

**Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)**

**Immunhistochemische Klassifizierung einer partiellen
neuroendokrinen Differenzierung des Adenokarzinoms des
Magens**

Eva Gutdeutsch

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. apl. Prof. Dr. Dr. L. Lehr

2. Univ.- Prof. Dr. J. R. Siewert

Die Dissertation wurde am 26.08.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 28.05.2003 angenommen.

1	EINLEITUNG	1
2	FRAGESTELLUNG	3
3	GRUNDLAGEN	4
4	MATERIAL UND METHODIK	7
4.1	Einschlusskriterien	7
4.2	Ausschlusskriterien	7
4.3	Immunhistochemische Marker	8
4.4	Digitale Bildanalyse	9
4.4.1	Technische Grundlagen	9
4.4.2	Voraussetzungen	10
4.5	Statistik	10
5	UNTERSUCHUNGSVERLAUF	11
5.1	Voruntersuchung	12
5.1.1	Chromogranin A	12
5.1.2	Synaptophysin	12
5.2	Auswertung	13
5.3	Problematik von Chromogranin A	13
6	ERGEBNISSE	15
6.1	Allgemeine Patientendaten	15
6.1.1	Tumorlokalisierung	15
6.1.2	Stadienverteilung	15
6.1.3	Typen nach Lauren	16
6.1.4	Überlebensdaten	17
6.1.4.1	Frauen und Männer	17
6.1.4.2	Altersverteilung	17
6.1.4.3	Tumorlokalisierung	18
6.1.4.4	Histologischer Tumortyp nach Lauren	19
6.1.4.5	Tumorstadium und Lymphknotenstatus	19
6.2	Markerergebnisse allgemein	21
6.2.1	Chromogranin A	22
6.2.2	Synaptophysin	23
6.3	Markerergebnisse im Einzelnen	23
6.3.1	Verteilung auf Frauen und Männer	23
6.3.2	Altersverteilung	25
6.3.3	Verteilung auf die Tumorlokalisierung	27
6.3.4	Verteilung auf die Tumorstadien	30
6.3.5	Verteilung auf die Laurentypen	33
6.3.6	Überlebensdaten	35
7	DISKUSSION	37
7.1	Material und Methodik	37
7.1.1	Einschlusskriterien	37
7.1.2	Chromogranin A	39
7.1.3	Synaptophysin (P 38)	40
7.1.4	Auswertung	41
7.2	Allgemeine Patientendaten	41
7.3	Markerergebnisse allgemein	43
7.3.1	Chromogranin A	43
7.3.2	Synaptophysin	44
7.3.3	Voruntersuchung	44
7.4	Markerergebnisse im Einzelnen	45
7.4.1	Frauen und Männer	45

7.4.2	Tumorlokalisation.....	45
7.4.3	Tumorstadien.....	46
7.4.4	Laurenklassifikation.....	46
7.4.5	Überlebenszeit.....	47
7.5	Ursprung der neuroendokrinen Zellen in Adenokarzinomen.....	48
7.6	Ausblick.....	50
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	52
9	ANHANG.....	53
9.1	Färbung durch Chromogranin A und Synaptophysin:.....	53
9.2	Erläuterungen.....	54
9.3	Abkürzungen.....	55
10	LITERATUR.....	56
11	LEBENS LAUF.....	60
12	DANKSAGUNG.....	61

1 EINLEITUNG

Das Magenkarzinom ist nach dem kolorektalen Karzinom eines der häufigsten Neoplasmen des Gastrointestinaltraktes.

Insgesamt ist es in Deutschland bei Frauen das häufigste Karzinom nach Neubildungen der Mammae, des Dickdarms, der Lunge und des Pankreas und bei Männern das häufigste nach Tumoren der Lunge, der Prostata, des Dickdarms, des Ösophagus und der ableitenden Harnorgane (57).

In den westlichen Industrieländern ist die Inzidenz des Magenkarzinoms in den letzten Jahren gesunken, wohingegen in Japan und China immer noch ein besonders zahlreiches Auftreten zu beobachten ist (3).

Auf Grund der hohen Inzidenzrate hat man in Japan in den sechziger Jahren begonnen, die Bevölkerung systematisch auf Magenkarzinome zu untersuchen. Dadurch werden dort immer häufiger Magenfrühkarzinome entdeckt, die inzwischen das fortgeschrittene Magenkarzinom in der Operationshäufigkeit überholt haben (41).

Innerhalb des Magens kann eine Vielzahl unterschiedlicher Tumoren auftreten. Neben den Adenokarzinomen, die mit 90% die häufigste Entität sind, gibt es auch Sarkome, Lymphome, Gefäßtumore, Metastasen und neuroendokrine Tumore.

Ein neuroendokriner Tumor geht von Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems aus und kann überall dort entstehen, wo neuroendokrine Zellen physiologischerweise existieren (32;59).

Eine häufig verwendete Unterteilung des Adenokarzinoms des Magens in histologische Subtypen ist die Einteilung nach Lauren, anhand morphologischer Kriterien, in einen intestinalen und einen diffusen Typ (35). Einige Tumoren lassen sich nicht auf diese beiden Typen festlegen und werden als sogenannter Mischtyp bezeichnet. Die Einteilung nach Lauren wird von einigen Autoren als prognostisch relevant herausgestellt. So soll der diffuse Typ nach Lauren zum Teil eine schlechtere Prognose haben als der intestinale (35). Dieses konnte in der 1992 durchgeführten Deutschen Magenkarzinomstudie bei radikalem Resektionsausmaß nicht bestätigt werden. (51)

In Adenokarzinomen des Magens können auch neuroendokrine Tumorzellen nachgewiesen werden. Sie kommen im intestinalen ebenso wie im diffusen Typ nach Lauren vor. In einigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Anteil der neuroendokrinen Zellen in Tumoren des diffusen Typs deutlich größer ist als in Tumoren des intestinalen Typs (35;42).

Die zur Verfügung stehenden immunhistochemischen Marker, z. B.: neuronenspezifische Enolase, Chromogranin A, B und C oder Synaptophysin (5), ermöglichen es, neuroendokrine Zellen zuverlässig darzustellen und auszuwerten. Inzwischen ist die Verwendung dieser Marker die am weitesten verbreitete Methode für den histologischen Nachweis von neuroendokrinen Tumoren (5).

Bei den früher üblichen argentaffinen und argyrophilen Färbemethoden (4), durch die auch neuroendokrine Zellen dargestellt werden können, war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse häufig nicht gegeben oder es kam zu falsch positiven Befunden (1;15;38;40).

Für Adenokarzinome des Kolons konnte eine Aussage über die prognostische Relevanz des Auftretens von neuroendokrinen Zellen im Tumor gemacht werden (18;26):

Hamada et al. untersuchten kolorektale Adenokarzinome mit Chromogranin A auf zusätzliche neuroendokrine Differenzierung. Hierbei wiesen Patienten mit zahlreichen neuroendokrinen Tumorzellen eine schlechtere Prognose auf als Patienten ohne. Es war kein prognostischer Unterschied zwischen Patienten mit nur wenigen neuroendokrinen Zellen im Tumor und solchen die überhaupt keine neuroendokrine Subpopulation hatten (26).

Auch de Bruine bestätigt diese Ergebnisse für Kolontumoren. Er fand eine schlechtere Prognose bei Patienten mit rein neuroendokrinen Tumoren des Kolons. Allerdings hatten Adenokarzinome die eine Subpopulation neuroendokriner Zellen aufwiesen unabhängig vom prozentualen Anteil am Gesamttumor eine schlechtere Prognose als reine Adenokarzinome (18).

Bei Patienten mit Magenadenokarzinomen ließ sich eine derartige Feststellung bisher nicht machen (61). Als Einziger hat Radi in einer Untersuchung von 15 Magenkarzinomen bei jüngeren Patienten (unter 40 Jahren) beobachtet, dass die Untergruppe mit positiven endokrinen Markern im Tumor die Tendenz eines längeren Überlebens aufwies (49). Davon abgesehen gibt es in der bisherigen Literatur keinerlei Angaben bzw. Untersuchungen, die eine Aussage hinsichtlich der Prognose von Adenokarzinomen des Magens mit neuroendokriner Differenzierung machen können.

In dieser Untersuchung wird ein Patientenkollektiv mit Adenokarzinomen des Magens anhand immunohistochemischer Untersuchungen auf eventuell vorhandene neuroendokrine Differenzierung untersucht. Im Folgenden wird gezeigt, ob diese Subpopulation, wenn eine solche existiert, eine unterschiedliche Prognose aufweist und ob es Abhängigkeiten hinsichtlich histopathologischer und anatomischer Kriterien gibt. Im Zuge der Ergebnisse könnten sich veränderte Indikationsstellungen für adjuvante und neoadjuvante Therapiekonzepte ergeben.

2 FRAGESTELLUNG

Folgende Fragestellungen sollen durch die Arbeit geklärt werden:

- Wie groß ist der Anteil einer neuroendokrinen Differenzierung in einer Patientengruppe mit Adenokarzinomen des Magens?
- Gibt es in einer solchen Untergruppe eine Korrelation zu histopathologischen und anatomischen Kriterien innerhalb des Magens?
- Hat eine neuroendokrine Subpopulation in einem Adenokarzinom des Magens einen Einfluss auf die Prognose des Patienten?

3 GRUNDLAGEN

Äthiologie:

Es werden verschiedene Risikofaktoren, die die Entwicklung eines Magenkarzinoms begünstigen können diskutiert:

Dazu gehören eine chronisch atrophische Gastritis Typ A, eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, auf dessen Boden sich häufig eine Typ B Gastritis entwickelt (27;55), Blutgruppe A (2), hyperplastische Magenpolypen und genetische Faktoren wie beispielsweise der Nachweis von Mutationen des K-ras Onkogenes (19). Patienten können aufgrund ihrer nationalen Herkunft zu einer Risikogruppe gehören. In Ländern wie China oder Japan ist beispielsweise die Inzidenz des Magenkarzinoms besonders hoch (9;41).

Andererseits scheint beispielsweise eine hoher Genuss an Zwiebeln (20) oder das regelmäßige Trinken grünen Tees (30) einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines Magenkarzinomes zu haben.

Epidemiologie:

In den westlichen Ländern ist die Inzidenz des Magenkarzinoms in den letzten Jahren rückläufig (3).

In Japan erkranken die Patienten im Schnitt etwas früher an einem Magenkarzinom und haben bei Diagnose auch häufiger schon einen fortgeschrittenen Tumor, als beispielsweise in Deutschland und in den Niederlanden. Allerdings haben sie trotzdem keine schlechtere Prognose, sondern im Vergleich zu deutschen und niederländischen Patienten noch ein statistisch längeres Überleben, was möglicher Weise an den intensiven therapeutischen Versuchen, inklusive radikaler chirurgischer Resektion liegt (9).

Prognose:

In Abhängigkeit des Resektionsausmaßes der Operation bestehen große Unterschiede hinsichtlich der Prognose des einzelnen Patienten. Patienten mit einer R0-Resektion (kein mikroskopischer oder makroskopischer Tumorrest nach der Operation) haben gegenüber einer R1-(mikroskopischer Residualtumor) oder R2-(makroskopischer Residualtumor) Resektion ein deutlich besseres Überleben (47).

Im Rahmen der Deutschen Magenkarzinom Studie betrug die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer R0-Resektion 47,8 % (51).

Undifferenzierte Magenkarzinome prädisponieren bei einem schon fortgeschrittenem Primärtumor für peritoneale Rezidive (37). Die Rezidivrate ist deutlich niedriger, wenn der Primärtumor noch auf Mukosa und Submukosa beschränkt ist (37).

Histologie:

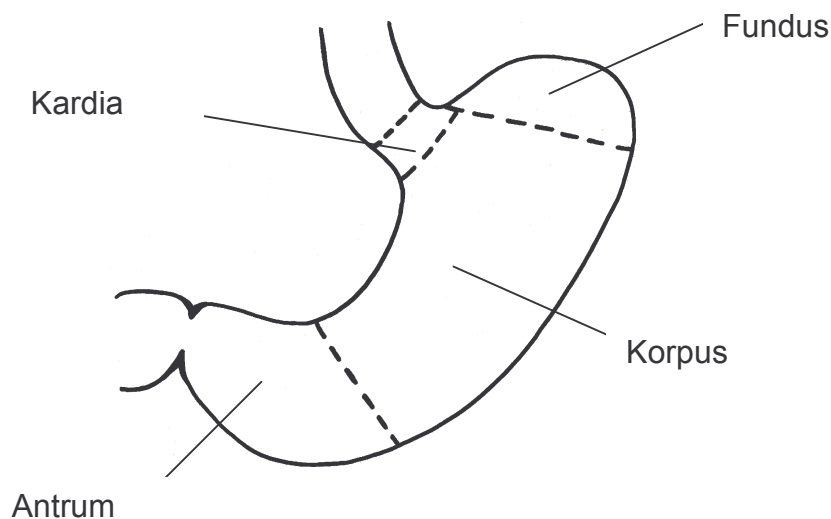
Die mikroskopische Einteilung der Magenadenokarzinome nach Lauren in intestinalen, diffusen oder Mischtyp beruht auf morphologischen Gesichtspunkten. Der intestinale Typ hat seinen Namen von der morphologischen Ähnlichkeit seiner Strukturen mit denen des Intestinums. Makroskopisch ist er zumeist klar begrenzt. Der diffuse Typ zeigt wenig Variationen innerhalb seiner zellulären Strukturen und enthält nur gelegentlich Drüsenreste. Sein Wachstum ist vor allem diffus im Stroma des Magens. Dadurch kann er sich unbemerkt in der Magenwand ausbreiten, ohne makroskopisch erkennbar zu sein (33;60).

Es existieren auch makroskopische Tumoreinteilungen, z.B. nach Ming. Diese Einteilung berücksichtigt in erster Linie das Wachstumsverhalten der Karzinome. Es wird unterschieden zwischen einem expandierend wachsenden Karzinom und einem infiltrativ wachsenden Karzinom (39).

Die Magenschleimhaut setzt sich aus einer Vielzahl von Zelltypen mit spezifischen Aufgaben zusammen. Durch die unterschiedlichen Zellen wird die Hauptfunktion der Magenschleimhaut, die Sekretion von Verdauungsenzymen und die Produktion von Salzsäure, gewährleistet. Die Belegzellen produzieren Säure, die Hauptzellen Pepsinogen. Die Nebenzellen, ebenso wie die Oberflächenepithelzellen, produzieren Schleim. Die Magenschleimhaut enthält auch enteroendokrine Zellen und Stammzellen. Letztere sind für die Regeneration des Epithels verantwortlich. Die Beanspruchung und Schädigung des Epithels, beispielsweise bei einer Gastritis, führt zu einer Vermehrung und Aktivitätssteigerung der Stammzellen (57).

Die Zellen sind im Magen als Drüsen angeordnet. Dadurch wird die funktionelle Oberfläche stark vergrößert.

Der Magen wird in unterschiedliche Regionen eingeteilt:



Endokrine Zellen findet man beispielsweise in den Drüsengründen des Magenfundus. Im Bereich des Korpus sind sie vereinzelt in Drüsenschläuchen und im Pylorus gehäuft in den Drüsenhälsen vorhanden. Auch die Schleimhaut des übrigen Gastrointestinaltraktes enthält physiologisch eine Vielzahl endokriner Zellen (57). Die Zusammensetzung und das Vorkommen variieren in den unterschiedlichen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes.

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann man die neuroendokrinen Zellen genauer differenzieren. Im Magen werden damit Zellen unterschieden, die Serotonin, Gastrin, Somatostatin, ein bombesinähnliches Peptid oder ein vasoaktives Peptid (VIP) bilden und sezernieren (57).

Einteilung der Tumoren mit neuroendokrinen Zellen:

Neben dem physiologischen Auftreten von neuroendokrinen Zellen im Magen, gibt es verschiedene Arten von Magentumoren, die neuroendokrine Zellen enthalten können. Deren Einteilung ist weitgehend uneinheitlich.

In folgenden Tumoren sind bisher neuroendokrine Zellen nachgewiesen worden:

1. Rein **neuroendokrine** Tumoren.

Nach Capella et al. (14) werden sie unterschieden in:

- a) *benigne oder gering maligne Tumoren* (= typische Karzinoide und hormonell aktive, gut differenzierte Tumore, mit guter Prognose)
- b) *geringgradig maligne Tumoren* (= atypische Karzinoide, d.h. nicht funktionell aktiv, und funktionell aktive, gut differenzierte Karzinome)
- c) *hochmaligne Tumoren* (= neuroendokrine, kleinzellige Tumoren, mit sehr schlechter Prognose)

Diese rein neuroendokrinen Tumoren können auch wenige, nicht neuroendokrine Zellen bzw. adenokarzinomatöse Areale im Tumorrandbereich enthalten (38).

2. **Adenokarzinome** des Magens, die eine neuroendokrine Subpopulation enthalten (7;46). Dabei ist zu berücksichtigen, dass in den einzelnen Adenokarzinomzellen jeweils neuroendokrine Strukturelemente existieren.

3. Tumoren, die als **Mischtumoren** aus einem Karzinom und einem Karzinoid zu bestehen scheinen und sich weiter unterteilen lassen in:

- a) "*Composite Tumors*" (32;59;64): ein Ursprungstumor und dann zwei Differenzierungen, da im Primärtumor und in den Metastasen beide Komponenten gefunden wurden.
Entstehungstheorie: Der Tumor entsteht aus einer einzigen Stammzelle, die zwei verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten hat.
- b) "*Collision Type Tumors*" (16;65) Entstehungstheorie: Ein Nebeneinander von zwei unterschiedlichen Tumoren (ein mäßig differenziertes Adenokarzinom mit wenigen neuroendokrinen Zellen und ein schlecht differenzierter Tumor mit neuroendokriner Differenzierung), die am gleichen Ort entstanden sind, Ausgang des Tumors jeweils von einer Zelle.

Die Unterscheidung von einem Composite Tumor zu einem Collision Type Tumors fällt oft sehr schwer (16;59).

4. Zuletzt können neuroendokrine Zellen auch in gemischt **endokrin-exokrinen Neoplasmen** (amphikrinen Tumoren) auftreten (16).

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 *Einschlusskriterien*

Nur durch ein weitgehend homogenes Patientenkollektiv können die einzelnen Fragestellungen zufriedenstellend beurteilt werden.

Aus diesem Grund wurde unser Patientenkollektiv nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Histologischer Typ

Es wurden nur Tumoren des intestinalen oder des diffusen Types nach Lauren ausgewählt.

Stadium

Es wurden nur Patienten ohne Fernmetastasen (M0) in die Untersuchung aufgenommen. Diese hatten alle ein Tumorstadium Ib, II oder III, nach der TNM Klassifikation des Jahres 1997.

Histopathologisches Grading

Alle ausgewählten Tumoren waren schlecht differenziert (G3).

Tumorlokalisation

Die Tumoren mussten alle innerhalb des Magens lokalisiert sein und wurden dann folgendermaßen unterteilt:

Das proximale Drittel des Magens enthält Tumoren des Kardia- und Fundusbereiches.

Das mittlere Drittel besteht aus Magentumoren, die zum überwiegenden Teil im Korpus lokalisiert sind.

Das distale Drittel Tumoren der Antrumregion.

Hat ein Tumor eine Ausbreitung in mehreren Regionen, so wird er zu dem Drittel gerechnet, in dem seine Haupttumormasse lokalisiert ist.

Operationszeitpunkt

Es wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die in den Jahren 1992 bis 1996 operiert wurden. Die jüngsten Operationstermine lagen damit zum Zeitpunkt der Untersuchung vier Jahre zurück.

Resektion, Fernmetastasen

Die eingeschlossenen Patienten waren nach der Tumoresektion sowohl lokal, als auch systemisch tumorfrei.

4.2 *Ausschlusskriterien*

Aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden alle Patienten, die zwar den Einschlusskriterien unter 4.1 entsprachen, jedoch zusätzlich vor oder nach der Operation eine Chemotherapie bekamen (keine zusätzliche palliative, adjuvante oder neoadjuvante Therapie).

4.3 Immunhistochemische Marker

Chromogranin A und Synaptophysin

Unter der Vielzahl immunhistochemischer Marker musste eine für das Patientenkollektiv passende Auswahl getroffen werden. Die Auswahl fiel auf Chromogranin A und Synaptophysin. Zwei Marker, die sich einerseits gut ergänzen und andererseits jederzeit in die klinische Routinediagnostik übernommen werden können.

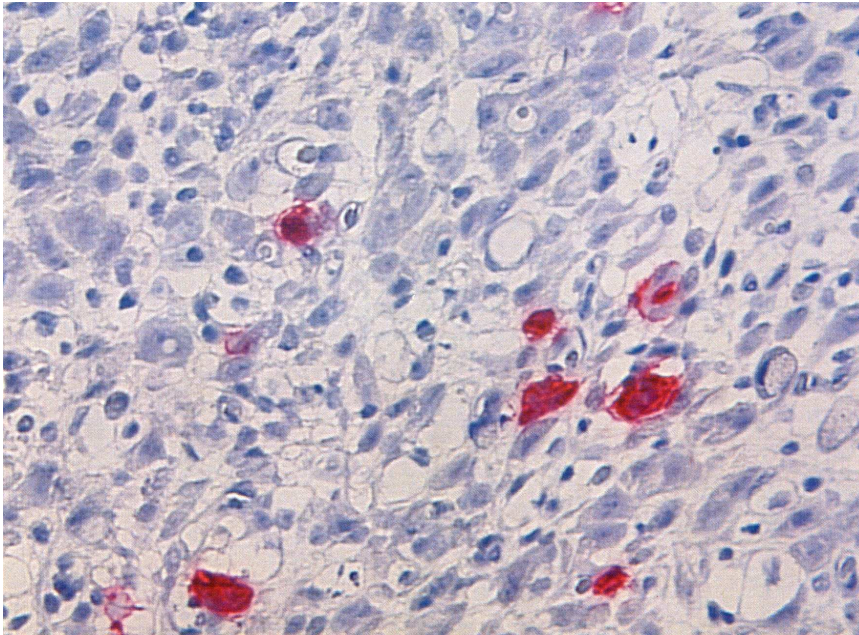


Abbildung 4-1 mit Chromogranin A angefärbte neuroendokrine Zellen (rot imponierend) innerhalb eines Adenokarzinoms des Magens

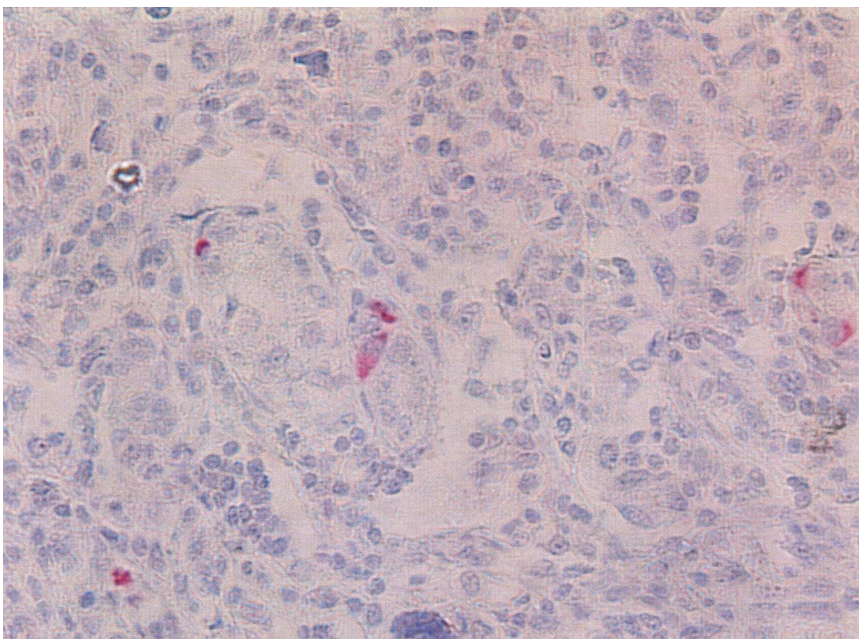


Abbildung 4-2: mit Synaptophysin angefärbte neuroendokrine Zellen innerhalb eines Adenokarzinoms des Magens stellen sich blaßrot dar

4.4 Digitale Bildanalyse

4.4.1 Technische Grundlagen

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgt an einem digitalen Bildanalyse-System der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) in Neuherberg.

