

Aus dem Institut für
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Bildanalytische Untersuchungen
an Cytokeratin 7 gefärbten Mammakarzinom-Schnitten

Michael Röhl

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. Prof. Dr. W. Nathrath,
Ludwig-Maximilians-Universität München

2. Univ.- Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 21.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

*Gewidmet ist diese Arbeit meiner Freundin Barbara Gerl, die bei einem
Autounfall ums Leben gekommen ist,
sowie einer Cousine meiner Mutter, Frau Christine Hofbauer, die bereits
im Alter von 37 Jahren an einem Mammakarzinom verstorben ist.*

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	1
<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Mammakarzinome	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	3
1.1.2.1 Risikofaktor hormonal/reproduktiv	3
1.1.2.2 Risikofaktor strukturell	4
1.1.3 Histomorphologie und Klassifikation	5
1.1.4 Prognosefaktoren	6
1.1.4.1 Gesicherte Prognosefaktoren	6
1.1.4.2 Wahrscheinliche und mögliche Prognosefaktoren	7
1.2 Cytokeratine	7
1.2.1 Das Cytoskelett	7
1.2.2 Einteilung der Cytokeratine	9
1.2.3 Verteilungsmuster	9
1.2.4 Cytokeratin	11
1.2.5 Nachweis von Cytokeratinen	13
1.3 Zielsetzung und Fragestellungen	13
<u>2 Material und Methoden</u>	14
2.1 Patientengut	14
2.1.1 Alter	15
2.1.2 pTpNpM-Klassifikation	16
2.1.3 Grading	17
2.1.4 UICC-Stadium	17
2.1.5 Östrogen/Gestagen-Rezeptor-Status	18
2.1.6 Lokalisation des Tumors nach Brustquadrant	19
2.1.7 Histologie nach WHO-Klassifikation	19
2.1.8 Follow up, Rezidiv- bzw. Metastasenfreies-Intervall	20

2.2	Material	21
2.2.1	Gefrierschnitte	21
2.2.2	Antikörper	22
2.2.2.1	Standardisierung der Antikörper	22
2.2.2.2	Charakteristika der einzelnen Antikörper	23
2.2.2.2.1	RPN	23
2.2.2.2.2	LP-1K / LP-5K	23
2.3	Bildanalytisches Verfahren	25
2.3.1	Versuchsaufbau	25
2.3.1.1	Übersicht der Ausgangssituation	25
2.3.1.2	Hardware, Software, optische Geräte	25
2.3.2	Meßmethodik	26
2.3.2.1	Auswahl der Meßfelder durch ein Zufallsverfahren	26
2.3.2.1.1	Vermessen des Gewebeexzidats	26
2.3.2.1.2	Auswahl eines geeigneten Meßmusters	27
2.3.2.1.3	Randomisierung der Meßfelder	27
2.3.2.2	Zytometrische Bestimmung des immunhistologischen Cytokeratin 7 Gehalts im einzelnen Meßfeld und im gesamten Tumor	28
2.3.2.2.1	Interaktives Messen	30
2.3.2.2.1.1	Wahl der Tumorschwelle	30
2.3.2.2.1.2	Wahl der Markerschwelle	31
2.3.3	Meßergebnisse	31
2.4	Visuelle Schätzung von Prof. Dr. Nathrath	33
2.5	Statistische Methoden	33
3	<u>Ergebnisse</u>	34
3.1	Unterschiedliche Verteilung von Cytokeratin 7 im einzelnen Tumor und im Tumorkollektiv	34
3.1.1	Verteilung im einzelnen Tumor	34
3.1.2	Verteilung im Tumorkollektiv	36
3.1.2.1	Semiautomatisch	36
3.1.2.2	Visuell	37

3.2	Korrelation der einzelnen AK-Färbungen untereinander	38
3.2.1	Semiautomatisch	38
3.2.2	Visuell	39
3.3	Vergleich der semiautomatischen Meßergebnisse mit den visuellen Schätzungen	40
3.3.1	Vergleich der SQO mit den visuellen Schätzungen	40
3.3.2	Vergleich der "Hot-spots" der semiautomatischen Messung mit den visuellen Schätzungen	42
3.4	Korrelation der Cytokeratin 7 Expression mit klinischen Daten	44
3.4.1	Semiautomatisch	44
3.4.2	Visuell	44
3.5	Korrelation der Cytokeratin 7 Expression mit immunhistologischen Kriterien	45
3.6	Prognose	46
3.6.1	Klinische Daten mit Survival und krankheitsfreiem Intervall	46
3.6.1.1	Survival	46
3.6.1.2	Krankheitsfreies Intervall	48
3.6.2	Cytokeratin 7 Expression mit Survival, krankheitsfreiem Intervall und Restüberleben	50
3.6.2.1	Survival	50
3.6.2.2	Krankheitsfreies Intervall	50
3.6.2.3	Restüberleben	51
3.7	Untersuchung der Cytokeratin 7 heterogen exprimierenden Tumoren bezüglich prognostischer Relevanz	51
3.8	Unterteilung der Fälle in Cytokeratin 7-positive und -negative Gruppen unter Berücksichtigung aller drei AK-Reihen (visuell und semiautomatisch)	52
4	<u>Diskussion und Beantwortung der Fragestellung</u>	53
4.1	Ist das Patientengut repräsentativ ?	53
4.2	Existiert eine Korrelation zwischen semiautomatischer Messung und visueller Schätzung ?	53

4.3	Existiert eine Korrelation zwischen den drei Antikörperreihen ?	54
4.4	Bedeutung von Cytokeratinen in Tumoren im Vergleich zum Ursprungsgewebe	55
4.5	Existiert eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und klinischen Daten ?	57
4.6	Existiert eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und anderen immunhistologischen Parametern ?	58
4.7	Möglichkeiten der Zytometrie bei der Auswertung histologischer Schnitte	58
4.8	Zeigen Cytokeratin 7 heterogen exprimierende Tumoren einen anderen klinischen Verlauf als homogen exprimierende Tumoren ?	60
4.9	Ist die Unterteilung in Cytokeratin 7-positive und -negative Karzinome relevant und bietet sich damit eine weitere Unterteilungsmöglichkeit der NOS – Karzinome ?	60
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	62
<u>6</u>	<u>Literatur</u>	64
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	71
	Verzeichnis der Bilder und Tabellen	72
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	75
	Lebenslauf	76
	Danksagung	

Bildanalytische Untersuchungen an Cytokeratin 7 gefärbten Mammakarzinom-Schnitten

Vorwort

Mamma-Karzinome werden nach der WHO histologisch klassifiziert. Den größten Anteil bilden in dieser Klassifikation die invasiv duktales Karzinome mit einem Anteil von knapp 70%. Diese unterscheiden sich jedoch untereinander erheblich hinsichtlich ihres biologischen und klinischen Verhaltens. Eine weitere Unterteilung dieser sehr heterogenen Gruppe wäre wünschenswert.

Ein Ansatz zur weiteren Aufteilung der Gruppe der invasiv duktales Mammakarzinome könnte ihre Untersuchung hinsichtlich unterschiedlicher Expression von Differenzierungsantigenen sein. Cytokeratine sind epitheliale Differenzierungsantigene und wesentlich am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt.

Im normalen Brustdrüsengewebe finden sich hauptsächlich Cytokeratin 7, 8, 18, 19 in luminalen, sowie Cytokeratin 5, 14, 17 in den Basalzellen. Während in Karzinomen in der Regel die Ausstattung mit Cytokeratinen des ursprünglichen luminalen Epithels beibehalten wird, haben einzelne Untersuchungen eine unterschiedliche Expression von insbesondere Cytokeratin 7 und 18 gezeigt.

Anhand von Cytokeratin 7 gefärbten Mamma-Karzinom Gefrierschnitten soll in dieser Arbeit eine semiquantitative Auswertung der Cytokeratin 7- Verteilung in einem größeren, nicht ausgesuchten Kollektiv von Mamma-Karzinomen untersucht und die Frage beantwortet werden, ob anhand der Verteilung und Expression unterschiedliche Karzinomgruppen mit möglicherweise unterschiedlicher Biologie, Klinik und Prognose gefunden werden können. Dabei soll überprüft werden, ob zwischen einer früheren, einfach visuell-mikroskopischen Auswertung der Schnitte durch einen Pathologen und einer späteren semiautomatischen Auswertung der gleichen Schnitte durch einen Doktoranden eine Korrelation besteht.

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mamma-Karzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in Europa und den USA, sowohl hinsichtlich der Inzidenz als auch der Todesfälle durch Krebs. Insgesamt 25 % der weiblichen Krebstoten sterben durch das Mamma-Karzinom. Brustkrebs ist bei der Altersgruppe der 40-55 jährigen sogar die häufigste Todesursache überhaupt (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.104).

Ein steiler Anstieg der Erkrankungen wird nach dem 35. Lebensjahr beobachtet (nach Stegner, 1994, S.318).

Betrachtet man die Altersverteilung der Erkrankungszeitpunkte, so entfallen etwa ein Drittel der Erkrankungen auf die prämenopausale Phase und zwei Drittel auf die postmenopausale Phase mit zwei Erkrankungsgipfeln bei ca. 45 und ca. 62 Jahren. Dabei liegt das Durchschnittsalter bei 55 Jahren (nach Bässler, 1978, S.456-458).

Weltweit gesehen bestehen bezüglich der Inzidenz und Mortalität erhebliche geographische Unterschiede : an der Spitze stehen die USA mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate (Neuerkrankungen je 100.000 Frauen) von 90, sowie West- und Nordeuropa (z.B. Deutschland : 58). Niedrigere Raten verzeichnen Süd- und Osteuropa (z.B. Spanien mit 40) und teilweise auch Südamerika (z.B. Ecuador 27)

Relativ am seltensten ist die Erkrankung in Asien und Japan (22)

Diese doch deutlichen geographischen Inzidenzunterschiede lassen den Schluß auf eine erhebliche Umweltbeeinflussung der Carcinogenese des Mamma-Karzinoms zu, vor allem wenn man die Angleichung der Inzidenz- und Mortalitätsraten bei z.B. jungen japanischen Einwanderinnen in die USA bedenkt (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.104-106).

Neuere Zahlen liefern im Vergleich zu der Untersuchung von Schüler und Gutzwiller einige deutsche Tumorzentren:

So lag die Inzidenzrate des Mammakarzinoms nach einer Untersuchung des Tumorzentrums Saarland bei 110 je 100.000 Frauen, nach Feldstudien in Aachen und München sogar bei 130 bis 140 Neuerkrankungen. Somit liegt, bezogen auf 42 Millionen in Deutschland lebenden Frauen, die jährliche Zahl der Neuerkrankungen an Brustkrebs zwischen 46.000 und 56.000.

Die Mortalität lag bei 45,0 je 100.000 Brustkrebserkrankten. Das mittlere Sterbealter bei 68,6 Jahren.

Die Prävalenzraten liegen bei 200.000 Frauen in den letzten 5 Jahren bzw. 350.000 Frauen in den letzten 10 Jahren (nach Sauer et al., 1998, S.82-83).

Interessant ist die Gegenüberstellung von Mortalität und Inzidenz. Während sich in der Schweiz als Beispiel für Europa der Quotient aus Mortalität und Inzidenz mit fortschreitendem Alter der Patienten von 0,1 auf 1,2 steigert, bleibt der Quotient in Japan zwischen 0,2 und 0,5 relativ konstant. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Brustkrebs bei japanischen Frauen nicht nur wesentlich seltener, sondern auch prognostisch günstiger ist. Betrachtet man die Trends von Inzidenz und Mortalität, so sind insgesamt leicht steigende Inzidenzraten bei relativ konstanten Mortalitätsraten zu beobachten. Die stärkere Steigerung der Inzidenz in Ländern mit bisher niedrigen Raten könnte mit der zunehmend besseren Erfassung der Erkrankungsfälle zu tun haben (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S. 106-108).

Bezüglich der Mortalität lassen sich in einigen Ländern z.B. Deutschland, Griechenland und Großbritannien in den letzten Jahren sogar sinkende Raten feststellen. Verantwortlich dafür dürften verbessertes Prescreening, Aufklärung und Therapiestrategien sein (nach Hermon, Beral, 1996, S.955-960).

1.1.2 Ätiologie

Die geläufigsten Risikodeterminanten können am einfachsten in zwei Untergruppen (hormonal/reproduktiv und strukturell) unterteilt werden. Wichtig ist dabei auch die getrennte Betrachtung von prä- und postmenopausalen Tumoren, da einige Risikodeterminanten sogar gegensätzlichen Einfluß auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit der prä- oder der postmenopausalen Karzinome ausüben.

1.1.2.1 Risikofaktor hormonal/reproduktiv

Eine Erhöhung der Erkrankungswahrscheinlichkeit liegt bei früher Menarche, später Menopause, später erster Geburt (über 30 Jahre) und Kinderlosigkeit vor.

Das Einsetzen der Menarche im Alter von 15 bedeutet ein um 23 % niedrigeres Brustkrebsrisiko als bei Einsetzen im Alter von 12. Eine Menopause im Alter von 55 bedeutet gegenüber einem Beginn im Alter von 45 eine Verdoppelung des Risikos (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.109).

Dagegen wird dem Stillen bei prämenopausalen Frauen ein protektiver Effekt zugeschrieben (nach Katsouyanni K. 1996 S.814-818). Ein ebenfalls höheres Risiko haben Nulliparae. Verantwortlich für den risikomindernden Effekt des Stillens und einer ausgetragenen Schwangerschaft dürfte die während dieser Prozesse vermehrte Ausdifferenzierung des Brustdrüsengewebes sein (nach Russo, Russo, 1997, S.81-91).

Auch die Einnahme von exogenen Östrogenen ist ausführlich untersucht worden.

Zu diesem Punkt gibt es jedoch gegensätzliche Meinungen. In ihrer Veröffentlichung über die Epidemiologie des Brustkrebses sind Schüler und Gutzwiller der Ansicht, daß die Einnahme oraler Kontrazeptiva außer bei längerem Gebrauch durch jüngere Frauen das Risiko nicht erhöhe und das Risiko postmenopausal an Brustkrebs zu erkranken sogar senke (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.109). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch die Untersuchungen von Rosenberg (Rosenberg et al., 1996, S.25-37), die eine Erhöhung des relativen Risikos um 1,7 in der Altersgruppe 25-34 Jahre fanden.

Andere Autoren sind der Ansicht, die Einnahme von oralen Antikontrazeptiva erhöhe das Erkrankungsrisiko nicht (nach Riede et al., 1993, S.956).

Ein weiterer, auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit von prämenopausalen und andererseits postmenopausalen Mammakarzinomen gegensätzlich wirkender Faktor ist die Adipositas.

Während Übergewicht in der prämenopausalen Phase das Risiko zu senken scheint, erhöht es dagegen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken in der postmenopausalen Phase. (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.109).

Die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken ist ebenfalls erhöht, wenn eine Frau bereits an bestimmten anderen malignen Tumoren erkrankt war oder ist. So finden sich erhöhte Risiken bei vorheriger Erkrankung an Endometrium und Ovar (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.109),

der kontralateralen Brust (nach Riede, 1993, S.956) und des Colons (nach Foulkes et al., 1996, S.534-539).

Auch über den Einfluß der Ernährung ist viel publiziert worden. Vermehrte Fettaufnahme erhöht das Risiko (nach Schüle, Gutzwiller, 1995, S.110 und Riede, 1993, S.956). Nach differenzierteren Untersuchungen sind dafür vor allem tierische Fette verantwortlich, wobei von diesen jedoch das vermehrt in Japan konsumierte Fischöl einen protektiven Effekt zu besitzen scheint (nach Caygill et al., 1996, S.159-164).

Ernährung reich an Obst und Gemüse scheint das Risiko zu vermindern. Verantwortlich dafür könnte das dadurch vermehrte Angebot an Carotinoiden (beta- Carotin, Lutein sowie Zeaxanthin) sein. Jedoch konnte für keine Einzelsubstanz allein ein protektiver Effekt nachgewiesen werden, so daß ein synergistischer Effekt vorliegen könnte. (nach Freudenheim et al., 1996, S.340-348).

Andere Autoren sehen durch diese Ernährung nur einen ,wenn überhaupt, minimalen protektiven Effekt (nach Hunter, Willet, 1996, S.56-68).

1.1.2.2 Risikofaktor strukturell

Wie schon in Punkt 1.1 angesprochen erkranken Angehörige der weißen Rasse wesentlich häufiger als Asiaten. Ebenso ist auch die Erkrankungshäufigkeit bei der farbigen Bevölkerung niedriger als bei der weißen Bevölkerung (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.104).

Als einer der wichtigsten Risikofaktoren gilt die familiäre Belastung durch Brustkrebs. Töchter deren Mütter an einem Mammakarzinom erkrankten, haben ein zwei bis neunmal größeres Risiko ebenfalls an Brustkrebs zu erkranken. (nach Riede, 1993, S.956).

Manche Autoren postulieren das Vorhandensein von Brustkrebsgenen. So wurde in einer Studie über das gemeinsame Auftreten von Mamma- und Colonkarzinom bei Patientinnen und ihren erstgradig Verwandten ein relatives Risiko von 4.05 gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet, was den Schluß nahelegt, daß in einigen Bevölkerungsteilen Gene vorhanden sind, die das Entstehen von Brust- und Darmkrebs begünstigen (nach Foulkes, 1996, S.159-164).

Molekularpathologisch besteht in Mammakarzinomen eine Hyperexpression der Onkogene c-ras und c-myc. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung werden die Karzinome zunehmend unabhängig von Östrogenen und beziehen ihre Wachstumsstimulation von Wachstumsfaktoren aus der FGF-Familie. Die Zellwucherung wird durch den Verlust der Tumorsuppressorgene p53 und pRB110 gesteigert und die Metastasierung durch Allelverlust von pNM23 ermöglicht (nach Riede, 1993, S.956).

Ionisierende Strahlung als Risikofaktor ist unbestritten. Dabei ist das Risiko dabei um so höher, je jünger die Frau bei der Bestrahlung war. Am deutlichsten belegt durch die Life Span Study (LSS) von Überlebenden des Atombombenabwurfs von Hiroshima (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.114-115, Goodman et al., 1997, S.144-153, Land, 1987, S.45-57, Shimizu et al., 1991, S. 54-63).

Auch Medikamente und Genußmittel wurden hinsichtlich ihres protektiven Effekts auf die Entstehung eines Mammakarzinoms in den letzten Jahren untersucht. Als Beispiel für Medikamente sei hier Acetylsalicylsäure (ASS) erwähnt. Hier liegen gegensätzliche Ergebnisse vor. Manche Autoren schreiben ASS einen protektiven Effekt zu (nach Schreinemachers, 1994, S.138-146), andere bestreiten diesen Effekt (nach Egan, 1996, S.988-993).

Rauchen scheint im Gegensatz zu vielen anderen malignen Erkrankungen beim Mammakarzinom keinen carcinogenen Effekt zu besitzen (nach Adami et al., 1988, S.832-837 und Baron et al., 1996, S.399-403).

Am bedeutendsten unter den strukturellen Risikodeterminanten sind jedoch die benignen Brusttumore. Führend unter den gutartigen Brustläsionen sind die Mastopathia cystica mit 44% und das Fibroadenom mit 30 % Anteil am Krankengut (nach Krieger, 1992, S.619-631). Dabei haben Patientinnen mit einem Fibroadenom ein relatives Risiko von 2,2 (nach Krieger, Hiatt, 1992, S.619-631) bzw. 1,6 für metachrone Karzinome und 6,9 für synchrone Karzinome (nach Levi et al., 1994, S.681-683, und Cole, Elwood, Kaplan, 1978, S.112-120). In Abhängigkeit vom Grad der Atypie ist das Risiko an Brustkrebs zu erkranken auch bei der Mastopathia cystica deutlich erhöht (nach Goovaerts, Schüler, Genton, 1983, S.211-217). Bei Atypiegrad I ist das relative Risiko nicht erhöht, bei Atypiegrad III hingegen liegt das relative Risiko bei 4 (nach Prechtel et al., 1994, S.158-164).

1.1.3 Histomorphologie und Klassifikation

Die normale Brustdrüse besteht aus 15 bis 20 Einzeldrüsen (Lobi), die wiederum aus verschiedenen vielen Drüsenläppchen (Lobuli) bestehen. Der Drüsenlobulus ist dabei als Basisstruktur zu sehen. Dieser enthält mehrere Drüsenazini, die histologisch aus einem zweireihigen Epithel bestehen: einem apikal sezernierenden und einer basalen Myoepithelschicht, dazwischen umgeben von lockerem Mesenchym (intralobuläres Mantelgewebe). Die Lobuli werden von einem zirkumlobulären Mantelgewebe umgeben. Die Drüsenendstücke bilden die sogenannten terminalen Gänge, welche zusammen die intralobulären Ausführungsgänge bilden. Außerhalb des Lobulus liegen die interlobulären Gänge mit Einmündung in die Hauptausführungsgänge, die sich retromammillär zu den Sinus lactiferi erweitern. Die Auskleidung der Milchgänge besteht aus einem zweireihigen Epithel, einer kubischen Basalschicht und einer zylindrischen Epithelschicht. Den Basalzellen wird dabei die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in Myoepithelzellen zugeschrieben, die von den terminalen Verzweigungen bis in die interlobulären Abschnitte vorhanden sind (nach Stegner, 1986, S.2, und Schiebler, 1991, S.432-437).

Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgt auch heute noch nach der gebräuchlichen WHO-Klassifikation. Nach dieser werden zwei große Hauptgruppen unterschieden, die duktales und lobuläres Karzinome, die jeweils noch in invasiv und intraduktal bzw. intralobulär unterteilt werden.

Nach dieser Einteilung entstünden Mammakarzinome also aus duktales oder lobuläres Abschnitten der Brustdrüse. Diese Theorie ist nach etlichen Untersuchungen jedoch zu bezweifeln.

Als Ausgangspunkt der Karzinome ist vielmehr die terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE), bestehend aus dem Drüsenläppchen und dem terminalen Gang, zu sehen (nach Russo, Russo, 1980, S.2677-2687, und Wellings et al., 1975, S.231-273) : in ihr findet sich die höchste Proliferationsrate der normalen Brustdrüse (Russo, Russo, 1980, S.2677-2687).

Die mit bis zu 80 % der Fälle am stärksten vertretene Gruppe ist die der invasiv duktalem Karzinome, von denen etwa 95% auch als NOS-Karzinome (not otherwise specified) bezeichnet werden. Seltener Untergruppen sind durch ihre spezielle Differenzierung von den invasiv ductalen Karzinomen abgeleitet und machen etwa 5 % aus (nach Bühling, 1995, S.319-320). Sie unterscheiden sich morphologisch und vor allem auch prognostisch von den beiden Hauptgruppen : das muzinöse, das papilläre, das adenoid-cystische, das medulläre und das tubulläre Karzinom (nach WHO 1981).

Diese gesamte Einteilung muß jedoch als unbefriedigend angesehen werden, weil die mit einem Anteil von bis zu 80 % vertretenen invasiv duktalem (NOS) Karzinome morphologisch und klinisch sehr heterogen sind. Bereits 1987 wurde ein Unterteilungsversuch anhand des Langzeitüberlebens in drei Gruppen A, B und C vorgenommen, die sich in ihrer Antigenexpression, dargestellt durch die monoklonalen Antikörper H59, H71 und H72, deutlich unterschieden.

Die Antikörper wurden unter Verwendung der Brustkrebs-Zell-Linie ZR-75-1 entwickelt. Die zugehörigen Antigene scheinen Glykoproteine auf der Zelloberfläche zu sein (nach Hendler, Yuan, 1985, S.421-429).

Diese Untersuchung legt den Zusammenhang zwischen der Antigenkomposition eines Tumors und dem histologischen Erscheinungsbild und der Prognose nahe (nach Yuan, Dawson, 1987, S.1097-1100). Daraus ergibt sich eine Möglichkeit, die bisher einheitliche NOS-Gruppe aufgrund von Moleküldifferenzierung, Wachstumsstruktur und Prognose weiter zu unterteilen.

1.1.4 Prognosefaktoren

1.1.4.1 Gesicherte Prognosefaktoren

Zu den gesicherten Prognosefaktoren gehören der pTNM-Status, die Morphologie sowie der Steroidhormonrezeptorstatus.

Der härteste prognostische Faktor bzgl. Überleben und Rezidivwahrscheinlichkeit ist der Lymphknotenstatus pN. Dieser sagt aus, ob Lymphknoten befallen sind oder nicht und wenn ja, wieviele. Hier herrscht eine eindeutige positive Korrelation mit dem Risiko von Überleben und Rezidiv. Der Status pN ist außerdem positiv mit der Tumorgroße pT korreliert. Ein zum Zeitpunkt der Diagnose größerer Tumor hat mit größerer Wahrscheinlichkeit bereits einen axillären Lymphknotenbefall verursacht als ein kleinerer Tumor. Auskunft darüber, ob zum Diagnosezeitpunkt bereits eine Fernmetastase vorliegt, oder nicht, gibt der Status pM.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit ist somit entscheidend von der Ausdehnung des Tumors zum Diagnosezeitpunkt abhängig. Hierzu einige Daten aus dem Tumorzentrum München :

T1N0: 92% für 5 Jahre, 78% für 10 Jahre

T2N1: 68% für 5 Jahre, 55% für 10 Jahre

M1: 28% für 5 Jahre, 15% für 10 Jahre

Verschiedene Varianten von TNM (z.B. T1N0M0, T2N1M0, M1, etc) wurden in der UICC-Klassifikation in verschiedene Stadien (Stage) zusammengefasst. Hier gilt je höher das Stadium, desto fortgeschrittener der pTNM-Status und umso schlechter die Prognose.

Auch die Morphologie ist ein gesicherter Prognosefaktor. Patientinnen mit einem höheren Malignitätsgrad haben eine schlechtere Prognose. Je entdifferenzierter ein Tumor ist (Grading), umso schlechter die Prognose. Auch ein Einbruch in das Lymphgefäßsystem (Lymphangiosis carcinomatosa) verschlechtert die Prognose. Der histomorphologische Typ ist ebenfalls mitunter ein Prognosefaktor. Bessere Überlebenswahrscheinlichkeit zeigten sich für die definierten Sonderformen des Mammakarzinoms.

Letztlich ist noch der Steroidhormonrezeptorstatus ein gesicherter Prognosefaktor. Hier ist zwischen Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptor (PR) zu unterscheiden. Bei nodal positiven Fällen scheint dem Östrogenrezeptor, bei nodal negativen dem Progesteronrezeptor die größere prognostische Bedeutung zuzukommen. Außerdem hat der Hormonrezeptorstatus auch große klinische Bedeutung, da je nach Vorliegen eine adjuvante Hormontherapie durchgeführt werden kann (nach Funke et al., 1998).

1.1.4.2 Wahrscheinliche und mögliche Prognosefaktoren

Es gibt eine Vielzahl weiterer Prognosefaktoren. Diese stammen aus den Bereichen der Histomorphologie, Genetik und Biochemie.

Wahrscheinliche Prognosefaktoren sind nach einer Untersuchung des Tumorzentrums Heidelberg: Tumorzellnachweis im Knochenmark, Angioinvasion, Tumorvascularisation, die Tumorpheriferation (S-Phase, Ki67) und das c-erb B2-Onkogen.

Als mögliche Prognosefaktoren werden dort andere Onkogenprodukte (bcl-2, c-myc, Beta-Catenin), Tumor-Suppressor-Antigene (p53, p16), Adhäsionsmoleküle (CD44v6, E-Cadherin) und Tumorproteasen/Proteaseinhibitoren (uPA, PAI-1) genannt (nach Grischke et al., 2000, S.9-16).

1.2 Cytokeratine

1.2.1 Das Cytoskelett

Die drei Hauptbestandteile des Cytoskeletts aller eukaryonten Zellen sind die

- Mikrotubuli
- Mikrofilamente (Aktinfilamente)
- Intermediäre Filamente

die für Gestalt, Bewegungsvorgänge und intracellulären Transport in der Zelle verantwortlich sind.

Die Mikrotubuli kommen in allen Zellen mit Kern vor. Ihre Gestalt ähnelt Röhren, die einzeln oder in Bündeln gerichtet vorliegen und damit die subzelluläre Struktur der Zelle bestimmen. Die meisten orientieren sich zum Zentriol, das als Organisationszentrum der Mikrotubuli gilt. Ihr Durchmesser beträgt 24 nm, ihre Wanddicke 5 nm. Sie werden bis zu 25 µm lang und bestehen aus Tubulin. Untereinander sind sie durch assoziierte Proteine verbunden und sind die Hauptbestandteile von Zentriolen, Zilien und Geißeln.

Mikrofilamente (Aktinfilamente) bestehen aus je zwei Aktinfäden (je ca. 5-7 nm dick), die in einer Helix umeinander gewunden sind. Eine Windung hat einen Durchmesser von 36 nm, ihre Länge beträgt bis zu einem µm. Die Lage der Mikrofilamente zueinander wird durch aktinbindende Proteine bestimmt. Mikrofilamente bestehen aus Aktin, es sind mindestens 7 verschiedene Typen bekannt, wobei die einzelnen Typen je nach Zellart charakteristisch vorliegen. Sind die Mikrofilamente in der Zelle mit Aktin verbunden, so dienen sie der Zellkontraktion, ohne diese Verbindung sind sie verantwortlich für die Stabilisierung der Zellmembran, Einziehungen derselbigen und ihrer Mitwirkung bei der Mitose.

Die Intermediärfilamente wurden als letzte Komponente des Zellskeletts identifiziert; sie haben einen Durchmesser von 8-10 nm, der zwischen dem Durchmesser der Mikrofilamente und dem der Mikrotubuli liegt; ihre Länge erreicht mehrere µm. Sie bestehen aus drei ineinander gewundenen Polypeptidketten mit alpha-Helices Struktur, die einen Faden bilden. Drei bis vier dieser Fäden bilden ein Intermediärfilament. Aufgrund dieser Struktur sind die Intermediärfilamente sehr stabil und kommen vor allem in Zellen mit hoher mechanischer Beanspruchung vor. Sie bilden ein um den Zellkern gelegenes Netzwerk, welches bis zur Zellmembran und den Desmosomen reicht. Somit schaffen sie ein interzelluläres Netzwerk. Intermediärfilamente lassen sich genetisch in mindestens 5 Klassen einteilen und weisen unterschiedliche Aminosäurefrequenzen auf (nach Schiebler, 1991 S.65-73):

- Klasse I : saure Cytokeratine (Molekulargewicht : 40.000-68.000 D)
- Klasse II : basische Cytokeratine (Molekulargewicht : 40.000-68.000 D)
- Klasse III : Vimentin (Molekulargewicht : 57.000 D), Desmin (Molekulargewicht : 53.000 D), Glial fibrillary acidic protein (Molekulargewicht : 45.000 D)
- Klasse IV : Neurofilamentäres Tripletprotein (Molekulargewicht : 68.000; 160.000; 210.000 D)
- Klasse V : Nukleäres Laminin (Molekulargewicht : 65.000-75.000 D)

Darüberhinaus sind die IF-Typen Hauptgewebetypen zugeordnet: Cytokeratine dem Epithel, Vimentin dem Bindegewebe, die Neurofilamente den Nerven Gliafaserprotein den Gliazellen und Desmin der Muskulatur (nach Nathrath, 1988, S.15, Moll et al., 1982, S.11).

