytologie, zu ergänzen oder zu ersetzen (Lokeshwar, 2005, S. 63; Habuchi 2005, S. 73, Vrooman, 2008, S. 916). Unverändert wird jedoch die Suche nach einem „idealen“ Tumormarker, der mit hoher Genauigkeit in Diagnostik und Nachsorge beim Harnblasenkarzinom einsetzbar ist, mit großer Anstrengung fortgesetzt.

Theodorescu und Mitarbeiter (Theodorescu, 2006, S. 230) konnten erstmals für ein proteomics-basiertes Testverfahren in einer Studie bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen (n=46) eine Sensitivität und Spezifität von jeweils >90% nachweisen. Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) konnte ein charakteristisches Polypeptidmuster in Urinproben von Patienten mit Harnblasenkarzinomen identifiziert werden. Hierbei stellt das Fibrinopeptid A, das bei Ovarial- und Magenkarzinomen vermehrt exprimiert wird, die Hauptkomponente eines definierten Polypeptidmusters dar.

Hinsichtlich neuerer urin-basierter Tumormarker mit dem Nachweis von Proteinen liegen zwischenzeitlich Studienergebnisse für das nukleäre Matrixprotein BLCA-4 sowie das System Hyaluronsäure/Hyaluronidase (HA-HAse Test) vor (Vroomann, 2008, S. 909). Die bei diesen Testsystemen beobachteten Sensitivitäten liegen im Bereich 89-96% (BLCA-4) und 83-94% (HA-HAse Test). Die Spezifitäten betragen 95-100% (BLCA-4) und 77-93% (HA-HAse Test).

Der mittels RT-PCR durchführbare Nachweis von mRNA des Antiapoptose-Proteins Survivin zeigte Sensitivitäten von 64-94% und Spezifitäten von 93-100%.

Bezüglich eines neuen zellbasierten Tumormarkers zeigt der multitarget, multicolor FISH-Assay (UroVysion Test, Firma Abbott) sehr gute Ergebnisse (Lokeshwar, 2005, S. 39). Dieser basiert auf dem Nachweis chromosomaler Alterationen der Chromosomen 3, 7, 17 und 9p21 mittels FISH-Technologie. Die Sensitivitäten liegen bei 69-88%, während die Spezifitäten Werte von 80-100% erreichen.

Möglicherweise liegt im Nachweis von komplexen, definierten, mittels Proteomics-Technologie erfassbaren Markern oder im kombinierten Einsatz mehrerer, neuerer Markersysteme im Gegensatz zu einzelnen Biomarkern in Zukunft der Schlüssel für eine bessere Entwicklung und den klinischen Einsatz eines optimalen urin-basierten, nicht-invasiven Tumornachweisverfahrens für das Harnblasenkarzinom.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von März 2004 bis Februar 2006 an der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München an einem aus 100 Patienten bestehenden Kollektiv mit histologisch gesicherten Urothelkarzinomen und einer Kontrollgruppe, die sich aus 70 Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen und 30 gesunden Probanden zusammensetzte, die Wertigkeit des Blasentumormarkers NMP22 in der Diagnostik des Harnblasenkarzinoms untersucht. NMP22 ist mittels zweier kommerziell erhältlicher Testversionen (ELISA Verfahren und Point-of-Care = POC Version) nachweisbar. Die POC-Version (NMP22 BladderChek) ist dabei eine qualitative und die neuere Testversion. Ziel der Untersuchung war der Vergleich der diagnostischen Wertigkeit der beiden Testversionen (ELISA vs. POC).

Die Gewinnung der Urinproben erfolgte in Form eines Mittelstrahlurins als zweite Urinportion des Tages (zweiter Morgenurin) in ein steriles Auffanggefäß. Zur Durchführung des NMP22 ELISA Tests war eine sofortige Verbringung eines Teils des Urins in ein spezielles Probengefäß mit einer Stabilisatorlösung erforderlich. Die stabilisierte Urinprobe wurde nachfolgend unmittelbar weiterverarbeitet und schließlich bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Die Durchführung des NMP22 ELISA Tests erfolgte immer innerhalb von maximal drei Monaten nach Probengewinnung. Der Cut-off war mit 10 U/ml vorgegeben.

Zur Durchführung des NMP22 BladderChek Tests (POC-Version) wurden unmittelbar nach Probengewinnung 4 Tropfen des Urins in die Probenkassette eingefüllt und das Ergebnis nach 30 Minuten abgelesen (positive oder negative Probe). Für alle Patienten und Probanden galten folgende Ausschlusskriterien: Harnwegsinfekte, Fremdkörper im Harntrakt, Steine im Harntrakt, andere Karzinome als Harnblasenkarzinome, Z.n. intravesikaler Chemo-/Immuntherapie und Darminterponate im Harntrakt.

Die mittleren Absolutwerte des NMP22 ELISA Tests korrelierten positiv mit Zunahme von T-Stadien und Grading. Ein signifikanter Unterschied fand sich

zwischen den Tumorstadien pTis/pTa vs. pT1-4 sowie zwischen G1 vs. G2/G3. Dies galt für das Gesamtkollektiv und für das Kollektiv mit Primärtumoren.