Das dafür verwendete Computerprogramm „Xafer“ (Gais/GSF) wurde dort entwickelt. Die Präparate werden mit einem Leitz Orthoplan Mikroskop (Firma Leica, Bensheim, Deutschland) unter dem 25x Objektiv mit numerischer Apertur 0.55 und einem daran angeschlossenen digitalen Bildanalyse-System „SAMBA“ (Systeme d' Analyses Microscopiques a Balayage Automatique, Firma UNILOG, Meylan, Frankreich) ausgewertet. Das dies unterstützende Computerprogramm „Xafer“ (Gais/GSF) ermöglicht eine Auswertung des Tumors und der histochemisch angefärbten Tumorbereiche bezüglich ihrer Fläche in einzelnen Bildpunkten. Die Messfelder werden 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 sind:

+ die Tumorfläche in Bildpunkten (ATU)

+ die markierte Tumorfläche in Bildpunkten (AMK) (= für die einzelnen Färbungen positive Bereiche des Tumors)

Aus diesen Werten errechnet sich die prozentual markierte Tumorfläche des Gesamttumors und der Summenquotient aus der Summe aller gemessenen, markierten Tumorflächen, dividiert durch die Summe aller bereits gemessenen Tumorflächen (SQO).

Zur Kontrolle werden die Grauwertgrenzen für den gesamten Tumorbereich (THT) und die markierten Tumorflächen (THM) bei jeder Messung abgespeichert. Durch zwei Farbauszüge, grün für die Tumorfläche, blau für die markierten Tumorflächen, werden hierbei die zu messenden Bereiche segmentiert. Eine Darstellung des Summenquotienten der beiden Messwerte - "markierte Tumorfläche (AMK) zur gesamten Tumorfläche (ATU)" - auf dem Monitorschirm während der Messung ermöglicht ein definiertes Beenden der Messung nach Erreichen eines stabilen Summenquotienten (SQO) oder nach einer bestimmten Anzahl von Messungen. Alle Bilder werden zusätzlich als Dokumentation digital abgespeichert.

4.4.2 Voraussetzungen

Für die Auswertung mit dem digitalen Bildanalysesystem müssen die Präparate bestimmte Voraussetzungen erfüllen:

1. Die verwendeten Präparate müssen sehr sauber sein. Sonst können falsch positive Areale bei der Markermessung auftreten. Verunreinigungen werden beispielsweise bedingt durch Flecken, Luftpinschlüsse, Staubpartikel, Stiftmarkierungen oder können durch Kleberrest entstehen. Sind Verschmutzungen an einem Präparat vorhanden, müssen diese durch Anpassungen der am Beginn einer jeden Messung eingestellten Marker- und Tumormarkierungen korrigiert werden. Das Präparat muss vor der Auswertung sorgfältig gesäubert werden.
2. Eine ungefähre Schnittdicke von zwei μm ist notwendig, damit nur eine Zellschicht auf dem Objektträger liegt. Das Präparat muss eine gewisse Regelmäßigkeit haben. Areale, in denen Verkalkungen oder Nahtreste vorhanden sind, ergeben falsch positive Ergebnisse und sind dadurch nicht auswertbar. Auch wenn die Helligkeit des Präparates sich ändert, muss die Blende nachkorrigiert werden, da sonst zu viele falsch positive Markergebiete entstehen. Damit wäre nicht mehr die gleiche Einstellung bei jedem Tumorpräparat gegeben.
3. Das Tumorareal muss ausreichend groß sein, damit von jedem Präparat 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet werden können.

Es ist von entscheidender Bedeutung, dass der jeweils verwendete Marker nur die betroffenen Zellen färbt und keine anderen Gewebe oder Strukturen. Beispielsweise färbt die neuronenspezifische Enolase auch Zellen des Interstitiums, die keine Tumorzellen sind. Diese Strukturen würden dann in der Messung als positive Areale gewertet werden und als falsch positive Bereiche mit in die Auswertung eingehen.

4.5 Statistik

Das nach den Einschlusskriterien verfügbare Patientenmaterial entsprach 53 Patienten.

Von jedem Präparat, wurden 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder innerhalb des Tumors ausgewertet. Das verwendete Computerprogramm „Xafer“ errechnet nach jeder Messung den Summenquotienten des gerade gemessenen Präparates für die positiven Tumorzellen. Bei einer ausreichend großen Anzahl von Messungen ändert sich dieser Quotient nur mehr sehr geringfügig, was als Maßstab für eine ausreichende Anzahl von Messungen gewertet wird.

Im Rahmen der Voruntersuchung (siehe Untersuchungsverlauf 5.1) stellte sich eine Messung von 20 Gesichtsfeldern pro Präparate als ausreichend heraus. Es zeigte sich, dass diese Anzahl von Gesichtsfeldern groß genug ist, sodass sich der Summenquotient kaum oder nur mehr sehr geringfügig ändert.

Für die Auswertung der erhobenen Daten, wurde der χ^2 Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Die Auswertung der Überlebenszeiten erfolgt anhand von Kaplan-Meier-Kurven.

5 UNTERSUCHUNGSVERLAUF

Über die Tumordokumentation der chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, werden mit dem Computerprogramm „Medos“, gemäß den Einschlusskriterien, alle Magenkarzinompatienten der Jahre 1992-1996 festgestellt. Von 53 Patienten ist ausreichendes Tumormaterial vorhanden, um sie in die Studie aufnehmen zu können. Anschließend werden die histologischen Daten der einzelnen Patienten mit Hilfe der Pathologiebefunde überprüft. Ist bei einem Tumor kein eindeutiger Differenzierungsgrad zu erkennen, so wird die am geringsten differenzierte Region im Tumor genommen.

Von den mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumoren werden zunächst die Hämatoxylin-Eosin-Schnitte der einzelnen Blöcke im Lichtmikroskop betrachtet. Jeweils zwei repräsentative Blöcke werden ausgewählt, mit denen in der Folge gearbeitet wird.

Am Rotationsmikrotom werden von den Paraffinblöcken eines jeden Patienten vier Schnitte mit einer Dicke von zwei μm angefertigt. Je einer für die Färbung mit Chromogranin A und Synaptophysin, die beiden anderen als Reserve, sollte eine Färbung nicht angehen oder ein Präparat unbrauchbar sein.

Anschließend werden die Schnitte in ein Warmwasserbad (47°C) gelegt, damit sie sich gut entfalten können, bevor sie auf silanisierte Objektträger aufgezogen und festgeklebt werden. Dieser Kleber (Zusammensetzung: Ponal[®] + destilliertes Wasser) ist besonders bei Präparaten des Gastrointestinaltraktes von Bedeutung, die immunhistochemisch gefärbt werden. Während des Färbevorgangs kann es ansonsten passieren, dass die Fettzellen, die sich beim Erhitzen dehnen und dadurch etwas vom Objektträger lösen, das umgebende Stroma mit vom Träger lösen und dass damit das Präparat unbrauchbar wird.

Nach dem Trocknen an der Luft kommen die Präparate für einen Tag in einen Brutschrank bei 37°C .

Die immunhistochemische Färbung mit Chromogranin A und Synaptophysin erfolgt maschinell. Die Antikörper für Chromogranin A werden von Boehringer Ingelheim bezogen, die Antikörper für Synaptophysin stammen von Dako, Dänemark.

Unter dem Mikroskop werden anschließend alle Präparate nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

- Ist der Marker angegangen? Die Kontrolle erfolgt immer in Arealen auf dem Präparat, in denen gesundes Magengewebe enthalten ist, da dort physiologisch neuroendokrine Zellen vorkommen und sich durch Chromogranin A anfärben lassen (23).
- Ist das Präparat geeignet für eine digitale Bildanalyse? (siehe Kriterien unter Material und Methodik)

Dann erfolgt in einem repräsentativen Areal des Tumors eine Markierung mit Rotstift, um innerhalb dieser Grenzen die prozentuale Menge des Markers am Gesamttumor mit Hilfe des digitalen Bildanalyse-Systems zu bestimmen.

5.1 Voruntersuchung

Um feststellen zu können, ob die Vorgehensweise -wie oben beschrieben- akzeptabel ist, und um Unstimmig- oder Ungenauigkeiten zu finden, werden zunächst in einer Voruntersuchung 15 Patienten untersucht.

Die Gruppe enthält zehn Patienten mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ und fünf Patienten mit einem Magenkarzinom vom diffusen Typ nach Lauren. Von den Patienten sind zehn männlich und fünf weiblich; alle befinden sich in der Altersgruppe von 42 bis 83 Jahren.

Insgesamt sind acht der 15 Tumoren für einen der immunhistochemischen Marker positiv. Davon sind sechs Tumoren für Chromogranin A und Synaptophysin positiv. Ein Fall ist nur für Chromogranin A, ein anderer nur für Synaptophysin positiv. Sieben Fälle sind für beide Marker negativ.

5.1.1 Chromogranin A

Sieben der 15 untersuchten Präparate sind für Chromogranin A positiv (46,7 %). Eine semiquantitative Dreiteilung der Chromogranin-A-positiven Gruppe in negativ/ schwach positiv/ stark positiv lässt sich nicht erkennen. Die Verteilung der positiven Zellen ist in zwei Tumoren gleich stark und die Anzahl der positiven Tumorzellen dort mit 5% größer als in den übrigen fünf Tumoren, die mit im Durchschnitt 1 % positiver Tumorfläche schwächer positiv sind. Allerdings ist der Unterschied zwischen 1% und 5% zu gering, um von einer stark und einer schwach positiven Gruppe von Tumoren zu sprechen. Es ergab sich daher keine Unterteilung in unterschiedlich stark positiv, sodass sieben Fälle positiv (x) und acht Fälle negativ (-) für die Chromogranin A Färbung sind.

5.1.2 Synaptophysin

Von allen fünfzehn gefärbten Tumoren sind für Synaptophysin sieben positiv (46,7%). Insgesamt ist die positive Markerreaktion, verglichen mit Chromogranin A, schwach.

Es finden sich keine stark positiven Präparate. Für alle sieben Fälle gilt, dass der prozentuale Markeranteil am Gesamttumor kleiner als 1 % ist. Dadurch ergibt sich für Synaptophysin ebenfalls nur eine Einteilung in positiv (x) und negativ (-).

Tabelle 5-1 Voruntersuchung

Nummer	Chromogranin A	Synaptophysin	Geschlecht	Laurentyp	Stadium	Alter bei Diagnose (J)
1	x	x	m	intestinal	IIb	42
2	x	x	m	intestinal	IIIa	64
3	x	x	m	intestinal	IIIa	77
4	x	x	m	diffus	IIIa	83
5	x	x	w	intestinal	IIb	75
6	x	x	m	intestinal	IIb	58
7	x	-	m	intestinal	IIIa	64
8	-	x	w	diffus	IIb	67
9	-	-	w	diffus	IIIa	73
10	-	-	w	intestinal	IIIa	73
11	-	-	m	diffus	IIIa	70
12	-	-	w	diffus	II	57
13	-	-	m	intestinal	II	69
14	-	-	m	intestinal	IIIb	63
15	-	-	m	intestinal	IIIa	64

5.2 Auswertung

Anhand der Voruntersuchung werden die genauen Kriterien für eine Auswertung mit dem digitalen Bildanalysesystem festgelegt (siehe Material und Methodik).

Jedes einzelne Präparat wird individuell im Mikroskop eingestellt. Während der Messungen eines Präparates werden die Einstellungen für die Blende und die Helligkeit nach einmaliger Festlegung bei der ersten Messung nicht mehr verändert.

Das erste Gesichtsfeld wird innerhalb der mit Rotstift angebrachten Markierung eingestellt. Alle weiteren Gesichtsfelder werden zufällig im Bereich des markierten Gebietes ausgewählt und gemessen. Sie werden auch in die Auswertung miteinbezogen, wenn sich in einem Gesichtsfeld kein positiver Befund befindet.

Als erstes Gesichtsfeld sollte immer ein Feld mit markerpositiven Zellen gewählt werden. Dadurch können am Computer die Kontrastwerte für den Tumor- und den Markeranteil optimal eingestellt werden und müssen in der Folge für das jeweilige Präparat nicht nachgebessert oder angepasst werden. Diese Werte werden für jedes Präparat neu bestimmt, da in manchen Präparaten unterschiedliche Helligkeiten und Dunkelheiten auftreten. Außerdem muss gewährleistet sein, daß die richtigen Areale des Präparates vom Computer als Tumor- bzw. als Markergewebe identifiziert werden. Wenn man noch keinerlei Erfahrung mit dem Auswerten der Präparate am Computer hat, beträgt der Zeitaufwand pro Präparat ungefähr 60 Minuten.

Mit einiger Erfahrung reduziert er sich etwas, bleibt aber trotzdem zwischen 30 und 60 Minuten. Die Einstellungen am Mikroskop benötigen unabhängig von der Geschwindigkeit der Messungen eine bestimmte Zeit, die sich nicht verkürzen lässt.

5.3 Problematik von Chromogranin A

Es werden von jedem Patienten mindestens zwei Tumorblöcke gefärbt und geschnitten. Nach der Färbung mit Chromogranin A stellt sich heraus, daß teilweise nur ein Block eines Patienten im Tumor positiv für Chromogranin A ist, der andere negativ.

Im Normalgewebe –zur Kontrolle, ob der Marker überhaupt angegangen ist-, ist Chromogranin A in den betroffenen Fällen jeweils positiv.

Daraufhin werden bei allen Tumoren, bei denen nicht entweder beide Blöcke positiv oder negativ sind, beide Blöcke noch einmal neu gefärbt.

Es gilt festzustellen, ob Chromogranin A bei den ersten Färbungen falsch positive oder falsch negative Befunde ergeben hat.

6 ERGEBNISSE

6.1 Allgemeine Patientendaten

Von den 53 Patienten der Untersuchung sind 24 Männer (mittleres Alter 67 Jahre) und 29 Frauen (mittleres Alter 66 Jahre). Die Altersverteilung bei Diagnosestellung liegt zwischen 30 und 89 Jahren.

6.1.1 Tumorlokalisation

Die Tumorlokalisationen werden in ein proximales, mittleres und distales Drittel des Magens eingeteilt. Eine weitere Gruppe enthält Tumoren, deren Lokalisation sich einer Region des Magen nicht eindeutig zuordnen lässt (siehe Material und Methodik).

Die meisten Tumoren (22; 41,5 %) sind im distalen Magendrittel lokalisiert. Übersicht über die Lokalisation aller Tumoren Abbildung 6-1:

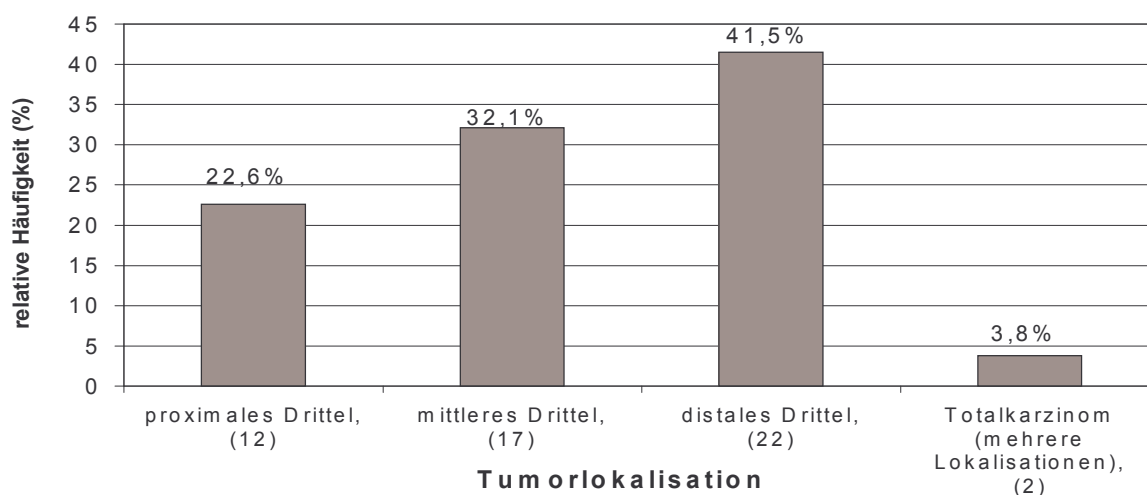


Abbildung 6-1 Lokalisation aller Tumoren (n=53)

6.1.2 Stadienverteilung

Von allen untersuchten Patienten (53) haben 26 (49,1 %) Lymphknotenmetastasen in 1-6 regionären Lymphknoten (N1), elf Patienten (20,8 %) haben Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten (N2). Alle 16 übrigen Patienten (30,2 %) haben nach der histologischen Untersuchung keine tumorbefallenen Lymphknoten (N0). Fernmetastasen liegen zum Zeitpunkt der Operation bei keinem Patienten vor (siehe Einschlußkriterien).

Es ergibt sich folgende Stadienverteilung: (Abbildung 6-2)

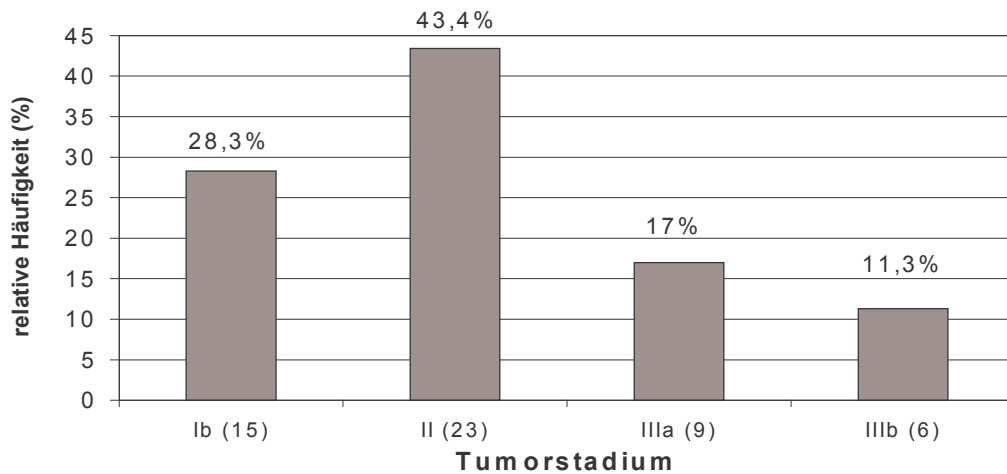


Abbildung 6-2 Verteilung der Tumorstadien (n=53)

6.1.3 Typen nach Lauren

Bei der histologischen Typisierung der Tumoren nach Lauren fielen von 53 der Magenkarzinome 32 (60 %) auf den intestinalen Typ, die anderen 21 (40 %) auf den diffusen Typ.

Dabei zeigt sich folgende Stadienverteilung:

Annähernd die Hälfte der Tumoren des intestinalen Types nach Lauren tritt im Stadium II auf (15; 28,3 %).

Die Tumoren des diffusen Types nach Lauren sind relativ ausgeglichen verteilt über die einzelnen Stadien Ib bis IIIb.

(Abbildung 6-3)

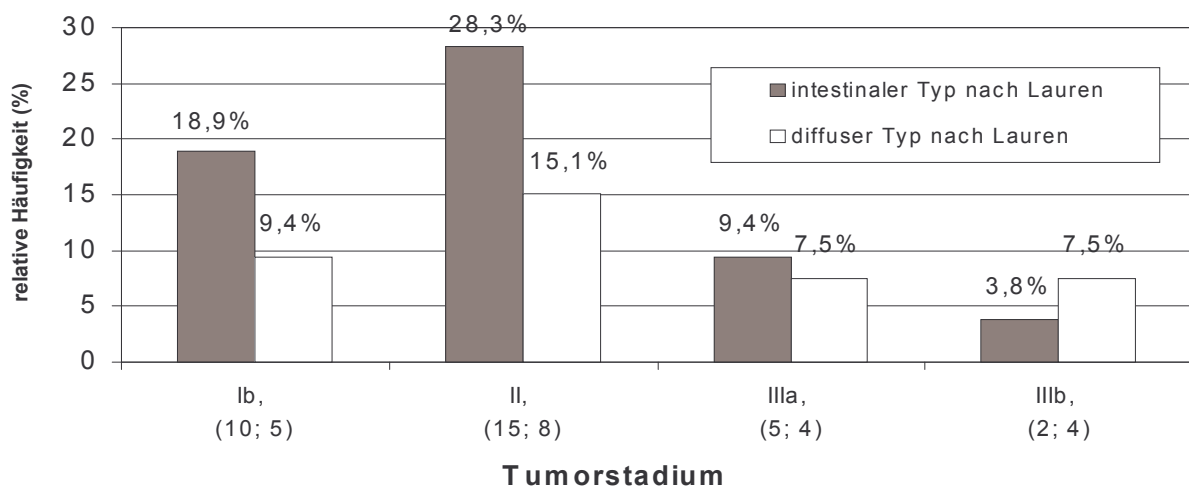


Abbildung 6-3 Tumorstadium und Laurentypisierung (n=53)

Die Geschlechterverteilung der Laurentypen ist für den intestinalen Typ ausgeglichen. Es sind mit 16 (30,2 %) genauso viele Adenokarzinome von männlichen Patienten wie von weiblichen Patienten.

Insgesamt gibt es bei beiden Geschlechtern etwas mehr Tumoren des intestinalen Types (n=32; 60,4 %) als des diffusen Types.

Vom diffusen Typ nach Lauren sind insgesamt 21 (39,6 %) Tumoren. Davon treten 13 (24,5 %) Tumoren bei Frauen und acht (15,1 %) bei Männern auf.

