

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker)

Proliferationsverhalten der Bronchialkarzinome

**Vergleichende Untersuchung
der statischen DNA-Image-Analyse mit der Immunhistochemie**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Dirk Baumann
aus Dortmund
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bürger

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker)
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bürger
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

Zusammenfassung

Proliferationsverhalten der Bronchialkarzinome Vergleichende Untersuchung der statischen DNA-Image-Analyse mit der Immunhistochemie

Dirk Baumann

Von 799 unselektierten Thoraxtumoren wurden zytologische Präparate für eine anschließende DNA-Zytometrie angefertigt. Die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich statischer und dynamischer Parameter der DNA-Zytometrie und der immunhistochemischen Parameter MIB-1 wurden ausgewertet und miteinander verglichen.

Als wesentliches Ergebnis zeigen sich kongruente Kurven beim Vergleich der DNA-Proliferationsfraktion (S/G₂/M-Phase) mit MIB-1. Dabei ist das immunhistochemische Ergebnis deutlich größer. Dies wird durch eine Rechtsverschiebung im Kurvenverlauf verdeutlicht. Die genetische Bestimmung der Proliferationsfraktion und die epigenetische Bestimmung an einem Eiweißmolekül ergeben somit gleichartige Werte. Mit der immunhistochemischen Proliferationsfraktion zeigten sich statistisch signifikante Beziehungen zu den führenden histologischen Wachstumsformen (Höchstwerte bei kleinzelligen Karzinomen), zum histopathologischen Grading (stärkere MIB-1-Expression in entdifferenzierten Tumoren) und zum DNA-Malignitätsgrad. Die Korrelation des Proliferationsmarkers MIB-1 mit dem DNA-Malignitätsgrad und der DNA-Stammlinien-Ploidie weist darauf hin, daß eine erhöhte proliferative Aktivität mit einer zunehmenden Heterogenität auf chromosomaler Ebene von Tumorzellen einhergeht. Der Vergleich zwischen statischen und dynamischen DNA-Parametern zeigt eine signifikante Korrelation, so daß auf Basis dieser Werte eine Aussage zur Wachstumsgeschwindigkeit und Malignität von Karzinomen möglich erscheint. Die Proliferation ist damit ein wesentlicher Prognoseparameter für den Spontanverlauf gerade beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die Beurteilung der Proliferation ist als prädiktiver Faktor entscheidend für das Therapieansprechen (Chemotherapie beim Kleinzeller) und damit für den gesamten Krankheitsverlauf. Der Vergleich von kleinzelligen mit nicht-kleinzelligen Tumoren weist die Kleinzeller als homogenere Gruppe aus. Die Proliferationskinetik der Karzinoide mit sehr niedrigen Werten unterscheidet sich signifikant von allen anderen Tumorarten.

Da die intraindividuelle und interindividuelle Reproduzierbarkeit des Gradings und Typings der malignen Tumoren, insbesondere auch beim Bronchialkarzinom, bekanntermaßen erheblichen Schwankungen unterliegt, ergibt sich durch die Bestimmung der immunhistochemischen Proliferationsparameter eine weitere Hilfe zur Objektivierung des biologischen Tumorverhaltens. Die daraus resultierende Qualitätssicherung wird sich auf die Prognose und die Therapierbarkeit der malignen Erkrankung positiv auswirken.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen in Übereinstimmung mit den Erfahrungen und Bewertungen in der Literatur den hohen Beziehungsgrad der Proliferation zu den etablierten Prognosefaktoren und rücken das MIB-1 an eine zentrale Stelle zur Abschätzung der Prognose von Karzinomerkrankungen.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie maligner Thoraxtumore.....	1
1.2 Entstehung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms	2
1.2.1 Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)	3
1.2.2 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)	4
1.2.3 Histologische Heterogenität.....	4
1.3 Gewebswachstum und Zellzyklus.....	5
1.4 Tumorentstehung und Tumorwachstum.....	6
1.4.1 Ursachen der Tumorentstehung.....	6
1.4.2 Tumorwachstum.....	9
1.5 Prognosefaktoren und Tumormarker.....	11
1.6 DNA-Image-Zytometrie.....	12
1.6.1 Interpretationsmethoden.....	14
1.7 Immunhistochemie.....	17
1.7.1 Ki-67 (MIB-1).....	18
1.8 Ziel der vorliegenden Studie.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Material.....	20
2.2 DNA-Image Zytometrie.....	21
2.2.1 Präparation und Färbung	21
2.3 Histologische Untersuchung.....	22
2.4 Immunhistochemie.....	22

2.4.1 Monoklonale Antikörper.....	23
2.4.2 Immunhistochemische Färbemethoden	23
2.4.2.1 Die Gewebefixierung.....	23
2.4.2.2 Material für die Immunhistochemie.....	25
2.5 Statistik und methodisches Vorgehen.....	25
2.5.1 Datenverarbeitung und Dokumentation.....	25
2.5.2 Überblick über die verwendeten Verfahren.....	25
3 ERGEBNISSE.....	27
3.1 Überblick über die Verteilung im Gesamtkollektiv.....	27
3.2 Altersverteilung.....	27
3.3 Überblick über die histologischen Befunde.....	29
3.4 Ploidie-Status.....	31
3.5 pT-Klassifikation.....	32
3.6 Histopathologisches Grading.....	33
3.7 DNA-Image-Zytometriebefunde.....	33
3.8 Kleinzeller (SCLC) versus Nichtkleinzeller (NSCLC).....	41
3.9 Unterschiede in der S/G2/M-Fraktion im Vergleich zur Histologie.....	49
3.10 Unterschiede in der S/G2/M-Fraktion nach Ploidiestatus.....	50
3.11 Unterschiede in der S/G2/M-Fraktion und G0/G1 -Fraktion.....	51
3.12 Unterschiede des MIB-1 im Vergleich zur Histologie.....	52
3.13 Unterschiede des MIB-1 je nach Ploidiestatus.....	54

3.14 Unterschiede des MIB-1 je nach G0/G1-Fraktion.....	56
3.15 Vergleich von MIB-1 und S/G2/M-Fraktion.....	58
4 DISKUSSION.....	60
4.1 Interpretation der Ergebnisse.....	61
4.1.1 Allgemeine Ergebnisse.....	61
4.1.2 DNA-Zytometriebefunde.....	62
4.2 Beurteilung der Proliferationskinetik.....	65
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	68
5.1 Ausblick.....	70
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	71
7 DANKSAGUNG.....	82
8 LEBENS LAUF.....	83
9 ANHANG.....	I
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	I
9.2 Tabellenverzeichnis.....	III

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie maligner Thoraxtumore

Weltweit gibt es jährlich etwa 1,3 Millionen Neuerkrankungen maligner Thoraxtumore mit steigender Tendenz bei Frauen und jüngeren Patienten. Allein in Deutschland sterben jährlich über 45000 Personen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms. Statistisch erkrankt jeder 20. Mann in Deutschland und liegt damit in 35% aller Neoplasien zu der am häufigsten zum Tode führenden malignen Erkrankung [100]. Bei den Frauen steht in Deutschland das Bronchialkarzinom noch hinter dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom in der Statistik der durch Malignome bedingten Todesursachen. Jedoch ist aufgrund der zunehmenden Erkrankungshäufigkeit damit zu rechnen, daß in den kommenden Jahren - wie schon heute in den USA - auch in Deutschland das Bronchialkarzinom die häufigste malignombedingte Todesursache bei Frauen sein wird.

Wie bei den meisten malignen Tumoren ist die Ätiologie der Thoraxkarzinome nicht vollständig geklärt. Als gesicherte Faktoren für die Entstehung einer malignen Neoplasie sind Zyanide und Aldehyde (Gasphase des Tabakrauches) gesichert [72, 67, 129].

Bronchialkarzinome weisen initial oft keine spezifischen Krankheitssymptome auf, so dass die Erkrankung lange unbemerkt verläuft. Nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC) werden in ca. 25-30% in den Stadien I und II, in 30% im Stadium III und in 40% im Stadium IV diagnostiziert. Kleinzellige Karzinome (SCLC) werden in 60-70% erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. Die Überlebensrate ist dementsprechend eingeschränkt bis schlecht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überlebenszeit nach klinischem und pathologischem Stadium

Fünf-Jahres -	Überlebensrate				
		klin. Stadium	pathol. Stadium		
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Alle Stadien		13%		
	Stadium	IA	61%	67%	
		IB	38%	57%	
	Stadium	IIA	34%	55%	
		IIB	24%	39%	
	Stadium	IIIA	13%	23%	
	Stadium	IIIB	5%		
	Stadium	IV	1%		
	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Alle Stadien			< 5%

Die Bestimmung zuverlässiger reproduzierbarer Parameter, die bereits zum Zeitpunkt der primären Diagnose Aufschluss über die Prognose oder das Ursachenspektrum der Tumorentstehung geben könnten, würde eine verbesserte und individuell konzipierte Therapie für den einzelnen Patienten ermöglichen [98].

Für die klinische, routinemäßige Therapieentscheidung gelten die Richtlinien der Konsensuskonferenz von St. Gallen 1995. Sie basieren auf den klassischen Prognosefaktoren Tumorgöße, Lymphknotenstatus, Rezeptorstatus und Grading [59]. Seit Einführung der DNA-Image-Zytometrie gelang darüber hinaus die Identifizierung obligater Präkanzerosen sowie eine objektive und reproduzierbare Malignitätsgraduierung verschiedener Tumoren. Mit diesen Untersuchungsmethoden (TNM-Klassifikation, histologischer Typ, Grading) sowie den statischen Parametern der DNA-Zytometrie konnte bislang jedoch keine Aussage hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors gemacht werden. Durch Einbeziehung dynamischer Parameter der DNA-Zytometrie (S/G₂/M-Phase des Zellzyklus) sowie immunhistochemisch nachweisbarer Parameter (Ki67, MIB-1) sollten Rückschlüsse auf die Proliferationskinetik eines Tumors möglich sein.

1.2 Entstehung und Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Bei einem vereinfachten Modell der Karzinomentstehung unterscheidet man mehrere Phasen: Die **Initiation** (Karzinogenexposition bis hin zur DNA-Schädigung), die **Promotion** (Exposition von nicht DNA-schädigenden Substanzen, die jedoch die maligne Zelltransformation unterstützen) und schließlich die **Progression**

(stufenweise Malignisierung transformierter Zellen). Für die Tumorentstehung sind dabei die Inaktivierung tumorsupprimierender Genprodukte oder aber die Aktivierung von Proteinen, die in Wachstum und Differenzierung eingreifen, verantwortlich [117]. Zum Verständnis regulatoriver Prozesse ist daher die Untersuchung der malignen Transformation auf DNA-Ebene an Tumorzellen von großer Bedeutung. Bronchialkarzinome lassen sich aufgrund ihrer histologischen Merkmale in zwei große Gruppen unterteilen, die kleinzelligen (SCLC) und nicht-kleinzelligen (NSCLC) Tumoren, wobei Mischformen auftreten können. Bei den nicht-kleinzelligen Karzinomen unterscheidet man zwischen Adenokarzinomen (ADC), Plattenepithelkarzinomen (SCC) und großzelligen, undifferenzierten Karzinomen (LCC), kleinzellige Karzinome werden nicht weiter differenziert [111].

1.2.1 Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC)

SCLC werden bei etwa 25 % aller Primärtumoren der Lunge diagnostiziert [82]. Die Bezeichnung leitet sich vom histologischen Bild eines durchschnittlichen kleinen Zellkerns von 5,1µm und der Gesamtzelle von ca. 6,6 µm ab [100]. Kleinzellige Bronchialkarzinome zeichnen sich durch schnelles und aggressives Wachstum aus, die Tumoren treten zur Zeit der Diagnose meist schon disseminiert auf und sind somit chirurgisch nicht mehr zu entfernen. Weiterhin zeigen sie eine hohe Sensibilität gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika [1], die Prognose ist jedoch sehr schlecht und weniger als 10 % aller Patienten zeigen eine vollständige klinische Heilung [27]. Zytogenetisch weisen 100 % aller SCLC-Zelllinien eine interstitielle Deletion des Chromosoms 3p auf, vor allem der Abschnitte 3p14-23 und 3p25 [81, 98]. Neben anderen Deletionen oder Translokationen kommen eine Herabsetzung oder ein Fehlen der Expression von mRNA des Retinoblastom(Rb)-Tumorsuppressorgens bei 55 % aller SCLC vor, und ein Fehlen des Proteins konnte in 80 % der Tumoren und Zelllinien gezeigt werden [139,81,119]. Dieses für die Regulation des Zellzyklus wichtige Tumorsuppressorgen fehlt also bei diesen Tumoren. SCLCs und abgeleitete Zelllinien werden außerdem durch die Sezernierung neuroendokriner Marker wie L-Dopa-Decarboxylase (DDC), Chromogranin A und neuronspezifischer Enolase (NSE) charakterisiert und exprimieren neben der neuronalen Form der Kreatinkinase (CK-BB) zum Teil bis zu zehn unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie ACTH, Kalzitinin, Neuromedin B, Gastrin-releasing-Peptid (GRP), IGF-I (insulin-like growth factor), Gastrin, Neurotensin u.a. Viele dieser

Faktoren besitzen mitogene Eigenschaften und binden an zelleigene Rezeptoren, wodurch die Zellen para- bzw. autokrin das Tumorwachstum stimulieren können [96,126,102].

1.2.2 Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC)

Unter NSCLC werden alle bösartigen Epithel-Tumoren der Lunge zusammengefaßt, die nicht SCLC sind [143], eine Ausnahme bilden die Karzinoide, die den Bronchialadenomen zugeordnet werden und etwa 1-2 % aller Lungentumoren ausmachen. Sie haben nur ein geringes metastasierendes Potential bei geringer Wachstumsrate. Ihre gut untersuchten neuroendokrinen Eigenschaften sind ebenfalls ein Grund, sie nicht zu den NSCLC zu zählen [60]. Insgesamt liegt die Häufigkeit von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen bei ca. 80 % aller Lungentumoren, wobei die Plattenepithelkarzinome mit 31-45 % den größten Teil ausmachen [111]. Die Zuordnung zu den Untergruppen orientiert sich an der histologischen Differenzierung der Tumoren, z.B. plattenepithelialen oder drüsigen Strukturen. Die durchschnittliche Kerngröße liegt bei etwa 9 µm, die der Gesamtzelle bei 14 µm [100]. Das Wachstum und der Differenzierungsgrad von NSCLC sind auch innerhalb der Untergruppen sehr vielfältig. Zytogenetisch liegt bei 50 % aller NSCLC ebenfalls eine Deletion des Chromosoms 3p vor [98], und 20 % zeigen eine gestörte Expression von Retinoblastom-Produkten. Punktmutationen des Tumorsuppressorgens p53 kommen bei 42 % aller NSCLC und bei 100 % aller SCLC vor [39,102]. Im Gegensatz zu den SCLC ist die Sezernierung von Hormonen und Wachstumsfaktoren bei den NSCLC gering bis fehlend [55,13,1], Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF treten dagegen vermehrt auf [136].

1.2.3 Histologische Heterogenität

Bronchialkarzinome zeigen eine ausgeprägte Heterogenität. Gut 50 Prozent der Lungenkarzinome besitzen mehr als einen Tumortyp. Diese Tatsache muß mit der präoperativen Tumorklassifikation berücksichtigt werden. Eine definitive histologische Typisierung läßt sich aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Bronchialkarzinome häufig erst am Resektat erstellen. Vergleicht man die Größe der Biopsieartikel, maximal 2-3 mm der Bronchusschleimhaut-PE und das Gewicht der

mediastinalen Lymphknoten von 0,1-1,5 g mit der Größe des Tumors am Resektionspräparat, wird klar, daß die Biopsien und die Mediastinoskopien immer eine eingeschränkte Aussagekraft im Hinblick auf die definitive Diagnose besitzen. Insbesondere die Subklassifikation der Adenokarzinome kann Probleme aufwerfen, da gerade diese Tumoren eine ausgeprägte Heterogenität aufweisen. Nur wenige Adenokarzinome zeigen ein einheitliches Wachstumsmuster. Die unterschiedlichen Wachstumsmuster des Adenokarzinoms sollen in der Klassifikation mitgenannt werden, z. B. Adenokarzinom mit papillären, tubulären und kribriformen Mustern. Allerdings hat die Subtypisierung der Adenokarzinome im wesentlichen differentialdiagnostische Bedeutung, z.B. bei der Abgrenzung gegenüber Absiedlungen primär extrapulmonaler Malignome mit vergleichbarem Wachstumsmuster.

1.3 Gewebswachstum und Zellzyklus

Normale menschliche Zellen und Gewebe sowie die daraus resultierenden Neoplasien, werden als in Teilung befindlich definiert, wenn ein Teil der Zellpopulation aktiv DNA synthetisiert. Obwohl ein Großteil der normalen erwachsenen Zellen sich im postmitotischen Stadium befindet und daher teilungsunfähig ist, sind Gewebe wie z.B. Epithel und Knochenmark in der Lage, sich ständig durch Zellproliferation zu erneuern. Aktiv proliferierende Zellen durchlaufen dabei vier Stadien. Die einzelnen Phasen sind G_1 [(Bereitstellen der Komponenten für die Synthese-Phase (z.B. Enzyme)], S (Synthese von DNA und anderen Zellbestandteilen), G_2 (Vorbereitung der Zellteilung), M (Mitose, Zellteilung): Das G steht für Gap (engl.: Lücke) (Abb.1).

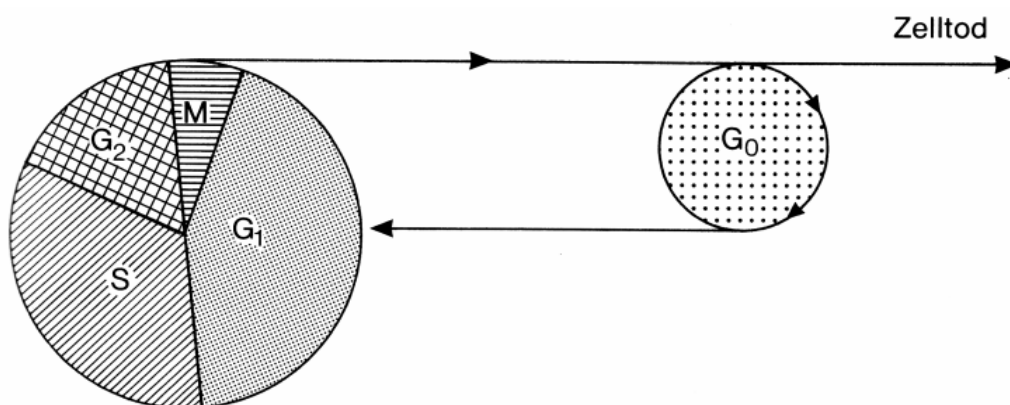


Abbildung 1: Zellzyklusphasen

Menschliche Keimzellen weisen den einfachen (haploiden) Chromosomensatz auf. Bevor die Zellkerne in die G_2 -Phase übertreten, findet im Synthesestadium die Verdoppelung der Erbsubstanz statt. Während dieser S-Phase liegt der DNA-Gehalt des Zellkerns zwischen 2c und 4c. Nach Beendigung der Synthese liegt im Stadium G_2 ein vierfacher Chromatidensatz (4c) vor, der als tetraploid bezeichnet wird [62,18]. Diploide Zellen haben einen DNA-Gehalt von 7,14 Pikogramm (pg) in ihrem Kern (entspricht 2c, dem doppelten Chromosomensatz), wenn sie in den Teilungszyklus eintreten. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Zelle in der G_1 -Phase. Während der Synthesephase steigert die Zelle ihren DNA-Gehalt kontinuierlich von 7,14 auf 14,28 pg, wodurch die Zelle den tetraploiden Status mit dem doppelten diploiden DNA-Gehalt erreicht. Die G_2 -Phase bezeichnet diesen tetraploiden oder auch prämitotischen Status. Maligne Zellen durchlaufen den gleichen Teilungszyklus.

Das normale Gewebe ist einem physiologischen Selektionsmechanismus unterworfen, um eine überproportionale Anhäufung von Zellen zu vermeiden. Es sind 3 Varianten des Zelltodes bekannt: Nekrose, terminale Differenzierung und Apoptose. Die letzten beiden sind sogenannte programmierte Zelltodformen. Während die Nekrose (auch akzidenteller Zelltod genannt) stets einen pathologischen Vorgang beinhaltet, handelt es sich bei der Apoptose um eine gewebeschonende, selektive Deletion von Einzelzellen sowie die Abkapselung und Eliminierung der DNA, schädlicher Zellinhaltsstoffe und Zellantigene ohne nachfolgende Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes. Die Apoptose ist zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in der Haut sowie auch zur normalen Embryonalentwicklung essentiell.

Die Zeit, die eine Zelle benötigt, um alle Phasen des Zyklus zu durchlaufen, wird Zellzykluszeit oder Generationszeit genannt. Diese ist von Spezies und Gewebe abhängig und sehr unterschiedlich (normal oder maligne). In der Regel ist die Generationszeit jedoch für malignes Gewebe wesentlich kürzer als für normal proliferierendes Gewebe [48].

1.4 Tumorentstehung und Tumorwachstum

1.4.1 Ursachen der Tumorentstehung

Hinsichtlich der Entstehung bösartiger Geschwülste im menschlichen Organismus gilt heute als sicher, daß bei der Karzinogenese mehrere Faktoren eine Rolle spielen und daß diese bei der Bildung von Malignomen ursächlich zusammenwirken.

Wirken kanzerogene Substanzen oder auch energiereiche Strahlen auf die DNS ein, können sie diese schädigend verändern und die in einzelnen Abschnitten des DNS-Moleküls (Gene) lokalisierten und gespeicherten genetischen Informationen durch Mutation störend beeinflussen. Dies kann letztlich zur malignen Transformation der Zelle führen (maligne Zellentartung).

Die Folgen der Einwirkung von Kanzerogenen sind nicht immer gleich. Zellen, die sich in der Ruhephase, das heißt in der G₀-Phase befinden, reagieren nur selten auf Kanzerogene. Proliferierende Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, besonders aber Zellen in der S- und Mitosephase des Zellzyklus, reagieren dagegen auf eine kanzerogene Einwirkung viel empfindlicher. Allgemein kann gesagt werden, daß Zellen und Gewebe, die sich sehr schnell und häufig vermehren (teilen), für eine maligne Entartung besonders anfällig sind.

Bis heute ist der Ablauf des zellulären Mechanismus bei der malignen Transformation in vielen Punkten ungeklärt. Man geht aber davon aus, daß Protoonkogene/Onkogene sowie Antionkogene (Tumorsuppressorgene) eine entscheidende Rolle dabei spielen.

Die Produkte von Protoonkogenen wirken stimulierend auf die Zellproliferation. Ihre Funktion wird von den Zellen sehr stringent reguliert. Kommt es durch Mutation zu einer Störung der physiologischen Funktion, kann die Zellproliferation von der Zelle nicht mehr oder nur eingeschränkt kontrolliert werden. Man spricht dann nicht mehr von Protoonkogenen, sondern von Onkogenen. Die Mutationen können verschiedenartig sein: Beispielsweise kann ein mutiertes daueraktives Genprodukt gebildet werden oder es kann z. B. durch Zerstörung eines regulatorischen Gens zur Dauerexpression eines proliferationsstimulierenden Proteins kommen. Bis heute sind mehr als 70 verschiedene Onkogene bekannt.

Die Protoonkogene stellen kritische Wirkorte in der zellulären DNS dar, die unter dem Einfluß von Noxen (Schadstoffen) wie z. B. kanzerogenen Substanzen, energiereichen Strahlen und auch Viren zu Onkogenen aktiviert werden können. Tumorsuppressorgene kodieren dagegen Proteine, die das Wachstum von Zellen negativ regulieren. Durch einen Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene kommt es zur Zellvermehrung. Ihre Zerstörung durch Mutation führt aber meist nicht sofort zur malignen Transformation, da in der Regel noch ein zweites intaktes Allel vorhanden ist. Erst wenn beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert sind, kommt es zur Fehlsteuerung der Zellproliferation. Ein wichtiges Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist das p53-Gen.

Ist es zu einer DNS-Schädigung und malignen Entartung gekommen, ist der erste Schritt zur Tumorentstehung getan, jedoch ist es bis zum erkennbaren Tumor noch ein weiter Weg, der sich über einen Zeitraum von Jahren hinziehen kann. Der Organismus verfügt über wirkungsvolle Abwehrmechanismen, die zum einen die an der DNS entstandenen Schäden wieder reparieren und zum anderen die schon maligne entarteten Zellen unschädlich machen können. So wird ein großer Teil der maligne transformierten Zellen schon frühzeitig vom Körper eliminiert, das heißt, sie fallen der normalen Zellmauserung und Abstoßung (Apoptose) anheim oder werden infolge der Fremdkörpereigenschaften von Krebszellen von der Immunabwehr des Körpers zerstört. Die fehlgesteuerte Apoptose findet ihr morphologisches Korrelat in der Tumorentwicklung, in angeborenen Mißbildungen, degenerativen, viralen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen.

Der Apoptoseregulation liegt ein kompliziertes Wechselspiel von verschiedensten intrazellulären und extrazellulären Signalen zu Grunde und erst nach Passieren mehrerer Kontrollpunkte, bei denen der programmierte Zelltod noch unterdrückt werden kann, wird über Induktion oder Inhibition des programmierten Zelltodes entschieden. Verschiedene Signalwege können zur Apoptose führen.

Ein wichtiger Regulator der Apoptose ist das Protoonkogen Bcl-2. Ursprünglich wurde bei einer Untersuchung zum zentroblastischen-zentrozystischen Lymphom am Bruchpunkt einer Translokation t(14;18) das B-Zell-Leukämie/Lymphom-2-Gen nachgewiesen, das auf dem Chromosom 18 q 21 lokalisiert ist. Erst später wurde die Funktion von Bcl-2 als ein die Lebenszeit unreifer prä-B-Zellen verlängerndes Gen erkannt und ihm somit die Funktion der Apoptosehemmung zugesprochen. Bcl-2 ist Bestandteil der Kernmembran von Teilen des endoplasmatischen Retikulums und der äußeren und inneren Mitochondrienmembran. Die Bcl-2-Expression greift über die Hemmung von c-myc, einem Zyklusregulator, in den Zellzyklus ein. Die mitogene Komponente wird spezifisch gehemmt, ohne den proliferativen Anteil zu beeinflussen. Ähnlich verhält es sich auch zwischen Bcl-2 und dem Zyklusregulator p53. p53 arretiert die Zellen nach einer Schädigung in der G₁-Phase des Zellzyklus, um somit eine DNA-Reparatur zu ermöglichen. Bei irreparabler Schädigung wird die Apoptose eingeleitet. Bei gleichzeitiger Expression von Bcl-2 wird die p-53-abhängige Apoptose blockiert. Folglich werden so irreparabel geschädigte Zellen und maligne Zellen nicht eliminiert. Insgesamt kommt dem Bcl-2 eine Schlüsselrolle bei der Apoptoseregulation zu, deren genaue Bedeutung bisher nicht völlig geklärt ist.

Darüber hinaus spielt auch ein oft über längere Zeit andauernder Wachstumsstop, dem selbst große Zellverbände unterliegen, eine Rolle. Bis heute sind die hierfür

verantwortlichen Faktoren noch nicht bekannt. Vermutlich sind es jedoch Gewebshormone mit hemmender Wirkung oder das Fehlen von Gewebshormonen mit anregender Wirkung, die zum Wachstumsstillstand solcher Zellverbände führen. Dabei kann man davon ausgehen, dass er in der Mehrzahl der Fälle aus einer einzigen malignen Zelle entsteht, das heißt, alle Zellen, die den Tumor bilden, sind monoklonal und bilden einen Zellklon (= Gruppe genetisch identischer Zellen, die durch Teilung aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind).

1.4.2 Tumorwachstum

Viele Körpergewebe enthalten eine bestimmte Anzahl von Zellen, die sich teilen und somit selbst erneuern können (Stammzellen). Die Differenzierung solcher Zellen führt zu funktionell ausgereiften Zellen, die bis zum Zelltod definierte Aufgaben erfüllen. Zellteilung und -vermehrung (Proliferation) sowie zelluläre Differenzierung werden jeweils durch bestimmte Gene gesteuert. So kodieren bestimmte Gene proliferationsanregende Proteine, die den Prozeß der Zellteilung steuern. Andere Gene wiederum regulieren die Zelldifferenzierung bzw. die Ausreifung zur Zelle mit bestimmter Zellfunktion. In einem gesunden Gewebe besteht also ein gut kontrolliertes Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Zelldifferenzierung und -tod, so daß normalerweise jedes Gewebe eine harmonische Ausdehnung erreicht, die sich dem Gesamtorganismus einfügt.

