

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK  
DES  
AKADEMISCHEN  
LEHRKRANKENHAUSES  
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN

CHEFARZT: PROF. DR. MED. HANS SCHWERING

**KLINISCHE BEDEUTUNG  
DER COMPUTERGESTÜTZTEN  
BILDANALYTISCHEN  
DNA-ZYTOMETRIE  
FÜR DIE PROGNOSE  
DES  
MAMMAKARZINOMS**

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR  
ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT  
MÜNSTER

VORGELEGT VON  
AXER, GERHARD PETER  
AUS EUSKIRCHEN

2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr.med.H.Jürgens

1.Berichterstatter: Prof.Dr.med.H.Schwering

2.Berichterstatter: Prof.Dr.med.P.Preusser

Tag der mündlichen Prüfung : 23.06.2006

Aus der chirurgischen Klinik des Akademischen Lehrkrankenhauses  
Marienhospital Euskirchen (Chefarzt Prof. Dr. med. H. Schwering)

**Referent: Prof.Dr.med.H.Schwering**

**Koreferent:Prof.Dr.med.P.Preusser**

## **Zusammenfassung**

### **Klinische Bedeutung der computergestützten, bildanalytischen DNA-Zytometrie für die Prognostik des Mammakarzinoms**

Axer, Gerhard Peter

Die Erkrankung an einem Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Die wichtigsten Prognoseparameter des Mammakarzinoms sind die histomorphologischen und immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse des Tumors zum Diagnosezeitpunkt. Ergebnisse in der computergestützten, bildanalytischen DNA-Zytometrie beim Mammakarzinom weisen auf mögliche diagnostische und prognostische Erweiterungen hin. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, herauszufinden, ob mittels Analyse der DNA durch Fluß-/Bildzytometrie wesentliche spezifischere Aussagen über die Prognose des Mammakarzinoms gemacht werden können, wie dies bereits bei anderen Tumoren möglich ist. Es sollte speziell die Korrelation zwischen DNA-Zytometrie und konventioneller Histologie des Mammakarzinoms festgestellt und damit die Bedeutung der DNA-Zytometrie für die Prognose des Mammakarzinoms festgelegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die konventionell-histologisch gesicherten und die bildanalytischen DNA-zytometrischen Daten von Patienten mit Mammakarzinom ausgewertet. Die Korrelation zwischen histomorphologischen Daten, bestehend aus Tumorgrading, TNM- und AJCC-Klassifikation einerseits, und DNA-zytometrischen Parametern, bestehend aus DNA-Diagnosen (Ploidiestatus), DNA-Index, DNA-Malignitätsgrad und Auer-Klassifikation andererseits, wurde festgestellt und in Verbindung mit der Prognose des Mammakarzinoms dargestellt.

Es lassen sich zusammenfassend durch die DNA-Zytometrie anhand dieser Studie nur tendenzielle-prognostische Aussagen ergänzend zu den anderen Prognosefaktoren machen, denn es zeigen sich nur für DNA-Malignitätsgrad, DNA-Index und DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer teilweise hochsignifikante Korrelationen zu den konventionellen histologischen Untersuchungsergebnissen.

Tag der mündlichen Prüfung : 23.06.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>1</b>
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Zielsetzung	2
<b>2.</b>	<b>Anatomie der Brustdrüse</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>Pathologie der Brustdrüse</b>	<b>5</b>
3.1.	Gutartige Tumore und tumorartige Bildungen	5
3.1.1	Mastopathia cystica fibrosa	5
3.1.2.	Fibroadenome	6
3.2.	Präcancerosen und praeinvasive Karzinome	7
3.2.1.	Carcinoma lobulare in situ (CLIS)	7
3.2.2.	Ductales Carcinoma in situ (DCIS)	7
3.3.	Mammakarzinom	8
3.4.	Tumorstadien	9
3.5.	Risikofaktoren des Mammakarzinoms	12
3.6.	Metastasierung des Mammakarzinoms	12
<b>4.</b>	<b>Diagnostik des Mammakarzinoms</b>	<b>13</b>
4.1.	Standard-Verfahren	13
4.2	Apparativ-technisches Verfahren	14
4.3.	Operative Gewebeentnahme	16
<b>5.</b>	<b>Therapie des Mammakarzinoms</b>	<b>17</b>
5.1.	Operative Therapie	17
5.2.	Adjuvante Therapie	19
5.2.1.	Strahlentherapie	20
5.2.2.	Hormontherapie	21
5.2.3.	Antikörpertherapie	22
5.2.4.	Chemotherapie	22
5.2.5.	Lokalreziv und Spätmetastase	23
5.3.	Tumornachsorge	24
<b>6.</b>	<b>Tumorbiologie und DNA-Zytometrie</b>	<b>25</b>
6.1.	Theoretische Grundlagen	25
6.2.	Grundlagen der DNA-Zytometrie	28
6.2.1	DNA-Diagnose	31
6.2.2	DNA-Index	31

6.2.3	DNA-Malignitätsgrad	32
6.2.4	DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer	32
6.3.	DNA-Zytometrie und ihre klinische Bedeutung	36
<b>7.</b>	<b>Patienten und Methoden</b>	<b>38</b>
7.1.	Datenerhebung	38
7.2.	DNA-zytometrische Untersuchung	39
7.2.1	Präparation und Färbung	39
7.2.2	Messplatz und Durchführung	39
7.3.	Histologische Aufarbeitung	43
7.4.	Statistik	43
7.4.1.	Deskriptive Statistik	43
7.4.2.	Statistische Methoden	44
<b>8.</b>	<b>Ergebnis</b>	<b>48</b>
8.1.	Soziodemographische Daten	49
8.2.	Histologische Klassifikation	50
8.3.	DNA-Zytometrie	61
8.3.1	DNA- Diagnose	61
8.3.2	DNA-Index	63
8.3.3	DNA-Malignitätsgrad	69
8.3.4	DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer	74
8.4.	Retrospektive Verlaufsanalyse	79
8.5	Nachbehandlung	98
<b>9.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
9.1.	Histomorphologische Untersuchung	102
9.2.	DNA-zytometrische Untersuchung	103
9.3.	Retrospektive Verlaufsanalyse	112
<b>10.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
<b>13.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>125</b>

# 1. Einleitung und Zielsetzung

## 1.1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist statistisch seit über 25 Jahren in den westlichen Industrienationen die Krebstodesursache Nr. 1 der weiblichen Bevölkerung (Achenbach 1993, Becker et al.1984). In Deutschland ist es in der Altersklasse zwischen 35 und 65 Jahren die häufigste Todesursache des weiblichen Geschlechts.

Im Jahre 2000 waren 395.000 Neuerkrankungen generell an Krebsleiden in Deutschland festzustellen, davon 200.000 Männer und 195.000 Frauen. Bei den Krebserkrankungen der Frauen war das Mammakarzinom mit 48.000 Erkrankungen und 1000 Sterbefällen die häufigste Todesursache der weiblichen Krebserkrankten (Robert-Koch-Institut 2000). Statistisch geht man heute davon aus, dass jede 15. Frau im Laufe ihres Lebens an einem bösartigen Tumor der Brust erkrankt.

Die Häufigkeit der Brusterkrankungen erfordert eine möglichst frühzeitige Erkennung eines klinisch noch okkulten Karzinoms oder seiner nicht invasiven Vorstufen, denn in diesen Stadien besteht noch Hoffnung auf eine vollständige Heilung. Ferner sollte eine sichere Klärung der Dignität eines in Erscheinung getretenen Tumors möglich sein. Denn gerade hiervon hängt das weitere Vorgehen ab.

## 1.2. Zielsetzung

In der Früherkennung und Therapie des Mammakarzinoms konnten in den letzten beiden Jahrzehnten durch ausgedehnte wissenschaftliche Untersuchungen deutliche Erfolge erzielt werden. Dagegen ist in der Prognosestellung über den Verlauf der Karzinomkrankung zum jetzigen Zeitpunkt noch keine definitiv verlässliche Aussage möglich.

Die Grundparameter der Prognostik beim Mammakarzinom sind die konventionellen histomorphologischen Parameter (Untersuchungen der Zellen und Einteilungen in Stadien). Eine zusätzliche Methode zur Spezifizierung dieser Parameter kann die Anwendung von zytogenetischen Informationen bedeuten. In Kenntnis der chromosomalen Strukturen und Funktionsmechanismen in der Zelle lassen sich in den Karzinomzellen strukturelle und numerische Fehlregulationen der Chromosomen und damit auch der DNA feststellen. Interessant ist der Zusammenhang von bekannten histomorphologischen und zytogenetischen Parametern in der Tumorzelle. Ein Verfahren für zytogenetische Untersuchungen ist die DNA-Zytometrie.

Kann die computergestützte bildanalytische DNA-zytometrische Untersuchung und die dadurch festgestellte DNA-Diagnose des Mammakarzinoms die Prognoseaussage beim Mammakarzinom alleine oder als Korrelat zu der konventionellen histomorphologischen Untersuchung verbessern?

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Ergebnisse auf eine Korrelation der computergestützten bildanalytischen DNA-zytometrischen Parametern und den konventionellen histomorphologischen Parametern beim Mammakarzinom zu analysieren!



## 2. Anatomie der Brustdrüse

Die Brustdrüse (Glandula mammaria) ist ein paarig angelegtes Organ ektodermalen Ursprungs, das als Epithelverdickung aus der Milchleiste hervorgeht. Unter dem Einfluß von Östrogen, Prolaktin und Wachstumshormon entwickelt sich in der Pubertät die weibliche Brust (Mamma). Die Brust befindet sich bei der liegenden Frau in Höhe der 2. bis 7. Rippe und von der Linea parasternalis bis zur Linea axillaris.

Sie besteht aus dem eigentlichen Drüsenkörper, dem umgebenden Fett- und Bindegewebe sowie der Haut mit Areola und Mamille. Der Drüsenkörper weist bei allen Frauen etwa das gleiche Volumen auf. Größe und Form der weiblichen Brust werden durch die Struktur des Bindegewebskörpers und durch die Menge an Fettgewebe bestimmt.

Der retromammäre Raum, eine lockere Bindegewebsschicht, begrenzt die Mamma nach dorsal zur Faszie des M. pectoralis major. Halt findet die Brust an der Faszie durch stärkere Bindegewebsstränge (Ligg. suspensoria mammaria), die den retromammären Raum durchziehen. An der Haut ist der Drüsenkörper durch das subkutane Fettgewebe ziehende Bindegewebszüge, die Cooperschen Ligamente, fixiert. Durch diese Fixation können schrumpfende Prozesse der Mamma, z. B. Karzinome durch Hauteinziehungen, sichtbar werden.

Die Brustdrüse der Frau setzt sich aus 15 bis 20 verzweigten Einzeldrüsen zusammen (Lobus/ Drüsenlappen). Jeder dieser Drüsenlappen mündet über einen Hauptmilchgang (Ductus lactiferus) als Milchsäckchen (Sinus lactiferus) in die Mamille. Ein Lobus setzt sich abhängig vom Alter der Frau und der Anzahl ihrer Schwangerschaften aus 30 bis 80 Lobuli (Drüsenläppchen) zusammen.

Außerdem finden sich Fettgewebe, stützendes Bindegewebe und Milchgänge. Die Lobuli selbst bestehen aus terminalen Milchgängen, Drüsenstückchen (Azini) und intralobulärem Mantelbindegewebe. Die Menge des Mantelbindegewebes ist hormongesteuert. Im Gegensatz dazu bleibt das Stützbindegewebe hormonell unbeeinflusst.

Die arterielle Blutversorgung der Brustdrüse erfolgt über ein breites, stark anastomosierendes Geflecht von Ästen der A. thoracica lat., der A. thoracica interna und der 3. bis 7. Interkostalarterie. Über einen subkutanen Venenplexus wird das Blut in die V. axillaris und die V. jugularis geleitet. Die Lymphe wird in einem oberflächlichen und einem tiefen Lymphgefäßnetz gesammelt (Plexus areolaris und fascialis). Über 70 % der Lymphe nimmt ihren Weg von dort über die axilläre Lymphstrombahn. Die restliche Lymphe folgt der intermuskulären, der interkostalen und der kutanen Abflußbahn.

Die Innervation erfolgt über Hautäste der 2. bis 6. Interkostalnerven, die sensible und autonome Fasern enthalten (Fleischhauer 1985).

Der Anteil von Parenchym, Bindegewebe und Fettgewebe am Gesamtvolumen der Brustdrüse unterliegt altersbedingten Schwankungen. Ab dem 35. Lebensjahr findet eine Regression des Drüsenepithels statt, die mit sinkenden Östrogen- und Progesteronspiegeln fortschreitet. Die Drüsenläppchen werden atrophisch und der relative Anteil an Fettgewebe nimmt deutlich zu. Man spricht von einer Involutionmamma (Prechtel 1970).

### **3. Pathologie der Brustdrüse**

#### **3.1. Gutartige Tumoren und tumorartige Bildungen**

##### **3.1.1. Mastopathia cystica fibrosa**

Die Mastopathie stellt die häufigste gutartige Brusterkrankung dar (Bässler 1978). Sie tritt nur in der Geschlechtsreife auf und hat ihren Häufigkeitsgipfel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr.

Die Ursache sieht man in einem relativen oder absoluten Östrogenüberschuß. Es handelt sich um eine Veränderung im Bereich der Milchgänge und ihrer Endstücke sowie des inter- und intralobulären Bindegewebes und einer Zystenbildung (Holzner 1986). Wird ein Milchgang durch Epithelproliferate oder Zelldetritus verlegt, entstehen hieraus größere Zysten. Man spricht von einer Mastopathia cystica.

Von einer Mastopathia fibrosa spricht man bei Regression der Drüsenläppchen und -gänge, Rückbildung des Mantelgewebes und Hyalinisierung des Stützbindegewebes. Das Auftreten ist herdförmig oder diffus und meist bilateral mit Bevorzugung des oberen äußeren Quadranten.

Entsprechend dem Proliferationsgrad der epithelialen Anteile unterscheidet man nach Prechtel Mastopathien der Grade I-III (Prechtel 1974) (s. Tab1).

Klassifikation	Definition	Entartungsrisiko in %
Mastopathie I	benigne Parenchymdysplasie ohne intraduktale/Intraduktuläre Epithelproliferation	1,2
Mastopathie II	benigne Parenchymdysplasie mit intraduktaler/Intraduktulärer Epithelproliferation ohne zyto- und histomorphologische Atypie	3,4
Mastopathie III	Parenchymdysplasie mit intraduktaler/intraduktulärer Epithelproliferation mit zyto- und histomorphologischer Atypie	44,0

*Tab.1: Klassifikation der Mastopathien nach Prechtel*

Die Proliferationsgrade unterscheiden sich hinsichtlich ihres Risikos der malignen Entartung. Bei einer Mastopathie Grad III schätzt man auf ein etwa um den Faktor 4 erhöhtes Karzinomrisiko. Die Veränderungen dieses Proliferationsgrades können zu einem intraduktalen Carcinoma in situ führen. Sie stellen oft multizentrisch gelegene Präkanzerosen dar (Bickmann 1991a).

### **3.1.2. Fibroadenome**

Fibroadenome der Mamma sind am häufigsten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Sie stellen etwa 20 % aller Brusterkrankungen dar. Bei meist solitärem Auftreten erreichen sie eine Größe von bis zu 5 cm (Eder 1990). Sie entarten sehr selten, müssen jedoch klinisch von zellreichen Karzinomen der Brust unterschieden werden. Histologisch sind die Fibroadenome von einer Bindegewebskapsel umgebene Neoplasien der Mamma, die durch unterschiedlich stark ausgeprägte Proliferation von Stroma und Epithel entstehen. Das häufige intrakanalikuläre Fibroadenom zeichnet sich durch hirschgeweihartig verzweigte Milchgänge aus, die vom umge-

benden Mantelgewebe komprimiert werden. Beim perikanalikulären Typus umhüllt das Mantelbindegewebe die um einen Milchgang proliferierten Drüsenstrukturen.

## **3.2. Präkanzerosen und präinvasive Karzinome**

### **3.2.1. Carcinoma lobulare in situ (Clis)**

Das Carzinoma lobulare in situ entsteht in den Drüsenläppchen, selten in den terminalen Tubuli durch Proliferation monomorpher Zellen in den Azini ohne Überschreiten der Basalmembran. Es kommt hauptsächlich bei jüngeren Frauen vor und entwickelt sich meist multizentrisch. Da es sich um eine mikroskopische Veränderung handelt, ist es meist ein Zufallsbefund. Das Risiko, ein invasives Karzinom zu entwickeln, beträgt bis zu 30 % und ist somit gegenüber dem statistischen Durchschnitt um das 7- bis 11-fache erhöht. Durch das multizentrische Auftreten nimmt die Wahrscheinlichkeit eines kontralateralen Karzinoms bei der Entwicklung eines invasiven Karzinoms stark zu (Bickmann 1991a).

### **3.2.2. Ductales Carcinoma in situ (Dcis)**

Solange die undifferenzierten atypischen epithelialen Zellverbände ausschließlich in den Milchgängen zu finden sind, spricht man von einem präinvasiven Karzinom. Unter allen Karzinomen hat es einen Anteil von 3 %, entwickelt sich in einem Drittel der Fälle multizentrisch und birgt das Risiko eines invasiven Karzinoms von etwa 50 %. Von einem Morbus Paget spricht man, wenn Malignomzellen in die Epidermis der Mamille und der Areola eindringen. Die Grenze zu einem invasiven Karzinom ist hier fließend. Ebenfalls schwer zu differenzieren ist das Komedokarzinom. Es entsteht durch den nekrotischen Zerfall von Zellen in der Lichtung des Milchganges. In der Form des reinen Carcinoma in situ breitet es sich nur in den Milchgängen aus, kann diese Grenze jedoch auch überschreiten. Die intraduktalen präinvasiven Karzinomformen stellen schwierige Grenzfälle zu den echten Karzinomen der Brust dar.