1.2.2 Einteilung der Cytokeratine

Wie schon in 1.2.1 aufgezeigt, können die Cytokeratine in die zwei Gruppen aufgeteilt werden (nach Moll, 1988, S.102) :

- saure Cytokeratine (CK) (Klasse I der CK) (CK 9-20, saure Ladung)
- basische Cytokeratine (CK) (Klasse II der CK) (CK 1-8, basisch bis neutral)

Cytokeratine kommen in Epithelzellen und Derivaten des Epithels vor. Die sauren und basischen Cytokeratine werden von je einer Gengruppe kodiert. Ihre Hauptaufgabe besteht im mechanischen Schutz der Epithelien, Aufrechterhaltung der Zellstruktur sowie der Protektion vor Wasserverlust, Strahleneinwirkung und Hitze.

Was die Cytokeratine für die immunhistochemische Untersuchung so interessant macht, ist ihr spezifisches Expressionsmuster je nach Epithelart (nach Schiebler, 1991, S.73), jede Epithelzelle enthält mindestens ein saures und ein korrespondierendes basisches Cytokeratin.

1.2.3 Verteilungsmuster

Aufgrund ihrer epithelspezifischen Verteilung ist eine weitere Einteilung der Cytokeratine außer nach Molekulargewicht (MG) und Ladung auch nach ihrem Verteilungsmuster möglich. So kommen die Cytokeratine 1-6 sowie 9-17 vorwiegend in Plattenepithel, Cytokeratin 7, 8, 18-20 in Zylinderepithel vor (nach Moll, 1993, S.1-197).

Was das Verteilungsmuster der Cytokeratine im normalen Epithel der Mamma betrifft, so muß zwischen luminalen und basalen Zellen unterschieden werden. Insgesamt kommen im Epithel der Brustdrüse die Cytokeratine 5, 7, 8, 14, 15, 17, 18, und 19 vor (nach Moll et al., 1982, S.14-15).

Davon sind in der basalen Schicht Cytokeratin 5 und 14 (typisch für Plattenepithelien), sowie wenig Cytokeratin 7 und 19 vertreten, während in der luminalen Schicht Cytokeratin 7, 8, 18 und 19 vorkommen (nach Taylor-Papadimitriou et al., 1989, S.403-413 und Nathrath, 1988, S.51).

Nach neueren Untersuchungen fanden sich in der luminalen Schicht vereinzelt auch die plattenepithelialen Cytokeratine 1 und 2, allerdings nur bei der laktierenden Mamma. Außerdem findet sich in der laktierenden Mamma noch Cytokeratin 13 in den luminalen Zellen, welches bei der ruhenden Mamma nicht nachgewiesen werden kann (nach Nathrath, 1988, S.113).

Die Cytokeratinverteilung in Mammakarzinomen wird im Vergleich zum normalen Epithel der Brustdrüse aufrechterhalten. So finden sich die Cytokeratine der luminalen Epithelien (Cytokeratin 7, 8, 18, 19) auch in den Karzinomen wieder (nach Nathrath et al., 1994, S. 291).

Bis auf wenige Ausnahmen fehlt jedoch in allen Mammakarzinomen das für die myoepitheliale Schicht typische Cytokeratin 14 (nach Nathrath, 1988, S.119).

Cytokeratin 13 kommt in etwa der Hälfte der Karzinome –allerdings nur in Einzelzellen- vor (nach Nathrath, 1988, S.119 und Nathrath, Lane, 1990, S. 596).

Eine konstante Expression von Cytokeratin 19 wurde in mehreren Untersuchungen beobachtet (nach Bartek et al., 1985, S.299-306).

Auffällig war eine heterogene Expression mancher Cytokeratine in einigen Tumoren. Beobachtet wurde dies für die Cytokeratine 8, 18 und vor allem für Cytokeratin 7 (nach Moll et al., 1983, S.256-269, Nathrath, 1988, S.119, Schaller et al., 1996, S.1881).

Natürlich wurden auch im Gegensatz zur allgemeinen Gültigkeit der Kontinuität der Cytokeratinexpression auch in seltenen Fällen Beobachtungen gemacht, bei denen sich Unterschiede in der Expression zwischen Ursprungsgewebe und Karzinom zeigten (nach Moll et al., 1983, S.599-610; Moll, Franke, 1986, S.112).

1.2.4. Cytokeratin 7

Wie schon unter 1.2.2 erwähnt, gehört Cytokeratin 7 zu den neutral bis basischen Cytokeratinen mit einem niedrigen Molekulargewicht der Gruppe II (nach Moll et al.,1982, S.15).

Es kommt in nicht kanzerösen Gangepithelien des Körpers vor. Ausführliche Untersuchungen in dieser Hinsicht wiesen Cytokeratin 7 in den Gangepithelien von Brust-, Speichel und Schweißdrüsen, der intra- und extrahepatischen Gallengänge, der Pankreasgänge und der Mündungsstücke der Brunnerschen Drüsen des Duodenums nach. Ferner ist es in einigen Epithelien der Niere sowie in den Lungenalveolen nachweisbar. Außerdem findet es sich in den weiblichen und männlichen Geschlechtsorganen wie Endometrium, Tuben, Rete testis und Ductus efferens wieder (siehe auch Bild 1-1). Einzelheiten der Verteilung in Bild 1-1. („Keratinmensch“, nach Nathrath, 1988, S.28).

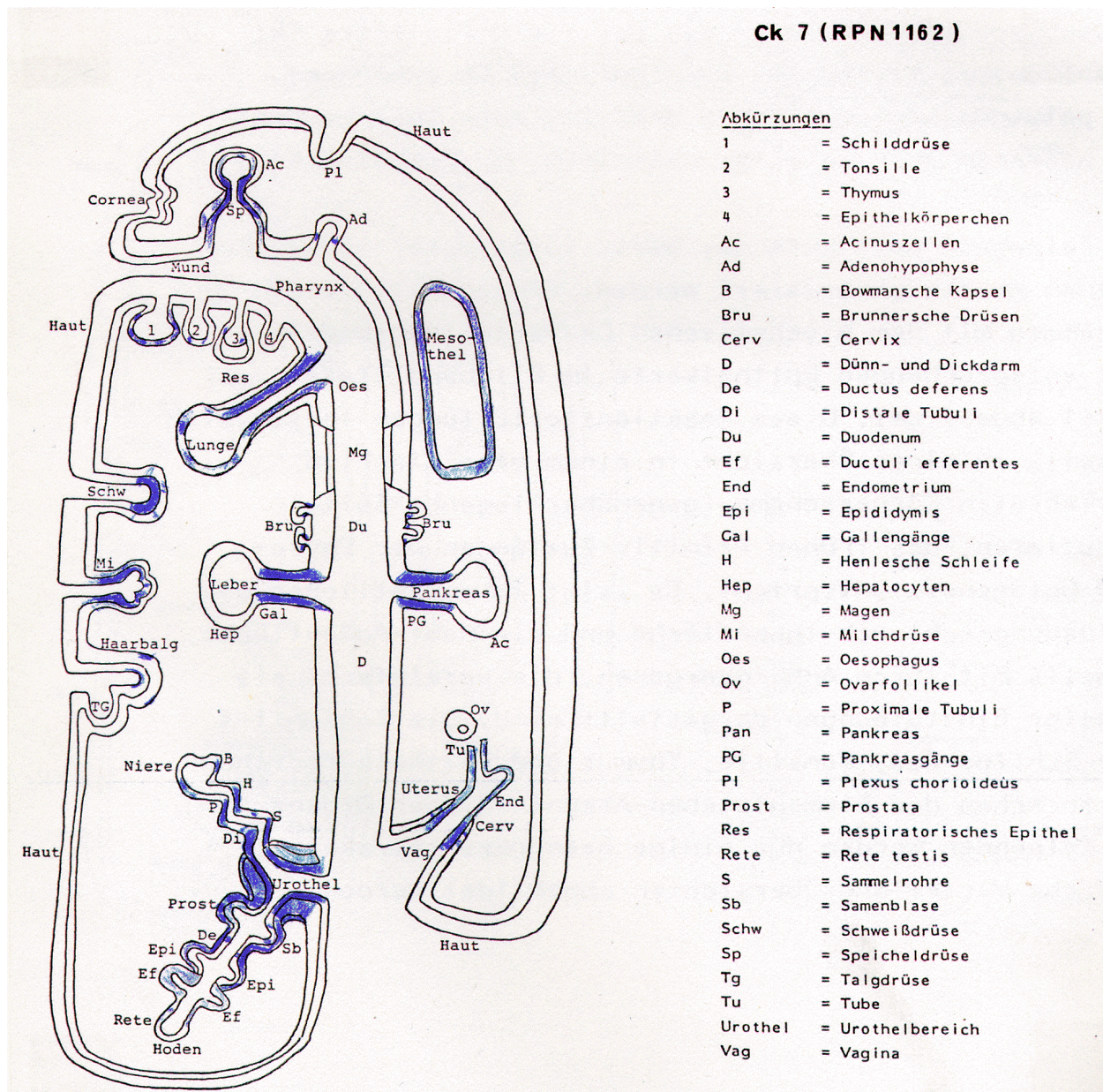


Bild 1-1: Cytokeratin 7 Verteilung im menschlichen Körper („Keratinmensch“ nach Nathrath, 1988, S.28).

Bei mehrreihigen oder mehrschichtigen Epithelien war Cytokeratin 7 in den luminalen Zellen der Brust-, Speichel-, und Schweißdrüsen und des respiratorischen Epithels vorhanden, während in den ableitenden Samenwegen ausschließlich die basalen Zellen Cytokeratin 7 enthielten.

Aufgrund dieser Untersuchungen dient Cytokeratin 7 als Antigen der Kontaktstrukturen zwischen den für die Herstellung von Stoffwechselprodukten verantwortlichen Zellen (z.B. Leberzellen) und den ihnen zugehörigen inneren (z.B. Darm) und äußeren Oberflächen (nach Nathrath, 1988, S.28-30).

In den vergangenen Jahren wurden weitere Untersuchungen bzgl. Cytokeratin 7 bei Mammakarzinomen vorgenommen, sowie praktische Anwendungsmöglichkeiten der Cytokeratinspezifität für Epithelien ausgearbeitet.

So wurde mit Hilfe biochemischer Extraktionsverfahren der Nachweis erbracht, daß Cytokeratin 7 in Mammakarzinomen in geringerer Menge enthalten ist, als in den normalen Mammaepithelien (nach Su et al., 1996, S.800-806).

Ebenso wurde biochemisch ein geringer Gehalt von Cytokeratin 7 in Mammakarzinomen im Vergleich zu Fibroadenomen der Mamma nachgewiesen (nach Franzen et al., 1997, S.1632-1638).

Praktische Anwendungsmöglichkeiten fanden sich bei der immunhistochemischen Untersuchung von Metastasen eines „Carcinoma of unknown primary“ auf Cytokeratin 7. So bescheinigen Perry et al. Cytokeratin 7 eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der Identifizierung des Primärtumors. Ihre Arbeit stützt sich dabei auf die Untersuchungen von cerebralen Metastasen unbekannter Adenokarzinome (nach Perry et al., 1997, S.938-943). Auch zur Unterscheidung zwischen einem primären mucinösen Adenokarzinoms des Ovar und filiae von occulten mucinösen Adenokarzinomen dient die immunhistologische Untersuchung auf Cytokeratin 7 (nach Hanna et al., 1997, S.481).

Diese Einsatzmöglichkeit der immunhistochemischen Untersuchung auf Cytokeratin 7 wurde auch in anderen Untersuchungen genutzt. Die Autoren bescheinigen dem Cytokeratin 7 im Vergleich zu Cytokeratin 20 eine höhere Effizienz bei der Ermittlung des unbekanntes Primärtumors (nach Longatto et al., 1997, S.961-971).

Von Lundquist et al. wurde dem Cytokeratin 7 als Marker für Pagetzellen eine hohe immunphänotypische Spezifität bescheinigt (nach Lundquist et al., 1997, S.334).

Die Cytokeratin 7 Expression dient ebenfalls als Unterscheidungshilfe zwischen endometrioiden Karzinomen des Ovar (Keratin 7-positiv) und Granulosazelltumoren (Keratin 7-negativ) und kann eine Hilfe bei der Unterscheidung von Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren (Keratin 7-negativ) und sertoliformen Karzinomen (Keratin 7-positiv) sein (nach Guerrieri et al., 1998, S.266).

In einer Arbeit von Pitz et al. wurde die Cytokeratin Expression von Cytokeratin 8, 18, 19 und 7, sowie Vimentin in histologisch verschiedenen Nierenzellkarzinom-Untergruppen untersucht.

Dabei ergab sich, daß die Cytokeratin 7 Expression mit dem Grading tendenziell korreliert.

So exprimierten alle klarzelligen Nierenzellkarzinome mit Grading I und II kein Cytokeratin 7, die entdifferenzierten Karzinome (Grading III) zum größten Teil jedoch schon. (Pitz et al., 1987, S. 645).

1.2.5 Nachweis von Cytokeratinen

Im Prinzip bestehen zwei Möglichkeiten des Cytokeratinnachweises:

- a) Einerseits kann mit Hilfe biochemischer Extraktionsverfahren und Isolierung des einzelnen Cytokeratins sein Nachweis erbracht werden. Damit gelingt zusätzlich eine quantitative Analyse des in einer Zellpopulation enthaltenen Cytokeratins.
- b) Andererseits ist der Nachweis von Cytokeratinen mittels immunhistochemischer Verfahren anhand des histologischen Feinschnittpräparates möglich. Dabei führen monoklonale Antikörper (mono- oder oligospezifisch) mit Hilfe von speziellen Farbstoffen zur Anfärbung des in den einzelnen Zellen jeweils enthaltenen Cytokeratins. Diese Methode liefert zwar keine exakte Menge des jeweiligen Cytokeratins, zeigt dafür aber seine Verteilung im Gewebe. Erst dadurch wird z.B. die Zugehörigkeit von Cytokeratin 14 zu den basalen Zellen des Mammaepithels deutlich.

1.3 Zielsetzung und Fragestellungen

Eine zytometrische Auswertung von Cytokeratinen, insbesondere von Cytokeratin 7 hat bisher noch nicht stattgefunden. Der Pilotcharakter dieser Untersuchung liegt insbesondere in der Tatsache, daß in dieser Arbeit kein immunhistochemischer Marker eines Kerns, sondern ein Cytoplasmamarker untersucht wurde. Bisherige zytometrische Untersuchungen bezogen sich auf Antigenexpression in Zellkernen (ER, PR, Ki-67 Antigen).

Interessant für den Kliniker wäre, ob grundsätzlich auch Zytoplasma-Antigenexpression und speziell das Ausmaß der Expression von Cytokeratin 7 eine prognostische Relevanz besitzt und dadurch Therapieschemata ausgearbeitet bzw. abgeändert werden könnten, ferner ob eine Schnittauswertung semiquantitativ oder lediglich „subjektiv“ erfolgen soll.

Diese Arbeit soll unter anderem ermitteln, ob folgende Hypothesen zutreffen: „Der Grad an Cytokeratin 7 Expression hat biologische und prognostische Relevanz“.

Insbesondere waren folgende Fragestellungen zu untersuchen

- Ist das Patientengut repräsentativ ?
- Besteht eine Korrelation zwischen semiautomatischer Messung und visueller Schätzung ?
- Besteht eine Korrelation zwischen den Färbungen durch 3 verschiedene Cytokeratin 7-Antikörper ?
- Besteht eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und klinischen Daten ?
- Besteht eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und immunhistologischen Kriterien ?
- Möglichkeiten der Zytometrie bei der Bewertung von immunhistologischen Schnitten ?
- Weisen Cytokeratin 7-heterogen exprimierende Tumoren Besonderheiten der Prognose auf ?
- Sind die Karzinome mit heterogener Cytokeratin 7-Expression der Cytokeratin 7-negativen oder der Cytokeratin 7-positiven Karzinomgruppe zuzuordnen (statistisch prognostisch relevanter Schwellenwert der immunhistologisch heterogenen Cytokeratin 7-Expression) ?
- Ist die Unterteilung in Cytokeratin 7-positiv und -negativ Karzinome relevant und bietet sich damit eine weitere Unterteilung der NOS Karzinome ?

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Für die folgende Arbeit wurden die klinischen Daten, sowie das follow-up von 91 Patientinnen erhoben. Die Fälle waren von Prof. Dr. W. Nathrath für seine Habilitationsarbeit von 1988 zufällig ausgewählt worden. Von ihm wurden in seiner Arbeit insgesamt 117 Fälle bearbeitet.

Von diesen 117 wurden 26 Fälle in dieser Arbeit wegen unzureichenden follow-up Daten noch vor Beginn der zytometrischen Auswertung ausgeschlossen. Dem Autor (Röhl, M.) der hier vorgelegten Dissertation war dadurch nicht bekannt, ob die Fälle Cytokeratin 7 positiv oder negativ waren.

Die Patientinnen waren im Zeitraum von 1983 bis 1987 in drei verschiedenen Kliniken operiert worden (siehe Bild 2-1). Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern dieser Kliniken, die mich bei der Suche nach den Patientenakten tatkräftig unterstützt haben.

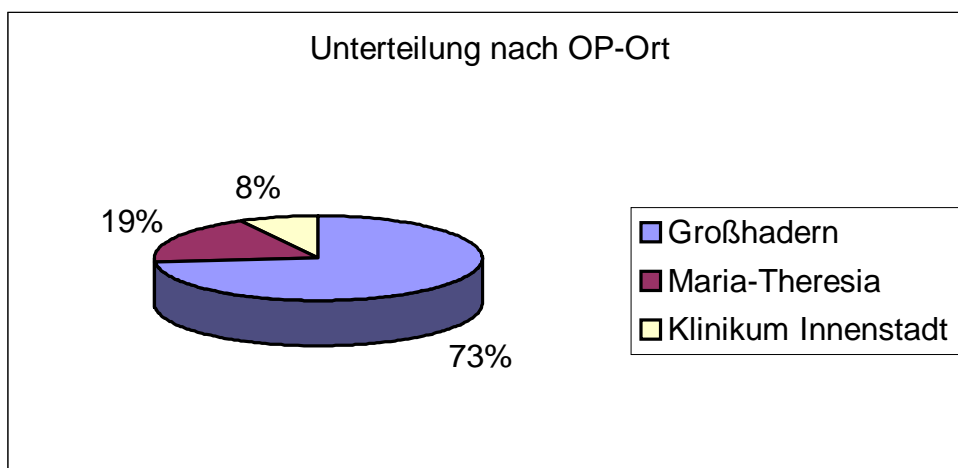


Bild 2-1: Herkunftsklinik des Untersuchungsmaterials

„Großhadern“:	Klinikum München-Großhadern, Frauenklinik und Poliklinik
„Maria-Theresia“:	Maria-Theresia-Klinik, Fachklinik für Chirurgie
„Klinikum Innenstadt“:	Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Chirurgische Klinik

Im einzelnen wurden folgende klinische Daten erhoben:

2.1.1 Alter

Erhoben wurde das Alter von 91 Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Der Mittelwert des Alters betrug 57,6 Jahre, die jüngste Patientin war 29, die älteste 83 Jahre alt; es fand sich eine zweigipflige Verteilung: ein Gipfel bei 48, der andere bei 66 bzw. 71 Jahren, eine Grenze wurde bei 55 Jahren angenommen: 42 (46%) Patientinnen waren jünger als 55 Jahre („prämenopausal“), 49 (54%) Patientinnen waren älter („postmenopausal“).

Von der Anzahl der Fälle sowie dem Mittelwert ist diese Patientinnengruppe durchaus als repräsentativ anzusehen. Allerdings ist im Vergleich zu den Zahlen von Schüller und Gutzwiller der prämenopausale Anteil von Frauen um circa 10% zu hoch. Nach den Zahlen dieser Autoren beträgt das Verhältnis von prämenopausal zu postmenopausal ein Drittel zu zwei Drittel (nach Schüller, Gutzwiller, 1995, S.104).

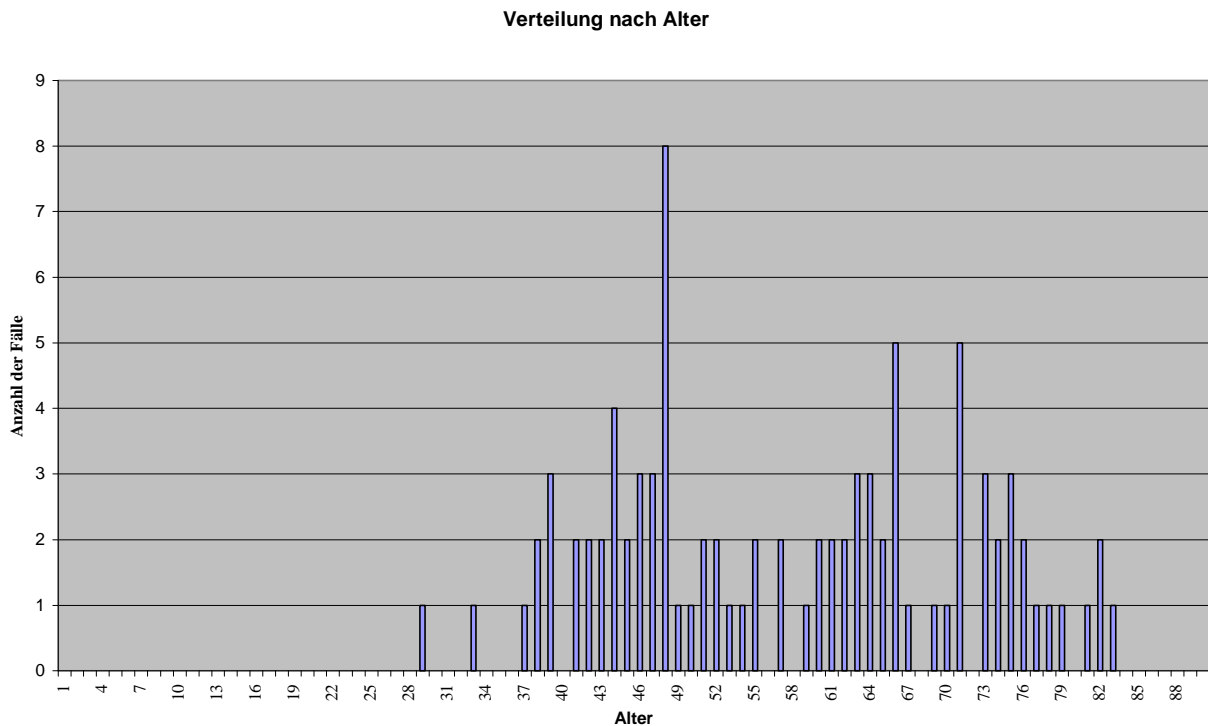


Bild 2-2: Altersverteilung der Patientinnen

2.1.2 pTpNpM-Klassifikation

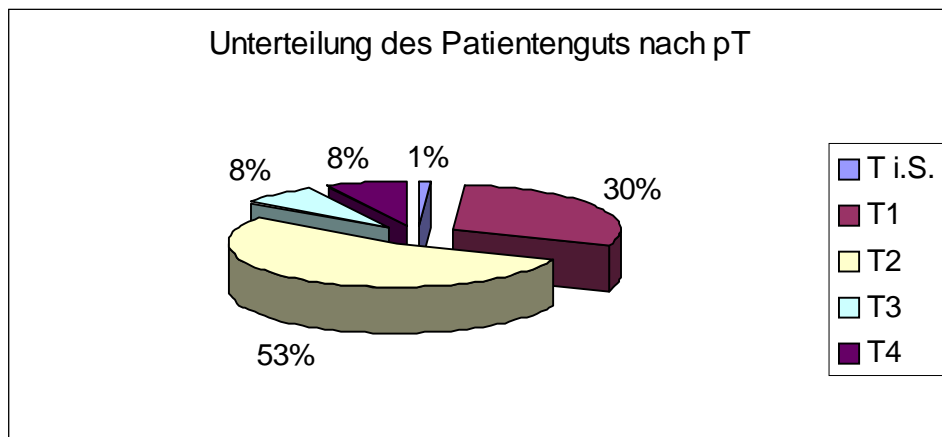


Bild 2-3: Unterteilung nach pT

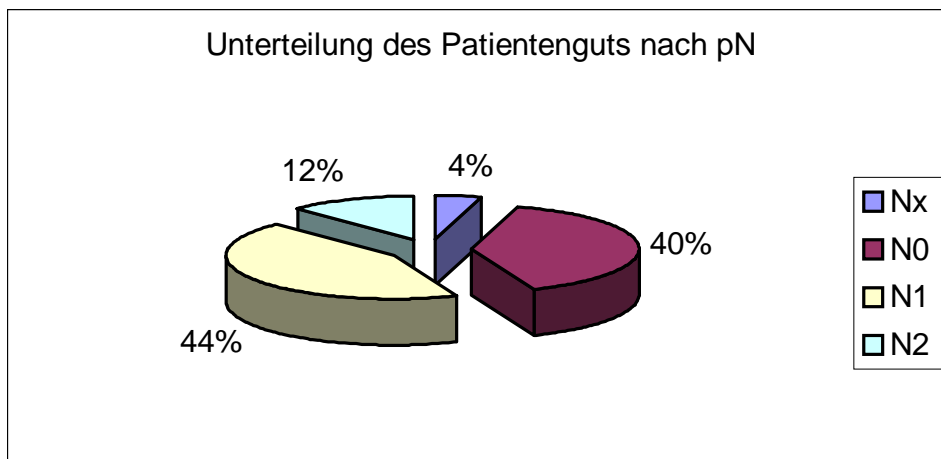


Bild 2-4: Unterteilung nach pN

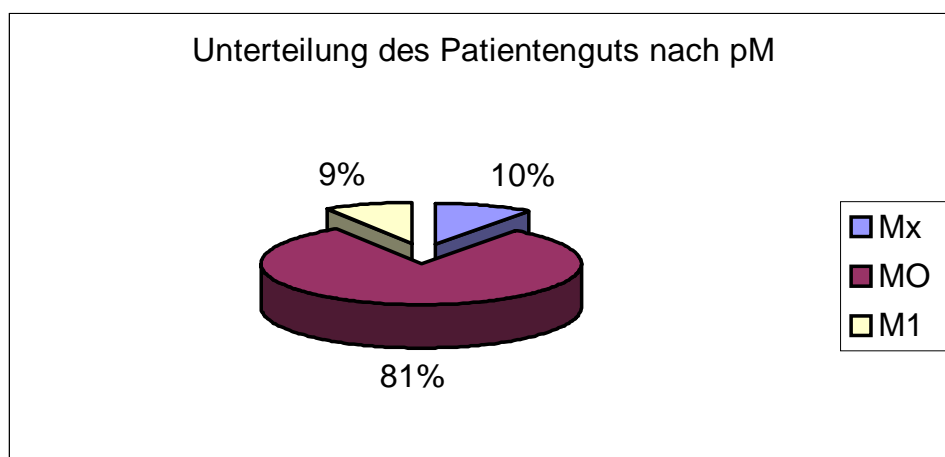


Bild 2-5: Unterteilung nach pM

2.1.3 Grading

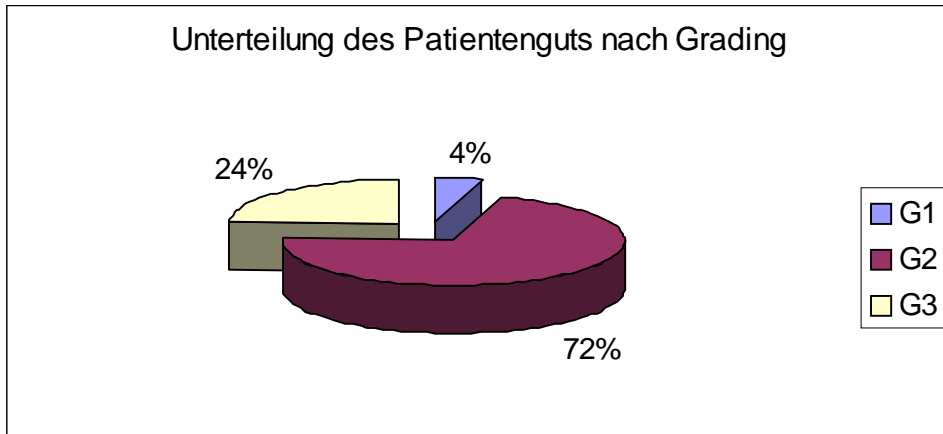


Bild 2-6: Das Grading erfolgte nach Bloom-Richardson.

2.1.4 UICC-Stadium

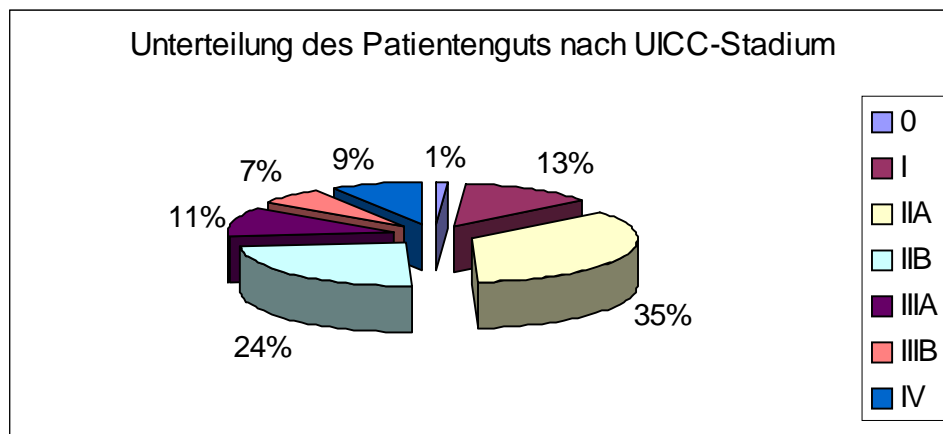


Bild 2-7: Unterteilung des Patientenguts nach UICC (Sobin 1997 S.128-129)

Fälle, bei denen eine Zuordnung wegen Nx nicht sicher möglich war, wurden in die jeweils prognostisch günstigere Gruppe eingeordnet. Dies war jedoch nur bei einem Fall nötig, der sowohl IIB als auch IIIA hätte sein können.