Der Mischtyp ist gemäß der Einschlusskriterien nicht in der Untersuchung vertreten (siehe Einschlusskriterien). (Abbildung 6-4)

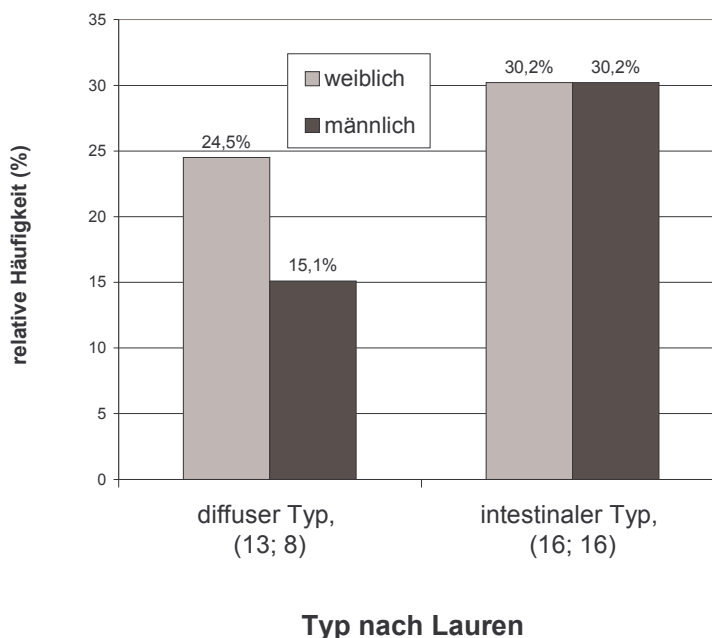


Abbildung 6-4 Geschlechterverteilung nach Laurentypen (n=53)

6.1.4 Überlebensdaten

6.1.4.1 Frauen und Männer

In der Verteilung der Tumoren auf die Geschlechter zeigte sich keine Korrelation zwischen Geschlecht und Überleben.

6.1.4.2 Altersverteilung

Der Vergleich der Altersgruppen von allen unter 70 Jahre alten Patienten (27) gegenüber allen über 70 Jahre alten Patienten (26) läßt keine statistisch signifikante Aussage hinsichtlich eines längeren Überlebens zu.

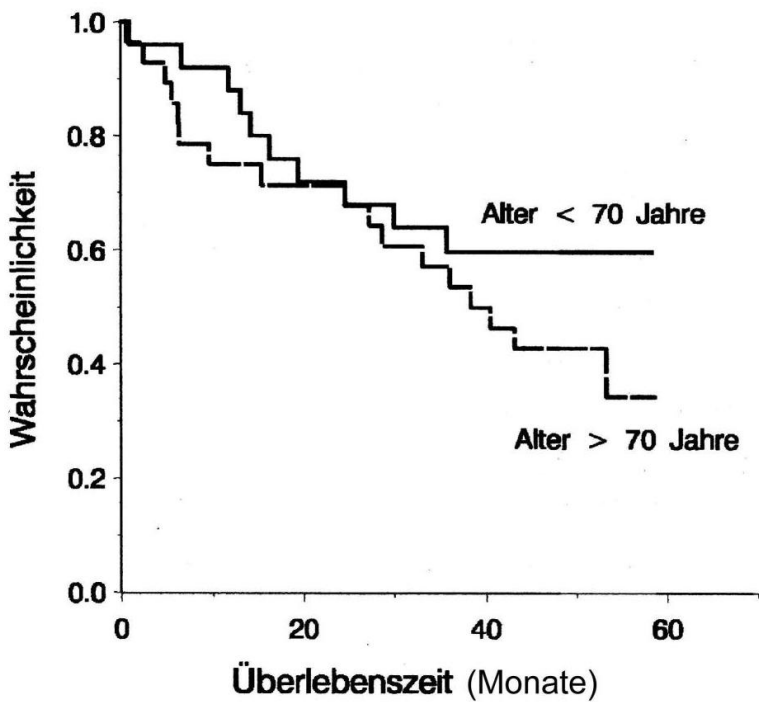


Abbildung 6-5 Überleben abhängig vom Alter

6.1.4.3 Tumorlokalisation

Hinsichtlich der Tumorlokalisation lässt sich beim Vergleich der Tumoren im distalen Drittel des Magens (23) zu den Tumoren des mittleren Magendrittels (16) und den Tumoren des proximalen Drittels des Magens (12) nach einer Überlebenszeit von fünf Jahren keine signifikante Aussage in Bezug auf ein längeres Überleben einer Patientengruppe machen.

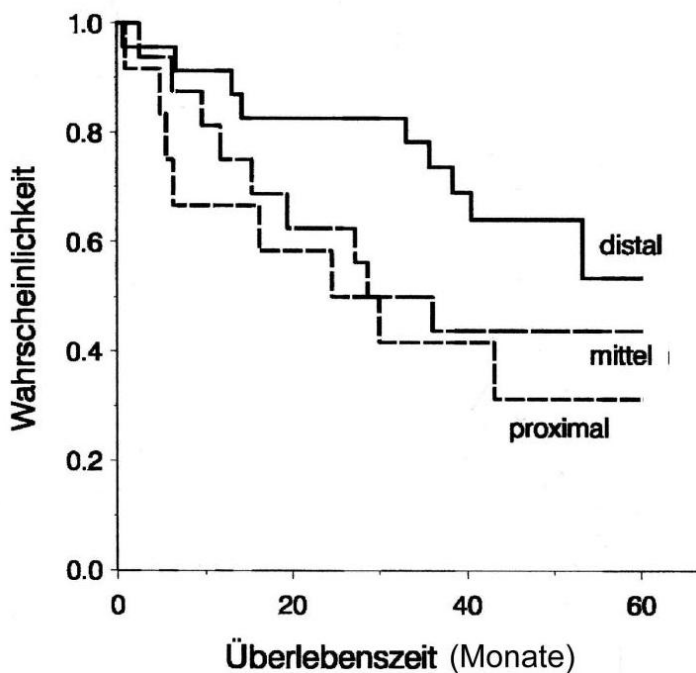


Abbildung 6-6 Überleben abhängig von der Tumorlokalisation

6.1.4.4 Histologischer Tumortyp nach Lauren

Bis zu einer Überlebenszeit von 60 Monaten nach Operation kann keine signifikante Aussage zur Prognose von Patienten mit einem diffusen Magenkarzinom nach Lauren (21) gegenüber Patienten mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ nach Lauren (32) gemacht werden.

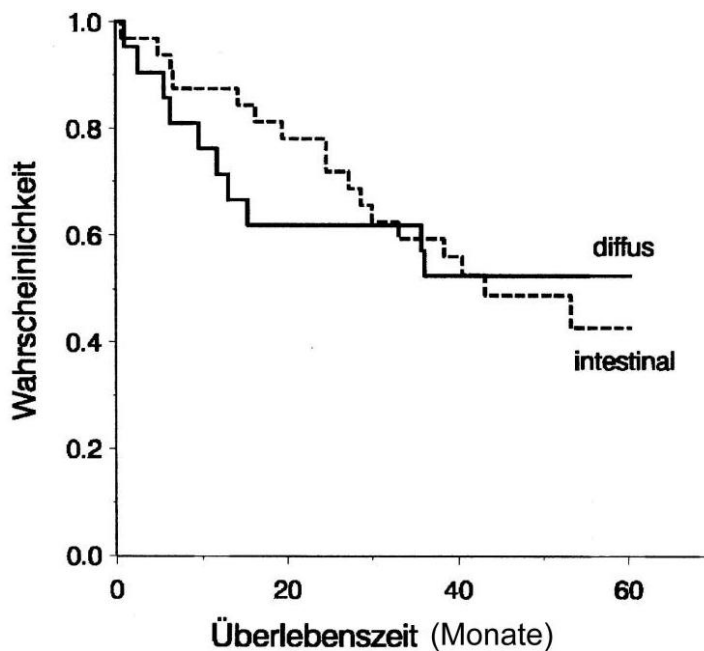


Abbildung 6-7 Überleben abhängig vom Laurentyp

6.1.4.5 Tumorstadium und Lymphknotenstatus

Die TNM-Stadieneinteilung der UICC von 1997, die die Lymphknotenkategorie nach der Anzahl der befallenen regionären Lymphknoten einteilt, lässt in unserem Fall keine signifikante Aussage bezüglich des postoperativen Überlebens der Patienten zu.

Patienten im Stadium Ib (15; 28,3 %) im Stadium II (23; 43,4 %) scheinen eine leicht bessere Prognose als Patienten im Stadium IIIa (9; 17,0 %) und IIIb (6; 11,3 %) zu haben, allerdings ist dies nicht statistisch signifikant.

Innerhalb der Stadien Ia und II und innerhalb der Stadien IIIa und IIIb gelingt es nicht, eine Tendenz hinsichtlich kürzeren oder längeren Überlebens auszumachen.

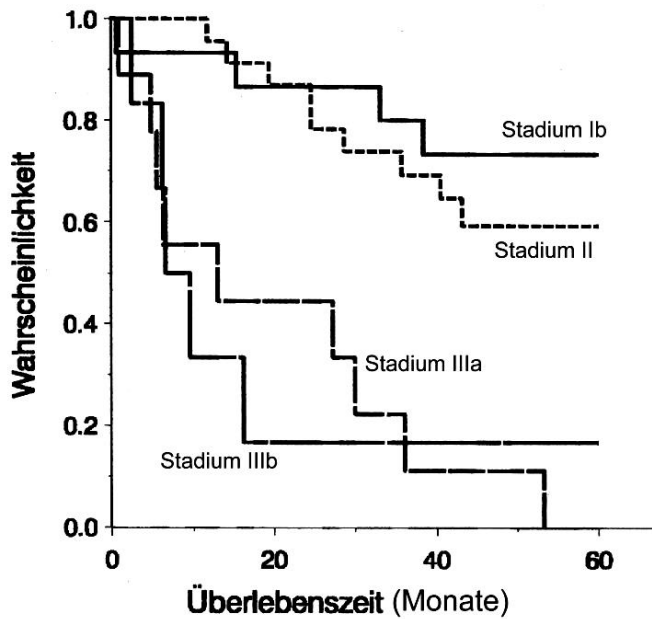


Abbildung 6-8 Überleben abhängig vom Tumorstadium

Nach weiterer Unterteilung der Patienten in die einzelnen Lymphknotenkategorien, Patienten ohne befallene Lymphknoten (N0; 16; 30,2 %), Patienten mit 1- 7 befallenen regionären Lymphknoten (N1; 26; 49,1 %) und Patienten mit einem Lymphknotenstatus von N2 (11; 20,8 %) dies entspricht 7- 15 befallenen, regionären Lymphknoten, lässt sich ebenfalls keine statistisch signifikante Aussage hinsichtlich eines längeren oder kürzeren Überlebens machen.

Es gibt keinen Patienten mit einem Lymphknotenstatus von N3, welcher mehr als 15 regionären Lymphknotenmetastasen entsprechen würde.

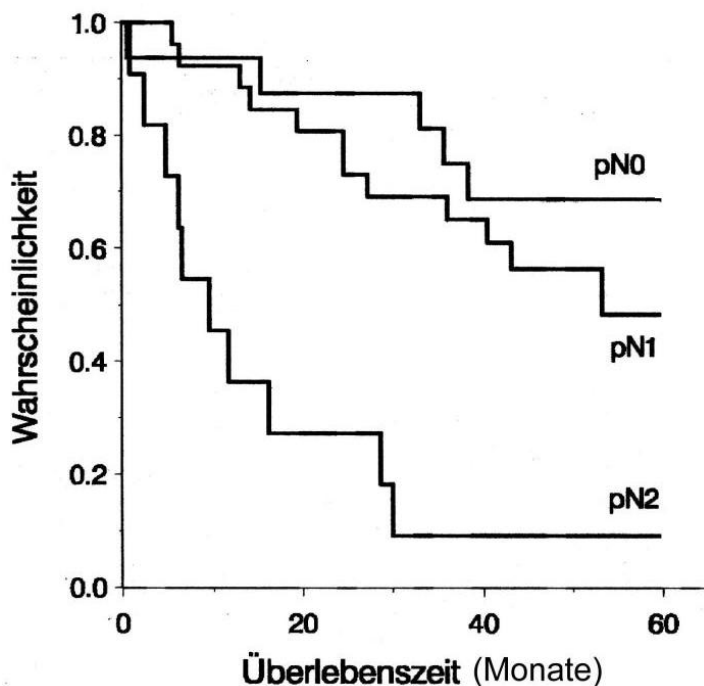


Abbildung 6-9 Überleben abhängig vom Lymphknotenstatus

Von den elf Patienten mit einem N2-Lymphknotenstatus lebt nach 60 Monaten noch ein Patient (9,1 %).

6.2 Markerergebnisse allgemein

Die Untersuchung zeigt, dass von 53 Adenokarzinomen des Magens 30 Tumoren eine partielle neuroendokrine Differenzierung aufweisen.

Für beide immunhistochemischen Marker, Chromogranin A und Synaptophysin, sind 13 (24,5 %) der Tumoren positiv. Jeweils nur für einen der beiden Marker positiv sind 17 (32,1 %) der Tumoren. Davon sind 14 (26,4 %) nur für Chromogranin A und drei (5,7 %) nur für Synaptophysin positiv. Von allen 53 Patienten zeigten 23 (43,4 %) der Tumoren weder eine Färbung für Chromogranin A noch für Synaptophysin.

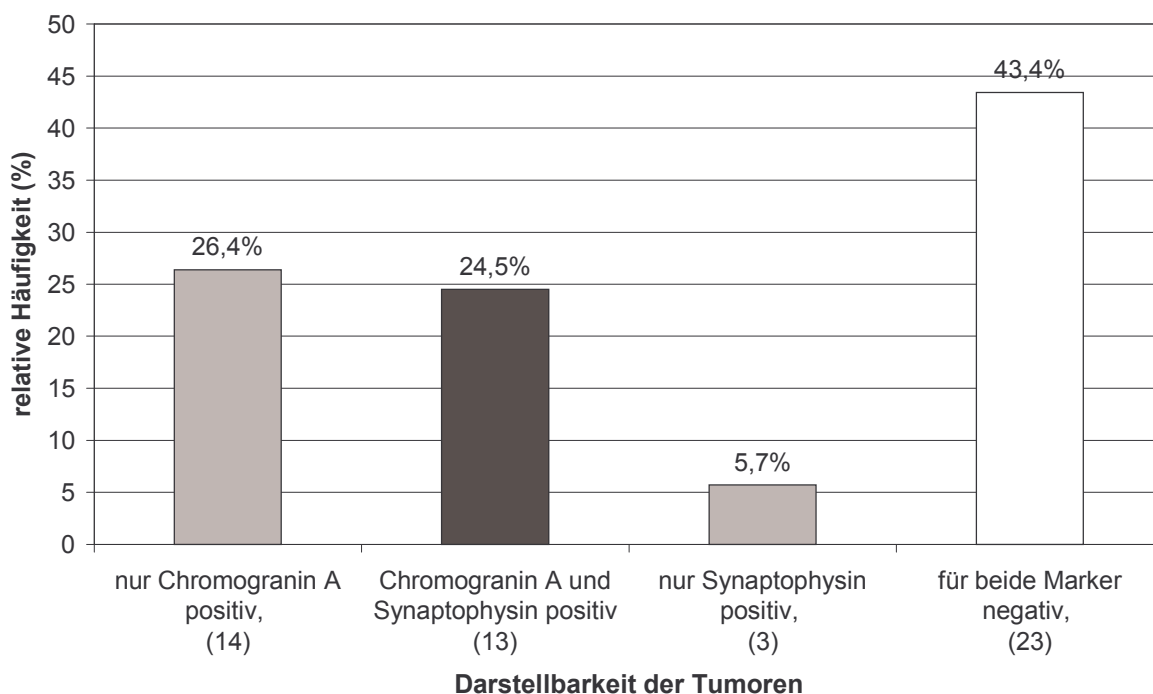


Abbildung 6-10 Färbeverhalten der Tumoren

6.2.1 Chromogranin A

Nach Färbung und Auswertung aller Tumoren ist für Chromogranin A die bereits in der Voruntersuchung erfolgte Einteilung in positiv und negativ weiterhin sinnvoll. Kein Tumor enthält einen positiven Markeranteil von mehr als 7 % der Tumorgesamtmasse. Die Tumoren, die sich immunhistochemisch darstellen lassen, entsprechen mit einem prozentual positiven neuroendokrinen Anteil zwischen 0,05 % bis 7 % schwach positiven Tumoren. Dadurch kann nicht von stark positiven und schwach positiven Tumoren gesprochen werden.

Tabelle 6-1 Übersicht über die nur für Chromogranin-A-positiven Fälle

Chromogranin A	Laurentyp	Tumorlokalisation (bezogen auf Magendrittel)	Geschlecht	Stadium	Grading
x	intestinal	proximales	m	II	3
x	diffus	distales	w	IIIa	3
x	diffus	mittleres	w	Ib	3
x	intestinal	mittleres	m	IIIa	3
x	intestinal	distales	m	IIIb	3
x	diffus	distales	w	IIIb	3
x	intestinal	mittleres	w	Ib	3
x	diffus	mittleres	m	IIIa	3
x	diffus	distales	w	IIIa	3
x	intestinal	proximales	w	IIIa	3
x	diffus	distales	w	Ib	3
x	intestinal	distales	w	Ib	3
x	intestinal	distales	w	Ib	3
x	diffus	distales	w	IIIa	3

Von den insgesamt 53 Tumorpatienten haben 26 (49,1 %) einen für Chromogranin A positiven und 27 (50,9 %) einen für Chromogranin A negativen Tumor.

Von 27 für Chromogranin A positiven Fällen sind 13 auch positiv für Synaptophysin. Vierzehn Tumoren sind nur für Chromogranin A positiv (x).

In allen Fällen sind die Chromogranin-A-positiven Zellen vereinzelt über den Tumor verteilt und nicht in Zellgruppen oder -haufen angeordnet.

6.2.2 Synaptophysin

Für Synaptophysin ergibt sich, wie für Chromogranin A auch, keine semiquantitative Dreiteilung der Tumoren, sondern lediglich eine Einteilung in negativ (-) oder positiv (+). Von den 53 Patienten haben ungefähr ein Drittel (16; 30,2 %) einen für Synaptophysin positiven Tumor und 37 (69,8 %) einen Tumor, der sich nicht mit Synaptophysin anfärben lässt.

Drei Tumoren sind nur für Synaptophysin positiv (x) und nicht für Chromogranin A.

Bei einem einzigen Tumor treten in der Synaptophysinfärbung positive Zellen nicht nur verstreut über den ganzen Tumor auf, sondern auch gruppiert.

Die Anfärbung der Tumorzellen ist in den meisten Fällen für Synaptophysin weniger intensiv, als sie es für Chromogranin A ist.

Tabelle 6-2 Übersicht über die nur für Synaptophysin positiven Fälle

Synaptophysin	Laurentyp	Tumorlokalisation (bezogen auf Magendrittel)	Geschlecht	Stadium	Grading
x	diffus	proximales	m	Ib	3
x	diffus	mittleres	w	II	3
x	diffus	mittleres	w	IIIb	3

6.3 Markerergebnisse im Einzelnen

6.3.1 Verteilung auf Frauen und Männer

Die Verteilung der Chromogranin-A-positiven Tumoren auf Frauen und Männer ist mit 14 weiblichen (26,4 %) und 12 männlichen (22,6 %) Patienten annähernd ausgeglichen.

Bei den männlichen Patienten gibt es jeweils 12 (22,6 %) für Chromogranin A positive und 12 (22,6%) für Chromogranin A negative Tumoren.

Bei den weiblichen Patienten ist das Verhältnis ebenfalls annähernd ausgeglichen. Es gibt 15 (28,3 %) für Chromogranin A negative und 14 (26,4 %) für Chromogranin A positive Tumoren. (Abbildung 6-11)

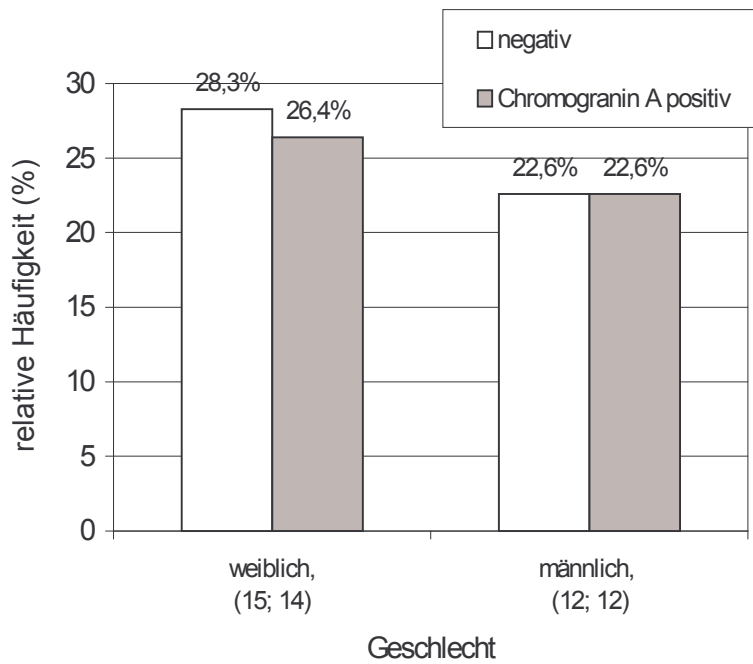


Abbildung 6-11 Geschlechtsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A

Unter den Patienten, die einen Synaptophysin-positiven Tumor haben, sind sechs Frauen (11,3 %) und zehn Männer (18,9 %). (Abbildung 6-12)

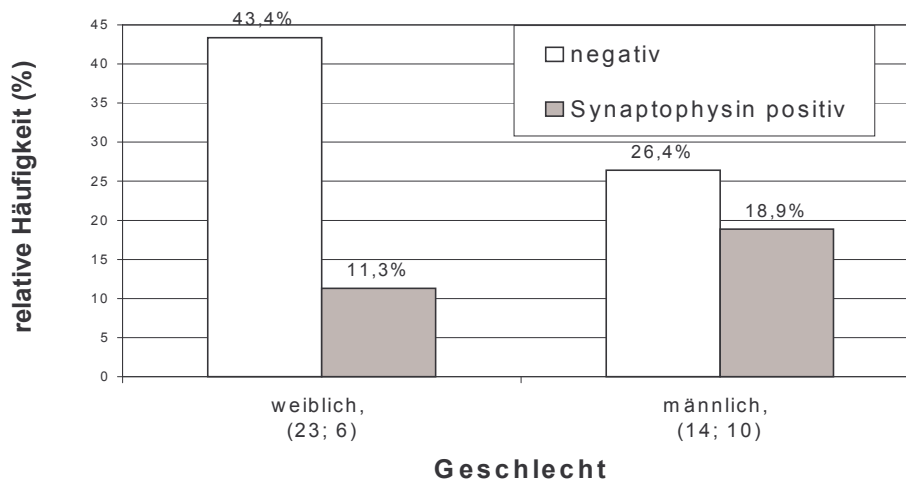


Abbildung 6-12 Geschlechtsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Synaptophysin

Die Zusammenstellung aller markerpositiven Tumoren bezüglich des Geschlechtes des jeweiligen Patienten macht noch einmal deutlich, dass es sowohl in der weiblichen wie auch in der männlichen Gruppe mehr Adenokarzinome mit neuroendokrinen Zellen gibt als ohne. In der Gruppe der weiblichen Patienten gibt es in dieser Untersuchung mehr Tumoren (29) als in der männlichen Gruppe (24) und auch etwas mehr positive Tumoren (16; 30,2%) als negative (13; 24,5%).