### 3.3. Mammakarzinom

85 % der bösartigen epithelialen Geschwülste der Brust gehen vom Gangsystem aus (duktales und intraduktales Karzinom). 15% finden ihren Ursprung in den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom). Die bevorzugte Lokalisation der Karzinome ist der obere äußere Quadrant der Brust. Hier finden sich fast 50 % aller bösartigen Tumore. Makroskopisch erscheint das Mammakarzinom meist als unscharf begrenzter derber Tumor. Strahlige Ausläufer und zentrale Verkalkungen sowie Nekrosen sind weitere häufige Merkmale des malignen Tumors. Von entscheidender prognostischer Bedeutung ist das Invasionsverhalten des Tumors. Bei invasiven Karzinomen kommt es rasch zu einer lymphogenen Metastasierung in die regionären Lymphknoten. Für die Richtung der lymphogenen Ausbreitung ist der Sitz des Primärtumors entscheidend. So führt der lymphogene Metastasierungsweg eines Tumors im oberen äußeren Quadranten über die axillären Lymphknoten, während bei medialem Sitz die para- und retrosternalen Lymphknoten betroffen sind. Invasiv duktaie Karzinome sind mit einem Anteil von etwa 80 % die häufigste Form des Brustkrebses. Histologisch finden sich meist solide oder drüsenähnliche Zellansammlungen und eine stark variierende Stromavermehrung. Bei sternförmig wachsenden Tumoren mit überwiegendem Bindegewebsanteil und vereinzelt eingestreuten Tumorzellverbänden spricht man von szirrhösen Karzinomen. Das Carinoma solidum simplex zeichnet sich durch ein ausgewogenes Tumor-Stroma-Verhältnis aus. Das knollig wachsende medulläre Karzinom hingegen verfügt über einen hohen Tumor-Anteil gegenüber geringen Stroma-Anteilen. Es neigt zu Einblutung und Nekrosebildung. Insgesamt zeigt sich bei den invasiven Mammakarzinomen eine sehr unterschiedliche Ausprägung der Relation von Tumor- zu Bindegewebe. Dieses führt zu einer erheblichen Variabilität der Morphologie in den bildgebenden Verfahren, welches mit großen Schwierigkeiten bei der Abgrenzung zu benignen Tumoren verbunden ist. Das seltenere lobuläre Karzinom entsteht durch Wucherung der Epithelien der Drüsenläppchen. Es tritt meist multizentrisch und bilateral auf. Neben den bisher genannten Brustkrebsformen ohne spezielle

Differenzierung gibt es noch eine Reihe gut differenzierter Karzinome. Die Prognose der gut differenzierten Formen ist deutlich günstiger. Der Anteil der gut differenzierten Tumoren liegt bei etwa 4 %. Die beiden häufigsten Vertreter dieser seltenen Tumorformen sind das Adenokarzinom und das schleimbildende Gallertkarzinom. Nach dem Durchbrechen der Basalmembran spricht man auch bei den oben aufgeführten Formen des Komedokarzinoms und des Morbus Paget von infiltrierend wachsenden, invasiven Karzinomen. Gesondert erwähnt werden soll das Carcinoma inflammatorum. Dieses stellt zwar keine besondere histologische Erscheinungsform dar, fällt jedoch durch seine diffuse Ausbreitungsart auf. Es kommt zu einer ausgedehnten subepidermalen Lymphangiosis carcinomatosa. Durch eine Stauungserscheinung der Gefäße entsteht eine Hyperämie der Haut, die wie eine Mastitis erscheint. Auch hier ist eine Differenzierung schwierig, aber von essentieller Bedeutung (Bickmann 1991 et al.)

### 3.4 Tumorstadien

Die im deutschsprachigen Raum früher gebräuchlichste klinische Klassifikation nach Steinthal wurde 1979 durch das TNM-System abgelöst. Dieses hat die alte Einteilung heute fast völlig verdrängt. Das TNM-System entstand nach den Richtlinien der UICC (Union International Contre le Cancer, Genf) und ermöglicht einen internationalen Vergleich der Tumorbeurteilung.

Das TNM-System klassifiziert nach Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) (s.Tab). Weiterhin unterscheidet man nach einer prätherapeutischen (TNM) und histologisch fundierten postoperativen (pTNM) Einteilung. Mit Hilfe dieser Systematik können Karzinome hinsichtlich Stadium, Ausbreitung und Differenzierungsgrad durch Symbole beschrieben werden (Bickmann 1991b).

TNM

pTNM

T = Größe des Tumors

pT = T

T0=	kein Anhalt für Primärtumor nachweisbar	pT0=kein Karzinom
		pTis= präinvasives Karzinom
T1	Tumorausdehnung bis 2 cm	
T1a	Tumorausdehnung bis 0,5 cm	
T1b	Tumorausdehnung bis 1,0 cm	
T1c	Tumorausdehnung bis 2,0 cm	pT = T
T2	Tumorausdehnung 2-5 cm	
T3	Tumorausdehnung > 5 cm	
T4	Tumorausdehnung jeglicher Größe mit Ausdehnung auf Brustwand und/oder Haut	
Tx	Keine sichere Einordnung möglich	

.....

N = regionäre Lymphknoten (LK)

N0	keine LK-Metastasen (tastbar)	pN0 = keine LK Metastasen
N1	Metastasen in ipsilateralen LK (tastbar als solche angesehen)	pN1 = in beweglichen ipsilat. axillären LK
		pN1a =Mikrometastasen bis 0,2 cm
		pN1b =Metastasen >0,2 cm
N2	untereinander oder mit anderen Strukturen verbackene LK	pN2 =wie N2
N3	Metastasen ipsilateral der A.mammaria interna	pN3 =wie N3
Nx	nicht beurteilbar	

.....

M = Metastasen

M0	keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen	pM = wie M
Mx	nicht beurteilbar	

TNM-Klassifikation nach UICC (Bickmann 19991b)



## Histopathologisches Grading

- G1 gut differenziert  
 G2 mäßig differenziert  
 G3 undifferenziert

## Stadieneinteilung

Vergleich der Stadieneinteilung nach AJCC und der TNM-Klassifikation beim Mammakarzinom:

	N 0	N 1	N 2	N 3
<b>T 1</b>	<b>I</b>	<b>II A</b>	<b>III A</b>	<b>III C</b>
<b>T 2</b>	<b>II A</b>	<b>II B</b>		
<b>T 3</b>	<b>II B</b>			
<b>T 4</b>			<b>III B</b>	

Tab.2: Stadieneinteilung nach AJCC in Bezug zu TN-Klassifikation

## Hormonrezeptoren

Bestimmung der Hormonrezeptoren ER (=Östrogen-Rezeptoren) und PR (=Progesteron-Rezeptoren) ist obligat. Bei der immunhistochemischen Bestimmungen ist ein Anteil von > 10 % hormonreaktiver Zellen als positiv zu bewerten. Werte zwischen 1 % und 9 % gelten als fraglich positiv. Bei der biochemischen Bestimmung sind Werte für ER > 10 µmol/mg Protein und für PR > 20 µmol/mg Protein positiv.

## Wachstumsfaktorrezeptor HER2 (c-erbB2)

HER2-Status der Mammakarzinomzelle wird immunhistochemisch bestimmt und nach Dako-Score ausgewertet. Der Score beinhaltet 4 Stufen (0, 1+, 2+, 3+). Dabei besteht eine Überexpression von HER2 auf den Tumorzellen nur bei einem Score von 2+ und 3+, d.h. ein Ansprechen der Antikörpertherapie findet nur bei eindeutiger Überexpression in diesem Wertebereich statt.

### 3.5. Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Familiär: Verwandte 1. Grades (Mutter, Schwester) mit einseitigem (erhöht) oder beidseitigem (stark erhöht) Karzinom

Persönlich: -Frühe Menarche (< 12. Lj.), Kinderlosigkeit, späte Menopause (> 55. Lj.), Adipositas  
-Karzinom in der Anamnese. Risiko für Zweit-Karzinom der Mamma erhöht.  
-Mastopathie (III. > II. Grades), nachgewiesenes Carcinoma in situ

Geringes Risiko: Erstes Kind vor dem 20. Lj., Multipara, lange Stillzeit.

### 3.6. Metastasierung des Mammakarzinoms

- Lk-Metastasen: axillär, supraclaviculär und retrosternal.
- Über den Blutweg am häufigsten Knochen (Wirbelsäule, lange Röhrenknochen), seltener Lunge, Pleura, Leber, Gehirn und Ovarien.

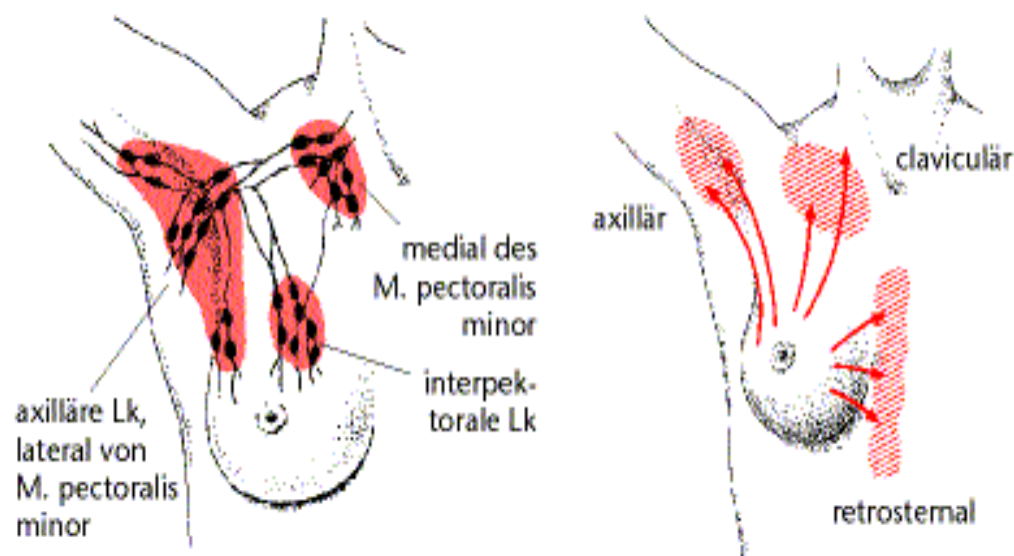


Abb. 1: Lymphogene Metastasierungswege des Mammakarzinoms

## **4. Diagnostik des Mammakarzinoms**

### **4.1 Standard-Verfahren**

#### **4.1.1. Klinik**

Meist findet sich beim Mammakarzinom ein derber Knoten in der Brustdrüse mit oder ohne Einziehung der Brustwarze oder des darüberliegenden Hautmantels. Bei umschriebener Infiltration der Haut kann es zu einer Exulzeration (Karzinomulkus), bei diffuser Infiltration der Haut kann es mit Lymphödem zum Bild der „Peau d'orange“ kommen. Liegen mehrere Tumorknoten eng beieinander, und sind alle Schichten durchsetzt, sprechen wir vom „Cancer en cuirasse“ ( Morbus Paget ).

#### **4.1.2. Screening-Untersuchungen**

Breit gestreute klinische und mammographische Untersuchungen ergaben einen positiven Befund bei etwa 1-2 % der untersuchten Frauen, hiervon wurden über 80% der Befunde bereits klinisch entdeckt. Der Erfolg dieser Studien lag darin, dass die so diagnostizierten Mammakarzinome überdurchschnittlich häufig noch in einem Frühstadium erfaßt wurden.

#### **4.1.3. Selbstuntersuchung**

Sie ist eine sehr effektive Methode, die bei entsprechender Aufklärung zu einer frühzeitigen weiteren Diagnostik verdächtiger Mammaknoten führen kann.

#### **4.1.4. Vorsorgeuntersuchung**

Gezielte klinische und mammographische Untersuchung von Frauen mit erhöhtem Risiko (über 45 Jahre, familiäre Disposition. Frauen ohne Kinder, frühere Mammaerkrankungen, Mastopathia fibrosa cystica).

#### **4.1.5. Anamnese, Inspektion, Palpation**

Vor jeder weitergehenden Diagnostik der Brustdrüse mit apparativ-technischen oder invasiven Untersuchungsverfahren wird eine sorgfältige Anamnese, Inspektion und Palpation der Mamma durchgeführt. In der Anamnese werden alle subjektiven Befunde zusammengefasst, die für eine Mammaerkrankung relevant sind. Die Inspektion und Palpation erfasst alle objektiven Befunde. Durch klinische Untersuchungen lassen sich 70-80% aller Mammaveränderungen erfassen.

## **4.2. Apparativ-technische Verfahren**

### **4.2.1. Mammographie**

Die konventionelle Mammographie wurde durch die Raster-Mammographie hinsichtlich ihrer Aussagekraft erheblich verbessert. Zudem besteht eine deutlich geringere Strahlenbelastung. Mammographische Kriterien für ein Karzinom sind Ansammlungen von Mikrokalzifikationen, Knoten mit Verdickungen, Areale, die die Architektur verändern und asymmetrisch im Vergleich zur Gegenseite sind oder Läsionen, die eine zunehmende Dichte im Verlauf von seriellen Mammographien aufweisen.

#### **4.2.2. Aspirationszytologie**

Hierzu besteht eine Indikation für Mammazysten bei palpatorisch und röntgenologisch unverdächtigen soliden und zystischen Befunden. Bei negativem zytologischem Befund ist lediglich bei gesicherten Mammazysten eine Verlaufsbeobachtung ohne Operation möglich (falsch-negative Quote von 20 %).

#### **4.2.3. Sonographie**

Die Domäne der Sonographie liegt bei der differentialdiagnostischen Identifizierung zystischer Befunde und unter Umständen bei der Untersuchung einer Mammographie-dichten Mammæ. Die Treffsicherheit der Sonographie scheint deutlich anzusteigen, wenn mit farbcodierten Doppler-Geräten, die langsame Blutflüsse registrieren, untersucht wird.

Bei mammographisch unverdächtigen Befunden kann die Sonographie sicher zwischen solidem und zystischem Tumor differenzieren. Die operative Exstirpation einer Zyste stellt keine absolute Indikation dar, da die Karzinomhäufigkeit nicht größer ist als bei der einfachen Mastopathie.

#### **4.2.4. Galaktographie**

Indiziert bei pathologischer Sekretion sowie mammographisch und palpatorisch nicht abklärbarer Ursache. Bei pathologischer Mamillensekretion liegt Malignität in 4-10% der Fälle vor (über 50 Jahre 10-40%).

#### **4.2.5. Thermographie**

Sie beruht auf dem Phänomen der lokalisierten Überwärmung im Bereich eines Tumors (gesteigerter Stoffwechsel, intensivere Gefäßversorgung). Falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse sind jedoch häufig. Daher hat sich die Thermographie zur Früherkennung des Mammakarzinoms nicht durchgesetzt.

#### **4.2.6. Magnet-Resonanz-Mammographie**

Derzeit ist die Magnet-Resonanz-(Kernspin-)Mammographie noch kein routinemäßiges Verfahren. Sie ist aber eine neue Methode, die sich vor allem bei prämenopausalen Frauen mit mastopathischer, dichter Mamma zu bewähren scheint. Sie sollte aber z. Zt. nur bei jungen Frauen (keine Strahlenbelastung!) mit schwerer familiärer Belastung, bei histologisch positiven axillären Lymphknoten und unbekanntem Primärtumor oder bei bekanntem kontralateralen Mammakarzinom in der Prämenopause eingesetzt werden.

#### **4.3. Operative Gewebeentnahme**

Unsicherheit über die Dignität des Befundes oder die Größe sind die häufigsten Gründe zur Entfernung eines klinisch gutartigen Befundes. Bei großen und kleinen zystischen Veränderungen ist die Punktion das adäquate Therapieverfahren. Eine komplette Exzision eines zystischen Areals ist erforderlich, wenn ständig Flüssigkeit in einem Knoten nachläuft oder das Aspirat blutig ist. Eine weitere Indikation zur kompletten Exzision ist gegeben bei allen soliden Knoten und wenn nach allen übrigen diagnostischen Maßnahmen Karzinomunsicherheit bleibt. Operationsziel ist die Totalentfernung des suspekten Gewebebezirkes mit intraoperativer histologischer Schnellschnittuntersuchung. Bei histologischer Sicherung der Karzinomdiagnose wird die erweiterte operative Therapie ausgeführt.

## 5. Therapie des Mammakarzinoms

### 5.1. Operative Therapie

Die chirurgische Therapie besteht aus brusterhaltenden oder radikalen Operationsverfahren. Das operative Vorgehen ist abhängig von der Tumorausdehnung, Lokalisation und Morphologie. Ziel ist die vollständige Entfernung des Karzinoms im gesunden Gewebe und gleichzeitig soviel gesundes Brustgewebe wie möglich zu erhalten („Soviel wie nötig, so wenig wie möglich.“)! Die Grenze des „so wenig wie möglich“ ist dann erreicht, wenn die Heilungschance gefährdet werden könnte (Schmidt-Matthiesen et al. 1995). Folgende operative Maßnahmen werden indikationsabhängig vorgenommen:

#### **Tumorexstirpation**

Indikation: Alle Tumoren, die klinisch und mammographisch unverdächtig erscheinen.

#### **Quadrantenresektion**

Indikation: Solitäres Papillom, Mammakarzinom T1-2, N0, M0 (mit Axillarevision)

#### **Subkutane Mastektomie**

Die subkutane Mastektomie bedeutet den äußersten Schritt in der Diagnostik, sie ist aber nicht als vollständige Mastektomie zu betrachten, da immer 5-10% des Brustdrüsengewebes zurückbleiben.

Indikationen:

1. Mastopathie mit Proliferation und Atypien
2. Multiple und diffuse ductale Papillome.
3. Carcinoma lobulare in situ.
4. Gynäkomastie.

### **Einfache Mastektomie**

Indikationen:

1. Carcinoma lobulare in situ
2. Bei fortgeschrittenem Mammakarzinom mit und ohne Fernmetastasen (T3-4, Nx, M0-1) aus kosmetischen und sozialen Gründen.