2.1.5 Östrogen/Gestagen-Rezeptor-Status

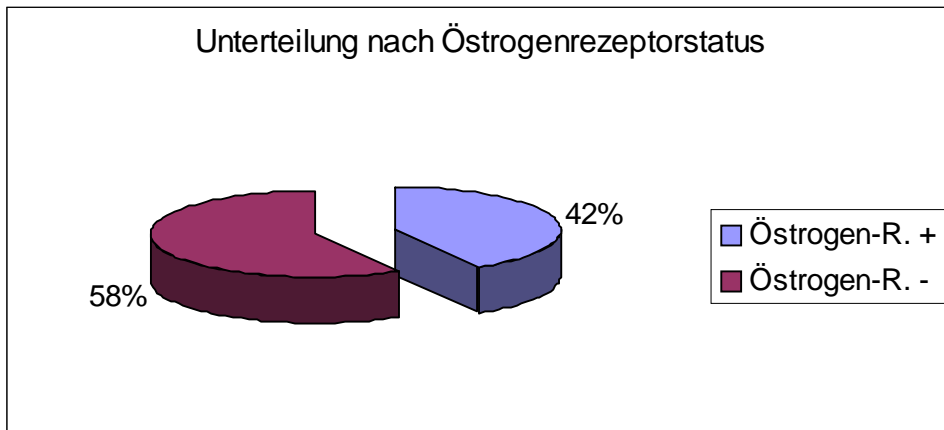


Bild 2-8: Unterteilung nach Östrogenrezeptorstatus

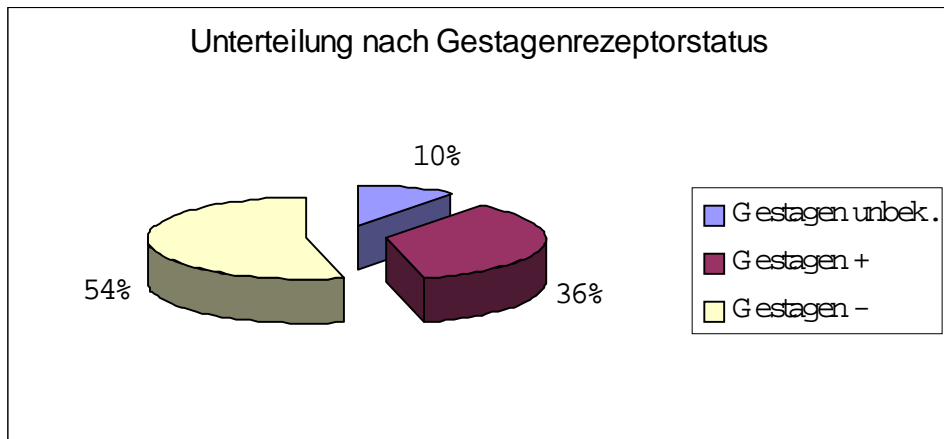


Bild 2-9: Unterteilung nach Gestagenrezeptorstatus

Der Gestagenrezeptorstatus wurde erst nach ca. der Hälfte der Fälle auch immunhistologisch bestimmt. Somit liegen im Gegensatz zum Östrogenrezeptorstatus nicht bei allen Fällen die Werte vor, da in der behandelnden Klinik nicht immer die immunohistochemische Bestimmung des Hormonstatus verlangt wurde.

Bei 59 Patientinnen (64%) war der Östrogenrezeptor und/oder der Gestagenrezeptor positiv. Diese Anzahl stimmt mit den von Stegner gefundenen Ergebnissen überein, der diese Häufigkeit mit zwischen 60-70% angibt (nach Stegner, 1994, S.330).

2.1.6 Lokalisation des Tumors nach Brustquadrant

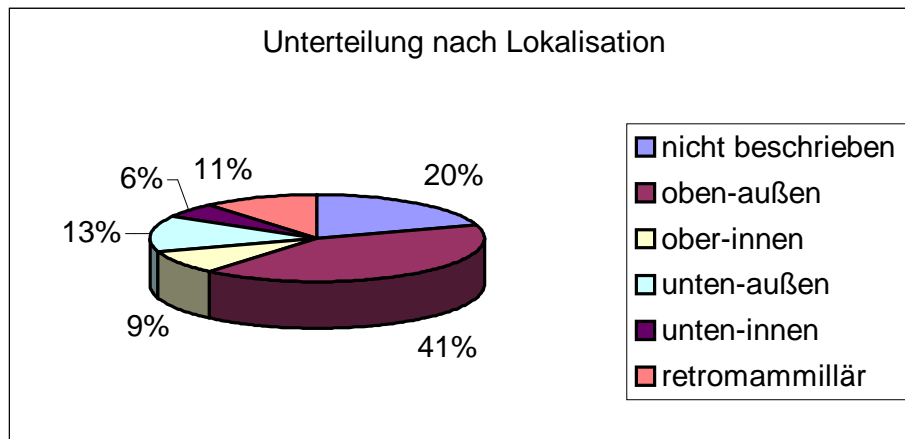


Bild 2-10: Unterteilung nach Lokalisation

Wie aus dem Diagramm ersichtlich konnten leider 20% der Lokalisationen aus den zur Verfügung stehenden Unterlagen nicht ermittelt werden. Nach Abzug der unbekanntem Lokalisationen entsprechen die Zahlen den gängigen Verteilungsmustern. (nach Stegner, 1994, S.320; und Bühling, 1995, S.319)

2.1.7 Histologie nach WHO-Klassifikation

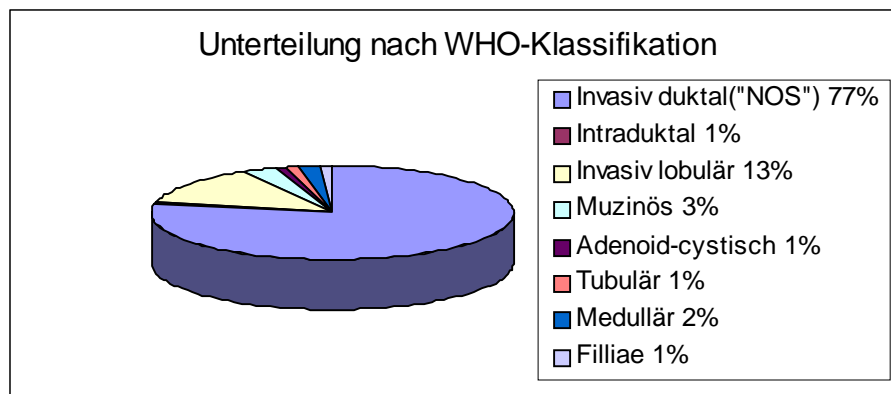


Bild 2-11: Unterteilung nach WHO-Klassifikation

Die prozentuale Verteilung der histologischen Typen entspricht den allgemein gängigen Zahlen. Invasiv duktale Karzinome („NOS“) werden mit einem Anteil von 65-85% angegeben (nach Arnhold et al., 1996, S.9-10, und Bühling et al. 1995 S.319-320), die invasiv lobulären Karzinome mit einem Anteil von 10% bis 20% (nach Bühling et al. 1995 S.319-320). Den restlichen spezifischen Differenzierungen wird ein Anteil zwischen 5% und 10% zugeschrieben (nach Arnhold 1996 S.9-10, Bühling et al. 1995 S.319-320).

Unter den 91 Fällen war auch eine filia eines Mammakarzinoms (Omentum majus-Metastase).

2.1.8 Follow-up, Rezidiv- bzw. Metastasenfreies-Intervall

Das „Follow-up“ der Patientinnen war bei 91 der ursprünglich 117 Fälle möglich und wurde anhand der in den Kliniken vorliegenden Nachsorgedaten, sowie durch Befragung der Hausärzte und Reha-Kliniken bis zum Jahr 1996 erhoben. Somit liegt eine Nachbetrachtungszeit zwischen 9 und 14 Jahren vor.

Eine lückenlose Aufklärung war nicht möglich, da einige Patientinnen „unbekannt verzogen“ waren oder ihren behandelnden Arzt gewechselt hatten (siehe Tabelle 2-1)

Tabelle 2-1: Follow up

	Mittelwert	Standardabw.	Minimum	Maximum	Verstorben	Am Leben
Follow up	71,8	-43,0	2	146	27	55
Rezidiv	63,2	-45,1	1	144	18	64
Metastase	64	-45,4	2	146	32	50
KFI	59	-46,0	1	140	37	45

Erläuterungen zur Tabelle:

Die Werte für Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum sind in Monaten angegeben, „Verstorben“ und „Am Leben“ sind Fallzahlen.

„Rezidiv“ bedeutet ein erneutes Auftreten der Erkrankung, z.B. ein Lokalrezidiv an der Operationsnarbe, jedoch keine Organmetastase.

Metastase bedeutet das Auftreten einer Lungen-, Leber-, Knochen- oder Hirnmetastase.

KFI ist das krankheitsfreie Intervall ohne erneutes Auftreten der Krebserkrankung.

2.2 Material

Die Untersuchungen der hier vorgelegten Dissertation (siehe 2.3) wurden an bereits gefärbten Gefrierschnitten von Mammakarzinomen durchgeführt. Zunächst werden hier die Einzelheiten der Schnitte und Färbungen mitgeteilt.

2.2.1 Gefrierschnitte

Die untersuchten Gewebe entstammten ausschließlich intraoperativen Schnellschnittpräparaten. Nach Erhalt, Durchgabe der Diagnose an den Operateur und ausreichender Entnahme für die definitive Diagnostik, wurde repräsentatives Tumorgewebe in Würfelgröße von 1-2 cm entnommen, in Methylbutan in flüssigem Stickstoff schnellgefroren, in Alufolie gewickelt, in Plastikfolie eingeschweißt und bei -80°C gelagert.

Von den tiefgefrorenen Blöcken wurden bei -20°C Serienschnitte von $5\ \mu\text{m}$ Dicke angefertigt, nachdem diese zuvor mit destilliertem Wasser auf Gewebehaltern festgefroren worden waren. Die erhaltenen Schnitte wurden auf mit Serunglycerin beschichtete Objektträger aufgezogen. Am ersten Schnitt erfolgte eine HE-Färbung, um die Qualität der Beurteilbarkeit festzustellen. Bei befriedigendem Ergebnis wurden vom jeweiligen Gewebeblock insgesamt 40 Serienschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden bei Raumtemperatur 3 Stunden unter dem Ventilator getrocknet und anschließend für 5 Minuten in Aceton bei 4°C fixiert.

Die so gewonnenen Präparate waren immunhistochemisch mit zahlreichen Antikörpern, zur Darstellung der Cytokeratin 7-Reaktivität in dieser Studie mit der ABC-PO-Methode (Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase) behandelt worden.

Im einzelnen: die fixierten Schnitte waren zuerst kurz mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) angefeuchtet und daraufhin zur Blockierung von endogenem Biotin mit Avidin (1 mg Avidin in 1 ml PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur behandelt worden, gefolgt von einem kurzen Waschvorgang, der Beschichtung mit normalem Pferdeserum für 15 Minuten zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und einem erneuten Waschvorgang.

Nach dieser Vorbehandlung waren je ein Präparat mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper RPN-1162, LP-1K und LP-5K (Details siehe 2.2) inkubiert worden.

Nach 3 Waschvorgängen a 5 Minuten, war jeweils ein biotinisierter anti-Maus-Ig-G-AK vom Pferd (Verdünnung 1:200 in PBS), danach der Peroxidase-Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain 4002; Camon, Wiesbaden) zugegeben worden, mit einer Einwirkzeit von jeweils 30 Minuten.

Nach einem erneuten Waschvorgang war die Färbung mit H_2O_2 als Peroxidase-Substrat und 0.01 % 3-Amino-9-Ethyl-Acethylcarbazol in Michaelispuffer sowie die Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun bei Blaudifferenzierung in Leitungswasser durchgeführt worden.

Die so gewonnenen immunhistochemisch behandelten Präparate waren mit Kaiser's Glycerin-gelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt worden.

Die endogene Peroxidase war nicht blockiert worden, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß einerseits die H_2O_2 -Methanol-Methode die Blockierung nicht vollständig gewährleistet und andererseits die Blockierung mit Na-Borhydrid und Perjodsäure die Gefrierschnittmorphologie zerstört.

In den meisten Mamma-Karzinomen war jedoch endogene Peroxidase nicht nachweisbar, so daß eine Vorblockierung oder die Anwendung der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase) als Alternative zur ABC-PO-Methode ohnehin nicht erforderlich gewesen wäre.

Die Lagerung der Präparate erfolgte bei Raumtemperatur, trocken und dunkel.

2.2.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit untersuchten Präparate waren mit den vor allem für Cytokeratin 7 spezifischen Antikörpern RPN-1162, LP-1K und LP-5K behandelt worden.

Dabei handelte es sich ausschließlich um monoklonale Mäuseantikörper. Die genaue Herkunft, Immunogen sowie die Cytokeratinspezifität ist aus Tabelle 2-2 ersichtlich.

Tabelle 2-2: Herkunft der Antikörper

Bezeichnung	Immunogen	CK-Spezifität	Herkunft	Literatur
RPN 1162	Zell-Linie RT112	7	Amersham	Osborn et al. 1985 Tölle et al. 1985
LP 1K	Mensch, SV 40-Transformierte	(1), (2), 4, (5), 7, (8)	Dr. E.B. Lane	Lane et al. 1985
LP 5K	„Keratinocyten“-Zell-Linie	(1), (2), (5), 7, (8)	Dr. E.B. Lane	Lane et al. 1985

2.2.2.1 Standardisierung der Antikörper

Für die ABC-Methode an den Gefrierschnitten der Mammakarzinome waren optimale Konzentration der Antikörper und ihre Inkubationszeit an Haut- und Lebergewebe wie folgt ermittelt worden:

Zunächst wurde die Reaktivität bei constanter Inkubationszeit von 30 Minuten und bei Raumtemperatur mit den Antikörper-Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:100 überprüft. Erfolgte keine oder nur eine unbefriedigende Reaktion, so wurden die Gewebe erneut bei 37°C unverdünnt über 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und über Nacht (bei 4°C) inkubiert.

Bei positiver Reaktion wurde von der jeweils höchsten reaktiven Verdünnung eine Doppelverdünnung hergestellt und geprüft.

Optimal war die Verdünnung, die eine Stufe unter der letzten noch wertbaren reaktiven Verdünnung lag.

Für die ABC-Methode wurden vorgegebene Verdünnungen des Kits verwendet (Hersteller: Camon).

2.2.2.2 Charakteristika der einzelnen Antikörper

2.2.2.2.1 RPN-1162

Bei RPN-1162 handelt es sich um einen von der Maus gewonnenen monoklonalen, monospezifischen Antikörper, d.h. er ist spezifisch für Cytokeratin 7. Der Antikörper war gegen die Urothelkarzinom-Zell-Kulturlinie RT 112 hergestellt worden. Er reagiert überwiegend mit dem luminalen Epithel des zweireihigen Epithels der Brustdrüse.

Sein Reaktionsspektrum deckt sich, auf alle Körperepithelien gesehen, mit dem biochemischen Verteilungsmuster von Cytokeratin 7, welches in vorherigen Arbeiten ermittelt wurde (Moll et al., 1982, S.15, Quinlan et al., 1985, S.282-306, Nathrath, 1988, S.25-29, siehe auch Bild 1-1 in 1.2.4.).

2.2.2.2.2 LP-1K / LP-5K

Die Antikörper LP-1K und LP-5K sind ebenfalls von der Maus und monoklonal, jedoch polyspezifisch, d.h. sie erkennen drei oder mehr Cytokeratine. Beide Antikörper waren gegen eine S 40-Virus-transformierte „Keratinocyten-Kultur-Linie“ hergestellt worden.

Sie erkennen beide vor allem Cytokeratin 7, schwach reaktiv erkennen sie auch die Cytokeratine 1, 2, 4, 5, 6 und 8.

Ihr Erkennungsspektrum bezüglich der Epithelien des menschlichen Körpers ist identisch, wobei LP-1K eine stärkere Reaktion verursacht. Sie reagieren mit den in 1.2.4. beschriebenen Epithelien, sowie zusätzlich mit den inneren und äußeren Epithelien der Schweißdrüsenausführungsgänge, dem Myoepithel der Brustdrüse, dem foveolären Epithel der Magenschleimhaut sowie mit den Merkelzellen. Dies deutet daraufhin, daß von ihnen in sehr geringem Maße (wie im Erkennungsspektrum in Tabelle 2-2 (S. 22) dargestellt) außer Cytokeratin 7 auch noch andere Cytokeratinepitope erkannt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß LP-1K und LP-5k zwar ein großes biochemisches Reaktionsspektrum besitzen, immunhistologisch aber im Wesentlichen mit Cytokeratin 7-haltigen Epithelien reagieren und somit ebenso wie RPN-1162 für die Untersuchung von Cytokeratin 7-haltigen Epithelien geeignet sind (nach Nathrath, 1988, S.44).

Immunhistologisch gesehen würde die Reaktion mit Cytokeratin 4 sich am meisten störend auswirken, das außer Cytokeratin 7 noch relativ am stärksten miterkannt wird. Cytokeratin 4 kommt in den in dieser Arbeit untersuchten Präparaten jedoch kaum vor, was durch eine Untersuchung der gleichen Gewebe mit einem für Cytokeratin 4 monospezifischen Antikörper (mAK 6B 10) bewiesen wurde (nach Nathrath, 1988, S.109).

Ein Beispiel für die so gewonnenen Präparate ist in Bild 2-12 zu sehen.

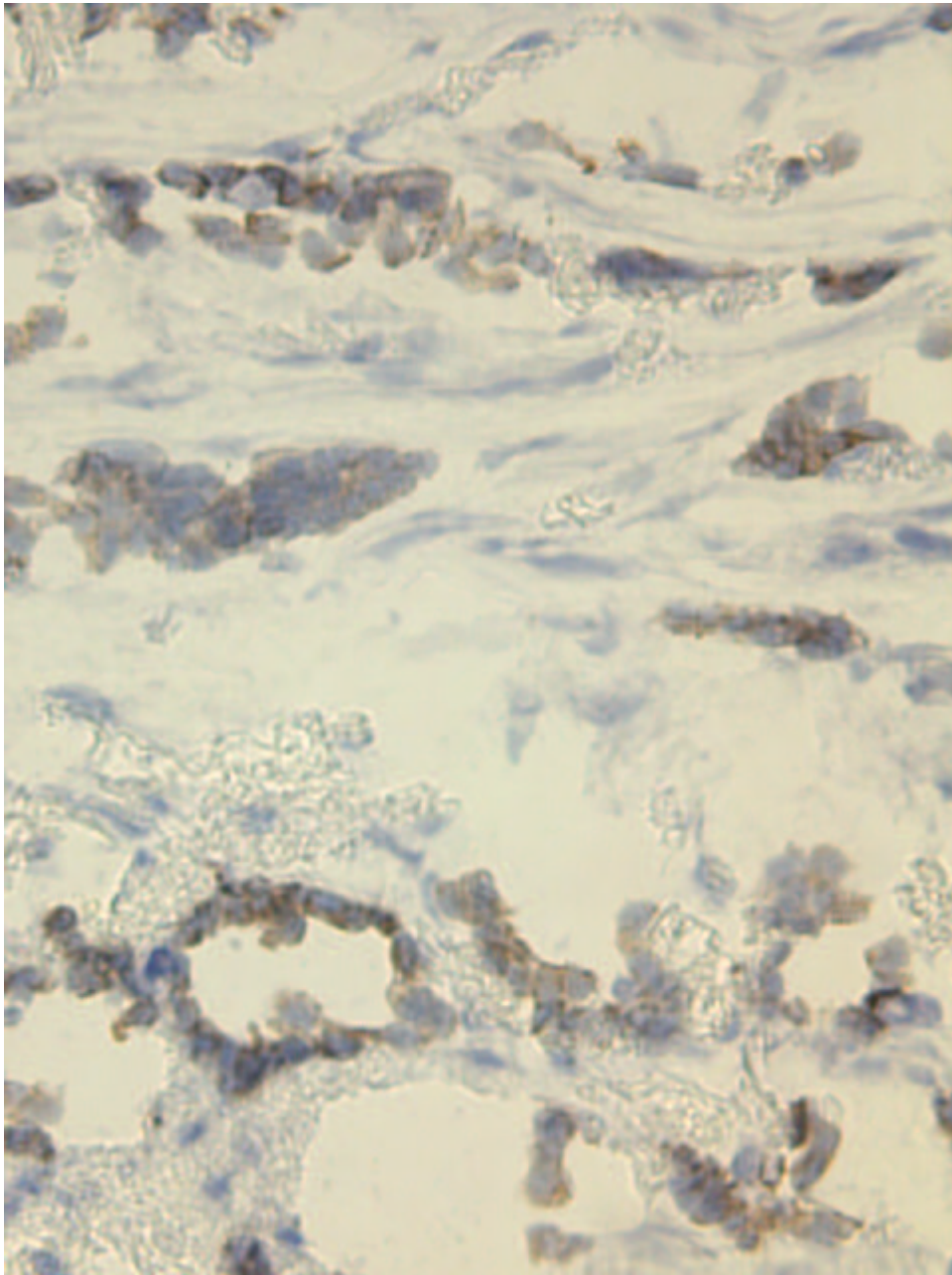


Bild 2-12: Immunhistologisch für Keratin 7 gefärbter Gefrierschnitt eines invasiv duktales Mammakarzinoms (AK: RPN-1162, ABC-PO-Methode, x 40 Objektiv)

Von den jeweils 91 Präparaten der 3 Antikörperreihen konnten wegen unzureichender Auswertbarkeit (durch Lufteinschlüsse im Präparat, zu geringe Tumormasse) nur 79 RPN-1162-, 82 LP-1K- und 80 LP-5K- Präparate semiautomatisch ausgewertet werden.

2.3 Bildanalytisches Verfahren

2.3.1 Versuchsaufbau

2.3.1.1 Übersicht der Ausgangssituation

Die wie unter 2.2 beschrieben hergestellten Präparate wurden zunächst hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit unter dem Mikroskop überprüft. Als nicht verwertbar galten Präparate mit zu wenig Tumormasse, verbläuerter Färbung oder zu vielen Artefakten durch Faltenbildung oder Gewebquetschung.

Kerne der Tumor- und Bindegewebszellen waren durch die Hämalaun-Färbung blau angefärbt, Cytokeratin 7 -sofern vorhanden- durch die ABC-PO-Methode braun.

Durch die auf dem Mikroskop angebrachte Farbkamera und einem daran angeschlossenen PC konnten digitale Bilder erarbeitet werden, welche auf dem Monitor des PC beurteilt wurden. Vor jeder Inbetriebnahme dieses Meßsystems erfolgte ein Schwarz-Weiß-Abgleich der Farbkamera zur Eichung. Mit Hilfe dieser Anordnung konnte nun der Computer in dem digitalisierten Bild zytometrisch sowohl das bräunlich gefärbte Cytokeratin 7 als auch den blau gefärbten Tumor durch Farbpixel markieren (Details siehe 2.3.1.2.).

Der Objektträgerschlitten des Mikroskops wurde durch einen Joystick und einen Elektromotor bewegt. Dieser Objektträgerschlitten war mit einem elektronischen Zählwerk verbunden. Durch dieses konnte die Bewegung des Objektträgers unter dem Mikroskop in µm abgelesen werden.

Ziel war es nun, die im jeweiligen Tumorschnitt enthaltene immunhistologische Menge von Cytokeratin 7 zu bestimmen.

2.3.1.2 Hardware, Software, optische Geräte

Die Auswertung der Schnitte wurde mit einem Zeiss Mikroskop (UEM, Zeiss, Jena, Deutschland) unter dem 40x Objektiv mit numerischer Apertur 0.55 und Optovar 1.6 (Nachvergrößerung) und einem daran angeschlossenen digitalen Bildanalyse-System SAMBA (Systeme d'Analyses Microscopiques a Balayage Automatique, Firma Unilog, Meylan, Frankreich) durchgeführt. Dabei wurde das Programm XAFER (Gais/GSF) benützt, das eine Auswertung der Tumorbereiche und vor allem der immunhistochemisch angefärbten Tumorbereiche bezüglich ihrer Fläche ermöglichte.

Die Meßfelder wurden dabei über das Mikroskop auf eine 3 Chip CCD-Farbkamera (KY-F30, Firma JVC, Tokyo, Japan) abgebildet und in das Bildanalyse-System übernommen.

Die gemessenen Parameter waren die Tumorfläche (ATU) und die markierte Tumorfläche entsprechend immunhistochemisch markiertem Cytokeratin 7 (AMK).

Hieraus ermittelte das Meßprogramm die prozentuale markierte Tumorfläche der einzelnen Meßfelder (AMP) sowie den Summenquotienten (SQO) für alle Meßfelder $i=1, n$ aus der Summe der markierten Tumorflächen (AMK) dividiert durch die Summe der Tumorflächen (ATU) :

$$SQO = \frac{\sum_{i=1, n} \text{Bildpunkte AMK} (x_i)}{\sum_{i=1, n} \text{Bildpunkte ATU} (x_i)}$$

Zur Kontrolle wurden auch die dabei verwendeten Grauwertgrenzen (Schwellen) für den gesamten Tumorbereich (THT) und die markierten Tumorflächen (THM) abgespeichert, mit denen in den beiden Farbauszügen (Grün für die Tumorflächen, Blau für die markierten Tumorflächen) die zu messenden Bereiche segmentiert wurden. Die Darstellung des Summenquotienten der beiden Meßwerte, d.h. „Keratin 7-markierte Tumorfläche (AMK) zur gesamten Tumorfläche (ATU)“ auf dem Monitorschirm während der Messung ermöglichte ein definiertes Beenden der Messung nach Erreichen eines stabilen Summenquotienten SQO. Alle Bilder wurden zusätzlich als Dokumentation digital abgespeichert.

2.3.1 Meßmethodik

Um nicht die ganze Tumormasse vermessen zu müssen, wurde ein Meßverfahren entwickelt, welches erlaubt, nach einer bestimmten Anzahl von ausgewerteten Meßbildern auch für die teilweise heterogene Expression von Cytokeratin 7 ein repräsentatives Ergebnis der immunhistologischen Menge von Cytokeratin 7 im Tumor zu erhalten.

Das Problem bei dieser Vorgehensweise besteht darin, wie einzelne Meßfelder in dem histologischen Schnittpräparat ausgewählt werden können, die einerseits auswertbar sind und andererseits rein zufällig ausgewählt wurden. In bisherigen Arbeiten wurden diese Meßfelder durch das Auge des Betrachters ausgewählt. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Tumoren zeigten jedoch in ein und demselben Präparat von Areal zu Areal unterschiedlich starke Expression von Cytokeratin 7, so daß eine subjektive Auswahl der Meßfelder keinesfalls zufriedenstellend sein konnte. Es bestand somit die absolute Notwendigkeit die Meßfelder rein zufällig auszuwählen, ohne daß der Untersucher sie vorher beurteilen konnte. Nur so bestand die Möglichkeit, eine begrenzte Auswahl von Meßfeldern zu erhalten, die zufällig gewonnen worden und zusammengekommen für den gesamten Tumor repräsentativ waren. Dadurch konnte eine subjektive Auswahl von Meßfeldern (z.B. bezüglich besserer Auswertbarkeit) vermieden werden.

Sämtliche Präparate wurden vom Autor ohne Kenntnis ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Patientin und ohne Kenntnis der früher subjektiv festgesetzten Werte (visuelle Schätzungen von Prof. Nathrath, siehe 3.1.2.2) ausgewertet, um eine noch größere Objektivität zu erzielen.

Die Methode wird in den folgenden Abschnitten ausführlich erläutert.

2.3.2.1 Auswahl der Meßfelder durch ein Zufallsverfahren

2.3.2.1.1 Vermessen des Gewebeexzidats

Wie in 2.3.1. beschrieben, wurde der Objektträger auf dem Schlitten des Mikroskops nicht mit Hilfe einer sonst standardmäßigen Schraubenverstellung bewegt, sondern mit Hilfe eines elektrischen Motorschlittens, welcher mit einem elektronischen Meßwerk ausgestattet ist. Durch diese Anordnung ist eine genaue Vermessung des Gewebeexzidats sowie die Einpassung des Exzidats in ein zweidimensionales Koordinatensystem möglich. Bereits beurteilte Meßfelder können somit durch die Zuordnung von zwei Koordinaten x und y problemlos und exakt wiedergefunden werden. Als Nullpunkt (=Schnittpunkt von x- und y-Achse) wurde jeweils der etwaige Mittelpunkt des Exzidats gewählt.

In diesem ersten Schritt wurden nun die Abmessungen (Länge und Breite) des Exzidats ermittelt.

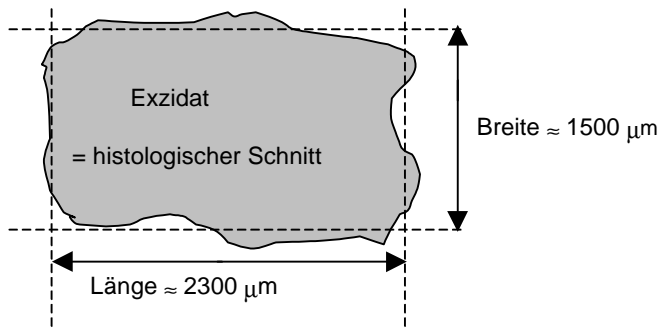


Bild 2-13: Vermessung eines Exzidats

2.3.2.1.2 Auswahl eines geeigneten Meßmusters

Je nach der dem Exzidat am ähnlichsten geometrischen Grundform (z.B. Quadrat, Rechteck, Dreieck, Kreis) wurde das dieser am besten entsprechende Meßmuster ausgewählt. Auf den jeweiligen Gitterlinien des Meßmusters wurden Meßpunkte festgelegt. Am besten geeignet war das Meßmuster, welches die größtmögliche Fläche des Gewebeexzidats abdeckte, ohne daß zu viele Meßpunkte im „gewebefreiem Raum“ des Objektträgers landen (siehe Bild 2-14).



Bild 2-14: Auswahl eines geeigneten Meßmusters

2.3.2.1.3 Randomisierung der Meßfelder

Das ausgewählte Meßmuster mit seinen Meßpunkten wurde nun über das Gewebeexzidat projiziert mit dem Ziel, möglichst das gesamte Exzidat abzudecken und andererseits auch möglichst wenige Meßpunkte außerhalb des Exzidats zu plazieren. In den meisten Auswertungen wurde der Mittelpunkt des Meßgitters, der meist auch der erste Meßpunkt war, auf den etwaigen Mittelpunkt des Exzidats projiziert. Durch eine nur geringfügige Verstellung des Objektträgerschlittens mit Hilfe des Joysticks wurde auch der erste Meßpunkt randomisiert.

Anschließend wurde das Exzidat genau nach den vorher festgelegten Meßpunkten ausgewertet. Durch diese Anordnung werden dem Untersucher zufällig ausgewählte Meßpunkte (Bildfelder) zur Auswertung aufgezwungen. Eine subjektive Auswahl ist somit nicht möglich (Bild 2-15).