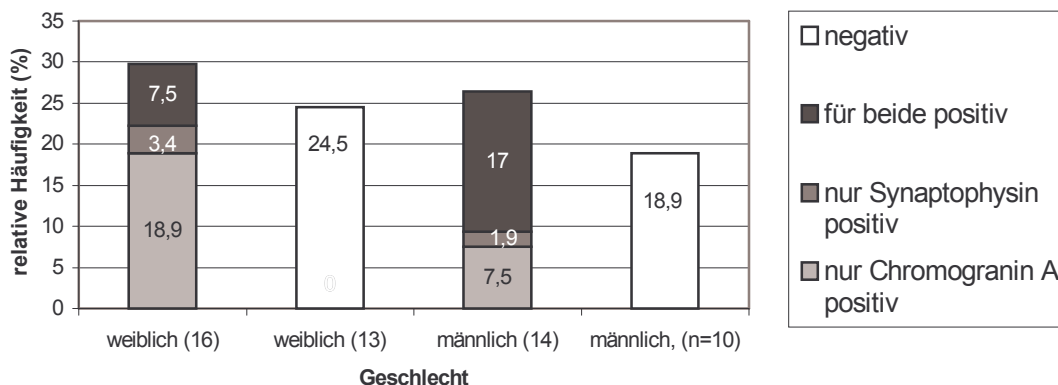


Abbildung 6-13 Geschlechtsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A und Synaptophysin

6.3.2 Altersverteilung

Es wurde in zwei Altersgruppen eingeteilt: 30-69 Jahre und 70 – 89 Jahre. In beiden kommen sowohl positive als auch negative Fälle von Chromogranin A vor.

In der Altersgruppe der 30-69 Jahre alten Patienten gibt es mit 13 (24,5%) geringfügig (ein Tumor) mehr positive als negative Fälle für Chromogranin A.

Die Gruppe der 70-89 jährigen Patienten enthält mehr negative als positive Tumoren für Chromogranin A. (Abbildung 6-14)

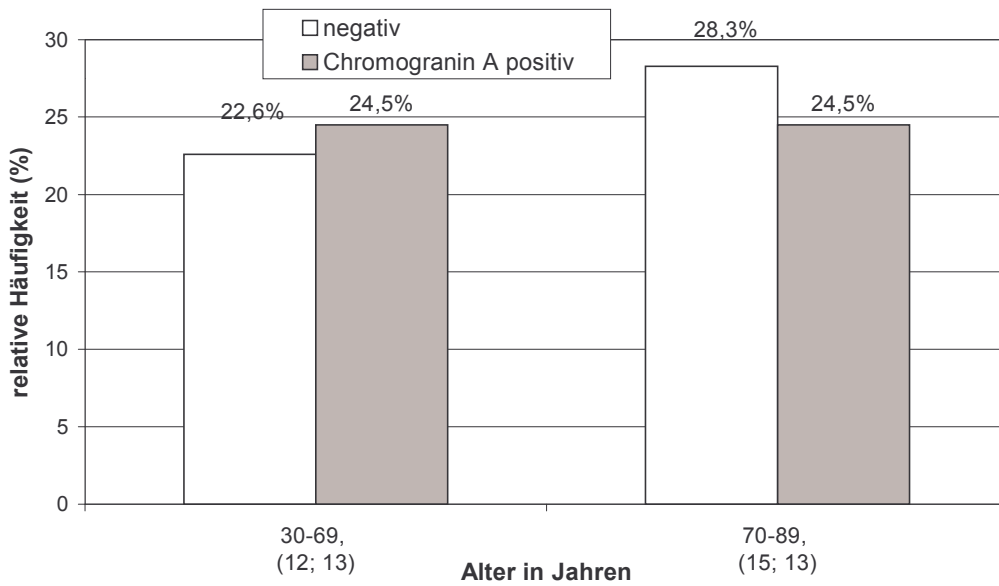


Abbildung 6-14 Altersverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A

Beide Altersgruppen enthalten mehr negative als positive Tumoren für Synaptophysin. (Abbildung 6-15)

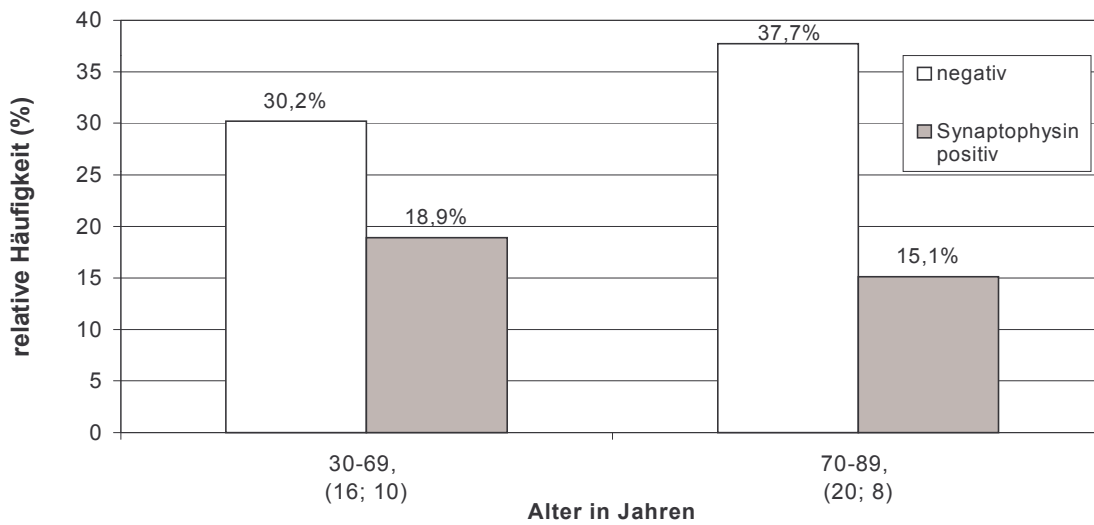


Abbildung 6-15 Altersverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Synaptophysin

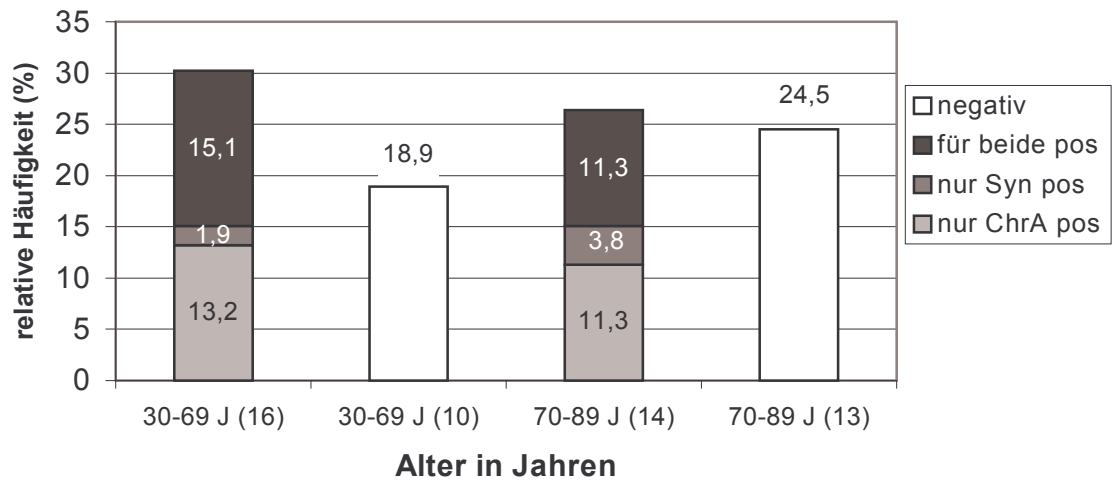


Abbildung 6-16 Altersverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A und Synaptophysin

6.3.3 Verteilung auf die Tumorlokalisierung

Im Rahmen der Tumorlokalisationen der für Chromogranin-A-positiven Tumoren ergibt sich folgendes Bild:

Es gibt keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Tumorlokalisationen im proximalen, im distalen Drittel oder im mittleren Drittel des Magens.

Der größte Anteil der Karzinome (22; 41,5 %) ist im distalen Magendrittel lokalisiert. Davon sind zwölf (22,6 %) positiv für Chromogranin A, zehn (18,9 %) negativ.

Der Tumor, der sich als Linitis plastica im Magen ausbreitet, ebenso wie der Tumor mit multilokulären Anteilen im Magen ist für Chromogranin A negativ. (Abbildung 6-17)

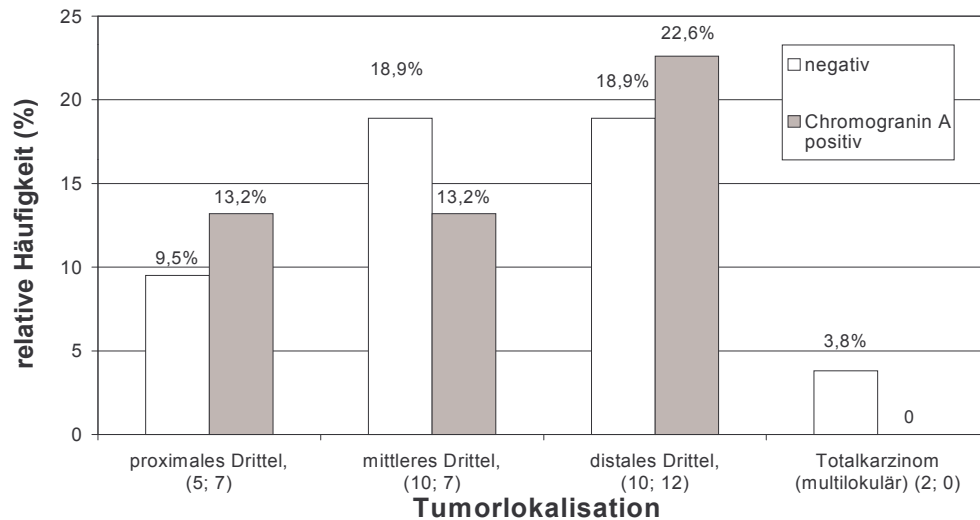


Abbildung 6-17: Lokalisationsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A

Im proximalen, mittleren und distalen Drittel des Magens kommen jeweils Synaptophysin positive Tumoren vor.

In der Gruppe der im mittleren Magendrittel lokalisierten Tumoren sind mehr Fälle positiv (11; 20,8 %) als negativ (5; 9,4 %) für Synaptophysin.

Auch mit der Synaptophysinfärbung lassen sich nicht darstellen, der als Linitis plastica und der multilokulär im Magen auftretende Tumor. (Abbildung 6-18)

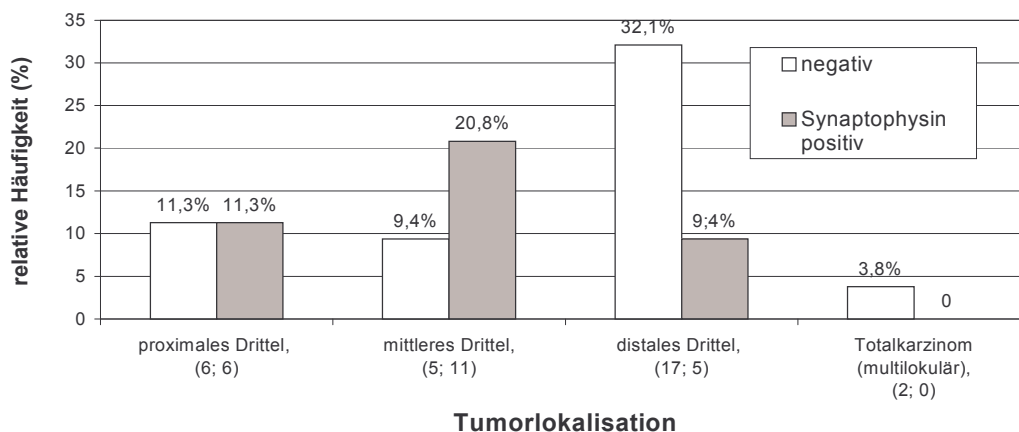


Abbildung 6-18 Lokalisationsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Synaptophysin

Betrachtet man die Markerpositivität nur im Vergleich der im distalen und mittleren Magendrittel lokalisierten Tumoren, sind im mittleren Drittel gleich viele Tumoren markerpositiv wie markernegativ (8; 20,5 %), im distalen Drittel hingegen etwas mehr markerpositiv (14, 35,9 %) als markernegativ (9; 23,1 %).

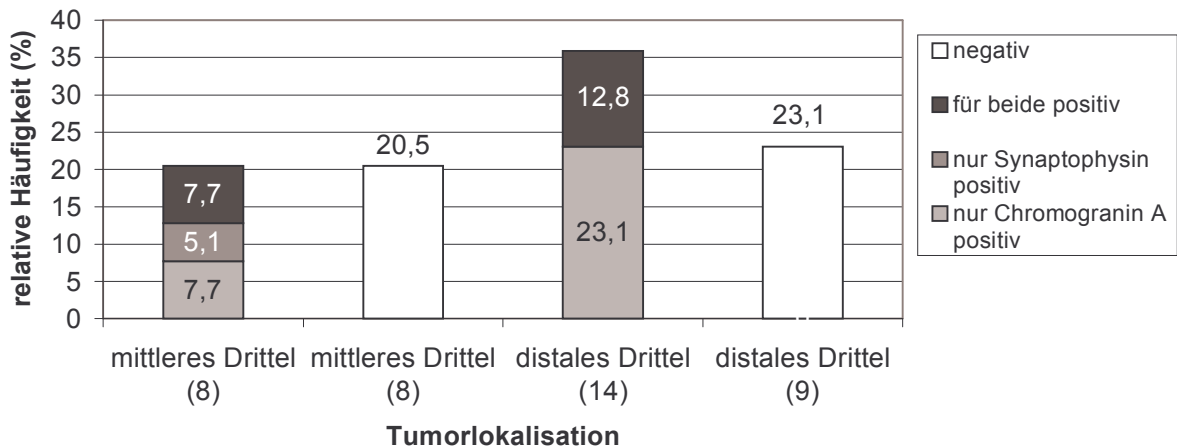


Abbildung 6-19 Lokalisationsverteilung der Tumoren (n=39) im mittleren und distalen Drittel in Bezug auf Chromogranin A und Synaptophysin

Gesamtüberblick der Lokalisationsverteilung und Positivität (Abbildung 6-20)

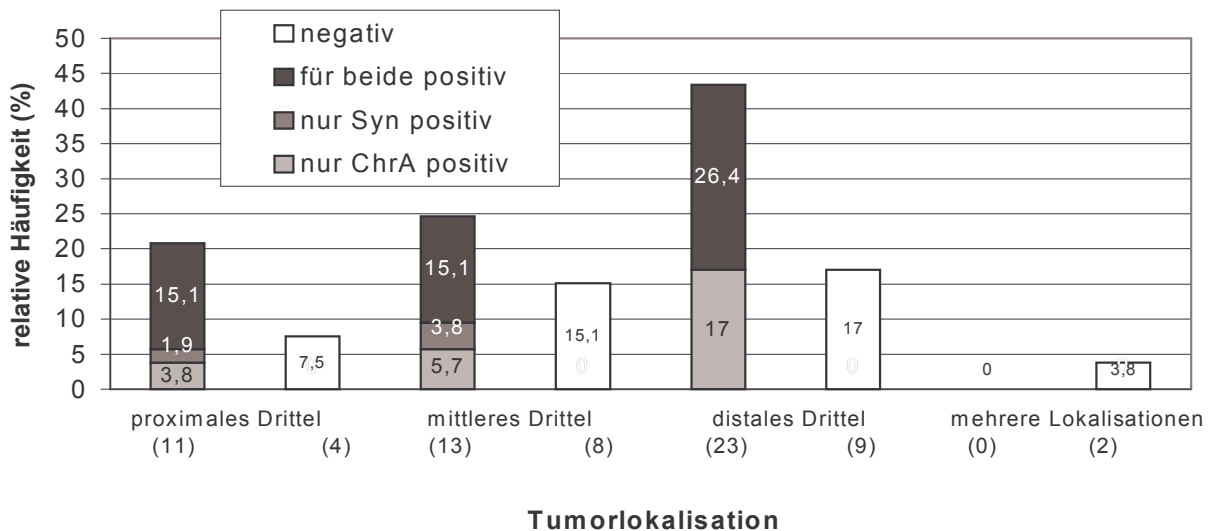


Abbildung 6-20 Lokalisationsverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A und Synaptophysin

6.3.4 Verteilung auf die Tumorstadien

In allen eingeschlossenen Tumorstadien treten positive Fälle für Chromogranin A auf.

Die meisten Karzinome (23; 43,4 %) gibt es im Stadium II.

Einzig in diesem Stadium gibt es Einige (14; 26,4 %) Tumoren mehr, die positiv als negativ (9; 17,0 %) für Chromogranin A sind.

In allen anderen Stadien (Stadium Ib, IIIa und IIIb) kommen mehr negative Tumoren für Chromogranin A vor. (Abbildung 6-20)

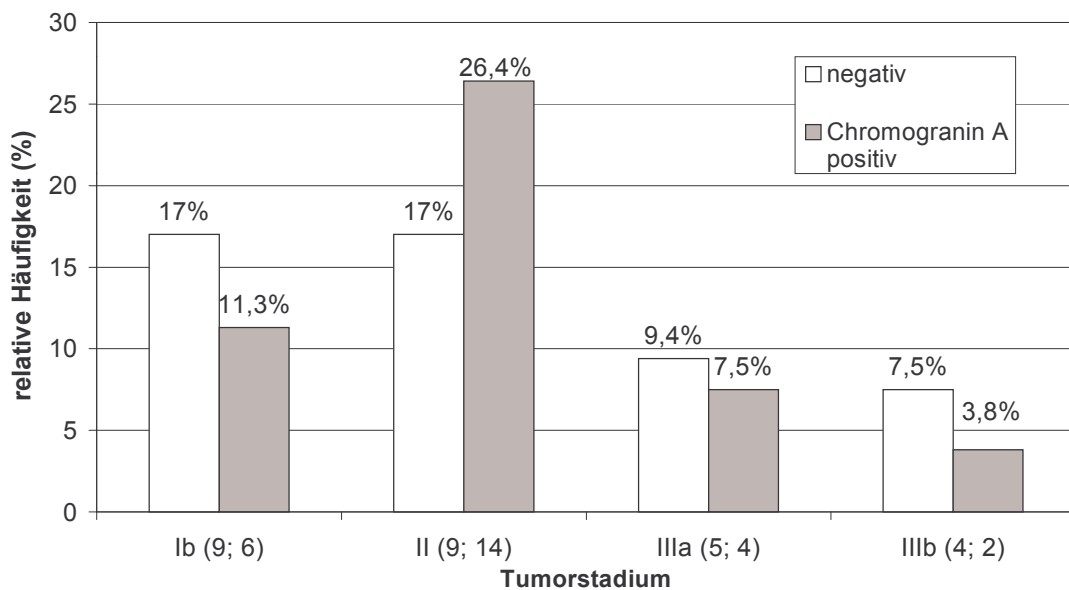


Abbildung 6-20: Stadienverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A

Bei der Synaptophysinfärbung treten ebenfalls in allen vertretenen Tumorstadien positiv angefärbte Tumoren auf. Im Stadium II sind mit 10 (18,5 %) die meisten Synaptophysin-positiven Tumoren zu finden. In allen anderen Stadien gibt es mehr Synaptophysin-negative Tumoren. Im Stadium IIIb ist das Verhältnis -positiver und negativer Tumoren mit jeweils 3 (5,7 %) ausgeglichen. (Abbildung 6-21)

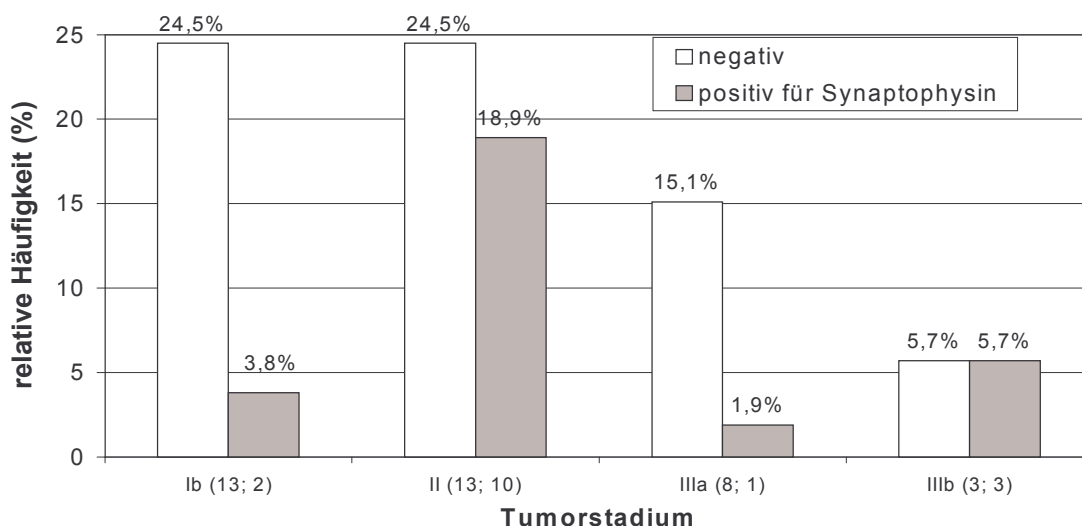
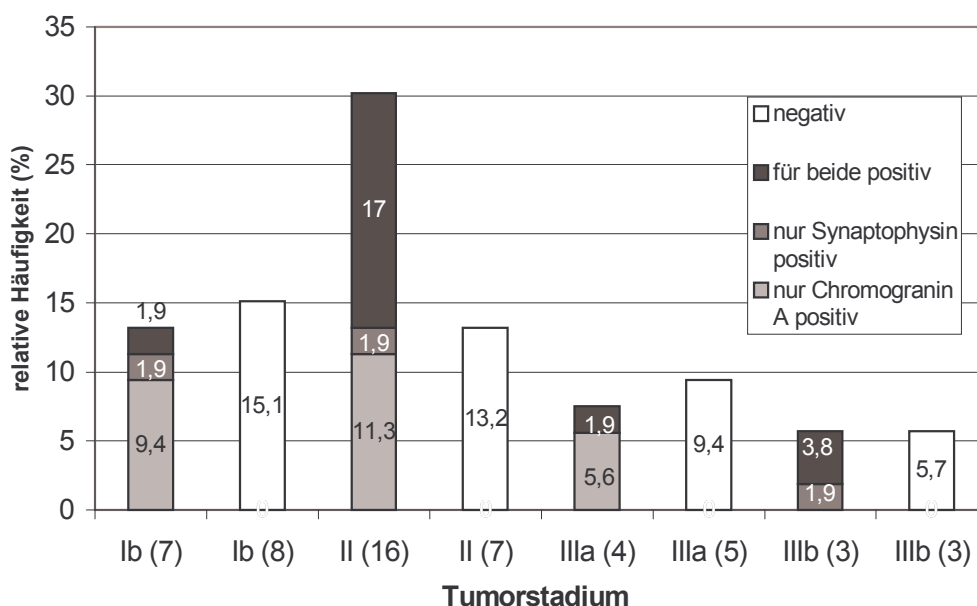


Abbildung 6-21 Stadienverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Synaptophysin

Gesamtüberblick des jeweiligen Tumorstadiums und Markerpositivität:



Wenn alle Tumorstadien gemeinsam betrachtet werden, fällt auf, dass die meisten

Abbildung 6-22 Stadienverteilung der Tumoren (n=53) in Bezug auf Chromogranin A und Synaptophysin

Tumoren im Tumorstadium II zu finden sind und auch die meisten mit positiven neuroendokrinen Zellen. Insgesamt gibt es 30 Patienten (56,5 %) mit einem Tumor im Stadium II. Von diesen enthalten 23 (43,4 %) eine neuroendokrine Subpopulation im Tumor.