### **Erweiterte Mastektomie (Patey)**

Diese Operationsmethode steht im Mittelpunkt aller Operationsverfahren beim Mammakarzinom. Sie ermöglicht die prognostisch und therapeutisch wichtige Klassifizierung der Lymphknoten. Eine primäre Mastektomie ist beim Mammakarzinom grundsätzlich nicht möglich, vielmehr erfolgt zunächst die operative Gewebeentnahme zur intraoperativen histologischen Schnellschnittuntersuchung und danach die Mastektomie.

Indikation: Mammakarzinom T1-3, N0-x, M0-1.

Komplikationen: Neben Nachblutung und Hämatombildung kann sich nach der Lymphknotendisektion eine Lymphzyste oder ein Lymphödem des Armes entwickeln (ca. 10-30 %)

### **Radikale Mastektomie (Rotter Halsted)**

Früher Standardverfahren, heute nur noch selten erforderlich. Indikation nur bei Tumoren, die die Pectoralfaszie infiltriert oder durchbrochen haben.

### **Erweiterte radikale Mastektomie**

Durch superradikale Eingriffe mit Ausräumung der retrosternalen Mammari-lymphknoten, der supraclaviculären Lymphdrüsengruppen und Brustwandresektion läßt sich eine Verbesserung der Überlebenszeit nicht erreichen. Die Komplikationsrate ist jedoch beträchtlich. Es handelt sich um eine heute verlassene chirurgische Therapie beim Mammakarzinom.



### **Axilläre Lymphknotendisektion**

Regionäre Lymphknotenmetastasen sind ein Indikator für die Metastasierungswahrscheinlichkeit auf lymphogenem oder hämatogenen Wege zu entfernten Regionen. Je mehr Lymphknoten befallen sind, desto wahrscheinlicher sind Fernmetastasen, umso ungünstiger wird die Prognose. Die histologische Sicherung und quantitative Erfassung von befallenen Lymphknoten liefert daher wichtige prognostische Informationen und ist ein besonderes Kriterium für die Wahl adjuvanter chemotherapeutischer Maßnahmen.

### **Rekonstruktion der Mamma nach Ablatio.**

Immer häufiger wird die Frage nach einem Erhalt bzw. dem sofortigen Aufbau der Mamma noch vor Beginn der Mammakarzinomtherapie gestellt. In den letzten Jahren hat sich die Einstellung zum Wiederaufbau der Mamma grundlegend geändert. Vorbehalte sind im wesentlichen nur noch auf das fortgeschrittene Mammakarzinom mit Fernmetastasierung beschränkt. Da der rasche Aufbau einer Mamma an der Grunderkrankung nichts ändert, ist zur Besserung der Lebensqualität eine Aufbauplastik bei entsprechendem Wunsch immer gerechtfertigt. Der Aufbau der Brust wird zweizeitig vorgenommen.

## **5.2. Adjuvante Therapie**

Die Heilungsrate des Mammakarzinoms läßt sich durch Steigerung der operativen Radikalität nicht weiter verbessern, so dass das Mammakarzinom heute als „Systemerkrankung“ betrachtet werden muß. Zum Zeitpunkt der primären Diagnostik liegen statistisch bereits in 65-70`% Fernmetastasen vor. Neben der operativen Behandlung soll durch adjuvante Therapiemaßnahmen wie Strahlentherapie (Radiatio), Hormontherapie (endokrine Therapie) und Chemotherapie die Heilungsrate erhöht, eine Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und eine Verringerung der Morbidität erreicht werden. Um die adjuvante Thera-

pie sinnvoll einsetzen zu können, sind die bekannten prognostischen Faktoren zu berücksichtigen; nur dann ist eine „stadiengerechte Therapie“ möglich.

Prognostische Faktoren: Neben Malignitätsgrad, Lage und Größe des Tumors sind der Menopausen-Status sowie die Anzahl der befallenen Lymphknoten in der Axilla wichtig. Es ist heute möglich, im Zytoplasma von Tumorzellen Steroidhormonrezeptoren zu bestimmen. Sie erlauben eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens einer endokrinen (hormonellen) Therapie. Prognostisch relevant sind Östrogenrezeptoren. Die Rezeptorbestimmung wird gleichzeitig mit der intraoperativen Schnellschnittuntersuchung am exstirpierten Tumor eingeleitet und auch bei Rezidiven, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen durchgeführt.

Risikogruppen: Aufgrund unserer heutigen Erkenntnisse sind folgende Risikogruppen erkennbar:

Niedriges Risiko: T1-3, N1-3, M0, Östrogen+Progesteronrezeptor positiv.

Hohes Risiko: T1-3, N1-X, M0-1, nur 1 oder kein Rezeptor positiv.

### **5.2.1. Strahlentherapie**

Eine Indikation zur Strahlentherapie besteht grundsätzlich nach jeder Operation eines Mammakarzinoms mit axillären Lymphknotenmetastasen und ferner bei isolierten ossären Metastasen. Eventuell ist eine Vorbestrahlung bei primär inoperablen Tumoren indiziert. Die Prognose wird durch die Bestrahlung in Bezug auf eine geringere Lokalrezidivrate verbessert, an der Langzeitüberlebensrate ändert die adjuvante Strahlentherapie nichts. Wichtig ist dabei, dass im Tumor eine möglichst hohe Strahlenkonzentration erreicht wird und das umliegende gesunde Gewebe trotzdem so weit wie möglich geschont werden kann.

### **5.2.2. Hormontherapie**

Der Wert einer routinemäßigen adjuvanten hormonellen Therapie ist nicht gesichert; eine Indikation besteht in der Regel nur für das metastasierende Mam-

makarzinom. Da bei einem hohen Anteil der Mammakarzinompatientinnen die Karzinomzellen hormonabhängig (Östrogenabhängig) wachsen, besteht das Grundprinzip der hormonellen Therapie darin, die Östrogenkonzentration durch Hemmung der Östrogenbildung oder Reduzierung der Östrogenmenge im Tumorgewebe zu erniedrigen. Daher sind die ablativen (Eingriffe am hormonproduzierenden Organ) und die additiven (Zugabe von Hormonen) Verfahren zu unterscheiden.

### **Ablative Verfahren**

Ovarektomie: Sie ist indiziert bei allen Frauen in der Prämenopause sowie in den ersten 5 Jahren der Postmenopause, wenn eine endokrine Restfunktion der Ovarien nachweisbar ist und ein positiver Östrogen-und Progesteronrezeptor-Status vorliegt. Die Ansprechrate liegt bei rezeptorpositivem Status bei ~ 60 %, bei Rezeptornegativität nur bei 3 %.

Adrenalektomie: Die Adrenalektomie ist indiziert bei allen Patientinnen, die im metastasierenden Stadium des Mammakarzinoms nach der Ovarektomie eine Remission der Erkrankung hatten; die Ansprechrate bei rezeptorpositivem Befund liegt bei ca. 50 %.

Hypophysektomie: Eine Indikation zur Hypophysektomie ist nur bei Patientinnen, die bei erfolgreich primärer endokriner Therapie (Ovarektomie) eine Remission zeigten, gegeben. Die Remissionsrate bei rezeptorpositivem Befund liegt bei ca. 50 %. Keine Indikation zur Hypophysenektomie besteht bei bereits vorhandenen viszerale Metastasierungen.

### **Additive Verfahren:**

GnRH-Analoga: Unterdrückung der körpereigenen Gonadotropinbildung in der Hypophyse und damit Senkung der Östrogenproduktion.

Gestagen-Therapie: Verminderung der Östrogenbildung und Abnahme der Östrogenrezeptoren am Tumor. Indikation: Patientinnen in der Menopause bei Nebenwirkungen einer Östrogen- oder Androgen-Therapie.

Androgene und Anabolika: Indikation: Patientinnen in der Postmenopause, Rezeptorstatus positiv. (Seltene Anwendung)

Antioestrogene: Hemmung der Östrogenrezeptoren an den Karzinomzellen.

Aromatasehemmer: Aromatase ist ein wichtiges Enzym (Vorkommen in Eierstöcken, Muskulatur, Fettgewebe und auch in den Brustkrebszellen) für die Östrogen-Produktion. Eine Hemmung der Enzymaktivität führt zu einer starken Senkung des Östrogen-Spiegels im Blut.

### **5.2.3. Antikörpertherapie**

Der menschliche Organismus wehrt sich gegen Tumorzellen mit Hilfe seines Immunsystems, dem B- und T-Zellen -System. Diese Immunzellen erkennen auf der Oberfläche körperfremder oder veränderter Zellen charakteristische Eiweißstrukturen. Beim Mammakarzinom sind in 25-30% der Karzinompatientinnen diese charakteristischen Eiweißstrukturen in Form von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, genannt HER2 (Human Epidermal Wachstumsfaktor-Rezeptor Nr. 2), vorhanden. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Wachstum der Tumorzellen. Die HER2 – Antikörper (Herceptin /Handelsname Trastuzumab) blockieren diese Rezeptoren, so dass die Tumorzellen noch kaum Wachstumssignale empfangen und absterben. Voraussetzung ist eine erhöhte Konzentration von HER2 im Tumorgewebe.

### **5.2.4 Chemotherapie**

Die Entscheidung zu einer adjuvanten Chemotherapie ist abhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknoten. Hier besteht ein Risikoanstieg bei mehr als 3 befallenen axillären Lymphknoten. Wichtig erscheint auch der Rezeptorstatus. Bei negativem Lymphknotenbefall und positivem Rezeptorstatus (5 Jahre, Heilungsrate ca. 80 %) ist eine prophylaktische Therapie nicht erforderlich.

Bei einem Befall von 1-3 Lymphknoten mit negativem oder positivem Rezeptorbefund, prä- oder postmenopausal, läßt sich möglicherweise das Therapieergebnis verbessern. Östrogenrezeptornegative Mammakarzinome haben eine höhere Proliferationsrate als östrogenrezeptorpositive. Sie reagieren besser auf eine adjuvante Chemotherapie.

Patientinnen mit viszeralen Metastasen, kurzen tumorfreien Intervallen, mit exensivem Tumorausmaß und Patienten mit Rezidiven nach erfolgter Chemotherapie sprechen auf eine weitere Chemotherapie nicht gut an.

Chemotherapieverfahren: Einzelgabe oder Kombinationen von Chemotherapeutika: z.B. Cyclophosphamid(C), Methotrexat (M), 5-Fluorouracil (F), Doxorubicin = Adriamycin (A), Epirubicin (E), ferner noch Prednison, Vincristin etc.

Kombinationen sind abhängig vom Tumorausmaß, Tumoransprechbarkeit und Verträglichkeit durch den Patienten. Standard-Zytostase: CMF oder AC / EC.

### **5.2.5 Lokalrezidive und Spätmetastasen**

Lokalrezidive und Fernmetastasen können in jedem Stadium der Erkrankung nach chirurgischer Therapie auftreten und zwar noch nach 20 Jahren. 90 % zeigen sich jedoch innerhalb der ersten 5 postoperativen Jahre. Die weitere Prognose ist schlecht. Ein Lokalrezidiv sollte immer exstirpiert und der Rezeptorstatus erneut überprüft werden. Falls möglich, sollte eine Nachbestrahlung erfolgen, die adjuvante hormonelle oder zytostatische Therapie richtet sich nach dem vorangegangenen Therapiekonzept. Solitäre Metastasen eines Mammakarzinoms im Gehirn, in der Lunge oder in der Leber sollten operativ entfernt werden. Falls eine Operation nicht möglich ist (Skelettmastasen), ist eine Strahlentherapie indiziert.

## **5.3 Tumornachsorge**

Ziel der Tumornachsorge bei der Erkrankung an einem Mammakarzinom ist die individuelle Therapieführung zur Verbesserung der Lebensquantität und insbesondere der Lebensqualität. Im Vordergrund steht die Überwachung der Karzinomkranken zur Früherkennung von Metastasen, zur Früherkennung von Zweittumoren (insbesondere in Ovarien, Endometrium und Colon) und zur Früherkennung von eventuellen pathologischen Folgen der durchgeführten Mammakarzinomtherapie. Durch entsprechend frühzeitige Kenntnis ist die Einleitung einer sofortigen, gezielten Therapiemaßnahme möglich, um die Erhaltung einer möglichst guten Lebensqualität zu erreichen.

Onkologische Leitlinien zur Tumornachsorge regeln eine umfassende Überwachung der betroffenen Patienten. Wichtig ist eine regelmäßige klinische Untersuchung mit gezielter Anamnese (neue Beschwerden etc.), körperlicher Untersuchung (Kontralaterale Mamma, Skelett, Lymphsystem, Genitalorgane etc.) und Zusatzuntersuchungen (ggf. Laborchemie, Sonographie, Mammographie, Röntgen Thorax, etc.).

## 6. TUMORBIOLOGIE und DNA-ZYTOMETRIE

### 6.1. Theoretische Grundlagen

In der Mitotischen Ruhephase beinhalten die menschlichen Zellkerne , abgesehen von den Zellen der Gonaden, je 2 x 23 Chromosomen aufgeteilt in 2 x 22 Autosomen und 2 Heterosome (= Gonosomen: xx beim weiblichen, xy beim männlichen Geschlecht). Entsprechend einem doppelten Chromosomensatz wird dieser als diploid oder abgekürzt als 2c bezeichnet.

Im Verlauf eines Zellzyklus unterliegt der DNA-Gehalt einer Zelle typischen Veränderungen. So findet sich in der Synthesephase (S-Phase), unmittelbar vor der Zellteilung in der G2-Phase ein DNA-Gehalt ein tetraploider Chromosomensatz (4c).

In manchen Geweben kommt es zu einer regelhaften Vervielfachung des Chromosomensatzes im Sinne ganzzahliger Potenzierungen des 2c-Wertes  $2^n c$  ( $n = 1, 2, 3, 4, \dots$ ). Diesen Vorgang einer physiologischen euploiden Polyploidisierung findet sich beispielsweise in Schilddrüsenepithelien, Samenblasenepithelzellen, Urothelzellen, Hepatozyten (Sandritter 1981), ferner bei einer Reihe gutartiger Tumoren, als Folge zytologisch nachweisbarer Virusinfekte sowie nach Strahlen- oder zytostatischer Therapie.

Numerische oder strukturelle Abweichungen normaler (euploider) Chromosomensätze, meßbar am veränderten DNA-Gehalt der Zellen, bezeichnet man als Aneuploidie.

Diese Form der Chromosomenaberration ist bei 1-2% aller Erbzellen vorhanden. Und nur eine geringe Anzahl dieser aneuploiden Chromosomenstörungen erlauben ein Überleben der befruchteten weiblichen Keimzelle. Jede 2. fetale Chromosomenaberration wird als Abort abgestoßen. Die einzige Monosomie, die überlebens-

fähig ist, ist das Ulrich Turner-Syndrom (häufigster Typ: 45,XO). Bei den Hyperploidi-Syndromen sind das Klinefelter-Syndrom (häufigster Typ: 47 XXY), das Triple Syndrom (häufigster Typ: 47 XXX) und die Trisomie 21 oder DOWN-Syndrom (hierbei findet sich ein triploider Satz des Chromosoms 21 in jeder Körperzelle und somit eine aneuploide Chromosomenstörung, die zu entsprechenden Mißbildungen führt) zu nennen.

Auffallend ist, dass sich nicht nur bei angeborenen Chromosomenstörungen, sondern auch bei malignen Tumoren ebenfalls isolierte numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen feststellen lassen.

Zellbiologisch gilt der Nachweis dieser chromosomalen DNA-Aneuploidie als Beleg für Neoplasie, wobei der Nachweis eines jeweils tumorspezifischen Ausmaßes ein Maß für Malignität darstellt (Heim 1987). Ist DNA-Aneuploidie jedoch nicht nachweisbar, erlaubt dies in keinem Falle einen Umkehrschluß. Ionisierende Strahlung und Zytostase können ebenfalls eine Aneuploidie bedingen, vermögen allerdings in der Regel nicht eine ganze Population proliferierender Zellen zu verändern. Entsprechende Therapiemaßnahmen sollten jedoch im Rahmen einer zytologischen Analyse berücksichtigt werden (Böcking u. et al. 1993).

Tumorentstehung und –progression sind grundsätzlich mit einer Zunahme chromosomaler Veränderungen verbunden (Füzesi 1993). Diese Veränderungen der Chromosomenaberrationen können qualitativ durch die Zytogenetik und quantitativ durch die DNA-Zytometrie verifiziert werden. Hierbei werden bezüglich ihres sequentiellen Auftretens der Aberrationen in der Tumorprogression, der Spezifität der beteiligten Chromosomen und der Bewertung der prognostischen Bedeutung die vorliegenden Chromosomenaberrationen in primäre, sekundäre und tertiäre eingeteilt. Die für einen Tumortyp charakteristischen sekundären, sowie unspezifischen tertiären Chromosomenaberrationen stellen hierbei die biologische Grundlage der DNA-Zytometrie dar (Füzesi 1993).



Die *primäre chromosomale Aberration* stellt eine für den jeweiligen Tumortyp charakteristische Veränderung des einzelnen Chromosoms dar. Sie ist eng mit einer Tumorentstehung vergesellschaftet und markiert den Beginn der Tumorprogression. Sie entzieht sich allerdings, aufgrund der nur geringfügigen Abweichung des Netto-DNA-Gehaltes der Zelle, zumeist der histologischen und zytologischen Beurteilung (Füzesi 1993).

Bei den primär chromosomalen Aberrationen unterteilt man humane Tumoren in zwei Gruppen (Füzesi 1993): 1. Lympho- bzw. hämatopoetische Tumoren und 2. solide Tumoren. Solide Tumoren zeigen als primäre Aberrationen in der Regel tumorspezifische Deletionen eines bestimmten Chromosoms, die meisten Leukosen Translokationen. Deletion und Translokation gehören zu den bestuntersuchten genetischen Mechanismen, bei denen in neoplastischen Zellen die Umverteilung von Genmaterial nachgewiesen werden konnte (Zech 1994).

*Sekundäre chromosomale Aberrationen* betreffen unterschiedliche Chromosomen, die zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorprogression mit gewisser Regelmäßigkeit aktiviert werden. Die dann vorhandenen chromosomalen Vermehrungen und Verluste sind durch ihren Nettoeffekte auf den zellulären DNA-Gehalt dann auch meist zytometrisch nachweisbar.