Die Gesamtsensitivität des NMP22 ELISA Tests betrug 40%, die Gesamtspezifität betrug 99%. Für den NMP22 BladderChek Test betrug die Gesamtsensitivität 59%, die Gesamtspezifität betrug 95%. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Testverfahren erwies sich weder für die Gesamtsensitivität noch für die Gesamtspezifität als statistisch signifikant.

Auch nach einer Aufteilung des Patientenkollektivs in Subkollektive (T-Stadien, Grading) waren die Werte für die Sensitivität in den einzelnen Subgruppen für den NMP22 BladderChek Test nominal höher als für den NMP22 ELISA Test, die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Sensitivität nahm für beide Testversionen jeweils von pTis nach pT2-4 ebenso wie von G1 nach G3 zu. Statistisch signifikant war der Unterschied der Sensitivitäten zwischen den Stadien pTis/pTa vs. pT1-4 und im Grading zwischen G1 vs. G2-3.

Teilte man das Gesamtkollektiv nach Primärtumoren (n=71) und Rezidivtumoren (n=29) ein, ergab sich für den NMP22 ELISA Test eine Sensitivität von 42% bzw. 34% sowie für den NMP22 BladderChek Test eine Sensitivität von 63% bzw. 48%. Die Unterschiede waren statistisch jeweils nicht signifikant. Die Analyse der Sensitivitäten des Kollektivs mit Primärtumoren ergab ebenso wie die Analyse des Gesamtkollektivs einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen pTis/pTa vs. pT1-4 und G1 vs. G2/G3.

Unterteilte man das Gesamtkontrollkollektiv zur Bestimmung der Spezifität in zwei Kollektive (gesunde Probanden vs. Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen), ergaben sich für den NMP22 ELISA Test Spezifitäten von 100% vs. 99%, während für den NMP22 BladderChek Test die Spezifitäten 100% vs. 93% betrug. Die Unterschiede hinsichtlich der Spezifitäten zwischen den beiden Kollektiven waren für beide Testverfahren statistisch nicht signifikant. Vergleich man die Spezifität des BladderChek Tests mit der Spezifität des NMP22 ELISA Tests in den beiden Untergruppen, zeigte sich ebenfalls keine statistische Signifikanz.

Im Vergleich zu dem aus der Literatur errechenbaren Mittelwert für die Sensitivität des NMP22 ELISA 70% (61-79%) lag die Gesamtsensitivität des NMP22 ELISA in der vorliegenden Untersuchung mit 40% deutlich niedriger. Die bestimmte Sensitivität des NMP22 BladderChek Tests lag mit 59% unter dem errechenbaren Mittelwert in der Literatur mit 65% (56-74%).

Die Gesamtspezifität der vorliegenden Untersuchung (NMP22 ELISA: 99%, NMP22 BladderChek: 95%) lag für beide Testverfahren über den mittleren Angaben der Literatur von jeweils 81% für beide Testversionen.

Die mögliche Hauptursache für die im Vergleich zur Literatur niedrigere Sensitivität des NMP22 ELISA (40%) könnte der vorzeitige und schnelle Abbau des Zielproteins und damit dessen geringere Nachweisbarkeit mittels ELISA sein. Präanalytische Schritte, wie die Stabilisierung, Lagerung und das Vorbereiten der Proben zur Durchführung des ELISA Tests können zur Degenerierung des Zielproteins beitragen. Aufgrund der deutlichen Vorteile bei der Anwendung des NMP22 BladderChek Tests gegenüber der NMP22 ELISA Version (keine präanalytischen Schritte, sehr schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse, Unabhängigkeit vom Untersucher und etwas geringere Kosten) ist der BladderChek Test der ELISA Version im klinischen Alltag deutlich überlegen.

Allerdings sind derzeit keine der beiden NMP22 Testversionen geeignet, einen oder gar beide der Goldstandards in Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, die Urethrozystoskopie und die Urinzytologie, zu ergänzen oder zu ersetzen.

Für eine abschließende Beurteilung der Wertigkeit der NMP22 BladderChek POC Version in der Diagnostik und der Nachsorge des Harnblasenkarzinoms sind weitere Studien im direkten Vergleich mit der NMP22 ELISA Version im Multizenteransatz mit größeren Patientenzahlen sinnvoll. Durch eine genaue Beschreibung des Patientenkollektivs und die Verwendung eines einheitlichen Cut-offs von 10 U/ml sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse gewährleistet sein.