In einem malignen Gewebe ist dieses Gleichgewicht gestört. Die zelluläre Differenzierung wird in einem frühen Stadium der Reifung blockiert. Die Tumorzelle besitzt nur noch einzelne funktionelle Eigenschaften einer ausgereiften Zelle, während die Fähigkeit zur Proliferation uneingeschränkt erhalten bleibt: Gene, die eine Wirkung als Signal zur Proliferation besitzen, sind kontinuierlich aktiv, während Gene, die einen Einfluss auf die zelluläre Differenzierung ausüben, nur ungenügend in Aktion sind. Kanzerogene Faktoren beeinflussen (hemmen) die Steuerungsmechanismen der Gene, so dass es zu Fehlregulationen in Bezug auf die zelluläre Differenzierung kommt. Es entstehen unausgereifte Zellen mit Funktionsstörungen.

Diese Blockierung der Differenzierung der Tumorzelle kann reversibel sein. Verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderem Hormone und Enzyme, können die Tumorzelle zu einer weiteren Ausdifferenzierung veranlassen. Zur breiten und praktischen Anwendung eines entsprechenden Therapieansatzes ist

es jedoch noch ein weiter Weg. So bleibt heute in erster Linie die Möglichkeit der Proliferationshemmung durch Zytostatika und Strahlentherapie. So kann die Prognose lokal fortgeschrittener nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome (NSCLC) durch neoadjuvante Chemo- oder Radiotherapie in Zusammenhang mit operativer Intervention gegenüber der alleinigen chirurgischen oder radiologischen Therapie entscheidend verbessert werden [82].

Wie inzwischen bekannt ist, hängt das Wachstum eines Gewebes auch von Rezeptoren und ihrer Anzahl in den Zellmembranen ab, die den Zellen die Anwesenheit von Nachbarzellen signalisieren. Gesunde Zellen schränken daraufhin ihre Teilungsaktivität ein. Maligne Zellen besitzen zu wenige dieser Rezeptoren. Sie können daher die Signale zur Begrenzung ihrer Teilungsaktivität nicht empfangen [48].

Das Wachstum von Tumorzellen erfolgt im Gegensatz zum gesunden Gewebe unkontrolliert, aber abhängig von der Größe des Tumors und seiner Blutversorgung. Die Zeit, die zur Verdoppelung einer bestimmten Tumormasse nötig ist, wird mit zunehmender Tumorgöße länger, das heißt, der Tumor wächst immer langsamer.

Die Verdoppelungszeit maligner Tumoren ist sehr variabel. Sie reicht von wenigen Stunden bis zu Monaten und Jahren. Sie hängt in erster Linie von der Wachstumsfraktion, aber auch von der Generationszeit der Zellen und vom Zellverlust ab.

In jedem Tumor befinden sich drei Formen von Zellen nebeneinander:

- **Proliferierende Zellen:** Diese sich teilenden Zellen sind entscheidend für das Wachstum des Tumors und sprechen am besten auf zytostatische Substanzen an.
- **Temporär ruhende Zellen:** Bei diesen Zellen, die sich nicht im Zyklus befinden (= G₀-Pool), handelt es sich um temporär auf eine antineoplastische Therapie nicht empfindlich reagierende Zellen. Sie können jedoch jederzeit wieder in den Zyklus eingeschleust werden!
- **Permanent ruhende Zellen:** Diese differenzierten, sich nicht mehr teilenden Zellen besitzen keine Tumorstammkapazität mehr (Endzellen) und sind klinisch von geringer Bedeutung.

1.5 Prognosefaktoren und Tumormarker

Die Prognose über den Krankheitsverlauf hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Neben den individuellen, patientenbezogenen Faktoren (Alter, familiäre Belastung, Ernährung, Zigaretten- und Alkoholkonsum) zählen klinische Parameter wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus und histologisches Grading zu den klassischen Prognosefaktoren. Da die 5-Jahres-Überlebensrate mit zunehmender Tumorgröße und positivem Lymphknotenbefall rapide absinkt, werden zuverlässig reproduzierbare Parameter benötigt, die eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung erlauben.

Prognosefaktoren lassen erkennen, mit welchem Risiko ein erneutes Auftreten (Rezidiv) oder eine verminderte Überlebensrate verbunden sind. Durch moderne Prognosefaktoren sollte es zusätzlich möglich sein, Aussagen über das zu erwartende Ansprechen oder eine Resistenz des Tumors auf die jeweilige Therapieform machen zu können. Der Befund zum Zeitpunkt der Primärbehandlung kann also über die Aggressivität des Tumors und damit über die zukünftigen Risiken des Patienten informieren. Zusätzlich kann die Wirksamkeit bestimmter Therapieformen besser abgeschätzt werden. Darüber hinaus sollten moderne Prognosefaktoren eine tumorbiologische Hypothese als Grundlage haben. Hierdurch grenzen sie sich von reinen prognostischen Indikatoren ab, die meist nur indirekt mit tumorbiologischen Phänomenen (Alter, Tumorgröße, Lymphknotenstatus etc.) verbunden sind. So ist z.B. das Staging lediglich eine Momentaufnahme, ein Status quo eines sich dynamisch entwickelnden Tumorprozesses, ohne einen Einblick in diese vielen ineinandergreifenden Mechanismen der Tumorentstehung und -progression geben zu können.

Moderne Prognosefaktoren finden sich auf molekularbiologischer und genetischer Ebene. In der molekularbiologischen Diagnostik ermöglichen das Auftreten bzw. die erhöhte Konzentration von Tumormarkern in Körperflüssigkeiten (humorale TM) oder in Zellen (zelluläre TM) Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose einer Tumorerkrankung. In erster Linie steht aber eine zunehmende Anzahl neuer tumorspezifischer Marker nur für die Diagnostik und Früherkennung hämatologischer Systemerkrankungen (klassisches Beispiel: Philadelphia-Chromosom bei der CML) oder einiger solider Tumoren mesodermaler Herkunft zur Verfügung [88]. Die tumorspezifische molekularbiologische Routinediagnostik von Karzinomen bleibt demgegenüber bisher auf eine kleine Anzahl hereditärer Tumordispositionserkrankungen beschränkt (z.B. FAP und HNPCC sowie familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom). Diese Lücke der molekularbiologischen

Routinediagnostik bei den soliden Tumoren epithelialen Ursprungs führt dazu, dass in diesem Bereich weiterhin vergleichsweise unspezifische humorale TM bestimmt werden. Diese weisen zwar Organspezifität (z.B. PSA), aber mit Ausnahme des hCG beim Hodenkarzinom und des Bence-Jones-Proteins beim Plasmozytom keine ausreichende Tumorspezifität auf. Wegen fehlender Organ- und Tumorspezifität sind die meisten verfügbaren humoralen TM für die Früherkennung und Primärdiagnostik nicht geeignet, sondern erlauben hauptsächlich die Verlaufskontrolle und Rezidivfrüherkennung im Rahmen der Nachsorge bei bereits diagnostizierten Tumoren [2]. Bei den Faktoren der Zellkinetik hat die quantitative Bestimmung des DNA-Gehaltes menschlicher Tumore mittels Flow- oder Image-Zytometrie prognostische Relevanz [23,18].

1.6 DNA-Image-Zytometrie

Zytogenetische Studien konnten zeigen, daß chromosomale Veränderungen eine große Rolle bei der Kanzerogenese spielen [121,71]. Genetische Veränderungen in Tumoren zeigen sich als Abweichungen des totalen DNA-Gehaltes, der einzelnen Chromosomen, einzelner Gene oder Genexpressionen [145]. So lassen sich bei allen malignen Tumoren numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen als Zeichen chromosomaler Aneuploidie nachweisen. Als numerische Aberration im Sinne eines Verlustes oder Zugewinns genetischen Materials finden sich z.B. die Deletion und Duplikation; Translokation und Inversion stellen strukturelle Veränderungen der Erbinformation dar [93]. Im Hinblick auf die Tumorentstehung unterscheidet man primäre, sekundäre und tertiäre Chromosomenaberrationen.

Primäre Chromosomenaberrationen sind die ersten für den jeweiligen Tumor typischen Veränderungen, die bei den meisten soliden Tumoren als Deletion in Erscheinung treten. Sekundäre Aberrationen betreffen nur bestimmte Chromosomen. Sie stellen sich bei soliden Tumoren meist als Polyploidisierung aneuploider Chromosomensätze dar. Diese Veränderungen sind in der Regel mit einer Steigerung der Tumormalignität verbunden und lassen sich zytometrisch feststellen. Tertiäre folgen meist den sekundären Chromosomenaberrationen und sind als Ausdruck genetischer Instabilität zu sehen [20]. Sind die chromosomalen Aneuploidien ausgeprägt genug, um DNA-zytometrisch als signifikante Normabweichungen identifiziert zu werden (meist $<$ oder $>$ 10%), so spricht man von DNA-Aneuploidie.

Zum Zweck der Malignitätsgraduierung wird das Ausmaß der Aneuploidie tumorspezifisch quantifiziert (DNA-Malignitätsgrading).

Weiterhin findet man sowohl physiologische als auch pathologische Faktoren, die Einfluß auf den DNA-Gehalt des Zellkerns nehmen und zu einer Abweichung vom diploiden Chromosomensatz führen können. So findet sich in Zellen bestimmter Gewebe (Herzmuskelzellen, Bronchialepithelien, Onkozyten der Mamma) sowie unter Einfluß einiger Virusinfekte eine sogenannte euploide Polyploidisierung, die immer als ganzzahlige Potenz des normalen $2c$ -Wertes auftritt. Im Gegensatz hierzu gilt die Aneuploidie im Sinne einer numerischen oder strukturellen Aberration des Chromosomensatzes als Anzeichen für Neoplasie und Aggressivität [93,116,20]. Jedoch sollte selbst extreme Aneuploidie nicht automatisch mit einem malignen Tumor gleichgesetzt werden. Sie läßt sich auch in gutartigen Tumoren und präkanzerösen Läsionen nachweisen [5].

FEULGEN [51] beschrieb 1924 erstmals eine Färbemethode, die eine elektive und stöchiometrische Färbung der Zellkern-DNA zuließ. Zwischen 1924 und den 70er Jahren wurden viele Feulgen-gefärbte solide Tumore durch Mikrospectrophotometrie auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht. Die herkömmlichen Mikroskopfotometer sind jedoch kaum noch gebräuchlich, da sie für die klinische Routineanwendung zu unpraktisch und in ihren Messungen zu zeitaufwendig sind. Basierend auf den Arbeiten von CASPERSSON (29) sind als weitere Stationen auf dem Wege zur modernen DNA-Image-Zytometrie die Feulgen-Zytometrie [61] sowie die Feulgen-Fluoreszenzphotometrie [24] zu nennen. Die Entwicklung elektronischer Zellmessungen führte in den 60er Jahren zur Anwendung der Flow-Zytometrie [46,135]. Die Durchflußzytometrie mißt den DNA-Gehalt einer großen Anzahl in Suspension befindlicher Zellen. Fortschritte in der Computer- und Bildverarbeitungstechnologie führten zur Entwicklung der interaktiven DNA-Image-Zytometrie [8,23]. Zur Ploidiebestimmung finden heute die Flow- und die interaktive DNA-Image-Zytometrie breite Anwendung. Die Vor- und Nachteile sowie die Korrelation beider Methoden werden in zahlreichen Studien diskutiert [10,45,132]. Weitere Zytometriestudien verfolgen das Ziel, die prognostische Signifikanz des DNA-Gehaltes in Mammakarzinomproben zu klären. So korrelierten viele die Ploidie sowohl mit der rezidivfreien als auch mit der Gesamtüberlebenszeit der Karzinompatienten. Die meisten, jedoch nicht alle Autoren berichteten über einen Zusammenhang zwischen Aneuploidie und schlechter Prognose [6,36,12].

1.6.1 Interpretationsmethoden

Mit Hilfe der DNA-Image-Zytometrie kann sowohl die Morphologie als auch der DNA-Gehalt Feulgen-gefärbter Präparate untersucht werden. Nach selektiver Tumorzellmessung erlauben bei der Histogrammanalyse zwei Interpretationsmethoden, die Stammlinien- und die Einzelzellinterpretation, die Feststellung der Aneuploidie. Diese beiden Interpretationsmethoden ermöglichen es dem Untersucher je nach vorliegendem Gewebe, eine Dignitätsdiagnose zu stellen oder eine Malignitätsgraduierung vorzunehmen.

Bei geringer Abweichung des Zellkern-DNA-Gehaltes kann die Messung größerer Zellzahlen den Nachweis chromosomaler Aneuploidie erbringen. Die klassische Interpretation der Aneuploidie bezieht sich auf den Modalwert einer Zellpopulation. Diese bereits 1966 von SANDRITTER ET AL. [123] beschriebene Stammlinieninterpretation definiert die häufigste Chromosomenkonstellation innerhalb eines Tumors. Der Modalwert bezeichnet den am häufigsten in einer Population vorkommenden Wert und beschreibt die Position der Stammlinie. Liegt er außerhalb von $2c + / - 2 \times CV$ (Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation), so wird er als aneuploid gewertet. So kann auch in polyploidisierenden Geweben durch Ausgrenzung der Bereiche um 4c, 8c, 16c etc. Aneuploidie nachgewiesen werden.

Weiterhin wird der DNA-Index zur Bestimmung der Ploidie herangezogen. Dieser Index errechnet sich aus dem Quotienten des DNA-Gehaltes der gemessenen Tumorzellen und dem der euploiden Referenzzellpopulation. Hierbei unterscheidet man zwischen einem diploiden/near-diploiden (0,9-1,1) und einem aneuploiden Indexbereich ($< 0,9 / > 1,1$) [116,41]. Eine differenziertere Einteilung berücksichtigt ferner einen hypertetraploiden (1,11-1,9), tetraploiden (1,91-2,1) und hypertetraploiden ($>2,1$) Indexbereich [57]. Obwohl die Stammlinieninterpretation als sehr spezifisch anzusehen ist, setzt sie jedoch voraus, dass ein Großteil der Zellen durch Chromosomenaberrationen verändert ist. Hier erweist sich die Einzelzellinterpretation als deutlich sensitiver, da sie auch Veränderungen einzelner Zellen erfaßt und somit eine Frühdiagnose von Malignität erlaubt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass DNA-Gehalte bis 4c noch normalen Zellen in der G_2 /M-Phase entsprechen können, erweisen sich Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$ als prognostisch relevant. Die absolute Zahl gefundener Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$ heißt 5c Exceeding Events und wird als Einzelzellinterpretation bezeichnet [18]. Für den Nachweis von Aneuploidie wird ein Vorliegen von mindestens drei 5c Exceeding Events gefordert. Analog wird für Gewebe mit euploider Polyploidisierung

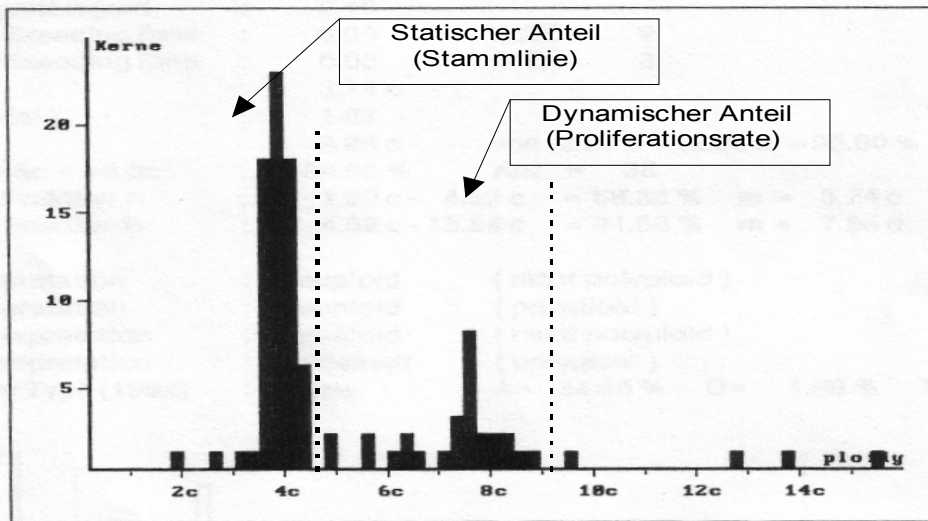
bis 8c ein Nachweis von drei oder mehr 9c Exceeding Events verlangt. Nach Auswertung dieser Werte ergibt sich die DNA-Diagnose, die aneuploid, diploid oder zweifelhaft lautet.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der häufig genutzten statischen DNA-Parameter.

Tabelle 2: Definition der DNA-Parameter

DNA-PARAMETER	DEFINITION
Modalwert	Position der Stammlinie
DNA-Mittelwert	mittlerer DNA-Gehalt der gemessenen Tumorzellen
DNA-Index	$\frac{\text{DNA-Gehalt der Tumorzellen}}{\text{DNA-Gehalt der Referenzzellen}}$
2c Deviation Index	Varianz der DNA-Mittelwerte um den 2c- Wert
5c Exceeding Events	absolute Zahl an Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 5c$
9c Exceeding Events	absolute Zahl an Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 9c$
Variationskoeffizient	$CV = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{arithmetisches Mittel}} \times 100\%$
DNA-Malignitätsgrad	logarithmische Umrechnung des 2c Deviation Index; Grad für das Ausmaß der Streuung der Werte um den diploiden 2c-Wert

Die nachfolgenden Histogramme zeigen Beispiele eines aneuploiden (Abb.2) und eines diploiden Bronchialkarzinoms (Abb.3) Die statischen und dynamischen DNA-Anteile werden in Abbildung 2 exemplarisch dargestellt. Die Stammlinie beschreibt die am häufigsten vorkommenden Werte im DNA-Histogramm [18]. In der Stammlinie wird die G₀/G₁-Phase der gemessenen Zellpopulation dargestellt. Innerhalb des Zellzyklus entspricht die G₀ /G₁-Phase dem statischen Anteil innerhalb des Zellzyklus.



DNA-Parameter

TU-Zell-DNA Streubreite: 9.88

DNA-Mittelwert: 5.05

DNA-Index (modal): 1.87

2c Deviation Index: 14.63

G₀/G₁-Fraktion: 68.32

Proliferations-Quotient: 2.16

Variations Koeffizient: 46.08

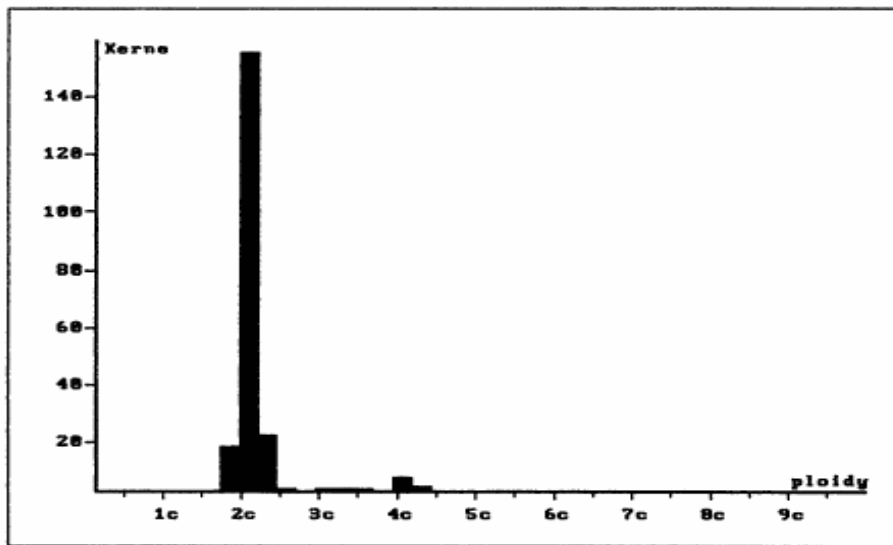
5c Exceeding Events: 9

9c Exceeding Events: 3

S/G₂/M-Fraktion : 31.68

Abbildung 2 : Histogrammanalyse eines aneuploiden Bronchialkarzinoms

Der dynamische Anteil im DNA-Histogramm entspricht der S/G₂/M-Fraktion im Zellzyklus, dem Stadium der Zellteilung, in dem sich die Zelle aktiv in der Proliferation befindet. Eine normale Population proliferierender diploider Zellen würde einen ersten Häufigkeitszyklus bei 2c (entsprechend der G₀ /G₁-Phase) und einen zweiten bei 4c (entsprechend der G₂/M-Phase) zeigen. Der Bereich zwischen den Gipfeln ist der Synthesephase zugeordnet.



DNA-Parameter

TU-Zell-DNA Streubreite: 2.13

DNA-Mittelwert: 2.10

DNA-Index (modal): 1.00

2c Deviatlon Index: 0.19

G₀/G₁-Fraktion: 94.09

Proliferations-Quotient: 15.92

Varlations Koeffizient: 20.08

5c Exceeding Events : 0

9c Exceeding Events : 0

S/G₂/M-Fraktion : 5.91

Abbildung 3 : Histogrammanalyse eines diploiden Bronchialkarzinoms

1.7 Immunhistochemie

Die Immunhistologie ist eine der zentralen Methoden der modernen histopathologischen Diagnostik und Forschung. Durch immunhistologische Techniken wird es möglich, Proteine, Polysaccharide u.a. Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Aus Körperflüssigkeiten oder in vitro gewonnen, lassen sich diese Antikörper in verschiedenen Untersuchungsverfahren als "molekulare Pinzetten" zum Nachweis der von ihnen spezifisch erkannten Antigene einsetzen. Dadurch kann die konventionell-histologische Analyse von Differenzierungsmustern um die Ermittlung von Expressionsmustern ergänzt werden. Sehr anschauliche Beispiele für den Nutzen dieser Methode bietet die Metastasenpathologie, bei der die immunhistologische Ermittlung charakteristischer Expressionsmuster von Leber-, Lungen oder

Lymphknotenmetastasen u.U. entscheidende Hinweise auf die Primärlokalisierung des Tumors liefern kann.

Die Bildung von Antikörpern ist die zentrale Funktion der humoralen Immunität, mit der der Organismus sich gegen eingedrungene Fremdsubstanzen zur Wehr setzen kann. Substanzen, die im Organismus eine Immunreaktion hervorrufen können, werden als Antigen bezeichnet (Proteine, Oligopeptide, Polysaccharide, Lipide). Die molekularen Strukturen eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt werden können, werden als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet.

Als Antigenität einer Substanz wird ihre Fähigkeit bezeichnet, prinzipiell eine Immunantwort induzieren zu können. Die Spezifität eines Antigens ergibt sich aus der Anzahl seiner verschiedenen Epitope. Enthält das Antigen genügend Determinanten, um selbst eine Immunantwort hervorzurufen, so wird es als Vollantigen bezeichnet. Viele kleine Moleküle provozieren erst nach Kopplung an einen hochmolekularen Träger eine Immunantwort; solche Verbindungen werden als Haptene bezeichnet.

1.7.1 Ki-67 (MIB-1)

Das Ki-67 Protein ist ein Proliferationsantigen, welches in der G₁-, S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus vorkommt. Ruhende Zellen in der G₀-Phase werden von diesem Antigen nicht erkannt. Somit zeigt der Anteil der gefärbten Zellen unmittelbar die Proliferationsaktivität an. Das Ki-67 Antigen wurde zuerst von GERDES ET AL. 1983 [56] beschrieben. Anfänglich war die Anwendung des Ki-67 aufgrund der Labilität des Epitops auf den Einsatz am Gefriermaterial beschränkt. Mit Einführung des MIB-1 (1992), einem monoklonalen Antikörper gegen das Ki-67 Antigen, steht eine neue Generation von Antikörpern zur Verfügung, die nach initialer Mikrowellenbehandlung zur Antigendemaskierung auch Untersuchungen an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe ermöglicht [31]. Die Messung erfolgt immunhistochemisch. In Anlehnung an bisher in der Literatur eingesetzte cut-off-Werte (Grenzwerte), die meist im Bereich von 20% lagen [95,43], kam auch hier für die Auswertung des MIB-1 ein cut-off-Wert von 20% zur Anwendung.

Es wurden daher unterteilt in:

- MIB-1 < 20% (Anzahl der gefärbten Kerne pro Tumor)
- MIB-1 ≥ 20% (Anzahl der gefärbten Kerne pro Tumor)

1.8 Ziel der vorliegenden Studie

Alle klassischen Untersuchungsmethoden zur Malignitätsgraduierung verschiedener Tumoren unterliegen der subjektiven Beurteilung des untersuchenden Pathologen. Ein erster Schritt zur Objektivierung und Reproduzierbarkeit der Befunde gelang durch die Einführung der statischen DNA-Zytometrie. Da die Proliferation einen wichtigen Teilaspekt bei der Charakterisierung des malignen Phänotyps und des biologischen Verhaltens von Neoplasien darstellt und die Tumorzellkinetik wichtige biologische Parameter hervorbringt, die in Beziehung zum klinischen Verlauf und der Ansprechbarkeit von Therapien stehen, musste die proliferative Aktivität in die Untersuchungsmethoden einbezogen werden. In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob die Werte der statischen Parameter der DNA-Image-Zytometrie mit dynamischen Parametern (S/G₂/M-Phase) sowie den genannten immunhistochemisch nachweisbaren Parametern (MIB-1) korrelieren und ob sich dadurch Rückschlüsse auf das Wachstum und die Geschwindigkeit maligner Thorax Tumore ziehen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von 799 Patienten ausgewertet, die sich in der Klinik für Thorax- und Gefäßchirurgie des St. Elisabeth-Hospitals Ibbenbüren (Chefarzt Prof. Dr. med. F. Klinke) für diagnostische und/oder therapeutische Eingriffe von Thoraxtumoren befanden. Haupteinschlusskriterium war das Vorliegen von Malignität. Der Zeitraum der Datenerfassung erstreckt sich vom 06. September 1994 bis zum 18. Oktober 2000. Alle 799 Präparate wurden einer histologischen Untersuchung unterzogen. 761 Präparate (kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome) wurden zusätzlich der DNA-Image-Zytometrie zugeführt. Die verbliebenen 38 Präparate (Mesotheliome, Non-Hodgkin-Lymphome und Karzinoide) fanden wegen zu geringer Population und damit verbundener, nicht aussagekräftiger Ergebnisse bei der Auswertung keine weitere Berücksichtigung. Sämtliche Untersuchungen wurden am Institut für Pathologie und Zytologie, Dr. med. U. Bosse Osnabrück durchgeführt. Die Daten wurden ausgewertet mit dem Ziel der statistischen Analytik dynamischer Tumorparameter.

Für die vorliegende Studie wurden die allgemeinen Patientendaten, pTNM-Stadium, histologische Typisierung, histologisches Grading und die beschriebenen Imagezytometrisch gewonnenen statischen und dynamischen DNA-Parameter sowie immunhistochemisch gewonnenen Parameter erfasst. Die dynamischen Parameter (S/G₂/M Fraktion und MIB-1) werden als Hauptzielparameter behandelt, wobei Abhängigkeiten vom Ploidiestatus im Vordergrund stehen.

Bei den Image-zytometrischen DNA-Werten handelt es sich im einzelnen um:

- Modalwert DNA-Mittelwert
- DNA-Index
- 2c Deviation Index
- 5c Exceeding Event
- 9c Exceeding Event
- Variationskoeffizient
- DNA-Malignitätsgrad
- G₀/G₁ -Fraktion
- S/G₂/M -Fraktion

Neben der Erfassung der DNA-Diagnose und dem Vergleich der DNA-Werte der Tumore untereinander sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Korrelation zwischen statischen und dynamischen Parametern der DNA-Image-Zytometrie sowie der immunhistochemisch ermittelten Parameter besteht.

2.2 DNA-Image Zytometrie

Die Messung der Zellkern-DNA-Gehalte und die diagnostische Interpretation der Daten erfolgen interaktiv an einem rechnergestützten TV-Bildanalyse-System, welches mit einem Lichtmikroskop gekoppelt ist.

2.2.1 Präparation und Färbung

Für die DNA-Image-Zytometrie wurden zur Vorbereitung der Messung Präparate (Imprint-Zytologie) von frischen Karzinomproben erstellt. Zur Sicherung des internen Standards erfolgte zusätzlich ein Abstrich blutigen Gewebes vom Schnellschnittmaterial. Nach Präfixierung mit Merco-Fix wurden die Präparate nach Feulgen, einer spezifischen stöchiometrischen Kernfärbung, gefärbt. Dies erforderte zunächst eine Hydrolyse mit HCl bei 60°C über sieben Minuten zur Freilegung der Aldehydgruppen der DNA-Purinbasen und eine Spülung mit Aqua dest.

Im Anschluß an die Färbung von 15 Minuten mit Schiffscher Reagenz zur quantitativen Bindung an die freien Aldehydgruppen folgte eine fließende Wässerung für 10 Minuten, Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe und eine Eindeckung mit Eukit. Da Nukleolen sowie zytoplasmatische Strukturen ungefärbt bleiben, erlaubt die Feulgenfärbung eine densitometrische Messung und somit die quantitative Analyse des Zellkern-DNA-Gehalts.

Die DNA-zytometrischen Messungen erfolgten mit dem DNA-Zytophotometer CYDOK der Firma Hilgers, Königswinter. Weiterhin benutzte man ein kommerzielles Mikroskop der Firma Leitz Diaplan mit Schwarz-weiß-Videokameraaufsatz, einen NEC Multi-sync 3D-Bildschirm sowie Rechner mit angeschlossenem Hewlett-Packard-Tintenstrahldrucker.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate waren am Bildschirm die unterschiedlich stark angefärbten Zellkerne des Karzinomabstriches zu sehen. Als interner Standard dienten pro Messung jeweils mindestens 20 Referenzzellen (normale Körperzellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Bindegewebszellen oder reife Epithelzellen). Anschließend wurden mindestens 100 Tumorzellen am Bildschirm

aufgesucht und gemessen. Das System erkennt die Zellkerne und bestimmt ihre integrierte optische Dichte.