*Tertiäre chromosomale Aberrationen* unterliegen keiner Regelmäßigkeit und können bei allen Chromosomen auftreten. Sie sind durch zumeist chromosomale Vermehrungen und Verluste in späten Phasen der Tumorprogression, d.h. im Endstadium der Tumorerkrankung, gekennzeichnet.

## 6.2. Grundlagen der DNA-Zytometrie

Durch die DNA-Zytometrie werden die Netto-DNA-Veränderungen quantitativ gemessen (Bollmann 1990, 1991, 1992). DNA-Aneuploidie ist dabei das zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie (Böcking 1993).

Die zytogenetischen Veränderungen menschlicher Tumoren werden danach unterschieden, in welcher Phase der Tumorprogression sie auftreten. So bedingen primäre chromosomale Aberrationen spezifische Veränderungen für den Tumortyp, z. B. Deletionen oder Translokationen. Diese Veränderungen reduzieren den Netto-DNA-Gehalt der Tumorzellen in der Regel um weniger als 5% und sind somit zytometrisch von normalen Zellen nicht zu unterscheiden. Als Beispiel solcher primären chromosomalen Aberrationen soll das „Philadelphia Chromosom“ für die chronisch myeloische Leukämie oder die Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 3 für Nierenzellkarzinome angeführt werden.

Sekundäre und/oder tertiäre chromosomale Aberrationen zeigen hingegen DNA-zytometrisch meßbare Auswirkungen. Sekundäre Aberrationen beinhalten meistens spezifische strukturelle oder numerische chromosomale Veränderungen. Sie sind zusammen mit den tertiären chromosomalen Aberrationen für die Lage der DNA-Stammlinie der Tumorzellen verantwortlich. Tertiäre chromosomale Aberrationen kommen in den späten Phasen der Tumorprogression regellos vor. Sie treten im Rahmen der genetischen Instabilität auf und verursachen eine hohe Variabilität des DNA-Gehaltes der Tumorzellen. DNA-zytometrisch manifestieren sich die meisten sekundären und tertiären chromosomalen Veränderungen in einem statistisch signifikanten DNA-Gehalt der Zellen, abweichend von gesunden Referenzzellen. Der Nachweis dieser DNA-Aneuploidien ist als früher Marker für prospektive Malignität bei cancerösen Veränderungen anzusehen. Während der weiteren Tumorprogression kommt es dann gleichzeitig oder nacheinander zu einer zunehmenden Chromosomenvermehrung oder zu einem zunehmenden Chromosomenverlust, somit zu aneuploiden Polyploidisierungen.

Die geschichtlichen Grundlagen für die heutige Durchfluß-Zytometrie (flow-Cytometrie) bilden zum einen die Fluoreszenz-Zytophotometrie mit entsprechender zellkernspezifischer Färbung nach Feulgen (1924), zum anderen die Durchfluß-Zytometrie im Rahmen der Zählung von roten Blutkörperchen durch Moldovan (1934). Die Kopplung beider Meßverfahren gelangen Dittrich und Göhde 1969 mit ihrem Impulsfluorometer.

Die DNA-Durchflußzytometrie ermöglicht die Messung einer großen Anzahl von Zellen innerhalb weniger Minuten. Hierfür werden die Zellen eines zu untersuchenden Präparates zunächst durch enzymatische und mechanische Verfahren in Lösung gebracht. Dies erklärt die Unbrauchbarkeit histologischer und zytologischer Standardpräparate. Durch Untersuchung einer großen Anzahl von Zellen wird eine genaue Bestimmung der Tumorstammlinie möglich, diese wiederum erlaubt eine konkrete Aussage über Ploidie oder Aneuploidie der Stammlinie. Von Nachteil ist hierbei die fehlende Möglichkeit der morphologischen Identifikation und Klassifizierung der Zellen, so können gezielte Messungen an der Einzelzelle zur Differenzierung der Tumorzellen von Lymphozyten, Granulozyten, Bindegewebs- und anderen Zellen nicht erfolgen. Weitere Nachteile dieses Verfahrens sind die Anfälligkeit für Artefakte (sog. Hintergrundrauschen), sowie die fehlende Möglichkeit, eine vermessene Zelle oder ein Artefakt wiederholt messen oder visuell überprüfen zu können.

Die heute übliche computergestützte bildanalytische DNA-Zytometrie basiert auf den Arbeiten von Auffermann u. Mitarb. (1984), Böcking (1990) und Tosi et al. (1989). Sie erfolgt an zytologischen Standardpräparaten, kann daher im Rahmen der zytologischen Routinediagnostik genutzt werden und erspart dem Patienten bei histologischer Aufarbeitung und Umfärbung nach Feulgen weitere Gewebeentnahmen. Die moderne DNA-Bildzytometrie mittels Mikroskop und TV-Bildanalyzesystem ist in der Lage einzelne Zellen gezielt zur Messung auszusuchen (Cursor) und morphologisch zu identifizieren. Das Softwareprogramm vermag dann eigenständig die Struktur des Zellkerns zu erkennen. Durch Vergleich mit den Werten individueller und gewebsspezifischer Referenzzellen erfolgt eine vergleichende Messung der Zellkerne einer Zellpopulation. Hierbei wird zusätzlich

die separate Messung eng benachbarter oder sich berührender Zellkerne erleichtert. Nachteile dieses Verfahrens gegenüber der Flow-Zytometrie liegen in der geringeren Anzahl meßbarer Zellen sowie in dem größeren Zeitaufwand.

Per Definitionem ist Aneuploidie in der DNA-Zytometrie gegeben, wenn ein Zellkern keinem euploiden oder polyploiden Chromosomensatz entspricht. Chromosomale Aneuploidie ist ein Phänomen der einzelnen Zelle. Somit kann eine geringfügige Abweichung der Zellkern-DNA im Vergleich mit Referenzzellen nur durch Messung mehrerer hundert verdächtiger Zellen bewiesen werden. Läßt sich ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen, so kann DNA-Aneuploidie angenommen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Stammlinieninterpretation“ (Sandritter u. Carl 1966; Fu u. Mitarb. 1981; Böcking 1990). Verglichen werden hierbei Fraktionen in der  $G_{0/1}$ -Phase der Referenz- und Analysezellen (Kolmogorow-Smirnow-Test). Aneuploidie liegt dann vor, wenn ein hochsignifikanter Unterschied resultiert. Zeigt sich eine gering ausgeprägte chromosomale Aneuploidie kann sie an der Einzelzelle nicht nachgewiesen werden, da die Zunahme an DNA pro Zellkern nur ca. 4,3 % beträgt, entsprechend 2,08c. Die Analyse einer großen Anzahl von Tumorzellen erlaubt hingegen eine statistische Signifikanz aufzuzeigen.

Als „rare Events“ werden wenige, aber eindeutig Malignität-beweisende Zellen bezeichnet. Sie entgehen diesem o.g. Interpretationsmodus. Prinzipiell kann aber die Diagnose der Neoplasie schon bei einer einzigen, DNA-zytometrisch eindeutig als aneuploid identifizierte Zelle berechtigt sein (Smeets 1987). Um nun aber sowohl eine letale Mutation dieser Einzelzelle auszuschließen, als auch dem DNA-Gehalt von 4c bei Zellen in der Mitosephase - methodische Fehler berücksichtigend - gerecht zu werden, wurde die Zahl von drei oder mehr aneuploiden Zellen mit einem DNA-Gehalt  $\geq 5c$  als diagnostischer Grenzwert für den Beweis einer Neoplasie eingeführt und hat sich nachfolgend als diagnostisch relevant erwiesen. Entscheidend ist dabei nicht der Prozentsatz an Zellen  $\geq 5c$ , sondern ihr absolutes Vorkommen. Dies beinhaltet, dass Zellen mit einem DNA-Gehalt  $\geq 5c$  in einem Präparat zur Dignitätsdiagnose regelrecht gesucht werden dürfen. Dabei sollten

insbesondere morphologisch oder von der Farbintensität auffällige Zellen ausgewählt werden. Der entsprechende Index wird nach Böcking „5c-Exceeding-Events (5cEE) bezeichnet (Böcking 1990). Diese „Einzelzell-Interpretation“ von DNA-Aneuploidie ist nur bei Geweben ohne euploide Polyploidisierung sinnvoll. Es lassen sich damit größere chromosomale Aneuploidien nachweisen, die aber nur in sehr wenigen Zellen nachweisbar sein müssen. Dieser Interpretationsmodus ist vergleichsweise zwar unspezifisch, aber sehr sensitiv (Böcking u. Mitarb. 1990).

Die DNA-Zytometrie vermittelt eine Reihe von erfaßten Daten, deren Aussage sich mittels folgender Indizes charakterisieren läßt:

### **6.2.1. DNA-Diagnose (Ploidie)**

Die DNA-Stammlinie, die den Modalwert einer Zellpopulation, d.h. den am häufigsten vorkommenden Wert darstellt, ist die Grundlage für die Interpretation der Aneuploidie eines Tumors. Bei der Interpretation der Stammlinien werden viele Zellen gemessen (Sandritter u. Carl 1966). Liegt der ermittelte Wert - der sogenannte Modalwert - im Bereich von  $2c \pm 2 \times CV$  ( $CV$ =Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation), so liegt „Euploidie“ vor. In allen anderen Fällen handelt es sich um „Aneuploidie“.

### **6.2.2. DNA-Index (DI)**

Die DNA-Ploidie entspricht den numerischen chromosomalen Aberrationen; diese Abweichung des gemessenen DNA-Gehaltes vom normalen DNA-Gehalt wird durch den DNA-Index (DI) ausgedrückt (Hiddemann u. Mitarb. 1984). Der DI ist das Verhältnis des Modalwertes der gemessenen Zellpopulationen zu dem der Referenzzellen und definiert somit die Lage der sogenannten Stammlinie. Ein DI von 1 entspricht also einer Stammlinie bei  $2c$ , ein DI von 2,5 einer Stammlinie bei  $5c$ . Das Auftreten weiterer Nebengipfel wird als Stammlinienheterogenität bezeichnet und spiegelt eine zunehmende chromosomale Instabilität bzw. Heterogenität wieder. Die Methode der Stammlinieninterpretation ist sehr spezifisch, allerdings von einer gro-

ßen Anzahl entsprechend veränderter Zellen abhängig. Eine geringe Zellzahl mit chromosomalen Veränderungen kann diesem Interpretationsmodus entgehen.

### **6.2.3. DNA-Malignitätsgrad (DNA-MG):**

Da für den Kliniker die Varianz der DNA-Werte um den Normalwert von  $2c$  ( $2c$ -Deviationsindex =  $2cDI$ ) als prognostischer Index zu abstrakt ist, führten Böcking et al. 1984 eine logarithmische Umrechnung des  $2c$ -Deviationsindex in die Skala eines DNA-Malignitätsgrades (DNA-MG) ein, die von 0 bis 3 reicht. Bei dieser Umrechnung wird die niedrigst denkbare Varianz von 0 als DNA-Malignitätsgrad 0 gesetzt und der höchste beobachtete Wert (eines Osteosarkoms) von 51 als DNA-Malignitätsgrad 3,0. Dabei kommt folgende Formel zur Anwendung:

$$\text{DNA-MG} = 3 \times \lg(2cDI + 1) / \lg 51 = 1,757 \times \lg(2cDI + 1)$$

Die prognostische Relevanz dieses DNA-Malignitätsgrades wurde bisher von Böcking et al. für maligne Lymphome, das Kehlkopf-, Prostata-, Mamma- und Harnblasenkarzinom in follow-up-Studien statistisch belegt. Darüber hinaus zeigte der DNA-Malignitätsgrad ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Repräsentativität und erwies sich als guter, von anderen Parametern unabhängiger Prädiktor für einen Lymphknotenbefall beim Mammakarzinom (Böcking et al., 1989 a).

### **6.2.4. Auer-Klassifikation**

Der Ploidie-Wert jeder gemessenen Zelle wird in einem Koordinatensystem eingetragen und als DNA-Histogramm bezeichnet. Auer und Mitarbeiter stellten eine quantitative Histogrammauswertung in 4 Typen (Typ I-IV) vor, die sich als prognostisch signifikant erwies (Auer et al., 1980).

Die folgenden Abbildungen sollen der Veranschaulichung der einzelnen Auer-Histogrammtypen dienen:

Nach dieser Klassifikation ist der **Typ I** durch eine einzelne Säule von modalen DNA-Werten nahe um den diploiden Chromosomensatz von normalen Zellen charakterisiert.

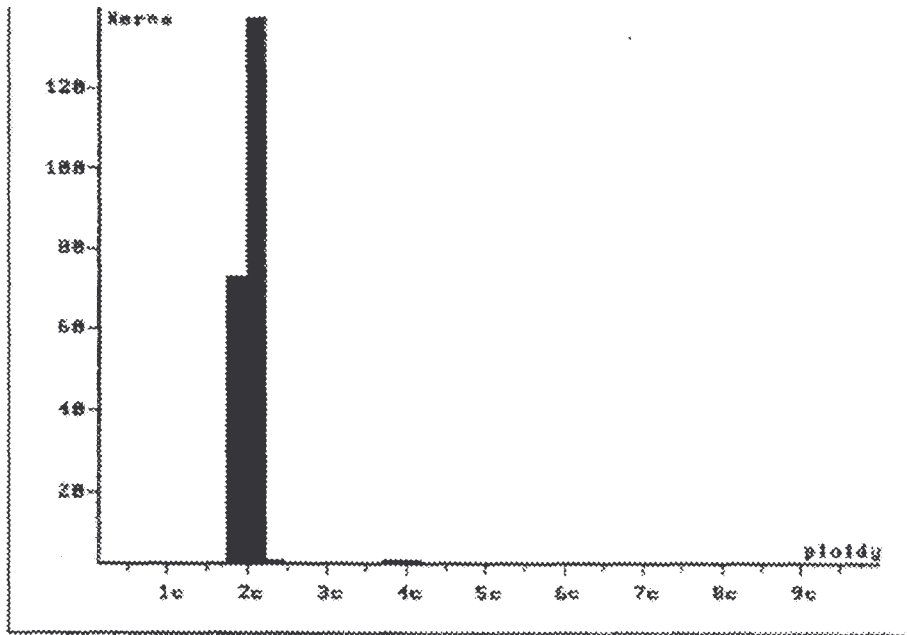


Abb. 2: DNA-zytometrisches Histogramm vom Auer Typ I

Der **Typ II** zeigt entweder eine einzelne Säule im tetraploiden Bereich (4c) von normalen Zellen (1.Variante) oder zwei klar abgrenzbare Säulen bei 2c und 4c, wobei nur wenige der gemessenen Zellen (< 5 %) zwischen den beiden Säulen zu finden sind, entsprechend den DNA-Werten von normalen Zellen in der DNA-Synthesephase (2.Variante).

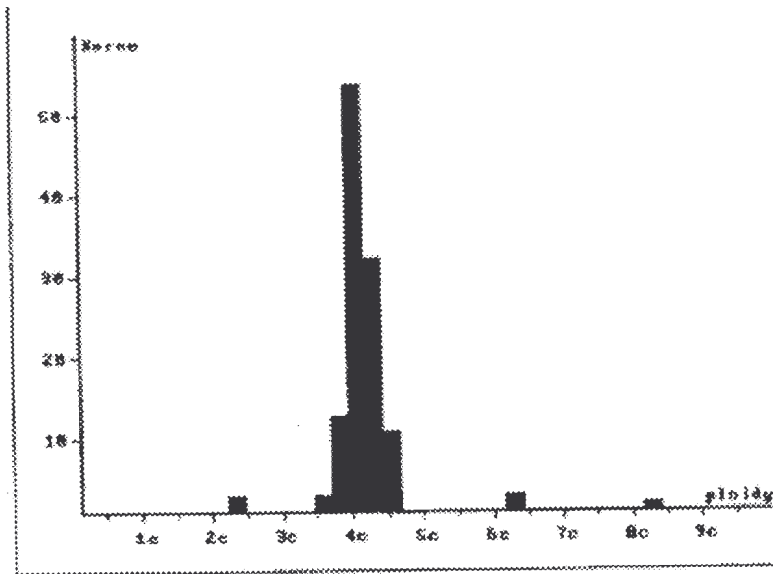


Abb. 3: DNA-zytometrisches Histogramm vom Auer Typ II (1. Variante)

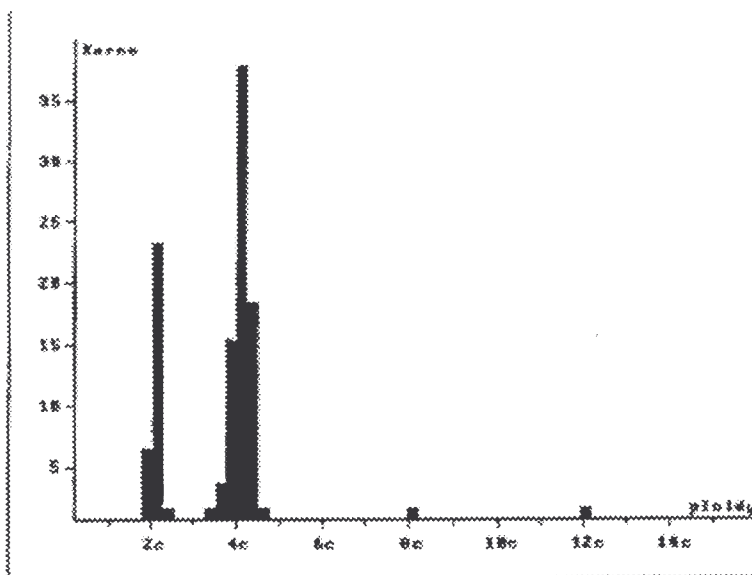


Abb. 4: DNA-zytometrisches Histogramm vom Auer Typ II (2. Variante)

Der **Typ III** ist charakterisiert durch zwei Säulen von Werten im Bereich von 2c und 4c, unterscheidet sich jedoch von Typ II dadurch, dass mehr Zellen (> 5%) mit einem DNA-Gehalt ähnlich dem von normalen Zellen während der DNA-Synthesephase zwischen 2c und 4c angesiedelt sind.