Eine genaue Aufschlüsselung des Tumorstadiums II auf die jeweilige Markerpositivität ist der nächsten Abbildung zu entnehmen:

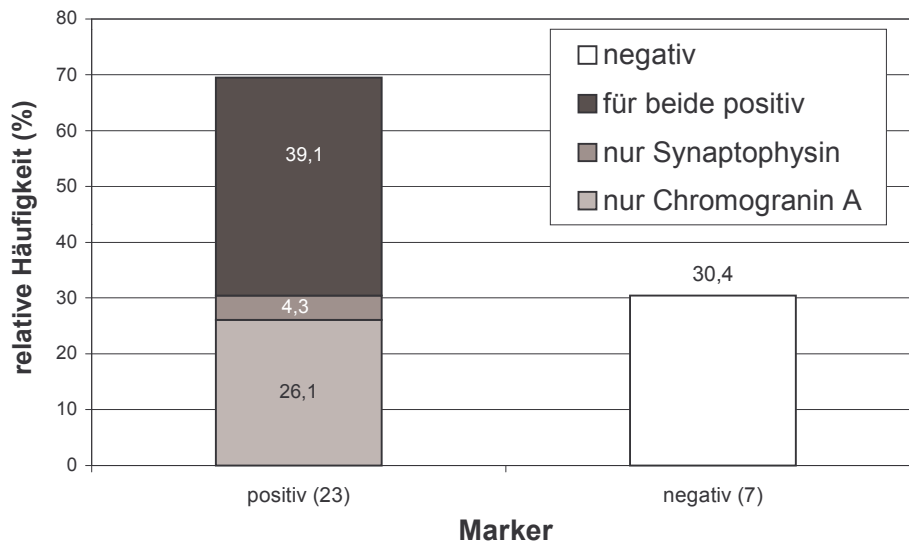


Abbildung 6-23 Markerverteilung der Tumoren (n=30) im Stadium II

Innerhalb der unterschiedlichen Tumorstadien existieren Tumoren mit (N+) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen.

Bei spezieller Betrachtung der markerpositiven und marker negativen Tumoren hinsichtlich vorhandener oder nicht vorhandener Lymphknotenmetastasen ergibt sich folgendes Bild:

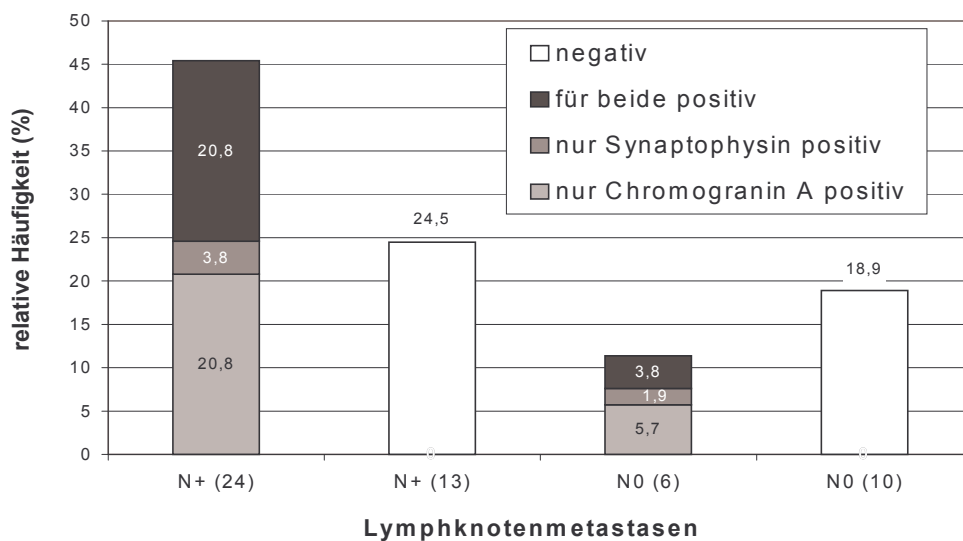


Abbildung 6-24 Markerverteilung der Tumoren (n=53) mit Lymphknotenmetastasen

Von vornherein gibt es mehr Tumoren in dieser Untersuchung, die Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation aufwiesen (43) verglichen mit denen, deren Tumor sich noch nicht in Lymphknoten ausgebreitet hatte (18). Von den 43 Patienten, deren Tumor bereits in Lymphknoten metastasiert hatte, hatten 24 (50,9 %) einen Tumor, in dem sich neuroendokrine Zellen nachweisen lassen.

6.3.5 Verteilung auf die Laurentypen

Im Gesamtkollektiv der Studie finden sich 21 Tumoren (39,6 %) vom diffusen Typ und 32 (60,4 %) vom intestinalen Typ nach Lauren.

In der Gruppe des diffusen Typs nach Lauren gibt es mit zwölf (22,6 %) mehr Chromogranin A negative als positive (9; 17,0 %) Tumoren.

Beim intestinalen Typ nach Lauren dagegen finden sich mehr Tumoren (17; 32,1 %), die positiv für Chromogranin A sind, als negative (15; 28,3 %).

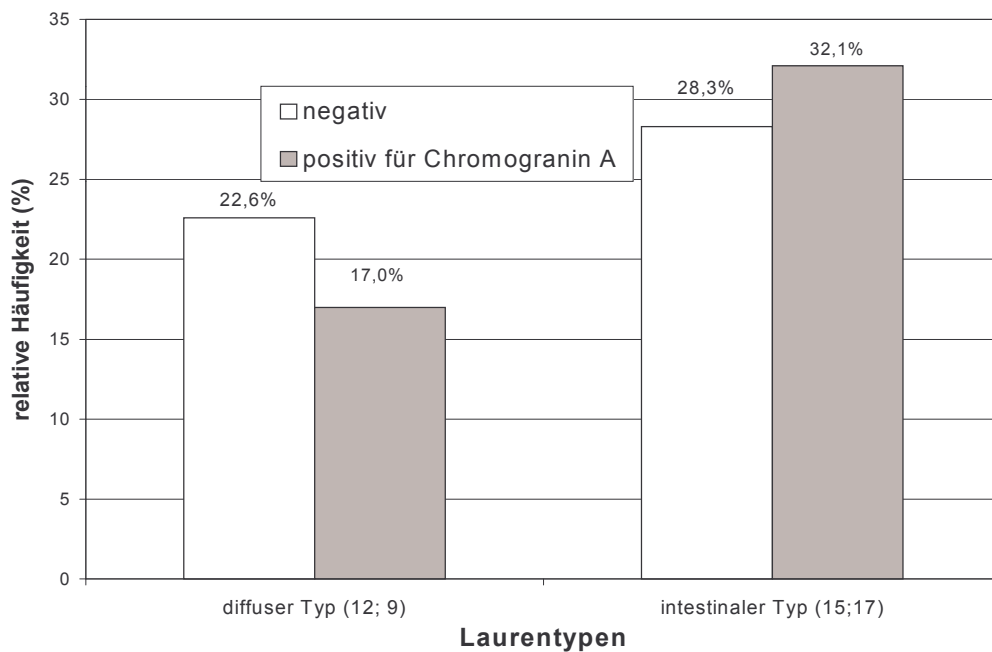


Abbildung 6-25: Chromogranin-A-Anfärbbarkeit der Tumoren (n=53) abhängig von der Laurentypisierung

Mit Synaptophysin lassen sich vom intestinalen Typ nach Lauren in etwa ein Drittel der Tumoren (positiv: 10 (18,9 %); negativ: 22 (41,5 %)) darstellen. Vom diffusen Typ nach Lauren stellen sich sechs (11,3 %) Tumoren von 15 (28,3 %) mit Synaptophysin dar.

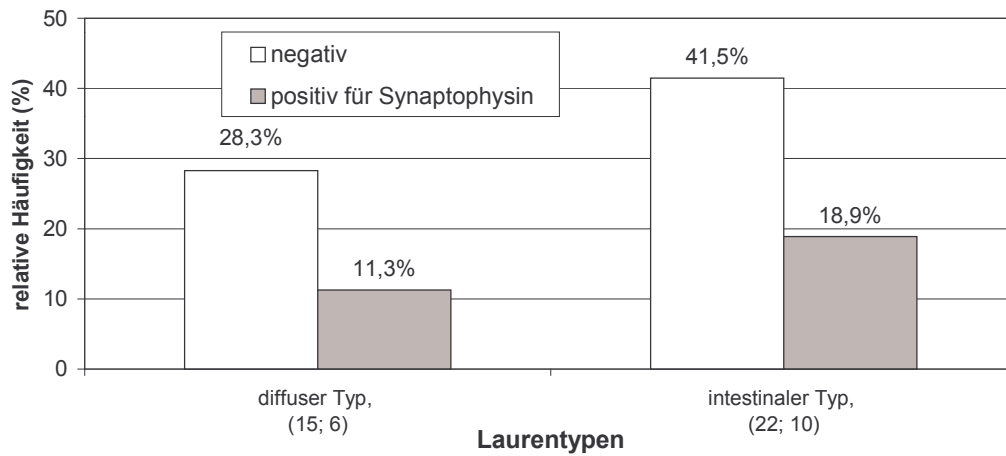


Abbildung 6-26 Synaptophysin-Anfärbbarkeit der Tumoren (n=53) abhängig von der Laurentypisierung

Gesamtüberblick über die Anfärbbarkeit der Tumoren:

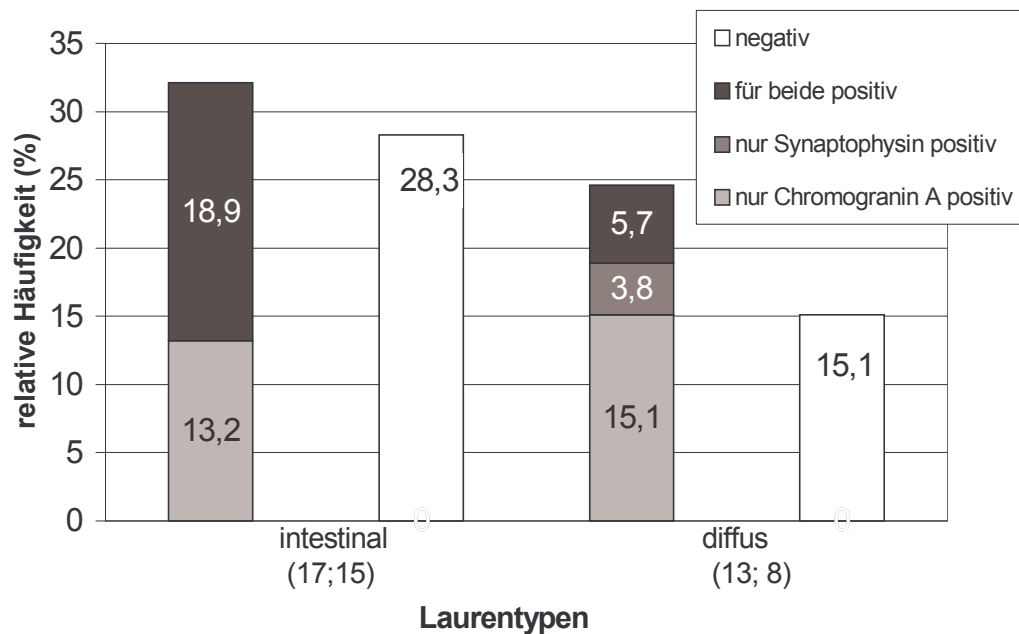


Abbildung 6-27 Anfärbbarkeit der Tumoren (n=53) in Abhängigkeit der Laurentypen

6.3.6 Überlebensdaten

Kaplan-Meier-Kurven

Von den 26 Patienten, die einen für Chromogranin A positiven Tumor haben, lebt am 2.4.2000 noch genau die Hälfte (13, 50 %).

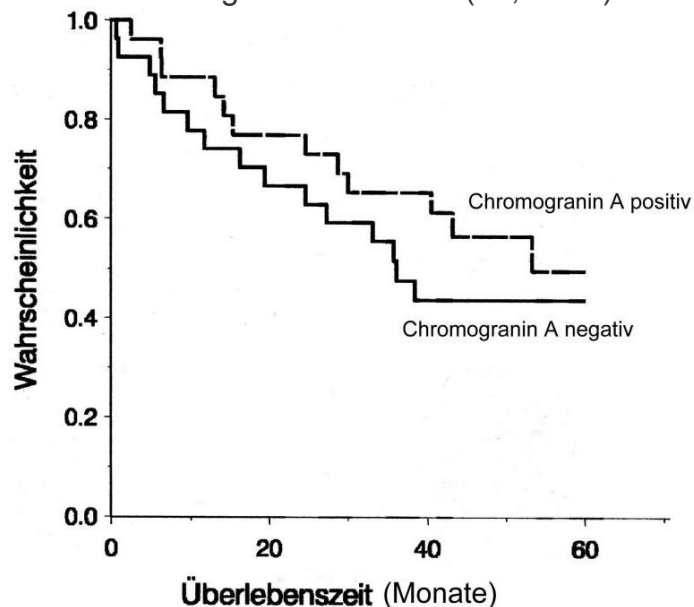


Abbildung 6-28 Überlebenszeit abhängig von Chromogranin A-Anfärbbarkeit

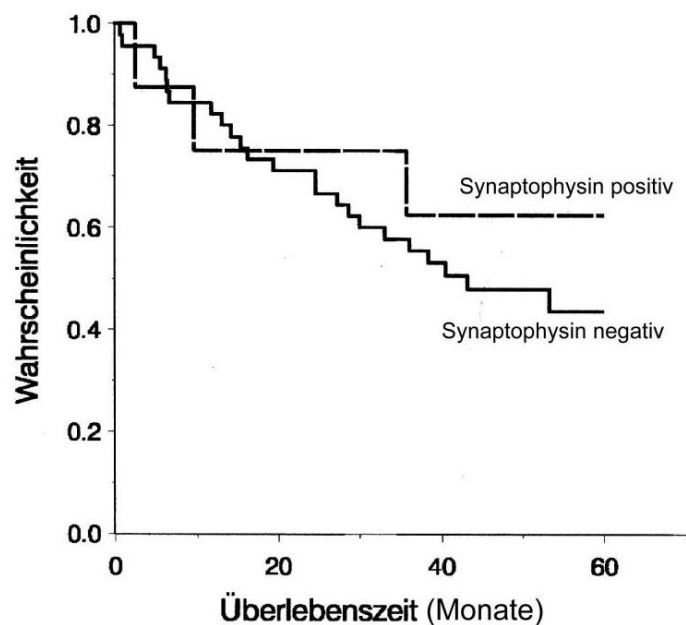


Abbildung 6-29 Überlebenszeit in Abhängigkeit der Anfärbbarkeit mit Synaptophysin

Von 16 Patienten mit einem für Synaptophysin positiven Tumor sind bis zum 02.04.2000 sieben verstorben.

Betrachtet man die Überlebenszeit aller markerpositiven (also für Synaptophysin oder Chromogranin A) im Vergleich zu komplett markernegativen, so ergibt sich folgendes Bild:

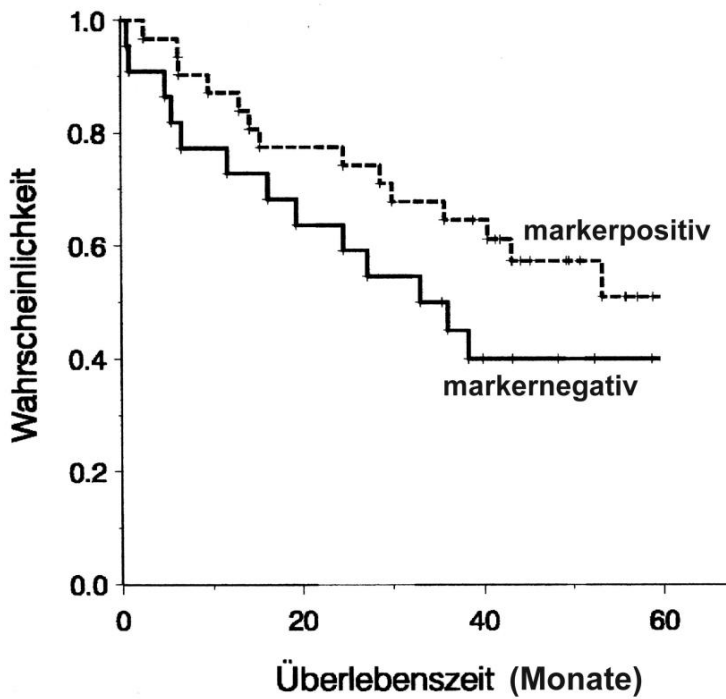


Abbildung 6-30 Überlebenszeit abhängig von der Anfärbarkeit mit Chromogranin A oder Synaptophysin

7 DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchung sollte zunächst geklärt werden, ob es innerhalb von Adenokarzinomen des Magens eine Subpopulation von Tumoren gibt, die neuroendokrine Zellen enthält. Dies ist, nach Untersuchungen mit den neuroendokrinen Markern Chomogranin A und Synaptophysin, bei 30 Tumoren (56,6 %) von insgesamt 53 Adenokarzinomen des Magens der Fall.

Diese Erkenntnis war die Grundlage für weitere Untersuchungen. Es galt herauszufinden, ob diese existierende neuroendokrine Subpopulation innerhalb des Magens bevorzugte histopathologische und anatomische Kriterien aufweist. Einige Untersuchungen, die teilweise noch keine immunhistochemischen Marker, sondern die früher üblichen argentaffinen und argyrophilen Färbemethoden verwendeten (7;35;42;61), fanden mehr neuroendokrine Zellen in Tumoren des diffusen Typs nach Lauren oder konnten diesbezüglich keine Aussage machen (8;46). Hinsichtlich der Lokalisation innerhalb des Magens gibt es Hinweise auf ein gehäuftes Auftreten neuroendokriner Subpopulationen in Tumoren des distalen Drittels (8;61) oder es gab keine bevorzugte Tumorlokalisierung (56).

In den bisher zum Tumorstadium Stellung beziehenden Untersuchungen fanden sich überwiegend neuroendokriner positive Adenokarzinome des Magens in den Stadien III und IV (46;56).

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die neuroendokrine Differenzierung bei den betroffenen Patienten Hinweise auf eine schlechtere oder bessere Prognose gibt.

In der bisher veröffentlichten Literatur gibt es diesbezüglich keinerlei Aussagen (8;46;61). Lediglich Radi spricht in seiner Untersuchung von Adenokarzinomen des Magens mit neuroendokriner Differenzierung von der Tendenz des längeren Überlebens, allerdings wurden dort nur 15 Fälle untersucht, die alle Patienten bis zu einem Alter von maximal 40 Jahren betrafen (49).

In der jetzt durchgeführten Untersuchung läßt sich mit der zur Zeit vorliegenden Fallzahl kein Unterschied feststellen.

7.1 *Material und Methodik*

7.1.1 **Einschlußkriterien**

Es galt zunächst eine möglichst homogenes Untersuchungskollektiv zu finden, innerhalb dessen man geeignete Fragestellungen ohne zu sehr streuende Variablen untersuchen kann.

Hinsichtlich des histologischen Typs der Adenokarzinome wurden nur Tumoren des diffusen oder intestinalen Typs nach Lauren ausgewählt.

Bisher gibt es eine Untersuchung, die mit den neuesten immunhistochemischen Markern durchgeführt wurde. Dort fiel das Auftreten von neuroendokrinen Zellen v.a. im diffusen Typ auf (61). Die übrigen Untersuchungen der letzten Jahre mit immunhistochemischen Methoden erbrachten keine signifikanten Ergebnisse zu dieser Frage (7;46).

Es gibt ältere Untersuchungen von Lauren und Nevalainen, die noch keine immunhistochemischen Marker verwendet haben, in denen mehr neuroendokrine Zellen im diffusen Typ als im intestinalen gefunden wurden (35;42).

Deshalb sollte dieser Frage noch einmal nachgegangen werden. Nachdem von einzelnen Autoren angenommen wird, dass der diffuse Typ des Magenkarzinomes nach Lauren zum Teil eine schlechtere Prognose als der intestinale Typ hat (35), sollte untersucht werden, wie sich der diffuse Typ verhält, wenn er eine Subpopulation neuroendokriner Zellen enthält.

Innerhalb der Stadienverteilung beschränkte sich die Auswahl auf die Tumorstadien Ib, II und III. In diesen Stadien erfolgt eine kurative Therapie durch eine radikale Tumoresektion.

Der Tumor ist einerseits nicht mehr, wie im Stadium Ia häufig, nur auf die Mucosa oder Submucosa begrenzt. Andererseits ist im Stadium IV eine kurative Behandlung durch eine Operation nicht mehr möglich. Um eine zu große Streubreite zu verhindern, wurden diese beiden Stadien ausgeschlossen.

Es wurden ausserdem nur Tumoren von Patienten aufgenommen, die keine Fernmetastasen hatten (M0). Dies könnte ansonsten zum einen die Prognose negativ beeinflussen und zum anderen möglicherweise eine zusätzliche Therapie erfordern, womit die Homogenität des Patientenkollektives nicht mehr gewährleistet wäre.

Die TNM-Klassifikation der UICC von 1997 hat für Magenkarzinome eine neue Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen festgelegt. Als N1 wird nun ein Tumor klassifiziert, der Metastasen in 1- 6 regionären Lymphknoten hat. N2 ist ein Tumor, wenn er Metastasen in 7- 15 regionären Lymphknoten hat; bei Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten, bekommt ein Tumor eine N3 Klassifikation (65). In früheren TNM-Klassifikationen wurde der Lymphknotenstatus nach Entfernung vom Primärtumor beurteilt. So bekam ein Tumor einen N1-Status, wenn er perigastrische Lymphknotenmetastasen innerhalb von 3 cm Abstand vom Primärtumor hatte, und einen N2-Status, wenn die Metastasen weiter als 3 cm vom Primärtumor entfernt waren, entlang der Aa. gastrica sinistra, hepatica communis, lienalis oder coeliaca lagen (28).