Möglicherweise stellen neue Technologien, wie die proteomics-basierte Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie und das Betrachten komplexer Polypeptidmuster sowie die Kombination mehrerer Markersysteme anstelle einzelner Proteine oder Markersysteme innovative und entscheidende Schritte auf der unverändert notwendigen Suche nach dem „idealen“ Tumormarker für das Harnblasenkarzinom dar.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abbate L, Dìntrono A, Cardo G, Marano A, Addabbo L, Musci MD, Pagliarulo A, Correale M, Quaranta M: Comparison of nuclear matrix protein 22 and bladder tumor antigen in urine of patients with bladder cancer. *Anticancer Research* 18 (1998) 3803-3806
2. Akkad T, Brunner A, Pallwein L, Gozzi C, Bartsch G, Mikuz G, Steiner H, Verdorfer I: Fluorescence in situ hybridisation for detecting upper urinary tract tumors: a preliminary report. *Urology* 70 (2007) 753- 757
3. Akkad T, Verdorfer I, Mueller T, Gozzi C, Bartsch G, Steiner H: Voided urinary specimen-comparison of a multitarget in situ hybridisation fluorescence (FISH) assay, NMP22-BladderChek an conventional cytology for detection of transitional cell cancer of the bladder. *Eur Urol Suppl* 4(3) (2005) 159 Abstract 628
4. Althausen AF, Prout jr GR, Daly JJ: Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 116 (1976) 575-580
5. Anderström C, Johansson SL, van Schulz L: Primary adenocarcinoma in urinary bladder. *Cancer* 52 (1983) 1273
6. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J: EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* 54 (2008) 303-314
7. Berezney R, Coffey DS: Identification of a Nuclear Matrix Protein. *Biochem. Biophys Res Commun* 60 (1974) 1410-1417
8. Bergeron A, Champetier S, LaRue H: MAUB is a new mucin antigen associated with bladder cancer. *J Biol Chem.* 271 (1996) 6933-6939
9. Bjerre BD, Johansen C, Steven K: Health-related quality of life after cystectomy: bladder substitution coupered with ileal conduit diversion. A questionnaire survey. *Br J Urol* 75 (1995) 200-205
10. Brünagel G, Vietmeier BN, Bauer AJ, Schoen RE, Getzenberg RH: Identification of nuclear matrix protein alterations associated with human colon cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 2437-2442



- 
11. Bubendorf L, Sauter G, Simon R: Frühe Detektion des Harnblasenkarzinoms mit der FISH-Technologie. *J Urol Urogynäkol* 10 (2003) 5-8
  12. Cajulis RS, Haines GK, Frias-Hidvegi D, McVary K, Bacus JW: Cytology, flow cytometry, image analysis and interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagn Cytopathol* 13 (1995) 214
  13. Casella R, Huber P, Blöchlinger A, Stoffel F, Dalquen P, Gasser T, Lehmann K: Urinary level of nuclear matrix protein 22 in the diagnosis of bladder cancer: experience with 130 patients with biopsy confirmed tumor. *J Urol* 164 (2000) 1926-1928
  14. Casetta G, Gontero P, Zitella A, Pelucelli G, Formiconi A, Priolo G, Martinasso G, Mengozzi G, Aimo G, Viberti L, Tizzani A: BTA quantitative assay an NMP22 testing compared with urine cytology in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder: *Urol Int* 65 (2000) 100
  15. Cassel A, Rahat MA, Lahat N, Lindenfeld N, Mecz Y, Stein A: Telomerase activity and cytokeratin 20 as markers for the detection and followup of transitional cell carcinoma: an unfulfilled promise. *J Urol* 166 (2001) 841-844
  16. Chahal R, Darshane A, Browning AJ, Sundaram SK: Evaluation of the clinical value of urinary NMP22 as a marker in the screening and surveillance of transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Eur Urol* 40 (2001) 415-421
  17. Cheng C, Chueh SC, Chern HD: Diagnosis of bladder cancer using telomerase activity in voided urine. *J Formos Med Assoc* 90 (2000) 920
  18. Chong TW, Cheng C: The role of the bladder tumour antigen test in the management of gross haematuria. *Singapore Med J* 40 (1999) 49
  19. Cohen SM, Ellwein LB: Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 49 (1990) 1007-1011
  20. Compton DA, Cleveland DW: NuMa is Required for the Proper Competition of Mitosis. *J Cell Biol* 120 (1993) 947-957