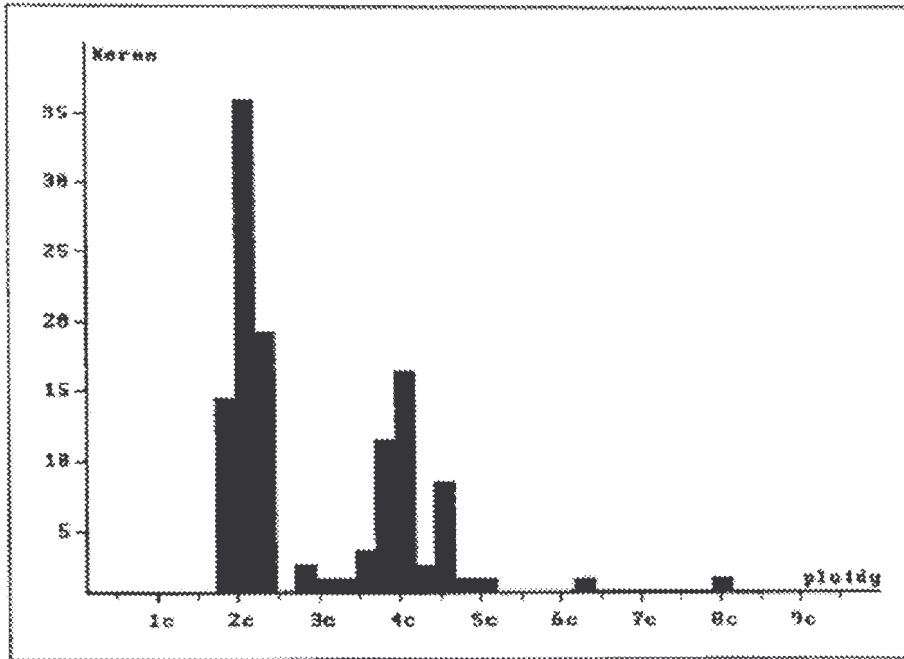


Abb. 5: DNA-zytometrisches Histogramm vom Auer Typ III

Der **Typ IV** ist durch ein Nebeneinander von Zellen unterschiedlichster Ploidie gekennzeichnet. Dabei treten oft DNA-Modalwerte jenseits des tetraploiden Chromosomensatzes auf, und das Histogramm zeigt ein irreguläres Bild, das auch als „skyline“ bezeichnet wird.

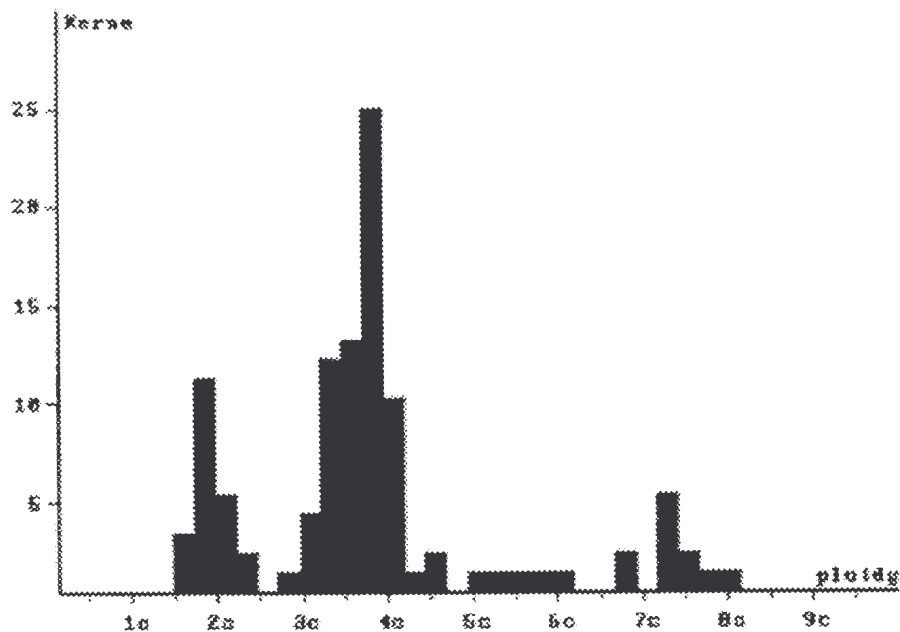


Abb. 6: DNA-zytometrisches Histogramm vom Auer Typ IV

Typ I und II entsprechen einer Verteilung der DNA-Werte im diploiden/tetraploiden Bereich und werden daher auch als euploid zusammengefaßt, wohingegen Typ III und IV als aneuploide Tumoren klassifiziert werden.

### **6.3. DNA-Zytometrie und ihre klinische Bedeutung**

Bezüglich der Bewertung von Dysplasien ist die Bedeutung der DNA-Zytometrie zunehmend. Nach Böcking (1993) stellen Dysplasien keine Krankheitsidentität dar, die Diagnose dokumentiert vielmehr die Unsicherheit morphologischer Kriterien, in manchen Fällen zwischen benignen und malignen Phänotypen von Zellen zu unterscheiden. Verschiedene Schweregrade von Dysplasien entsprechen somit weniger verschiedenen Phasen der Tumorprogression, als vielmehr verschiedenen Wahrscheinlichkeiten, mit denen sich aus den betreffenden Läsionen ein morphologisch manifestes Karzinom entwickeln wird (Böcking u. Mitarb. 1993).

Die DNA-Zytometrie läßt auf zusätzliche Informationen zur Abklärung von Dysplasien und Borderline-Läsionen verschiedener Gewebe mit dem Ziel der prospektiven Identifikation eventueller Malignität hoffen. So vermag die Feststellung einer DNA-Aneuploidie im Mittel bereits zwei Jahre vor der histologischen und zytologischen Nachweisbarkeit einer malignen Gewebsalteration auf beginnende maligne Transformation hinzuweisen. Der Nachweis einer DNA-Aneuploidie entspricht daher biologisch der Erkennung eines Carcinoma in situ und verspricht somit frühzeitig bei der Aufdeckung und Bewertung einer im Gang befindlichen Transformation behilflich zu sein. So sind die Auswirkungen sekundärer Chromosomenaberrationen auf die Zellkern-DNA solider Tumoren cytometrisch nachweisbar (Füzesi 1993):

1. Geringes Absinken oder Ansteigen der DNA-Stammlinienploidie unter/oder über  $2c$ , bedingt durch Nettoverluste und/oder Vermehrungen von Chromosomenanteilen
2. Erste aneuploide Polyploidisierung der Tumorzellstammlinie mit Bildung einer zweiten Stammlinie mit doppeltem DNA-Gehalt
3. weite aneuploide Polyploidisierung mit Bildung einer dritten Tumorzellstammlinie
4. Absinken der DNA-Stammlinienploidie durch massiven Chromosomenverlust der aneuploid polyploidisierten Tumorzellen
5. Progressiver Verlust der ersten (und später zweiten) Tumorzellstammlinie

## 7. Patienten und Methoden

### 7.1. Datenerhebung

In den Jahren 1990 bis 1996 unterzogen sich 496 Patienten mit einem Mamma-Karzinom nach Diagnosestellung der notwendigen operativ-resezierenden Behandlung. Im Anschluß an die histologische Sicherung des Karzinoms wurde im Institut für Pathologie in Bonn-Duisdorf (Chefarzt Dr. med. R. Bollmann) die bildzytometrische DNA-Analyse durchgeführt. Die Einschlusskriterien bezüglich der Auswahl der Patienten waren das gleichzeitige Vorliegen einer kompletten Histologie (Tumorlokalisierung, pTNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad Grading G1-G3, Stadieneinteilung nach AJCC (American Joint Committee on cancer), Stadieneinteilung nach Auer) und der bildzytometrischen DNA-Analyse (DNA-Diagnose (Ploidität), DNA-Index, DNA- Malignitätsgrad ) beinhaltet.

Zusätzlich wurden neben den soziodemographischen Daten zu Alter und Geschlecht bei 125 Patienten aus dem Gesamtkollektiv auch der Zeitpunkt der Diagnosestellung, Diagnostizierung von Metastasen und Rezidiven, eventuelle adjuvante Therapien und der weitere postoperative Krankheitsverlauf für die vorliegende Studie ermittelt. Das Ende des Beobachtungszeitraums wurde mit „verstorben“, „Teilremission“, „Vollremission“, „Progression“ oder aber „nicht möglich abzuklären“ bezeichnet.

Die Auswertung der Daten erfolgte retrospektiv.

## **7.2. DNA-Zytometrische Untersuchungen**

### **7.2.1. Präparation und Färbung**

Die DNA-zytometrischen Messungen erfolgten an luftgetrockneten zytologischen Abklatschpräparaten, sogenannten Imprint-Präparaten, die aus tumordurchsetzten Resektatanteilen gewonnen wurden. Zur Färbung der Einzelausstriche diente die Feulgen-Reaktion. Hierbei kommt es in einem ersten Schritt unter Anwendung von Salzsäure (HCl) zur hydrolytischen Freilegung der Aldehydgruppen der DNA-Purinbasen, die in einem folgenden zweiten Schritt chemisch markiert werden. Dies gelingt durch die Anfärbung mit dem Schiffschens Reagenz nach Feulgen, welches sich quantitativ an die freien Aldehydgruppen bindet.

### **7.2.2. Messplatz und Durchführung**

Die DNA-zytometrischen Messungen erfolgten unter Benutzung des DNA-Zytophotometers. Im Rahmen der interaktiven TV-Bildanalyse wird ein über das Mikroskop und die Videokamera erzeugtes Bild in einem Rechner digitalisiert und auf dem Bildschirm zur Auswertung dargestellt. Es entstehen die sogenannten Kernbilder, die entweder direkt im Live-Bild gemessen oder markiert sowie gespeichert werden und so zu einem späteren beliebigen Zeitpunkt analysiert werden können.

Das Prinzip der Messung liegt in der digitalen Verarbeitung eines aus mikroskopischen Präparaten aufgezeichneten Bildes mit Unterstützung der mathematischen Morphologie. Bei diesem Vorgehen wird die integrierte optische Dichte von Feulgen-gefärbten Eichzellen mit einem DNA-Gehalt von  $2c$  auf die optische Dichte der auszuwertenden Zellen bezogen und so der relative DNA-Gehalt ermittelt. Als Referenzzellen dienen 20-30 ganz gezielt ausgewählte Lymphozyten oder Granulozyten, die dem gleichen Ausstrich wie die zu messenden Zellen entstammen. So ist sichergestellt, dass diese Referenzzellen derselben Anfärbung unterzogen wurden. Nach der Eichung werden ca. 250 Tumorzellen pro Präparat aufgesucht und analy-

siert. Zur Feststellung des DNA-Gehaltes erfolgt die automatische Zuteilung einer bestimmten Grauwertstufe zu jeder markierten Zelle. Diese Grauwertstufen lassen sich den verschiedenen Tumortypen angleichen. Hierdurch wird die Verfälschung des Messergebnisses verhindert, die durch Artefakte wie Schmutz- oder Zelldoubletten sowie durch nichttumoröse Zellen wie Lymphozyten, Stromazellen oder Granulozyten auftreten könnte. In diesem Verfahren liegt der besondere Vorteil der Image-Zytometrie im Vergleich zur Flow-Zytometrie. Somit ist gewährleistet, dass ein durch die bildgesteuerte DNA-Zytometrie erzeugtes Histogramm ein Ergebnis darstellt, welches ausschließlich aus Tumorzellendaten gewonnen wurde.

An eine präzise und standardisierte DNA- Zytometrie sind folgende Postulate zu richten:

- Fixation der Zellen in gepuffertem 4%-igem Formaldehyd ohne Zusatz von Essigsäure oder Alkohol. Die Zellen können bedenkenlos primär luftgetrocknet und erst nach Jahren formalinfixiert werden.
- Identische Fixation und Färbung von Referenz- und Analysezellen
- Stöchiometrische Färbung der DNA nach Feulgen unter homogener Temperatur innerhalb der Küvette mit Parafuchsin oder Thionin.
- Der Interferenzfilter für Parafuchsin muss 570 Nanometer +/- 10 Nanometer Halbwertsbreite betragen.
- Ein Ausbleichen der gefärbten Zellkerne unter dem Mikroskop ist zu vermeiden.
- Die Linearität der densitometrischen Funktion des Zytometriesystems muss  $r < 0,99$  entsprechen.
- Eine Streulicht-Reduktion soll durch Verwendung von Kondensoren niedriger Apertur (z.B. 0,25) erreicht werden.
- Eine Streulicht-Korrektur durch Software für ausreichende Messpräzision ist obligat.
- Blenden und Kondensoren des Mikroskops sind während der Messung konstant einzustellen.
- Die Lichtintensität ist dem optimalen densitometrischen Arbeitsbereich der Kamera anzugleichen.

- Es sollen Planobjektive bis maximal 40 x angewendet werden, um genügend Tiefenschärfe zu erreichen
- Zellkerne sind vor der Messung zu fokussieren.
- Die zu messenden Zellkerne sind zu klassifizieren (z.B normale versus dysplastische Zellen, Tumorzellen versus Bindegewebszellen).
- Für jede Zelle sind individuelle Detektion (Schwellenwertsetzung zur Erkennung) sowie Hintergrundkorrektur obligat.
- Es wird die Verwendung von mindestens 30 individualspezifischen Referenzzellen gefordert, der Variationskoeffizient muss unter 5 % liegen.
- Als Voraussetzung gelten Qualitätsstandards des Gerätes bei Messung derselben diploiden Zellen an 27 verschiedenen Stellen des Monitors unter optimalen Bedingungen:  $CV < 2 \%$ , bei Messung einer Population von 27 verschiedenen diploiden Zellen an 27 verschiedenen Stellen des Monitors unter optimalen Bedingungen:  $CV < 3 \%$  ( $CV = \text{Variationskoeffizient der Referenzzellpopulation}$ ).
- Die Messwerte sollen von Schwankungen der Beleuchtungsintensität unabhängig sein.
- Die gemessenen Zellkerne müssen zur Qualitätskontrolle in einer Bilddatenbank gespeichert werden, um sie bei Bedarf relokalisieren und nachuntersuchen zu können.

Diesen Postulaten wurde entsprochen. Nach Abschluss der Messung wurde das Ergebnis in Form eines DNA-Histogramms dargestellt und ausgedruckt.

In Abbildung 7 ist als Beispiel das Histogramm eines aneuploiden Tumors abgebildet. Die Stammlinie dieses Tumors liegt bei 3c. Zudem ist die Zahl der Zellen, die einen DNA-Gehalt größer 5c aufweisen, deutlich vergrößert. So kann sowohl nach der Einzelzell- als auch nach der Stammlinieninterpretationsmethode Aneuploidie angenommen werden.

Als Vergleich dazu wird in Abbildung 8 das Histogramm eines euploiden Tumors gezeigt, dessen Stammlinie bei 2c liegt, so dass auf Grund der Stammlinieninterpre-

tation Euploidie diagnostiziert werden kann. Die Einzelzellinterpretation führt zu demselben Ergebnis, da keine Zellen mit einem DNA-Gehalt von 5c oder mehr vorliegen.

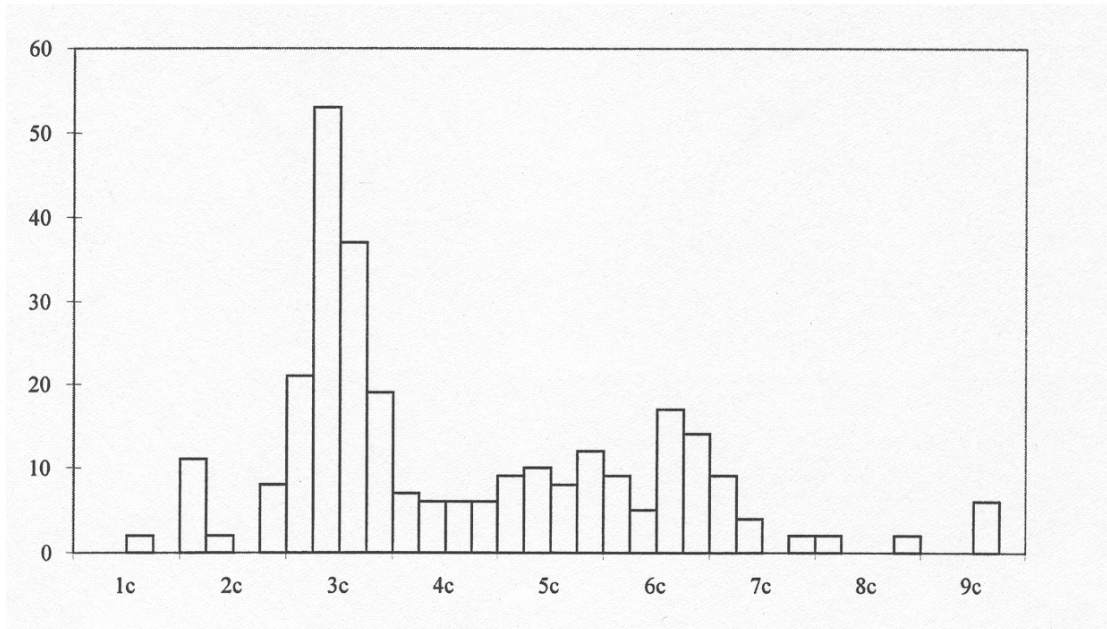


Abb.7: Histogramm eines aneuploiden Tumors

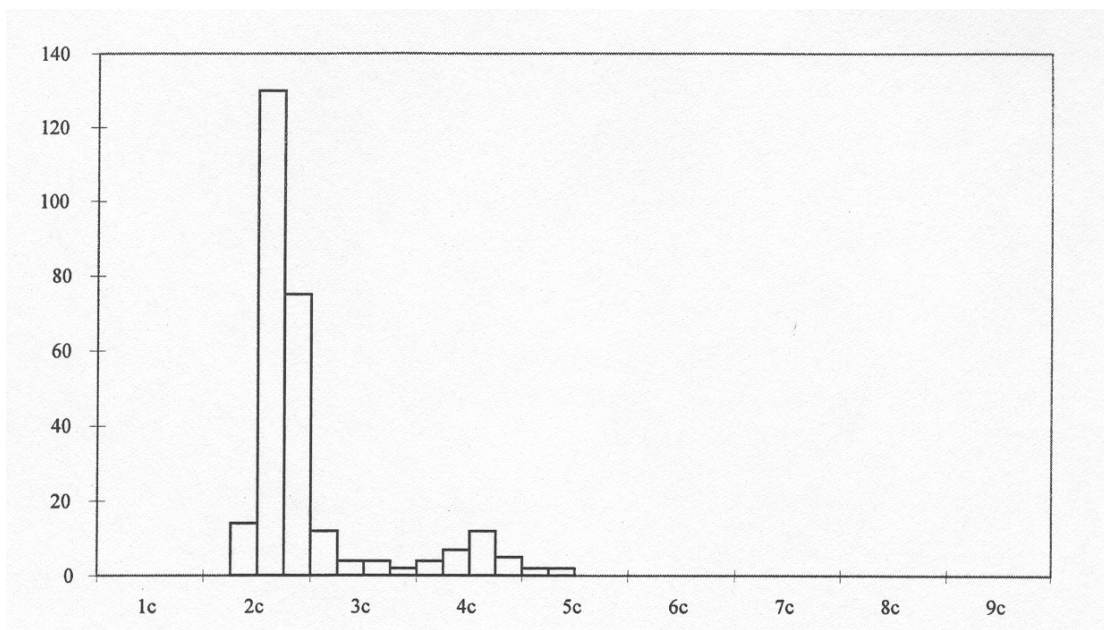


Abb.8: Histogramm eines diploiden, euploiden Tumors

Für die Studienauewertung wurden folgende DNA-zytometrisch ermittelten Daten berücksichtigt: DNA- Diagnose (Ploidität), DNA- Index und DNA- Malignitätsgrad