Zur Stratifizierung des Patientenkollektives wurden hinsichtlich des histopathologischen Differenzierungsgrades nur Tumoren mit einem G3-Grading (schlecht differenziert) ausgewählt. In Adenokarzinomen des Kolons wurde eine erhöhte Anzahl neuroendokriner Tumorzellen bei einem schlechteren Differenzierungsgrad des Tumors gefunden (26).

Deshalb erwarteten wir eine neuroendokrine Subpopulation vorwiegend in den weniger differenzierten Tumoren.

Es war das Ziel, Patienten mit einem postoperativem Krankheitsverlauf von mindestens fünf Jahren einzuschliessen, sodass die jüngsten Operationszeitpunkte zu Beginn der Untersuchung vier Jahre zurücklagen.

Die postoperative Verlaufsbeobachtung war bei der überwiegenden Anzahl der Patienten ohne Probleme möglich. Einerseits erfolgte bei vielen die Tumornachsorge im Klinikum rechts der Isar, andererseits ist die Kooperation mit den meisten Hausärzten sehr gut. Diese unterrichten das onkologische Studiensekretariat der Chirurgie regelmäßig über den Gesundheitszustand des betroffenen Patienten.

Bei einigen Patienten war es nicht möglich, über den weiteren Krankheitsverlauf informiert zu bleiben. Für diejenigen wurde als Überlebenszeitraum vom letzten bekannten Lebensdatum nach der Operation ausgegangen.

Alle Patienten wurden mit einem kurativen Therapieansatz operiert und galten postoperativ lokal (R0) und systemisch (M0) als tumorfrei.

7.1.2 Chromogranin A

Chromogranin A hat sich seit einigen Jahren als immunhistochemischer Marker für neuroendokrine Tumorzellen etabliert (7;46;53;56;61).

Es hat sich gezeigt, dass sich damit eine neuroendokrine Differenzierung in Tumoren nachweisen läßt, die nicht hormonell aktiv sind und kein spezifisches Hormon oder Peptid sezernieren (44;63).

Im gesamten Gastrointestinaltrakt kommt Chromogranin A physiologisch in allen neuroendokrinen Zellen vor. Es ist in den Speichergranula enthalten und dadurch ein Indikator für das Vorhandensein derartiger Granula. Die Intensität der Färbung zeigt in den unterschiedlichen Regionen des Gastrointestinaltraktes wenig Variation. Momentan lassen sich alle identifizierbaren neuroendokrinen Zelltypen des menschlichen Gastrointestinaltraktes mit Chromogranin A darstellen (23).

Bisher wurde noch kein intestinaler neuroendokriner Tumor gefunden, der nicht Chromogranin A positiv war (24).

Dadurch ist gewährleistet, daß Chromogranin A positive Zellen auch im gesunden Magengewebe auftreten. Hiermit läßt sich kontrollieren, ob der Marker am Präparat überhaupt angegangen ist. Deshalb wurden in dieser Untersuchung nur Tumorblöcke ausgewählt, auf denen auch gesundes Magengewebe enthalten war.

Nach Untersuchungen an Adenokarzinomen des Magens und des Kolons, ist Chromogranin A der sensitivste Marker, verglichen mit neuroenspezifischer Enolase, Serotonin, Gastrin und Synaptophysin (7;18;46). Des Weiteren ist Chromogranin A auch ein sensibler Marker für eine neuroendokrine Hyperplasie (62).

Von den früher häufig verwendeten argentaffinen und argyrophilen Färbemethoden ist man weitgehend abgekommen. Die Erfahrung hat gezeigt, dass bei diesen häufig falsch positive Ergebnisse zustande kommen. Die verwendeten Färbetechniken stellen oft Zellen dar, die mit der Speicherung von Schleim, Glukagon und Lactalbumin in Verbindung gebracht werden (1) und ultrastrukturell keinerlei Anzeichen für neuroendokrine Granula zeigen (15). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war sehr unzuverlässig und variierte von Labor zu Labor. Demzufolge konnten die Ergebnisse nur mit großer Vorsicht interpretiert werden (1;15;40).

Ein weiterer Vorteil von Chromogranin A ist, dass diese Färbung inzwischen zu den immunhistochemischen Routinemethoden gehört und mit einem Herstellungspreis zwischen 6,- und 10,- DM nicht teuer ist. Es sollte eine klinische Anwendung dieses Markers in der Diagnostik der Adenokarzinome des Magens in Zukunft nicht ausgeschlossen werden. Deshalb galt es, eine Vorgehensweise zu finden, die unkompliziert und kostengünstig ist.

Es existieren erste Untersuchungen der Serumbestimmung von Chromogranin A mit Hilfe von Radioimmunoassays (44;53). Diese könnten in der Zukunft eine geeignete Ergänzung der Immunhistochemie sein, sodass Untersuchungen mit Chromogranin A nicht nur auf das histologische Präparat beschränkt bleiben müssen.

Auf Grund dieser Überlegungen wurde Chromogranin A als erster Marker der Untersuchung ausgewählt.

7.1.3 Synaptophysin (P 38)

In wenigen Studien wurden bisher Adenokarzinome des Magens, die mit Chromogranin A untersucht wurden, ebenfalls mit Synaptophysin untersucht.

Im Gegensatz zu Chromogranin A färbt Synaptophysin nicht die Speichergranula der neuroendokrinen Zellen, sondern eine Art von Vesikeln. Diese werden als kleine, klare, synaptisch-ähnliche Vesikel beschrieben. Sie kommen sowohl in normalen neuroendokrinen Zellen vor, als auch in hyperplastischen endokrinen Zellen und in endokrinen Tumorzellen und lassen sich mit Synaptophysin darstellen (13). Deshalb wird Synaptophysin in der Immunhistochemie auch als vesikulärer neuroendokriner Marker bezeichnet (28).

Synaptophysin färbt, ebenso wie Chromogranin A, endokrine Zellen des physiologischen Magengewebes. Anhand dessen kann man im tumorfreien Abschnitt des jeweiligen Präparates sehen, ob die Färbung funktioniert hat. In den meisten neuroendokrinen Tumoren kann Synaptophysin dargestellt werden. Es scheint, daß dadurch nur neuroendokrine Zellen oder neuroendokrine Tumoren angefärbt werden (25). Es lassen sich des Weiteren, ebenso wie bei Chromogranin A, neuroendokrine Zellen in Karzinoiden und präkanzerösen Läsionen darstellen (11).

Nach Buffa et al. ist Synaptophysin ein spezifischer und sensitiver Marker für neuroendokrine Zellen im Allgemeinen und in diesem Zusammenhang stehenden Tumoren. Dieser sollte am besten in Verbindung mit Chromogranin A verwendet werden (13).

Die Synaptophysinfärbung gehört inzwischen zu den in der Routine angewandten Methoden der Immunhistochemie. Sie eignet sich gut für in Paraffin fixierte Präparate (25) und ist mit einem Herstellungspreis zwischen 6,- und 10,- DM, ebenso wie Chromogranin A, kostengünstig.

Die positive Reaktion von Chromogranin A in gastrointestinalen Zellen ist intensiver als die von Synaptophysin. Dies hat folgende Gründe:
Die Färbung der Speichergranula einer Zelle durch Chromogranin A erscheint als kleine punktuelle Markierung innerhalb des Zytoplasmas.
Demgegenüber wirkt bei einer durch Synaptophysin gefärbten Zelle das gesamte Zytoplasma als positiv, aber weniger intensiv angefärbt als bei Chromogranin A (13).

Positivität für einen vesikulären (z.B. Synaptophysin) oder einen granulären (z.B. Chromogranin A) Marker wird als neuroendokriner Nachweis gewertet (28).

Auf Grund dieser Überlegungen schien die Kombination von Chromogranin A und Synaptophysin eine gute Möglichkeit zu eröffnen, eine Studie unter Bedingungen auszuführen, die später in den klinischen Alltag übernommen werden könnten.

Auf einen zusätzlichen zytoplasmatischen Marker, von denen der bekannteste die neuronenspezifische Enolase (NSE) ist, wurde verzichtet. Die neuronenspezifische Enolase ist ein Marker, der sowohl neuroendokrine Zellen als auch Nervengeflechte, besonders in Magen und Pankreas, gut und zuverlässig anfärbt (6). In der Versuchsreihe von Bishop et al. stellten sich im Magen die neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern in enger Nachbarschaft zueinander dar (6). In einem derartigen Fall wäre eine Auswertung mit digitaler Bildanalyse nicht möglich oder erschwert gewesen, da die

gefärbten Nervenstrukturen falsch positive Markermessungen ergeben hätten (siehe Material und Methodik unter 4.4).

Deshalb wurde auf einen zytoplasmatischen Marker verzichtet und die Untersuchung mit Chromogranin A auf einen granulären und mit Synaptophysin auf einen vesikulären immunhistochemischen Marker beschränkt.

Die neuroendokrinen Zellen innerhalb eines Adenokarzinoms des Magens können sehr spärlich sein. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, mehrere Blöcke eines jeden Patienten auf neuroendokrine Differenzierung zu untersuchen, um kleine oder vereinzelt liegende Zellen nicht zu übersehen (siehe Untersuchungsverlauf 5.3.). In den bisher vorliegenden Studien zu Adenokarzinomen des Magens und neuroendokrinen Zellen geben lediglich zwei Autoren über die Anzahl der verwendeten Tumorblöcke Auskunft. Bonar et al. untersuchten 2- 5 Tumorblöcke pro Patient (8), Blumenfeld et al. dagegen von jedem Patienten nur einen Tumorblock (7). Letzteres kann leicht dazu führen, ein geringes Vorkommen von neuroendokrinen Zellen innerhalb eines Adenokarzinomes zu übersehen.

Im Rahmen der durchgeführten Voruntersuchung zeigte sich bei 14 von 16 Fällen, dass verschiedene Tumorblöcke ein differierendes Färbeverhalten für Chromogranin zeigten (siehe Untersuchungsverlauf 5.3), sodass ein einzelner untersuchter Block aus einem Tumor nicht als ausreichend repräsentativ für den Gesamttumor gelten kann.

7.1.4 Auswertung

Die digitale Bildanalyse, die für die Auswertung der Tumoren verwendet wurde, ist der rein visuellen Beurteilung mit Hilfe eines Lichtmikroskopes in einigen Aspekten überlegen. Dies betrifft insbesondere die Unterscheidung, ob ein Marker stark oder schwach positiv ist. So wird eine semiquantitative Beurteilung wesentlich erleichtert. Mit Hilfe der digitalen Bildanalyse ist es möglich, exakte Berechnungen für Teilmengen eines Tumors, zu erstellen (siehe Material und Methodik 4.4).

Dadurch wird die Klärung weiterer Fragestellungen ermöglicht. Es kann beispielsweise untersucht werden, ob eine ganz bestimmte Menge eines Markers/ einer Subpopulation innerhalb eines Tumors eine Auswirkung beispielsweise auf die Prognose hat.

Die Vorgehensweise ist standardisiert und jederzeit von anderen Benutzern nachprüfbar.

Ein weiterer Vorteil ist die problemlose digitale Speicherung interessanter Bildsequenzen für spätere Dokumentationen.

Für diese Arbeit war letztlich die exakte Markermenge des Gesamttumors nicht relevant. Alle markerpositiven Adenokarzinome enthielten insgesamt sehr wenige positive Zellen. Dadurch war eine Unterscheidung in stark oder schwach positive Tumoren, wie ursprünglich erwartet, nicht sinnvoll.

Neuroendokrine Zellen eignen sich ebenfalls für eine elektronenmikroskopische Auswertung. Diese birgt einige Nachteile: Sie ist mit einem größeren Aufwand verbunden als die Immunhistochemie, ist teurer, benötigt viel Zeit und unterliegt häufiger Fehlern (32).

7.2 Allgemeine Patientendaten

Das Patientenkollektiv entspricht einem normalen Kollektiv von an Magenkarzinomen Erkrankten, da die allgemeinen Patientendaten, wie im Folgenden beschrieben,

weitgehend den anderen, bisher veröffentlichten Daten über Patienten mit Adenokarzinomen des Magens entsprechen:

Alle Patienten waren bei Diagnosestellung zwischen 30 und 89 Jahren alt mit einem mittleren Alter von 66 Jahren. Bei der Deutschen Magenkarzinom-Studie 1992 mit 1999 Patienten lag der Altersmedian mit 62,3 Jahren geringfügig niedriger (12).

Hinsichtlich der Lokalisation hatten Patienten, deren Tumoren im proximalen Magendrittel lokalisiert waren, die Tendenz eines kürzeren Überlebens, verglichen mit Patienten, deren Tumoren im distalen Drittel des Magens lokalisiert waren. Dies wurde auch in anderen Untersuchungen beobachtet (31).

Im proximalen Drittel des Magens gibt es keine Serosa. Dadurch fehlt eine natürliche Barriere und dort wachsende Tumoren erreichen früher ein "fortgeschrittenes" Stadium als im distalen Magen.

Patienten der Deutschen Magenkarzinom-Studie, deren Tumor im proximalen Magendrittel lokalisiert war, hatten mit einer medianen Überlebenszeit von 17,2 Monaten nach der Operation deutlich kürzer zu leben als Patienten, deren Magenkarzinom im distalen Drittel lokalisiert war und die im Schnitt 40,8 Monate nach der Operation überlebten (51).

Bezogen auf die Überlebenszeiten nach den Laurentypen können wir für unser Patientenkollektiv keine Aussage bezüglich eines besseren oder schlechteren Überlebens für einen der beiden Typen machen.

Lauren et al. stellten in Untersuchungen an Adenokarzinomen des Magens fest, dass der diffuse Typ nach Lauren eine schlechtere Prognose als der intestinale hat (35).

Für den diffusen Typ nach Lauren werden für die operative Therapie größere Resektionsgrenzen als beim intestinalen Typ empfohlen, da der diffuse Typ nach Lauren sich gelegentlich makroskopisch nicht sichtbar in der Magenwand ausbreiten kann (54).

Die Deutsche Magenkarzinom-Studie von 1992 zeigte, dass die Lauren Klassifikation die Prognose nicht beeinflusst (51). Dies wird auf die konsequente Anwendung des größeren Resektionsausmaßes bei Karzinomen des diffusen Typs nach Lauren zurückgeführt (51).

In Anbetracht der Überlebenszeiten im Bezug auf die unterschiedlichen Tumorstadien, anhand der Tumorstadieneinteilung der UICC von 1997 (65), zeigt die vorliegende Untersuchung einen Zusammenhang zwischen einer günstigen Prognose und einem guten Tumorstadium im Gegensatz zu einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem höheren Tumorstadium.

Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens im Stadium Ib und II haben eine bessere Prognose als Patienten mit einem Stadium IIIa oder IIIb Tumor. Dies war zu erwarten.

Das gleiche Patientenkollektiv nach der alten TNM-Klassifikation eingeteilt, gibt keinen klaren Aufschluss auf ein längeres oder kürzeres Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium(28).

Insofern zeigt sich die neue TNM-Klassifikation des Magens auch im Rahmen der hier untersuchten Patientengruppe als aussagekräftiger.

Die Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten ist ein wichtiger prognostischer Faktor (12). Patienten mit tumorfreien regionären Lymphknoten haben eine bessere Prognose als Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen (41).

In dieser Untersuchung haben Patienten mit einem Lymphknotenstatus von N2 (7-15 positive, regionäre Lymphknoten) die Tendenz des schlechteren Überlebens, verglichen mit Patienten, die keine tumorbehafteten Lymphknoten hatten (N0). Von den 16 Patienten, die keine Lymphknotenmetastasen hatten, leben nach fünf Jahren noch zehn (62,5 %). Dagegen lebt von den elf Patienten mit einem N2 Lymphknotenstatus nur noch einer (9,1 %).

Nakamura et al. fanden in einer Untersuchung an 10000 gastrektomierten japanischen Patienten, dass ein positiver Lymphknotenstatus insbesondere im fortgeschrittenen Tumorstadium einen negativen Einfluss auf die Prognose des Patienten hat. Bei Patienten, deren Tumor auf die Mukosa oder Mukosa und Submukosa beschränkt war, betrug die 5-Jahresüberlebensrate 90,3 % bei negativem und 80,5 % bei positivem Lymphknotenstatus (41).

Bei weiter fortgeschrittenen Tumoren betrug die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 34,2 % bei positivem und 70,6 % bei negativem Lymphknotenstatus (41).

Im Rahmen der deutschen Magenkarzinomstudie von 1992 hatten Patienten mit einem negativen Lymphknotenstatus eine 5-Jahres-Überlebensrate von annähernd 70 % (51). Dies entspricht in etwa den Verhältnissen dieses Patientenkollektives.

Bei Rogers et al., der Adenokarzinome des Magens mit Karzinoiden verglich, hatten Patienten unabhängig vom histologischen Typ nach Lauren eine deutlich reduzierte Überlebensrate, wenn sie einen positiven Lymphknotenstatus aufwiesen. Neuroendokrine Karzinome mit regionären Lymphknotenmetastasen hatten eine sechsfach bessere Überlebensrate im Vergleich mit den Patienten, die ein Adenokarzinom des Magens hatten (52).

7.3 Markerergebnisse allgemein

Nach Auswertung aller Präparate zeigte sich ein genereller Unterschied im Färbeverhalten von Chromogranin A und Synaptophysin: Die mit Chromogranin A gefärbten Zellen stellten sich jeweils intensiver positiv dar als die für Synaptophysin. Diese Ergebnisse werden durch anderen Studien unterstützt (13;25). Der Grund liegt darin, dass beide Marker unterschiedliche Strukturen der neuroendokrinen Zelle anfärben (siehe Diskussion unter 7.1.2 und 7.1.3). Die von Chromogranin A dargestellten neuroendokrinen Speichergranula sind etwas größer als die von Synaptophysin markierten Vesikel (13).

7.3.1 Chromogranin A

Die Verteilungsstruktur der Chromogranin-A-positiven Tumoren im vorliegenden Patientenkollektiv ist homogen. Es sind in etwa die Hälfte (27; 50,9 %) der Tumoren positiv für Chromogranin A, wohingegen 26 (49,1 %) negativ für Chromogranin A sind. Vierzehn Tumoren ließen sich nur für Chromogranin A darstellen und nicht für Synaptophysin. Für beide Antikörperfärbungen zeigten 13 Tumoren (24,5 %) eine positive Reaktion.

Chromogranin A gilt als einer der sensitivsten neuroendokrinen Marker (7;18;46). Deshalb kann es durchaus vorkommen, daß sich in einem Tumor neuroendokrine Zellen nur mit Chromogranin A und nicht mit Synaptophysin darstellen lassen.

7.3.2 Synaptophysin

Von den insgesamt 53 Tumoren sind vier ausschließlich für Synaptophysin positiv.

Wiedenmann erklärt dies damit, dass es neuroendokrine Tumorzellen gibt, die keine spezifischen neuroendokrinen Granula enthalten (64).

Neuroendokrine Granula einer Zelle würden sich mit Chromogranin A darstellen lassen (23).

Besonders in entdifferenzierten Tumoren können Zellen ohne spezifische neuroendokrine Granula auftreten, die nur mit Synaptophysin darstellbar sind und negativ für Chromogranin A sind. Im elektronenmikroskopischen Bild sind dann ebenfalls keine neuroendokrinen Granula zu erkennen (64).

Gould erwägt die Möglichkeit, dass Synaptophysin erst nach einer Zelltransformation oder beim malignen Wachstum von bestimmten neuroendokrinen Tumoren auftritt, da es sich bei manchen neuroendokrinen Tumoren (oder auch bei manchen nicht neoplastischen neuroendokrinen Zellansammlungen) nicht darstellen lässt (25). Allerdings scheint Synaptophysin weiterhin einer der neuroendokrinen Marker mit der größten Identifizierungsfähigkeit für neuroendokrine Neoplasmen zu sein (25).

Buffa et al. meinen, dass die Expression von Synaptophysin in Tumorgewebe durch eine maligne Transformation verstärkt wird, wie es in vielen Zellen des Gastrointestinaltraktes beobachtet werden kann (13).

7.3.3 Voruntersuchung

Nach den hier erzielten Ergebnissen ist es nicht sinnvoll, nur einen Tumorblock pro Patient zu untersuchen. Um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, müssen mehrere Blöcke mit Tumormaterial untersucht werden. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass verschiedene Blöcke unterschiedliche Areale eines Tumors repräsentieren. Die neuroendokrine Differenzierung muss nicht über den gesamten Tumor verteilt sein, sondern kann sich auf einzelne Areale beschränken. In den meisten Fällen, die untersucht wurden, zeigt sich, dass auch auf einem Präparat nur innerhalb eines bestimmten Areales positive neuroendokrine Zellen im Tumorgewebe gefunden werden. Dies erklärt, dass sich manche Blöcke einmal anfärben lassen und beim zweiten Mal nicht- und umgekehrt.

Während des Schneidvorganges muss jeder Block zu Anfang neu angeschnitten werden. Dies bedeutet, dass jedesmal Gewebe abgeschnitten wird, welches nicht untersucht werden kann. So kann es passieren, dass man mit dem Schnitt, der gelingt und weiter untersucht wird, gerade kein neuroendokrines Tumormaterial gewinnt, obwohl der Tumor in bestimmten Bereichen eine neuroendokrine Differenzierung zeigt. Dies bedeutet in der Folge, dass es sinnvoll ist, mehr als einen Block pro Patienten zu untersuchen. Ansonsten könnte eine neuroendokrine Subpopulation leicht übersehen werden.

Ein einmalig negativer Befund von Chromogranin A bedeutet nicht, dass der Tumor keinerlei neuroendokrine Tumorzellen enthält.

In jüngeren immunhistochemischen Untersuchungen von Adenokarzinomen des Magens wurden unterschiedliche Anzahlen von Tumorblöcken untersucht. Es gibt Studien, die pro Patient nur einen repräsentativen Block immunhistochemisch auf

neuroendokrine Zellen hin untersucht haben (7). Demgegenüber verwendeten Bonar et al. in ihrer Studie 2-5 Tumorblöcke von einem Patienten (8).

7.4 Markerergebnisse im Einzelnen

7.4.1 Frauen und Männer

Es lässt sich in der vorliegenden Untersuchung keine Aussage hinsichtlich einer Geschlechterbevorzugung eines der beiden neuroendokrinen Marker machen. Bei Männern und Frauen ist die Anzahl der für neuroendokrine Zellen positiven Tumoren annähernd gleich.

Bei Staren et al. finden sich aus 81 Adenokarzinomen des Magens zwölf neuroendokrin positive Tumoren, von denen zehn zu männlichen Patienten und nur zwei zu weiblichen Patienten gehören (56). Einen Erklärungsversuch hierzu bietet er nicht.

7.4.2 Tumorlokalisation

Unter allen untersuchten Tumoren gibt es in allen Dritteln des Magens Adenokarzinome, die eine Gruppe neuroendokriner Zellen enthalten.