Bei der DNA-Image-Zytometrie erlauben verschiedene einfach zu bedienende Menüfunktionen die unkomplizierte Durchführung der Messung. Nach einfachem Anklicken der morphologisch verdächtigen Zelle erscheint umgehend der gemessene DNA-Gehalt neben der jeweiligen Zelle am Bildschirm (z.B. 2,5c bei einer aneuploiden Zelle). Möglich ist weiterhin die Speicherung schon gemessener Zellen oder die Trennung eng zusammenliegender Zellen, so daß diese anschließend einzeln ausgewertet werden können. Durch die Selektion der morphologisch verdächtigen Zellen und die visuelle Kontrolle des erfahrenen Untersuchers wird ein Mitmessen von Stroma- oder anderen normalen Körperzellen vermieden.

Nach Beendigung einer Messung wird ein Protokoll ausgegeben, welches die und die DNA-Diagnose sowie das Histogramm als graphische Darstellung beinhaltet. Zusätzlich erhält man die Abbildungen der gemessenen Zellen in 16 schwarz-weiß Tonstufen, die der Kontrastierung eines Zeitungsbildes entsprechen.

2.3 Histologische Untersuchung

Nach Präparation und Färbung mit HE und PAS erfolgte die Bestimmung des histologischen Typs sowie ein histopathologisches Grading unter Berücksichtigung des Kernpolymorphismus und der Mitoserate nach BLOOM und RICHARDSON [17]. Es fand eine Unterscheidung der Gradinggruppen G₁, G₂, G₂₋₃ und G₃ statt.

2.4 Immunhistochemie

Klassische histologische Färbungen basieren auf chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften von Zell- und Gewebsbestandteilen. Sie stellen Strukturen mit gleichartigen chemischen oder physikalischen - nicht aber notwendigerweise gleichen biologischen - Eigenschaften dar. Die Immunhistochemie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Methoden, die zur Darstellung von Zell- und gewebespezifischen Antigenen (meist Proteine) verwendet werden, indem diese mit Hilfe von Antikörpern in situ markiert und visualisiert werden. Durch den spezifischen Nachweis von Proteinen erlaubt die Immunhistochemie - im Idealfall - die Darstellung von Zellen mit gleichen funktionellen Eigenschaften oder Zellen mit gleicher Histogenese. Dies ist entscheidend für die Anwendung in der Tumordiagnostik.

2.4.1 Monoklonale Antikörper

Für die Produktion monoklonaler Antikörper werden Plasmazellen mit Zellen eines unbegrenzt teilungsfähigen Plasmazelltumors, eines Plasmozytoms fusioniert. Die resultierenden "Hybridome" haben Eigenschaften der Tumorzelle sowie des anderen Fusionspartners und produzieren dauerhaft den bestimmten mAK, da sie sowohl Erbmaterial der Plasmazelle als auch der Myelomzelle enthalten. Die Produktion der AK erfolgt entweder in der Zellkultur (AK im Medium) oder in Tieren (AK im Aszites).

Vorteile der monoklonalen AK sind

- die Möglichkeit eines praktisch unbegrenzten Nachschubs,
- die hohe Standardisierung
- die hohe und enge Spezifität

Nachteile sind

- z.T. eine zu enge Spezifität
- eine teilweise geringe Stabilität.

2.4.2 Immunhistochemische Färbemethoden

Um antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten im mikroskopischen Bild nachzuweisen, werden Antikörper (AK) mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, partikulärem Material (z.B. Goldpartikel) oder mit radioaktiven Isotopen markiert.

Wesentliche Voraussetzungen für die Aussagekraft der Methode sind die Spezifität der verwendeten AK und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten. Ein negativer Ausfall der Reaktion beweist daher nicht unbedingt das Fehlen des Antigens; in fraglichen Fällen sollte man mit optimal erhaltenem Gewebe (z.B. unfixierte Gefrierschnitte) arbeiten.

2.4.2.1 Die Gewebefixierung

Methode: Chem Mate (TM= Tech Mate) Peroxidase / DAB **Dako** / Code-Nr: K 5001

Antikörper: Ki67, MIB-1 **Dako** / Code-Nr: 117240

Verdünnung: 1: 100

Verdünnungsmittel: **Dako** / Code-Nr: S 2022

Material: Paraffinschnitte, 2 - 4 µm

1. Vorbereitung:

a.) Trocknung der Schnitte: 1h bei 60 ° C, 24h bei 30 ° C

b.) Entparaffinierung : 2x 10min Xylol, 1x 5min abs. Alk..

2x 5min 96%Alk., 1x 5min 70% Alk. ,

1x 5min Aqua dest

2. Vorbehandlung:

30min kochen im Wasserbad (970 C) mit Citratpuffer (Apoth.)

20min im Citratpuffer abkühlen lassen

5min Aqua dest

3. Immunreaktion im Automaten : Autostainer

5min Waschpuffer mit Tween 20, pH 7,6, **Dako** / CodeNr: S 3006

(Ansatz: 1800 ml Aqua dest + 200 ml Konzentrat)

25min Primärantikörper, waschen

20min Chemate Link HRP Bottle A , **Dako** / Code-Nr. K 5001, waschen

5min Peroxidaseblock (H2 O2), **Dako** / Code-Nr. 2023, waschen

20min Chemate Strept HRP Bottle B , **Dako** / Code-Nr. K 5001 waschen

5min Chemate DAB (Chromogen) , **Dako** / Code- Nr: K 5001, waschen (nach beiliegender Tabelle verdünnen)

5min Chemate DAB (Wiederholung für bessere Anfärbung), waschen

Die Immunreaktion ist abgeschlossen, die Objektträger können aus dem Autostainer entnommen werden.

4. Gegenfärbung: 1 min Hämalun (Kernfärbung)

Merck, 1 : 2 verdünnt mit Aqua dest

kurz in Aqua dest spülen

1 min bläuen in Leitungswasser

Reaktion stoppen in Aqua dest

eindecken mit wässrigem Eindeckmedium, **Dako** / Code-Nr: 002972

oder: aufsteigende Alkoholreihe, Xylol , Eukit

Als Alternative zur Formalinfixierung bietet sich bei empfindlichen Antigenen die Gefriertechnik an. Ein schonendes und schnelles Einfrieren sind für eine gute Strukturhaltung essentiell. In flüssigem Stickstoff vorgekühltes Isopentan dient als Kältevermittler. Das gefrorene Gewebe wird mit Gewebekleber (Tissue Tec) und CO₂ aufgeblickt und im Kryostaten zwischen -10E C und -30E C geschnitten.

Der Gefrierschnitt wird am Objektträger angeschmolzen, getrocknet und unfixiert oder nach Fixierung mit Aceton weiterbearbeitet. Getrocknete Gefrierschnitte lassen sich längere Zeit bei -20E C oder besser bei -80E C aufbewahren, aufgeblickte Gewebstücke lagert man bei -80E C. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren schadet dem Gewebe und führt zu beträchtlichen Strukturveränderungen.

2.4.2.2 Material für die Immunhistochemie

- Paraffin-eingebettetes Gewebe: Chem Mate- (ev. auch anderweitig) fixiert, 2 - 5 µm dünne Schnitte
- Frisch eingefrorenes Gewebe: 5 - 10 µm Schnitte, Aceton- oder Paraformaldehyd-fixiert
- Blutausstriche, zytologische Ausstriche, Zytospin-Präparate: Ethanol-, Methanol-, Spray-fixiert. Für viele Antigene ist auch eine Färbung auf Papanicolau-gefärbten Präparaten noch möglich
- Glutaraldehyd- oder Paraformaldehyd-fixiertes Gewebe für Immun-Elektronenmikroskopie

2.5 Statistik und methodisches Vorgehen

2.5.1 Datenverarbeitung und Dokumentation

Zur Bearbeitung der Daten wurde eine relationale Datenbank verwendet (Microsoft ACCESS 2000). Die statistischen Berechnungen wurden mittels SPSS 6 durchgeführt.

2.5.2 Überblick über die verwendeten Verfahren

Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurden - je nach Fragestellung - die folgenden Kennwerte angegeben:

- bei Häufigkeitsdaten waren dies absolute und relative Häufigkeiten (% Werte)
- bei metrischen Daten waren dies das arithmetische Mittel, als Maß für Variabilität die Standardabweichung, das Minimum und Maximum, die Fallzahl, sowie die Perzentile. Perzentile, zu denen auch der Median zählt, können als "Eckpunkte" einer Werteverteilung bezeichnet werden. Beispielsweise charakterisiert der Median den Wert, der die Stichprobe in der Mitte teilt.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten statistischen Rechenverfahren.

Tabelle 3: Die explorativ verwendeten statistischen Verfahren

Test	Zielsetzung
Mann-Whitney-U-Test (SACHS) [120]	Vergleich und Bewertung von Unterschieden zweier Gruppen in Parametern, die stetige Daten enthalten
Chi ² -Test, Fisher-Yates-Test (BORTZ ET AL.) [25]	Prüfung von Unterschieden bei Häufigkeitsdaten (z.B. Prüfung, ob Unterschiede in Prozentwerten bestehen)

Explorativ berechnete statistische Signifikanzen werden stets mittels sogenannter p-Werte¹ gekennzeichnet. Die folgende Tabelle 4 zeigt einen Bewertungsmaßstab für die p-Werte.

Tabelle 4: Kennzeichnung der explorativen Signifikanzen

Symbol	Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung
n.s.	$p > 0.05$	nonsignifikanter Unterschied zwischen Gruppen
n.s.	p von 0.05 bis 0.10	nonsignifikanter Unterschied, die Signifikanzschwelle wurde nur geringfügig verfehlt (insgesamt liefert dies einen starken Hinweis auf einen möglichen Unterschied, siehe SACHS) [120]
*	$p \leq 0.05$	signifikanter Unterschied
**	$p \leq 0.01$	hochsignifikanter Unterschied
***	$p \leq 0.001$	hochsignifikanter Unterschied (gleiche Formulierung wie bei $p \leq 0.01$)

¹Das "p" steht für "probability". Der p-Wert bezieht sich auf eine Nullhypothese (z.B. "kein Zusammenhang" oder "kein Unterschied"). Diese vermutet man vorerst als wahr. Geringe p-Werte führen zur Ablehnung der Nullhypothese und machen eine Alternative ("signifikanter Zusammenhang", "signifikanter Unterschied") plausibel.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick über die Verteilung im Gesamtkollektiv

Von insgesamt 799 Tumorresektaten entfielen 594 auf männliche und 205 auf weibliche Patienten.

Ein Blick auf die Geschlechterverteilung zeigt also einen deutlichen Schwerpunkt bei männlichen Patienten, die mit 74% vertreten sind (Abbildung 4). Weibliche Patienten waren entsprechend mit 26% beteiligt. Insgesamt kann das Verhältnis von Männern zu Frauen mit 3 : 1 beschrieben werden.

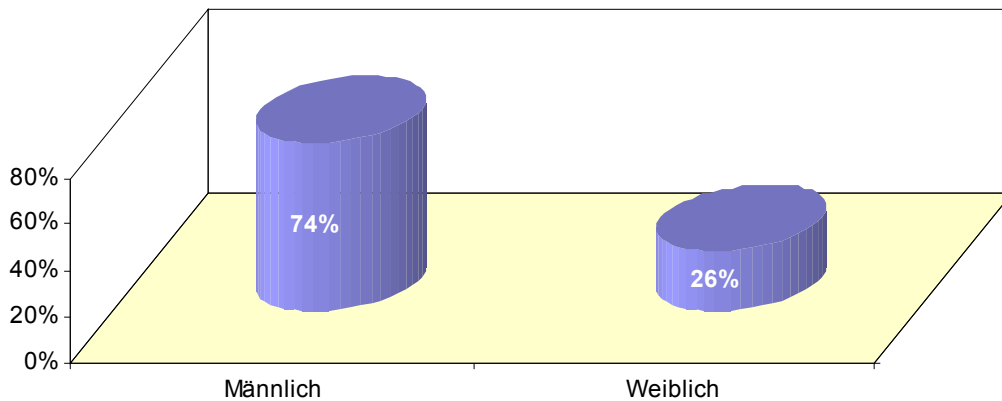


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Geschlechter

Tabelle 5: Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs

Geschlecht	%	Datenbasis
Männlich	74%	594
Weiblich	26%	205
Gesamt	100%	799

3.2 Altersverteilung

Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 23 und 88 Jahren. Der Altersschwerpunkt aller Patienten lag bei 60-69 Jahren (Abbildung 5), das

durchschnittliche Alter lag bei 62,7 Jahren, die Standardabweichung betrug 10,1 Jahre. Der jüngste Patient war 23 Jahre, der älteste 88 Jahre alt.

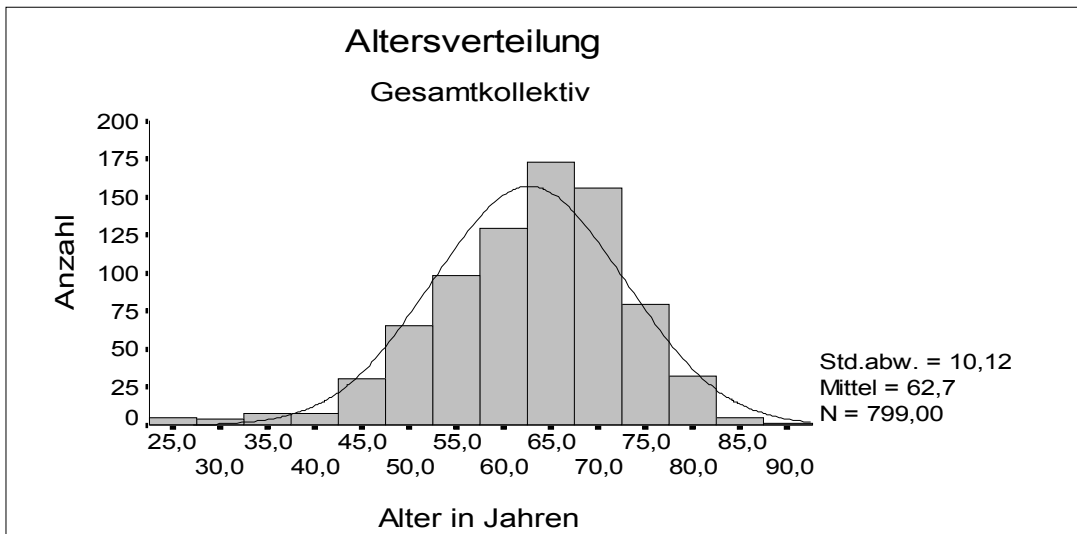


Abbildung 5: Altersverteilung des Gesamtkollektivs mit Häufigkeitsgipfel

Der Altersgipfel der männlichen Patienten lag geringfügig über dem der weiblichen Patienten. Das durchschnittliche Alter der Männer lag bei 63,2 Jahren, die Standardabweichung betrug 9,4 Jahre (Abbildung 6).

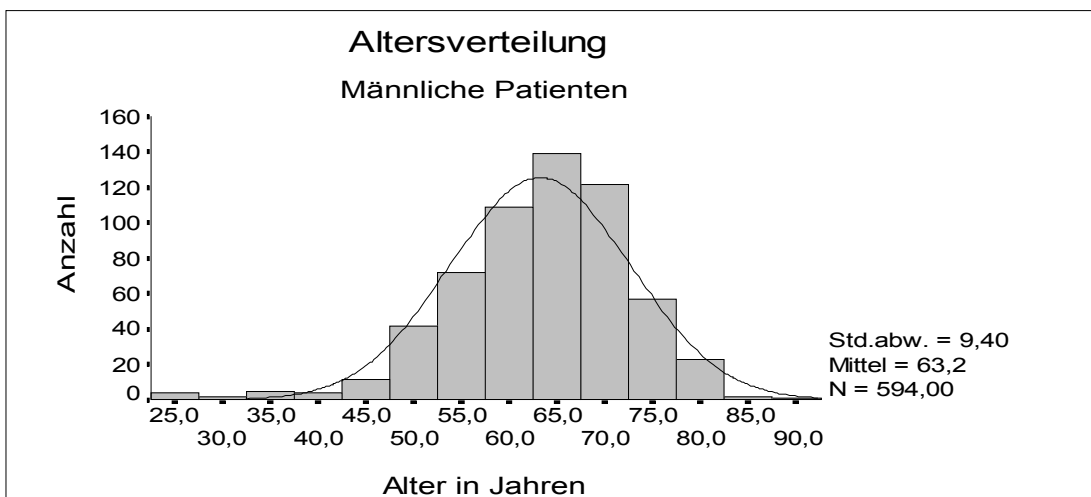


Abbildung 6: Altersverteilung der männlichen Patienten mit Häufigkeitsgipfel

Das durchschnittliche Alter der weiblichen Patienten betrug 61,1 Jahre, die Standardabweichung lag bei 11,8 Jahren (Abbildung 7).

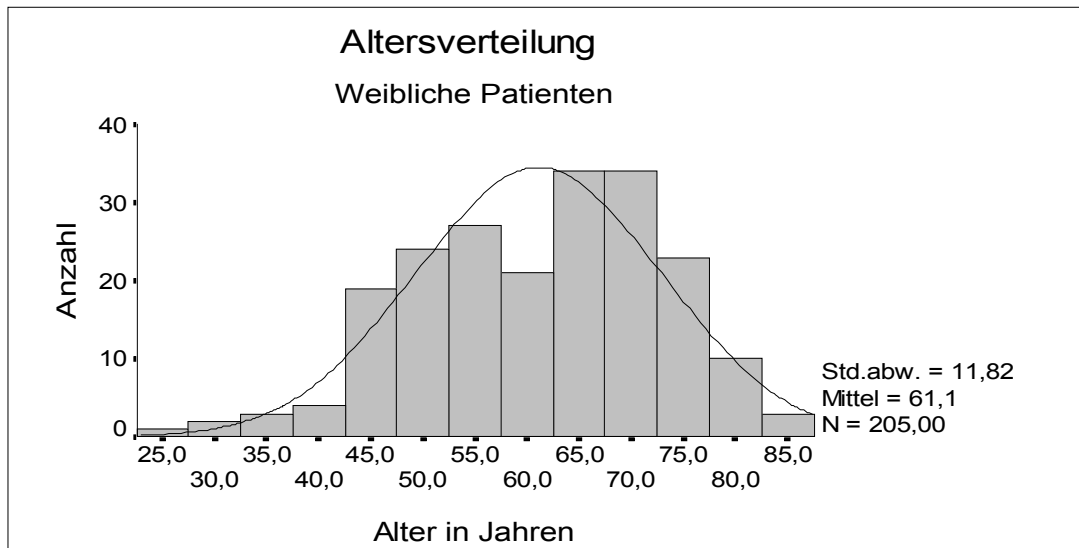


Abbildung 7: Altersverteilung der weiblichen Patienten mit Häufigkeitsgipfel

3.3 Überblick über die histologischen Befunde

Die Diagnose Plattenepithelkarzinom wurde mit 33% vor Adenokarzinom mit 30% am häufigsten gestellt. Großzellige Karzinome kamen bei 18% und kleinzellige bei 14% der Patienten vor. Non-Hodgkin-Lymphome kamen in 3 % der Diagnosen vor. Demnach wurden 81% aller thorakaler Tumore von Nichtkleinzellern und nur 19% der Tumore von Kleinzellern (14%) und Non-Hodgkin (3%), Mesotheliomen (1%) sowie Karzinoiden (1%) verursacht. In der folgenden Abbildung 8 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

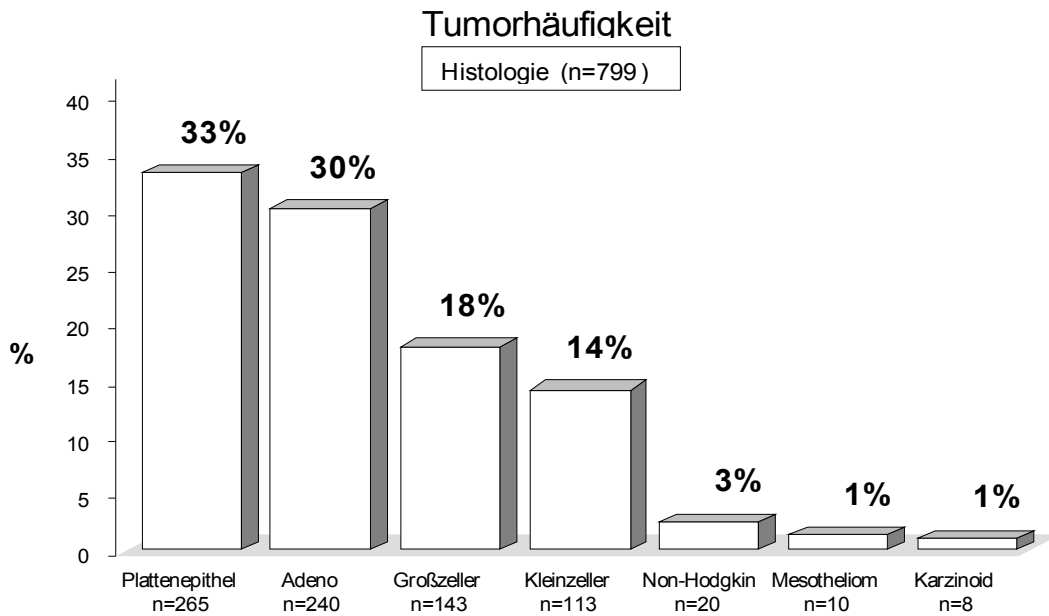


Abbildung 8: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Diagnosen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilung der verschiedenen Tumorarten bei Männern und Frauen. Bei den männlichen Patienten überwiegt die Diagnose Plattenepithelkarzinom weit vor dem Adenokarzinom und dem großzelligen Karzinom. Kleinzellige Karzinome fanden sich bei 87 Patienten, Non-Hodgkin bei 17, Mesotheliome bei 8 und Karzinoide bei 5 Patienten (Abbildung 9).

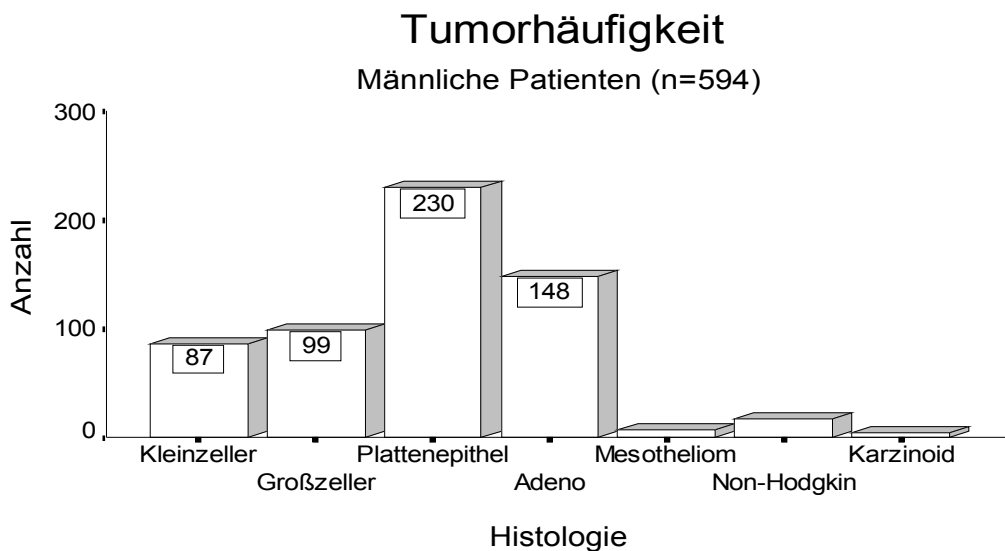


Abbildung 9: Häufigkeit der Tumorarten bei männlichen Patienten

Bei den weiblichen Patienten überwog die Diagnose Adenokarzinom (n=92), gefolgt vom großzelligen Karzinom (n=44) und Plattenepithelkarzinom (n=35). Wie bei den Männern kam das kleinzellige Karzinom in geringer Anzahl (n=26) vor. Non-Hodgkin (n=3), Mesotheliom (n=2) und Karzinoid (n=3) wurden entsprechend des geringen Gesamtaufkommens selten diagnostiziert (Abbildung 10).

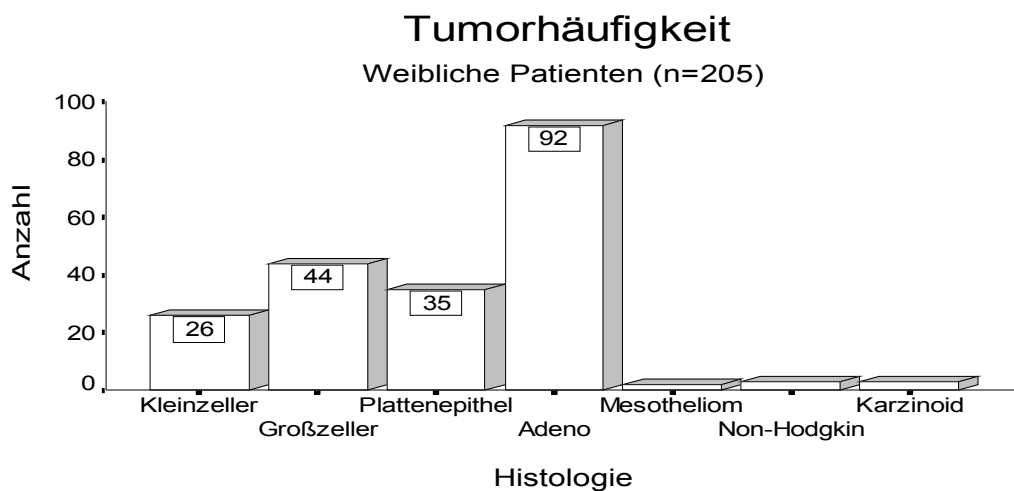


Abbildung 10: Häufigkeit der Tumorarten bei weiblichen Patienten

3.4 Ploidie-Status

Der Ploidie-Status kann bei 88% der Tumorarten als aneuploid beschrieben werden. Rund 6% hatten einen diploiden Status und ebenfalls rund 6% hatten einen zweifelhaften Status (Abbildung 11). Im einzelnen zeigten die Kleinzeller 82%, Großzeller 90%, Adenokarzinome 87% und Plattenepithelkarzinome 91%.

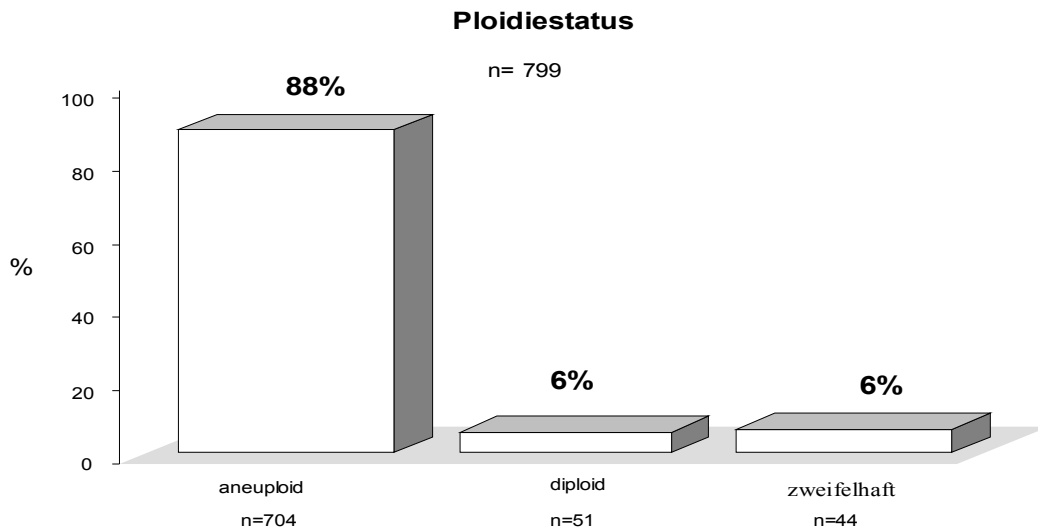


Abbildung 11: Überblick über den Ploidie-Status, alle Prozentwerte ganzzahlig gerundet

3.5 pT-Klassifikation

Die Mehrzahl der Tumore hatte das Tumorstadium pT2 (41%) oder pT3 (34%) (Abbildung 12).