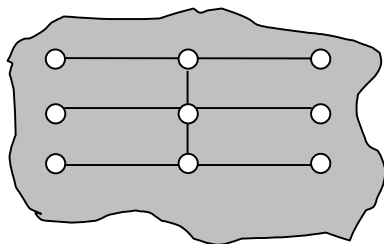


Bild 2-15: Erzeugung von randomisierten Meßfeldern

Ein Problem ergab sich dann, wenn der zuvor zufällig ausgewählte Meßpunkt nicht ausgewertet werden konnte. Dafür gab es drei Möglichkeiten und Problemlösungen:

Lag ein Meßpunkt außerhalb des Exzidats, wurde der Objekttücherschlitten automatisch in Richtung der Meßgitterachse, auf der sich der Meßpunkt befand, zurückgefahren, bis der Meßpunkt sich wieder in der Fläche des Gewebeexzidats befand.

Ermittelte der Meßpunkt ein zwar im Exzidat liegendes Feld, das jedoch zu wenig Tumormasse (z.B. nur Bindegewebe) enthielt oder zu schlecht erhalten war, um auswertbar zu sein, so wurde von diesem Meßpunkt aus in einem je nach Exzidatgröße vorher genau definierten kleineren Meßgitter ein neuer zufälliger Meßpunkt ermittelt. (z.B. +500µm nach x und +500µm nach y).

Das dritte Problem tauchte dann auf, wenn das Gewebeexzidat zu fragmentiert war. Dann landeten zu viele Meßpunkte im „gewebefreien Raum“. In diesem Fall wurde einfach das gesamte Exzidat vermessen.

2.3.2.2 Zytometrische Bestimmung des immunhistologischen Cytokeratin 7-Gehalts im einzelnen Meßfeld und im gesamten Tumor

Zum besseren Verständnis sind im Anschluß Bild 2-16, sowie das gleiche Bild mit den durch die Grauschwellen THT (Bild 2-17) und THM (Bild 2-18) markierten Bildpunkten für Marker (AMP) und Tumor (ATU) beigefügt.

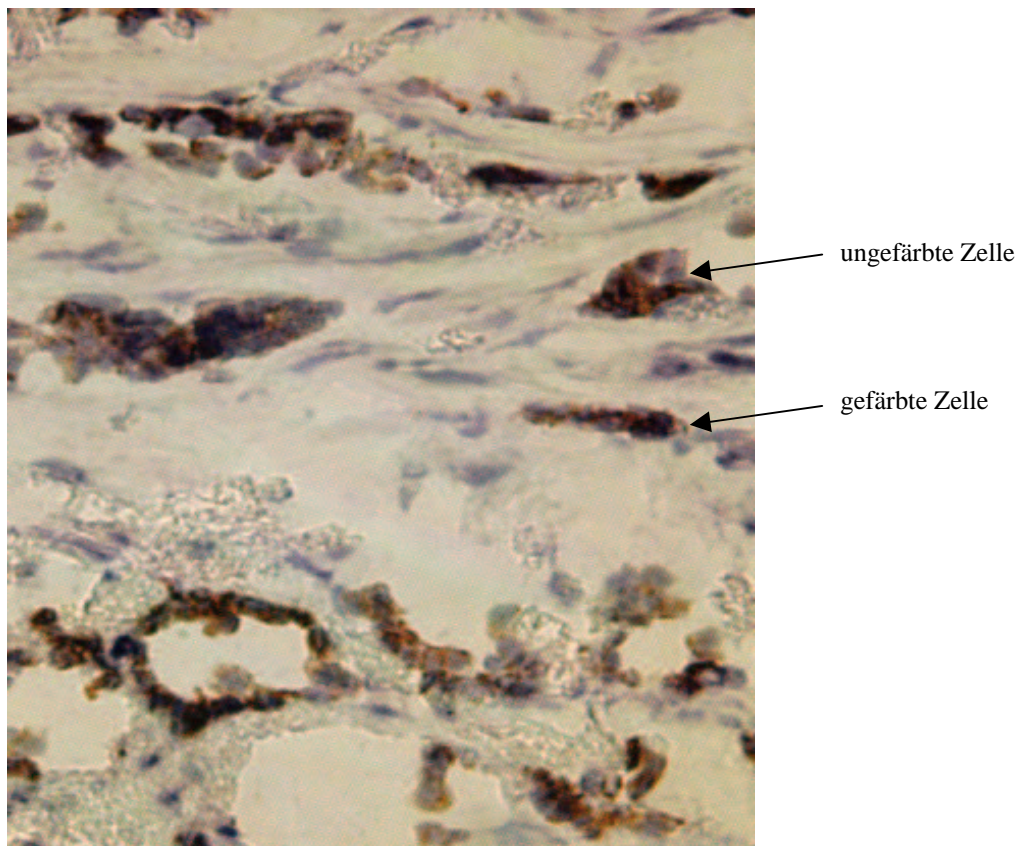


Bild 2-16: Ausgangsbild mit heterogener CK-7 Färbung (siehe auch Bild 2-12)

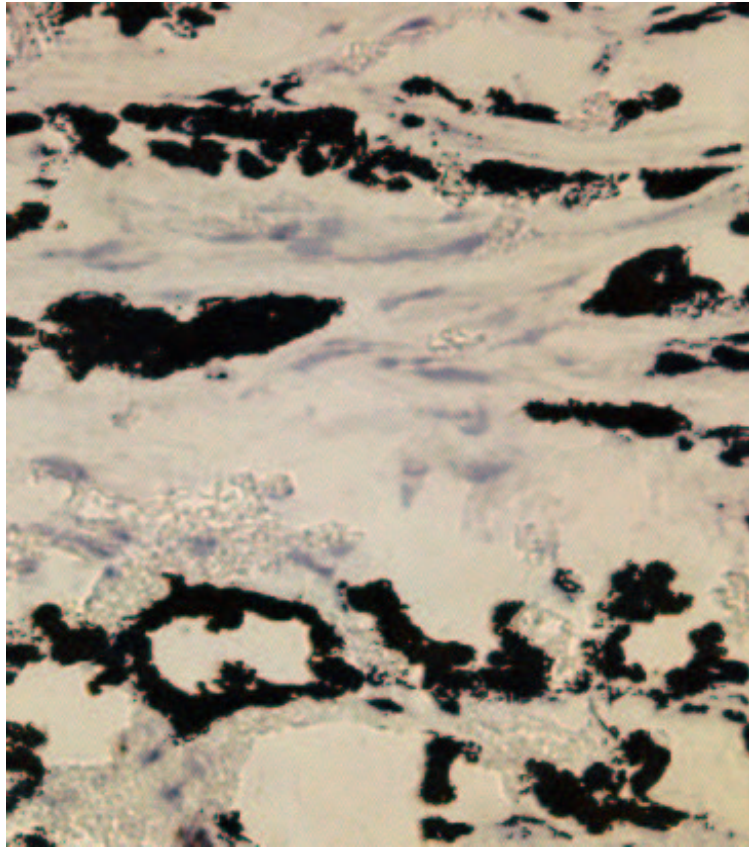


Bild 2-17: Die schwarz dargestellte Fläche ist die gesamte Karzinomzellfläche ATU, dargestellt durch die Tumorschwelle THT

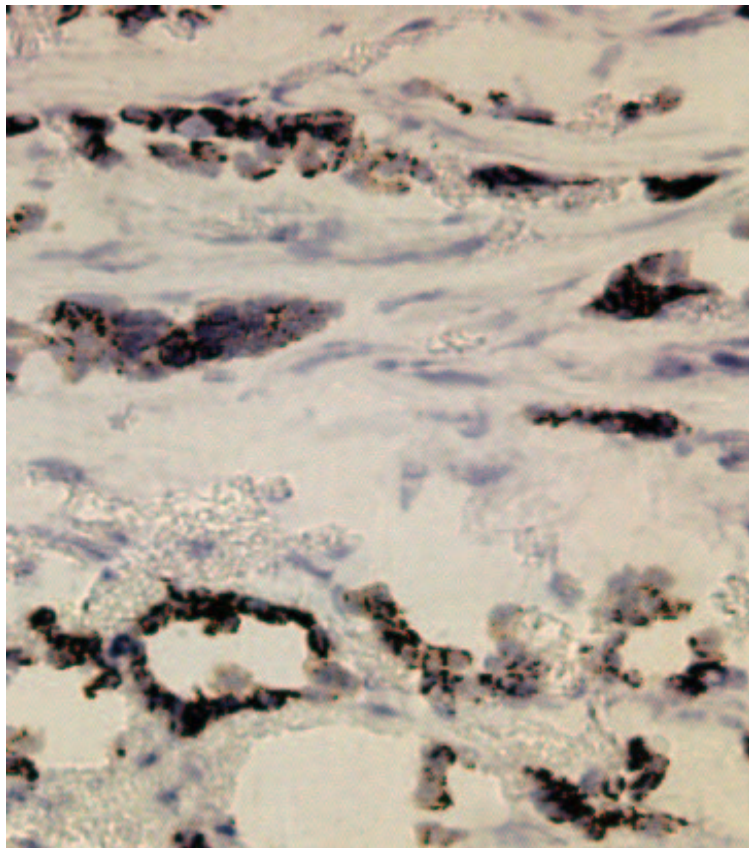


Bild 2-18: Die nun schwarz dargestellten Flächen sind zusammengenommen die CK-7 Markerfläche ATM, dargestellt durch die Markerschwelle THM.

2.3.2.2.1 Interaktives Messen

2.3.2.2.1.1 Wahl der Tumorschwelle

Das unter dem Mikroskop betrachtete Gewebe (in 400-facher Vergrößerung) kann nun mit Hilfe der Farbkamera in ein digitales Bild umgewandelt und auf dem Monitor bearbeitet werden. Als immunhistologischer Gehalt an Cytokeratin 7 gilt der prozentuale Anteil von Markerfläche (AMK) (immunhistochemisch markiertes Cytokeratin 7) zur Tumorfläche (ATU).

Als erster Schritt zur Bestimmung dieser Menge wird die Fläche des Tumors (ATU) bestimmt. Hierzu wird durch Auswahl einer geeigneten Grauschwelle (THT) aus einem Intervall der geeignete Wert zur Segmentierung bestimmt. Das Intervall reicht von 0 (kein Pixel wird markiert) bis über 200 (der Computer markiert alle Pixel und mißt die Fläche des gesamten Meßfeldes=Monitorfläche). Ziel ist es einen Wert in diesem Intervall = Schwelle zu finden, unter dem möglichst wenig Pixel vom Computer falsch negativ oder falsch positiv markiert werden. Falsch negativ entspricht in diesem Fall nicht markierter Tumorfläche, falsch positiv markierte Fläche entspricht vom Computer markierten Artefakten, Bindegewebsfasern, Fibrocytenkernen oder, sofern vorhanden, Leukocyten. Die Schwelle wird eher etwas höher als die Idealschwelle gesetzt. Falsch negative Areale sind somit praktisch ausgeschlossen. Größere falsch positiv markierte Flächen werden von Hand anschließend korrigiert, d.h. die vom Computer vorgenommene Markierung wird gelöscht. Einzelpixel und kleinere Flächen können dabei ignoriert werden, da ihr Verhältnis zur Gesamtumorfläche unter einem Prozent liegt.

Die Unterscheidung der im Exzidat vertretenen zwei Hauptgewebe (Tumor und Bindegewebe) war für den Computer möglich, da die bei diesen Präparaten verwendete Hämalaun-Färbung das Bindegewebe schwächer Blau färbte als die Tumorzellen. Abgesehen davon wurden im Bindegewebe, wenn überhaupt, nur Fibrocytenkerne in relevant großer Fläche markiert, die -sofern nötig- von Hand wieder gelöscht werden konnte.

Im ungünstigsten Fall war nur wenig Tumormasse bei kernreichem Bindegewebe vorhanden. Dies traf insbesondere auf die invasiv lobulären Tumoren zu, bei denen der Tumor keine soliden Nester oder Stränge bildete, sondern lediglich Einzelzellen. In diesen Fällen erwies sich die Auswertung der Tumorfläche durch farblich gesteuerte Markierung desselbigen durch den Computer als unbrauchbar. Im Verhältnis zur geringen Tumorfläche pro Meßfeld wurden zu viele Artefakte und Bindegewebsstrukturen falsch positiv durch das Schwellenverfahren markiert. Die Markierung des Tumors erfolgte auf dem digitalisierten Bild von Hand. In diesen speziellen Fällen erwies sich diese Methode als ökonomischer und vor allem genauer als eine Korrektur der massiv falsch positiv markierten Fläche.

Siehe hier auch unten angefügte Tabelle 2-3 mit den Streuungen von THT.

Minimum ist die niedrigste, Maximum die höchste Streuung. Der Mittelwert ergibt sich aus der Summe der Streuungen einer Antikörperreihe dividiert durch die Anzahl der Präparate.

Tabelle 2-3: Streuung von THT

Antikörper	Minimum	Maximum	Mittelwert
LP 1K	0	22	6,3
LP 5K	0	24,2	5,8
RPN 1162	0	21,2	5,1

2.3.2.2.1.2 Wahl der Markerschwelle

Das Verfahren entspricht dem Vorgang der Tumorschwelle. Die Bestimmung der exakten Markerschwelle war jedoch wesentlich einfacher und präziser. Das durch die ABC-PO-Methode dunkelbraun angefärbte Cytokeratin 7 konnte durch das zytometrische Verfahren vom Computer wesentlich präziser erkannt werden, zumal keine andere Struktur diese Färbung zeigte. Eine Markierung von falsch positiven Strukturen war in diesem Fall kaum vorhanden und eine Korrektur von Hand nur in seltenen Fällen nötig (z.B. bei stark gequetschten Gewebeartefakten, die dadurch sehr dunkel bis braun erschienen).

Als Ergebnis erhielt man die Markerfläche (AMK).

Eine einmal richtig eingestellte Markerschwelle mußte kaum mehr verändert werden. Darauf weisen auch die sehr kleinen Streuungen bzw. Mittelwerte der Streuungen der Markerschwelle THM in den einzelnen Auswertungen hin (siehe unten angefügte Tabelle 2-4 der Streuungen von THM, wobei Minimum die niedrigste, Maximum die höchste Streuung ist).

Tabelle 2-4: Streuung von THM

Antikörper	Minimum	Maximum	Mittelwert
LP 1K	0	25,5	2,3
LP 5K	0	52,8	3,1
RPN 1162	0	42,2	3,8

2.3.2 Meßergebnisse

Als ersten Schritt bildete das Meßprogramm einen Quotienten aus den beiden obigen Messungen. Dieser Quotient aus Markerfläche (AMK) zu Tumorfläche (ATU) ergibt den prozentualen Flächengehalt an markiertem Cytokeratin 7 im Verhältnis zur Tumorfläche (AMP) und somit ein Maß für den immunhistologischen Gehalt an Cytokeratin 7 im Tumor in jedem einzelnen Meßfeld. Der größte AMP-Wert wird im folgenden als „hot-spot“ bezeichnet.

Für eine repräsentative Aussage über den Anteil von Cytokeratin 7 im gesamten Tumor ist eine Mittelwertbildung erforderlich. Die arithmetische Mittelwertbildung aus den AMP-Werten wäre aber nur zulässig, wenn die ATU-Werte aller Meßpunkte gleich groß wären. Dies ist hier jedoch nicht gegeben.

Daher wurde als zutreffende Form der Mittelwertbildung die Berechnung des Summenquotienten SQO eingeführt (siehe auch 2.3.1.2),

Hierbei führte das Programm eine fortlaufende Addition der Bildpunktepunkte Marker (AMK) durch und teilte diese durch die Summe der Bildpunkte Tumor (ATU) mit dem Ergebnis SQO.

Mit zunehmender Anzahl von Meßfeldern näherte sich der SQO einem konstanten Endwert.

In der Regel war dafür die Auswertung von 9 Meßfeldern erforderlich; dann blieb der SQO mit einer Sicherheit von 3 Messungen innerhalb eines Schwankungsbereichs von weniger als 5%.

Zusammenfassend heißt das, wenn der Summenquotient (SQO) trotz fortlaufender Messungen relativ konstant bleibt, so ist eine genügend große Anzahl von Einzelbildauswertungen erfolgt, um einen für den gesamten Tumor repräsentativen Wert von Cytokeratin 7-Gehalt zu ermitteln (siehe Bild 2-19).

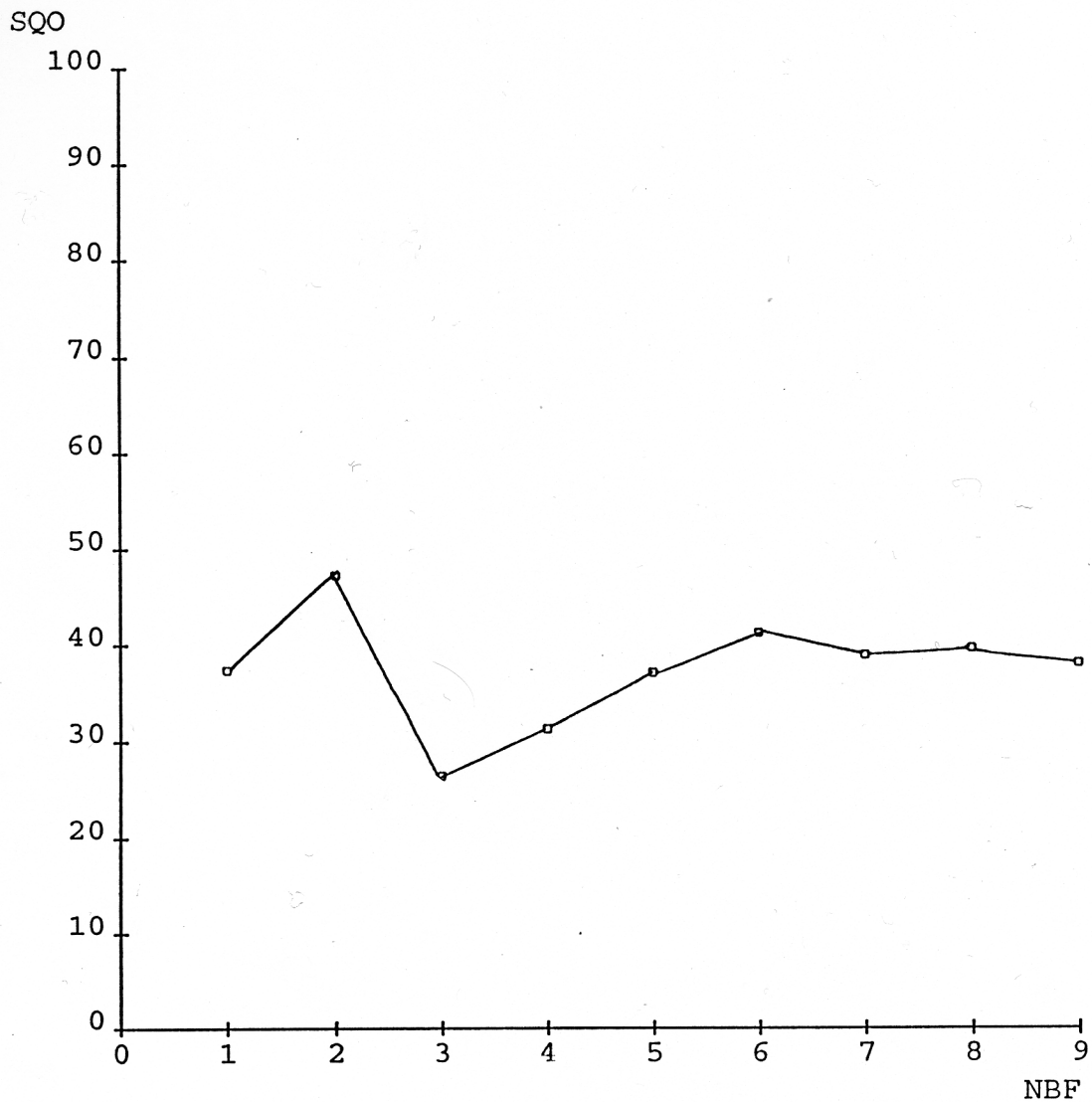


Bild 2-19: Annäherung des SQO an eine Konstante.

Je heterogener der Tumor bezüglich seiner Cytokeratin 7 Expression war, um so mehr Messungen mußten durchgeführt werden, bis der Summenquotient nur noch geringe Änderungen aufwies. So mußten in Einzelfällen bis zu 20 Meßfelder ausgewertet werden. Die Anzahl an nötigen Messungen und die Streuung der einzelnen sind ein indirektes Maß für die Heterogenität des Tumors.

In einem Vorversuch wurden zwei Präparate jeweils zweimal mit der oben beschriebenen Methode sowie komplett ausgewertet, um einerseits die Genauigkeit als auch die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen. Diese insgesamt 6 durchgeführten Messungen zeigten auf das jeweilige Präparat bezogen lediglich Abweichungen von +/- 4%. Damit lagen sie im gleichen Toleranzbereich, der sich bei mehrfachen kompletten Messungen am gleichen Objekt ergab.

2.4 Visuelle Schätzung von Prof. Dr. Nathrath

Die hier analysierten histologischen Schnittpräparate waren bereits von Prof. Dr. Nathrath in seiner Habilitationsarbeit von 1988 bewertet worden. Neben anderen immunhistologischen Präparaten waren auch von allen Karzinomen je drei Präparate mit den oben genannten Antikörpern untersucht worden. In der hier vorgelegten Dissertations-Arbeit werden Nathraths visuell-subjektive Ergebnisse mit den semi-automatischen Auswertungen verglichen und wie folgt bezeichnet:

RPN-1162 : RPN visuell

LP-1K : 1K visuell

LP-5K:5K visuell

Die Präparate waren von Nathrath unter dem Lichtmikroskop ausgewertet worden zur Abschätzung der Cytokeratin 7 Expression der Karzinome. Das Ziel war die Ausarbeitung, wieviel Prozent der Tumorzellen in dem jeweiligen Karzinom Cytokeratin 7 exprimierten. Es fanden sich homogen Cytokeratin 7 exprimierende Karzinome, homogen Cytokeratin 7 nicht exprimierende Karzinome und bzgl. der Expression von Cytokeratin 7 heterogene Karzinome, d.h. daß z.B. nur 30% der Tumorzellen Cytokeratin 7 positiv waren. Eine Unterscheidung bzgl. der Intensität der Färbung (entspricht grundsätzlich Cytokeratin 7-Expression) war jedoch nicht erfolgt.

2.5 Statistische Methoden

Als Verfahren wurden Pearson's Korrelationskoeffizient , t-Tests, Schrittweise Cox Regressionsanalyse, log-rank-Tests sowie Kaplan-Meier Überlebenskurven verwendet. Die Signifikanz wurde auf dem 95% Niveau getestet.

Als Statistik-Software diente das SAS-Programm (SAS Institute,Inc.,Cary,North Carolina,USA).

Als Graphikprogramm wurde Microsoft-Excel (Microsoft-Cooperation,USA) benutzt.

Ergebnisse

3.1 Unterschiedliche Verteilung von Cytokeratin 7 im einzelnen Tumor und im Tumorkollektiv

3.1.1 Verteilung im einzelnen Tumor

Zur Beurteilung des immunhistologischen Cytokeratin 7-Gehalts wurden zwischen 1 (Minimum bei 100% negativen Tumoren) und 20 (Maximum bei sehr heterogenen Tumoren) Messungen durchgeführt. Der Mittelwert für die Anzahl N der pro Präparat durchgeführten Meßfelder betrug 8,1.

Als Beispiel für die Unterschiedlichkeit der Cytokeratin 7 Expression kann die Zahl und Verteilung der Messungen von vier verschiedenen Karzinomen aus der LP-1K Reihe herangezogen werden (Bild 3-1).

Die Standardabweichungen für die einzelnen AMPs betragen 4,21; 5,75; 6,14;30,77

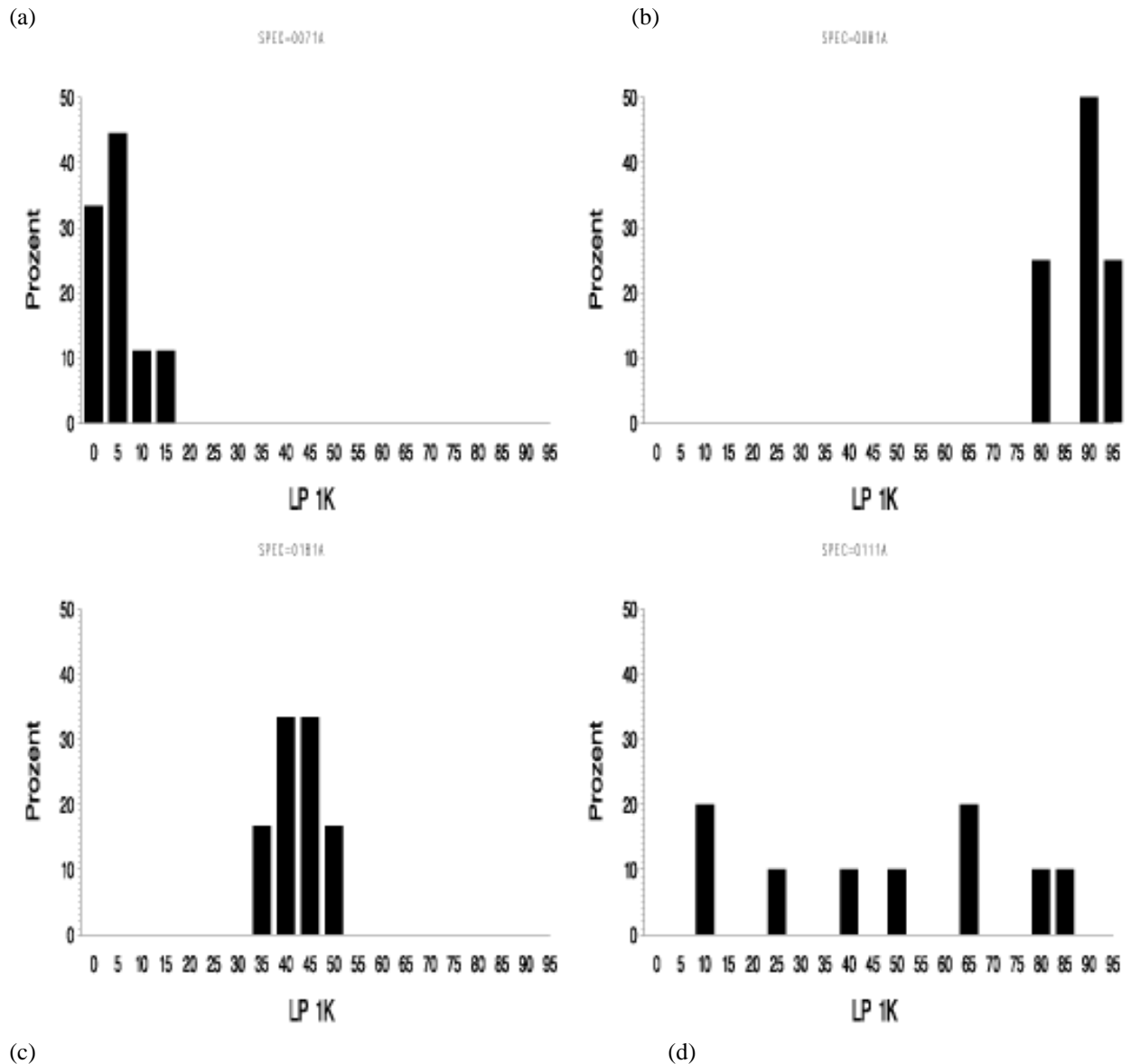


Bild 3-1: Beispiele für die Unterschiedlichkeit der Cytokeratin7 Expression. (a): Fall 007, (b): Fall 008, (c): Fall 018, (d): Fall 011

Diese Fallbeispiele repräsentieren jeweils Vertreter aus einer charakteristischen Gruppe :

- Fall 7 : homogen schwach positiv (siehe Bild 3-1 (a))
- Fall 8 : homogen stark positiv (siehe Bild 3-1 (b))
- Fall 18: homogen mittelstark positiv (siehe Bild 3-1 (c))
- Fall 11: sehr heterogene Cytokeratin 7 Expression (siehe Bild 3-1 (d))

Alle vier oben genannten Fälle stammen aus der Gruppe der invasiv duktalem Karzinome. Ergänzend ist noch ein Vertreter der Gruppe der invasiv lobulären Karzinome in Bild 3-2 (c) angefügt.

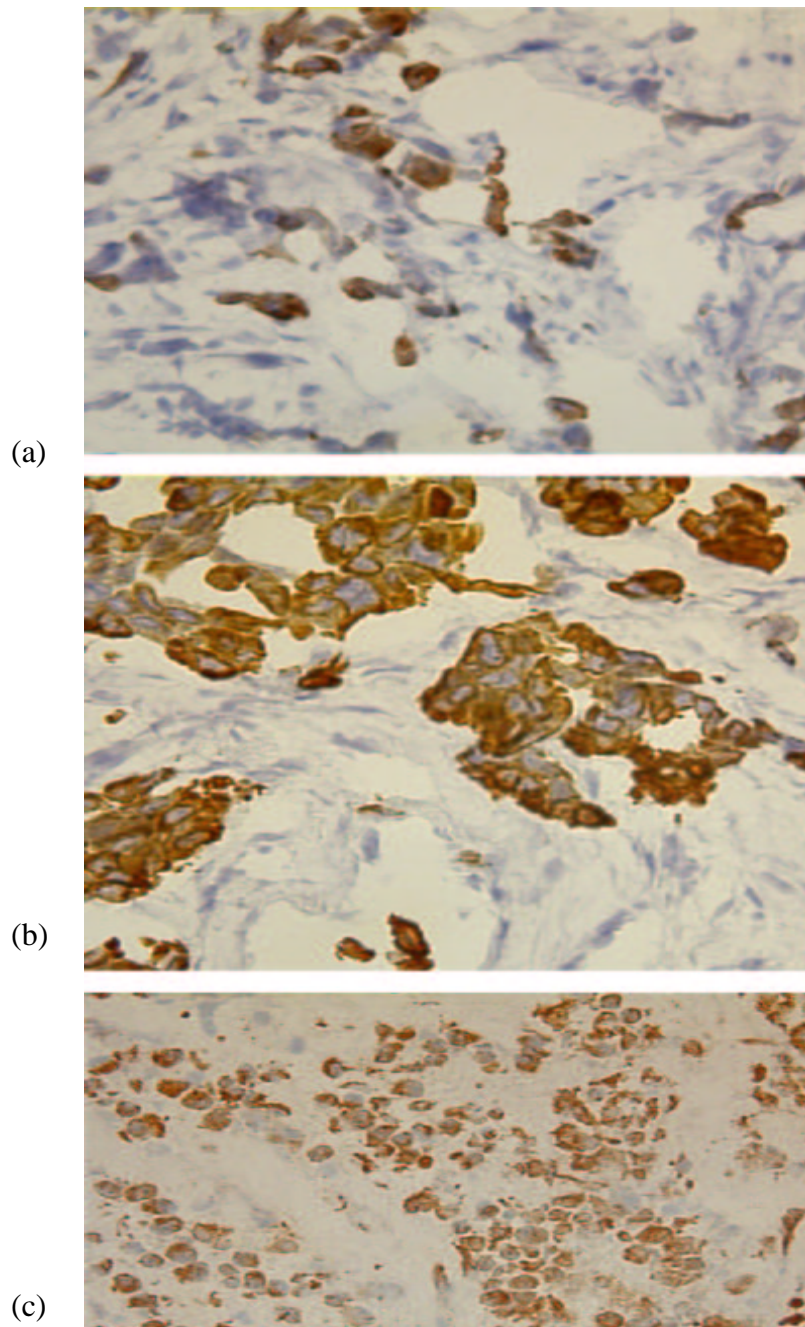


Bild 3-2: Charakteristische Beispiele für Cytokeratin 7 Expression für verschiedene Tumorpräparate:
(a): heterogen, invasiv duktal, (b): homogen, invasiv duktal, (c): homogen, invasiv lobulär.