21. Conn IG, Crocker J, Wallace DMA, Hughes MA, Hilton C: Basement Membranes in Urothelial Carcinoma. *Br J Urol* 60 (1987) 536-542
22. Del Nero A, Esposito N, Curro A, BIASONI D, Montanari E, Mangiarotti B, Trinchieri A, Zanetti G, Serrago MP, Pisani E: Evaluation of urinary level of NMP22 as a diagnostic marker for stage pTa-pT1 bladder cancer: comparison with urinary cytology and BTA Test. *Eur Urol* 35 (1999) 93-97
23. D`Hallewin MA, Baert L: Initial evaluation of the bladder tumor antigen test in superficial bladder cancer. *J Urol* 155 (1996) 475-476
24. Ellis WJ, Blumenstein BA, Ishak LM, Enfield DN: Clinical evaluation of the BTA TRAK assay and comparison to voided urine cytology and the Bard BTA test in patients with recurrent bladder tumors. Multi Center Study Group. *Urology* 50 (1997) 882
25. Ewing R, Tate G, Hetherington JW: Urinary fibrin/fibrinogen degradation products in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 59 (1987) 53
26. Fey EG, Penman S: Nuclear Matrix Protein Reflect Cell Type of Origin in Cultured Human Cells. *Proc Nati Accad Sci USA* 85 (1998) 121-125
27. Friedrich MG, Toma MI, Hellstern A, Pantel K, Weisenberger DJ, Noldus J, Huland H: Comparison of multitarget fluorescence in situ hybridization in urine with other noninvasive tests for detecting bladder cancer. *BJU International* 92 (2003) 911-914
28. Gelmini S, Crisci A, Salvadori B, Pazzagli M, Selli C, Orlando C: Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 2771
29. Getzenberg RH, Konety BR, Oeler TA, Quigley MM, Hakam A, Becich MJ, Bahnson RR: Bladder cancer associated nuclear matrix proteins. *Cancer Res* 56 (1996) 1690-1694
30. Giannopoulos A, Manousakas T, Gounari A, Constantinides C, Choremi-Papadopoulou H, Dimopoulos C: Comparative evaluation of the diagnostic performance of the BTA Stat Test, NMP22 and urinary

- bladder cancer antigen for primary and recurrent bladder tumors. *The J Urol* 166 (2001) 470-475
31. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PMM, Kurth KH: Tumor markers in diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J Urol* 169 (2003) 1975-1982
  32. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, Shen Y: Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 293 (2005) 810-816
  33. Grossman HB, Soloway M, Messing E, Katz G, Stein B, Kassabian V, Shen Yu: Surveillance for recurrence bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 295 (2006) 299-305
  34. Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet GP 3<sup>rd</sup>, Bono AV, Gobell P, Getzenberg RH, Hautmann SH, Messing E, Fradet Y, Lokeshwar VB: Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 66 (2005) 64-74
  35. Halling KC, King W, Sokolova IA, Karnes RJ, Meyer RG, Powell EL, Sebo TJ, Chevillie JC, Clayton AC, Krajnik KL, Ebert TA, Nelson RE, Burkhardt HM, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz VS, Lieber MM, Blute ML, Zincke H, Seelig SA, Jenkins RB, O'Kane DJ: A comparison of BTA stat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol* 167 (2002) 2001-2006
  36. Halling KC, King W, Sokolova IA, Meyer RG, Burkhardt HM, Halling AC, Chevillie JC, Sebo TJ, Ramakumar S, Stewart CS, Pankratz S, O'Kane DJ, Seelig SA, Lieber MM, Jenkins RB: A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 164 (2000) 1768-1775
  37. Hartung R, Barba M: Endourologische Diagnostik und Therapie. In: „Urologie“, Hautmann R, Huland H (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 3. Auflage, 75-86
  38. Hautmann S, Filipow N, Braun P, Ellinghausen H, Friedrich MG, Huland H, Jueneman KP: The new proteomic-based point-of-care (POC) urine NMP22-BladderChek compared to the standard NMP22 ELISA urine

- 
- lab test for bladder cancer detection. *Eur Urol Suppl* 4 (2005) 160  
Abstract 630
39. Hautmann SH, Toma M, Lorenzo Gomez MF, Friedrich M, Jaekel T, Michl U, Schroeder G, Huland H, Juenemann K, Lokeshwar: ImmunoCyt and the HA-Ase urine tests for the detection of bladder cancer: a side by side comparison. *Eur Urol* 46 (2004) 466-471
  40. Heicappell R, Wetting IC, Schostak M, Müller M, Steiner U, Sauter T, Miller K: Quantitative detection of human complement factor H-related protein in transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Eur Urol* 35 (1999) 81
  41. Hertle L, Bierer S: Prävention und Früherkennung bösartiger Erkrankungen. In: „Urologie“, Hautmann R, Huland H (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 3. Auflage, 183-185
  42. Hofmann T, Knüchel-Clarke R, Hartmann A, Stöhr R, Tilki D, Seitz M, Karl A, Stief C, Zaak D: Clinical Implications of the 2004 WHO Histological Classification on Non-Invasive Tumours of the Urinary Bladder. *EAU-EBU Update Series* 4 (2006) 83-95
  43. Hueper WC, Wiley FH, Wolfe HD: Experimental production of bladder tumours in dogs by administration of betall-naphthylamine. *J Indust Hyg Toxicol* 20 (1938) 46
  44. Huland H, Friedrich MG: Harnblasenkarzinom. In: „Urologie“, Hautmann R, Huland H (Hrsg.) Springer-Verlag, Heidelberg 2006, 3. Auflage, 202-212
  45. Ianari A, Sternberg CN, Rossetti A, Van Rijn A, Deidda A, Giannarelli D, Pansadoro V: Results of Bard BTA test in monitoring patients with a history of transitional cell cancer of the bladder. *Urology* 49 (1997) 786
  46. Irani J, Desgranchamps F, Millet C, Toubert ME, Bon D, Auber J, LeDuc A: BTA stat and BTA TRAK : A comparative evaluation of urine testing for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 35 (1999) 89-92
  47. Ishiwata S, Takahashi S, Homma Y, Tanaka Y, Kameyama S, Hosaka Y, Kitamura T: Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by