### **7.3. Histologische Aufarbeitung**

Die histologische Aufarbeitung der Operationspräparate wurde im Institut für Pathologie in Bonn-Duisdorf, Chefarzt Dr. med. R. Bollmann, durchgeführt. Nach entsprechender Präparation wurden dem Tumorgewebe 4-5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte entnommen. Mit Unterstützung des Stereomikroskops erfolgte nach Aufhellung die Präparation der Lymphknoten aus dem Fettgewebe. Die Resektionsränder sowie die Gegend des Gefäßresektionsrandes inklusive der Lymphknoten wurden separat eingebettet und untersucht. Gefärbt wurden die Präparate mit den histologischen Routinefärbungen HE, PAS, Evg und Masson-Trichrom. Eine immunhistochemische Färbung (z.B. Faktor VIII, Endothelmarker CD 34, Ulex), die auf einer Reaktion mit Aktin basiert, gelangte dann zur Anwendung, wenn Gefäßeinbrüche nachgewiesen werden sollten.

### **7.4. Statistik**

#### **7.4.1. Deskriptive Statistik**

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um nominal- und intervallskalierte Daten. Das qualitative Merkmal Geschlecht, Therapie, Verlauf und Ploidität stellen z. B. eine Nominalskala dar. Zu den Daten, welche einer Ordinalskala genügen, gehören die Einteilungen der histologischen Klassifikationen, TNM-Klassifikation, das Grading und die Stadieneinteilung nach AJCC und Auer. Die Daten Alter, DNA-Index, DNA-Malignitätsgrad und die Beobachtungszeiträume genügen einer Intervallskala.

Von den Maßzahlen, welche einer Intervallskala angehören, werden die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) und die Standardabweichung der Stichprobe ermittelt. Der Standardfehler des Mittelwertes

dient als Maß für die Unsicherheit der Schätzung des arithmetischen Mittelwertes. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes wird für die intervallskalierten Daten getestet, ob sie einer Normalverteilung genügen. Er berechnet die maximale Distanz zwischen den Daten und der idealen kumulierten Häufigkeit. Der p-Wert als Signifikanz dieser Abweichung entspricht der Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieses Wertes unter der Annahme, dass es sich bei den Daten um eine normalverteilte Grundgesamtheit handelt. Ein hoher p-Wert spricht also für eine Normalverteilung. Die intervallskalierten Daten Alter und DNA-Index zeigen Normalverteilung, die Beobachtungszeiträume sind nicht normalverteilt. Bei den nominal- und ordinalskalierten Daten werden die Häufigkeiten für das Vorkommen eines bestimmten Ereignisses in Absolutzahlen oder als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben.

#### **7.4.2. Statistische Methoden**

Je nach Art der Daten erfolgen die Anwendung der verschiedenen statistischen Methoden und die statistische Auswertung. Die Signifikanz wird mit dem sogenannten p-Wert angegeben, wobei ein p-Wert  $<0,05$  als schwach signifikant definiert wird,  $p < 0,01$  als signifikant und  $p < 0,001$  als hochsignifikant.

Bei den intervallskalierten Daten werden verschieden statistische Verfahren angewendet in Abhängigkeit von der Anzahl der zu vergleichenden Variablen und ob die für einige Tests bestehende Voraussetzung der Normalverteilung der Stichprobengruppen gegeben ist. Liegen zwei intervallskalierte, normalverteilte unabhängige Stichprobengruppen vor, so werden die Ergebnisse mit dem t-Test für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Sind die Varianzen der beiden Stichproben gleich (F-Test), so wird der homogene t-Test angewandt; bei Vorliegen heterogener Varianzen (Varianzen-Unterschiede der Stichproben sind im F-Test mit  $p < 0,05$  signifikant) werden die Prüfgröße  $t$  sowie die Zahl der Freiheitsgrade anders definiert und führen zu einem veränderten p-Wert, welcher für den heterogenen Fall Gültigkeit hat. Der t-Test ermittelt, ob zwischen den Mittelwerten zweier Messreihen ein signifikanter Unterschied besteht.

Um mehr als zwei Stichproben einer Messreihe, z. B. den DNA-Index der vier Stadien nach AJCC, miteinander zu vergleichen bzw. um vorab zu testen, ob zwischen den einzelnen Stichproben der Messreihe überhaupt Unterschiede zu erwarten sind, wird eine Varianzanalyse durchgeführt. Die Voraussetzungen zur Durchführung einer Varianzanalyse sind denen des t-Testes identisch, also Intervallskalierung, Normalverteilung und homogene Grundgesamtheit (Varianzgleichheit). Die Varianzgleichheit wird mittels des Barlett-Tests geprüft, welcher mit einem P-Wert unter 0,05 homogene Varianzen anzeigt. Die Varianzanalyse untersucht, ob die Mittelwerte der verschiedenen Stichproben sich unterscheiden. Liegen signifikante Unterschiede zwischen Stichproben vor, so werden Untergruppen gebildet, deren Stichproben homogen sind, d. h. deren Mittelwerte keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Signifikante Unterschiede bestehen jedoch zwischen den gebildeten Untergruppen. Sind die Voraussetzungen für die Varianzanalyse nicht erfüllt, wird die gleiche Fragestellung mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests untersucht. Es handelt sich um ein parameterfreies Prüfverfahren für mehrere Stichproben, so dass die Daten nur ordinalskaliert sein müssen. Das Testverfahren gibt Auskunft darüber, ob zwischen den Stichproben Signifikanzen zu erwarten sind oder nicht. Eine Einteilung in Untergruppen wie bei der Varianzanalyse erfolgt nicht.

Sind beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben nicht alle Voraussetzungen für den t-Test erfüllt, liegt z. B. keine Normalverteilung vor oder handelt es sich eine Ordinalskala, dann wird der Vergleich mit dem U-Test (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Der U-Test arbeitet nicht wie der effektivere t-Test direkt mit den Messwerten, sondern mit Rangzahlen, d. h. die Messwerte werden in einer gemeinsamen aufsteigenden Reihe angeordnet und mit der entsprechenden Rangzahl versehen. Die Hälfte der jeweiligen Summe der Rangzahlen beider Reihen werden die Prüfgrößen  $U_1$  und  $U_2$  ermittelt. Ist die kleinere der beiden Prüfgrößen kleiner oder gleich dem kritischen Tabellenwert  $U_0$ , so liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben vor. Es wird jedoch direkt eine Transformation auf Wahrscheinlichkeiten durchgeführt, indem der U-Wert in den Wert einer entsprechenden Normalverteilung umgerechnet wird. Bei der

Auswertung wird jeweils nur die Signifikanz  $p$  für die zweiseitige Fragestellung zur Klärung der Frage, ob ein signifikanter Unterschied besteht, herangezogen.

Die nominalskalierten Daten wurden außerdem mit Hilfe von Kreuztabellen erfasst und miteinander verglichen. Kreuztabellen sind bivariate Häufigkeitsverteilungen und ermöglichen die Erkennung von Abhängigkeiten zwischen den untersuchten Variablen bzw. eine Aussage darüber, ob zwischen den Variablen signifikante Unterschiede bestehen. Ob zwischen den untersuchten Gruppen von Variablen Abhängigkeit oder signifikant Unabhängigkeit besteht, wird mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet, welcher ein Maß für die Abweichung zwischen gemessenen und erwarteten Häufigkeitsverteilungen ist. Voraussetzung für die Anwendung des Chi-Quadrat-Testes ist, dass es sich um unabhängige Stichproben handelt, welches bei den nominalskalierten Daten der Studie in allen Fällen gegeben ist. Ist der berechnete  $\chi^2$ -Wert gleich oder größer dem festgelegten Tabellenwert  $\chi_0^2$  (3,841), so liegt Unabhängigkeit der verglichenen Variablen vor. Hat die Prüfgröße  $\chi^2$  einen Wert  $\geq 3,841$ , so liegt mit  $p < 0,05$  ein signifikanter Unterschied zwischen den Variablen vor. Je höher der  $\chi^2$ -Wert, desto kleiner ist der  $p$ -Wert und desto höher ist entsprechend die Signifikanz. Außerdem wird der Kontingenzkoeffizient und Cramer's  $V$  ermittelt als Maß für den Grad der Abhängigkeit der untersuchten Variablen, wobei der Wert 0 völlige Unabhängigkeit und der Wert 1 strenge Abhängigkeit bedeutet. Besteht die Kreuztabelle nur aus 2 x 2 Variablen (Vierfeldertafel) wird zusätzlich der Fisher's Exact-Test durchgeführt, welcher genauer als der Chi-Quadrat-Test ist. Für  $p < 0,05$  gilt im Fisher's Exact-Test Unabhängigkeit bzw. signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Variablen.

Bei der Berechnung der Mittelwerte der Nachbeobachtungszeit wird die Tatsache nicht berücksichtigt, dass bei einigen Patienten die tatsächlichen Überlebenszeiten, d. h. der Zeitraum ab operative Sanierung des diagnostizierten Mamma-Karzinoms bis zum Exitus letalis wesentlich länger ist, da diese Patienten zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch leben. Die für einzelne Gruppen berechneten Mittelwerte der Überlebenszeiten können somit nur Tendenzen aufzeigen

und dürfen in ihrer Aussagekraft nicht überbewertet werden. Auch bei den bislang erwähnten statistischen Methoden fließt diese Tatsache nicht mit ein. Die Survivalanalyse nach Kaplan-Meier hingegen berücksichtigt bei der Auswertung der Daten diese Tatsache und hat somit einen wesentlich höheren Aussagewert. Sie ist das wichtigste statistische Verfahren dieser Studie. Mit ihr werden die Wahrscheinlichkeiten für die Überlebenszeiten für die jeweilige Variable, z. B. mit oder ohne adjuvante Nachbehandlung, berechnet. Die Kaplan-Meier-Methode berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind. Jedem Patienten wird zugeordnet, ob das Ereignis „tumorbedingt verstorben“ eingetreten ist oder nicht. Die Wahrscheinlichkeit am Tage  $x$  berechnet sich als der Anteil überlebender bzw. nicht am Tumor verstorbenen Patienten von den beobachteten Patienten.

## 8. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden 125 bzw. 469 Patientinnen mit einem Mammakarzinom retrospektiv untersucht. Neben den soziodemographischen Daten des Alters zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden bei 125 Patientinnen folgende Parameter erfasst: Anhand der histologischen Aufarbeitung der Operationsresektate erfolgte die Einteilung in die TNM-Klassifikation und das Grading (Differenzierungsgrad G1-G3) sowie die Einteilung in die Stadien nach AJCC. Außerdem erfolgte eine DNA-zytometrische Untersuchung des Resektates mit Bestimmung der Ploidität, des DNA-Index und des DNA-Malignitätsgrades sowie die Einteilung in die DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer.

Retrospektiv wurden dann noch der Zeitpunkt der Diagnosestellung, das Ende der Beobachtungsphase mit Ermittlung des Status „Vollremission“, „Progression“ oder „verstorben“ erhoben. Der Beobachtungszeitraum betrug einen Monat bis acht Jahre, je nach Zeitpunkt der Erstdiagnose und Verlauf. Es wurde zusätzlich festgehalten, ob eine adjuvante Nachbehandlung in Form einer Strahlentherapie oder Chemotherapie durchgeführt wurde.

Bei 469 Patientinnen wurden ausschließlich folgende anhand der Aufarbeitung des Operationsresektates gewonnenen Informationen erfasst : Die Einteilung in die TNM-Klassifikation, das Grading (Differenzierungsgrad G1-G3), die Einteilung in die Stadien nach AJCC, die Bestimmung der Ploidität, des DNA-Index und des DNA-Malignitätsgrades sowie die Einteilung in die DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer. Diese Ergebnisse werden lediglich bezüglich der Aussagekraft der DNA-Zytometrie im Vergleich zu den histopathologischen Klassifikationen im Kapitel „DNA- Zytometrie“ bewertet.

## 8.1. Soziodemografische Daten

Das mittlere Alter der 125 Patientinnen lag bei 57,2 ( $\pm 1,4$ ) Jahren, wobei die jüngste Patientin 21 Jahre und die älteste Patientin 86 Jahre alt waren. Tabelle 3 und Abbildung 9 zeigen die Altersverteilung der Gesamtgruppe bezogen auf die Altersklassen mit einer Klassenbreite von 10 Jahren. In der Altersklasse der 51- bis 60-jährigen Patientinnen ist das Mammakarzinom mit 35,2 % am häufigsten.

Altersklasse (Jahre)	Häufigkeit (Anzahl N)	Relative Häufigkeit (%)
21-30	2	2,3
31-40	7	8,0
41-50	15	17,0
<b>51-60</b>	<b>31</b>	<b>35,2</b>
61-70	19	21,6
71-80	13	14,8
81-90	1	1,1
Gesamt	88	100,0

Tab.3: - Häufigkeit des Mammakarzinoms bezogen auf die Altersklassen mit einer Klassenbreite von 10 Jahren

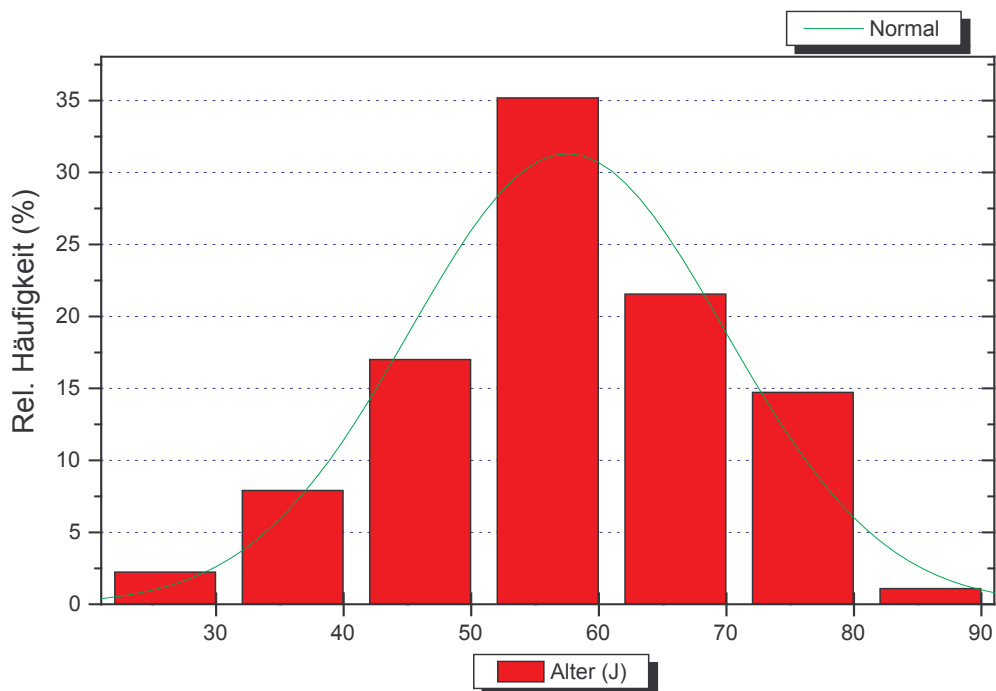


Abb.9: – Relative Häufigkeit eines Mammakarzinoms bezogen auf die Altersklassen mit einer Klassenbreite von 10 Jahren

## 8.2. Histologische Klassifikationen

Die Mammakarzinome wurden hinsichtlich histologischer und zytologischer Kriterien untersucht und in die jeweiligen Gruppen der pTNM-Klassifikation, des Differenzierungsgrades (Grading) und der Stadieneinteilung nach AJCC eingeteilt. Die folgende Tabelle 4 zeigt die Häufigkeiten bzw. Relativen Häufigkeiten in Prozent der jeweiligen Klassifikationen für die untersuchten Mammakarzinome.