3.1.2 Verteilung im Tumorkollektiv

3.1.2.1 Semiautomatisch

Bild 3-3 enthält die Meßergebnisse bzgl. des immunhistologischen Cytokeratin 7-Gehalts (SQO) für alle Präparate einer Antikörperreihe. Die SQO-Skala ist in Cluster von 0..100 mit einer Intervallbreite von 5 eingeteilt. Man erkennt z.B. in der RPN-1162-Reihe, daß 26% aller Fälle im SQO-Cluster 0 liegen, 14% im Cluster 5 und der Rest schwerpunktmäßig bei Cluster 50 endet (siehe 4.3).

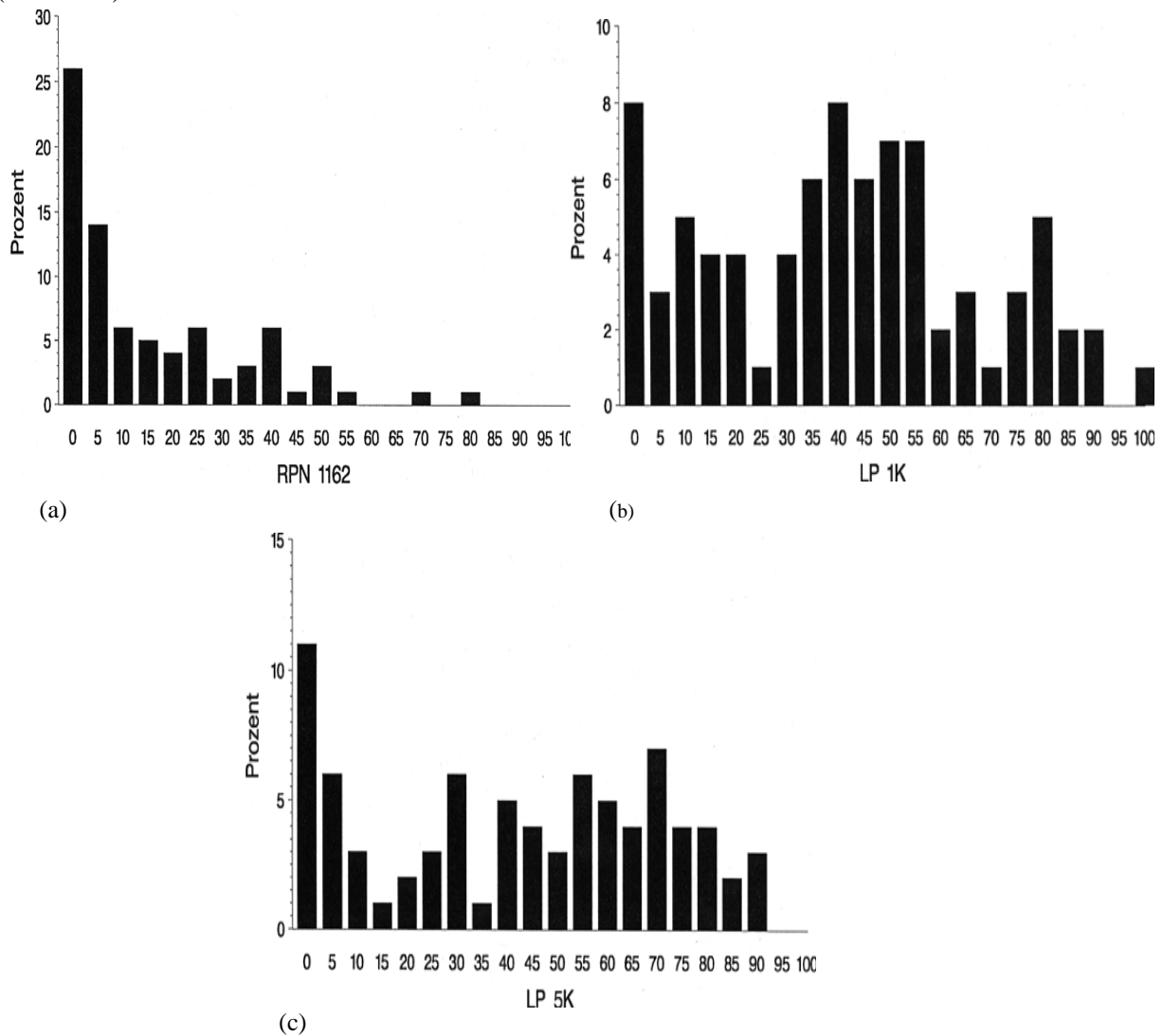


Bild 3-3: Cytokeratingehalt aller Präparate einer Antikörperreihe (semiautomatische Auswertung). (a):RPN-1162, (b):LP-1K, (c):LP-5K

In Tabelle 3-1 sind der Mittelwert, die Streuung, Minimum und Maximum, sowie der Variationskoeffizient (CV) für die drei Reihen aufgelistet. Man sieht, daß die Meßergebnisse für RPN-1162 im Vergleich zu den LP-1K- und LP-5K-Werten wesentlich niedriger ausfallen.

Tabelle 3-1: Statistische Ergebnisse der semiautomatischen Messung

AK	Mittelwert	Stand.abw.	Min.	Max.	Var.koeff.(CV)
PN-1162	5,6	18,2	0	78,1	116,1
LP-1K	40,6	25,9	0	98,7	63,8
LP-5K	42,2	28,6	0	88,9	67,7

3.1.2.2 Visuell

Bild 3-4 enthält die Ergebnisse der visuellen Schätzungen von Prof. Dr. Nathrath. Im Gegensatz zur semiautomatischen Methode ist hier auf der Abszisse eine Clustereinteilung für den prozentualen Anteil Cytokeratin 7 exprimierender Zellen in einem Tumor vorgenommen worden. Betrachtet man die Ergebnisse der LP-1K-Reihe, so erkennt man, daß z.B. in (b) 11% aller Tumoren zu 80%, 52 aller Tumoren zu 100% LP 1K-Antigen exprimieren.

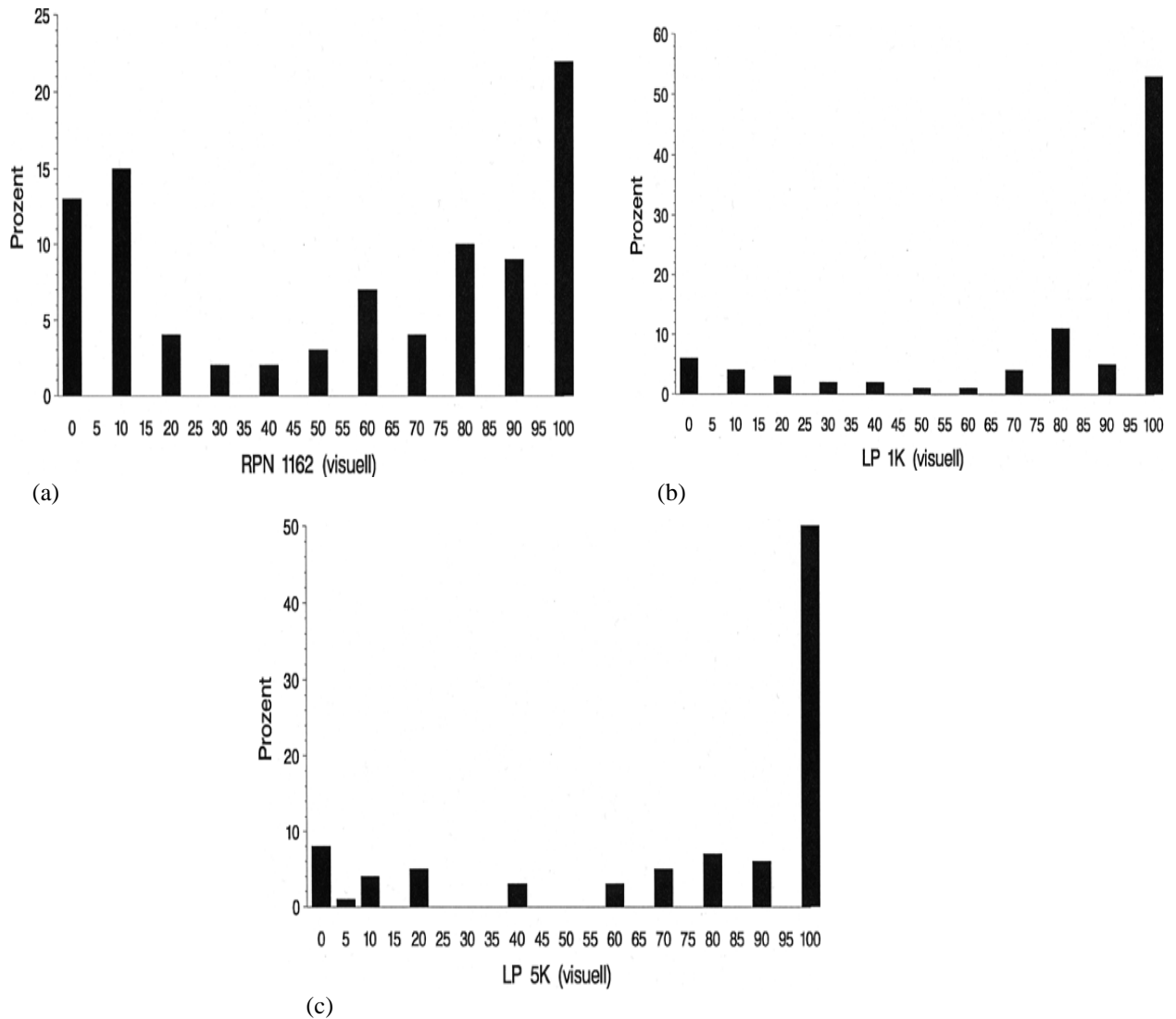


Bild 3-4: Verteilung der Tumoren einer Antikörperreihe nach prozentualem Anteil Cytokeratin 7 exprimierender Zellen in einem Tumor. (a):RPN-1162, (b):LP-1K, (c):LP-5K

In Tabelle 3-2 sind Mittelwert, Streuung und Variationskoeffizient (CV) aufgelistet. Dabei ist zu beachten, daß diese Ergebnisse unter anderen Voraussetzungen gewonnen wurden. Ein Ergebnis von 30% bedeutet nicht, daß 30% der Tumorfläche von Cytokeratin 7-Marker ausgefüllt war, sondern daß 30% der Tumorzellen Cytokeratin 7 enthielten. Auch wurde bei den zu 100% homogen Cytokeratin 7 positiven Tumoren nicht weiter unterschieden, ob diese nun kräftig oder nur schwach positiv angefärbt waren.

Tabelle 3-2: Statistische Ergebnisse der visuellen Schätzung

AK	Mittelwert	Stand.abw.	Min.	Max.	Var.koeff.(CV)
RPN-vis.	55,3	39,3	0	100	71,2
1K-vis.	78,9	33,2	0	100	42,1
5K-vis.	75,0	36,2	0	100	48,3

3.2 Korrelation der einzelnen AK-Färbungen untereinander

Die Korrelationen zwischen den Antikörperfärbungen wurden durch die Ermittlung des Pearson's Korrelationskoeffizienten r (PKK) bestimmt. Der PKK kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Dabei bedeutet +1 perfekter positiver Zusammenhang und -1 perfekter negativer Zusammenhang. Ein Wert von 0 steht für fehlenden Zusammenhang.

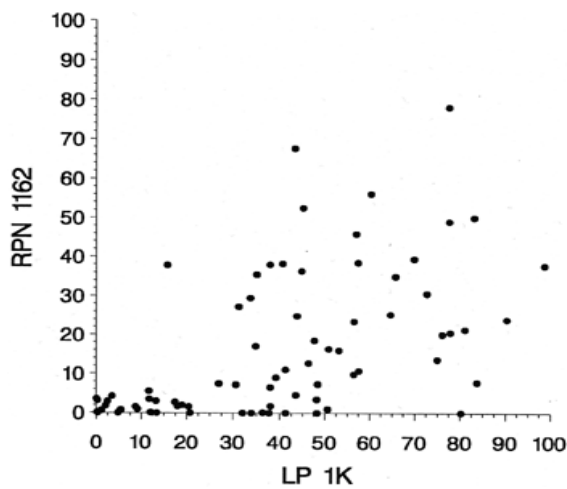
3.2.1 Semiautomatisch

In Bild 3-5 sind die Meßergebnisse der drei Antikörperreihen gegeneinander aufgetragen. Die Pearson's Korrelationskoeffizienten sind signifikant für $p < 0.0001$ und betragen für:

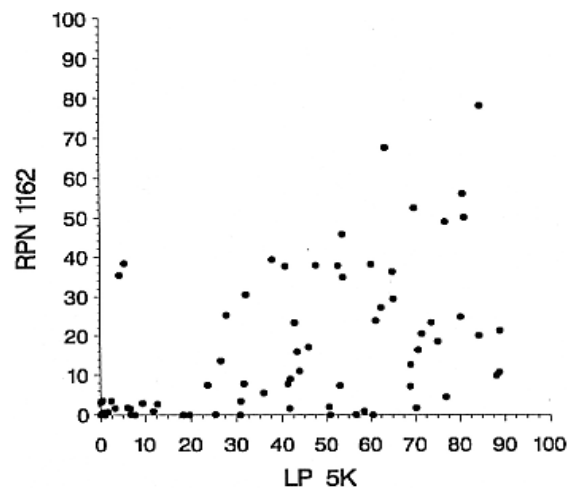
RPN-1162 – LP-1K: $r = 0,55$

RPN-1162 – LP-5K: $r = 0,51$

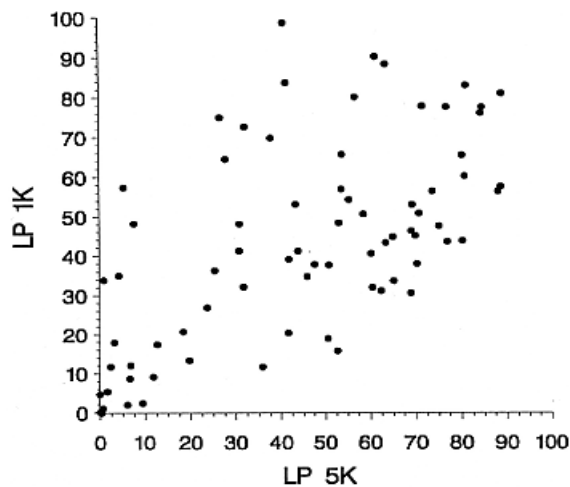
LP-1K – LP-5K: $r = 0,66$



(a)



(b)



(c)

Bild 3-5: Korrelation der AK-Färbungen nach der semiautomatischen Methode. (a):RPN-1162 / LP-1K, (b):RPN-1162 / LP-5K, (c):LP-1K / LP-5K

3.2.2 Visuell

In Bild 3-6 sind die Ergebnisse der visuellen Schätzungen für die drei Reihen gegeneinander aufgetragen.

Die Pearson's Korrelationskoeffizienten sind signifikant für $p < 0.0001$ und betragen für:

RPN visuell – 1K visuell: $r = 0,73$

RPN visuell – 5K visuell: $r = 0,78$

1K visuell – 5K visuell: $r = 0,93$

Die Ähnlichkeit zwischen LP-1K und LP-5K wird bei dieser Art Auswertung noch deutlicher als unter semiautomatischen Bedingungen, jedoch muß man berücksichtigen, daß die Werte nur in 10er Schritten vorliegen.

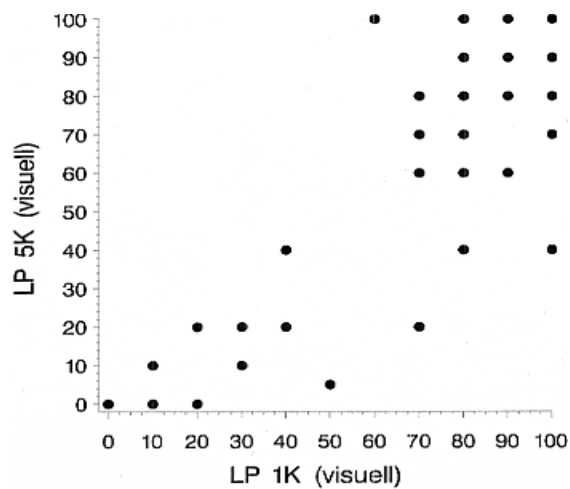
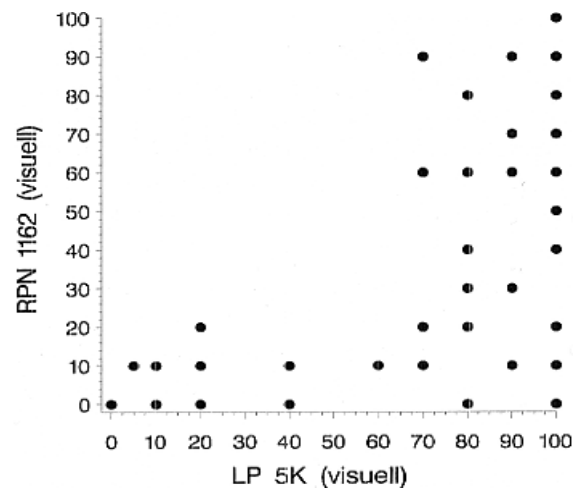
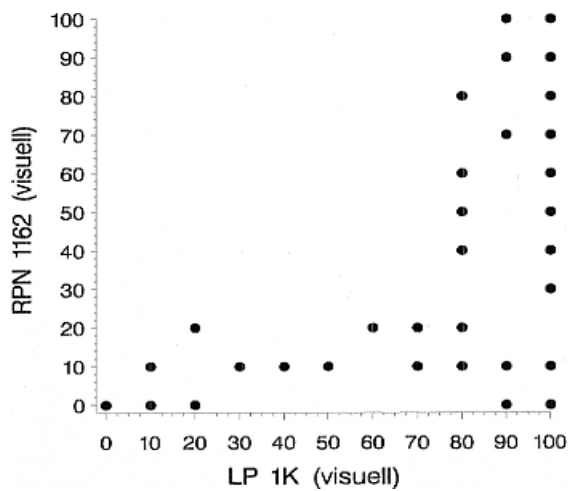


Bild 3-6: Korrelation der AK-Färbungen untereinander nach der visuellen Methode. (a):RPN-1162 / LP-1K, (b):RPN-1162 / LP-5K, (c):LP-5K / LP-1K

3.3 Vergleich der semiautomatischen Meßergebnisse mit den visuellen Schätzungen

3.3.1 Vergleich der SQO mit den visuellen Schätzungen

Die semiautomatischen Meßergebnisse liegen immer unter den visuellen Schätzungen. Ursache hierfür ist, daß bei der semiautomatischen Messung die Größe der angefärbten Zellfläche berücksichtigt wird.

Bei der visuellen Auswertung gilt ein Tumor als 100% positiv, wenn nur alle Zellen zumindest ein Minimum an Marker enthalten, egal ob nun viel Marker in der einzelnen Zelle vertreten ist, oder wenig. Bei der semiautomatischen Auswertung ergeben sich jedoch in dieser Gruppe der 100% positiven Tumoren erhebliche Unterschiede, da ein zwar homogen positiver aber nur schwach Cytokeratin 7 exprimierender Tumor keine so große Markerfläche (AMK) besitzt, wie ein stark Cytokeratin 7 exprimierender Tumor.

Ausnahme war lediglich ein Fall, der in allen drei Reihen bei der semiautomatischen Messung Ergebnisse erbrachte, die gleich oder über dem visuellen Schätzwert lagen, was an der besonders intensiven Anfärbung lag. Besonders deutlich ist die Abweichung bei LP-5K (visuell: 80%, semiautomatisch: SQO=90).

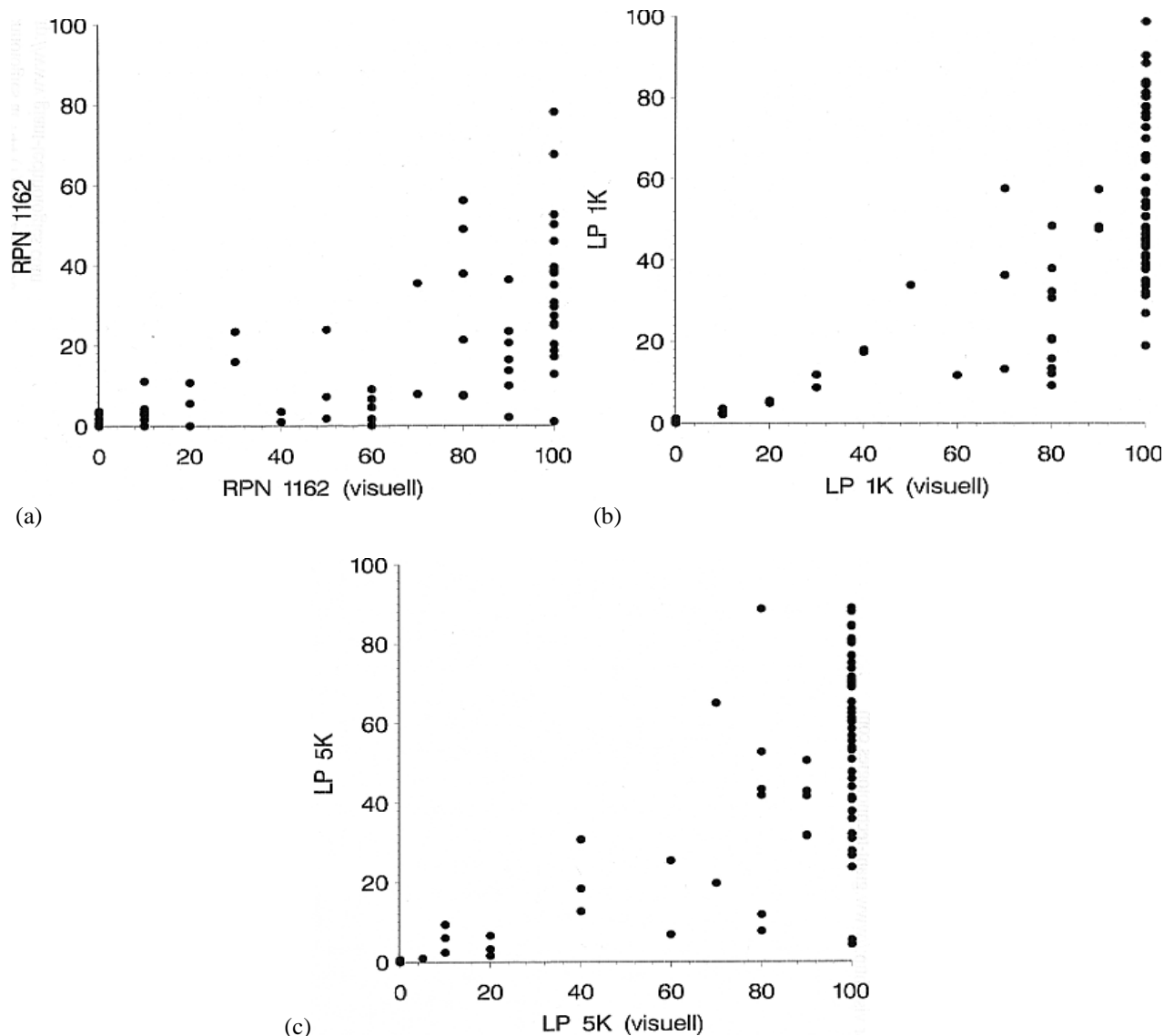


Bild 3-7: Korrelation zwischen semiautomatischer Messung und visueller Schätzung.

(a): RPN-1162, (b): LP-1K, (c): LP-5K

Die Pearson`s Korrelationskoeffizienten sind signifikant für $p < 0.0001$ und betragen für:

RPN-1162 – RPN visuell: $r = 0,70$

LP-1K – K1 visuell: $r = 0,75$

LP-5K – K5 visuell: $r = 0,76$

Die massiv streuenden Ergebnisse bei visuell=100% erklären sich aus der Unterschiedlichkeit der beiden Methoden. Ein z.B. nur wenig, aber Cytokeratin 7 homogen exprimierender Tumor erhalte in der semiautomatischen Auswertung lediglich Werte um ca. 50%, während er in der visuellen Auswertung 100% erhalten würde, da ja alle Zellen - wenn auch nur sehr wenig - Cytokeratin 7 enthalten.

Erst ein stark homogen und viel Cytokertin 7 exprimierender Tumor erhält auch in der semiautomatischen Auswertung Werte, die sich 100% nähern.

3.3.2 Vergleich der „Hot-spots“ der semiautomatischen Messung mit den visuellen Schätzungen

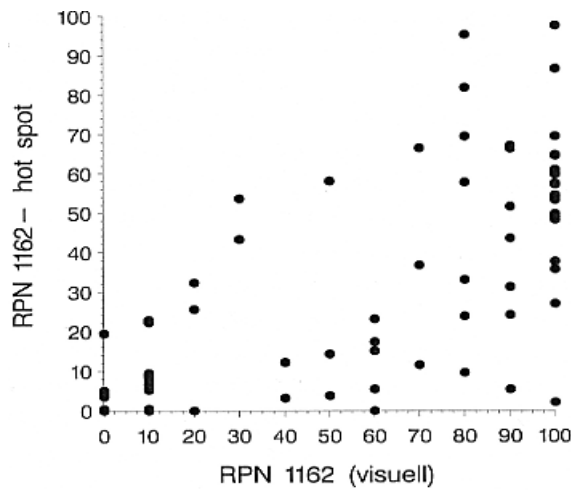
In Bild 3-8 sind die Ergebnisse der Gegenüberstellung der hot-spots mit den visuellen Schätzungen geplottet.

Die Pearson's Koeffizienten sind signifikant für $p < 0.0001$ und betragen für:

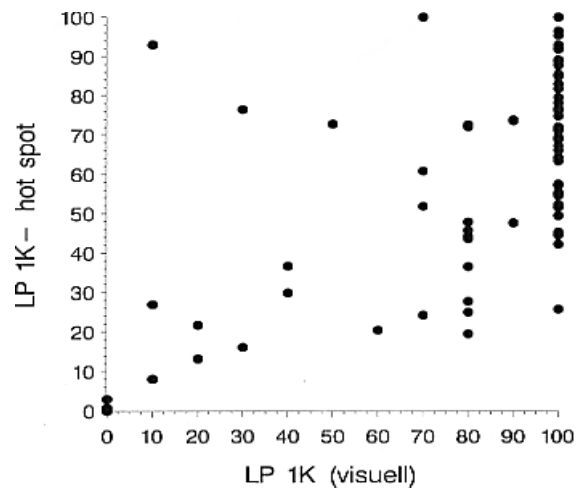
RPN-1162hot – RPN visuell: $r = 0,73$

LP-1Khot – K1 visuell: $r = 0,69$

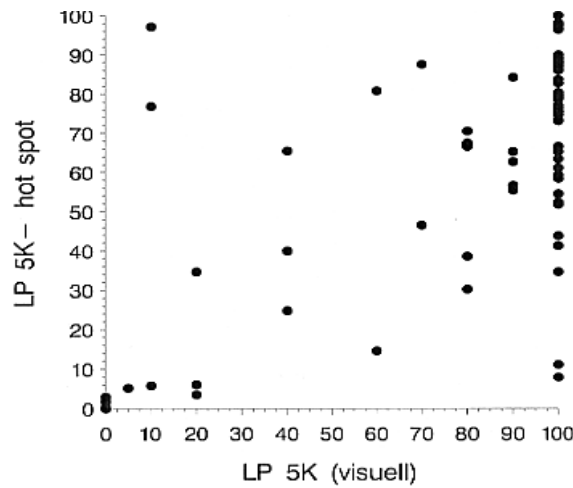
LP-5Khot – K5 visuell: $r = 0,71$



(a)



(b)



(c)

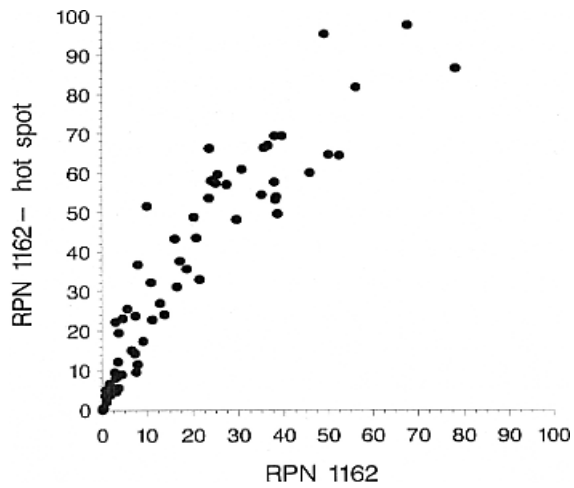
Bild 3-8: Vergleich der „Hot-spots“ mit visuellen Schätzungen. (a): RPN-1162, (b): LP-1K, (c): LP-5K

Der Vollständigkeit halber wurden auch die hot-spots mit den semiautomatischen Ergebnissen verglichen. Die Plots dazu sind in Bild 3-9 enthalten.