- 
- fluorescence in situ hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urology* 57 (2001) 811-815
48. Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Koshida K, Namiki M, Inoue M: Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 2807
  49. Jakse G, Jacobi GH, Altwein JE: Das Adenokarzinom der Harnblase *Urologe A* (1979) 86
  50. Jakse G, Putz A, Feichtinger J: Cystectomy: the treatment of choice in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder? *Eur J Surg Oncol* 15 (1989) 211-216
  51. Johnston B, Morales A, Emerson L, Lundie M. Rapid Detection of Bladder Cancer: A Comparative Study of Point of Care Tests. *J Urol* 158 (1997) 2098-2101
  52. Junker K, Fritsch T, Hartmann A, Schulze W, Schubert A: Multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) on cells from urine for the detection of bladder cancer. *Cytogenet Genome Res* 114 (2006) 279-283
  53. Kausch I, Böhle A: Nichtinvasive Urindiagnostik des Harnblasenkarzinoms. *Urologe A* 42 (2003) 912-921
  54. Kavalier E, Landman J, Chang Y, Droller MJ, Liu BCS: Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 82 (1998) 708-714
  55. Keesee SK, Briggman JV, Thill G, Wu YJ: Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6 (2-3) (1996) 189-214
  56. Khanuja RS, Lehr JE, Soule HD, Gehani S, Noto AC, Choudhury S, Chen R, Pienta KJ: Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Res* 53 (1993) 3394-3398
  57. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 (1994) 2011-2015

- 
58. Kinders R, Jones T, Root R, Bruce C, Murchison H, Corey M, Williams L, Enfield D, Hass GM: Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 2511-2520
  59. Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, Mishina M, Mitsumori K, Itoh N, Yamada H, Terachi T, Yoshida O: Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Nat Cancer Inst* 89 (1997) 724
  60. Kirolos M, McDermott S, Bradbrook RA: The performance characteristics of the bladder tumour antigen test. *Br J Urol* 80 (1997) 30
  61. Kriegmair M, Stepp HG, Baumgartner R, Hofstetter A, Knüchel R, Steinbach P, Hofstädter F: Fluorescence controlled transurethral resection of bladder cancer following intravesical application of 5-aminolevulinic acid. *J. Urol.* 155 (1996); 665 A Abstract 1418
  62. Kriegmair M, Waidelich R, Lumper W, Ehsan A, Stepp HG, Rick K, Knüchel R, Baumgartner R, Hofstetter A: Integral photodynamic treatment of refractory superficial bladder cancer. *J Urol* 154 (1995) 1339-1341
  63. Kumar A, Kumar R, Gupta NP: Comparison of NMP22 BladderChek test and urine cytology for the detection of recurrent bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol* 36 (2006) 172-175
  64. Lahme S, Bichler KH, Feil G, Krause S: Comparison of cytology and Nuclear Matrix Protein 22 for the detection and follow-up of bladder cancer. *Urol Int* 66 (2001) 72-77
  65. Lance RS, Aldous WK, Blaser J, Thrasher JB: Telomerase activity in solid transitional cell carcinoma, bladder washings and voided urine. *Urol Oncol* 4 (1998) 43-49
  66. Landman J, Chang Y, Kavalier E, Droller M J, Liu B C-S: Sensitivity and specificity of NMP22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* 58 (1998) 398-402

- 
67. Leyh H, Hall R, Mazeman E: Wertigkeit von BTA Test und Urinzytologie bei der Diagnostik und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. *Akt Urol* 29 (1998) 57-61
  68. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E, Droller MJ: Bladder tumor markers beyond cytology: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urology* 66 (2005) 35-63
  69. Lokeshwar VB, Soloway MS: Current bladder tumor tests: Does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol* 165 (2001) 1067-1077
  70. Lotan Y, Roehrborn C: Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 61 (2003) 109-118
  71. Lydersen BK, Pettijohn DE: Human-Specific Nuclear Protein that Associates with the Polar Region of the Mitotic Apparatus: Distribution in a Human/Hamster Hybrid Cell. *Cell* 22 (1980) 489-499
  72. Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M, Nagel D, Holdenrieder S, Hofmann K, Reiter W, Schmeller N, Stieber P: Measurements of complement H-related protein (BTA-TRAK assay) and nuclear matrix protein (NMP22 assay) - useful diagnostic tools in the diagnosis of urinary bladder cancer? *Clin Chem Lab Med* 41 (2003) 104-10
  73. Matritech Product Information, NMP22 Test Kit, Newton, MA 02460, USA (2000)
  74. McCabe RP, Lamm D, Haspel MV, Pomato N, Smith KO, Thompson E, Hanna MG jr: A diagnostic-prognostic test for bladder cancer using a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay for detection of urinary fibrin(ogen) degradation products. *Cancer Res* 44 (1984) 5886
  75. Menendez V, Filella X, Alcover JA, Ricardo M, Mallafre J M, Ballesta AM, Talbot-Wright R: Usefulness of urinary nuclear matrix protein 22 (NMP22) as a marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Research* 20 (2000) 1169-1172