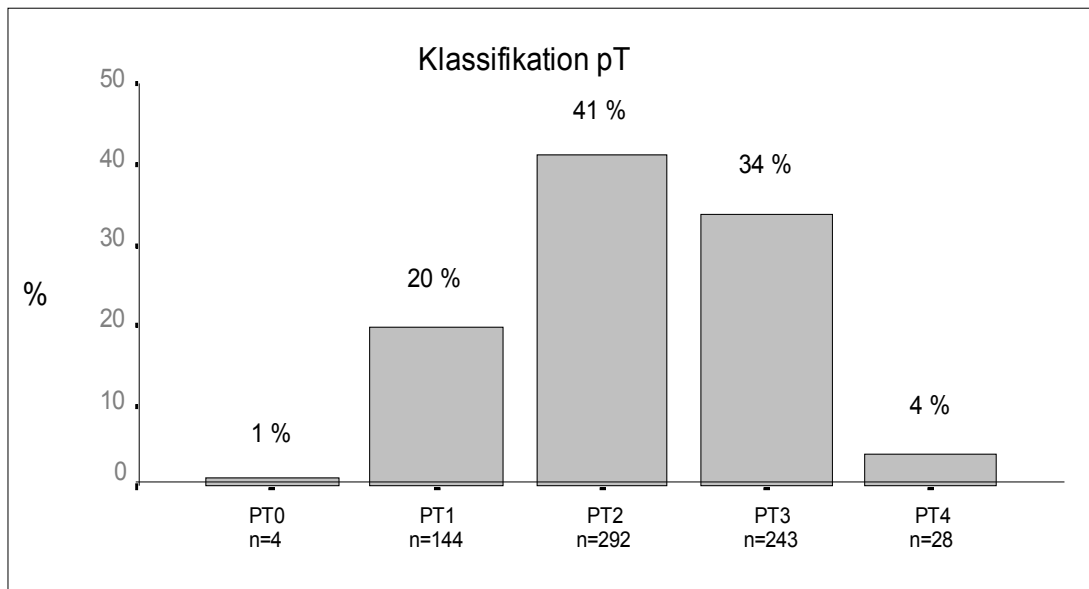


Abbildung 12: Verteilung der Tumore nach pTNM-Klassifikation; Datenbasis n=799, hiervon nicht verfügbar pT n=88

3.6 Histopathologisches Grading

Die Mehrzahl der Tumore hatte eine mittelgradige Differenzierung G 2 (44%). 36% der Patienten hatten die Differenzierung G 2-3 (Abbildung 13).

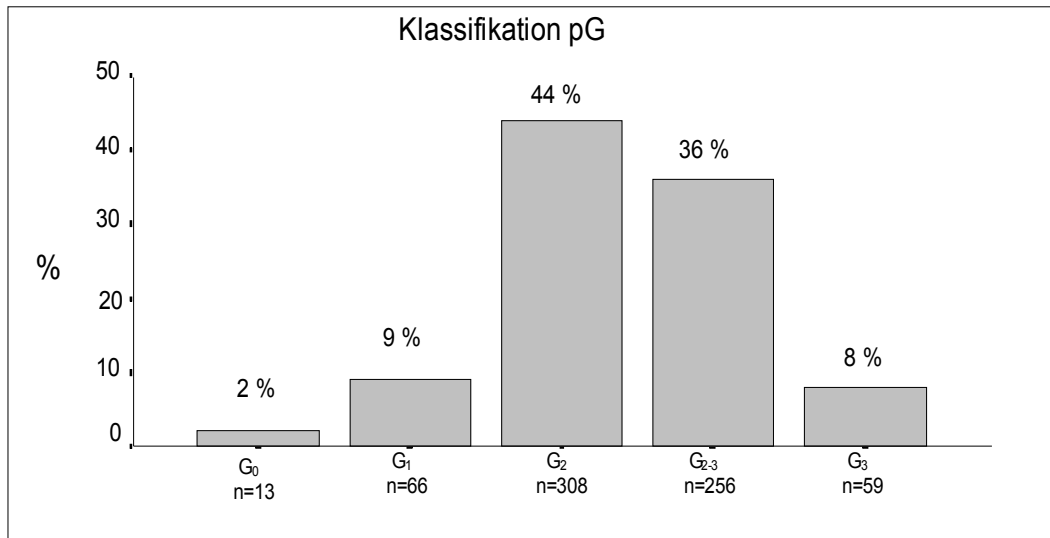


Abbildung 13: Häufigkeit und prozentuale Verteilung des Tumorgrading; Datenbasis n=799, nicht verfügbar Klassifikation pG n=97.

3.7 DNA-Image-Zytometriebefunde

In der folgenden Tabelle (Tabelle 6) wird der Modalwert der einzelnen Tumortypen aufgelistet. Die Tabelle zeigt, daß die Kleinzeller mit 3,31 die niedrigste Stammlinie haben, während die Adenokarzinome mit 4,59 den höchsten Wert aufweisen. Die Plattenepithelkarzinome und die Großzeller liegen mit Werten von 3,66 und 3,72 nahe dem Wert von 3,91 der Gesamtpopulation.

Tabelle 6: Mittelwert und Standardabweichung des Modalwertes der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	3,31	0,82	113
Großzeller	3,72	1,24	143
Plattenepithel	3,66	1,10	265
Adeno	4,59	15,70	240
Gesamtfallzahl	3,91	8,86	761

Die Streubreite der einzelnen Stammlinien wird in Abbildung 14 graphisch verdeutlicht. Da die Streubreite bei Kleinzellern am geringsten ist, fällt die Standardabweichung in dieser Tumorgruppen entsprechend niedrig aus.

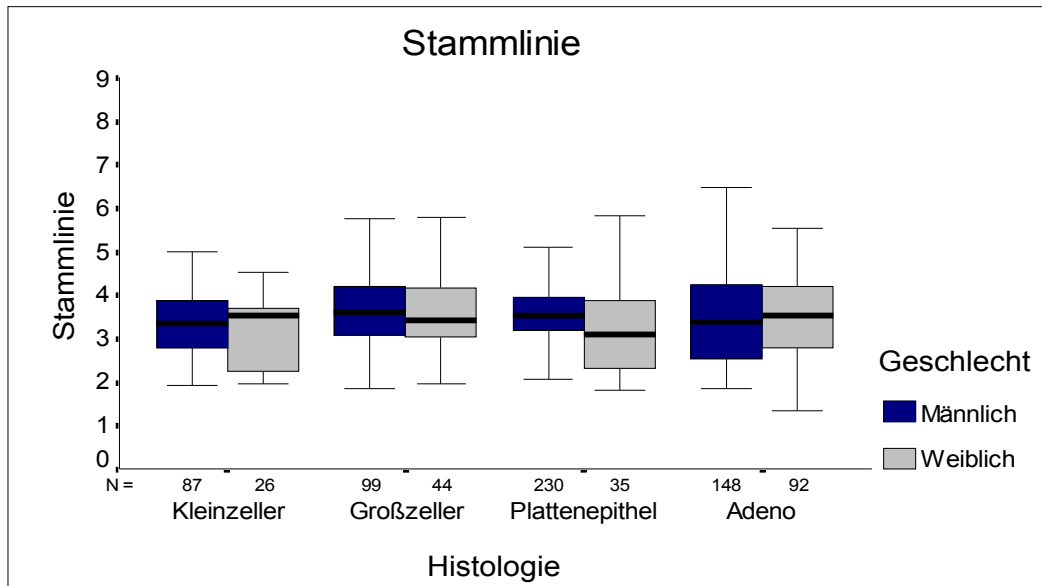


Abbildung 14: Stammlinienmedianwerte der untersuchten Tumorarten

Die Mittelwerte des DNA-Mittelwertes liegen bei der Gesamtpopulation bei 4,51 mit einer Standardabweichung von 1,45. Der geringste Wert lag bei 4,11 für die Kleinzeller gefolgt von 4,30 der Adenokarzinome. Den höchsten Wert zeigten die Großzeller mit 4,79.

Tabelle 7: Mittelwert und Standardabweichung vom DNA-Mittelwert der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	4,11	0,98	113
Großzeller	4,79	1,66	143
Plattenepithel	4,71	1,38	265
Adeno	4,30	1,51	240
Gesamtfallzahl	4,51	1,45	761

Die größten Streubreiten beobachtete man bei Großzellern mit 1,66, Adenokarzinomen mit 1,51 und Plattenepithelkarzinomen mit 1,38 (Abbildung 15).

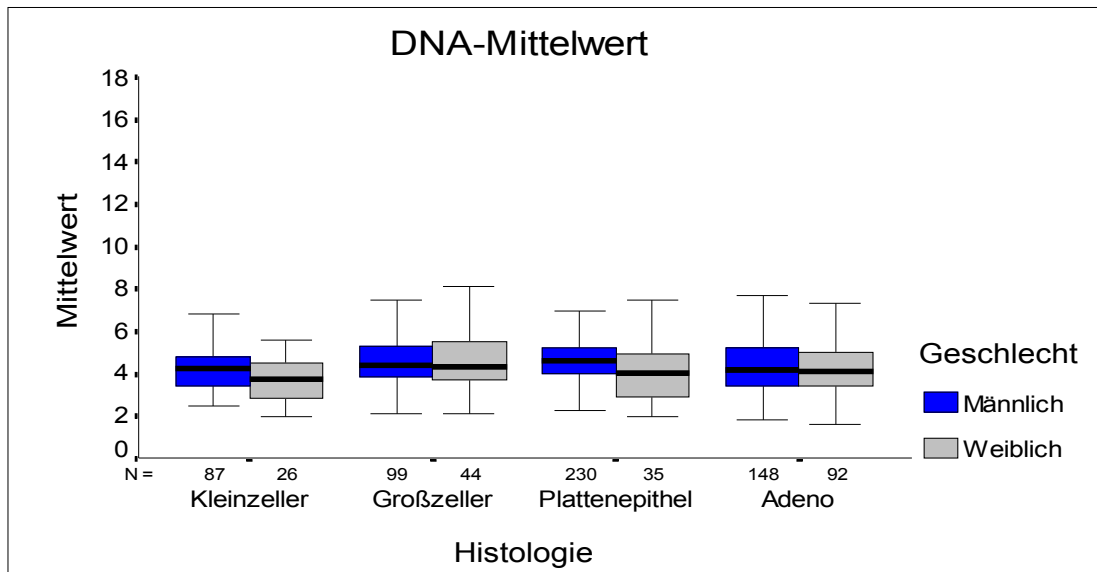


Abbildung 15: DNA-Mittelwert der untersuchten Tumorarten

Der Mittelwert des DNA-Index wies für die gesamte Population einen Wert von 2,19 bei einer Standardabweichung von 7,10 auf. Der geringste Mittelwert lag bei 1,65 vom Kleinzeller gefolgt von 1,79 der Adenokarzinome. Mit Abstand den höchsten Wert beobachtete man mit 3,82 bei den Großzellern (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mittelwert und Standardabweichung des DNA-Index

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	1,65	0,41	113
Großzeller	3,82	16,20	143
Plattenepithel	1,91	1,31	265
Adeno	1,79	0,62	240
Gesamtfallzahl	2,19	7,10	761

Die größte Streubreite wies ebenfalls die Gruppe der Großzeller mit 16,20 auf. Den zweithöchsten Wert beobachtete man bei den Plattenepithelkarzinomen mit 1,31, gefolgt von den Adenokarzinomen. Der niedrigste Wert lag mit 0,41 in der Gruppe der Kleinzeller.

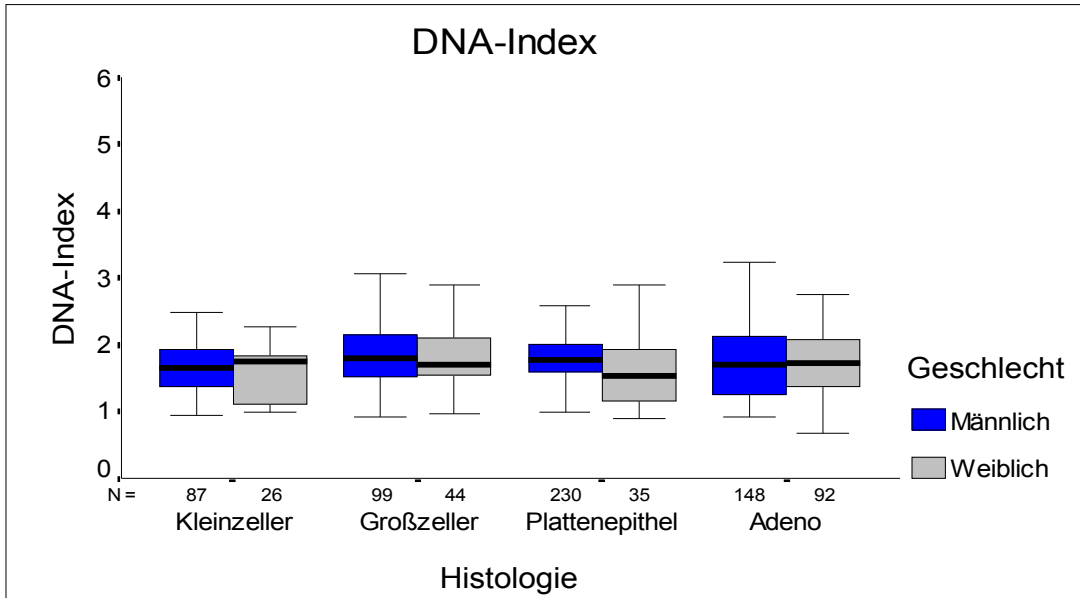


Abbildung 16: DNA-Index der untersuchten Tumorarten

Der 2c Deviation Index beschreibt die Varianz der DNA-Werte um den diploiden Chromosomensatz. Für die Gesamtpopulation ergab sich ein Wert von 12,23 bei einer Standardabweichung von 17,45. Die höchste Varianz wurde bei den Großzellern mit einem Wert von 16,16 beobachtet, gefolgt von der Gruppe der Plattenepithelkarzinome mit einem Wert von 13,17 sowie den Adenokarzinomen mit 11,12. Eine sehr geringe Varianz zeigten die Kleinzeller mit 7,44 bei einer Standardabweichung von 5,56.

Tabelle 9: Mittelwert und Standardabweichung vom 2c Deviation Index der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	7,44	5,56	113
Großzeller	16,16	26,94	143
Plattenepithel	13,17	14,86	265
Adeno	11,12	16,01	240
Gesamtfallzahl	12,23	17,45	761

Bei der Streubreite der Varianz sind große Unterschiede innerhalb der einzelnen Tumorgruppen zu finden. Insbesondere fällt die hohe Streubreite der Großzeller mit 26,94, der Adenokarzinome mit 16,01 und der Plattenepithelkarzinome mit 14,86 auf. Die Gruppe der Kleinzeller ist hiervon kaum betroffen.

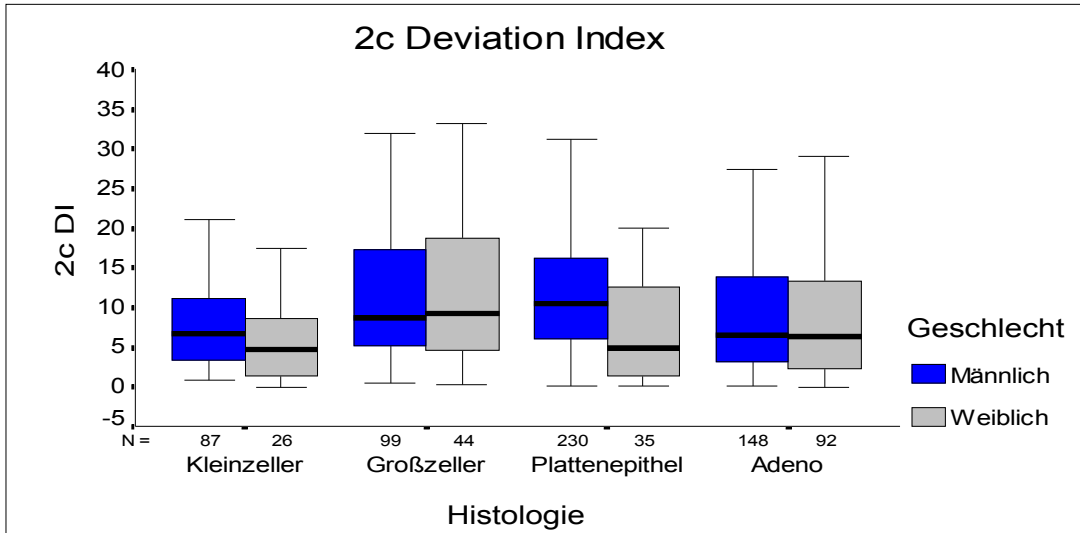


Abbildung 17: Streubreite des 2c Deviation Index der untersuchten Tumorarten

Die Auswertung der 5c Exceeding Events ergab für die Gesamtpopulation einen Mittelwert von 0,21 bei einer Standardabweichung von 0,21. Der niedrigste Wert lag in der Gruppe der Kleinzeller mit 0,14, den höchsten Wert wiesen die Großzeller mit 0,24 gefolgt von den Plattenepithelkarzinomen mit 0,23 und den Adenokarzinomen mit 0,20 auf. Hier ist zu beachten, dass das Vorkommen von drei oder mehr Zellen mit einem DNA-Gehalt = 5c als Nachweis für Aneuploidisierung gilt.

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung von 5c Exceeding Events der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	0,14	0,13	113
Großzeller	0,24	0,22	143
Plattenepithel	0,23	0,20	265
Adeno	0,20	0,24	240
Gesamtfallzahl	0,21	0,21	761

Betrachtet man die Streubreite der Häufigkeit der 5c Exceeding Events in der graphischen Darstellung, fällt die geringe Streuung bei der Gruppe der Kleinzeller auf.

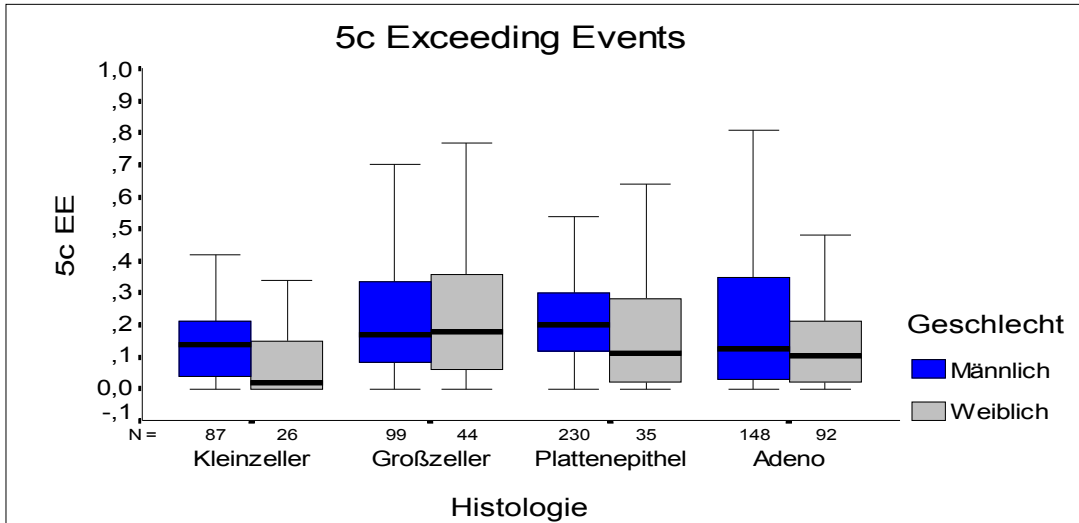


Abbildung 18: Streubreite der 5c Exceeding Events der untersuchten Tumorarten

Erwartungsgemäß liegt die Häufigkeit der 9c Exceeding Events unter der Häufigkeit der in der vorangegangenen Darstellung der 5c Exceeding Events. Es ergab sich für die gesamte Population ein Mittelwert von 0,04 bei einer Standardabweichung von 0,16. Bei den einzelnen Gruppen zeigten sich die höchsten Werte bei den Großzellern und Adenokarzinomen mit je 0,05 gefolgt von der Gruppe der Plattenepithelkarzinome mit 0,04. Der niedrigste Wert fand sich bei den Kleinzellern mit 0,01.

Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung von 9c Exceeding Events der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	0,01	0,03	113
Großzeller	0,05	0,09	143
Plattenepithel	0,04	0,06	265
Adeno	0,05	0,26	240
Gesamtfallzahl	0,04	0,16	761

Abbildung 19 zeigt die hohe Streuung der 9c Exceeding Events bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Im Gegensatz dazu ist die Streubreite der Kleinzeller sehr gering.

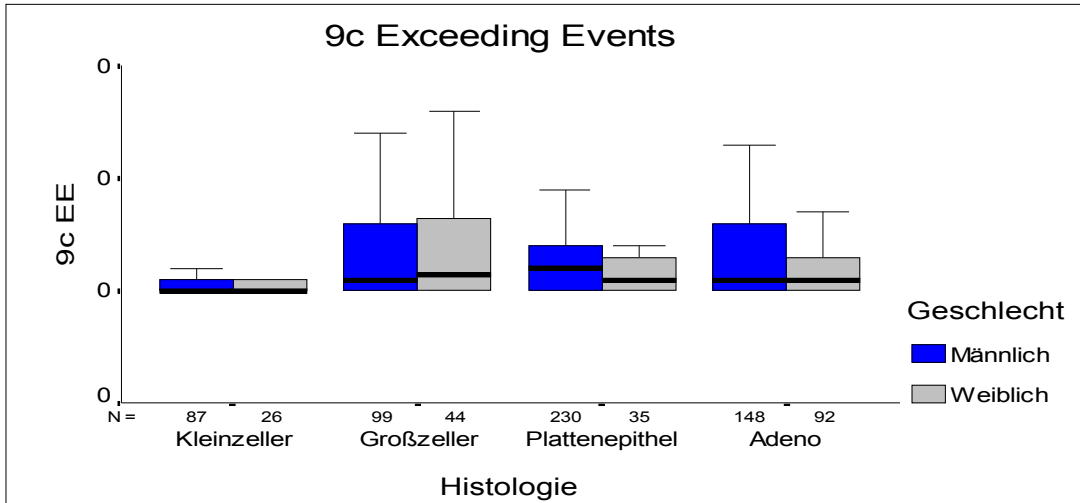


Abbildung 19: Streubreite der 9c Exceeding Events

Die Mittelwertverteilung für den Variationskoeffizienten zeigt eine relativ einheitliche Verteilung für die einzelnen Gruppen. Der Wert für die gesamte Population lag bei 37,03 mit einer Standardabweichung von 12,85. In einzelnen zeigten sich die Plattenepithelkarzinome als die Gruppe mit dem höchsten Wert bei 39,95 und die Kleinzeller mit dem niedrigsten Wert von 32,76.

Tabelle 12: Mittelwert und Standardabweichung vom Variationskoeffizienten der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	32,76	8,13	113
Großzeller	38,76	14,62	143
Plattenepithel	39,95	12,14	265
Adeno	34,79	13,41	240
Gesamtfallzahl	37,03	12,85	761

Die folgende graphische Darstellung (Abbildung 20) verdeutlicht die recht homogene Streubreite der Kleinzeller sowie die davon abweichende Streuung der Gruppen der Nichtkleinzeller.

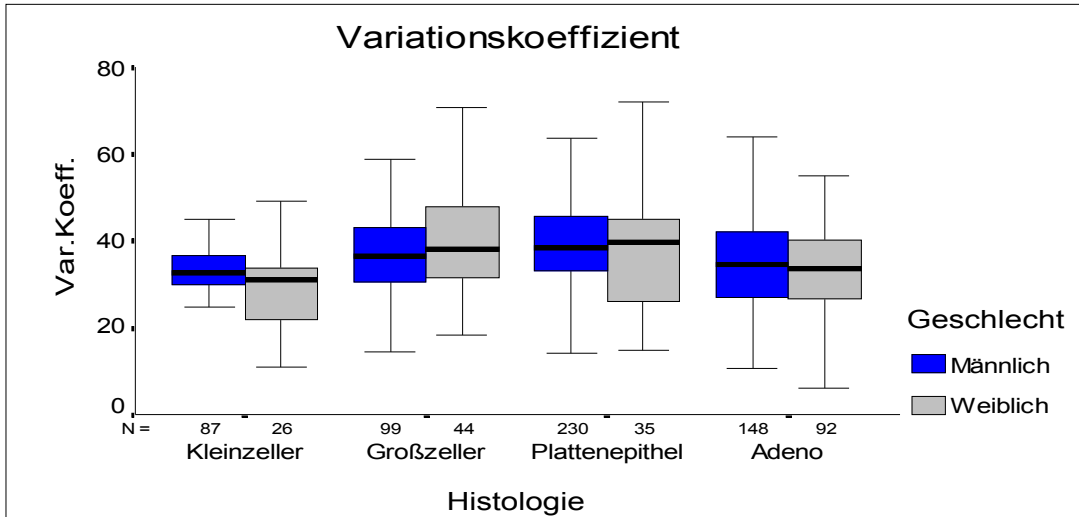


Abbildung 20: Streubreite des Variationskoeffizienten

Der DNA-Malignitätsgrad weist für die gesamte Population einen Mittelwert von 1,92 bei einer Standardabweichung von 7,15 aus. Bei den einzelnen Gruppen findet sich der höchste Wert mit 2,34 bei den Adenokarzinomen gefolgt von den Plattenepithelkarzinomen und Großzellern mit je 1,80. Der niedrigste Wert wurde bei den Kleinzellern mit 1,48 beobachtet.

Tabelle 13: Mittelwert und Standardabweichung vom DNA-Malignitätsgrad der untersuchten Tumorarten

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	1,48	0,57	113
Großzeller	1,80	0,69	143
Plattenepithel	1,80	0,63	265
Adeno	2,34	12,71	240
Gesamtfallzahl	1,92	7,15	761

In der graphischen Darstellung (Abbildung 21) wird die hohe Streubreite der Nichtkleinzeller verdeutlicht.

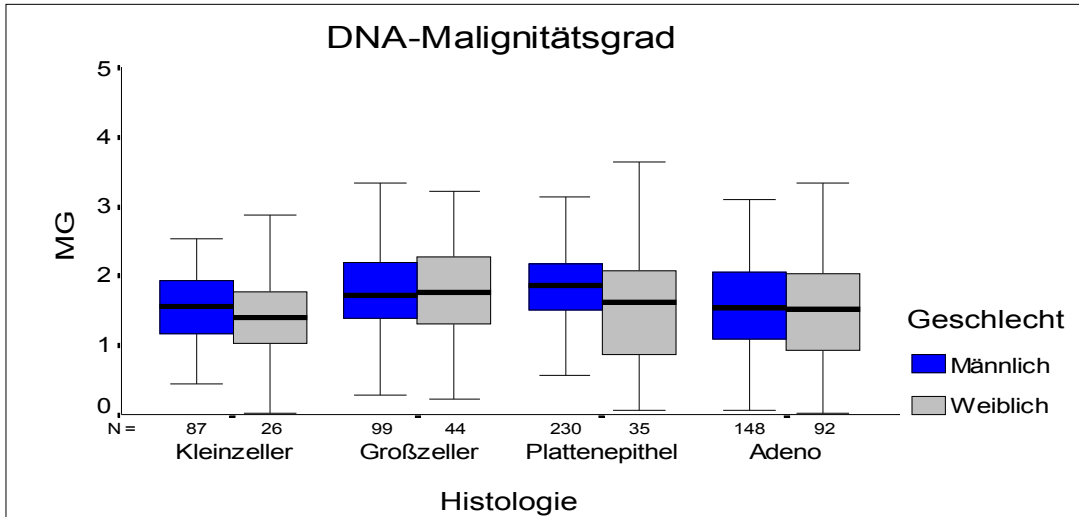


Abbildung 21: Streubreite des DNA-Malignitätsgrades

3.8 Kleinzeller (SCLC) versus Nichtkleinzeller (NSCLC)

Im folgenden werden die DNA-Parameter der kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) und der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) dargestellt und miteinander verglichen. Zu der Gruppe der NSCLC gehören die Großzeller, Plattenepithel-, und Adenokarzinome. In der Gruppe der Kleinzeller sind 113 Fälle gegenüber 648 Fällen der Nichtkleinzeller.

Tabelle 14 zeigt, daß die Stammlinie im Mittelwert bei den Kleinzellern unter dem Mittelwert der Nichtkleinzeller liegt. Die Standardabweichung der Kleinzeller ist erheblich geringer als die Streubreite der Nichtkleinzeller.

Für die Gesamtpopulation ergibt sich ein Mittelwert von 3,91 mit einer Standardabweichung von 8,86.

Tabelle 14: Mittelwert und Standardabweichung vom Modalwert Kleinzeller versus Nichtkleinzeller

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	3,31	0,82	113
Nichtkleinzeller	4,02	9,60	648
Gesamtfallzahl	3,91	8,86	761

In Abbildung 22 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.