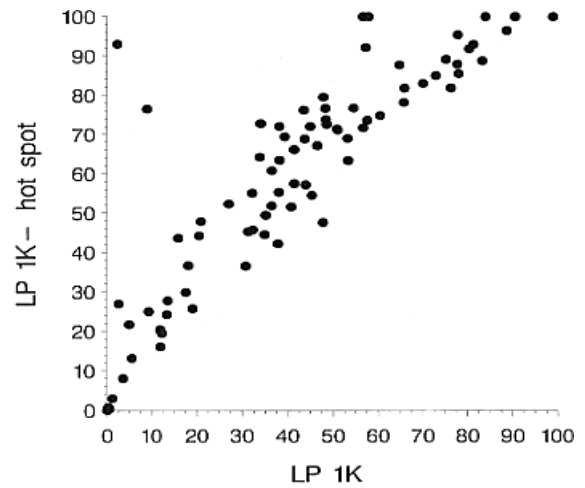
RPN-1162 hot – RPN-1162: $r=0,93$

LP-1K hot – LP-1K: $r=0,69$

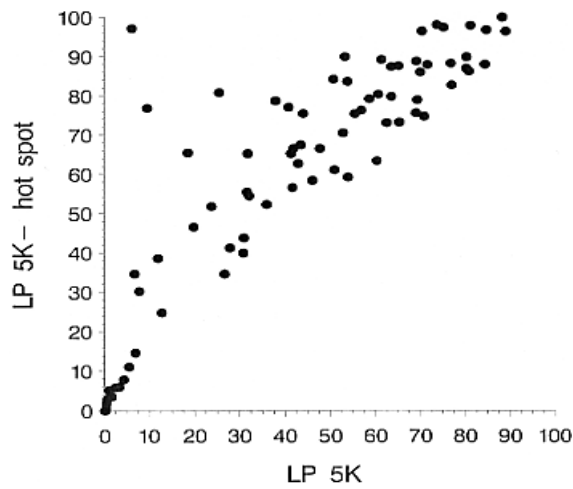
LP-5K hot – LP-5K: $r=0,76$



(a)



(b)



(c)

Bild 3-9: Vergleich der “Hot-spots” mit der semiautomatischen Messung. (a): RPN-1162, (b): LP-1K, (c): LP-5K

3.4 Korrelation der Cytokeratin 7 Expression mit klinischen Daten

3.4.1 Semiautomatisch

Im t-Test wurden die SQO sowie die hot-spots der drei AK-Reihen mit den klinischen Daten Alter, pT(T1+T2/T3+T4), pN (N0/N1-3), pM (M0/M1), Grading (G1+G2/G3), Stage (1+2/3+4), Östrogenrezeptor (positiv/negativ) und Gestagenrezeptor (positiv/negativ) auf Signifikanz untersucht. Es ergaben sich diesbezüglich jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

Es wurde ebenfalls geprüft, ob histomorphologisch verschiedene Karzinome eine unterschiedliche Cytokeratin 7 Expression besitzen. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Cytokeratin 7-Expression zwischen der histomorphologischen Gruppe der invasiv duktales Karzinome und der invasiv lobulären Gruppe. Die im Patientinnenkollektiv vertretenen Sonderformen waren von ihrer Anzahl her zu gering, um statistisch verlässliche Aussagen treffen zu können. Gleiches gilt auch für die (der Vollständigkeit halber ausgewerteten) von drei Karzinomen vorliegenden Lymphknotenmetastasen sowie einer vorhandenen Filia.

3.4.2 Visuell

Mittels t-Test wurden die visuellen Schätzungen der drei AK-Reihen mit den klinischen Daten Alter, pT (T1+T2/T3+T4), pN (N0/N1-3), pM (M0/M1), Grading (G1+G2/G3), Stage (1+2/3+4), Östrogenrezeptor (positiv/negativ) und Gestagenrezeptor (positiv/negativ) untersucht.

In der visuellen Auswertung der Cytokeratin 7 Expression für die Antikörperreihe mit RPN-1162 (RPNvis) ergab sich eine signifikante Korrelation mit dem Patientinnenalter. Die Cytokeratin 7 negativen Fälle (Cutpoint <30%) waren signifikant älter als die Cytokeratin 7 positiven Fälle. (siehe Tabelle 3-3)

Tabelle 3-3: t-Test Ergebnisse RPNvis gegen Alter

RPN	N	MW	Stand.abw.
<30% (CK-7 neg.)	33	61,7	± 14,7
>30% (CK-7 pos.)	59	55,5	± 12,4

p=0,0331

Ebenfalls signifikant war die Korrelation von 1Kvis mit dem Östrogenrezeptor. (siehe Tabelle 3-4)

Tabelle 3-4: t-Test Ergebnisse 1Kvis gegen Östrogenrezeptorstatus

ER-Rezeptorstatus	N	MW	Stand.abw.
Neg.	44	85,9	±27,6
Pos.	35	70,3	±38,4

p=0,04

Die anderen getesteten Parameter waren nicht signifikant.

3.5 Korrelation der Cytokeratin 7 Expression mit immunhistologischen Kriterien

Zusätzlich wurde geprüft, ob die Cytokeratin-7-Expression mit anderen immunhistologischen Kriterien korreliert. Dazu wurden die Ergebnisse dieser Arbeit verglichen mit Untersuchungen von Fuchs, die das gleiche Patientinnengut als Grundlage verwendete. In dieser Arbeit wird die Reaktivität von veränderten Glykolisierungsmustern terminaler Kohlehydratstrukturen von Mammakarzinomzellen untersucht. Diese werden mit Hilfe von Lektinen nachgewiesen. Es wurden insgesamt 23 Lektine im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Prognostisch signifikante Ergebnisse ergaben sich nur für ein Lektin, das Helix Pomatia-Agglutinin (HPA). Eine HPA-Anfärbbarkeit bedeutete eine erhöhte Rezidiv- und verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit (nach Fuchs, et al., 1997, S.742).

Im t-Test wurden für jedes Lektin zwei Gruppen gebildet. Eine Gruppe zeigte für das jeweilige Lektin positive, die andere negative Reaktivität.

Für die beiden Lektine VVA und JAC ergaben sich jeweils signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf den Mittelwert der SQO verschiedener Meßreihen. In der Lektin-pos. Gruppe waren die SQO-Mittelwerte stets höher, d.h. die durchschnittliche Cytokeratin 7 -Expression war in den positiven Gruppen größer.

Für VVA ergaben sich signifikante Mittelwertsunterschiede des SQO ($p < 0,05$) für alle drei „hot-spot“ Reihen (RPNmax, LP-1Kmax, LP-5Kmax).

Für JAC ergaben sich signifikante Mittelwertsunterschiede des SQO ($p < 0,05\%$) für RPN 1162, LP-1K, LP-1Kmax)

Für die anderen Lektine (insbesondere für HPA) ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (nach Fuchs, et al., 1997, S.742).

Tabelle 3-5: Signifikante Ergebnisse zwischen Lektin VVA und SQO.

	RPNmax gegen VVA		LP-1Kmax gegen VVA		LP-5Kmax gegen VVA	
	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
N	25	26	26	27	23	28
MW	23.3	39.5	53.1	71.0	49.9	70.7
Stand.abw.	±24.4	±30.0	±30.2	±27.6	±30.3	±29.1

Tabelle 3-6: Signifikante Ergebnisse zwischen Lektin JAC und SQO.

	RPN1162 gegen JAC		LP-1K gegen JAC		LP-1Kmax gegen JAC	
	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
N	16	13	14	14	14	14
MW	13.0	31.4	39.6	65.6	62.0	82.1
Stand.abw.	±15.5	±15.3	±16.8	±23.9	±28.6	±20.1

Erläuterung zu den Tabellen 3-5 und 3-6:

N = Anzahl der Patientinnen in einer Gruppe

MW = Mittelwert der SQO einer Gruppe

Stand.abw. = Standardabweichung der SQO einer Gruppe

3.6 Prognose

3.6.1 Klinische Daten mit Survival und krankheitsfreiem Intervall

3.6.1.1 Survival

Die Kaplan-Meier Kurven (Bild 3-10, (a) – (g)) zeigen die erwarteten Korrelationen der Parameter pT, pN, pM, Stage, Grading, Östrogenrezeptorstatus und Gestagenrezeptorstatus mit der Überlebenszeit.

Es ergeben sich signifikant höhere Absterberaten für die fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, sowie für die Patientinnen, deren Tumoren Östrogenrezeptor negativ waren.

Interessant ist der Verlauf der Kurve bei dem Parameter Gestagenrezeptor: zunächst zeigt sich ein deutlich schnelleres Absterben der Patientinnengruppe mit negativem Gestagenrezeptorstatus, jedoch gleichen sich die Kurven nach etwa 90 Monaten auf dem gleichen Niveau an.

Kein signifikanter Unterschied bzgl. des Survivals bestand zwischen der Gruppe der prämenopausalen und der postmenopausalen Frauen bei einem Cutpoint von 55 Jahren.

Die Ergebnisse bzgl. der klinischen Parameter des log-rank-Test sind in Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-7: p-Werte des log-rank-Test für klinische Daten mit Survival

ER	p=0.036
Grading	p=0.0011
PT	p=0.003
PM	p=0.0001
Stage	p=0.0001
PN	p=0,0029

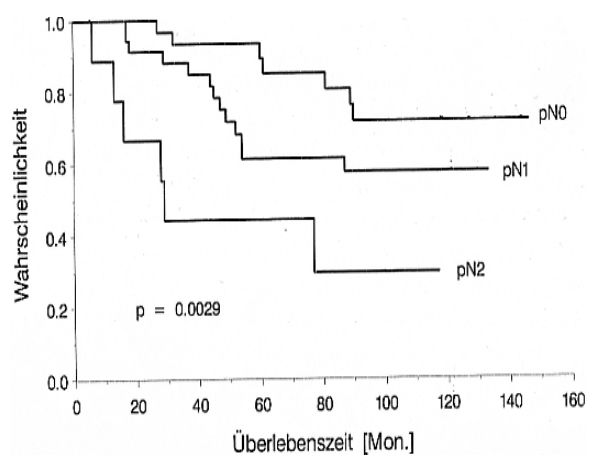
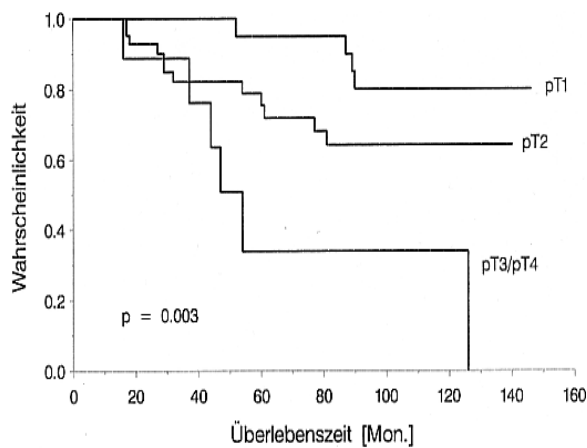
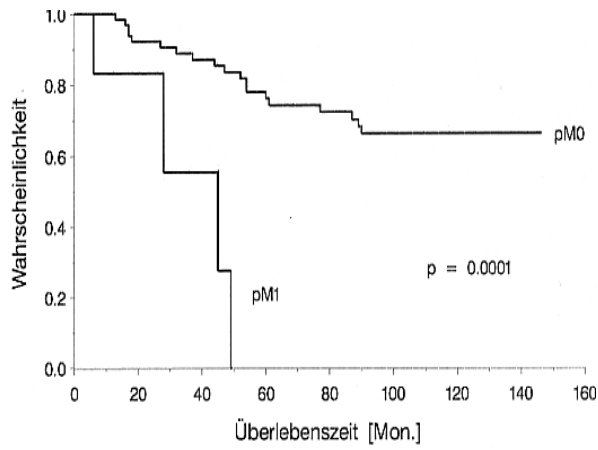
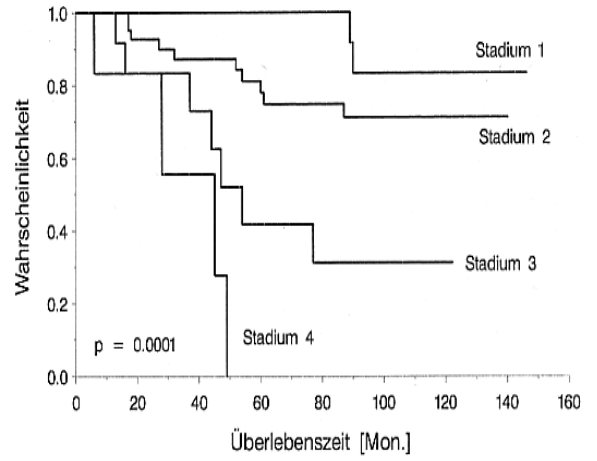


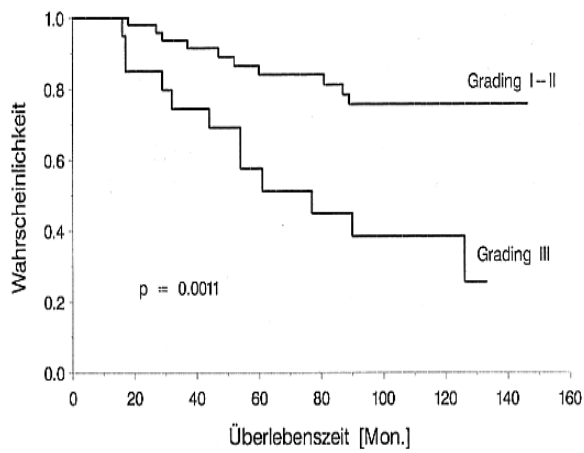
Bild 3-10: Korrelation zwischen Überlebenszeit und verschiedenen Parametern. (a): pT, (b): pN.
(Fortsetzung für (c) - (g) siehe S. 47)



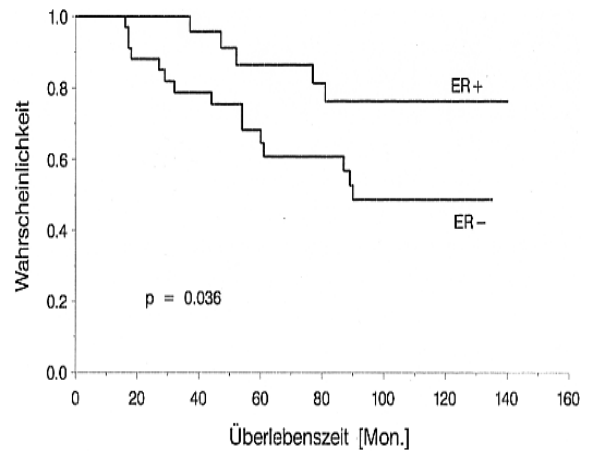
(c)



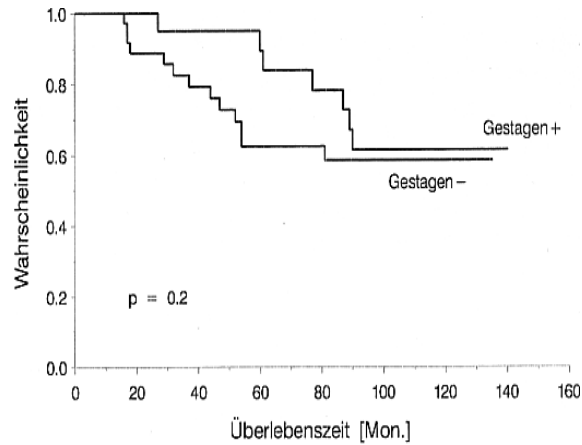
(d)



(e)



(f)



(g)

Bild 3-10: Korrelation zwischen Überlebenszeit und verschiedenen Parametern. (c): pM, (d): Stadium, (e): Grading, (f): Östrogenrezeptorstatus, (g): Gestagenrezeptorstatus.

3.6.1.2 Krankheitsfreies Intervall

In den Kaplan-Meier Kurven (Bild 3-11) sind die oben genannten Parameter mit dem krankheitsfreien Intervall dargestellt.

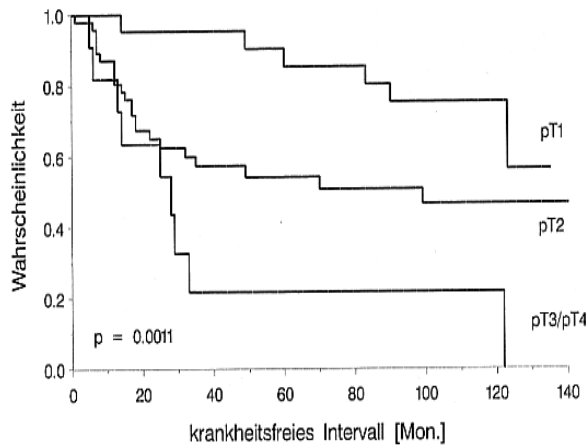
Für die Parameter pT, pN, Stage und Grading zeigen sich wie oben erwartete Verläufe. Je fortschrittener die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose war, um so kürzer ist die Zeit bis zu einem erneuten Auftreten der Krankheit.

Bei den Parametern Östrogen- und Gestagenrezeptorstatus zeigt sich zunächst bei beiden Kurvenverläufen ein zunächst schnelleres Rezidivieren der Patientinnengruppe mit jeweils negativem Status. Beim Östrogenrezeptor erfolgt jedoch nach 10 Jahren eine Angleichung der Kurven, beim Gestagenrezeptorstatus nach ebenfalls 10 Jahren sogar eine leichte Verbesserung bzgl. des Krankheitsfreien Intervalls bzgl. der krankheitsfreien Zeit!

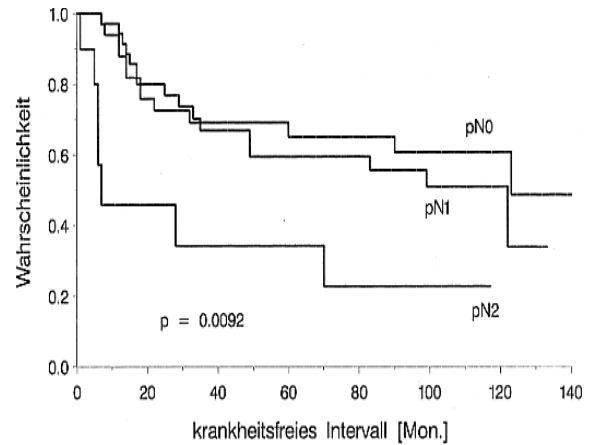
(siehe Tabelle 3-8)

Tabelle 3-8: p-Werte des log-rank-Test für klinische Daten mit krankheitsfreiem Intervall

Grading	p=0.0048
PT	p=0.0011
PN	p=0,0092
ER	p=0,042
Stage	p=0.014

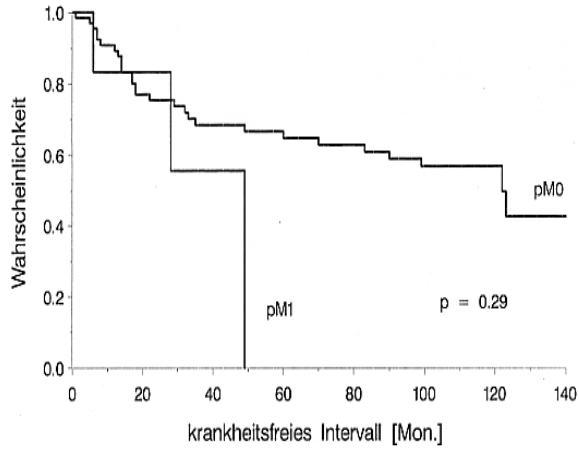


(a)

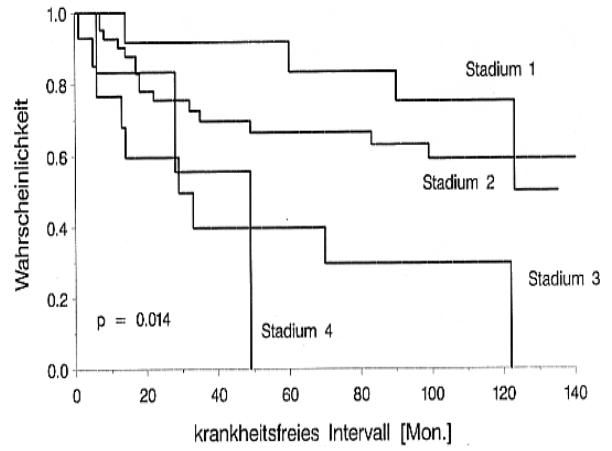


(b)

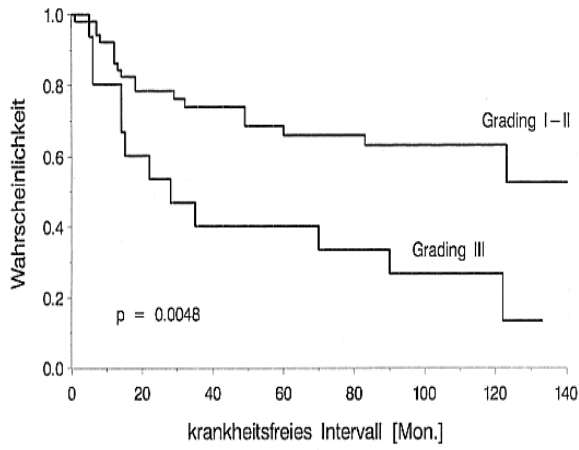
Bild 3-11: Korrelation zwischen krankheitsfreiem Intervall und verschiedenen Parametern. (a): pT, (b): pN
(Fortsetzung für (c) - (g) siehe S. 49)



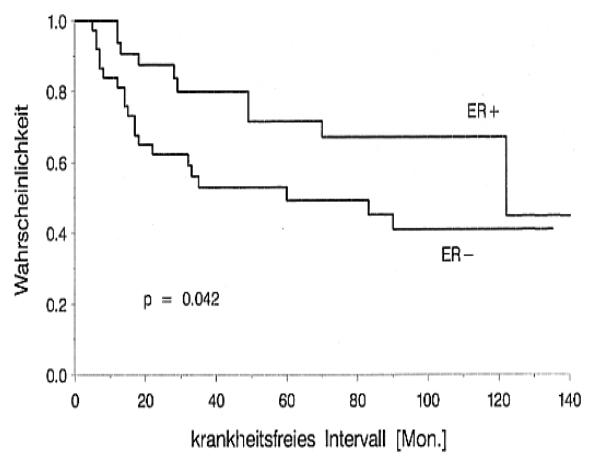
(c)



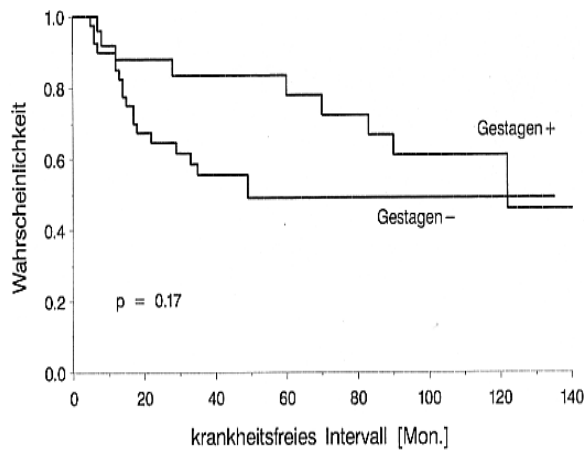
(d)



(e)



(f)



(g)

Bild 3-11: Korrelation zwischen krankheitsfreiem Intervall und verschiedenen Parametern. (c): pM, (d): Stadium, (e): Grading, (f): Östrogenrezeptorstatus, (g): Gestagenrezeptorstatus.

3.6.2 Cytokeratin 7 Expression mit Survival, krankheitsfreiem Intervall und Restüberleben

3.6.2.1 Survival

Getestet wurden die SQO, hot-spots und die visuellen Schätzungen. Es ergaben sich keine signifikanten Abhängigkeiten in allen drei AK-Reihen bzgl. des Survivals.

3.6.2.2 Krankheitsfreies Intervall

Es ergibt sich eine signifikante Reduzierung des krankheitsfreien Intervalls für $p < 0,05$ bei LP-5K > 75% bei einem hot-spots Cutpoint von 75% (siehe Bild 3-12). In die Gruppe „>75%“ wurden die Fälle eingeordnet, bei denen mindestens 1 Meßfeldergebnis (AMP) der semiautomatischen Messung >75% war.

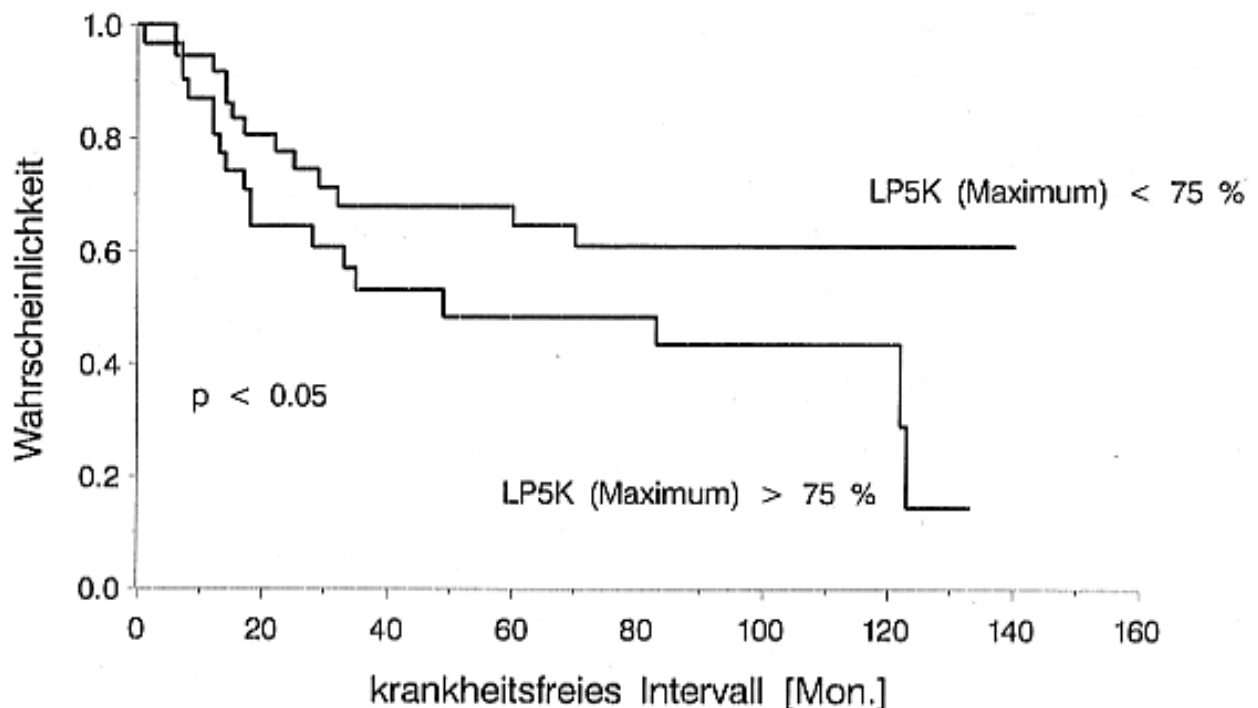


Bild 3-12: Zusammenhang zwischen krankheitsfreiem Intervall und LP-5K - „hot-spots“.

Hot-spots bedeutet der bei der semiautomatischen Messung ermittelte höchste Wert in einem Tumor. Anzumerken ist, daß bei der benutzten Auswertungsmethode der „hot-spots“ eines Tumors durch die Zufälligkeit der Auswahl der Meßfelder möglicherweise nicht in allen Tumoren getroffen wurde. Dies hat zur Folge, daß einige Tumoren möglicherweise zu niedrige Werte für den „hot-spots“ erhalten haben. Dies dürfte jedoch nur in einem sehr geringen Prozentsatz der Fall sein, da durch die Meßmuster der größte Teil der Tumoren abgedeckt wurde.

3.6.2.3 Restüberleben

Für diese Darstellung wurde nur Material von Patienten mit pM0 (N=44) verwendet. Das Restüberleben bezieht sich auf die Zeitspanne nach einem Rezidiv/Metastase bei initial pM0.

Signifikante Abhängigkeiten ergaben sich für:

K1vis: p=0,0373
Lp-1K: p=0,0196
Lp-1K hot-spot: p=0,0279

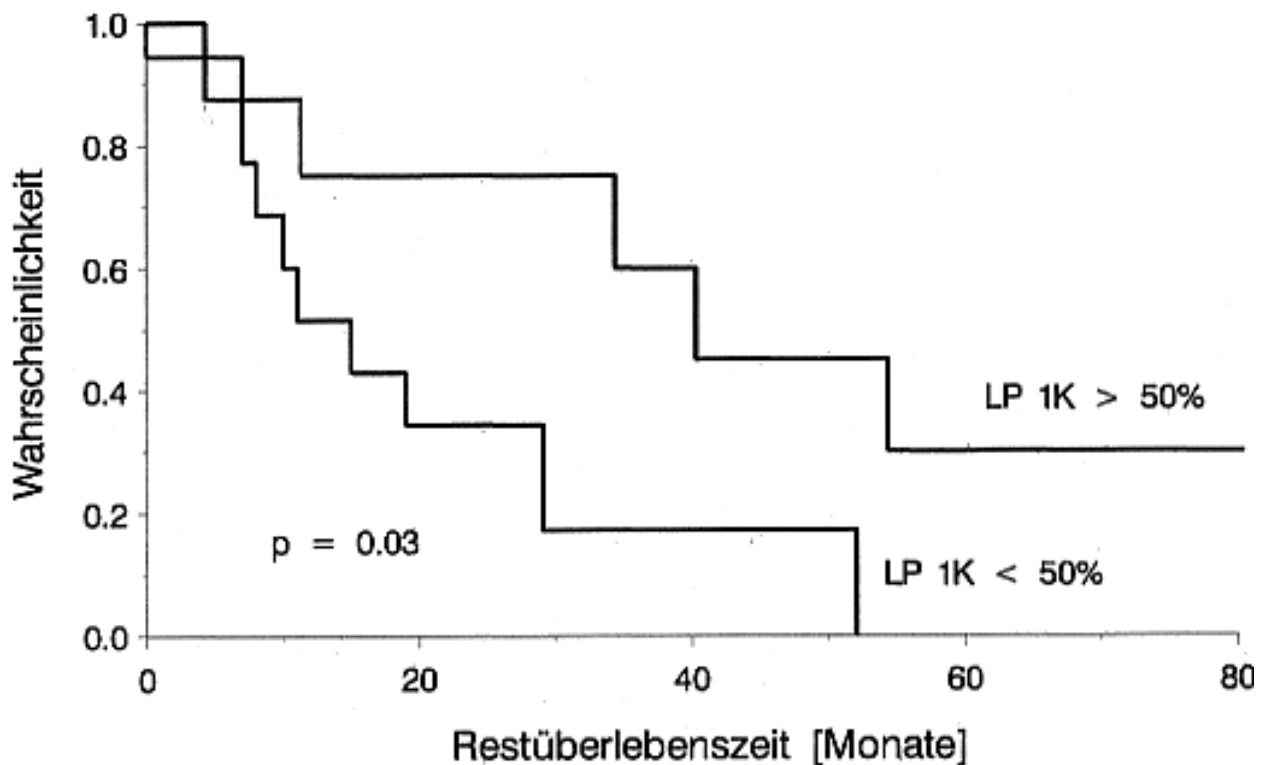


Bild 3-13: Restüberlebenszeit in Abhängigkeit von LP-1K mit Cutpoint 50%

Aus dieser Darstellung ergibt sich für die Gruppe „LP-1K>50%“ ein signifikant besseres Restüberleben als für die Gruppe „LP-1K<50%“. Zunächst erscheint dies widersprüchlich zu den Ergebnissen aus 3.6.2.2. Zur Deutung wird auf Punkt 4.5 verwiesen.