Sowohl im proximalen als auch im distalen Drittel sind jeweils mehr Tumoren markerpositiv als negativ.

Im mittleren Drittel, welches dem Korpusbereich entspricht, waren gleich viele Tumoren positiv wie negativ für neuroendokrine Zellen.

Bonar et al. fanden bei ihrer Untersuchung als einziges im Antrum und Pylorus Bereich (entspricht hier dem distalen Magendrittel) mehr endokrin positive Adenokarzinome des Magens als negative (8). In allen anderen Regionen waren mehr endokrin negative Tumoren aufgetreten als positive. Insgesamt ist ein Drittel seiner positiven Tumoren im Antrum und Pylorus Bereich lokalisiert, unabhängig von der Stärke der Expression(8).

Bei Staren et al. finden sich jeweils fünf Tumoren im proximalen und distalen Anteil des Magens, wohingegen nur zwei im mittleren Abschnitt lokalisiert sind (56).

Waldum vermutet, dass ein Großteil der neuroendokrinen Tumoren des Magens ursprünglich von ECL-Zellen (enterochromaffin like cells) und damit vom Fundusbereich ausgeht, da die ECL-Zellen vor allem in der Fundusmukosa lokalisiert sind (61). Dies wird in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt.

Physiologisch finden sich die neuroendokrinen Zellen im Magen auch vermehrt im Fundus- bzw. im Antrum- Pylorusbereich (57). Im Magenkorpus kommen endokrine Zellen vereinzelt in Drüsenschläuchen vor, wohingegen sie gehäuft im Magenfundusbereich am Drüsengrund und im Pylorusbereich in den Drüsenhälsen auftreten (57).

Möglicherweise könnte dies das geringe Vorkommen neuroendokriner Zellen in Adenokarzinomen des mittleren Magendrittels und ein verstärktes Auftreten derartiger Tumorzellen im Bereich des proximalen und distalen Magendrittels erklären, wenn man davon ausgehen würde, dass sich neuroendokrine Tumorzellen aus physiologischen endokrinen Zellen entwickeln, was allerdings nicht unserer Hypothese entspricht (siehe Diskussion 7.5).

7.4.3 Tumorstadien

Die meisten Tumoren des Patientenkollektivs (23, 43,4 %) sind dem Stadium II der TNM-Klassifikation von 1997 der UICC zugeordnet.

Das Stadium II ist des Weiteren das einzige eingeschlossene Tumorstadium, in dem es mehr markerpositive Tumoren (16, 30,2 %) gibt als negative (7, 13,2 %).

In den Stadien Ib, IIIa und IIIb gibt es jeweils mehr negative oder eine gleiche Anzahl von positiven und negativen Tumoren; das Stadium IV war in dieser Untersuchung nicht eingeschlossen (siehe Material und Methodik 4.1).

Dies stimmt nicht ganz mit den dazu bisher veröffentlichten Studien überein:

Bei Staren et al. treten die neuroendokrinen Tumorzellen vermehrt in den Stadien III und IV auf (56).

In der Untersuchung von Ooi et al. an 212 Adenokarzinomen des Magens findet sich ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Chromogranin A positiven neuroendokrinen Zellen in den Stadien III und IV (46). Durch diese Ergebnisse und die Tatsache bestätigt, dass die neuroendokrin-positiven Zellen nur in vereinzelt Arealen der Tumoren zu finden waren (46), unterstützt Ooi die These der multipotenten Stammzelle (siehe Diskussion unter 7.5).

7.4.4 Laurenklassifikation

Die markerpositiven Präparate weisen kein statistisch signifikantes Ergebnis bezüglich eines häufigeren Vorkommens im diffusen oder intestinalen Typ nach Lauren auf.

In den bisherigen immunhistochemischen Untersuchungen kann entweder keine Korrelation zwischen dem Auftreten von endokrinen Zellen und histologischen Subtypen festgestellt werden (46), oder es scheint zumindest die Tendenz zu bestehen, dass beim diffusen Typ nach Lauren eine größere neuroendokrine Expression innerhalb des Tumors vorkommt, als beim intestinalen (7).

Im Rahmen einer ohne Immunhistochemie durchgeführten, älteren Untersuchung hat Nevalainen argentaffine und argyrophile Zellen ebenfalls häufiger im diffusen als im intestinalen Typ nach Lauren gefunden (42).

Bei Bonar et al. traten gleich viele (je zwölf) intestinale und diffuse Adenokarzinome mit neuroendokriner Subpopulation auf. Bei den Tumoren, die negativ für neuroendokrine Zellen waren, waren mehr vom intestinalen Typ nach Lauren als vom diffusen Typ (8).

In einer Untersuchung von Waldum et al. an 41 Adenokarzinomen des Magens, die immunhistochemisch auf eine neuroendokrine Zusatzdifferenzierung untersucht wurden, besteht eine Tendenz zwischen Magenkarzinomen des diffusen Types nach Lauren und einem positiven Nachweis einer neuroendokrinen Differenzierung des Tumors. Als Begründung nennt er die Überlegung, dass alle diffusen Magentumoren neuroendokrinen Ursprungs sind und die, in intestinalen Adenokarzinomen positiven neuroendokrinen Zellen, möglicherweise hyperplastische Zellen darstellen (61).

In der vorliegenden Untersuchung gibt es sowohl mehr Tumoren des intestinalen als auch des diffusen Typs, die eine zusätzlich neuroendokrine Subpopulation aufwiesen, als reine Adenokarzinome.

Lauren hat in der ersten Beschreibung des diffusen und intestinalen Types des Magenadenokarzinoms neuroendokrine Zellen in beiden Tumorarten beschrieben, ein etwas häufigeres Auftreten im diffusen Typ (35).

Die multipotente Stammzelle kann im diffusen ebenso wie im intestinalen Typ eine neuroendokrinen Subpopulation entwickeln, sodass es keinen bevorzugten Typ nach Lauren geben dürfte, würde man die neuroendokrine Differenzierung innerhalb eines Adenokarzinomes mit Ursprung in der multipotenten Stammzelle sehen.

7.4.5 Überlebenszeit

Auf Grund fehlender aussagekräftiger Untersuchungen über die Prognose von Patienten mit Adenokarzinomen des Magens, die zusätzlich neuroendokrine Zellen enthalten, wurden zunächst Ergebnisse derartiger Adenokarzinome des Kolons als Grundlage genommen: Für diese Tumoren wurde in zwei Studien gezeigt, dass Tumoren mit einer neuroendokrinen Subpopulation eine kürzere Überlebenszeit aufweisen (18;26).

Unter der Annahme, dass die gesuchte Untergruppe der Adenokarzinome eine schlechtere Prognose aufweist, schien ein Zeitabstand von mindestens vier Jahren nach Operation ein akzeptabler Zeitabstand, um eine Aussage über die Überlebenszeit zu machen. Die mittlere Überlebensdauer für alle Magenkarzinompatienten beträgt 23 Monate nach Diagnosestellung (siehe Seite 4)(54).

Ooi kann im Rahmen seiner Untersuchung an Adenokarzinomen des Magens mit neuroendokriner Differenzierung keine Aussage über die unterschiedliche Prognose von Patienten mit oder ohne neuroendokriner Subpopulation machen (46). In der von Waldum et al. durchgeführten Untersuchung an Magenkarzinomen mit neuroendokriner Differenzierung läßt sich ebenfalls nichts über die möglicherweise veränderte Prognose aussagen. In letzterem Fall auf Grund eines zu kurzen Beobachtungszeitraumes (61).

Staren et al. hat 81 Karzinome des Magens auf neuroendokrine Zellen untersucht. Er kommt zu dem Schluß, dass die zwölf Karzinome des Magens mit neuroendokrinen Zellen, die in seiner Untersuchung gefunden wurden, besonders aggressiv sind. Alle Tumoren, die neuroendokrine Zellen aufwiesen, waren in einem fortgeschrittenen Stadium und die mittlere Überlebenszeit betrug lediglich 15 Monate nach Diagnosestellung (56).

In einer weiteren Untersuchung von Bonar et al., in der es Überlebensdaten von 78 Patienten mit Adenokarzinomen des Magens gibt, kann keine statistisch signifikante Aussage gemacht werden, ob neuroendokrine Zellen im Tumor eine bessere oder schlechtere Prognose bewirken. Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit neuroendokrinen Zellen innerhalb des Adenokarzinoms beträgt 9 Monate, für Patienten ohne neuroendokrine Subpopulation im Tumor 12,8 Monate. Zu Anfang der Untersuchung war die Hypothese umgekehrt. Als Grundlage galt die Überlegung, dass neuroendokrine Tumore des Magens eine bessere Prognose als Adenokarzinome aufweisen. Bonars Schlussfolgerung lautet, daß Adenokarzinome des Magens mit neuroendokrinen Zellen sich genauso verhalten wie normale Magenkarzinome (8).

Es gibt eine einzige Untersuchung, die von einem besseren Überleben für Patienten mit einer neuroendokrinen Subpopulation in einem Adenokarzinom des Magens spricht.

Radi et al. hat 17 Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens untersucht, die alle jünger als 40 Jahre waren. Die Gruppe der neun Patienten, die neuroendokrine Zellen innerhalb des Tumors besaßen, befanden sich alle in einem frühen Tumorstadium und hatte eine längere Überlebenszeit. Allerdings hatte die Untersuchung mit insgesamt 17 Patienten eine sehr geringe Fallzahl (49).

Für Patienten mit einer positiven Chromogranin-A-Färbung des Tumors gab es keine Korrelation zum Überleben, verglichen mit Patienten, deren Tumoren sich nicht anfärbten. (Abb 6-28)

Es konnte auch hinsichtlich einer positiven Färbung mit Synaptophysin keine Abhängigkeit zum Überleben der Patienten gefunden werden, verglichen mit Patienten, deren Tumoren negativ für Synaptophysin waren. (Abb. 6-29)

Dennoch scheint möglicherweise, im Gegensatz zu Tumoren des Kolons (18;26), eine neuroendokrine Differenzierung innerhalb eines Adenokarzinoms des Magens einen günstigen Effekt auf die Prognose des Patienten zu haben. Dies kann aber nicht abschließend bewertet werden, da die meisten der hier untersuchten Tumoren, die eine positive neuroendokrine Differenzierung zeigten, im Stadium II zu finden. Dies liegt daran, dass nur R0-resezierte Tumoren eingeschlossen wurden und beispielsweise das Stadium IV nicht mit untersucht wurde.

Bei einer Untersuchung von de Bruine waren bei kolorektalen Tumoren auch Dukes D Stadien enthalten, die an sich schon eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit haben (18).

De Bruine diskutiert auch einen möglicherweise bestehenden Einfluß der neuroendokrinen Zellen selbst, die seiner Meinung nach unausgereifter sind und dadurch eine schlechtere Prognose bedingen. Dementgegen liefern Hamada et al. keinen Erklärungsversuch (18; 26) für ein schlechteres Überleben neuroendokrins-positiver Adenokarzinome des Kolons.

7.5 Ursprung der neuroendokrinen Zellen in Adenokarzinomen

Es existieren zwei grundsätzliche Erklärungsversuche für das Auftreten von neuroendokrinen Zellen in Adenokarzinomen:

Die eine Theorie geht davon aus, dass die physiologisch beispielsweise im Magen vorkommenden neuroendokrinen Zellen entarten. Die anderen gehen davon aus, dass eine multipotente Stammzelle existiert, aus der sich verschiedene Subpopulationen bzw. Klone entwickeln können.

Von der Entartung physiologischer neuroendokriner Zellen aus dem Magen geht Nobels aus.

Er fand, dass endokrine Zellen, die nicht neuroendokrinen Ursprungs sind, kein Chromogranin A enthalten.

Andererseits gibt es Zellen in nicht neuroendokrinen Tumoren, die für Chromogranin A positiv sind (43). Für diese Zellen hat er zwei Erklärungsmöglichkeiten:

- 1) Es sind Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems, die vom Tumor angezogen und zur Proliferation angeregt werden, oder
- 2) der Tumor (und dadurch die einzelne Zelle) kann selber eine neuroendokrine Differenzierung durchmachen (43).

Mehrere Autoren begründen die Existenz einer multipotenten Stammzelle damit, dass die neuroendokrinen Tumorzellen nur in einzelnen Tumorarealen auftreten (4;46;49). Auch dann liegen sie häufig vereinzelt und selten gruppiert. In der hier durchgeführten Untersuchung traten die positiven neuroendokrinen Zellen mit einer Ausnahme, bei der sie in Zellhaufen auftraten, ebenfalls verstreut über den Tumor auf, es waren nicht in allen Tumoranschnitten neuroendokrine Zellen zu finden (5.3).

Die Adenokarzinomzelle kann eine neuroendokrine Differenzierung zeigen, auf Grund von intrazellulären Potentialen einer Tumorzelle. Warum und ob andere Zellen auch diese Möglichkeit haben, ob sie diese Möglichkeit gerade nicht oder überhaupt nicht haben, wissen wir nicht.

Neuroendokrine Zellen sind deutlich, auch mikroskopisch, ohne zusätzliche Immunhistochemie als solche zu identifizieren.

Vielleicht stellt die neuroendokrine Zelle auch einen Funktionszustand der Adenokarzinomzelle dar.

Klappenbach hat Tumoren, die zusätzliche neuroendokrine Differenzierung zeigten, in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (32):

Er erklärt das Auftreten eines Tumors, der sowohl Anteile eines Karzinoids wie auch eines Adenokarzinoms enthält („Composite Tumor“), damit, dass es sich um eine multipotente Stammzelle handelt. Sonst ist die enge Mischung von zwei verschiedenen Neoplasmen mit zwei unterschiedlichen Differenzierungsmöglichkeiten schwer zu erklären (32).

Andererseits geht er bei einem „Collision Type Tumor“ von zwei eindeutig getrennten Zelllinien aus, die sich, am gleichen Ort, unabhängig voneinander entwickelt haben (32).

Corsi schließt sich sowohl in der Unterscheidung in „Collision Type Tumoren“ als auch in „Composite Tumoren“ wie auch in deren Entstehung Klappenbach an (16;32). Er selber hat in einem als „Collision Type Tumor“ klassifizierten Karzinom in dessen Adenokarzinomteil eine sehr geringen Anzahl von positiven neuroendokrinen Zellen gefunden (16).

Corsi wirft die Frage auf, ob in jedem schlecht differenzierten Adenokarzinom neuroendokrine Zellen vorkommen (16).

Cox et al. haben nach Tierversuchen mit Ratten an Tumorzellen des Kolons behauptet, dass die neuroendokrinen Zellen des Kolons endodermalen Ursprungs sind und dass die undifferenzierte Karzinomzelle die multipotente Stammzelle ist (17).

Manche weisen darauf hin, dass besonders im proximalen und im distalen Magendrittel gehäuft Adenokarzinome mit neuroendokrinen Tumorzellen auftreten. Eine Lokalisation, in der physiologisch viele neuroendokrine Zellen zu finden sind (57). Dies würde eher die Vermutung bestätigen, daß physiologisch vorhandene Zellen auch dort eher entarten, wo sie vermehrt auftreten.

In der hier durchgeführten Untersuchung ist andererseits das Verteilungsmuster der markerpositiven, neuroendokrinen Zellen, bis auf eine Ausnahme, sehr charakteristisch. Die positiven Tumorzellen sind jeweils verstreut über den Tumor zu finden. Sie zeigen sich weder in allen Tumorblöcken noch in jedem einzelnen Präparat. Dadurch würde eher die These einer multipotenten Stammzelle bestätigt. Diese kann sich im Tumor beispielsweise sowohl in Adenokarzinomzellen als auch zu anderen

Subpopulationen bzw. Klonen, beispielsweise neuroendokrinen Zellen, differenzieren und dadurch unregelmäßig verteilt über den Tumor auftreten.

Es ist für die Immunhistochemie sinnvoller, einen kombinierten Marker z.B. aus Chromogranin A und B zu verwenden, als nur einen Marker. Damit ist die immunhistochemische Analyse sensitiver (21;22).

Ausserdem erscheint es geeigneter, immunhistochemische Marker zu verwenden, deren intrazelluläres Färbeverhalten sich ergänzt, und nicht eine Kombination von Markern zu verwenden, die gleiche oder ähnliche Strukturen einer Zelle anfärben. Sonst könnte leicht eine kleine neuroendokrine Population, beispielsweise in entdifferenzierten Tumoren übersehen werden.

7.6 Ausblick

Eine nochmalige Verlaufsbeobachtung der untersuchten Patienten sollte jeweils fünf Jahre nach dem letzten Operationstermin erfolgen. Dann ist ein ausreichend langer Zeitraum zum Zeitpunkt der Operation verstrichen, der es erlaubt, eine exaktere Aussage über die Prognose der Patienten zu machen.

Sollte es möglich sein, Aussagen über die Prognose von Patienten mit Adenokarzinomen und neuroendokrinen Zellen zu machen, dann sollten in der Folge noch vor einer Operation bei Patienten mit den entsprechenden Einschlusskriterien die Serumchromograninwerte gemessen werden. Dieses Verfahren ist zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Routinemethode.

Ein stark erhöhter Chromogranin A Spiegel im Blut weist auf einen neuroendokrinen Tumor hin (44). Dadurch könnte man anhand von Serumuntersuchungen ein frühes Screening auf endokrine Neoplasie mit einer Markerkombination von Chromogranin A und B unternehmen (21).

Durch Chromogranin A Serumbestimmungen lässt sich nicht auf den zu Grunde liegenden pathologischen Befund schließen. Aus diesem Grund ist diese Untersuchung nicht zur Primärdiagnostik, aber zur Verlaufsbeobachtung geeignet (44).

In der mittleren Chromogranin-A-Serumkonzentration ist kein Unterschied zwischen einem hormonell inaktiven und einem hormonell aktiven Tumor (54).

Für die Bestimmung des Serum Chromograninspiegels ist eine Kombination aus Chromogranin A und B sensitiver als nur einer alleine, ebenso wie bei der immunhistochemischen Untersuchung (22).

Die Bestimmung von Serumkonzentrationen von Chromogranin A erscheint nur mit einer zusätzlichen histologischen Untersuchung der Tumoren sinnvoll. Bei reinen Serummessungen könnte auch eine neuroendokrine Hyperplasie vorliegen, da vor allem die neuroendokrine Zellmasse gemessen wird (10;62).

Tumorzellen, die zu wenige Produkte enthalten, um mit der Immunhistochemie dargestellt zu werden, können mit der in situ Hybridisierung identifiziert werden. Dies kann als Ergänzungsuntersuchung bei Tumoren verwendet werden, die sehr geringe neuroendokrine Differenzierung aufweisen oder als Zusatzuntersuchung zum Nachweis intrazellulärer Hormonsynthese (5).

Eine Untersuchung hinsichtlich Chromogranin A positiver Tumoren und der Frage, ob diese besser oder schlechter auf Chemotherapie ansprechen wäre sehr interessant. Hieraus könnten sich weitere differentialtherapeutische Überlegungen ergeben.

Eine weitere Frage wäre, ob eine Korrelation besteht zwischen Adenokarzinomen des Magens, die positiv auf immunhistochemische neuroendokrine Marker reagieren und anderen, nicht immunhistochemischen Tumormarkern z.B. tumorassoziierten Proteasen.

Weiter Rückschlüsse auf die Herkunft neuroendokriner Tumorzellen könnte eine Untersuchung über die Verteilung von neuroendokrinen Zellen in Adenokarzinomen des Magens vom Typ des Frühkarzinoms verglichen mit Magenkarzinomen im Stadium IV bringen. Im Rahmen einer digitalen Analyse derartiger Tumoren könnte man das exakte Verteilungsmuster herausfinden.

8 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurden Adenokarzinome des Magens von 53 Patienten immunhistochemisch auf neuroendokrine Zellen untersucht.

Das Ziel war herauszufinden, ob es innerhalb einer Untergruppe von Adenokarzinomen des Magens mit neuroendokriner Subpopulation eine Korrelation zu histopathologischen und anatomischen Kriterien gibt und ob eine derartige Untergruppe einen Einfluß auf die Prognose des Patienten hat.

Es wurden nur Tumoren des intestinalen oder diffusen Types nach Lauren eingeschlossen von Patienten, die postoperativ lokal und systemisch tumorfrei waren und die dem Stadium Ib, II oder III der UICC Klassifikation von 1997 angehörten. Alle Tumoren waren schlecht differenziert (G3). Der Operationszeitpunkt lag zwischen 1992 und 1996; um eine ausreichende postoperative Beobachtungsphase zu haben.

Die Tumoren wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Chromogranin A und Synaptophysin gefärbt. Beides sind etablierte Marker, die sich im Färbeverhalten gut ergänzen. Chromogranin A kommt physiologischerweise in allen neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes vor. Von jedem Tumor müssen mehrere Blöcke untersucht werden um eine möglicherweise nur sehr kleine neuroendokrine Zellpopulation nicht zu übersehen.

Die Auswertung erfolgte anhand eines digitalen Bildanalysesystems der GSF in Neuherberg. Dadurch ist eine exakte Messung der angefärbten Tumormasse möglich.

Eine quantitative Abschätzung in stark oder schwach positive Tumoren zeigte sich als nicht sinnvoll, da in allen Tumoren nur eine sehr geringe Anzahl neuroendokrin positiver Zellen auftrat.

Etwas mehr als die Hälfte der untersuchten Adenokarzinome (26 von 35) hatte eine neuroendokrine Subpopulation.

Hinsichtlich histopathologischer oder anatomischer Differenzierung, Verteilung auf männliche und weibliche Patienten und bezogen auf die Prognose des Einzelnen fanden sich keine statistisch signifikanten Resultate. Es ergab sich lediglich die Tendenz eines längeren Überlebens bei Nachweis von neuroendokrinen Zellen. Die größte Anzahl von Tumoren gehörten zum Stadium II der UICC. In diesem gab es mehr Tumore mit neuroendokriner Differenzierung als ohne, im Gegensatz zu allen anderen eingeschlossenen Stadien.

Der Ursprung der neuroendokrinen Zellen liegt möglicherweise in multipotenten Stammzellen, die sich sowohl in eine Adenokarzinomzelle als auch in eine neuroendokrine Zelle differenzieren können, da in nahezu allen Tumoren die neuroendokrinen Zellen verteilt über den gesamten Tumor und nicht in Zellhaufen auftraten.

Es existieren bereits experimentelle Untersuchungen mit neuroendokrinen Serummarkern (z.B. Chromogranin A), die in der Zukunft möglicherweise präoperativ eine relevante neuroendokrine Tumordifferenzierung messen können.