Tumorklassifikationen		Anzahl n	Häufigkeit in %
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	1	0,8
	T1	42	33,6
	T2	57	45,6
	T3	13	10,4
	T4	11	8,8
<b>N-Klassifikation</b> (Lymphknotenbefall)	N0	53	42,4
	N1	47	37,6
	N2	8	6,4
	Nx	16	12,8
<b>M-Klassifikation</b>	M0	59	47,2
	M1	3	2,4
	Mx	62	49,6
<b>Grading</b>	G1	12	10,2
	G2	76	64,4
	G3	30	25,4
<b>Stadieneinteilung nach AJCC</b>	I	26	24,5
	IIA	30	28,3
	IIB	27	25,5
	IIIA	16	15,1
	IIIB	7	6,6
	IIIC	0	0,0

Tab. 4: - Häufigkeitsverteilung der Mammakarzinome innerhalb der verschiedenen Tumorklassifikationen



## Stadieneinteilung nach AJCC

Die Stadieneinteilung nach AJCC erfolgte anhand der Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen und der Klassifikation in das TNM-System. Tabelle 5 zeigt die Stadieneinteilung nach AJCC in Bezug auf die TNM-Klassifikation.

	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
<b>T1</b>	I	IIA	IIIA	IIIC
<b>T2</b>	IIA	IIB		
<b>T3</b>	IIB	IIIA		
<b>T4</b>	IIIB			

Tab.5: –Stadieneinteilung nach AJCC des Mammakarzinoms

Tabelle 4 und Abbildung 10 zeigen die relativen Häufigkeiten (%) der in der vorliegenden Studie vorkommenden Stadien nach AJCC. Die Stadien I, IIA und IIB kommen mit jeweils um die 25 % am häufigsten vor.

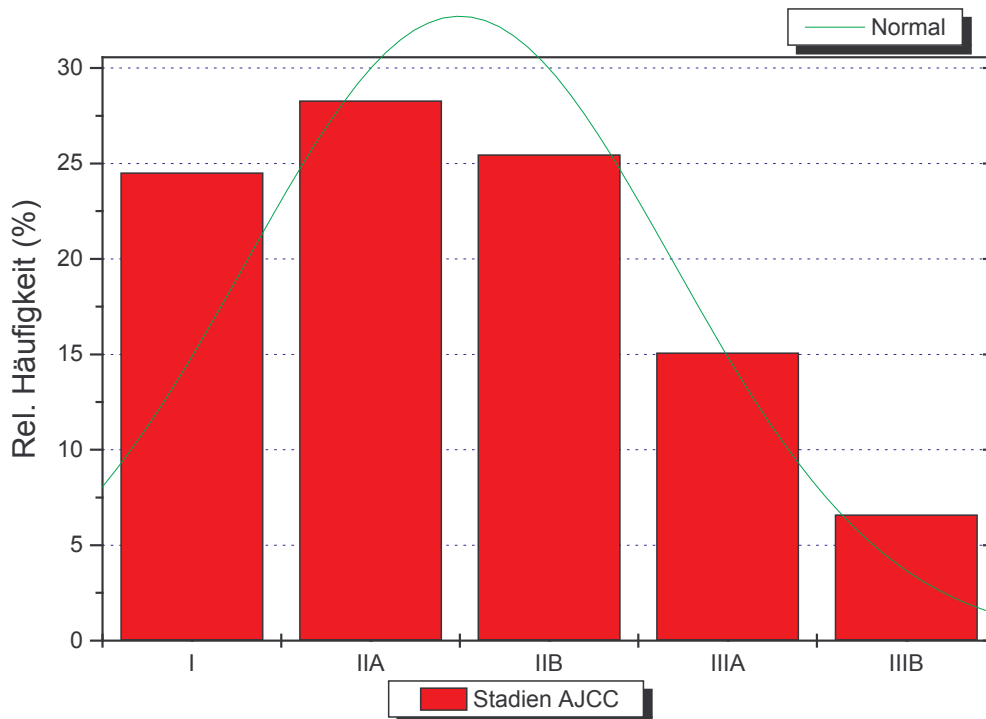


Abb.10: – Rel. Häufigkeit (%) der Stadien nach AJCC der Mammakarzinome

Das mittlere Alter (J) der Patientinnen bezogen auf das jeweilige AJCC-Stadium zeigt die Tabelle 6 und die Abbildung 11. Es finden sich diesbezüglich keine signifikanten Altersunterschiede innerhalb der fünf untersuchten Stadien.

Tumorstadien	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	±S.E.M.
I	22	59,2	2,9
IIA	23	53,5	2,3
IIB	18	55,5	3,1
IIIA	7	58,0	3,4
IIIB	4	64,0	4,1
<b>Gesamt</b>	<b>74</b>	<b>56,7</b>	<b>1,4</b>

Tab. 6: – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf das jeweilige Tumorstadium der Mammakarzinome

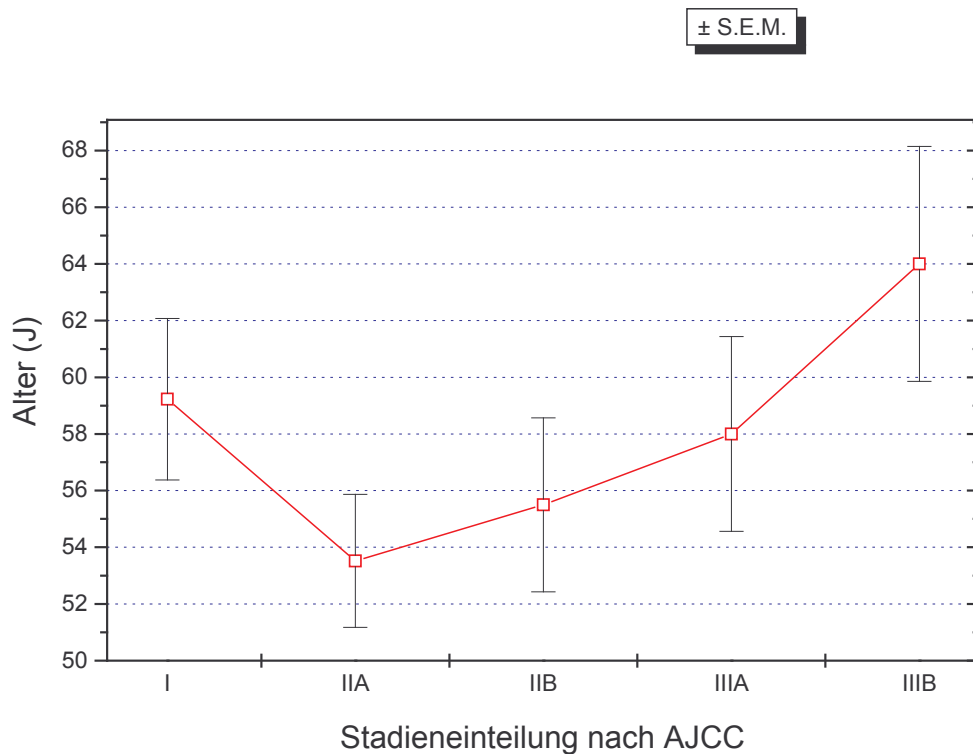


Abb. 11: – Mittelwert (±S.E.M.) des Alters (J) der Stadien nach AJCC der Mammakarzinome

## TNM-Klassifikation

### T-Klassifikation

Die Häufigkeitsverteilung innerhalb der T-Klassifikation (s. Tabelle 4 und Abbildung 12) zeigt, dass die gefundenen Tumoren in 33,6 % der Fälle kleiner als 2 cm (T1) und in 45,6 % der Fälle zwischen 2 und 5 cm (T2) groß waren. Tumoren mit einer Größe über 5 cm (T3) kamen nur in 10,4 % der Fälle vor und Tumoren, welche sogar schon die Brustwand oder die Haut infiltriert hatten (T4) lagen nur in 8,8 % der Fälle vor. Die Diagnostik des Mammakarzinoms erfolgte somit in nahezu 80 % der Fälle bevor der Tumor eine Größe von 5 cm (T1 und T2) erreicht hatte.

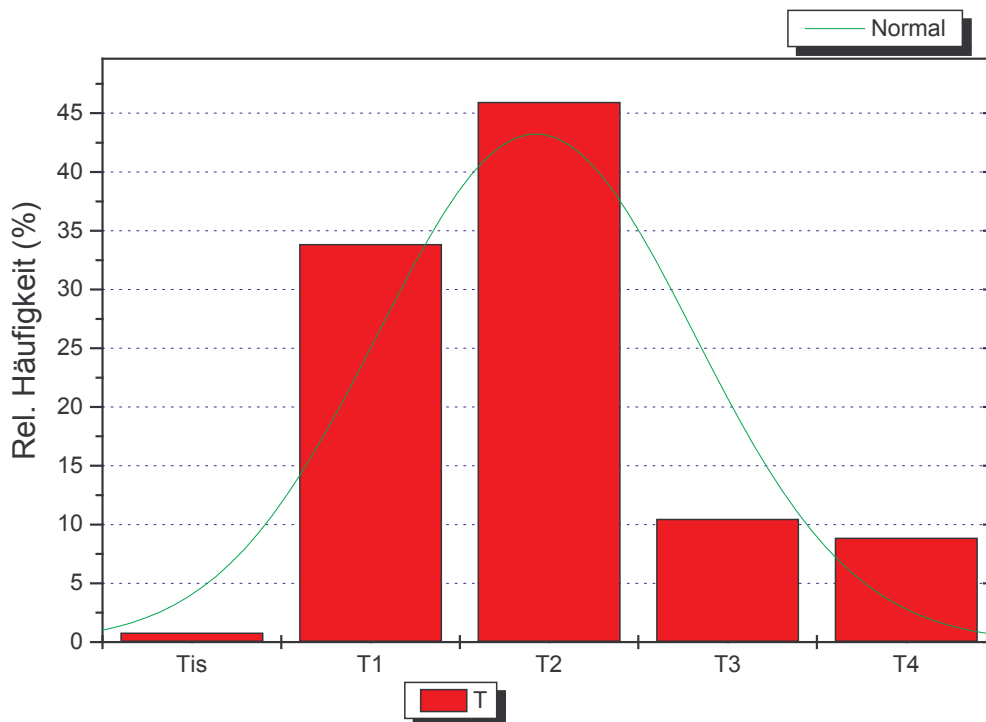


Abb.12: – Rel. Häufigkeit (%) der T-Klassifikation der Mammakarzinome

Das mittlere Alter (J) der Patientinnen zeigt ebenso wie bei den Stadien nach AJCC keine signifikanten Unterschied innerhalb der 5 untersuchten Grade der T-Klassifikation, auch wenn das mittlere Alter der Patientinnen mit einem T4-Karzinom mit 64,9 Jahren höher ist als das mittlere Alter der T1- bis T3-Karzinome (s. Tabelle 7 und Abbildung 13).

T-Klassifikation	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	±S.E.M.
Tis	1	54,0	0,0
T1	33	58,9	2,2
T2	39	54,9	2,0
T3	8	55,4	4,9
T4	7	64,9	4,7
<b>Gesamt</b>	<b>88</b>	<b>57,2</b>	<b>1,4</b>

Tab.7: – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf die jeweilige T-Klassifikation der Mammakarzinome

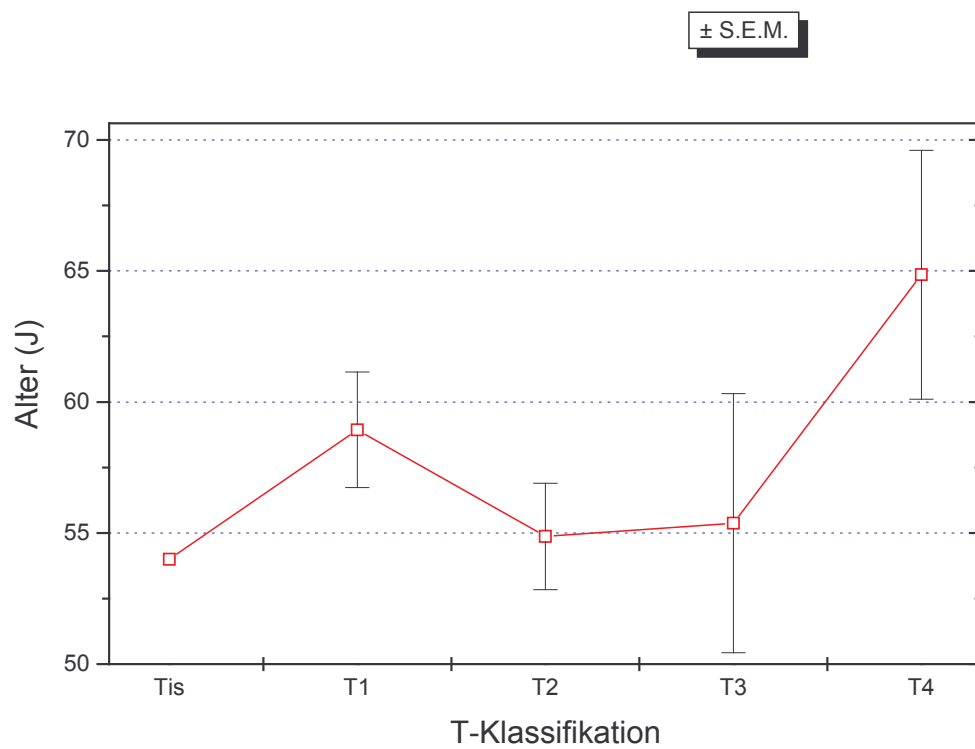


Abb.13: – Mittelwert (±S.E.M.) des Alters (J) der T-Klassifikation der Mammakarzinome

### *N-Klassifikation*

Der Lymphknotenstatus wurde bei 124 der insgesamt 125 Patientinnen erfasst. Bei 42,4 % fand sich kein Befall der regionären Lymphknoten (N0), in 37,6 % der Fälle waren bereits 1-3 Lymphknotenmetastasen histologisch nachweisbar (N1) und bei 8 Patientinnen (6,4 %) fanden sich 4-9 axilläre Lymphknotenmetastasen bzw. klinisch erkennbare LK-Metastasen entlang der A. mammaria interna (N2).

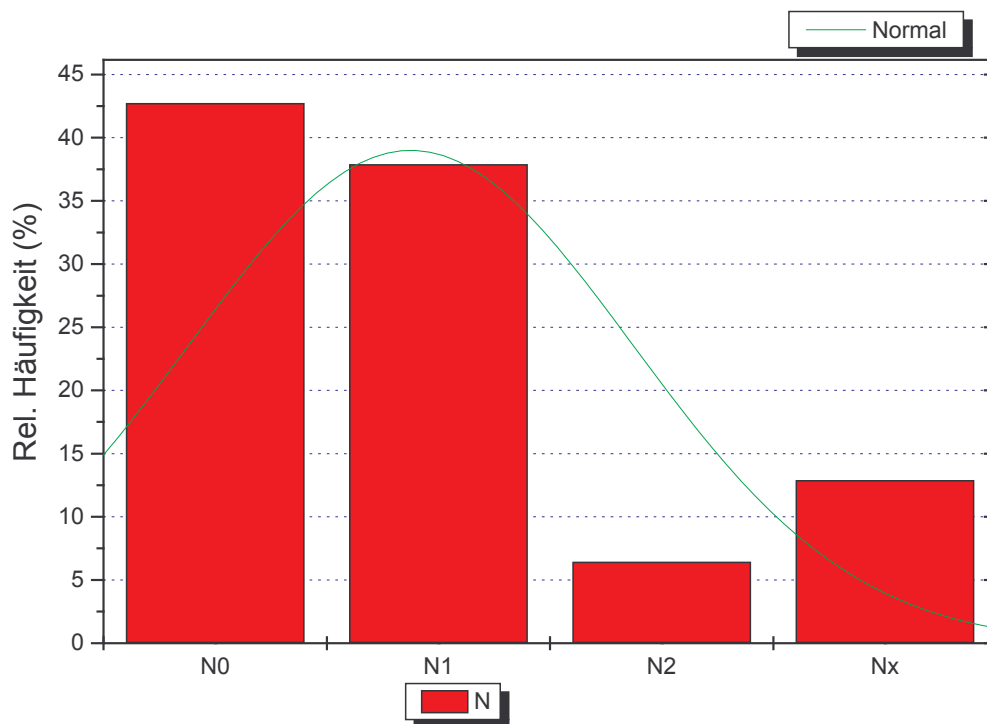


Abb.14: – Rel. Häufigkeit (%) der N-Klassifikation der Mammakarzinome

Das mittlere Alter (J) der Patientinnen (s. Tabelle 8 und Abbildung 15) bezogen auf das Ausmaß des Lymphknotenbefalls (N-Klassifikation) zeigt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten Gruppen.

N-Klassifikation	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	$\pm$ S.E.M.
N0	45	57,2	1,9
N1	28	55,4	2,0
N2	2	62,0	8,0
Nx	12	61,0	5,0
<b>Gesamt</b>	<b>87</b>	<b>57,3</b>	<b>1,4</b>

Tab.8: – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf die jeweilige N-Klassifikation der Mammakarzinome

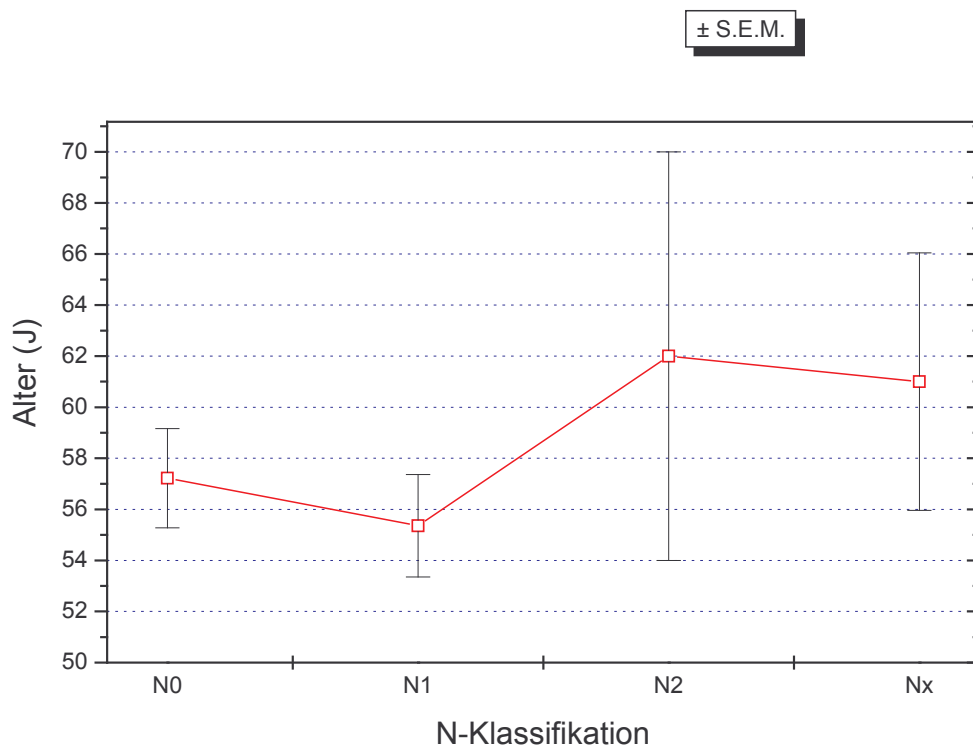


Abb.15: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des Alters (J) der N-Klassifikation der Mammakarzinome

### M-Klassifikation

Bei nahezu der Hälfte der untersuchten Patientinnen (47,2 %) lagen noch keine Metastasen vor (M0) und bei 49,6 % der Fälle war der Status der Metastasierung unbekannt bzw. nicht beurteilbar. Nur bei 3 (2,4 %) Patientinnen konnten Fernmetastasen nachgewiesen und dokumentiert werden.