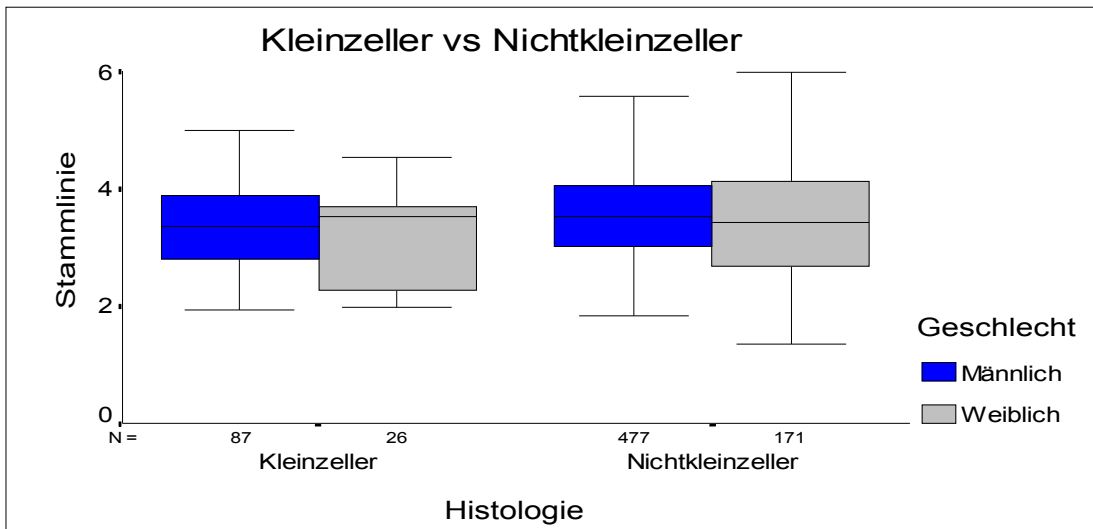


Abbildung 22: Stammlinienverteilung der Kleinzeller und Nichtkleinzeller

Der Vergleich der DNA-Mittelwerte der beiden Gruppen NSCLC und SCLC zeigt einen relativ homogenen Mittelwert auch im Vergleich zur Gesamtpopulation. Bei den Nichtkleinzellern fällt die deutlich niedrigere Standardabweichung, bei den Kleinzellern dagegen die deutlich höhere Standardabweichung auf (Tabelle 15).

Tabelle 15: Mittelwert und Standardabweichung vom DNA-Mittelwert Kleinzeller versus Nichtkleinzeller

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	4,65	4,98	113
Nichtkleinzeller	4,58	1,51	648
Gesamtfallzahl	4,59	2,36	761

Die Ergebnisse werden in der folgenden Abbildung 23 noch einmal graphisch dargestellt.

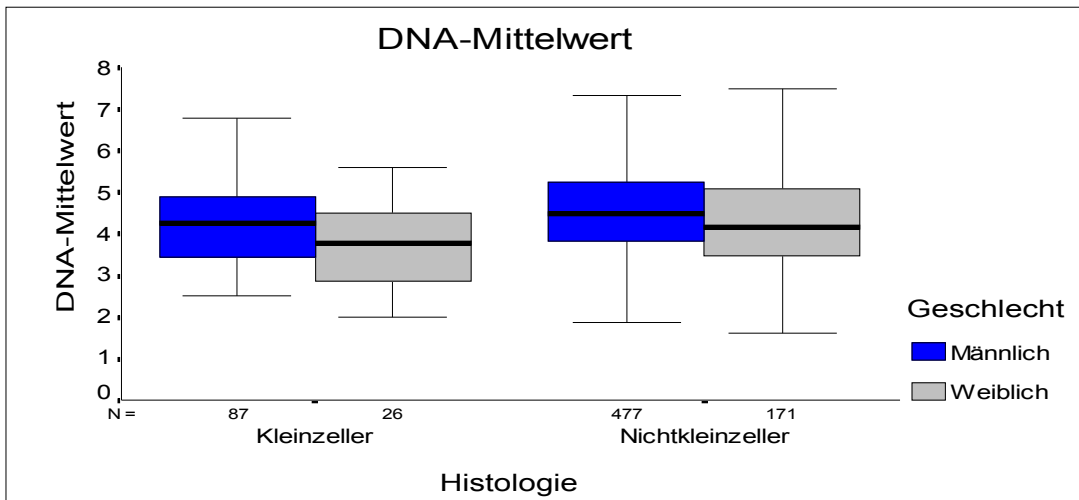


Abbildung 23: DNA-Mittelwert-Verteilung Kleinzeller versus Nichtkleinzeller

Der Vergleich Kleinzeller versus Nichtkleinzeller ergibt für den DNA-Index relativ homogene Werte bei der Gruppe der Nichtkleinzeller und der Gesamtpopulation. Die Kleinzeller liegen mit einem Mittelwert von 1,65 und einer Standardabweichung von 0,41 deutlich unter der Vergleichsgruppe (Tabelle 16).

Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichung vom DNA-Index NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	1,65	0,41	113
Nichtkleinzeller	2,29	7,69	648
Gesamtfallzahl	2,19	7,10	761

Die Verteilung wird in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

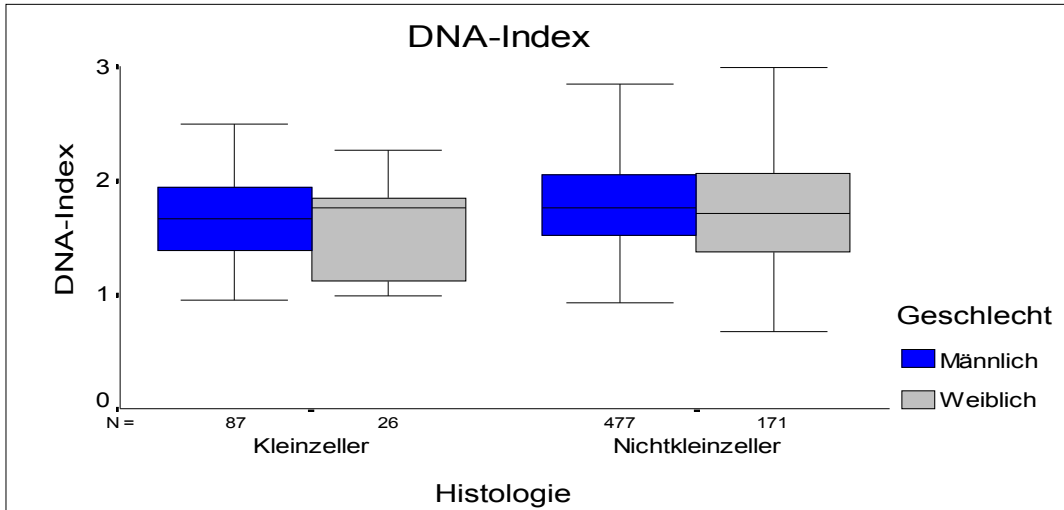


Abbildung 24: DNA-Index Kleinzeller versus Nichtkleinzeller

Die Auswertung des 2c Deviation Index zeigt bei dem Vergleich des Mittelwertes einen deutlichen Unterschied bei der Gruppe der Kleinzeller gegenüber den Nichtkleinzellern. Die Gruppe der Nichtkleinzeller hat mit einem Wert von 13,07 und einer Standardabweichung von 18,64 nahezu gleiche Werte im Vergleich zur Gesamtpopulation. Gegenüber den Kleinzellern liegt hier bei Betrachtung des Mittelwertes fast eine Verdoppelung, bei der Standardabweichung annähernd eine Verdreifachung vor (Tabelle 17).

Tabelle 17: Mittelwert und Standardabweichung vom 2c Deviation Index NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	7,44	5,56	113
Nichtkleinzeller	13,07	18,64	648
Gesamtfallzahl	12,23	17,45	761

Die graphische Darstellung der Verteilung zeigt Abbildung 25.

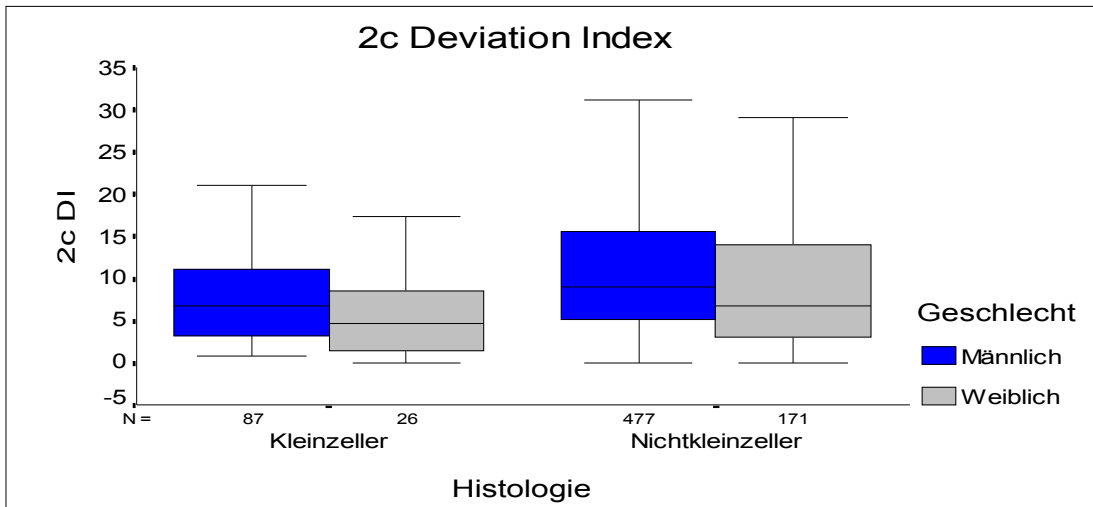


Abbildung 25: Verteilung des 2c Deviation Index NSCLC versus SCLC

Auch bei der Auswertung der 5c Exceeding Events fällt auf, dass die Werte der Nichtkleinzeller analog der Gesamtpopulation ausfallen, während die Gruppe der Kleinzeller mit einem Mittelwert von 0,14 und einer Standardabweichung von 0,13 deutlich niedriger liegt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Mittelwert und Standardabweichung von 5c Exceeding Events NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	0,14	0,13	113
Nichtkleinzeller	0,22	0,22	648
Gesamtfallzahl	0,21	0,21	761

Abbildung 26 zeigt die graphische Verteilung.

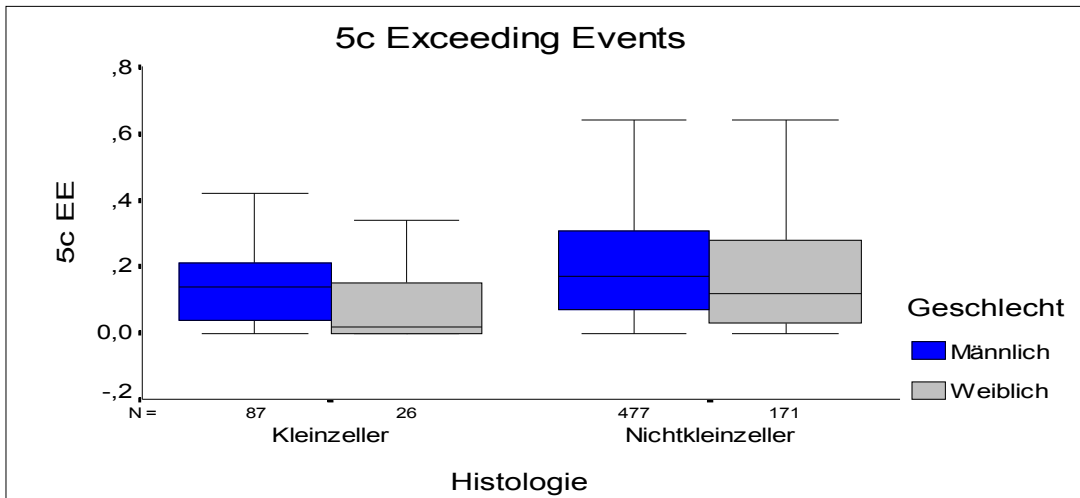


Abbildung 26: Medianverteilung der 5c Exceeding Events NSCLC versus SCLC

Auch bei der Auswertung der Werte für 9c Exceeding Events zeigen sich erneut relativ identische Werte zwischen der Gesamtpopulation und der Gruppe der Nichtkleinzeller, während die Gruppe der Kleinzeller mit einem Mittelwert von 0,01 und einer Standardabweichung von 0,03 deutlich niedriger liegen.

Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung von 9c Exceeding Events NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	0,01	0,03	113
Nichtkleinzeller	0,05	0,17	648
Gesamtfallzahl	0,04	0,16	761

Die graphische Darstellung verdeutlicht die Ergebnisse (Abbildung 27).

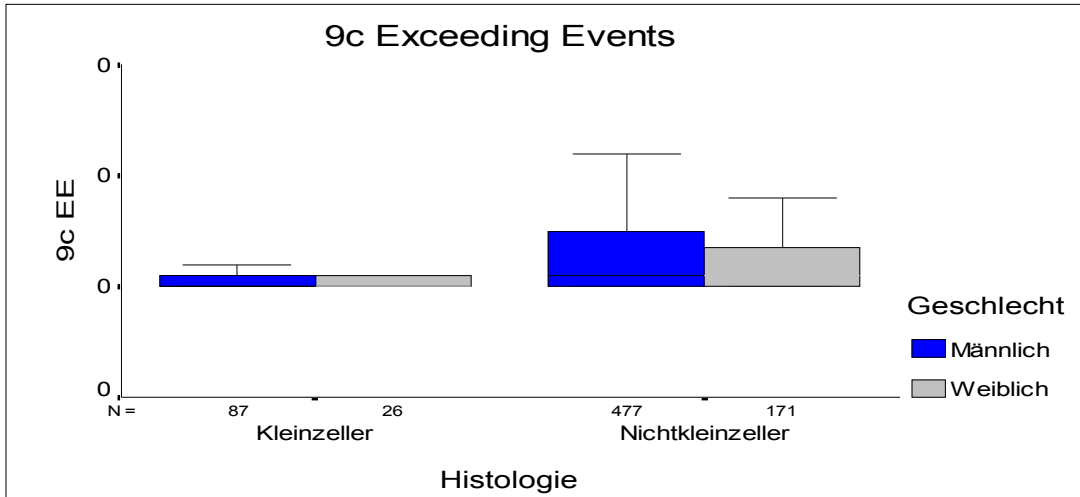


Abbildung 27: Medianverteilung der 9c Exceeding Events NSCLC versus SCLC

Der Mittelwert und die Standardabweichung des Variationskoeffizienten der Gruppe der Nichtkleinzeller weichen nur geringfügig vom Wert der Gesamtpopulation ab. Während der Mittelwert der Kleinzeller hier mit 32,76 einen ähnlich hohen Wert erreicht, liegt die Standardabweichung mit 8,13 deutlich unter den Vergleichswerten (Tabelle 20).

Tabelle 20: Mittelwert und Standardabweichung vom Variationskoeffizienten NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	32,76	8,13	113
Nichtkleinzeller	37,77	13,38	648
Gesamtfallzahl	37,03	12,85	761

Die Unterschiede werden in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

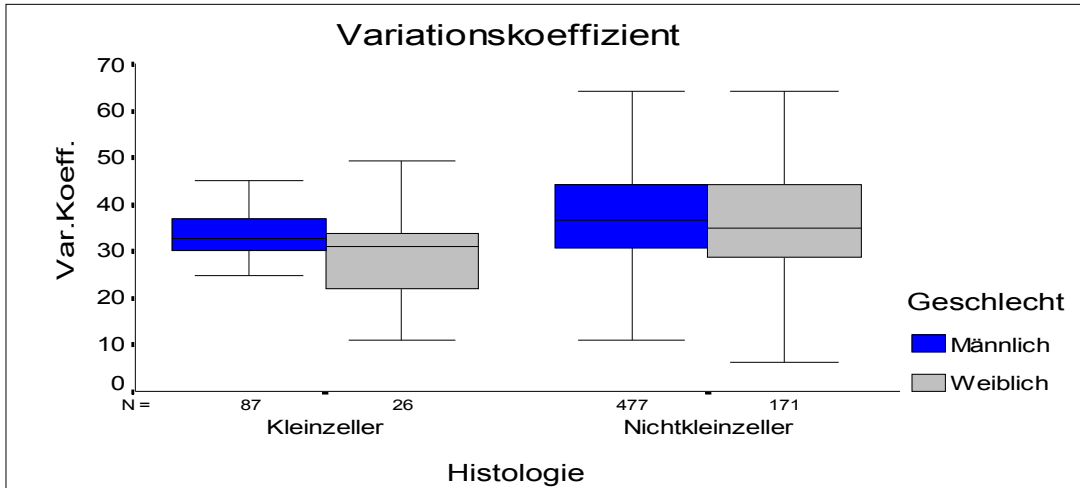


Abbildung 28: Variationskoeffizienten NSCLC versus SCLC

Der Mittelwert des DNA-Malignitätsgrades liegt wiederum in der Gruppe der Nichtkleinzeller mit 1,70 und einer Standardabweichung von 0,71 relativ homogen zur Gesamtpopulation. Dagegen liegt die Gruppe der Kleinzeller mit einem Mittelwert von 1,48 und einer Standardabweichung von 0,57 niedriger.

Tabelle 21: Mittelwert und Standardabweichung vom Malignitätsgrad NSCLC versus SCLC

TUMOR	Mittelwert	Standard-Abweichung	Anzahl
Kleinzeller	1,48	0,57	113
Nichtkleinzeller	1,70	0,71	648
Gesamtfallzahl	1,67	0,69	761

In Abbildung 29 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.

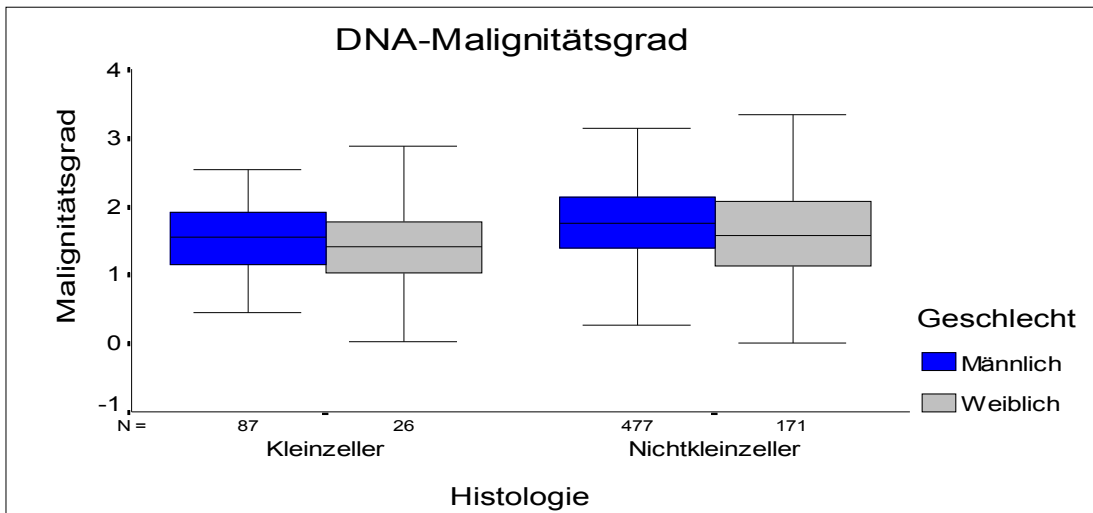


Abbildung 29: Malignitätsgrad NSCLC versus SCLC

3.9 Unterschiede in der S/G₂/M-Fraktion im Vergleich zur Histologie

Ein Vergleich der Werte der S/G₂/M-Fraktion der Diagnosegruppen, die hinsichtlich der Fallzahlen ausreichend besetzt waren (Abbildung 30), zeigte nur für die Adenokarzinome signifikant geringere Werte der S/G₂/M-Fraktion. Diese Gruppe hatte im Vergleich zu den übrigen Diagnosen die signifikant geringere mediane S/G₂/M-Fraktion. Im Mann-Whitney-U-Test zeigten sich für die einzelnen Tumorgruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte zwischen Adenokarzinomen und Kleinzellern, Großzellern und Plattenepithelkarzinomen ein hochsignifikanter Unterschied angenommen werden ($p < 0,001$). Tabelle 22 gibt einen Überblick über die geringen Unterschiede der Mittelwerte und der Mediane zwischen den Gruppen der Kleinzeller, Großzeller und Plattenepithelkarzinomen einerseits und im Vergleich dazu der Adenokarzinome.

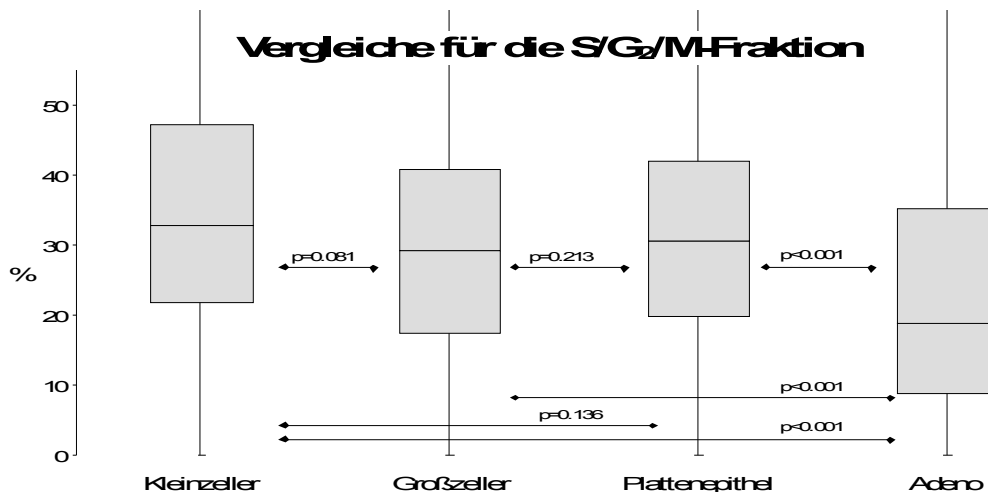


Abbildung 30: Vergleich der S/G₂/M-Fraktion und der verschiedenen Tumorgruppen. p-Werte ≤0,05 weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

Tabelle 22: Mittelwert und Medianverteilung der S/G₂/M-Fraktion im Vergleich zu den Tumorgruppen. Nur Diagnosen mit ausreichender Gruppenstärke. Datenbasis n=761. Werte nicht verfügbar: S/G₂/M-Fraktion n=3

Tumor	S/G ₂ /M-Fraktion							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil	Max.	
Kleinzeller	33	18	0	22	33	47	87	113
Großzeller	31	18	0	18	29	41	90	140
Plattenepithel	32	17	0	20	31	42	91	265
Adeno	23	18	0	9	19	35	87	240
Gesamt	29	18	0	16	28	40	91	758

3.10 Unterschiede in der S/G₂/M-Fraktion nach Ploidiestatus

In einem weiteren Schritt wurden Unterschiede zwischen Gruppen mit unterschiedlichem Ploidiestatus in den Werten der S/G₂/M-Fraktion geprüft.

Die statistische Signifikanzprüfung zeigte signifikant höhere Werte bei aneuploiden und hinsichtlich des Ploidiestatus zweifelhaften Tumorarten (Abbildung 31). Betrachtet man die verschiedenen Gruppen untereinander, ergibt sich mit p=0,402 ein nicht-signifikanter Unterschied zwischen der aneuploiden und zweifelhaften Gruppe. Zwischen zweifelhaftem und diploiden Status liegt mit p=0,026 ein signifikanter, zwischen aneuploidem und diploidem Status mit p=0,001 ein hochsignifikanter Unterschied. Der Median der S/G₂/M-Fraktion bei diploiden Tumoren lag bei 16%, während die Mediane der aneuploiden oder hinsichtlich des Ploidiestatus zweifelhaften Tumorarten zwischen 26% und 28% lagen (Tabelle 23).

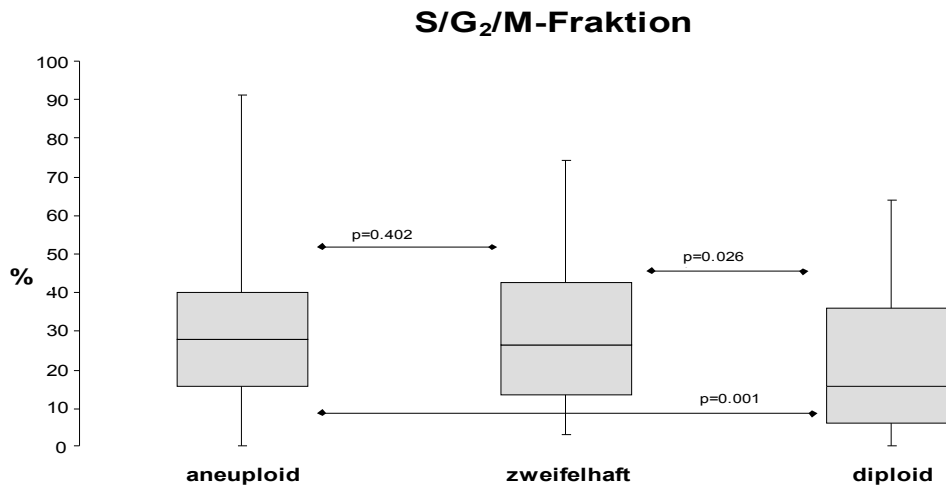


Abbildung 31: Vergleich von Gruppen mit unterschiedlichem Ploidiestatus in den Werten der S/G₂/M-Fraktion.

Tabelle 23: Verteilung der Mittelwerte und der Mediane der S/G₂/M-Fraktion. Datenbasis: n=799. Werte nicht verfügbar: S/G₂/M-Fraktion n=4

Ploidie-Status	S/G ₂ /M-Fraktion						Datenbasis	
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil		Max.
aneuploid	29	18	0	16	28	40	91	701
zweifelhaft	28	18	3	13	26	43	74	43
diploid	22	18	0	6	16	36	64	51
Gesamt	29	18	0	15	27	40	91	795

3.11 Unterschiede in der S/G₂/M-Fraktion und G₀/G₁-Fraktion

Zum Vergleich der G₀/G₁-Werte mit der jeweiligen S/G₂/M-Fraktion wurden die G₀/G₁-Werte in verschiedene Intervalle eingeteilt (Tabelle 24). Signifikanztest war der Mann-Whitney-U-Test. Auch hier zeigten sich je nach G₀/G₁-Fraktion statistisch signifikante Unterschiede in der S/G₂/M-Fraktion, wie Abbildung 32 zeigt. Auffällig war insbesondere die unterschiedliche Verteilung der Mediane. Höhere Werte in der G₀/G₁-Fraktion (ab dem Intervall 25-49) gingen mit einer signifikanten Reduktion der Werte der S/G₂/M-Fraktion einher. G₀/G₁-Werte unter 25 hatten den S/G₂/M-Medianwert von 0%. Allerdings war aufgrund von Ausreißerwerten eine große Streubreite feststellbar. Erst höhere Abschnitte auf der G₀/G₁-Werteskala gehen mit einer Reduktion einher, d.h. von 57% der S/G₂/M-Fraktion bei G₀/G₁ 25-49 auf 36% und danach auf 14% im G₀/G₁-Intervall ab 75% (Abbildung 32). Signifikante

Unterschiede ergaben sich zwischen dem G_0/G_1 -Intervall 0-24 und 25-49 und zwischen 0-24 und 50-74. Hochsignifikante Unterschiede bestanden zwischen den Intervallen 25-49 und 50-74, 25-49 und 75-100 sowie den Intervallen 50-74 und 75-100 mit $p < 0,001$. Ein nicht-signifikanter Unterschied ergab sich hingegen bei dem Vergleich der Intervalle 0-24 und 75-100 mit $p = 0,057$.

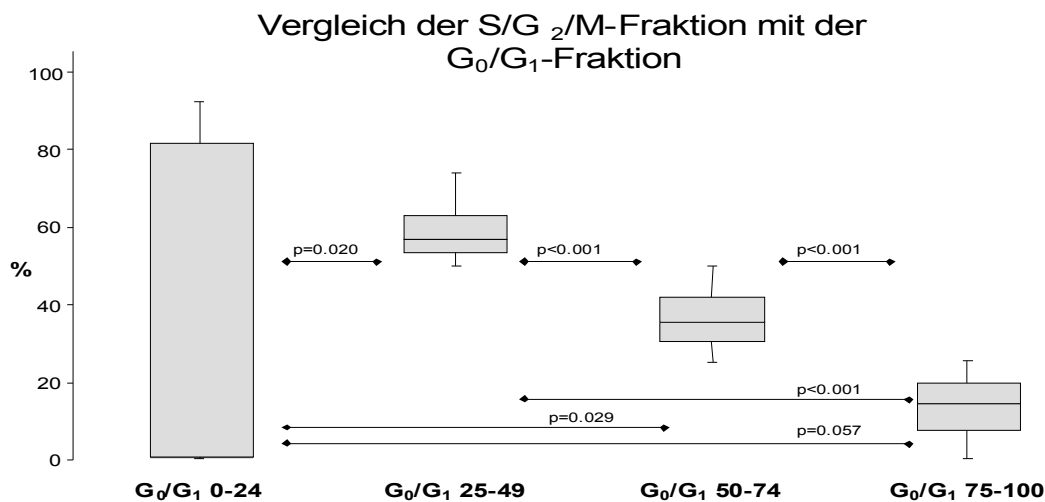


Abbildung 32: Vergleich von Gruppen unterschiedlicher G_0/G_1 -Fraktion anhand von Werten der $S/G_2/M$ -Fraktion. p -Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

Tabelle 24: Mittelwert und Medianverteilung der G_0/G_1 -Intervalle im Vergleich mit der $S/G_2/M$ -Fraktion. Datenbasis $n=799$; Werte nicht verfügbar: G_0/G_1 $n=4$, $S/G_2/M$ $n=4$

G_0/G_1	S/ G_2 /M Fraktion							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil	Max.	
0-24	32	41	0	0	0	81	91	27
25-49	59	6	50	53	57	63	74	92
50-74	36	7	25	30	36	42	50	320
75-100	14	7	0	7	14	20	25	356
Gesamt	29	18	0	15	27	40	91	795

3.12 Unterschiede des MIB-1 im Vergleich zur Histologie

Der Vergleich der MIB-1-Werte je nach Diagnosegruppe zeigte erneut für die Adenokarzinome signifikant geringere Werte (Abbildung 33). Diese Gruppe hatte im Vergleich zu den übrigen Diagnosen den signifikant geringeren MIB-1-Median, während andererseits Patienten mit Kleinzellern den höchsten MIB-1-Wert aufwiesen. Der mediane MIB-1-Wert dieser Gruppe lag bei 90% (Adenokarziompatienten

hingegen hatten einen Wert von 33%). Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigt lediglich für die Großzeller und Plattenepithelkarzinome mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,346$ keinen signifikanten Unterschied. Alle anderen Vergleiche ergaben mit $p<0,001$ einen hochsignifikanten Unterschied. Tabelle 25 zeigt die geringen Unterschiede der Mittelwerte, wobei die Kleinzeller mit 74 den höchsten Wert einnehmen und die Großzeller mit 62 und Plattenepithelkarzinome mit 61 eng beieinander liegen. Die Adenokarzinome liegen mit einem Mittelwert von 38 deutlich darunter, sie zeigen mit einer Standardabweichung von 26 eine größere Streubreite als Plattenepithelkarzinome und Großzeller.