- 
76. Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M, Marberger M: Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 161 (1999) 1486-1489
  77. Miyanaga N, Hideyuki A, Ishikawa S, Ohtani M, Kawai K, Koiso K, Koyama A, Takahashi T: Clinical evaluation of nuclear matrix protein 22 (NMP22) in urine as a novel marker for urothelial cancer. *Eur Urol* 31 (1997) 163-168
  78. Mondal A, Banerjee DK: The reliability of urinary cytology in the detection of tumours of urinary bladder. *J Indian Med Assoc* 90 (1992) 265
  79. Moonen PMJ, Kiemeny LALM, Witjes JA: Urinary NMP22 BladderChek Test in the Diagnosis of Superficial Bladder Cancer. *Eur Urol* 48 (2005) 951-956
  80. Moonen PM, Merks GF, Peelen P, Karthaus HF, Smeets DF, Witjes JA: UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 51 (2007) 1275-1280
  81. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA. Histological typing of urinary bladder tumours. In: "World Health Organization - International histologic classification of tumours". Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 2. Auflage, 1999
  82. Mostofi FK, Sobin MH, Torloni H: Histological typing of urinary bladder tumours. International histological classification of tumours, No 10, WHO, Geneva (1973)
  83. Murphy W, Rivera-Ramirez I, Medina C, Wright N, Wajzman Z: The bladder tumor antigen (BTA) test compared to voided urine cytology in the detection of bladder neoplasms. *J Urol* 158 (1997) 2102-2106
  84. Nakayasu H, Berezney R: Mapping Replication Sites in the Eucaryotic Nucleus. *J Cell Biol* 108 (1989) 1-11
  85. Nasuti JF, Gomella LG, Ismial M, Bibo M: Utility of the BTA stat test kit for bladder cancer screening. *Diagn Cytopathol* 21 (1999) 27



- 
86. O'Donoghue JM, Horgan PG, Corcoran M, Bredin H, McGuire M, Given HF: Urinary cytology in the detection of bladder carcinoma. *Ir J Med Sci* 160 (1991) 352
  87. Öge Ö, Atsü N, Kendi S, Özen H: Evaluation of nuclear matrix protein 22 (NMP22) as a tumor marker in the detection of bladder cancer. *Int Urol Nephrol* 32 (2001) 367-370
  88. Olsson H, Zackrisson B: ImmunoCyt™ a useful method in the follow-up protocol for patients with urinary bladder carcinom. *Scand J Urol Nephrol* 35 (2001) 280-282
  89. Paoluzzi M, Cuttano MG, Mugnaini P, Salsano F, Gianotti P: Urinary dosage of nuclear matrix protein 22 (NMP22) like biologic marker of transitional cell carcinoma (TCC): a study on patients with hematuria. *Arch Ital Urol Androl* 71 (1999) 13
  90. Pardoll DM, Vogelstein B, Coffey DS: A Fixed Site of DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Cell* 19 (1980) 527-536
  91. Partin AW, Getzenberg RH, CarMichael MJ, Vindivich D, Yoo J, Epstein JI, Coffey DS: Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res.* 53 (1993) 744-746
  92. Planz B, Synek C, Robben J, Bocking A, Marberger M: Diagnostic accuracy of DNA image cytometry and urinary cytology with cells from voided urine in the detection of bladder cancer. *Urology* 56 (2000) 782
  93. Pode D, Golijanin D, Sherman Y, Lebensart P, Shapiro A: Immunostainig of Lewis X in cells from voided urine, cytopathology and ultrasound for noninvasive detection of bladder tumors. *J Urol* 159 (1998) 389
  94. Ponsky LE, Sharma S, Pandrangi L, Kedia S, Nelson D, Agrawal A, Zippe CD: Screening and monitoring for bladder cancer: refining the use of NMP22. *J Urol* 166 (2001) 75-78
  95. Poulakis V, Witzsch R, De Vries R, Altmannsberger HM, Manyak MJ, Becht E: A comparison of urinary nuclear matrix protein-22 and bladder tumour antigen tests with voided urinary cytology in detecting and following bladder cancer: the prognostic value of false-positive results. *BJU Int* 88 (2001) 692-701