3.7 Untersuchung der Cytokeratin 7 heterogen exprimierenden Tumoren bzgl. prognostischer Relevanz

Mittels Kaplan-Meier-Kurven wurden die visuellen Schätzungen in Hinblick auf die Überlebenszeit untersucht. Es ergaben sich in allen drei AK-Reihen keine signifikanten Abhängigkeiten.

3.8 Unterteilung der Fälle in Cytokeratin 7-positive und -negative Gruppen unter Berücksichtigung aller drei AK-Reihen (visuell und semiautomatisch)

Bei dieser Untersuchung wurde das Patientinnengut in zwei Gruppen eingeteilt (Cytokeratin 7-pos. und -neg. Gruppe). Ein Fall wurde der Cytokeratin 7-pos. Gruppe zugeordnet, wenn bei einem Cutpoint von z.B. 30% mindestens einer der Werte der drei AK-Reihen (RPN-1162, LP-1K, LP-5K) größer war als 30%.

Beim Durchgehen aller sinnvollen Cutpoints konnten weder für die visuellen Schätzungen, noch für die semiautomatischen Werte signifikante Abhängigkeiten bzgl. des Survivals gefunden werden.

4 Diskussion und Beantwortung der Fragestellung

4.1 Ist das Patientengut repräsentativ ?

Für die Aussagekraft der Arbeit ist es von entscheidender Bedeutung, ob die zufällig ausgewählten 91 Patientinnen überhaupt den gängigen epidemiologischen Daten entsprechen. Wie schon in Kapitel 2 angeführt entspricht das Patientengut hinsichtlich des Erkrankungsalters, der histologischen prozentualen Typenverteilung der Karzinome sowie des Hormonrezeptor-status und der Lokalisation des Karzinoms gängigen epidemiologischen Studien (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.104, Stegner, 1994, S.330, Bühling et al., 1995, S.319-320). Eine Abweichung liegt jedoch beim prozentualen Anteil prämenopausaler Karzinome vor, die höher liegt als in großen epidemiologischen Studien (nach Schüler, Gutzwiller, 1995, S.104). Die Ergebnisse der Untersuchung bzgl. der prognostischen Relevanz von Cytokeratin 7 dürfte dadurch jedoch nicht beeinflusst worden sein. Denn laut den Ergebnissen der visuellen Schätzung tritt Cytokeratin 7 vermehrt eher bei jüngeren Patientinnen auf und eher weniger bei älteren Patientinnen. Eine wie in dieser Patientinnengruppe eher ausgeglichene Verteilung von prä- und postmenopausalen Patientinnen könnte hier sogar eher vorteilhaft sein.

Nachteilig war außerdem, daß nicht von allen Patientinnen ein vollständiges follow-up erstellt werden konnte. Dies lag vor allem daran, daß die Patientinnen zum Erkrankungszeitpunkt nicht in eine Studie eingebunden worden waren und somit oft der Kontakt zur behandelnden Klinik abgerissen war. Auch Kontakte zu den Hausärzten blieben teilweise erfolglos. Jedoch liegen in dieser Studie die Follow-up Zeiten von bis zu 12 Jahren doch noch über denen in der Literatur zu findenden gängigen Follow-up Zeiten von bis zu 10 Jahren (nach Hölzel, 1996, S.68-69).

Für noch folgende derartige Arbeiten wäre es wünschenswert, ein Patientengut von mindestens 100 Patientinnen mit einem kompletten follow-up über mindestens 10 Jahre zur Verfügung zu haben.

Trotz des teilweise unvollständigen follow-up ergaben sich jedoch signifikante und der Literatur entsprechende Zusammenhänge bzgl. pT, pN, pM, Grade, Stage, ER bei Korrelation mit Survival bzw. krankheitsfreiem Intervall.

Das Patientengut kann daher als repräsentativ angesehen werden.

4.2 Existiert eine Korrelation zwischen semiautomatischer Messung und visueller Schätzung ?

Wie die Ergebnisse zeigen, existiert ein signifikanter Zusammenhang zwischen den visuellen Schätzungen und der semiautomatischen Messung für alle drei Antikörperreihen.

Zur Verdeutlichung sei hier noch einmal der Unterschied zwischen beiden Methoden dargestellt. Bei der visuellen Schätzung geht lediglich der prozentuale Anteil Cytokeratin 7 positiver Zellen in einem Tumor ein, unabhängig davon, wie groß die Cytokeratin 7-Markerfläche war, also wieviel Cytokeratin 7 exprimiert wurde.

Die Korrelationen zwischen den LP-1K/5K Reihen waren signifikant höher, als bei der RPN-Reihe. Die Ursache dafür war die durchweg größere Markerfläche bei LP-1K/5K als bei RPN. Wie im Abschnitt 3.1.1 bereits erklärt, lagen die Ergebnisse der visuellen Schätzung immer über denen der semiautomatischen Schätzung. Werte um 100% wurden bei der semiautomatischen Messung nur bei Tumoren mit großer Markerfläche erreicht. Die LP-1K/5K Reihen hatten fast

durchweg größere Markerflächen, erbrachten somit höhere Ergebniswerte, wodurch sich die höheren signifikanten Korrelationen erklären. Warum allerdings dies der Fall bei gleicher postulierter CK-Spezifität der Antikörper (siehe 2.2.2.4.2.) ist, ist nicht geklärt. Denkbar wäre eine „Überfärbung“ bei der Herstellung der Präparate für LP-1K/5K oder „Unterfärbung“ für RPN 1162.

Der Wert für die Cytokeratin 7 Expression der semiautomatischen Messung (SQO) resultiert, wie gesagt, aus der prozentual markierten Tumorfläche. Hier wird also auch zwischen schwach und stark exprimierenden Tumoren differenziert. Der SQO ist somit ein mehr aussagekräftiger Wert bzgl. der biologisch vorhandenen Menge an Cytokeratin 7 als die visuelle Schätzung.

Interessant ist hier der Vergleich mit einer Arbeit von Schaller et al. In dieser wurde eine heterogene Expression von Cytokeratin 18 bei 134 Mammakarzinomen beobachtet. Einzelne Tumore waren heterogen, sowie auch das gesamte Tumorkollektiv bzgl. der Intensität der Anfärbung (entsprechend der Menge an exprimiertem Cytokeratin). Um eine Unterteilung in eine Cytokeratin 18-negative und eine Cytokeratin 18-positive Gruppe zu erreichen, wurden beide Parameter berücksichtigt. Als Cutpoint galt ein „IRS“ >4 . Der IRS lag zwischen 0 und 12 und wurde aus dem Produkt von Intensität und prozentualer Menge angefärbter Zellen in einem Tumor ermittelt. Hierzu erhielten bestimmte Prozentmengen an gefärbten Zellen einen Wert zwischen 0 und 4, sowie die Intensität der Zellen Werte zwischen 0 und 3 (nach Schaller et al, 1996, S.1880). Diese Methode gibt somit wie die semiautomatische Messung Auskunft über den biologischen Cytokeratingehalt in einem Tumor.

Der Vergleich zwischen visueller Schätzung und Image Analyse erbrachte auch in einer anderen Arbeit bzgl. Östrogenrezeptorexpression signifikante Korrelationen (nach Layfield 1998 S.763).

Insgesamt ist bemerkenswert, daß ein „geschultes Auge“ der Meßmethode prinzipiell gleichwertig ist. Der Unterschied im Aufwand ist allerdings beträchtlich. Während bei der visuellen Methode ein „kurzer Blick“ in verschiedenen Vergrößerungen auf das Präparat ausreicht, fallen bei der semiautomatischen Messung mehrere zusätzliche zeitaufwendige Schritte an. Dazu gehören:

- vor Meßbeginn schwarz-weiß-Abgleich der Farbkamera
- Vermessung des Exzidats und Erstellung eines Meßmusters
- Ermittlung der Schwellen und ggf. manuelle Nachkorrektur für mehrere Meßfelder

Dies resultiert in einem etwa 10-fach höheren Zeitaufwand gegenüber der visuellen Methode.

4.3 Existiert eine Korrelation zwischen den drei Antikörperreihen ?

Die Ergebnisse zeigen signifikante Korrelationen zwischen den drei Antikörperreihen. Wie erwartet ist die Korrelation zwischen den Messungen der LP-1K und LP-5K Reihe am höchsten. Dies spiegelt auch die Ähnlichkeit der beiden Antikörper und ihrer Spezifität bzgl. der erkannten Cytokeratin-Epitope wieder. Die jeweilige Korrelation zwischen diesen beiden und dem monospezifischen RPN-1162 zeigt, daß diese trotz ihrer Polyspezifität für Cytokeratin-Epitope durchaus auch wie der monospezifische RPN-1162 für die Untersuchung auf Cytokeratin 7 geeignet sind.

Die Ergebnisse bestätigen die von Prof. Dr. Nathrath (nach Nathrath 1988 S.109) postulierte Verwendbarkeit der beiden Antikörper für die Untersuchung von Cytokeratin 7. Durch die beiden Antikörper zusätzlich erkannte Cytokeratin-Epitope (insbesondere Cytokeratin 4) fallen bei der Untersuchung von Mammakarzinomen nicht ins Gewicht.

Der deutlich niedrigere Mittelwert bzw. AMP-Schwelle bei der RPN-Reihe (siehe 3.1) als bei der LP-1/5K-Reihe ist wohl ein Hinweis auf die schwächere Reaktivität des Antikörpers mit Cytokeratin 7. Als Ursache könnte eine schlechtere Sensitivität aufgrund der höheren Spezifität vorliegen. Die intensivere Anfärbung durch LP-1/5K aufgrund zusätzlicher Markierung anderer Cytokeratine ist durch die Vorversuche von Prof. Dr. Nathrath (nach Nathrath 1988 S.109) sehr unwahrscheinlich.

4.4 Bedeutung von Cytokeratinen in Tumoren im Vergleich zum Ursprungsgewebe.

Wie schon in Punkt 1.2. angeführt lassen sich verschiedene Zellen aufgrund der Expression ihrer Intermediärfilamente unterschiedlichen Hauptgewebetypen zuordnen. Zellen mit einer Expression von Cytokeratinen sind dadurch dem Epithel zuzuordnen, Zellen mit z.B. Vimentin dem Bindegewebe, etc.

Die Epithelien können grob in Zylinder- und Plattenepithel unterteilt werden. Nach Moll (nach Moll, 1988, S. 102) treten sogenannte Grundkomponenten oder Leitcytokeratine auf. Diese sind für das Zylinderepithel Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18, für das Plattenepithel die Cytokeratine 5, 14 und 17 (nach Moll, 1988, S. 102-103).

Nathrath unterteilte die Zylinderepithelien durch das Vorkommen unterschiedlicher Kombinationen von Cytokeratinen in drei Gruppen:

- a) Ganz innen: ausschließlich die Leitkeratine 8 und 18, z.B. in Pankreasazinuszellen
- b) Gangtyp: Cytokeratine der Verbindungskanäle (7,8,18,19), z.B. Mamma, Gallen- und Pankreasgänge)
- c) Innerer Schlundtyp: inneres Zylinderepithel des Magen-Darmtrakts (8,18,19)
(nach Nathrath, 1988, S. 62)

Das Brustdrüsenepithel ist jedoch nicht einheitlich. So enthält es vor allem in luminalen Zellen (weniger in den basalen Zellen) der Ductuli reichlich Cytokeratin 7 die somit dem „Gangtyp“ angehören, in den Azini besteht ein Mosaikmuster, d.h. dort finden sich auch Zellen vom inneren Schlundtyp, also ohne Cytokeratin 7 (nach Nathrath, 1988, S. 65). In den Basalzellen finden sich außerdem noch die Plattenepithel-Cytokeratine 5 und 14, eine Kombination, die sich in allen Basalzellen von Epithelien wiederfindet (nach Purkis et al., 1990, S.46).

In Mammakarzinomen ist die Expression der Cytokeratine jedoch uneinheitlich bzw. heterogen. So wurde in der Arbeit von Nathrath lediglich dem Cytokeratin 19 eine Persistenz in der Expression bei Karzinomen im Vergleich zum normalen Mammaepithel zugeschrieben, (allerdings auch hier ein Cytokeratin 19 negativer Fall). Zu diesem Ergebnis kamen auch Malzahn et al (nach Nathrath, 1988, S. 119, nach Malzahn et al., 1998, S. 123). Cytokeratin 8 wird in Mammakarzinomen zwar größtenteils konserviert, jedoch auch heterogen und teilweise überhaupt nicht exprimiert (nach Nathrath 1988 S 119, nach Reis 1993 S.303). Gleiches gilt für Cytokeratin 18 (nach Nathrath 1988 S.119, nach Schaller et al.,1996, S.1879). Dem in dieser Arbeit besondere Aufmerksamkeit geschenktem Cytokeratin 7 (ein leichtes, neutral-basisches nicht platten-

epitheliales Cytokeratin der Gruppe II, in Kombination mit 8,18 und 19 für den „Gangtyp“ von Zylinderepithelien) ist ebenfalls eine nicht konstante Expression im Vergleich zum Ursprungsgewebe zu eigen (nach Nathrath, 1988, S.119, nach Su L. et al., 1996, S. 804). Letztere Arbeit untersuchte immunhistochemisch sowohl den Cytokeratin-Gehalt als auch die zugehörige mRNA. In dieser waren fast 50 % der Mammakarzinome bzgl. Cytokeratin 7 negativ, während die normalen Mammagewebe dieses biochemisch extensiv exprimierten. Als Ursache wird in dieser Arbeit entweder eine „down-Regulation“ von Cytokeratin 7 auf der Transkriptionsebene vermutet oder eine selektive Beeinflussung Cytokeratin 7 neg. Zellen in der Entwicklung der meisten Mammakarzinome.

Die Bedeutung der Cytokeratinexpression kann hier nun in zwei unterschiedlichen Aspekten diskutiert werden. Besitzt die Expression eines oder mehrerer Cytokeratine zum einen prognostische Relevanz, kann die Expression zum anderen zur von Gewebe unbekanntem Ursprung beitragen (diagnostische Möglichkeiten). Zur prognostischen Relevanz wird in den nachfolgenden Punkten Stellung bezogen. Beispiele für diagnostischen Nutzen der Untersuchung auf Cytokeratinexpression wurden bereits in Punkt 1.2.4 angeführt. Eine Identifizierung einer Metastase unbekannter Herkunft (durch die Bestimmung des Cytokeratinexpressionsmusters allein) als Mammapilia erscheint unter Zusammenfassung der vorliegenden oben genannten Arbeiten als zumindest problematisch, da die Expression der Hauptkeratine 7,8,18 und 19 doch sehr heterogen ist und in seltenen Fällen auch Plattenepithel-Cytokeratine gefunden wurden. Eine Untersuchung auf das Cytokeratinexpressionsprofil ist jedoch sehr wohl richtungsweisend auf eine Karzinommetastase durch den Nachweis von Cytokeratinen im Allgemeinen (im Gegensatz z.B. zu einer Sarkommetastase). Außerdem z.B. auf drüsige Karzinommetastase mit Verdacht auf primäres Mammakarzinom durch den Nachweis von mehreren der vier Hauptkeratine (7, 8, 18, 19), sowie durch Bestimmung zusätzlicher Komponenten. Eine interessante Arbeit untersuchte, ob durch die Bestimmung von Cytokeratin 7 und 20 sowie durch den ER-Status von Metastasen mit unbekannter Herkunft der wahrscheinliche Ursprungsort ermittelt werden könnte. In diesem konkreten Fall stellte sich die Frage, ob Metastasen eines Siegelringkarzinoms sicher den klinisch häufigsten Ursprungskarzinomen, nämlich gastrointestinalen Karzinomen oder invasiv lobulären Mammakarzinomen zugeordnet werden können. Die meisten gastrointestinalen Tumoren waren Cytokeratin 20 positiv, während nur wenige der Mammakarzinome Cytokeratin 20 exprimierten. Cytokeratin 7 wurde in den meisten Fällen beider Karzinomgruppen nachgewiesen. ER wurde lediglich in den meisten Mammakarzinomen und in keinem der gastrointestinalen Karzinome nachgewiesen. Eine Kombination des Status von Cytokeratin 20 und ER erlaubt somit die Zuordnung einer solchen Metastase mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer der beiden Primärkarzinomgruppen (nach Tot T., 2000, S.467-472).

Zusammenfassend ist also die konkrete 100% Zuordnung zu einem bestimmten Ursprungsgewebe nicht möglich, eine engere Eingrenzung eines möglichen Primärtumors bei klinisch lediglich vorliegender Metastase aber sehr wohl. Somit hat die Bestimmung des vorliegenden Cytokeratinexpressionsmusters, insbesondere unter Hinzunahme anderer Parameter wie z.B. ER großen diagnostischen Wert.

4.5 Existiert eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und klinischen Daten ?

Der visuellen Schätzung nach sind bei einem Cutpoint von 30% die vermehrt Cytokeratin 7 exprimierenden Fälle signifikant in der prämenopausalen Patientinnengruppe vertreten (nach Nathrath, Lane, 1990, S. 596, nach Nathrath, Lane, 1994, S. 60). Die semiautomatische Messung konnte dies jedoch nicht bestätigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, das in jüngeren Jahren die Tumorzellpopulation Cytokeratin einheitlicher exprimiert, sprich die Homogenität der Karzinome größer ist, die Menge an biologisch exprimiertem Cytokeratin 7 insgesamt jedoch nicht altersabhängig ist. Daraus ergibt sich die Hypothese, daß die Cytokeratinzellarchitektur bei Mammacarciomen in jüngeren Jahren auf der Ebene der Zytoplasmaarchitektur einheitlicher ist als im fortgeschritteneren Lebensalter.

Grundsätzlich jedoch ist Anordnung und Verteilung der Keratine im Cytoplasma verschiedener Zelltypen nicht einheitlich (nach Moll et al, 1982, S.11).

Ein Ergebnis der semiautomatischen Messung betrifft die sogenannte Hot-spot Auswertung in der LP-5K Reihe. Hier wurden die untersuchten Karzinome dieser Reihe in zwei Gruppen aufgeteilt. Als Cutpoint wurde ein AMP-Wert von 75% verwendet. War der höchste gemessene AMP-Wert (Hot-spot) in einer Meßreihe eines Karzinoms größer als 75%, so zählte dieser Fall zu der Gruppe „>75%“. Die Hot-spots könnten bzgl. der Keratinstruktur der Zelle als die aktivsten Zentren einer heterogenen Tumorzellpopulation angesehen werden. Somit wären die Hot-spots, im Falle einer prognostischen Relevanz von Cytokeratin 7, die den weiteren Krankheitsverlauf maßgeblich bestimmende Zellpopulation innerhalb des Karzinoms. Wie im Abschnitt 3.5.2 erwähnt ergab sich für diese Gruppe ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß ein homogen oder zumindest teilweise stark Cytokeratin 7 exprimierendes Mammakarzinom als rezidivfreudiger angesehen werden kann. Damit stimmt auch die bei der visuellen Schätzung gestellte Hypothese überein, daß Cytokeratin 7 verstärkt exprimierende Tumoren vor allem bei jüngeren Patientinnen gefunden und im allgemeinen als rezidivfreudiger angesehen werden. So ergaben Untersuchungen von Lees et al. eine signifikant schlechtere Prognose in der Altersgruppe der 35-39 Jahre alten Patientinnen als in der Gruppe der 45-69 jährigen. Eine Verschlechterung der Prognose trat erst wieder ab einem Alter von 70 Jahren auf (nach Lees AW 1989 S.143-151). Auch in einer Untersuchung von bereits metastasierten Mammakarzinomen hatte die Gruppe der 64-74 jährigen eine bessere Prognose als die beiden Gruppen der 45-54 jährigen und 55-64 jährigen Patientinnen. Eine deutliche Verschlechterung trat auch hier erst wieder bei der Gruppe der 75-84 jährigen auf (nach Alberts 1991 S239-241). Unterschiedliche Prognose bei unterschiedlicher Cytokeratin-Expression werden auch für K18 (nach Schaller 1996 S.1879) und K8 (nach Reis et al.,1993, S. 303) beschrieben.

Die Untersuchung des Restsurvivals nach einem Rezidiv bzw. einer Metastase erbrachte in der 1K-Reihe für K1vis (visuelle Schätzung nach Nathrath), Lp1k und Lp1k hot-spot (semiautomatische Messung nach Röhl) signifikant kürzere Lebenserwartungen mit $p= 0,0373; 0,0196; 0,0279$ (siehe 3.5.2.3). Hier hatten jedoch die vermehrt Cytokeratin exprimierenden Tumoren die bessere Prognose. Geht man von einem jüngeren Durchschnittsalter der vermehrt Cytokeratin 7 exprimierenden Tumoren aus, so erscheint auch dieses Ergebnis logisch, da bei gleicher biologischer Malignität/Rezidivfreudigkeit jüngere Patientinnen dem Krebsleiden besser Widerstand

leisten können. Eine weitere mögliche Ursache dafür wäre, daß die jüngeren Patientinnen aufgrund ihres Alters und dem relativ frühen Stadium der Erkrankung nach gängigen Therapie-schemata nach Rezidiv bzw. Metastase aggressiver therapiert wurden und dadurch diese Gruppe ein besseres Restsurvival hatte.

Zusammengefaßt: Cytokeratin 7-positive Tumoren haben kürzeres rezidivfreies Überleben als Cytokeratin 7-negative Tumoren; wenn Rezidiv, dann haben Cytokeratin 7-positive Tumoren weniger Ausbreitungstendenz als Cytokeratin 7-negative Tumoren, vermutlich wegen aggressiverer Behandlung.

4.6 Existiert eine Korrelation zwischen Cytokeratin 7 und anderen immunhistologischen Parametern ?

Wie in Punkt 3.5 gezeigt bestehen einige signifikant positive Zusammenhänge zwischen der Cytkeratin 7 Expression der semiautomatischen Messung und der Reaktivität verschiedener Lektine. So exprimierte die VVA (*Vicia villosa* Agglutinin) reaktive sowie die JAC (*Artocarpus integrifolia* Agglutinin) reaktive Gruppe im Durchschnitt signifikant mehr Cytokeratin 7. Da in einer Arbeit von Nathrath und Lane eine vermehrte Cytokeratin 7 Expression eher bei jungen Patientinnen und ER negativen Karzinomen vorkommt (nach Nathrath und Lane 1990 S.596), könnte man zunächst eine Reaktivität mit VVA und JAC als ungünstigen Prognosefaktor annehmen. Allerdings konnte Fuchs für die beiden Lectinreaktivitäten von VVA und JAC eben keine prognostische Relevanz nachweisen (nach Fuchs et al. 1997 S.742) und wie in Punkt 4.4. gezeigt, besitzt Cytokeratin 7 wohl auch eher keine eindeutige prognostische Relevanz. Eine Korrelation mit HPA, dem Fuchs eine prognostische Relevanz bescheinigt, konnte nicht nachgewiesen werden.

Ob ein biologischer Zusammenhang zwischen der Cytokeratin 7 Expression und dem veränderten Glykolisierungsmuster terminaler Kohlehydratstrukturen (konkret in diesem Fall nachgewiesen durch VVA und JAC) besteht, ist völlig unklar, da bisher keine Erkenntnisse über einen Zusammenhang zwischen einem Bestandteil der Intermediärfilamente, also der Zellarchitektur und veränderten terminalen Kohlehydratstrukturen vorhanden sind.

4.7 Möglichkeiten der Zytometrie bei der Auswertung histologischer Schnitte

Die visuelle Schätzung ist der semiautomatischen Messung überlegen, wenn es darum geht, die Heterogenität eines Tumors zu quantifizieren. Stellt sich jedoch die Frage, wieviel Cytokeratin 7 „biologisch“ in einem Tumor exprimiert wird, so ist die semiautomatische Auswertung deutlich überlegen, da sie auch die Intensität und somit die damit korrelierende tatsächliche Menge an exprimiertem Cytokeratin 7 berücksichtigt. Mit ihrer Hilfe werden auch kleinste Mengen von Cytokeratin 7 im Zytoplasma der Tumorzellen erfaßt und bzgl. der gesamten Tumormasse quantifiziert.

Ein besonderer Aspekt dieser Arbeit ist die Tatsache, daß hier ein Cytoplasmaprotein Gegenstand der semiautomatischen, zytometrischen Untersuchung war.

Veröffentlichungen über zytometrische Arbeiten an Cytoplasmaproteinen existieren nach Wissen des Autors nicht. Auch Nachfragen im zytometrischen Institut des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit und Recherchen im Internet (PubMed, Medline) ergaben keinen Hinweis auf die Existenz zytometrischer Untersuchungen von Cytoplasmaproteinen.

Dagegen wird die Zytometrie zur Auswertung der Expression von Kern- oder Zelloberflächenfärbungen benutzt. Als Beispiele hierfür seien folgende zwei Arbeiten genannt:

In einer Untersuchung von Walch et al. wurde die zytometrische Untersuchung zur objektiven Quantifizierung der heterogenen Amplifikation des Her-2/neu Gens und der Expression von c-erbB-2-Protein von einzelnen Tumorzellen in Barrett-Karzinomen angewandt (nach Walch et al., 2000, S.25-32).

Eine zweite Arbeit verwendete die Zytometrie zur morphometrischen Evaluation einer anderen „Kernfärbung“, nämlich der Menge an vorhandenem MIB-1 (paraffin Ki-67) in 59 neuroendokrinen Lungentumoren (nach Böhm et al., 1996, S402-409).

Die Streuung der einzelnen Meßergebnisse (AMP) im Tumor bei der semiautomatischen Messung ist für das Ausmaß der Heterogenität nur bedingt verwertbar, da die Schwankungen bedingt durch die individuelle Einstellung von Marker und Tumorschwelle zu groß sind. Der Hauptgrund dafür ist insbesondere die größere Streuung der Tumorschwelle bedingt durch die unter Material und Methoden beschriebene Wahl der Tumorschwelle je nach Bindegewebsmenge in einem Meßfeld. Je nach Menge und Intensität der Anfärbung des Bindegewebes war eine Modifikation der Tumorschwelle nötig, um einen Mittelweg zwischen falsch negativ markiertem Tumor und falsch positiv markiertem Bindegewebe zu finden. Die Fehler wurden durch manuelle Interaktion beseitigt, d.h. falsch positiv markiertes Bindegewebe wurde gelöscht und falsch negative Tumorflächen per Hand markiert. Somit wurde das Endergebnis, also der SQO, nicht beeinflusst. Zusammenfassend ist also die Beurteilung der Heterogenität eines Tumors visuell genauer und wesentlich weniger zeitaufwendig. Damit künftig die Heterogenität mittels Bildanalyse besser beurteilt werden kann, müßten bei nachfolgenden Untersuchungen die Präparate anders behandelt werden. Zunächst sollten keine Gefrierschnitte verwendet werden, um die Auswertbarkeit aufgrund von Gewebequetschungen oder auch Luft einschüssen zu verbessern. Am wichtigsten wäre jedoch die Wahl einer Färbemethode, die zum einen eine genaue Differenzierung zwischen Bindegewebe und Tumor, zum anderen zwischen Marker und Tumorzellkernen ermöglicht. Größere Schwankungen der einzelnen Meßergebnisse in einem Tumor könnten dann aufgrund der unter diesen Voraussetzungen gegebenen Konstanz von Tumor und Markerschwelle ausgeschlossen werden. Somit wäre auch die Imageanalyse zur Untersuchung der Heterogenität eines Tumors ebenso gut geeignet wie die visuelle Schätzung. Vorteilhaft für diese Färbungen wären Farben, welche im Spektrum möglichst weit auseinander liegen, d.h. idealerweise Rot-Grün-Blau. So wäre für Bindegewebe X gut, für eine Tumorfärbung Y, sowie Z für das Marker-substrat.

Unter diesen Voraussetzungen ist auch ein automatisiertes Vorgehen durchaus möglich. Dann wäre letztlich noch ein manuelles Ausmessen des Tumorpräparates, die Auswahl eines passenden Meßmusters und die Zentrierung auf den Mittelpunkt des Präparates erforderlich. Die weitere Auswertung könnte nach Entwicklung einer entsprechenden Software vollautomatisch erfolgen,

was eine deutliche Reduzierung des Zeitaufwands und der Kosten bewirken würde. Bisher erfolgte die Auswertung in den oben genannten zytometrischen Arbeiten für jedes Präparat semiautomatisch und nicht automatisiert.

4.8 Zeigen Cytokeratin 7 heterogen exprimierende Tumoren einen anderen klinischen Verlauf als homogen exprimierende Tumoren ?

Wie im Ergebnisteil dargelegt, unterscheiden sich die Cytokeratin 7 heterogen exprimierenden Tumoren bzgl. der Prognose nicht von den homogen positiven oder homogen negativen Tumoren.

Trotz mehrerer verschiedener Cutpoints ließ sich kein „statistisch-prognostischer“ Schwellenwert finden, bei dem sich unterschiedliche klinische Verläufe zweier Gruppen (Cytokeratin 7-pos. und Cytokeratin 7-neg.) ergeben hätten.

Auch die Untersuchung bzgl. der zu 100% positiv exprimierenden und der komplett negativen Tumoren erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Somit scheint die heterogene Expression von Cytokeratin 7 keinen prognostisch relevanten Wert zu besitzen.

4.9 Ist die Unterteilung in Cytokeratin 7 positive und negative Mammakarzinome relevant und bietet sich damit eine weitere Unterteilungsmöglichkeit der NOS Karzinome ?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen unter anderem, daß Cytokeratin 7 vermehrt wohl von prämenopausalen Karzinomen exprimiert wird. Eine eindeutige prognostische Relevanz besitzt Cytokeratin 7 wohl eher nicht. Hinweisen auf eine größere Rezidivfreudigkeit Cytokeratin 7-positiver Tumoren müßte in nachfolgenden Arbeiten mit einer größeren Patientenzahl mit vollständigem Follow-up und optimierten Präparaten nachgegangen werden. Sollte sich die größere Rezidivfreudigkeit reproduzieren lassen, so wäre dies durchaus ein Hinweis auf die Notwendigkeit der prätherapeutischen Cytokeratin 7 Bestimmung, um primär aggressivere Therapien bei höherer Rezidiv-Wahrscheinlichkeit anzuwenden.

Andere Arbeiten über die Cytokeratin-Expression in Mammakarzinomen geben Hinweise darauf, daß eine Unterteilung der „NOS“-Karzinome durch verschiedene Expression hinsichtlich Menge und Kombination von Cytokeratinen durchaus möglich wäre.