9 ANHANG

9.1 Färbung durch Chromogranin A und Synaptophysin:

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zur Färbung der Präparate durch die Antikörper Chromogranin A (Firma Boehringer /WAK; Clone LK2H10) und Synaptophysin (Firma Dako; Clone SY 38) erläutert:

1. Entparaffinierung
2. Vorbehandlung: 7 min im Kochtopf mit 2l Citratpuffer pH 6,0 erhitzen
3. Schnitte 10 min abkühlen lassen in aqua dest.
4. Primärantikörper auftragen, 1h einwirken lassen;
Verdünnung Chromogranin = 1:15000; Verdünnung Synaptophysin = 1:80
5. 3 mal spülen mit TRIS Puffer
6. Sekundärantikörper auftragen, 30 min einwirken lassen; (Chemate Kit Firma Dako)
7. 3 mal spülen mit TRIS Puffer
8. APAAP Komplex auftragen, 30 min einwirken lassen; (Chemate Kit Firma Dako)
9. 3 mal spülen mit TRIS Puffer
10. Chromogen (Neufuchsin) auftragen, 9 min einwirken lassen (Firma Dako)
11. Spülen in aqua dest
12. Gegenfärben mit Mayer's Hämalaun 10 sec. Kontaktzeit
13. Mit warmen Leitungswasser spülen bzw. bläuen 1-2min
14. aufsteigende Alkoholreihe
15. Xylol
16. Eindecken

Citratpuffer

Für 1000ml

2,1 g Citronensäuremonohydrat (Merck 1.00244) in 1000ml aqua dest. lösen und mit 2 N Natronlauge auf pH 6,0 einstellen

Die Lösung bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahren.

Diese Lösung ist gebrauchsfertig.

Trispuffer-Stammlösung

Für 1000ml

60,5 g Trizma-Base (Sigma T-1503)

in 700ml aqua dest. lösen

mit 2 N Salzsäure auf pH 7,6 einstellen und auf 1000ml auffüllen, pH nochmals kontrollieren und darin 90g NaCl (Merck 1.06404) lösen, in Flaschen abfüllen und bei Raumtemperatur lagern, der hohe Salzgehalt der Lösung verhindert Pilz- oder Bakterienwachstum in der Lösung.

Gebrauchslösung: Die Stammlösung 1:10 mit aqua dest. verdünnen, also 100ml Stammlösung + 900 ml aqua dest.

Hitzedemaskierung im Kochtopf

Schnitte entparaffinieren

2 Liter Citratpuffer pH 6,0 10mMol in den Dampfdruckkochtopf einfüllen und die Kochplatte auf höchste Stufe einstellen, warten bis der Citratpuffer sprudelnd kocht und dann die Schnitte darin einstellen, den Deckel sofort schließen, und dann 7 Minuten kochen lassen.

Die 7 Minuten beinhalten den Druckaufbau und 4 Minuten Kochzeit bei vollem Druck.

Anschließend den Kochtopf von der Heizplatte nehmen und in das Waschbecken stellen, kaltes Wasser darüberlaufen lassen, bis der Topf abgekühlt und der Druck entwichen ist.

Dann den Kochtopf öffnen und langsam kaltes Leitungswasser zulaufen lassen, bis alles abgekühlt ist.

APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)

= indirekte Komplexmethode

Der APAAP- Komplex besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert ist (Enzym-anti-Enzym-Komplex).

Der Primärantikörper bindet zunächst an das im Gewebe liegende Antigen. Je nachdem, aus welchem Tier der Primärantikörper gewonnen wurde, muss ein entsprechender Brückenantikörper eingesetzt werden, damit der APAAP- Komplex anschließend binden kann. Daraus folgt: Bei monoklonalen Antikörpern aus der Maus wird der Primärantikörper durch den Brückenantikörper mit dem APAAP-Komplex verbunden. Wird ein Primärantikörper aus dem Kaninchen eingesetzt, muss man einen zusätzlichen Schritt mit einem Maus-anti-Kaninchenantikörper einfügen, da der APAAP-Komplex sonst nicht binden kann.

Der APAAP- Komplex ermöglicht eine Verstärkung der Reaktion, indem man die Schritte Brückenantikörper und APAAP- Komplex bis zu zweimal hintereinander wiederholt.

Nachteile:

- es kann zu unspezifischen Anfärbungen kommen, da die endogene alkalische Phosphatase in den Proben nicht immer vollständig unterdrückt werden kann.
- Wiederholungen können unspezifische Hintergrundfärbung provozieren.

Vorteile:

- Primärantikörper kann gegenüber der direkten Methode höher verdünnt werden.
- Durch Wiederholungen kann das Farbsignal verstärkt werden.

9.2 Erläuterungen

argyro- und argentaffine Zellen = neuroendokrine Zellen

argyrophile Zellen = ECL- (enterochromaffin-ähnliche) Zellen

argentaffine Zellen = enterochromaffine Zellen:

bilden Serotonin, "gelbe Zellen", basalgekörnt im Gastrointestinaltrakt vorkommend

Argyrophilie= Neigung von bestimmten Substanzen, sich bei den üblichen Silberimprägnationsmethoden mit einem Reduktionsmittel zu schwärzen.

Argentaffinität= Eigenschaft bestimmter Strukturelemente der Zellen und des Gewebes, ammoniakalische Silbernitratlösung von sich aus, ohne Anwendung eines

Reduktionsmittels zu reduzieren, wobei ein schwarzer Silber Niederschlag entsteht (4;48).

9.3 **Abkürzungen**

CG	Chromogranin A
ECL-Zellen	enterochromaffin-ähnliche Zellen
EC-Zellen	enterochromaffine Zellen
EM	Elektronenmikroskop
G-Zellen	Gastrin produzierende Zellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
NSE	Neuronenspezifische Enolase
R0	kein mikroskopischer oder makroskopischer Residualtumor im Bereich
	des Primärtumores
R1	mikroskopischer Residualtumor im Bereich des Primärtumores
R2	makroskopischer Residualtumor im Bereich des Primärtumores
Syn	Synaptophysin
UICC	International Union Against Cancer

10 LITERATUR

1. Aguirre, P., Scully, R., Wolfe, H., DeLellis, R.: Endometrial Carcinoma with Argyrophil Cells: A Histochemical and Immunohistochemical Analysis. *Hum Pathol* 15: 210-217, 1984.
2. Aird, J., Bentall, H.H.: A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J* i; 799-801; 1953.
3. Akoh, J.A., Macintyre, I.M.: Improving survival in gastric cancer: review of 5-year survival rates in English language publications from 1970. *Br J Surg* 79; 293-299; 1992.
4. Azzopardi, J.G., Pollock, D.J. Argentaffin and argyrophil cells in gastric carcinoma. *J Pathol Bact* 86:443-451. 1963.
5. Bishop, A.E., Power, R.F., Polak, J.M.: Markers for neuroendocrine differentiation. *Path Res Pract* 183: 119-128. 1988.
6. Bishop, A.E., Polak, J.M., Faler, P., Ferri, G.-L., Marangos, P.J., Pearse, A.G.E.: Neuron specific enolase: A common marker for the endocrine cells and innervation of the gut and pancreas. *Gastroenterol* 83: 902-912. 1982.
7. Blumenfeld, W., Chandhoke, D.K., Sagerman, P., Turi, G.K.: Neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinomas. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 120(5): 478-481, 1996.
8. Bonar, S.F., Sweeney, E.C.: The prevalence, prognostic significance and hormonal content of endocrine cells in gastric cancer. *Histopathology* 10: 53-63. 1986.
9. Bonenkamp, J.J., van de Velde, M.D., Kampschöner, G.H., Hermans, J., Hermanek, P., Bemelmans, M., Gouma, D.J., Sasako, M., Maruyama, K.: Comparison of factors influencing the prognosis of Japanese, German, and Dutch gastric cancer patients. *World J Surg* 17; 410-415; 1993.
10. Borch, K., Stridsberg, M., Burman, P., Rehfeld, J.F.: Basal chromogranin A and gastrin concentrations in circulating correlate to endocrine cell proliferation in type-A Gastritis. *Scand J Gastroenterol* 32: 198-202. 1997.
11. Bordi, C., Yu, J.Y., Baggi, T.B., Davoli, C., Pilato, F.P., Baruzzi, G., Gardini, G., Zamboni, G., Franzin, G., Papotti, M., Bussolati, G.: Gastric carcinoids and their precursor lesions. A histologic and immunohistochemical study of 23 cases. *Cancer* 67: 663-672. 1991.
12. Böttcher, K., Roder, J.D., Busch, R., Fink, U., Siewert, J.R., Hermanek, P. und Meyer, H.J.: Epidemiologie des Magenkarzinoms aus chirurgischer Sicht. *Ergebnisse der Deutschen Magenkarzinom-Studie 1992. Dtsch med Wschr* 118, 729- 726, 1993.
13. Buffa, R., Rindi, G., Sessa, F., Gini, A., Capella, C., Jahn, R., Navone, F., De Camilli, P., Solcia, E.: Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours. *Molecular and Cellular Probes* 2: 367-381, 1988.
14. Capella, C., Heitz, P., Höfler, H., Solcia, E., Klöppel, G.: Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* 55 (suppl 3): 11-23, 1994.
15. Clayton, F., Ordonez, N., Sibley, R., Hanssen, G.: Argyrophilic breast carcinomas. Evidence of lactational differentiation. *Am J Surg Pathol* 6: 323-333, 1982.
16. Corsi, A., Bosman, C.: Adenocarcinoma and atypical carcinoid: morphological study of a gastric collision-type tumour in the carcinoma-carcinoid spectrum. *Ital J Gastroenterol* 27: 303-308, 1995.

17. Cox, W.F., Pierce, G.B.: The endodermal origin of the endocrine cells of an adenocarcinoma of the colon of the rat. *Cancer* 50: 1530-1538. 1982.
18. De Bruine, A., Wiggers, T., Beek, C., Volovics, A., von Meyenfeldt, M., Arends, J., and Bosman, F.: Endocrine cells in colorectal adenocarcinomas: Incidence, hormone profile and prognostic relevance. *Int J Cancer* 54: 765-771, 1993.
19. Dijkhuizen, S., Entius, M., Clement, M., Polak, M.M., van den Berg, F.M., Craanen, M.E. Slebos, R.J.C., Offerhaus, G.J.A.: Multiple hyperplastic polyps in the stomach: evidence for clonality and neoplastic potential. *Gastroenterology* 112; 561-566; 1997
20. Dorant, E., van den Brandt, P., Goldbohm, R., Sturmans, F.: Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma. *Gastroenterology* 110; 12-20; 1996.
21. Eriksson, B., Arnberg, H., Ödberg, K., Hellman, U., Lundqvist, G., Wernstedt, C., Wilander, E.: Chromogranins - new sensitive markers for neuroendocrine tumors. *Acta Oncologica* 28, Fasc. 3: 325-329. 1989.
22. Eriksson, B., Arnberg, H., Ödberg, K., Hellman, U., Lundqvist, G., Wernstedt, C., Wilander, E.: A polyclonal antiserum against chromogranin A and B - a sensitive marker for neuroendocrine tumours. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 122,2: 145-155, 1990.
23. Facer, P., Bishop, A.E., Lloyd, R.V., Wilson, B.S., Hennessy, R.J., Polak, J.M.: Chromogranin a newly recognized marker for endocrine cells of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 89: 1366-1373, 1985.
24. Fahrenkamp, A.G., Wibbeke, C., Winde, G., Öfner, D., Böcker, W., Fischer-Colbrie, R., Schmid, K.W.: Immunohistochemical distribution of chromogranins A and B and secretogranin II in neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 426: 361-367. 1995.
25. Gould, V.E., Wiedenmann, B., Lee, I., Schwechheimer, K., Dockhorn-Dworniczak, B.: Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol* 126: 243-257, 1987.
26. Hamada, Y., Oishi, A., Shoji, T., Takada, H., Yamamura, M., Hioki, K., Yamamoto, M.: Endocrine cells and prognosis in patients with colorectal carcinomas. *Cancer* 69(11): 2641-2646, 1992.
27. Hatz, R.A., Lehn, N., Kaps, M.F., Bayerdörffer, E., Stolte, M., Schildberg, F.-W.: Die Prävalenz der Helicobacter pylori-Infektion beim Magenkarzinom. *Der Chirurg* 67; 403-408; 1996.
28. Hermanek, P., Scheibe, O., Spiessl, B., Wagner, G. TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Kapitel: Tumoren des Verdauungstrakts, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 4. Auflage, 2. Revision 1992, S. 48.
29. Höfler, H., Stier, A., Schusdziarra, V., Siewert, J.R.: Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas und ihre therapeutische Relevanz. *Chirurg* 68:107-115, 1997.
30. Ji, B.-T., Chow, W.-H., Yang, G., Mc Laughlin, J.K., Gao, R.-N., Zheng, W., Shu, X.-O., Jin, F., Fraumeni, J.F., Gao, Y.-T.: The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in Shanghai, China. *Cancer* 15; 77(12); 2449-2457; 1996.
31. Kampschöer, G.H., Nakajima, T., van de Velde, C.J.: Changing patterns in gastric adenocarcinoma. *Br J Surg* 79; 914-916. 1989.
32. Klappenbach, R.S., Kurman, R.J., Sinclair, C.F., James, L.P.: Composite carcinoma-carcinoid tumors of the gastrointestinal tract. A morphologic, histochemical, and immunocytochemical study. *Am J Clin Pathol* 84: 137-143, 1985.
33. Lauren, P.A., Nevalainen, T.J.: Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Cancer* 71(10); 2926-2933. 1993.
34. Lauren, P.A.: Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 26(suppl 180): 160-164. 1991.

35. Lauren, P.A.: The two histologic main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal -type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 64: 31-49. 1965.
36. Lechago, J.: Gastrointestinal Pathology Symposium-Part 2. Gastrointestinal neuroendocrine cell proliferations. *Human Pathology* 25(11): 1114-1122, 1994.
37. Maehara, Y., Emi, Y., Baba, H., Asachi, Y., Akazawa, K., Ichiyoshi, Y., Sugimachi, K.: Recurrences and related characteristics of gastric cancer. *Br J Surg* 74; 975-979, 1996.
38. Matsui, K., Jin, X.M., Kitagawa, M., Miwa, A.: Clinicopathologic features of neuroendocrine carcinomas of the stomach. Appraisal of small cell and large cell variants. *Arch Pathol Lab Med Vol* 122: 1010-1017. 1998.
39. Ming, S.C.: Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 39; 2475-2485; 1977.
40. Murayama, H., Tamaki, I., Masahiro, K.: Solid Carcinomas of the Stomach. A Combined Histochemical, Light and Electron Microscopic Study. *Cancer* 51: 1673-1681, 1983.
41. Nakamura, K., Ueyama, T., Yao, T., Xuan, Z.X., Ambe, K., Adachi, Y., Yakeishi, Y., Matsukuma, A., Enjoji, E.: Pathology and Prognosis of Gastric Carcinoma. Findings in 10,000 Patients Who Underwent Primary Gastrektomy. *Cancer* 70: 1030-1037, 1992.
42. Nevalainen, T.J., Lauren, P.A.: Endocrine cells in gastric carcinoma. *Tumor Res* 19: 21-24. 1984.
43. Nobels, F.R.E., Kwekkeboom, D.J., Bouillon, R., Lamberts, S.W.J.: Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Europ J Clin Invest* 28: 431-440. 1998.
44. Nobels, F.R.E., Kwekkeboom, D.J., Coopmans, W., Schoenmakers, C.H.H., Lindemans, J., de Herder, W.W., Krenning, E.P., Bouillon, R., Lamberts, S.W.J.: Chromogranin A as serum marker for neuroendokrine neoplasia: Comparison with Neuron-Specific Enolase and the α - subunit of glycoprotein hormones. *JCE & M* 82, 8: 2622-2628. 1997.
45. Noltenius, H., Hrsg.: Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren. in 4 Bd. 4.Aufl. München; Wien; Baltimore. Urban und Schwarzenberg. 1987.
46. Ooi, A., Mai, M., Ogino, T., Ueda, H., Kitamura, T., Takanaski, Y., Kawahara, E., Nakamishi, I. Endocrine differentiation of gastric adenocarcinoma. The prevalence as evaluated by immunoreactive chromogranin A and its biological significance. *Cancer* 62: 1096-1104, 1988.
47. Otsuji, E., Yamaguschi, T., Hagiwara, A., Taniguchi, H., Takahashi, T.: Recent advances in surgical treatment have improved the survival of patients with gastric carcinoma. *Cancer* 82(7): 1233-7. 1998.
48. Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch. Sonderausgabe Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 257.Auflage, Hamburg. Nikol Verlagsgesellschaft mbH, 1993, S. 103.
49. Radi, M.J., Fenoglio- Presier, C.M., Bartow, S.A., Key, C.R., Pathak, D.R.: Gastric carcinoma in the young: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Am J Gastroenterol* 81: 747-756. 1986.
50. Riede, U.N., Schaefer, H.E. Krekeler, G.R.: Digestorisches System in „Allgemeine und spezielle Pathologie“, Riede, U.N., Schaefer, H.E. (Hrsg.) 3. neu bearb. Auflage. Stuttgart; New York: Thieme. 1993. S. 692-705
51. Roder, J.D., Böttcher, K., Siewert, J.R.: Prognostic factors in gastric carcinoma. Result of the German Gastric Cancer Study 1992. *Cancer* 72:2089-2097, 1993.
52. Rogers, L.W., Murphy, R.C.: Gastric carcinoid and gastric carcinoma. Morphologic correlates of survival. *Am J Surg Pathol* 3: 195-202. 1979.

53. Schürmann, G., Betzler, M., Buhr, H.J.: Chromogranin A, neuron-specific enolase and synaptophysin as neuroendocrine cell markers in the diagnosis of tumours of the gastro-entero-pancreatic system. *Eur J Surg Oncol* 16 (4): 298-303. 1990.
54. Schürmann, G., Raeth, U., Wiedenmann, B., Buhr, H., Herfarth, C.: Serum chromogranin A in the diagnosis and follow-up of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract. *World J Surg* 16: 697-702. 1992.
55. Solcia, E., Rindi, G., Fiocca, R., Villani, L., Buffa, R., Ambrosiani, L., Capella, C.: Distinct patterns of chronic gastritis associated with carcinoid and cancer and their role in tumorigenesis. *Yale J Biol and Med* 65: 793-804. 1992.
56. Staren, E.D., Lott, S., Saavedra, V.M., Jansson, D.S., Deziel, D.J., Saclarides, T.J., Meanderino, G.L., and Gould, V.E.: Neuroendocrine carcinomas of the stomach - a clinicpathologic evaluation. *Surgery* 112: 1039-1047, 1992.
57. Statistisches Bundesamt, Bonn: Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4, „Todesursachen in Deutschland,, 1999.
58. Stevens, A., Lowe, J.S., Kapitel 10 Verdauungstrakt in „Histologie“ Stevens, A., Lowe, J.S. (Hrsg.). Weinheim; Basel (Schweiz); Cambridge; New York, NY: VHC. 1992, S. 160-164.
59. Ulich, T., Kollin, M., and Lewin, K.: Composite Gastric Carcinoma. Report of a tumor of the carcinoma-carcinoid spectrum. *Arch Pathol Lab Med* 112: 91-93, 1988.
60. Viste, A., Eide, G.E., Halvorsen, K., Maartman-Moe, H., Soreide, O.: The prognostic value of Lauren`s histopathological classification system and ABO blood groups in patients with stomach carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 12(2); 135-141; 1986.
61. Waldum, H.L., Aase, S.: Neuroendocrine differentiation in human gastric carcinomas. *Cancer* 1;83(3): 435-44, 1998.
62. Waldum, H.L.; Arnestad, J.S., Brenna, E., Eide, I., Syversen, U., Sandvik, A.K.: Marked increase in gastric acid secretory capacity after omeprazole treatment. *Gut* 39: 649-53, 1996.
63. Wiedenmann, B., John, M., Ahnert-Hilger, G., Riecken, E.O.: Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *J Mol Med* 76(9): 637-47, 1998.
64. Wiedenmann, B., Rancso, C., Ahnert-Hilger, G., John, M., Stein, H., Riecken, E.O.: Secretory vesicles in neuroendocrine cells markers for intestinal tumor differentiation. *Gastroenterology* 112(Suppl.): A419, 1997.
65. Wittekind, Ch., Wagner, G., TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Kapitel: Tumoren des Verdauungstrakts, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Auflage. 1997, S. 49-59.
66. Yamashina, M., Flinner, R.: Concurrent occurrence of adenocarcinoma and carcinoid tumor in the stomach: a composite tumor or collision tumors? *Am J Clin Pathol* 83: 233-236. 1985.
67. Yang, G.C.H., Rotterdam, H.: Mixed (composite) glandular-endocrine cell carcinoma of the stomach. Report of a case and review of literature. *Am J Surg Pathol* 15(6): 592-598. 1991.

11 LEBENS LAUF

Name: Eva Regina Gutdeutsch, geb. Schlicht
 Geburtsdatum: 5. September 1974
 Geburtsort: München
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet mit Dr. J. Peter Gutdeutsch
 Eltern: Hannelore Schlicht, geborene Kohlmayer, und Gerhard Schlicht
 Geschwister: Thomas Schlicht, geboren 1978

1981- 1985 Grundschule, Unterhaching
 1985- 1991 Gymnasium Unterhaching
 1991- 1992 High School Diploma der Nevada Union High School in Kalifornien, USA
 1992- 1994 Kollegstufe, Gymnasium Unterhaching
 1994 Allgemeine Hochschulreife

1994- 2000 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
 8/1996 Ärztliche Vorprüfung
 8/1997 1. Staatsexamen
 3/2000 2. Staatsexamen
 4/2000 Wechsel an die Universität Regensburg zum Praktischen Jahr
 4/2001 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:
 4- 8/2000 Dermatologie: Universitätsklinikum Regensburg
 8-10/2000 Allgemein Chirurgie: Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spanien
 10-12/2000 Chirurgie: Universitätsklinikum Regensburg
 12- 3/2001 Innere Medizin: Universitätsklinikum Regensburg

ÄiP:
 4/2001- 10/2002 II. Med. Klinik im Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg

Assistenzärztin
 ab 10/2002 II. Med. Klinik im Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg

12 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand von 1997 bis 2000 an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar in München mit Unterstützung des Institutes für Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München. Nach Fertigstellung der Dissertationsschrift möchte ich allen danken, die das Zustandekommen ermöglichten.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Siewert, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Prof. Lehr danke ich für die Überlassung des Themas.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Vogelsang und Herrn Dr. Negele danken, die diese Arbeit förderten und über die gesamte Entstehungszeit kontinuierlich und motivierend betreuten.

Herrn Prof. Dr. Höfler danke ich für die Anregungen und Kritik, die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung, Überlassung der Arbeitsplätze im Labor der Pathologie und bei der GSF in Neuherberg.

Frau PD. Dr. I. Becker für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Für ihre Kooperation und Begutachtung der Präparate möchte ich Herrn Dr. Müller und Herrn Dr. Barbur danken.

Frau Klara Fitzi danke ich für ihre Anleitung beim Erstellen der histologischen Präparate, ihre stetige Motivation, Hilfsbereitschaft und Aufmunterung.

Herrn Gais und Frau Jütting von der GSF in Neuherberg möchte ich sehr für die Hilfe bei der Auswertung der Präparate, den kritischen Anmerkungen und der statistischen Auswertung der Ergebnisse danken.

Mein Dank gilt besonders meinem Mann, J. Peter Gutdeutsch, für seine ständige Motivation und Geduld.