- 
96. Priolo G, Gontero P, Martinasso G, Mengozzi G, Formiconi A, Pelucelli G, Zitella A, Casetta G, Viberti L, Aimo G, Tizzani A: Bladder tumour antigen assay as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer. *Clin chim Acta* 305 (2001) 367
  97. Rahat M, Lahat N, Gazawi H, Resnick M, Sova y, Ben-Ari G, Cohen M, Stein A: Telomerase activity in patients with transitional cell carcinoma: a preliminary study. *Cancer* 85 (1999) 919
  98. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, Roberts SG, Wollan PC, Blute ML, O Kane DJ: Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer . *J Urol* 161 (1999) 388-394
  99. Richie JP, Shipley WU, Yagoda A: Cancer of Bladder. In: "Cancer Principles and Practice of Oncology." De Vita VT, Hellman S., Rosenberg S.A. (Hrsg.), J.B. Lippincott, Philadelphia ,1989, 1008-1020
  100. Richie JP, Skinner DG: Ureterointestinal diversion. *Campell's Urology* 3 (1986) 2601-2619
  101. Riesz P, Lotz G, Paska C, Szendroi A, Majoros A, Nemeth Z, Torzsok P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A: Detection of Bladder Cancer from the Urine using fluorescence in situ hybridization technique. *Path oncol Res.* 13 (2007) 187-194
  102. Rübber H, Otto T: Harnblasenkarzinom. In: „Uroonkologie“, Rübber H (Hrsg), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, 2001, 3. Auflage, 85-158
  103. Sachs Lothar: „Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden“ Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Honkong, London, Mailand, Paris, Tokio 2002. 10.Auflage
  104. Sanchez-Carbayo M, Herrero E, Megias A, Soria F: Evaluation of nuclear matrix protein 22 as a tumor marker in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 84 (1999) 706-713
  105. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Silva JM, Romani R, Gonzalez de Buitrago, J M, Navajo JA: Comparative predictive values of urinary cytology, urinary bladder cancer antigen, Cyfra 21-1 and NMP22 for evaluating symptomatic patients at risk for bladder cancer. *J Urol* 165 (2001) 1462-1467

- 
106. Sarosdy MF, de Vere White RW, Soloway MS, Sheinfeld J, Hudson MA, Schellhammer PF, Jarowenko MV, Adams G, Blumenstein BA: Results of a Multicenter Trial Using the BTA Test to Monitor for and Diagnose Recurrent Bladder Cancer. *J Urol* 154 (1995) 379-384
  107. Sarosdy MF, Hudson MA, Ellis WJ, Soloway MS: Detection of Recurrent Bladder Cancer Using a New One-Step Test for Bladder Tumor Antigen. *Br J Urol* 80, Suppl. 2 (1997) Abstract 99
  108. Sarosdy MF, Hudson MA, Ellis WJ, Soloway MS, de Vere White R, Sheinfeld J, Jarowenko MV, Schellhammer PF, Schervish EW, Patel JV, Chodak GW, Lamm DL, Johnson RD, Henderson M, Adams G, Blumenstein BA, Thielke KR, Pfalzgraf RD, Murchison HA, Brunelle SL: Improved detection of recurrent bladder cancer using the Bard BTA Stat test. *Urology* 50 (1997) 349-53
  109. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsz G, Kahn P, Chad R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K: Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 168 (2002) 1950-1954
  110. Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, Morales A: A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol* 158 (1997) 801
  111. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M: Improved detection of urothelial fluorescence cystoscopy. *J Urol* 171 (2004) 135-138
  112. Sharma S, Zippe C, Pandrangi L, Nelson D, Agrawal A: Exclusion Criteria Enhance the Specificity and Positive Predictive Value of NMP22 and BTA Stat. *J Urol* 162 (1999) 53-57
  113. Simon MA, Lokeshwar VB, Soloway MS: Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial? *Crit Rev Oncol Hematol* 47 (2003) 91-107
  114. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer TG, Seelig SA, King W: The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2 (2000) 116-23

- 
115. Soloway MS, Briggmann V, Carpinito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL, Lange P, Messing E, Pasciak RM, Reservitz GB, Rukstalis DB, Sarosdy MF, Stadler WM: Use of the new tumor marker urinary NMP22 in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol* 156 (1996) 363-367
  116. Sözen S, Biri H, Sinik Z, Küpeli B, Alkibay T, Bozkirli I: Comparison of the nuclear matrix protein 22 with voided urine cytology and BTA stat test in the diagnosis of transitional cell carcinoma of bladder. *Eur Urol* 39 (1999) 225
  117. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes A, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K: Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables : a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 49 (2008) 466-477
  118. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, Mischka H, Frierson HF: Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* 7 (2006) 230-240
  119. Thomas L, Leyh H, Marberger M, Bombardieri E, Bassi P, Pagano F, Pansadoro V, Sternberg CN, Boccon-Cibod L, Ravery V, Le Guludec D, Meulemans A, Conort P, Ishak L: Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 45 (1999) 472
  120. Toma MI, Friedrich MG, Hautmann SH, Jäkel KT, Erbersdobler A, Hellstern A, Huland H: Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *World J Urol* 22 (2004) 145-149
  121. Tomera K, Clark WR, Singaas MW, Strawbridge LR: Results of screening high risk patients for urothelial cancers with a new office test-NMP22 BladderChek. *J Urol* 169 (2003) 226-227
  122. Tritschler S, Scharf S, Karl A, Tilki D, Knuechel R, Hartmann A, Stief C, Zaak D: Validation of the diagnostic value of NMP22 BladderChek Test