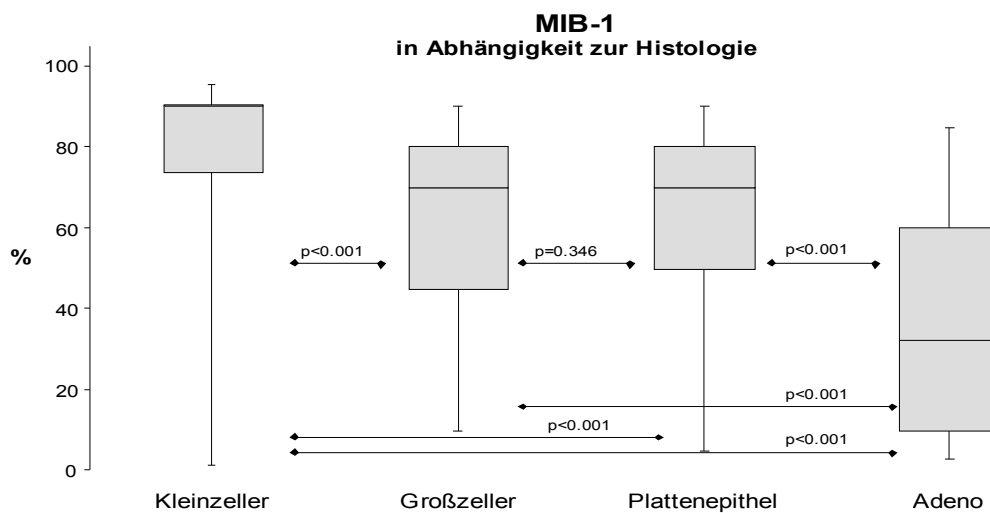


Abbildung 33: Vergleich von MIB-1 und Histologie der Tumorgruppen. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin. Signifikanztest war der Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 25: Mittelwert und Medianverteilung von MIB-1 in Abhängigkeit zur Histologie. Nur Diagnosen mit ausreichender Gruppenstärke. Datenbasis $n=761$. Werte nicht verfügbar: Ki67 $n=568$

Tumor	MIB-1							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil	Max.	
Kleinzeller	74	30	1	74	90	90	95	32
Großzeller	62	24	10	45	70	80	90	27
Plattenepithel	61	21	5	50	70	80	90	60
Adeno	38	26	3	10	33	60	85	74
Gesamt	55	28	1	30	60	80	95	193

Die Häufigkeiten von MIB-1-Werten über 20 (Abbildung 34) zeigen für Adenokarzinome die geringste Rate an, während die übrigen Gruppen deutlich höhere Häufigkeiten an erhöhten MIB-1-Werten haben, sich untereinander statistisch gesehen jedoch nicht unterscheiden. Im χ^2 -Test zeigten sich im Vergleich der

Gruppen Kleinzeller und Großzeller, Großzeller und Plattenepithelkarzinom sowie Kleinzeller und Plattenepithelkarzinome keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu zeigten die Adenokarzinome im Vergleich zu den Kleinzellern und den Großzellern einen signifikanten Unterschied, im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen mit $p < 0,001$ einen hochsignifikanten Unterschied.

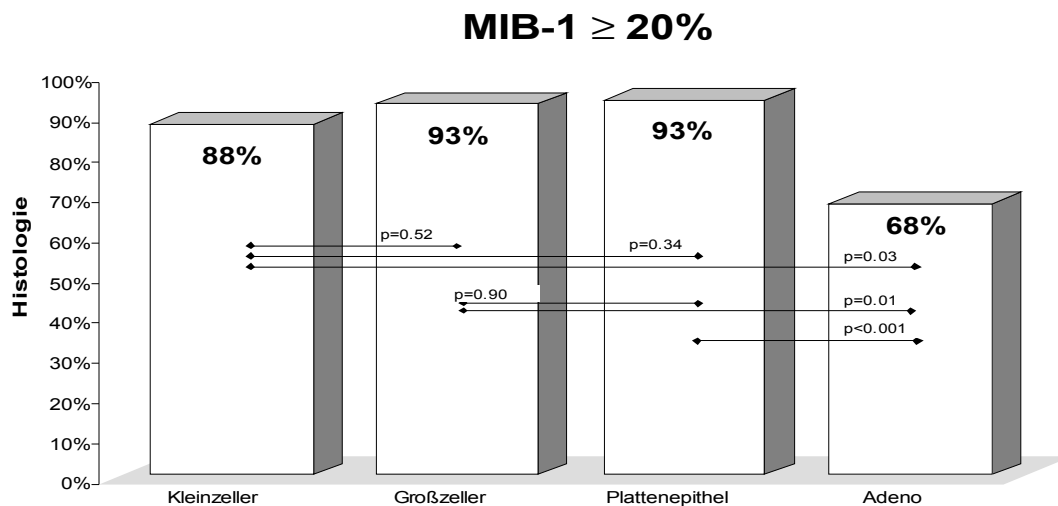


Abbildung 34: Häufigkeiten des hohen MIB-1-Index ($\geq 20\%$) in Abhängigkeit zur Histologie. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin. Signifikanztest war der Chi²-Test.

Tabelle 26: Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Index ($\geq 20\%$). Datenbasis n=761. Werte nicht verfügbar: MIB-1 $\geq 20\%$ n=568

Tumor	MIB-1 \geq 20%		Datenbasis
	%	Fälle	
Kleinzeller	88%	28	32
Großzeller	93%	25	27
Plattenepithel	93%	56	60
Adeno	68%	50	74
Gesamt	82%	159	193

3.13 Unterschiede des MIB-1 je nach Ploidiestatus

Von einem Teil des Kollektivs (n=200) lagen MIB-1-Werte vor (Tabelle 27). Prüft man diese Daten je nach Ploidie-Status, so zeigt sich der erwartungsgemäß geringste MIB-1-Median bei diploiden Tumoren und der höchste bei aneuploiden Tumorarten, wie die Medianwerte in Abbildung 35 zeigen. Tumore mit zweifelhaftem Status liegen

dazwischen. Der Unterschied der Mediane wird zwischen Tumoren mit aneuploidem und diploidem Status statistisch signifikant. Nach Mann-Whitney-U-Test ergab sich mit $p=0,006$ ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der aneuploiden und diploiden Tumorgruppe. Zwischen aneuploider und zweifelhafter Gruppe bestand zwischen zweifelhafter und diploider Gruppe ein nicht-signifikanter Unterschied.

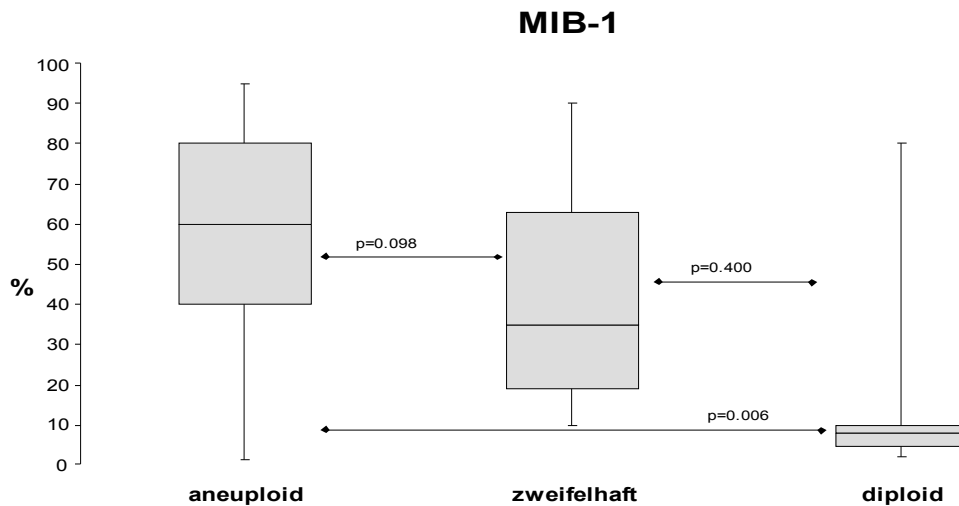


Abbildung 35: Vergleich von Gruppen mit unterschiedlichem Ploidiestatus in den Werten von MIB-1 in Prozent. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

Tabelle 27: Mittelwert und Medianverteilung von MIB-1 .Datenbasis n=799;Werte nicht verfügbar: MIB-1 n=599

Ploidie-Status	MIB-1							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil	Max.	
aneuploid	57	27	1	40	60	80	95	183
zweifelhaft	43	32	10	19	35	63	90	6
diploid	17	25	2	5	8	10	80	11
Gesamt	54	28	1	30	60	80	95	200

Die MIB-1-Werte werden unterteilt in hohe ($\geq 20\%$) und niedrige Werte ($< 20\%$). Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die MIB-1-Werte anhand der Schwelle von ± 20 kategorisiert und die Auftretenshäufigkeiten, d.h. Inzidenzen, von MIB-1-Werten über 20 betrachtet (die Auftretenshäufigkeiten von Werten unter 20 sind 1:1 komplementär hierzu). Die höchste Rate an erhöhten MIB-1-Werte finden sich unter Tumoren mit aneuploiden Status (86%). Die geringste Rate findet sich erwartungsgemäß bei

Tumoren mit diploidem Status. Hier fanden sich in 18% der Fälle erhöhte MIB-1-Werte (Tabelle 28).

Bei Vergleich des Ploidiestatus findet man bei Anwendung des Chi²-Testes zwischen aneuploidem und zweifelhaftem Status mit $p=0,66$ einen nonsignifikanten Unterschied, zwischen aneuploidem und diploidem Status einen signifikanten Unterschied. Zwischen zweifelhaftem und diploidem Status besteht mit $p<0,001$ ein hochsignifikanter Unterschied (Abbildung 36).

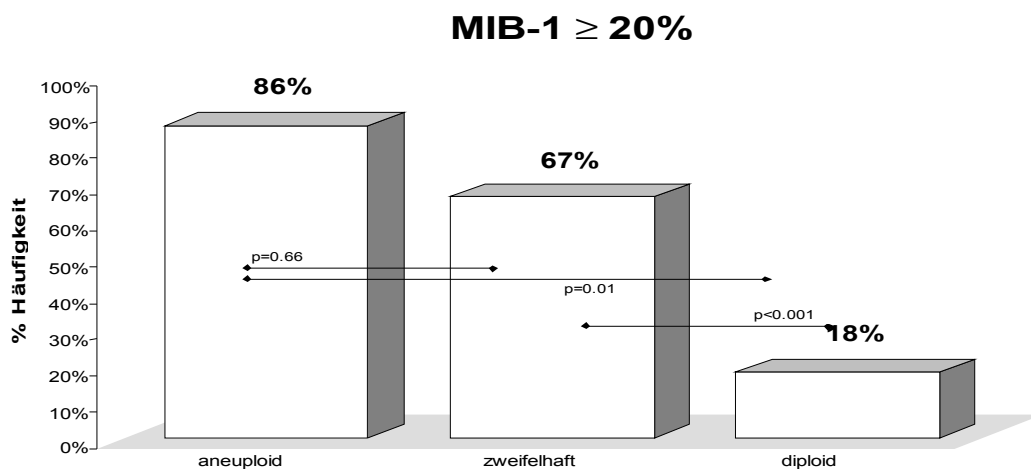


Abbildung 36: Häufigkeit und prozentuale Verteilung von kategorisierten MIB-1-Werten ($\geq 20\%$), d.h. hoher Index. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin.

Tabelle 28: Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Wertes. Datenbasis $n=799$. Werte nicht verfügbar: MIB-1 $\geq 20\%$ $n=599$

Ploidie-Status	MIB-1 $\geq 20\%$		Datenbasis
	%	Fälle	
aneuploid	86%	158	183
zweifelhaft	67%	4	6
diploid	18%	2	11
Gesamt	82%	164	200

3.14 Unterschiede des MIB-1 je nach G_0/G_1 -Fraktion

Mit statistisch signifikant erhöhten MIB-1-Werten war bei Tumoren zu rechnen, die G_0/G_1 -Werte im mittleren (G_0/G_1 50-74) oder geringen Bereich (G_0/G_1 0-49) hatten (Tabelle 29). Hingegen waren die MIB-1-Werte bei Tumoren mit G_0/G_1 -Werten im höheren Bereich (G_0/G_1 75-100) statistisch signifikant geringer, wie ein Vergleich der

Mediane in Abbildung 37 zeigt. Im Mann-Whitney-U-Test fand sich bei Vergleich des G_0/G_1 -Intervalls 0-49 und 50-74 kein signifikanter Unterschied der Mediane. Hingegen besteht zwischen Intervall 0-49 und 75-100 und zwischen Intervall 50-74 und 75-100 ein hochsignifikanter Unterschied

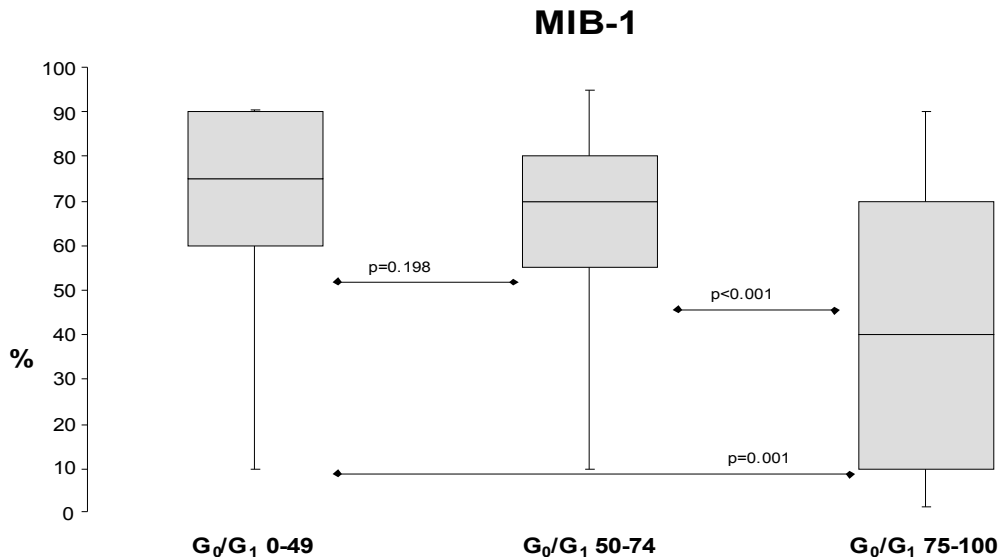


Abbildung 37: Vergleich von MIB-1 mit unterteilter G_0/G_1 -Fraktion. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin.

Tabelle 29: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Mittelwerte und Mediane. Datenbasis n=799. Werte nicht verfügbar: G_0/G_1 n=1, MIB-1 n=599

G_0/G_1	MIB-1							Datenbasis
	Mittelwert	SD	Min.	25. Perzentil	Median	75. Perzentil	Max.	
0-49	67	26	10	60	75	90	90	21
50-74	66	20	10	55	70	80	95	71
75-100	43	30	1	10	40	70	90	107
Gesamt	54	28	1	30	60	80	95	199

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch, wenn man die MIB-1-Werte anhand des Index von ± 20 kategorisiert und die Auftretenshäufigkeiten von MIB-1-Werten über 20 betrachtet (die Auftretenshäufigkeiten von Werten unter 20 sind 1:1 komplementär hierzu).

Während sich in den Intervallen 0-49 und 50-75 mit 95% und 97% annähernd gleich hohe MIB-1-Werte feststellen lassen, findet sich im G_0/G_1 -Intervall 75-100 mit 69% eine vergleichsweise geringe Rate an erhöhten MIB-1-Werten (Tabelle 30). Entsprechend ergibt sich im χ^2 -Test im Vergleich der G_0/G_1 -Intervalle zwischen 0-49 und 50-74 mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,66$ ein nicht-signifikanter Unterschied,

während zwischen den Intervallen 0-49 und 75-100 ein signifikanter sowie zwischen Intervall 50-74 und 75-100 mit $p < 0,001$ ein hochsignifikanter Unterschied besteht (Abbildung 38).

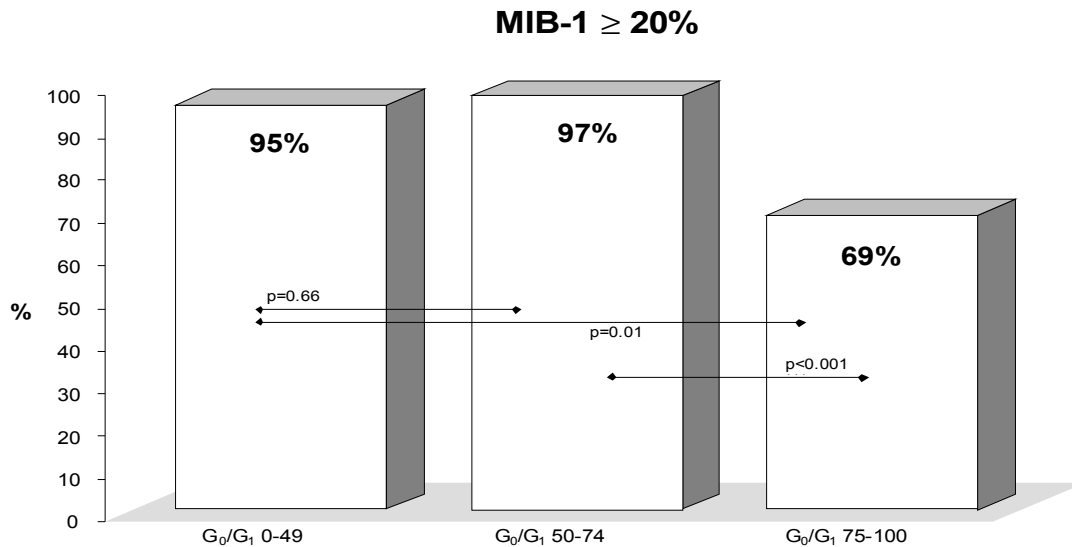


Abbildung 38: Vergleich der G₀/G₁-Intervalle mit MIB-1-Werten $\geq 20\%$. p-Werte $\leq 0,05$ weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin

Tabelle 30: Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Index ($\geq 20\%$). Datenbasis n=799. Werte nicht verfügbar: G₀/G₁ n=1, MIB-1 $\geq 20\%$ n=599

G ₀ /G ₁	MIB-1 $\geq 20\%$		Datenbasis
	%	Fälle	
0-49	95%	20	21
50-74	97%	69	71
75-100	69%	74	107
Gesamt	82%	163	199

3.15 Vergleich von MIB-1 und S/G₂/M-Fraktion

Abschließend folgt die Gegenüberstellung der immunhistochemisch nachgewiesenen MIB-1 (Abb.39) mit der DNA-zytometrisch nachgewiesenen S/G₂/M-Fraktion (Abb.40). Beide Werte weisen als Proliferationsparameter identische Kurven auf.

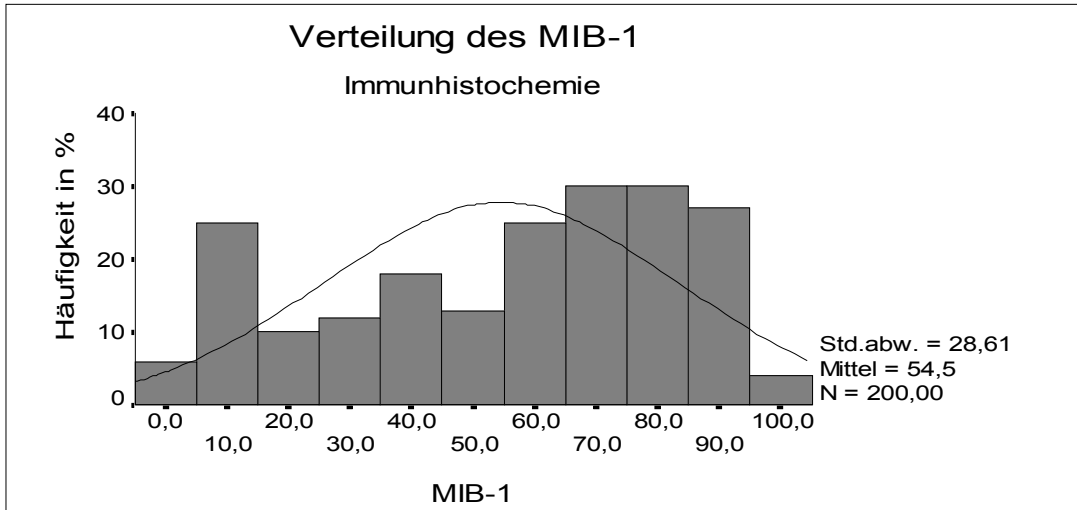


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung des MIB-1

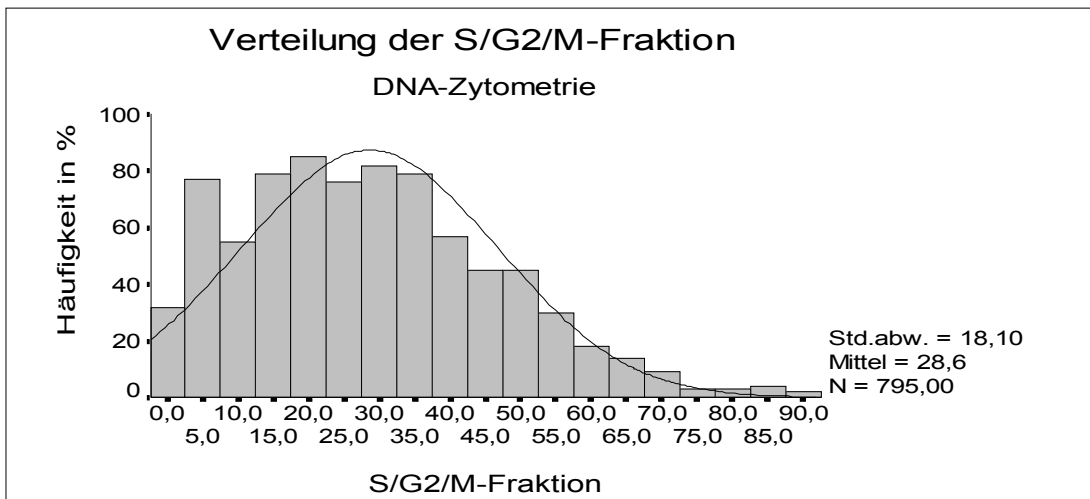


Abbildung 40: Häufigkeitsverteilung der S/G₂/M-Fraktion. Datenbasis n=799, nicht zur Verfügung n=4

Die hohe Proliferationsrate zeigt sich in einer annähernd parallelen Rechtsverschiebung im Kurvenverlauf. Im Unterschied zum MIB-1 hört die Kurve der DNA-Zytometrie früher auf, da dieses Messverfahren die G₁-Phase unberücksichtigt lässt. Die immunhistochemische Erfassung der Proliferationsfraktion ergibt ein breites Wertspektrum. Die höchsten Werte finden sich beim kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einer Rate von bis zu 95%. Die niedrigsten Werte lagen beim bronchioloalveolären Karzinom als Untergruppe der Adenokarzinome mit etwa 3%. Der Häufigkeitsgipfel liegt bei der Immunhistochemie zwischen 50-55%, während er bei der DNA-Zytometrie zwischen 25-30% liegt.

4 Diskussion

Um die Prognose eines Malignoms beurteilen zu können, ist es notwendig, ein Malignitätsgrading unter Berücksichtigung möglichst vieler zu objektivierbarer Parameter vorzunehmen [75,26,20,90]. Die Komplexität des Malignoms, welche sich aus pathomorphologischen, biochemischen und immunhistologischen Befunden ableitet, muss dabei Berücksichtigung finden. Das wesentliche Problem des klassischen, histologischen oder zytologischen Gradings liegt in seiner mangelhaften intra- und interindividuellen Reproduzierbarkeit. Die Einteilung des histologischen Gradings geht zurück auf die Arbeiten von BLOOM u. RICHARDSON [17] und findet vielfach modifiziert auch heute seine regelmäßige Anwendung [53]. Die Vergabe von Punkten zur Beurteilung des Kernpolymorphismus und der Mitoserate beim Grading erfordert sehr große Sorgfalt und Erfahrung des Pathologen. Dennoch kann dieser nur seine subjektive Beurteilung der Histomorphologie des Präparates abgeben. Hieraus resultieren große inter- und intraindividuelle Schwankungen sowie ein Mangel an Reproduzierbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse. Aus diesem Grund forderten SCARFF u. TORLONI [124] bereits 1968 eine Kontrolle der Ergebnisse im besten Fall durch einen zweiten Pathologen oder mindestens durch eine zweite Kontrolle desselben Pathologen. GILCHRIST ET AL. [58] fanden in einer Studie erhebliche Diskordanz bei der Befundbewertung. Dennoch hat sich die prognostische Signifikanz des herkömmlichen Gradings in der Praxis bewährt. Nach Untersuchungen von HAYBITTLE ET AL. [66] zeigten sich Korrelationen mit der Überlebenszeit sowohl in univariater als auch in multivariater Cox-Analyse.

Aufgrund der beschriebenen Problematik erscheint es sinnvoll, nach objektiven, reproduzierbaren Grading-Methoden zu suchen, die die gleiche prognostische Validität besitzen und die Möglichkeiten bieten, Karzinome, insbesondere Lungenkarzinome, nach neuen Gesichtspunkten einzuteilen.

Da die chromosomale Aneuploidie als Anzeichen für Neoplasie und aggressives Tumorverhalten gilt [93,20], untersuchte man die Ploidie zum Zwecke der Dignitätsdiagnose oder der Malignitätsgradierung von Tumoren. Die quantitative Bestimmung des DNA-Gehalts menschlicher Tumore mittels Flow- oder Image-Zytometrie fand daher in den letzten Jahren zunehmendes Interesse [33,107,18,34,40,92,146,140].

Die meisten Zytometriestudien der letzten Jahre beschränkten sich jedoch auf die Auswertung weniger DNA-Zytometrie-Parameter, wie die modale Stammlinienploidie und den davon abhängigen DNA-Index. Da verschiedene Untersuchungen zu

Mammakarzinomen der DNA-Ploidie isoliert keine prognostische Relevanz zuschreiben [32,65,103,105,130,68,106,14,38], scheint ein standardisiertes Beurteilungsverfahren für alle Tumorarten ausschließlich mit mehreren Parametern möglich. Für die DNA-Image-Analyse stellte die Einführung des 2c Deviation Index und des DNA-Malignitätsgrades durch Böcking eine erhebliche Erweiterung des Spektrums objektiver, reproduzierbarer Parameter dar [23]. Diese beiden Parameter liefern zusätzliche Informationen neben der Ploidie der Stammlinie, da sie die Streuung der Werte um den diploiden 2c-Wert berücksichtigen und eine Malignitätsgradierung von Tumoren ermöglichen. Die Grundlage für dieses DNA-Malignitätsgrading liegt in der Beobachtung, daß die modale chromosomale Aneuploidie und die Varianz der DNA-Werte vieler Tumore mit der Prognose der Patienten korreliert [18].

Darüber hinaus haben bisher veröffentlichte internationale Studien zur Image- und Flowzytometrie lediglich einen Umfang von 20 – 200 untersuchten Fällen [78,79,28,104,146,26,75,84,90]. In einer vorangegangenen Studie von HEIDEMEYER [69] wurde erstmals ein Datenpool von 659 Tumoren gesammelt, auf dessen Basis insgesamt sieben statische Parameter analysiert wurden. Aufgrund der technischen Limitierung des Computerprogramms war zum Auswertungszeitpunkt der vorangegangenen Studie die Analyse auf die statischen Parameter beschränkt.