So fand sich in einer Arbeit eine signifikant negative Korrelation mit der Expression von Cytokeratin 8 und der Länge des rezidivfreien Intervalls. Die vermehrte Expression von Cytokeratin 8 wäre somit ein prognostisch günstiger Faktor und könnte eine Unterteilung der „NOS“-Karzinome liefern (nach Reiss et al, 1993, S303).

Auch Cytokeratin 18 könnte eine solche Unterteilung liefern. In einer Arbeit von Schaller, in der 134 Mammakarzinome untersucht wurden, zeigte sich eine deutlich höhere Mortalitätsrate in den Fällen, in denen die Tumoren kein Cytokeratin 18 exprimierten (nach Schaller et al. 1996, S.1879).

Malzahn et al. fanden in einer Untersuchung von 101 NOS-Mammakarzinomen zwei unterschiedliche Gruppen heraus. Die erste Gruppe exprimierte die gängigen Cytokeratine 7, 8, 18 und 19 der luminalen Epithelschicht, während eine zweite Gruppe noch zusätzlich die Cytokeratine 4, 14 und 17 exprimierte. Diese zweite Gruppe hatte ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall. Außerdem gehörten 62% der G3-Karzinome zu dieser Gruppe, während die große Mehrheit der G1 und G2 Karzinome der ersten Gruppe angehörte (nach Malzahn et al., 1998, S.119).

Aus diesen Ergebnissen könnte man schlußfolgern, daß der Nachweis von eigentlich für Plattenepithelien typischen Cytokeratinen (4, 14, 17) ein Zeichen von sehr weit fortgeschrittener Entdifferenzierung ist und sich damit eine prognostisch deutlich schlechtere Untergruppe innerhalb der NOS-Karzinome ergibt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Nathrath et al., die Hinweise auf eine prognostisch schlechtere Untergruppe in NOS-Karzinomen fanden (nach Nathrath et al., 1994, S. 291).

Darüberhinaus könnte als Ursprungsort für diese Karzinomgruppe eine bestimmte Zellpopulation in der TDLE postuliert werden (unter Voraussetzung der „Konservierung“ der Cytokeratin-Expression). Diese vereinzelt luminalen Zellen sind Cytokeratin 14-pos. und werden in mehreren Arbeiten als Stammzellkandidat gehandelt. Das Vorkommen von Cytokeratin 14 ist in diesen Zellen als Restausdruck der epidermalen Histogenese des Brustdrüsenepithels zu sehen (nach Nathrath, 1988, S.74, nach Nathrath, Lane, 1994, S. 60-61).

5 Zusammenfassung

Nach der WHO werden die Mammakarzinome in mehrere histologische Gruppen unterteilt. Die weitaus größte davon ist die Gruppe der invasiv ductalen Karzinome mit einem Anteil von fast 80%. Jedoch verhält sich diese „not otherwise specified“ (NOS)-Gruppe in ihrem histomorphologischen Wachstumsmuster uneinheitlich und aus klinischer Erfahrung bzgl. Rezidivfreiheit, Prognose, etc. sehr heterogen. Eine weitere Unterteilung dieser NOS-Karzinome in einheitliche Untergruppen wäre wünschenswert.

In dieser Arbeit wurden immunhistologisch gefärbte Mammakarzinomgefrierschnitte mit Hilfe der Zytometrie ausgewertet und mit vorhandenen klinischen Daten, sowie dem ermittelten Follow-up verglichen. Ebenfalls flossen die Ergebnisse der Habilitationsarbeit von Prof. Dr. W. Nathrath ein, der die gleichen Präparate visuell untersucht hatte.

Zytometrisch untersucht wurden 3 Präparatreihen zu je 91 Fällen. In allen drei Reihen wurde Cytokeratin 7, ein Cytoplasmaprotein, mit einem jeweils spezifischen, monoklonalen Antikörper immunhistologisch dargestellt. Die drei Antikörper waren RPN-1162, LP-1K und LP-5K. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun.

Das Hauptziel dieser Arbeit war nun, nach Ermittlung der zugehörigen Daten sowie des follow-up, festzustellen, ob die Expression von Cytokeratin 7 in unterschiedlicher Menge eine prognostische Relevanz besitzt und damit eine weitere Unterteilung der NOS-Karzinome je nach Menge der Expression möglich ist. Außerdem sollte die verwendete zytometrische Methode auf ihre Korrelation mit den visuellen Schätzungen in der Arbeit von Prof. Dr. Nathrath überprüft werden.

Ermittelt wurden zu den 91 Patientinnen die klinischen Daten wie z.B. Alter, TNM, Hormonrezeptorstatus, etc. sowie ein follow-up von bis zu 146 Monaten.

In der Arbeit von Prof. Dr. Nathrath wurde die Cytokeratin 7-Expression der Karzinome visuell untersucht. Es ergaben sich drei Gruppen. Homogen positiv exprimierende, homogen negativ exprimierende und Cytokeratin 7 heterogen exprimierende Karzinome. Diese wurden der Cytokeratin 7-pos. bzw. Cytokeratin 7-neg. Gruppe zugeordnet, wenn mehr bzw. weniger als 30% der Karzinomfläche Cytokeratin 7 aufwies. Durch Korrelation mit den mittlerweile vorliegenden klinischen Daten zeigte sich, daß die wenig Cytokeratin 7 exprimierenden Tumoren signifikant häufiger in der Gruppe der älteren Patientinnen und bei den Östrogenrezeptor positiven Karzinomen zu finden waren.

Für die hier vorgelegte Dissertation wurde mit Hilfe eines semiautomatischen, zytometrischen Meßverfahrens der immunhistologisch exprimierte Gehalt an Cytokeratin 7 im jeweiligen Präparatschnitt ermittelt. Vergleiche dieser Meßwerte mit den visuellen Schätzungen ergaben signifikante Korrelationen, so daß die Methode als durchaus geeignet gesehen werden darf.

Die Ergebnisse der visuellen Auswertung bzgl. des Alters und Östrogenrezeptorstatus konnten mit den vorliegenden Meßwerten der zytometrischen Methode nicht bestätigt werden, jedoch ergab sich ein Hinweis darauf, daß die vermehrt Cytokeratin 7 exprimierenden Tumoren ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall, aber ein besseres Restsurvival (Restüberleben nach 1. Rezidiv) haben, als die wenig Cytokeratin 7 exprimierenden Karzinome. Dies paßt zu den Ergebnissen der visuellen Schätzung, nämlich daß die vermehrt Cytokeratin 7

exprimierenden Tumoren vor allem in der jüngeren, Östrogenrezeptor negativen Altersgruppe zu finden sind. Zusammenhänge mit Überleben oder der Mehrzahl klinischer Daten (Alter, TNM, stage, etc.) konnten jedoch nicht hergestellt werden.

Insgesamt ergaben sich keine zwingenden Hinweise auf eine prognostische Relevanz der Cytokeratin 7 Expression oder auf eine Möglichkeit, die Gruppe der NOS-Karzinome anhand des Cytokeratin 7 Gehalts in weitere Untergruppen zu unterteilen. Weitere Untersuchungen mit einem größeren Patientengut, sowie einer für die zytometrische Auswertung optimierten Aufbereitung der histologischen Schnitte wären jedoch wünschenswert.

6 Literatur

(Anmerkung : Hinweise auf Veröffentlichungen mit mehr als zwei Autoren sind im Textteil zur Vereinfachung in folgender Weise abgekürzt: „NAME1 et al.“)

Adami H.-O., Adams G., Boyle P., Ewertz M., Lee N., Lund E., Miller A., Olsson H., Steel M., Trichopoulos D., Tulinius H.
Breast cancer etiology.
Int J Cancer Suppl 5 (1990), 22-39

Adami H.-O., Lund E., Bergstrom R., Meirik O.
Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of breast cancer in young women.
Br J Cancer 58 (1988), 832-837

Alberts A.S., Falkson G., van der Merwe R.
Metastatic breast cancer-age has a significant effect on survival.
S Afr Med J 79 (1991), 239-241

Arnhold H., Lebeau A., Nathrath W., Permanetter W.
Pathomorphologie des Mammakarzinoms.
In: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome.
Tumorzentrum München, München, 1996, 6. Aufl, 9-19

Bässler R.
Pathologie der Brustdrüse.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, , 1978, S.456-458

Baron J.A., Newcomb P.A., Longnecker M.P., Mittendorf R., Storer B.E., Clapp R.W., Bogdan G., Yuen J.
Cigarette smoking and breast cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5 (1996), 399-403

Bartek J., Taylor-Papadimitriou J., Miller N., Millis R.
Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumors.
Int J Cancer 36 (1985), 299-306

Böhm J., Koch S., Gais P., Jütting U., Pauer H.W., Höfler H.
Prognostic value of MIB1 in neuroendocrine tumors of the lung.
J Pathol 178 (1996), 402-409

Bühling K.J.
Weibliche Geschlechtsorgane.
In: Allgemeine und Spezielle Pathologie,
Bühling K.J., Lepenien J., Witt K., Seiffert K., Bleschkowski A.,
Urban & Schwarzenberg, München–Wien–Baltimore, 1995, 316-318

Caygill C.P.J., Charlett A., Hill M.J.
Fat fish fishoil and cancer.
Br J Cancer 74 (1996), 159-164

Cole P., Mark Elwood J., Kaplan S.D.

Incidence rates and risk factors of benign breast neoplasms.

Am J Epidemiol 108 (1978), 112-120

Egan K.M., Stampfer M.J., Giovannucci E., Rosner B.A., Colditz G.A.

Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer.

J Natl Cancer Inst 88 (1996), 988-993

Foulkes W.D., Bolduc N., Lambert D., Ginsburg O., Olien L., Yandell D.W., Tonin P.N., Narod S.A.

Increased incidence of cancer in first degree relatives of women with double primary carcinomas of the breast and colon.

J Med Genet 33 (1996), 534-539

Franzen B., Linder S., Alaiya A.A., Eriksson E., Uruy K., Hirano T., Okuzawa K., Auer G.

Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins.

Br J Cancer 74 (1996), 1632-1638

Freudenheim J.L., Marshall J.R., Vena J.E., Laughlin R., Brasure J.R., Swanson M.K., Nemoto T., Graham S.

Pre-menopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits and related nutrients.

J Natl Cancer Inst 88 (1996), 340-348

Fuchs A., Röhl M., Schumacher U., Leathem A., Jütting U., Untch M., Nathrath W.

Reaktivität mit Helix Pomatia-Agglutinin als prognostischer Parameter bei Mammakarzinomen in einer Langzeitstudie.

Verh Dtsch Ges Path 81 (1997), 742

Funke, Classen, Eiermann, Harbeck, Konecny, Lebeau, Permanetter, Untch

Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom

In: Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinom

Tumorzentrum München (Hrsg.), 1998, 7. Aufl.

(<http://www.med.uni-muenchen.de/tzm/empfehlung/mamma/S031.HTML#Prognosefaktoren>, „Suchwort“ : <Prognosefaktoren>)

Goodman M.T, Cologne J.B., Moriwaki H., Vaeth M., Mabuchi K.

Risk factors for primary breast cancer in Japan: 8-year follow up of atomic bomb survivors.

Prev Med 26 (1997), 144-153

Goovaerts G., Schüler G., Genton C.Y.

La maladie fibro-kystique du sein, une precancerose?

Schweiz Med Wschr 113 (1983), 211-217

Grischke E.-M., Bastert G., Otto H.F., Sinn H.-P., Treiber M., von Fournier D., Wannenmacher M.

Das Mammakarzinom, Empfehlungen für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Kapitel II. Tumorklassifizierung.

Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim (Hrsg.), 2000, 9-16

Guerrieri C., Franlund B., Malström H., Boeryd B.
Ovarian Endometrioid Carcinomas simulating Sex Cord-Stromal Tumors:
A study using Inhibin and Cytokeratin 7.
Int J Gynecol Pathol 17 (1998), 266-271

Hanna I., Steinhoff M., Rizk Y., Sung C.J., Lauchlan S.
Expression of keratin 7 and 20 by mucinous adenocarcinomas:
Immunohistochemical study.
ACJP Vol. 107 (1997), 481

Hendler F.J., Yuan D.
Relationship of monoclonal antibody binding to estrogen and
progesterone receptor content in breast cancer.
Cancer Res 45 (1985), 421-429

Hermon C., Beral V.
Breast cancer mortality rates are levelling off or beginning to decline in many western countries:
Analysis of time trends, age-cohort and age period models of breast cancer mortality in 20
countries.
Br J Cancer 73 (1996), 955-960

Hölzel D., Mahl G., Sauer H., Schmid L., Ulrich G.
Kapitel: Nachsorge
In: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinom.
Tumorzentrum München, 1996, 6.Auflage, 68-81

Hunter D.J., Willett W.C.
Nutrition and breast cancer.
Cancer Causes Control 7 (1996), 56-68

Katsouyanni K., Lipworth L., Trichopoulou A., Samoli E., Stuver S., Trichopoulos D.
A case-control study of lactation and cancer of the breast.
Br J Cancer 73 (1996), 814-818

Krieger N., Hiatt R.A.
Risk of breast cancer after benign diseases.
Variation by histologic type, degree of atypia, age at biopsy, and length of follow-up.
Am J Epidemiol 135 (1992), 619-631

Land C.E.
Temporal distributions of risk for radiation-induced cancers.
J Chronic Dis 40 Suppl 2 (1987), 45-57

Layfield L.J., Saria E., Mooney E.E., Liu K., Dodge R.R.
Tissue heterogeneity of immunohistochemically detected estrogen receptor.
Am J Clin Pathol 110 (1998), 758-764

Lees A.W., Jenkins H.J., May C.L., Cherian G., Lam E.W., Hanson J.
Risk factors and 10-year breast cancer survival in northern Alberta.
Breast Cancer Res Treat 13 (1989), 143-151

Levi F., Randimbison L., Te V.C., La Vecchia C.
Incidence of breast cancer in women with fibroadenoma.
Int J Cancer 57 (1994), 681-683

Longatto Filho A., Bisi H., Alves V.A., Kanamura C.T., Oyafuso M.S.,
Bortolan J., Lombardo V.
Adenocarcinoma in females detected in serious effusions.
Cytomorphologic aspects and immunocytochemical reactivity to cytokeratins 7 and 20.
Acta Cytol 41 (1997), 961-971

Lundquist K., Kohler S., Rouse R.
Cytokeratin 7 and 20 expression in extramammary and mammary Paget's disease
and Toker cells.
ACJP Vol. 107 (1997), 334

Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R.
Biological and prognostic significance of stratified epithelial Cytokeratins in infiltrating ductal
breast carcinomas.
Virchows Arch 433 (1998), 119-129

Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R.
The Catalog of human Cytokeratins: Patterns of expression in Normal Epithelia,
Tumors and Cultured Cells.
Cell Vol 31 (1982), 11-24

Moll R., Krepler R., Franke W.W.
Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas.
Differentiation 23 (1983), 256-269

Moll R., Levy R., Czernobilsky B., Hohlweg-Majert P., Dallenbach-Hellweg G., Franke W.W.
Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract.
Lab Invest 49 (1983), 599-610

Moll R.
Differenzierungsprogramme des Epithels und ihre Änderungen.
Verh Dtsch Ges Path 72 (1988), 102-114

Moll R., Franke W.W.
Cytochemical cell typing of metastatic tumors according to their cytoskeletal proteins.
In: Biochemistry and molecular genetics of cancer metastasis
M Nijhoff Publishing, Boston, 1986, 101-114

Moll R.
Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors.
Veroff Pathol 142 (1993), 1-197

Nathrath W.
Morphologische und immunhistologische Untersuchung von Mammakarzinomen unter
besonderer Berücksichtigung von Cytokeratinen, im Vergleich zu anderen neoplastisch
veränderten und den normalen Epithelgeweben des Menschen.
Pathologisches Institut der Universität München, München, 1988, 22-76, 104-136

Nathrath W., Lane E.B.
Immunhistologische Untersuchung der Verteilung von Cytokeratinen in 100 Mammakarzinomen.
Verh Dtsch Ges Path 74 (1990), 596

Nathrath W., Lane E.B.
Patterns of keratin expression and differentiation of breast cancer.
In: Prospects in diagnosis and treatment of breast cancer.
Schmitt M., Graeff H., Kindermann G.
Elsevier Science B.V., 1994, 57-62

Nathrath W., Reiss B., Lane E.B.
Bedeutung verschiedener, insbesondere plattenepithelialer Keratinmuster in Mammakarzinomen.
Verh Dtsch Ges Path 78 (1994), 291

Perry A, Parisi JE, Kurtin PJ.
Metastatic adenocarcinoma to the brain: an immunohistochemical approach.
Hum Pathol 28 (1997), 938-943

Pitz S., Moll R., Störkel S., Thoenes W.
Expression of intermediate filament proteins in subtypes of renal cell carcinomas and in renal oncocytomas.
Lab Invest 56 (1987), 642-653

Prechtel K., Gehm O., Geiger G., Prechtel P.
The histology of mastopathy and cumulative ipsilateral breast cancer sequence.
Pathologie 15 (1994), 158-164

Purkis P.E., Steel J.B., Mackenzie I.C., Nathrath W., Leigh I.M., Lane E.B.
Antibody markers in basal cells in complex epithelia.
J Cell Sci (1990) 97, 39-50

Quinlan R.A., Schiller D.L., Hatzfeld M., Achtstätter T., Moll R., Jorcano J.L., Magin T.M., Franke W.W.
Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments.
Ann N Y Acad Sci 455 (1985), 282-306

Reiss B., Nathrath W., Lane D.P., Sundström B., Stigbrand T., Lane E.B.
Immunhistologische Verteilung von p53 und Keratinen in routinepräparierten Mammakarzinomen
Verh Dtsch Ges Path 77 (1993), 303

Riede U.-S.
Epidermodermales System.
In: Allgemeine und Spezielle Pathologie
Riede U.-S. und Schaefer H.-E.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1993, 926-961

Rosenberg L., Palmer J.R., Rao R.S., Zauber A.G., Strom B.L., Warshauer M.E., Harlap S., Shapiro S.

Case-control study of oral contraceptive use and risk of breast cancer.

Am J Epidemiol 143 (1996), 25-37

Russo J., Russo I.H.

Differentiation and breast cancer.

Medicina (B Aires) 57 Suppl 2 (1997), 81-91

Russo J., Russo I.H.

Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis.

Cancer Res 40 (1980), 2677-2687

Sauer, De Waal, Hölzel, Lutz, Mahl, Rauthe, Schmid, Schünemann, Sittek, Sommer, Stieber, Untch, von Rottkay

Nachsorge.

In: Empfehlungen zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinom

Tumorzentrum München (Hrsg.), 1998, 7. Aufl., 82-83

Schaller G., Fuchs I., Pritze W., Ebert A., Herbst H., Pantel K., Weitzel H., Lengyel E.
Elevated Keratin 18 Protein Expression Indicates a Favorite Prognosis in Patient with Breast Cancer.

Clin Cancer Res 2 (1996), 1879-1885

Schiebler, T.-H., Schneider F., Junqueira J.C., Carneiro J.

Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1991, 3. Aufl., 43-95, 412-437

Schüler G., Gutzwiller F.

Zur Epidemiologie des Brustkrebses.

Arch Gynecol Obstet 256 Suppl (1995), 104-115

Schreinemachers D.M., Everson R.B.

Aspirin use and lung, colon and breast cancer incidence in a prospective study.

Epidemiology 5 (1994), 138-146

Shimizu Y., Kato H., Schull W.J.

Risc of cancer among atomic bomb survivors.

J Radiat Res (Tokyo) 32 Suppl 2 (1991), 54-63

Sobin L.H.

Breast Tumours.

In: UICC: TNM Classification of Malignant Tumours.

Sobin L.H., Wittekind Ch.,

Wiley-Liss Verlag, New York-Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore -Toronto, 1997, Fifth Edition, 128-129

Stegner H.E.

Histopathologie der Mammatumoren - Licht- und elektronenmikroskopischer Atlas.

Enke Verlag, Stuttgart, 1986, 2-5

Stegner H.E.

Gynäkologie und Geburtshilfe.

Enke Verlag, Stuttgart, 1994, 5.Auflage, 283-342

Su L., Morgan P.R., Lane E.B.

Expression of cytokeratin messenger RNA versus protein in the normal mammary gland and in breast cancer.

Hum Pathol 27 (1996), 800-806

Taylor-Papadimitiou J., Stampfer M., Bartek J., Lewis A., Boshell M., Lane E.B., Leigh I.M.
Keratin Expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium.

J Cell Sci 94 (1989), 403-413

Tot T.

The role of cytokeratins 20 and 7 and estrogen receptor analysis in separation of metastatic lobular carcinoma of the breast and metastatic signet ring cell carcinoma of the gastrointestinal tract.

APMIS 108 (2000), 467-472

Walch A., Bink K., Gais P., Stangl S., Hutzler P., Aubele M., Mueller J., Höfler H., Werner M.
Evaluation of c-erbB-2 overexpression and Her-2/neu gene copy number heterogeneity in Barrett's adenocarcinoma.

Anal Cell Pathol 20 (2000), 25-32

Wellings S.R., Jensen H.M., Marcum R.G.

An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions.

J Natl Cancer Inst 55 (1975), 231-273

WHO

Histological typing of breast tumors.

International histological classification of tumors No.2.

Geneva, 1981, 2.ed.

Yuan D., Dawson P.J.

Relationship between histology, monoclonal antibody reactivity, and prognosis in breast cancer.

Hum Pathol 18 (1987), 1097-1100

7 Anhang

Verzeichnis der Bilder und Tabellen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Lebenslauf

Danksagung

Verzeichnis der Bilder und Tabellen

<u>Bilder</u>		Seite
Bild 1-1	Cytokeratin 7 Verteilung im menschlichen Körper („Keratinmensch“ nach Nathrath).....	11
Bild 2-1	Herkunftsklinikdes Untersuchungsmaterials	14
Bild 2-2	Altersverteilung der Patientinnen.....	15
Bild 2-3	Unterteilung nach pT	16
Bild 2-4	Unterteilung nach pN	16
Bild 2-5	Unterteilung nach pM	16
Bild 2-6	Das Grading erfolgte nach Bloom-Richardson.	17
Bild 2-7	Unterteilung des Patientenguts nach UICC (Sobin 1997 S.128-129)	17
Bild 2-8	Unterteilung nach Östrogenrezeptorstatus	18
Bild 2-9	Unterteilung nach Gestagenrezeptorstatus	18
Bild 2-10	Unterteilung nach Lokalisation	19
Bild 2-11	Unterteilung nach WHO-Klassifikation.....	19
Bild 2-12	Immunhistologisch für Keratin 7 gefärbter Gefrierschnitt eines invasiv duktalen Mammakarzinoms (AK: RPN-1162, ABC-PO-Methode, x 40 Objektiv)	24
Bild 2-13	Vermessung eines Exzidats.....	27
Bild 2-14	Auswahl eines geeigneten Meßmusters	27
Bild 2-15	Erzeugung von randomisierten Meßfeldern	27
Bild 2-16	Ausgangsbild mit heterogener Cytokeratin 7 Färbung.....	28
Bild 2-17	Die schwarz dargestellten Fläche ist die gesamte Karzinomzellfläche ATU, dargestellt durch die Tumorschwelle THT	29
Bild 2-18	Die nun schwarz dargestellten Flächen sind zusammengenommen die Cytokeratin 7 Markerfläche ATM, dargestellt durch die Markerschwelle THM	29
Bild 2-19	Annäherung des SQO an eine Konstante.	32

Bild 3-1	Beispiel für die Unterschiedlichkeit der Cytokeratin7 Expression. (a): Fall 007, (b): Fall008, (c): Fall 018, (d): Fall 011	34
Bild 3-2	Charakteristische Beispiele für Cytokeratin 7 Expression für verschiedene Tumorpräparate:(a): heterogen, invasiv duktal, (b): homogen, invasiv duktal, (c): homogen, invasiv lobulär.	35
Bild 3-3	Cytokeratingehalt aller Präparate einer Antikörperreihe (semiauto- matische Auswertung). (a):RPN-1162, (b):LP-1K, (c):LP-5K	36
Bild 3-4	Verteilung der Tumoren einer Antikörperreihe nach prozentualem Anteil Cytokeratin 7 exprimierender Zellen in einem Tumor. (a):RPN-1162, (b):LP-1K, (c):LP-5K	37
Bild 3-5	Korrelation der AK-Färbungen nach der semiautomatischen Methode. (a):RPN-1162 / LP-1K, (b):RPN-1162 / LP-5K, (c):LP-1K / LP-5K	38
Bild 3-6	Korrelation der AK-Färbungen untereinander nach der visuellen Methode (a):RPN-1162 / LP-1K, (b):RPN-1162 / LP-5K, (c):LP-5K / LP-1K	39
Bild 3-7	Korrelation zwischen semiautomatischer Messung und visueller Schätzung. (a): RPN-1162, (b): LP-1K, (c): LP-5K	40
Bild 3-8	Vergleich der "Hot-spots" mit visuellen Schätzungen. (a): RPN-1162, (b): LP-1K, (c): LP-5K	42
Bild 3-9	Vergleich der "Hot-spots" mit der semiautomatischen Messung. (a): RPN-1162 (b): LP-1K, (c): LP-5K	43
Bild 3-10	Korrelation zwischen Überlebenszeit und verschiedenen Parametern. (a): pT, (b): pN, (c): pM, (d): Stadium, (e): Grading, (f): Östrogenrezeptorstatus, (g): Gestagenrezeptorstatus.	46
Bild 3-11	Korrelation zwischen krankheitsfreiem Intervall und verschiedenen Parametern. (a): pT, (b): pN, (c): pM, (d): Stadium, (e): Grading, (f): Östrogenrezeptorstatus, (g): Gestagenrezeptorstatus.	48
Bild 3-12	Zusammenhang zwischen krankheitsfreiem Intervall und LP-5 -,hot-spots".	50
Bild 3-13	Restüberlebenszeit in Abhängigkeit von LP-1K mit Cutpoint 50 %.	51

<u>Tabellen</u>	Seite
Tabelle 2-1 Follow up	20
Tabelle 2-2 Herkunft der Antikörper	22
Tabelle 2-3 Streuung von THT	30
Tabelle 2-4 Streuung von THM	31
Tabelle 3-1 Statistische Ergebnisse der semiautomatischen Messung.....	36
Tabelle 3-2 Statistische Ergebnisse der visuellen Messung	37
Tabelle 3-3 t-Test Ergebnisse RPNvis gegen Alter.....	44
Tabelle 3-4 t-Test Ergebnisse 1Kvis gegen Östrogenrezeptorstatus	44
Tabelle 3-5 Signifikante Ergebnisse zwischen Lektin VVA und SQO	45
Tabelle 3-6 Signifikante Ergebnisse zwischen Lektin JAC und SQO	45
Tabelle 3-7 p-Werte des log-rank-Test für klinische Daten mit Survival	46
Tabelle 3-8 p-Werte des log-rank-Test für klinische Daten mit krankheitsfreiem Intervall	48

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
AMK	durch Bildanalyse gemessene immunhistochemisch markierte Cytokeratin 7 Fläche
AMP	prozentual markierte Tumorfläche in einem Meßfeld
ATU	durch Bildanalyse gemessene Tumorfläche
CK	Cytokeratin(e)
CK-7	Cytokeratin 7
CV	Variationskoeffizient
ER	Östrogenrezeptor
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg
HPA	Helix Pomatia-Agglutinin
JAC	Lektin
MG	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
N	Anzahl von Ergebnissen, Patientinnen, etc.
NOS	not otherwise specified
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PKK	Pearson´s Korrelationskoeffizient
PR	Progesteronrezeptor
SQO	Summenquotient
Stand.abw.	Standardabweichung
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
THM	verwendete Grauwertgrenze (Schwelle) für markierte Tumorfläche
THT	verwendete Grauwertgrenze (Schwelle) für Tumorfläche
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Var.koef.	Variationskoeffizient
Vis	visuell
VVA	Lektin
WHO	World Health Organization

Lebenslauf von Michael Röhl

Persönliche Daten

Geboren: 19.10.1971 in München-Pasing

Eltern: Prof. Gerhard Röhl
Margot Röhl

Familienstand: ledig

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschule Gröbenzell
1982 – 1991 Gymnasium Puchheim
Abitur: Juni 1991
Leistungsfächer: Mathematik, Geschichte

Studium

1991 – 1993 Medizinstudium an der Universität Regensburg
1993 – 1998 Medizinstudium an der TU-München

Physikum: 13.09.1993

1. Staatsexamen: 25.08.1994

Famulaturen: 01.04. – 30.04.1994 KKH Pasing, Abteilung für Innere Medizin
01.10. – 31.10.1994 Gemeinschaftspraxis Dr. Wimmer, Dr. Tittus
01.04. – 30.04.1995 Dermatologische Klinik Biederstein
01.04. – 30.04.1996 Gemeinschaftspraxis Prof. Dr. Krüger, Dr. Kreuzer

2. Staatsexamen: 09.04.1997

Praktisches Jahr: 28.04.1997 – 27.03.1998
1. Tertial: Innere Medizin im KKH Pasing
2. Tertial: Chirurgie im KKH Pasing
3. Tertial: HNO im Klinikum Rechts der Isar

3. Staatsexamen: 04.05.1998

Berufliche Tätigkeiten

AIP: 01.06.1998 – 30.11.1999, Kreisklinik Fürstenfeldbruck

Approbation: 06.12.1999

Assistenzarzt: Seit 01.01.2000, Kreisklinik Fürstenfeldbruck

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Nathrath für seine große Geduld danken. Ohne seine Motivation und sein Vertrauen in meine Arbeit wäre die Fertigstellung wohl nicht möglich gewesen.

Ebenso großer Dank gebührt den Mitarbeitern der GSF-Neuherberg, insbesondere Frau Jütting, Herrn Gais und Herrn Rodenacker für die Beratung und Unterstützung im statistischen, mathematischen und technischen Bereich.

Die Erstellung des follow-up über einen Betrachtungszeitraum von teilweise mehr als 15 Jahren wäre ohne die Hilfe der Gynäkologischen Abteilung der Universitätsklinik Großhadern, der Maria- Theresia-Klinik und der Chirurgischen Abteilung der Innenstadtkliniken München der LMU nicht möglich gewesen.

Dafür gebührt den Herren Direktoren dieser Kliniken, Prof. Dr. Hepp, Prof. Dr. Schaudig und Prof. Dr. Schweiberer besonderer Dank.

Auch den zahlreichen Hausärzten, die mir Material für meine Recherchen geliefert haben, sei an diese Stelle herzlich gedankt.

Abschließend danke ich Herrn Decker und Herrn Wälzel von ESION GmbH für die Unterstützung bei der Bearbeitung des Bildmaterials.