- 
- as a Marker for Bladder Cancer by Photodynamic Diagnosis. *Eur Urol* 51 (2007) 403-408
123. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR: Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58 (1998) 4168-4172
  124. van der Poel HG, van Balken MR, Schamhart DH, Peelen P, de Reijke T, Debruyne FM, Schalken JA, Witjes JA: Bladder wash cytology, quantitative cytology and the qualitative BTA test in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 51 (1998) 44-50
  125. van Rhijn BW, van der Poel HG, Boon ME, Debruyne FM, Schalken JA, Witjes JA: Presence of carcinoma in situ and high 2C-deviation index are the best predictors of invasive transitional cell carcinoma of the bladder in patients with high-risk Quanticyt. *Urology* 55 (2000) 363-367
  126. Varella-Garcia M, Akduman B, Sunpaweravong P, Di Maria MV, Crawford ED: The UroVysion fluorescence in situ hybridization assay is an effective tool for monitoring recurrence of bladder cancer. *Urol Oncol* 22 (2004) 16-19
  127. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira, Wersall P, Clrall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF: Gemcitabine and Cisplatin versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study, *J Clin Oncol* 17 (2000) 3068-3077
  128. Vriesema JL, Atsma F, Kiemeny LA, Peelen WP, Witjes JA, Schlaken JA: Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence. *Urology* 58 (2001) 367-371
  129. Vriesema JL, van der Poel HG, Debruyne FMJ, Schalken JA, Kok LP, Boon ME: Neural network-based diagnosis of bladder wash cytology. *Diagnostic cytopathology* 23 (2000) 171-179

- 
130. Vrooman OP, Witjes JA: Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 53 (2008) 909-916
  131. Wajsman Z, Williams PD, Greco J, Murphy GP: Further study of fibrinogen degradation products in bladder cancer detection. *Urology* 12 (1978) 659-61
  132. Weidner W: Bakteriologische und klinisch-chemische Untersuchungen In: „Urologie“, Hautmann R, Huland H (Hrsg.) Springer-Verlag Heidelberg, 2006, 3. Auflage, 44-49
  133. Wiener Hg, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G: Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J Urol* 159 (1998) 1876
  134. Wiener DM, Zanger P, Petri E, Feil G, Bichler KH: Are Cytokeratines Useful Tumor Markers in Transitional Cell Carcinoma of Bladder Cancer? *J Urol* 157 (1997) 144
  135. Witjes JA, Van der Poel HG, van Balken MR, Debruyne FMJ, Schalken JA: Urinary NMP22 and karyometry in the diagnosis and follow-up of patients with superficial bladder cancer. *Eur Urol* 31 (1998) 387
  136. Wittekind Ch, Greene FL, Hutter RVP, Klimpfinger M, Sobin LH: Harnblase. In „TNM Atlas: Illustrierter Leitfaden zur TNM/Klassifikation maligner Tumoren.“ Wittekind Ch, Klimpfinger M, Sobin LH (Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005, 5. Auflage, 321-326
  137. Wynder EL, Goldsmith R: The epidemiology of bladder cancer: a second look. *Cancer* 40 (1997) 1246
  138. Yang CH, Snyder M: The Nuclear Mitotic Apparatus is Important in the Establishment and Maintenance of the Bipolar Mitotic Spindle Apparatus. *Moll Biol Cell* 3 (1992) 1259-1267
  139. Yoshida K, Sugino T, Tahara H. Woodman A, Bolodeeoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D: Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79 (1997) 362-369

140. Zhang J, Zheng S, Fan Z, Gao Y, Wang D, Xiao Z, Li C, An Q, Cheng S: A comparison between microsatellite analysis and cytology of urine for the detection of bladder cancer. *Cancer Lett* 172 (2001) 55
141. Zimmermann RL, Bagley D, Hawthorne C, Bibbo M: Utility of the Bard BTA test in detecting upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 51 (1998) 956
142. Zippe C, Pandrangi L, Agrawal A: NMP22 is a sensitive, cost-effective test in patients at risk for bladder cancer. *J Urol* 161 (1999) 62-65

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen E. Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München für die Überlassung des Themas.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn PD Dr. Uwe Treiber für die umfassende Betreuung bei der Erstellung der Arbeit.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der laborchemischen Untersuchungen möchte ich mich bei Frau Doris Langer und Frau Dr. Antonie Lehmer vom Urologischen Forschungslabor der Klinik bedanken sowie beim Pflegepersonal der Urologischen Stationen für die Unterstützung bei der Gewinnung der Urinproben.

Für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Studie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Wagenpfeil, Frau R. Hollweg und Herrn T. Schuster vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München.

Für die tatkräftige Unterstützung bei allen auftauchenden Problemen und Problemchen möchte ich mich ganz herzlich bei Klaus, Karl, Christoph und Thomas bedanken, sowie bei meinen Eltern für die große persönliche Unterstützung.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht schließlich an Barbara für ihre große Unterstützung und ihre Motivation.