Um eine weitere Objektivierung der subjektiven Pathologie zu erreichen und Aussagen hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und damit auf die Semimalignität erheben zu können, wurden in der vorliegenden Studie zusätzlich dynamische DNA-Parameter und immunhistochemische Parameter aufgenommen. Es wurden aus einem Datenpool von 761 Bronchialkarzinomen neben statischen Prognoseparametern wie DNA-Mittelwert, DNA-Index, 2c Deviation Index, 5c Exceeding Events, 9c Exceeding Events, Variationskoeffizient, DNA-Malignitätsgrad und DNA-Diagnose dynamische Prognoseparameter der S/G₂/M-Fraktion sowie immunhistochemisch nachweisbare Parameter (MIB-1) analysiert und miteinander verglichen.

4.1 Interpretation der Ergebnisse

4.1.1 Allgemeine Ergebnisse

Das gesamte Kollektiv zeigte gegenüber den Literaturstudien keine Abweichungen. Männliche Patienten standen mit 74% der Erkrankten deutlich im Vordergrund

gegenüber einem weiblichen Anteil von nur 26%. Der Altersschwerpunkt lag bei 60-69 Jahren bei einem durchschnittlichen Alter von 62,7 Jahren, wobei auch der männliche Anteil über dem weiblichen Anteil lag. Auch im Hinblick auf die histologischen Befunde war eine den veröffentlichten Ergebnisse anderer Studien annähernd gleiche Verteilung zu verzeichnen. Die Diagnose Plattenepithelkarzinom war mit 33% die häufigste, gefolgt vom Adenokarzinom mit 30%. Etwas abweichend von den Daten der WHO fanden sich Großzeller mit 18% (WHO 10-15%) und Kleinzeller mit 14% (WHO 20-25%). Insgesamt ergab sich ein Diagnoseverhältnis von 81% Nichtkleinzellern gegenüber 14% Kleinzeller sowie entsprechend der Seltenheit des Auftretens 3 % Non-Hodgkin-Lymphome, 1% Mesotheliome und 1% Karzinoide. Zusammenfassend entspricht das Ergebnis für ein durchschnittliches epidemiologisches Verteilungsmuster und somit für ein repräsentatives Tumorkollektiv.

4.1.2 DNA-Zytometriebefunde

Mit der Auswertung der statistischen Parameter konnten die Ergebnisse aus der Studie von HEIDEMEYER [69] bestätigt werden. Der DNA-Mittelwert stellt den mittleren DNA-Gehalt der gemessenen Tumorzellen eines Karzinompräparates dar und nahm in vorliegender Untersuchung Werte zwischen 4,11c und 4,79c mit einem Mittelwert bei 4,51c an. Die meisten Proben (95%) wiesen einen mittleren DNA-Gehalt = 4,0c auf.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß euploide Referenzzellen einen mittleren DNA-Gehalt von ungefähr 2c enthalten, läßt sich bereits bei Betrachtung der vorliegenden Durchschnittswerte eine erhebliche Abweichung zu stark aneuploiden Werten erkennen.

88% aller Tumore wurden als aneuploid befundet. Im einzelnen zeigten die Kleinzeller 82%, Großzeller 90%, Adenokarzinome 87% und Plattenepithelkarzinome 91% DNA-Aneuploidie. Es herrscht weitgehender Konsens bezüglich der Verknüpfung zwischen Aneuploidie und erhöhter Tumoraggressivität. In der Literatur finden sich viele Untersuchungen, die für Plattenepithelkarzinome in 98-100% der Fälle Aneuploidie [30,123,73,85,94,141] sowie für gutartige oder reaktiv veränderte Plattenepithelien keine DNA-Aneuploidie [128,23,144] zeigen konnten. Mehrere Arbeitsgruppen kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß aneuploide Karzinome vorwiegend mit einer niedrigen Differenzierung, einer gesteigerten Malignität und Aggressivität des Tumorgewebes und mit einer ungünstigen

Prognose assoziiert sind [6,35,77,109,125]. FALLENIIUS ET AL. [50] konnten 1988 in ihrer Studie beobachten, daß das Rezidivrisiko für Mammakarzinome mit steigender Ploidie zunahm. Diese stufenweise Risikoerhöhung parallel zu dem schrittweisen Anstieg der Ploidie weist vom tumorbiologischen Standpunkt darauf hin, daß die Tumormalignität möglicherweise vom Grad der Abweichung vom normalen DNA-Gehalt der Zelle abhängt. Auch andere Arbeitsgruppen kamen, gestützt durch ihre Ergebnisse, zu der Annahme, daß genomische Alterationen, deren Manifestation letztlich eine Aneuploidie ist, die Tumoraggressivität zu steigern vermögen [77]. AUFFERMANN u. BÖCKING [9] wiesen bereits 1985 in einer Studie über Bronchialkarzinome darauf hin, daß in Sputumproben enthaltene DNA-Aneuploidie einen positiven Prädiktionswert von 89,5% hat. Dieser Prädiktionswert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich im Follow-up von DNA-aneuploiden Abstrichen ein Karzinom findet.

Die Messung der Stammlinie (Modalwert) der einzelnen Tumore ergab einen Mittelwert aller gemessenen Tumore von 3,91c. Für alle Tumoren wurde eine starke Streuung um den Mittelwert der Stammlinie gefunden. Dies ist als Ausdruck der starken Heterogenität der einzelnen Tumorentitäten zu bewerten.

Der 2c Deviation Index beschreibt die Variabilität der Zellkern-DNA-Gehalte um den normalen 2c Wert und spiegelt die genetische Instabilität der Karzinomzellen wieder [23]. Bei den dargestellten Tumoren lagen Indices zwischen 7,44 und 16,16 mit einem Mittel von 12,23 und einer Häufung im Bereich = 5 vor. Diese sehr große Spannweite zwischen Minimum und Maximum ist wiederum Ausdruck einer erheblichen Inhomogenität und Variabilität sowohl innerhalb der Gesamtgruppe aller als auch in der Untergruppe der aneuploiden Karzinome. Interessant sind hierbei die gemessenen Werte für den Kleinzeller. Für das kleinzellige Bronchialkarzinom wurde ein Mittelwert von 7,44c für den 2c Deviations Index gemessen. Diese gemessenen Werte zeigen, daß es sich hier um genetisch relativ stabile Tumore handelt. 1990 nannte die „IAC/ASC: Task Force on Standardization of Quantitative Methods for Diagnostic Pathology“ [74] bereits den 2c Deviation Index neben der Stammlinienploidy als wichtigen prognostischen Marker zur objektiven und kontinuierlichen Histogramminterpretation. Ein Rückschluß auf die Malignität des Tumors kann von dem 2c Deviations Index jedoch nicht abgeleitet werden.

BÖCKING ET AL. [23] führten 1984 den DNA-Malignitätsgrad zur Interpretation der Malignität von Tumoren ein. Die hierzu ermittelten Werte dieser Studie zeigen erwartungsgemäß für die Kleinzeller und die Adenokarzinome die geringsten Werte. Bei der Interpretation des Malignitätsgrades muß jedoch berücksichtigt werden, daß

es sich hierbei um die logarithmische Umrechnung des 2c Deviations Index handelt. Somit ist der Malignitätsgrad kein eigenständiger Meßwert, sondern ein abgeleiteter Wert. Der Malignitätsgrad ist daher als ein Wert, der die Eingruppierung der ermittelten Werte in „Malignitätsklassen“ erlaubt, in seiner jetzigen Form nicht valide. Die Aussage über die Aggressivität eines Malignoms kann durch den Malignitätsgrad, so wie er zu jetzigen Zeitpunkt definiert ist, nicht getroffen werden. Die Betrachtung des Malignitätsgrades für sich allein erlaubt nur die Aussage, daß die genannten Tumorgruppen von den untersuchten Tumoren den durchschnittlich geringsten Zugewinn von DNA-Masse haben.

Die 5c Exceeding Events als Parameter der Einzelzellinterpretation dienen in erster Linie der Dignitätsdiagnose bzw. der Frühdiagnose von Malignität. Es wird hierzu ein Nachweis von mindestens drei Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 4c$ gefordert, um Aneuploidie zu diagnostizieren. Analog muß in Geweben mit Polyploidisierung bis $8c$ der Nachweis von mindestens drei Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 9c$ erbracht werden [21].

Die gemessenen Werte für die 5c Exceeding Events zeigen für die kleinzelligen Karzinome die niedrigsten Werte. Es sei noch einmal verdeutlicht, daß das Auftreten einer Zelle mit einem DNA-Gehalt von $>4c$ ein nahezu sicheres Kriterium für Malignität ist. Allerdings darf aus den relativ niedrigen Werten der gemessenen 5c Exceeding Events für die kleinzelligen Karzinome nicht der Schluß gezogen werden, daß diese Tumoren nur eine geringe Malignität aufweisen. Die Messung von 5c Exceeding Events bei den gemessenen Bronchialtumoren beweist, daß es sich hierbei um Malignome handelt. Bestimmte Konstellationen können auch bei den zu messenden Proben eine euploide Polyploidisierung mit dem Messen von Werten $> 5c$ nach sich ziehen, die die eindeutige Diagnose Malignom nicht gestatten. Hierzu wird die Messung des 9c Exceeding Events herangezogen.

Die Messung der 9c Exceeding Events bestätigt die zuvor gemachten Aussagen im Hinblick auf Malignität. Bei allen Bronchialtumoren wurde das Auftreten von 9c Exceeding Events gezeigt. Erneut wurde bei der Gruppe der kleinzelligen Karzinome die geringste Häufigkeit der 9c Exceeding Events gefunden. Dieses deutet auf eine relative Homogenität der o. g. Gruppe hin.

Die Betrachtung der Variationskoeffizienten der Tumorzellpopulationen ergab Werte zwischen 32,76 % und 39,95 % mit einem Mittelwert bei 37,03 %. Bei der Messung des Variationskoeffizienten ergeben sich für das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Adenokarzinom die geringsten Werte. Bei der Interpretation des Variationskoeffizienten muß berücksichtigt werden, daß es sich hierbei um die

Abweichung individueller Zellkern-DNA-Gehalte einer Population vom gemessenen mittleren DNA-Gehalt der gesamten gemessenen Population handelt. Durch die Interpretation des Variationskoeffizienten ist somit eine Aussage über die Homo- bzw. Heterogenität eines Tumors möglich. In den hier gemessenen Gruppen zeigen die Kleinzeller die größte Homogenität.

Während sich in der Literatur wenig Zahlenangaben zu den Variationskoeffizienten der gemessenen Tumorpräparate finden, wird doch häufig auf die Tatsache verwiesen, daß die große Streuung in einigen Histogrammen als Charakteristikum aneuploider Peaks und Verursacher großer Variationskoeffizienten zu werten ist [132]. Diese Aussage wird durch unsere Beobachtungen gestützt, da stark erhöhte Variationskoeffizienten mit großen 2c Deviation Indices hochsignifikant korrelierten.

Die gesonderte Betrachtung der Gruppe der kleinzelligen Karzinome versus der Gruppe der nicht-kleinzelligen Karzinome (Großzeller, Plattenepithel- und Adenokarzinom) bestätigt die zuvor gemachten Aussagen. Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist in sich genetisch ein relativ homogener Tumor, während die Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialtumore eine größere genetische Instabilität zeigt. Dies bedeutet jedoch nicht, daß das kleinzellige Bronchialkarzinom eine niedrigere Malignität als die Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialtumore aufweist.

4.2 Beurteilung der Proliferationskinetik

Eine der wesentlichen Anforderungen an Prognosefaktoren besteht darin, daß prognostische Parameter eine tumorbiologische Hypothese als Grundlage aufweisen sollten [80]. Die Proliferationskinetik stellt einen wichtigen Teilaspekt bei der Charakterisierung des malignen Phänotyps und des biologischen Verhaltens von Neoplasien dar. Durch die Tumorzellkinetik werden wichtige biologische Parameter hervorgebracht, die in Beziehung zum klinischen Verlauf und der Ansprechbarkeit auf Therapien stehen [142,54]. Dennoch scheint es trotz der Empfehlungen der EORTC Receptor and biomarker study group [133] bisher eher die Ausnahme als die Regel zu sein, die proliferative Aktivität als prognostischen Faktor bei der klinischen Entscheidung mit einzubeziehen [52].

Verschiedene Nachweisverfahren zur Erfassung proliferationskinetischer Phänomene beim Bronchialkarzinom stehen im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Neben immunhistochemischen Methoden, die Proliferationsantigene oder Enzyme bzw. Kofaktoren des Zellzyklus identifizieren, wie z.B. Antikörper gegen DNA-Polymerase α , Topoisomerase II α , PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Ki-67/MIB-1 oder

AgNOR (Argyrophilic Nucleolus Organizing Regions), werden heutzutage auch DNA-zytometrische Messungen am Tumorgewebe durchgeführt. Durch spezifische Anfärbung der DNA mit Hilfe von markierten Metaboliten wie ^3H -Thymidin oder 5-Bromo-desoxy-Uridin (BrdU) kann das Verhalten der DNA abgeleitet und daraus der proliferative Zustand photometrisch ermittelt werden.

Nicht alle diese Verfahren erfüllen hierbei die geforderten Standards, um routinemäßigen Eingang in die Laboratorien der Pathologie zu finden bzw. klinische Einsetzbarkeit zu erlangen. Hohe Spezifität und Sensivität hinsichtlich der Erkennung proliferierender Zellen, einfache und schnelle Durchführbarkeit der Nachweismethoden sowie niedrige Kosten, Reproduzierbarkeit und nachweisliche prognostische Validität sind einige der grundlegenden Standards, die derartige Nachweisverfahren erfüllen sollten [89].

MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper und weist das nukleäre Antigen Ki-67 nach, das während des Zellzyklus in unterschiedlicher Intensität während der G_1 - und S-Phase, ebenso in der G_2/M -Phase vorhanden ist. Der Anteil der gefärbten Zellen zeigt unmittelbar die Proliferationsaktivität an. Der große Vorteil dieses immunhistochemischen Nachweisverfahrens gegenüber einigen der genannten Methoden besteht in seiner einfachen Durchführbarkeit, der Möglichkeit, Untersuchungen an kleinen, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben vorzunehmen. Die prognostische Aussagekraft bezüglich des klinischen Verlaufs bei bösartigen Tumoren der Mamma wurde von VERONESE ET AL. [137] und ELLIS ET AL. [47] beschrieben.

Durch Vergleiche mit S-Phase-Fractionen mittels Durchflußzytometrie, AgNOR und ^3H -Thymidin-Labeling-Index [89,43] wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung ausreichend validiert und objektiviert. Im Einzelfall finden sich jedoch z.T. erhebliche Diskrepanzen zwischen der durchflußzytometrisch bestimmten S-Phase-Fraktion und dem MIB-1-Proliferationsindex. Diese beruhen auf einer intratumoralen Heterogenität, dem Problem der Stromakontamination in der DNA-Zytometrie, der Fixation und vor allem darauf, dass diese Antikörper auch Zellen der G_1 - und G_2 -Phase markieren [131].

Bei der Beurteilung der proliferativen Aktivität mittels immunhistochemischem Nachweis von MIB-1 zeigte sich in der vorliegenden Studie eine auch statistisch gesicherte signifikante Korrelation zu der histologischen Wachstumsform. Im Vergleich zu den Adenokarzinomen sowie den Plattenepithelkarzinomen ließ sich bei den Kleinzellern eine deutlich stärkere Proliferationskinetik verzeichnen. Dieser Befund steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [91].

Darüber hinaus paßt diese Beobachtung zu dem eher ruhigen histologischen Bild des Adenokarzinoms mit überwiegend soliden Strukturen und langsamerer Tumorprogression, was sich auch an der längeren präklinischen Phase des Tumorwachstums zeigt.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß ebenfalls ein Zusammenhang zwischen histopathologischem Grading und MIB-1 besteht. Der Differenzierungsgrad ist ein morphologisches, phänotypisches Kriterium, welches als Summe eines komplexen Regulationsmechanismus auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zu verstehen ist. Aus diesem Grund lässt sich unschwer nachvollziehen, daß eine unkontrolliert gesteigerte Proliferation die reguläre Erscheinungsform der einzelnen Zelle und konsekutiv das histologische Gefüge zerstört. Dieser Differenzierungsverlust des Tumorgewebes findet Ausdruck im ansteigenden nukleären und histopathologischen Grading. Somit kann bei erhöhten MIB-1-Werten als Ausdruck gesteigerter proliferativer Aktivität auf eine zunehmende Entdifferenzierung des Tumorgewebes geschlossen werden. Diesbezügliche Korrelationen wurden in der Literatur mehrheitlich beschrieben [113,43,89]. Darüber hinaus fanden AUER ET AL. [7] in Untersuchungen zur Ploidie und Wachstumsaktivität, daß Tumoren, die hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes als niedrig maligne klassifizierte wurden, eine niedrige Proliferationsaktivität aufwiesen. Dem gegenüber zeigten als hochmaligne eingestufte Tumoren eine entsprechende hohe Proliferationskinetik. Studien zum Phänomen der „Mehrschritt-Kanzerogenese“ betonten die Assoziation von Tumorzellen in der Phase der unkontrollierten Proliferation mit irreversiblen Alterationen des Zellgenoms und daraus resultierender karyotypischer Instabilität [112]. Fortschreitende Beeinträchtigungen genetischer Stabilität äußern sich in dem Verlust eines euploiden Chromosomensatzes und der Prädominanz von Zellen mit irregulärem, abnormem DNA-Gehalt. Eine erhöhte proliferative Aktivität scheint mit einer zunehmenden Heterogenität auf chromosomaler Ebene einherzugehen [32;44]. Ein ansteigender DNA-Malignitätsgrad kann demnach als Manifestation dieser genetischen Dissoziationen im Rahmen erhöhter proliferativer Aktivität interpretiert werden.

Zwischen dem Proliferationsmarker MIB-1 und dem Ploidiestatus zeigten sich ebenfalls signifikante Korrelationen. So zeigte sich der erwartungsgemäß geringste MIB-1-Median bei diploiden Tumoren und der höchste bei aneuploiden Tumorarten. Der Unterschied der Mediane war zwischen Tumoren mit aneuploidem und diploidem Status statistisch signifikant. Mittels Mann-Whitney-U-Test ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der aneuploiden und diploiden Tumorgruppe.

Zwischen aneuploider und zweifelhafter Gruppe bestand zwischen zweifelhafter und diploider Gruppe ein nicht-signifikanter Unterschied. Analoge Korrelationen ergaben die Vergleiche mit höheren MIB-1-Werten (= 20%) und niedrigeren Werten (<20%).

In einem weiteren Schritt wurden Unterschiede zwischen Gruppen mit unterschiedlichem Ploidiestatus in den Werten der S/G₂/M-Fraktion geprüft.

Die statistische Signifikanzprüfung zeigte signifikant höhere Werte bei aneuploiden und hinsichtlich des Ploidiestatus zweifelhaften Tumorarten. Die verschiedenen Gruppen untereinander ergaben einen nicht-signifikanter Unterschied zwischen der aneuploiden und zweifelhaften Gruppe. Zwischen zweifelhaftem und diploiden Status lag ein signifikanter, zwischen aneuploidem und diploidem Status ein hochsignifikanter Unterschied. Diese Werte lassen den Schluß zu, daß erhöhte Werte im Bereich der dynamischen Phase der DNA-Zytometrie mit entsprechender Proliferationskinetik einhergeht.

Auch der Vergleich zwischen der statischen (G₀/G₁) und der dynamischen Phase (S/G₂/M) zeigte je nach Intervall der G₀/G₁-Fraktion statistisch signifikante Unterschiede in der S/G₂/M-Fraktion. Auffällig war hier insbesondere die unterschiedliche Verteilung der Mediane. Höhere Werte in der G₀/G₁-Fraktion (ab dem Intervall 25-49) gingen mit einer signifikanten Reduktion der Werte der S/G₂/M-Fraktion einher. G₀/G₁-Werte unter 25 hatten den S/G₂/M-Medianwert von 0%. Allerdings war hier aufgrund von Ausreißerwerten eine große Streubreite feststellbar. Erst höhere Abschnitte auf der G₀/G₁-Werteskala gehen mit einer Reduktion einher, d.h. von 57% der S/G₂/M-Fraktion bei G₀/G₁ (25-49) auf 36% und danach auf 14% im G₀/G₁-Intervall ab 75%.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Von 799 unselektierten Thoraxtumoren wurden am Pathologischen Institut Dr.Bosse in Osnabrück 761 zytologische Präparate für eine anschließende DNA-Zytometrie angefertigt. Die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich statischer und dynamischer Parameter der DNA-Zytometrie und der immunhistochemischen Parameter MIB-1 wurden ausgewertet und miteinander verglichen.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Als wesentliches Ergebnis zeigen sich kongruente Kurven beim Vergleich der DNA-Proliferationsfraktion (S/G₂/M-Phase) mit MIB-1. Dabei ist das immunhistochemische Ergebnis naturgegeben deutlich größer. Dies wird durch

eine Rechtsverschiebung im Kurvenverlauf verdeutlicht, da die Immunhistochemie auch die G₁-Phase miteinfaßt. Die genetische Bestimmung der Proliferationsfraktion und die epigenetische Bestimmung an einem Eiweißmolekül ergeben somit gleichartige Werte.

2. Mit der immunhistochemischen Proliferationsfraktion zeigten sich statistisch signifikante Beziehungen zu den führenden histologischen Wachstumsformen (Höchstwerte bei kleinzelligen Karzinomen), zum histopathologischen Grading (stärkere MIB-1-Expression in entdifferenzierten Tumoren) und zum DNA-Malignitätsgrad.
3. Die Korrelation des Proliferationsmarkers MIB-1 mit dem DNA-Malignitätsgrad und der DNA-Stammlinien-Ploidie weist darauf hin, daß eine erhöhte proliferative Aktivität mit einer zunehmenden Heterogenität auf chromosomaler Ebene von Tumorzellen einhergeht. Aus weiteren Gegenüberstellungen zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Faktoren läßt sich ableiten, daß ein erhöhter DNA-Malignitätsgrad als Ausdruck genetischer Instabilität vorwiegend mit histologisch aggressiveren Phänotypen und histomorphologischer Entdifferenzierung assoziiert ist. Demnach lassen sich aus dem Nachweis von MIB-1 und von DNA-zytometrischen Parametern geeignete, einander ergänzende objektive und reproduzierbare Aussagen ableiten.
4. Der Vergleich zwischen statischen und dynamischen DNA-Parametern zeigt eine signifikante Korrelation, so daß auf Basis dieser Werte eine Aussage zur Wachstumsgeschwindigkeit und Malignität von Karzinomen möglich erscheint. Gerade im Hinblick auf die unverändert schlechte Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms würde dies eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie bedeuten.
5. Die Proliferation ist damit ein wesentlicher Prognoseparameter für den Spontanverlauf gerade beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die Beurteilung der Proliferation ist als prädiktiver Faktor entscheidend für das Therapieansprechen (Chemotherapie beim Kleinzeller) und damit für den gesamten Krankheitsverlauf.
6. Die führenden histologischen Typen (kleinzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, großzelliges Karzinom) zeigen eine breite Überschneidung der DNA-Mittelwerte. Dadurch läßt sich eine spezifische Tumortypisierung allein mit der DNA-Image-Analyse nicht durchführen.
7. Jede Tumorart weist in sich eine ausgeprägte Variation der DNA-Werte auf.

8. Der Vergleich von kleinzelligen mit nicht-kleinzelligen Tumoren weist die Kleinzeller als homogenere Gruppe aus.

Da die intraindividuelle und interindividuelle Reproduzierbarkeit des Gratings und Typings der malignen Tumoren, insbesondere auch beim Bronchialkarzinom, erheblichen Schwankungen unterliegt, ergibt sich durch die Bestimmung der immunhistochemischen Proliferationsparameter eine weitere Hilfe zur Objektivierung des biologischen Tumorverhaltens. Die daraus resultierende Qualitätssicherung wird sich auf die Prognose und die Therapierbarkeit der malignen Erkrankung positiv auswirken.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen in Übereinstimmung mit den Erfahrungen und Bewertungen in der Literatur den hohen Beziehungsgrad der Proliferation zu den etablierten Prognosefaktoren und rücken das MIB-1 an eine zentrale Stelle zur Abschätzung der Prognose von Karzinomerkrankungen.

5.1 Ausblick

MIB-1 als Marker der Proliferationskinetik ist zu einem sinnvollen und praktikablen Faktor zur Prognoseabschätzung avanciert. Mit der Erhebung und Auswertung dynamischer DNA-Parameter hat die statische DNA-Zytometrie einen ergänzenden Faktor erhalten, der Aussagen über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors zulässt. In der modernen pathologischen Diagnostik an Bronchialkarzinomen ist auf die Beurteilung der proliferativen Aktivität zur Prognoseabschätzung wie auch im Hinblick auf die Überlebenszeit der Patienten nicht mehr zu verzichten. Aus diesem Grund, und auch aufgrund der methodischen Einfachheit stehen Parameter zur Proliferationskinetik bei den neu entwickelten Konzepten zur optimalen Prognoseabschätzung an vorderer Stelle.

Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, nach längerem Follow-up die Auswirkungen dieser Parameter auf das rezidivfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit des Patientenkollektivs in univariater und multivariater Analyse zu ermitteln.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Aoyagi K, Miyake Y, Urakami K, Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kodama T, Yamaguchi K (1995): Enzyme immunoassay of immunoreactive progastrin-releasing peptide (31-98) as tumor marker for small-cell lung carcinoma: development and evaluation. *Clin Chem* 41(4): 537-543
- 2) Arbeitskreis Tumormarker Leitlinien, 3. Auflage; Klinikum rechts der Isar München, 2001
- 3) Arnerlöv C, Emdin SO, Roos G, Angström T, Bjersing L, Ängquist KA, Jonsson H (1990): Static and flow cytometric DNA analysis compared to histologic prognostic factors in a cohort of stage T2 breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 16: 200-208
- 4) Asamura H, Ando M, Matsuno Y, Shimosato Y (1999): Histopathologic prognostic factors in resected adenocarcinomas: Is nuclear DNA content prognostic? *Chest* 115: 1018 -1024
- 5) Auer G (1992): Vortrag 1: Bedeutung der DNA-Messung. Zytologietagung, Bad Segeberg. *Pathologie* 13: 25-38
- 6) Auer G, Caspersson TO, Wallgren A (1980): DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 12: 161-165
- 7) Auer G, Ono J, Caspersson T (1983): Cytochemical identification of quiescent and growth-activated tumor cells. *Anal Quant Cytol* 5: 5-8
- 8) Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren AS (1984): Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res* 44: 394-396
- 9) Auffermann W, Böcking A (1985): Early detection of precancerous lesions in dysplasia of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 7: 218 - 226
- 10) Baldetorp B, Fernö M, Fallenius A (1992): Image cytometric DNA analysis in human breast cancer may add prognostic information in diploid cases with low S-phase fraction by flow cytometry. *Cytometry* 13: 577 - 585
- 11) Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MG (1990): A prospective comparison of DNA quantitation by image analysis and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 193: 322 – 326
- 12) Beerman H, Kluin PM, Hermans J, Velde CJH van de, Cornelisse CJ (1990): Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 45: 34-39
- 13) Bepler G, Zeymer U, Mahmoud S, Fiskum G, Palaszynski E, Rotsch M, Willey J, Koros A, Cuttitta F, Moody TW (1988): Substance P analogues function as bombesin receptor antagonists and inhibit small cell lung cancer clonal growth. *Peptides* 9(6): 1367-1372

- 14) Bergers E, van Diest PJ, Baak JPA (1997): Prognostic value of DNA ploidy using flow cytometry in 1301 breast cancer patients: results of the prospective Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Mod Pathol* 10: 762 – 768
- 15) Bertino B, Knape W, Pytlinska M (1994): A comparative study of DNA content as measured by flow cytometry and image analysis. *Anal Cell Pathol* 6: 377 – 394
- 16) Blondal T, Lindgren A (1982): Fluorescence cytophotometric measurements of nuclear DNA in adenocarcinoma of the lung; relation of proliferative activity and DNA ploidy to prognosis. *Anal Quant Cytol* 4: 225 - 232
- 17) Bloom WG, Richardson WW (1957): Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11: 359
- 18) Böcking A (1990): DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. *Beitr Onkol* 38: 298 - 347
- 19) Böcking A (1998): Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. *Dtsch Ärztebl* 12: 658-662
- 20) Böcking A, Chatelain R (1988): Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynecological cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 11: 177-186
- 21) Böcking A, Bollmann R (1996): DNA-Zytometrie zur Qualitätskontrolle in der gynäkologischen Zytologie. *Verh Dtsch Ges Pathol* 80 : 123-130
- 22) Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Auffermann W (1984): Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol* 6: 1-8
- 23) Böhm N, Sprenger E (1968): Fluorescence cytophotometry: A valuable method for quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA. *Histochemistry* 16: 100 -118
- 24) Bortz J, Lienert GA, Boehnke K: *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*. Springer Berlin - Heidelberg 1990.
- 25) Carey FA, Gray E (1996): A comparison of flow and image DNA cytometry in prediction of patient prognosis in surgically resected small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 12: 137 - 143
- 26) Carney DN, Gazdar AF, Nau M, Minna JD (1985): Biological heterogeneity of small lung cancer. *Semin Oncol* 12(3): 289-303
- 27) Carp NZ, Ellison DD, Brophy P (1992): DNA content in correlation with postsurgical stage in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 53: 680 - 683
- 28) Caspersson T (1932): Die quantitative Bestimmung von Thymonucleinsäure mittels fuchsin-schwefelhaltiger Säure. *Biochem Z* 253: 97 -117

- 29) Caspersson T (1936): Quantitative cytochemical studies on normal, premalignant and atypical cell populations from uterine cervix. *Scand Arch Physiol* 73: 8-45
- 30) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168 (4): 357-363
- 31) Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Mc Guire WL (1989): Prediction of relaps or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 320: 627 – 633
- 32) Claud RD, Weinstein RS, Howeedy A, Straus AK, Coon JS (1989): Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Mod Pathol* 2: 463 - 467
- 33) Cohen C, Tickman RJ, DeRose P (1991): DNA ploidy studies of benign and malignant tumors: comparison of flow cytometry and image analysis techniques using two types of cytological specimen. *Cytopathology* 2: 247 – 259
- 34) Cook DL, Weaver DL (1995): Comparison of DNA content, S-Phase fraction and survival between medullary and ductal carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 104: 17-22
- 35) Coulsen PB, Thornthwaite JT, Woolley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D (1984): Prognostic indicators including histogram type, receptor content and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 44: 4187-4196
- 36) Cufer T, Lamovec J, Bracko M, Lindtner J, Us-Krasovec M (1997): Prognostic value of DNA ploidy in breast cancer stage I-II. *Neoplasma* 44: 127–132
- 37) D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Nau M, Fedorko J, Russell E, Johnson B, Buchhagen D, Bodner S, Phelps R, et al. (1992): High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer lines and tumors. *Oncogene* 7(2): 339-346
- 38) Danque P, Chen HB, Patil J (1993): Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. *Mod Pathol* 6: 270 -275
- 39) Davey DD, Banks ER, Jennings D, Powell D (1993): Comparison of nuclear grade and DNA cytometry in breast carcinoma aspirates to histologic grade in excised cancer. *Am J Clin Pathol* 99: 708-713
- 40) Delides GS, Garas G, Georgouli G (1982): Intralaboratory variations in the grading of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 106: 126-128

- 41) Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K, Jänicke F, Nathrath W, Schmitt M, Graeff H, Höfler H (1997): Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB-1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer *Br J Cancer* 75: 1525-1533
- 42) Devilee P, Thierry RF, Kievits T, Kolluri R, Hopman AH, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ (1988): Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. *Cancer Res* 48: 5825-5830
- 43) Diest PJ van, Baak JPA (1994): Biomarkers of breast hyperplasias and in situ carcinomas: an overview. *J Cell Biochem Suppl* 19: 99-104
- 44) Dittrich W, Göhde W (1969): Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspension. *Z Naturforsch* 24b: 360-361
- 45) Ellis PA, Makris A, Burton SA, Titley J, Ormerod MG, Salter J, Powles TJ, Smith LE, Dowsett M (1996): Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas *Br J Cancer* 73: 640-643
- 46) Erbar P : *Onkologie*. 4. Auflage; Schattauer Verlag Stuttgart 2002
- 47) Evans AS, Monaghan JM (1983): Nuclear DNA content of normal, neoplastic and wart-affected cervical biopsies. *Anal Quant Cytol* 5 (2): 112-116
- 48) Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM (1988): Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62: 331-341
- 49) Feulgen R, Rossenbeck H (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 135: 203 - 248
- 50) Fleischhacker M, Beinert T, Possinger K (1999): Molecular genetic characteristics of lung cancer- useful as real tumor markers? *Lung Cancer* 25(1): 7-24
- 51) Frierson HF, Wolber RA, Berean KW, Franquemont DW, Gaffey MJ, Boyd JC, Wilbur DC (1995): Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 103: 195-198
- 52) Gasparini G, Boracchi P, Verderio P, Bevilacqua P (1994): Cell kinetics in human breast cancer: comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. *Int J Cancer* 57(6): 822-829
- 53) Gazdar AF, Minna JD (1986): Cell lines as an investigational tool for the study of biology of small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22(8): 909-911

- 54) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20
- 55) Ghali VS, Liao S, Teplitz K, Prudente R (1992): A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. *Cancer* 70: 2668-2672
- 56) Gilchrist KW, Kalish L, Gould VE, Hirschl S, Imbriglia JE, Levy WM, Patchelsky AS, Penner DW, Pickren J, Roth JA, et al. (1985): Interobserver reproducibility of histopathologic features in stage II breast cancer: an ECOG study. *Breast Cancer Res Treat* 5: 3 – 10
- 57) Goldhirsch A, Wood CW, Senn HJ, Glick HJ, Gelber RD (1995). Meeting Highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1441-1445
- 58) Gould VE, Warren WH, Memoli VA (1983): Diagnosis of human tumors. Case 4: Neuroendocrine carcinoma of lung, intermediate size cell type. *Ultrastruct Pathol* 5(4):291-297
- 59) Grundmann E, Marquardt H (1953): Untersuchung an Interphasekernen des Wurzelmeristems von *Vicia faba*. 1. Mitteilung. Desoxyribonucleinsäure-Gehalt und Größe der Kerne. *Chromosoma* 6: 115-134
- 60) Hafner L, Hoff P : Genetik. Schrödel Verlag Hannover 1988
- 61) Harada Y, Katagiri T, Ito L, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M (1994): Genetic studies of 457 breast cancers: clinicopathologic parameters compared with genetic alterations. *Cancer* 74: 2281-2286
- 62) Haroske G, Kunze KD, Theissig F (1991): Prognostic significance of image cytometry DNA parameters in tissue sections from breast and gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 3: 11-24
- 63) Hatschek T, Fagerberg G, Stal O, Sullivan S, Carstensen J, Grontoft O, Nordenskjold B (1989): Cytometric characterization and clinical course of breast cancer diagnosed in a population-based screening program. *Cancer* 64: 1074–1081
- 64) Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW (1982): A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 45: 361-366
- 65) Hecht SS (1999): Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1194-1210
- 66) Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D (1993): DNA cytometry consensus conference. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 28(1): 55–59
- 67) Heidemeyer, A : DNA Typing and Grading der Thoraxtumoren. Diss. Med. Dent. Aachen 2003

- 68) Heiden T, Auer G, Tribukait B (2000): Reliability of DNA cytometry S-Phase analysis in surgical biopsies: assesment of systematic and sampling errors and comparison between results obtained by image and flow cytometry. *Cytometry* 42: 196 - 208
- 69) Heim S, Mitelman F : *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss Inc., New-York 1987
- 70) Hoffmann D, Wynder EL (1986): Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. *IARC Sci Publ* 174: 145-165
- 71) Hrushowetz SB, Lauchlaan SC (1970): Comparative DNA-content of cells in the intermediate and parabasal layers of cervical intraepithelial neoplasias studied by two-wavelength Feulgen cytophotometry. *Acta Cytol* 14: 68-70
- 72) IAC/ASC: Task force on standardization of quantitative methods for diagnostic pathology. IAC/ASC Chicago 1990
- 73) Ikeda N, MacAuly C, Lam S, Garner D (1995): Use of high-resolution cytometry in predicting the biological behavior of T1 adenocarcinoma of the lung. *Anal Quant Cytol Histol* 17: 69-74
- 74) Ikonen J, Ojala A, Salenius JP (1999): DNA flow cytometry in surgically treated lung cancer. *Scand Cardiovasc J* 33: 228 - 233
- 75) Ioakim-Liossi A, Karakitsos P, Aroni K, Markopoulos C, Delivelioti K, Gogas J, Kyrkou K (1997): DNA ploidy and pS2 protein expression in breast cancer. *Cytopathology* 8: 171-176
- 76) Isobe H, Miyamoto H, Inoue K, Shimizu M, Endo T, Mizuno S, Kawakami Y (1990a): Flow cytometric DNA content analysis in primary lung cancer: comparison of results from fresh and paraffin-embedded specimens. *J Surg Oncol* 43: 36-39
- 77) Isobe H, Miyamoto H, Shimizu T, Haneda H, Hashimoto M, Inoue K, Mizuno S, Kawakami Y (1990b): Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer* 65(6): 1391-1395
- 78) Jänicke F (1995): Etablierte und neue Prognosefaktoren für das primäre Mammakarzinom. *Gynäcol Spectrum* 2: 3-5
- 79) Johnson BE, Kelley MJ (1995): Biology of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 12 Suppl 3: 5-16
- 80) Junker K, Bosse U, Thomas M : Morphologisch fassbare Prognosefaktoren bei neoadjuvant behandelten nicht-kleinzelligen Lungentumoren. In: Klinke F, Wagner W (Hrsg) : *Multimodale Therapiekonzepte bei fortgeschrittenen Bronchialkarzinomen*. Pabst Science Publishers Berlin 2002: 136-154

- 81) Kindermann D, Mallmann P, Stark GB, Hültenschmidt D, Bischoff M, Sasse C, Schmitz C, Knapp M, Pfeifer U (1992): Histopathologische und bildzytometrische (statische DNS Zytometrie) Kriterien in Hinblick auf die prognostischen Aussagewerte bei 115 Patientinnen mit Mammakarzinom unter besonderer Berücksichtigung des Frührezidivrisikos. *Pathologie* 13: 25-38
- 82) Kolodziejcki L, Niezabitowski A, Gasinska A (1997): Clinical and flow cytometric prognostic factors in treated squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 16: 173-182
- 83) Krug H, Ebeling K (1977): Pulse cytophotometric investigations concerning ploidy and proliferation pattern of invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Exp Pathol* 13: 237-246
- 84) Kumpel BM (2000): Analysis of factors affecting quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion* 40: 1376-1383
- 85) Lee AKC, Dugan J, Hamilton WM, Cook L, Heatley G, Kamat B, Silvermann ML (1991): Quantitative DNA analysis in breast carcinomas: A comparison between image analysis and flow cytometry. *Mod Pathol* 4: 178-182
- 86) Lindblom A, Liljegren A (2000): Tumour markers in malignancies. *BMJ* 320: 424-427
- 87) Mac Grogan G, Jollet L, Huet S, Sierankowski G, Picot V, Bonichon F, Coindre JM (1997): Comparison of quantitative and semiquantitative methods of assessing MIB-1 with the S-phase fraction in breast carcinoma. *Mod Pathol* 10(8): 769-776
- 88) Marek W, Krampe S, Dickgreber N (1999): Automated quantitative image cytometry of bronchial washing in suspected lung cancer: comparison with cytology, histology and clinical diagnosis. *Pneumologie* 53: 583-595
- 89) Markiewski M, Domagala W (1996): Immunohistochemical assessment of proliferation rate of breast carcinoma cells using Ki-67, MIB-1 and anti-PCNA monoclonal antibodies. *Pol J Pathol* 47: 189-194
- 90) Martin-Reay D, Kamentsky LA, Weinberg DS, Hollister K (1994): Evaluation of a new slide-based laser scanning cytometer for DNA analysis of tumors. Comparison with flow cytometry and image analysis. *Am J Clin Pathol* 102: 432-438
- 91) Mellin W (1990): Cytophotometrie in Tumor Pathology: A critical Review of Methods and Applications, and Some Results of DNA Analysis. *Pathol Res Pract* 186: 37-62
- 92) Millet JS, Husain OAN, Bitenski L, Chaven J (1985): Feulgen hydrolysis profiles in cells exfoliated from the cervix uteri: a potential aid in diagnosis of malignancy. *J Clin Pathol* 53: 345-349

- 93) Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Cetto GL (1997): Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 74 (4): 433-437
- 94) Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD (1981): High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science* 214(4526): 1246-1248
- 95) Motherby H, Friedrichs N, Kube M, Nadjari B, Knops K, Donner A, Baschiera B, Dalquen P, Boecking A (1999): Immunocytochemistry and DNA-image cytometry in diagnostic effusion cytology. II. Diagnostic accuracy in equivocal smears. *Anal Cell Pathol* 19: 59-66
- 96) Müller KM (1999): Neues zur Pathologie der Lungentumoren. *Verh Dtsch Ges Pathol* 83: 168-183
- 97) Müller KM, Gonzales S (1991): Präneoplasien und Frühkarzinome der Lunge - Histogenetische Aspekte des Bronchialkarzinoms. *Pneumologie* 45: 971-976
- 98) Müller KM, Theile A (1994): Lungentumoren. *Internist* 35: 710-723
- 99) Muguerza JM, Diez M, Torres AJ (1997): Prognostic value of flow cytometric DNA analysis in non-small-cell-lung cancer: rationale of sequential processing of frozen and paraffin-embedded tissue. *World J Surg* 21: 323-329
- 100) Mulshine JL, Jett M, Cuttitta F, Treston AM, Quinn K, Scott F, Iwai N, Avis I, Linnoila RI, Shaw GL (1993): Scientific basis for cancer prevention. Intermediate cancer markers. *Cancer* 72 Suppl 3: 978-983
- 101) Muss HB, Kute TE, Case LD, Smith LR, Booher C, Long R, Kammire L, Gregory B, Brockschmidt J (1989): The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristic in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 64: 1894-1900
- 102) Okada S, Kobayashi S (1992): Flow cytometric DNA analysis of lung cancer cell lines. *Tohoku J Exp Med* 168: 307-310
- 103) O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Rubens RD, Richards MA (1990): Node-negative breast cancer: prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J Clin Oncol* 8: 2040-2046
- 104) Ottestad L, Pettersen EO, Nesland JM, Skrede M, Tveit KM, Nustad K, Borresen AL (1993): Flow cytometric DNA analysis as prognostic factor in human breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 189: 405-410
- 105) Oud P, Pahlplatz M, Beck J (1989): Image and flow DNA cytometry of small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 64: 1304-1309

- 106) Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A (1997): Sputum screening microscopy: a reexamination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Study. *Mayo Clin Proc* 72: 697-704
- 107) Peiró G, Lerma E, Climent MA, Segui MA, Alonso MC, Prat J (1997): Prognostic value of S-phase fraction in lymph-node-negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol* 10 (3): 216-222
- 108) Pence JC, Kerns BJ, Dodge RK, Iglehart JD (1993): Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Arch Surg* 128(12): 1382-1390
- 109) Petersen I (1999): Genetik von Karzinomen des Respirationstraktes: Korrelation von Genotyp und Phänotyp. *Verh Dtsch Ges Pathol* 83: 195-204
- 110) Pitot HC (1989): Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80: 599-607
- 111) Rajakariar R, Walker RA (1995): Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast carcinomas. *Br J Cancer* 71: 150-154
- 112) Rice TW, Bauer TW, Gephardt GN (1993): Prognostic significance of flow cytometry in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 106: 210-217
- 113) Richartz G, Meissner A, Kohl A, Knieriem HJ (1996): Quality control in gynecological cytology using quantitative DNA-image analysis. *Verh Dtsch Ges Pathol* 80: 43-51
- 114) Rondez R, Yoshizaki C, Pirozynski W (1990): Determination of nuclear DNA content and hormone receptors in breast cancer by the CAS 100 Cell Analysis System as related to morphologic grade and biochemical results. *Anal Quant Cytol Histol* 13: 233-245
- 115) Ross DW : *Introduction to Oncogenes and Molecular Cancer Medicine*. Springer Verlag New York Berlin Heidelberg 1998
- 116) Ross JS : *DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology*. IGAKU-SHOIN Medical Publishers Inc, New-York 1996
- 117) Roth JA (1995): Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 12 Suppl 2: 3-15
- 118) Sachs L: *Angewandte Statistik*. Springer Verlag Berlin Heidelberg 1992
- 119) Sandberg AA: *The chromosomes in human cancer and leukemia*. Elsevier, New York, Amsterdam 1980
- 120) Sandritter W : *Allgemeine Pathologie; 2 Auflage; Schattauer Verlag, Stuttgart* 1986
- 121) Sandritter W, Carl M, Ritter W (1966): Cytophotometric measurements of the DNA content of human malignant tumors by means of Feulgen reaction. *Acta Cytol* 10: 26-30

- 122) Scarff RW, Torloni H: Histological typing of breast tumours (international histological classification of tumours, no 2). World Health Organization, Geneva 1968
- 123) Schlotter CM, Kropp S, Bosse U, Vogt U, Bosse A, Wassmann K : Cytometric Results of DNA Imaging and Established Prognostic Factors in Primary Breast Cancer. In: Bonk U (ed): Breast Cancer: International Recommendations for an Objective Diagnosis. Urban&Fischer München Jena 1999: 132-146
- 124) Sethi T, Rozengurt E (1992): Gastrin stimulates Ca²⁺ mobilization and clonal growth in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 52(21): 6031-6035
- 125) Shen H, Lu YD, Zhang YX (2000): Quantitative chromatics analysis for computer imaging of cytologic subtypes of lung cancer stained by Papanicolaou stain. *Anal Quant Cytol Histol* 22: 263-266
- 126) Shevchuk MM, Richard RM (1982): DNA-content of condyloma acuminatum. *Cancer* 49: 489-492
- 127) Shields PG (2000): Epidemeology of Tabacco Carcinogenesis. *Curr Oncol Rep* 2: 257-262
- 128) Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg Ä, Dalberg M, Ferno M, Killander D, Olsson H (1990): Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 322: 1045–1053
- 129) Sinn HP, Haag D, Ehemann V, Magener A, Goertler K, Bastert G, Otto HF (1997): DNA-Zytometrie beim Mammakarzinom: Übersicht zur Methode und zum Stellenwert bei der Prognoseabschätzung. *Pathologe* 18: 19-26
- 130) Susnik B, Poulin N, Phillips D, LeRiche J, Palcic B (1995): Comparison of DNA measurement performed by flow and image cytometry of embedded breast tissue sections. *Anal Quant Cytol Histol* 17: 163-171
- 131) Sweep FC, Fritsche HA, Gion M, Klee GG, Schmitt M (2003): Considerations on development, validation, application and quality control of immuno(metric) biomarker assay in clinical cancer research: An EOPTC-NCI working group report. *Int J Oncol* 23(6): 1715-1726
- 132) UICC International Union against Cancer: TNM-Klassifikation maligner Tumore, 4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1987
- 133) Van Dilla MA, Trujillo TT, Coulter JR, Dean PN (1969): Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163(872): 1213-1214
- 134) Veale D, Ashcroft T, Marsh C, Gibson GJ, Harris AL (1987): Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 55(5): 513-516
- 135) Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P (1993): Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71: 3926-3931

- 136) Veronese S.M., Maisano C., Scibilia J (1995): Comparative prognostic value of Ki-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer. *Anticancer Res* 15: 2717-2722
- 137) Viallet J, Minna JD (1990): Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 225-232
- 138) Viren MM, Ojala A, Kataja VV, Mattila J (1997): Flow cytometry analysis of tumor DNA proliferated related to response to treatment and survival in small-cell lung cancer. *Med Oncol* 14: 35-38
- 139) Walsh CB, Thornhill M, Kay E, Whelan D, Barry D, Turner M, Prendville W, Leader M (1995): DNA-quantification is technically feasible and of value in cervical smear samples: possible applications for determination of progression in low grade dyskaryosis. *Cytopathology* 6: 88-94
- 140) Weidner N, Folkmann J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G (1992): Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84: 1875-1887
- 141) WHO : International Histological Classification of Tumours. In: Travis W.D., Colby T.V. et al. (Hrsg): *Histological Typing of Lung and Pleural Tumours, Third Edition*; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 156pp 1999
- 142) Winkler B, Crum CP, Fujii T (1984): Koilocytic lesions of the cervix: the relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA-content. *Cancer* 53: 1081-1087
- 143) Wolman SR, Pauley RJ, Mohamed AN, Dawson PJ, Visscher DW, Sarkar FH (1992): Genetic markers as prognostic indicators in breast cancer. *Cancer Supp* 170: 1765-1774
- 144) Yamamoto T, Horiguchi H, Kamma H (1994): Comparative DNA Analysis by image and flow cytometry in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 1171 -1177

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. F. Klinke, Leiter der Abteilung für Thoraxchirurgie der St. Raphaels-Klinik Osterkappeln im St. Georgs-Klinikum, danke ich für die Anregung zur Durchführung der Arbeit.

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. Bürger, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker) des Universitätsklinikums Münster für die wissenschaftliche Betreuung und für die Unterstützung während der Ausarbeitung und Fertigstellung der Arbeit. Er stand mir mit zahlreichen kritischen und hilfreichen Anregungen zur Seite.

Herrn Dr. med. U. Bosse, Leiter des Pathologischen Instituts Osnabrück, danke ich herzlich für die freundliche Bereitstellung des histopathologischen und immunhistochemischen Datenmaterials.

Auch möchte ich meiner Frau Nicole aufs herzlichste danken. Sie hat mir bei der Korrektur des Textes in allen Phasen geholfen.

8 Lebenslauf

Dirk Baumann
 Untere Dorfstraße 11
 44265 Dortmund

Persönliche Daten

Geburtsdatum	06.11.1958
Geburtsort	Dortmund
Eltern	Günter Baumann, verst. 1974 Doris Baumann, geb. Wichmann, Rentnerin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	konfessionslos
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

1965-1968	Grundschule Dortmund Aplerbeck
1968-1973	Gymnasium Dortmund Aplerbeck
1973-1979	Friedrich-Bährens-Gymnasium Schwerte
1979	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
1979-1980	Krankenpflegepraktikum

Studium

1981- 1988	Studium der Humanmedizin in Bochum, Bonn u. Essen
19.07.1988	Approbation als Arzt
1990 – 1994	Studium der Zahnheilkunde in Erlangen
07.07.1994	Approbation als Zahnarzt

Berufliche Tätigkeit

01.04. - 30.09.1989	Weiterbildung HNO Praxis Dr. Miodek in Haan
01.01. - 31.03.1990	Weiterbildung Allgemeinchirurgie St. Josefs-Hospital Dortmund-Hörde
01.04. - 11.06.1990	Weiterbildung Neurochirurgie Städtische Kliniken Dortmund
01.08.94 – 15.02.98	Weiterbildung MKG-Chirurgie Knappschafts-Krankenhaus Recklinghausen
31.01.1998	Facharztanerkennung MKG-Chirurgie
01.01.1999	Niederlassung in eigener Praxis in Dortmund

Dortmund , 23.09.2004

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung1: Zellzyklusphasen	5
Abbildung2: Histogrammanalyse eines aneuploiden Bronchialkarzinoms	16
Abbildung3: Histogrammanalyse eines diploiden Bronchialkarzinoms	17
Abbildung4: Prozentuale Verteilung der Geschlechter	27
Abbildung5: Altersverteilung des Gesamtkollektivs	28
Abbildung6: Altersverteilung der männlichen Patienten	28
Abbildung7: Altersverteilung der weiblichen Patienten	29
Abbildung8: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Diagnosen	30
Abbildung9: Häufigkeit der Tumorarten bei männlichen Patienten	30
Abbildung10: Häufigkeit der Tumorarten bei weiblichen Patienten	31
Abbildung11: Überblick über den Ploidiestatus	32
Abbildung12: Verteilung der Tumore nach pTNM-Klassifikation	32
Abbildung13: Häufigkeit und prozentuale Verteilung des Tumorigradings	33
Abbildung14: Stammlinienmedianwerte der untersuchten Tumorarten	34
Abbildung15: DNA-Mittelwert der untersuchten Tumorarten	35
Abbildung16: DNA-Index der untersuchten Tumorarten	36
Abbildung17: Streubreite des 2c Deviation Index der untersuchten Tumorten	37
Abbildung18: Streubreite der 5c Exceeding Events der untersuchten Tumorarten	38
Abbildung19: Streubreite der 9c Exceeding Events der untersuchten Tumorarten	39
Abbildung20: Streubreite des Variationskoeffizienten	40
Abbildung21: Streubreite des Malignitätsgrades	41
Abbildung22: Stammlinienverteilung der Kleinzeller und Nichtkleinzeller	42
Abbildung23: DNA-Mittelwert-Verteilung Kleinzeller vs Nichtkleinzeller	43
Abbildung24: DNA-Index Kleinzeller vs Nichtkleinzeller	44
Abbildung25: Verteilung des 2c Deviation Index NSCLC vs SCLC	45
Abbildung26: Medianverteilung der 5c Exceeding Events NSCLC vs SCLC	46
Abbildung27: Medianverteilung der 9c Exceeding Events NSCLC vs SCLC	47
Abbildung28: Variationskoeffizienten NSCLC vs SCLC	48
Abbildung29: Malignitätsgrad NSCLC vs SCLC	49
Abbildung30: Vergleich der S/G ₂ /M-Fraktion und der verschiedenen Tumorgruppen	50
Abbildung31: Vergleich von unterschiedlichem Ploidiestatus in der S/G ₂ /M-Fraktion	51
Abbildung32: Vergleich von unterschiedlicher G ₀ /G ₁ -Fraktion / der S/G ₂ /M-Fraktion	52
Abbildung33: Vergleich von MIB-1 in Abhängigkeit zur Histologie der Tumorgruppen	53
Abbildung34: Häufigkeiten des hohen MIB-1-Index in Abhängigkeit zur Histologie	54

Abbildung35: Vergleich von unterschiedlichem Ploidiestatus in den Werten von MIB-1	55
Abbildung36: Häufigkeit und prozentuale Verteilung von kategorisierten MIB-1-Werten	56
Abbildung37: Vergleich von MIB-1 mit unterteilter G_0/G_1 -Fraktion	57
Abbildung38: Vergleich der G_0/G_1 -Intervalle mit MIB-1-Werten	58
Abbildung39: Häufigkeitsverteilung des MIB-1	59
Abbildung40: Häufigkeitsverteilung der $S/G_2/M$ -Fraktion	59

9.2 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Überlebenszeit nach klinischem und pathologischem Stadium	2
<u>Tabelle 2:</u> Definition der DNA-Parameter	15
<u>Tabelle 3:</u> Die explorativ verwendeten statistischen Verfahren	26
<u>Tabelle 4:</u> Kennzeichnung der explorativen Signifikanzen	26
<u>Tabelle 5:</u> Geschlechterverteilung des Gesamtkollektivs	27
<u>Tabelle 6:</u> Mittelwert u. Standardabweichung des Modalwertes der Tumorarten	33
<u>Tabelle 7:</u> Mittelwert u. Standardabweichung vom DNA-Mittelwert der Tumorarten	34
<u>Tabelle 8:</u> Mittelwert und Standardabweichung des DNA-Index	35
<u>Tabelle 9:</u> Mittelwert u. Standardabw. vom 2c Deviation Index der Tumorarten	36
<u>Tabelle 10:</u> Mittelwert u. Standardabw. von 5c Exceeding Events der Tumorarten	37
<u>Tabelle 11:</u> Mittelwert u. Standardabw. von 9c Exceeding Events der Tumorarten	38
<u>Tabelle 12:</u> Mittelwert u. Standardabw vom Variationskoeffizienten der Tumorarten	39
<u>Tabelle 13:</u> Mittelwert u. Standardabw. vom DNA-Malignitätsgrad der Tumorarten	40
<u>Tabelle 14:</u> Mittelwert u. Standardabw. vom Modalwert NSCLC vs SCLC	41
<u>Tabelle 15:</u> Mittelwert u. Standardabw. vom DNA-Mittelwert NSCLC vs SCLC	42
<u>Tabelle 16:</u> Mittelwert und Standardabw. vom DNA-Index NSCLC vs SCLC	43
<u>Tabelle 17:</u> Mittelwert und Standardabw. vom 2c Deviation Index NSCLC vs SCLC	44
<u>Tabelle 18:</u> Mittelwert und Standardabw. von 5c Exceeding Events NSCLC vs SCLC	45
<u>Tabelle 19:</u> Mittelwert und Standardabw. von 9c Exceeding Events NSCLC vs SCLC	46
<u>Tabelle 20:</u> Mittelwert u. Standardabw. v. Variationskoeffizienten NSCLC vs SCLC	47
<u>Tabelle 21:</u> Mittelwert und Standardabw. vom Malignitätsgrad NSCLC vs SCLC	48
<u>Tabelle 22:</u> Mittelwert und Median der S/G ₂ /M-Fraktion vs zu den Tumorgruppen	50
<u>Tabelle 23:</u> Verteilung der Mittelwerte und der Mediane der S/G ₂ /M-Fraktion	51
<u>Tabelle 24:</u> Mittelwert und Medianverteilung der G ₀ /G ₁ -Intervalle und S/G ₂ /M-Fraktion	52
<u>Tabelle 25:</u> Mittelwert und Medianverteilung von MIB-1 in Abhängigkeit zur Histologie	53
<u>Tabelle 26:</u> Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Index (≥20%)	54
<u>Tabelle 27:</u> Mittelwert und Medianverteilung von MIB-1	55
<u>Tabelle 28:</u> Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Wertes	56
<u>Tabelle 29:</u> Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Mittelwerte und Mediane	57
<u>Tabelle 30:</u> Häufigkeit und prozentuale Verteilung des hohen MIB-1-Index (≥20%)	58