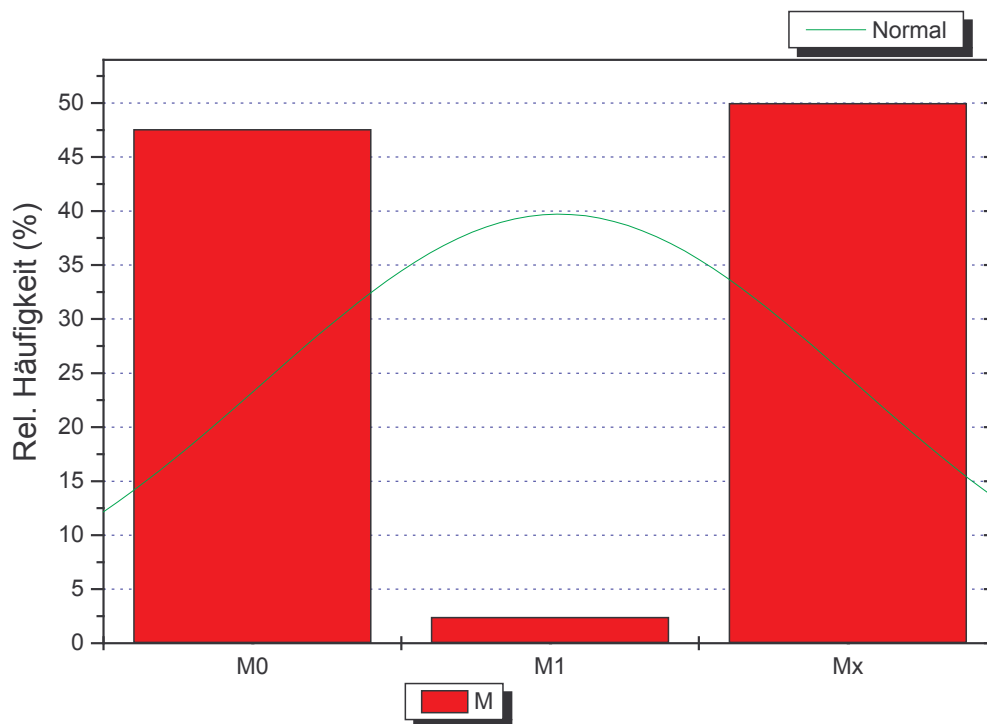


Abb.16: – Rel. Häufigkeit (%) der M-Klassifikation der Mammakarzinome

Nur bei einer Patientin mit Fernmetastasen war das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bekannt. Diese war mit 44 Jahren deutlich jünger als die Patientinnen ohne Fernmetastasen, welche im Mittel 57 Jahre alt waren. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des mittleren Alters zum Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzinoms innerhalb der M-Klassifikation finden sich nicht.

M-Klassifikation	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	$\pm$ S.E.M.
M0	46	57,5	1,8
M1	1	44,0	0,0
Mx	40	57,3	2,2
<b>Gesamt</b>	<b>87</b>	<b>57,3</b>	<b>1,4</b>

Tab.9: – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf die jeweilige M-Klassifikation der Mammakarzinome

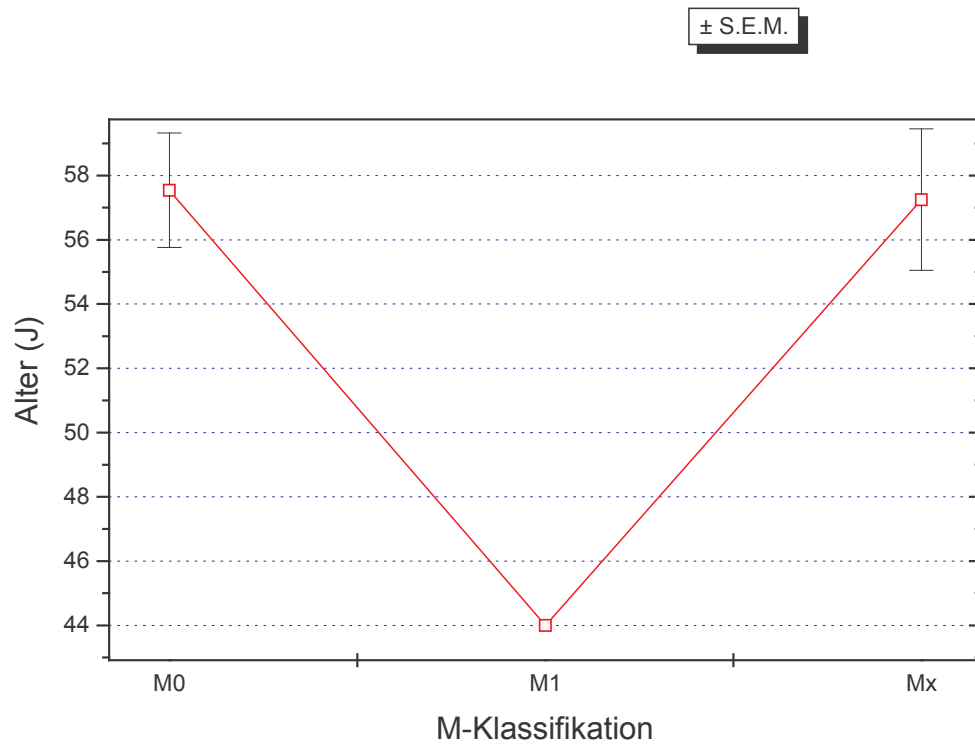


Abb.17 – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des Alters (J) der M-Klassifikation der Mammakarzinome



## Histopathologisches Grading (Differenzierungsgrad)

Der Differenzierungsgrad der Operationsresektate war in den meisten Fällen (64,4 %) eine mäßige Differenzierung (G2). 30 Resektate (25,4 %) waren undifferenziert (G3) und 12 Resektate (10,2 %) gut differenziert (G1).

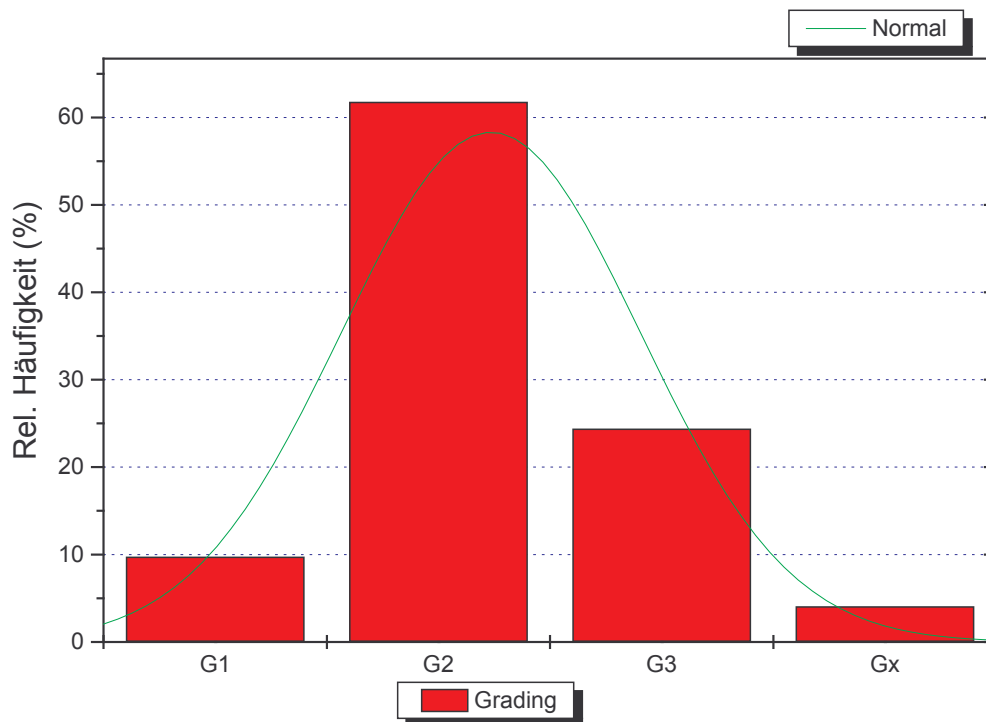


Abb. 18: – Rel. Häufigkeit (%) des Differenzierungsgrades (Grading) der Mammakarzinome

Wie auch bei der TNM-Klassifikation zeigt das mittlere Alter (J) bei Diagnose bezogen auf die verschiedenen Differenzierungsgrade keine signifikanten Unterschiede. Ein Einfluß des Alters auf den Differenzierungsgrad kann wie bei der TNM-Klassifikation und bei der Stadieneinteilung nach AJCC als Zeichen für das Ausmaß des Tumors nicht nachgewiesen werden.

Grading	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	$\pm$ S.E.M.
G1	8	56,1	3,3
G2	59	58,1	1,8
G3	17	55,6	2,7
Gx	3	53,0	9,0
<b>Gesamt</b>	<b>87</b>	<b>57,3</b>	<b>1,4</b>

Tab.10 – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf den jeweiligen Differenzierungsgrad (Grading) der Mammakarzinome

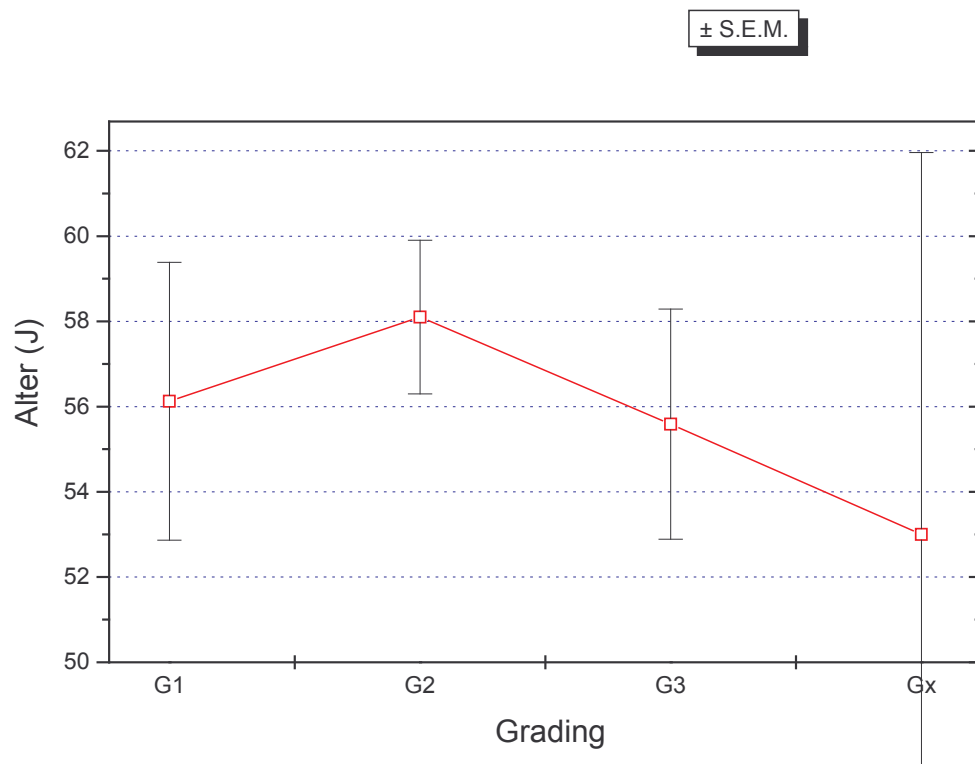


Abb.19: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des Alters (J) des Differenzierungsgrades (Grading) der Mammakarzinome

## 8.3. DNA-Zytometrie

### 8.3.1. DNA-Diagnose (Ploidität)

Die DNA-Diagnose betrachtet den Chromosomensatz der untersuchten Zellen der Mammakarzinome und untersucht unter Anwendung der Stammlinien- und Einzelzellinterpretation, ob ein euploider ( $2^n c$  mit  $n=9^+$ ) oder ein aneuploider Chromosomensatz vorliegt. Aneuploidie definiert als numerische oder strukturelle Abweichungen vom euploiden Chromosomensatz gilt zellbiologisch als Beleg für eine Neoplasie.

In der vorliegenden Studie wiesen 102 (82,3 %) der 125 untersuchten Mammakarzinome einen aneuploiden Chromosomensatz auf. 22 Mammakarzinome (17,7 %) zeigten DNA-zytometrisch einen euploiden Chromosomensatz. Damit ist der Anteil der aneuploiden Karzinome bei den untersuchten Mammakarzinomen deutlich höher als der Anteil der euploiden Karzinome.

Das mittlere Alter (J) der Patientinnen mit einem aneuploiden Karzinom liegt mit 56,4 ( $\pm 1,5$ ) Jahren unter dem mittleren Alter der Patientinnen mit einem euploiden Karzinom der Mamma. Diese sind im Mittel 61,3 ( $\pm 3,9$ ) Jahre alt. Dieser Unterschied hinsichtlich des mittleren Alters bezogen auf die Ploidität ist jedoch nicht signifikant.

Die folgende Tabelle 11 zeigt die Häufigkeiten und die relativen Häufigkeiten der DNA-Diagnose (Ploidität) bezogen auf die verschiedenen histologischen Klassifikationen.

Tumorklassifikationen		DNA-Diagnose					
		euploid			aneuploid		
		Anzahl	%*	%**	Anzahl n	%*	%**
* Spaltenhäufigkeit in Prozent		n					
** Zeilenhäufigkeit in Prozent							
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	0	0,0	0,0	1	1,0	100,0
	T1	9	40,9	21,4	33	32,7	78,6
	T2	8	36,4	14,0	49	48,5	86,0
	T3	1	4,5	8,3	11	10,9	91,7
	T4	4	18,2	36,4	7	6,9	63,6
<b>N-Klassifikation</b>	N0	14	63,6	26,4	39	38,6	73,6
	N1	4	18,2	8,7	42	41,6	91,3
	N2	1	4,5	12,5	7	6,9	87,5
	Nx	3	13,6	18,8	13	12,9	81,3
<b>M-Klassifikation</b>	M0	11	50,0	18,6	48	47,5	81,4
	M1	1	4,5	33,3	2	2,0	66,7
	Nx	10	45,5	16,4	51	50,5	83,6
<b>Grading</b>	G1	3	13,6	25,0	9	9,0	75,0
	G2	14	63,6	18,7	61	61,0	81,3
	G3	4	18,2	13,3	26	26,0	86,7
	Gx	1	4,5	20,0	4	4,0	80,0
<b>Stadien nach AJCC</b>	I	7	36,8	26,9	19	22,1	73,1
	IIA	6	31,6	20,0	24	27,9	80,0
	IIB	2	10,5	7,4	25	29,1	92,6
	IIIA	1	5,2	6,7	14	16,3	93,3
	IIIB	3	15,8	42,9	4	4,7	57,1

Tab.11: – Häufigkeitsverteilung der DNA-Diagnosen innerhalb der verschiedenen Tumorklassifikationen

Innerhalb der aufgeführten Tumorklassifikationen liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien bzw. Differenzierungsgraden hinsichtlich der DNA-Diagnose vor.

Es konnte ihm Rahmen der Studie somit nicht nachgewiesen werden, dass ab einem gewissen Tumorstadium bzw. Differenzierungsgrad die Diagnose „aneuploid“ signifikant häufiger ist als die Diagnose „euploid“. In den fortgeschrittenen Tumorstadien (T3 und T4) oder bei Lymphknotenbefall (N1 und N2) liegt somit nicht signifikant häufiger ein aneuploider Chromosomensatz vor als in den Stadien T1 und T2 bzw. bei Fehlen von LK-Metastasen (N0). Auch bei den undifferenzierten Karzinomen (G3) ist die Aneuploidie nicht signifikant häufiger als bei den Differenzierungsgraden G1 und G2.

### **8.3.2. DNA-Index**

Der DNA-Index (DI) gibt die Abweichung des gemessenen DNA-Gehaltes vom normalen DNA-Gehalt an, wobei ein DI von 1 einer Stammlinie bei 2c, ein DI von 2,5 einer Stammlinie bei 5c entspricht (s. a. Kapitel DNA-Zytometrie). Der DNA-Index kann als Maß für die Stammlinienheterogenität bzw. chromosomale Instabilität dienen und ist damit ein Index für Neoplasie.

Wie die Häufigkeitsverteilung (Abbildung 20) zeigt, gibt es zwei Häufigkeitsgipfel. Eine Häufigkeitsdichte findet sich bei einem DNA-Index zwischen 0,95 und 1,14 (27 Fälle) sowie eine zweite Häufigkeitsdichte bei 1,85 bis 2,04 (23 Fälle).

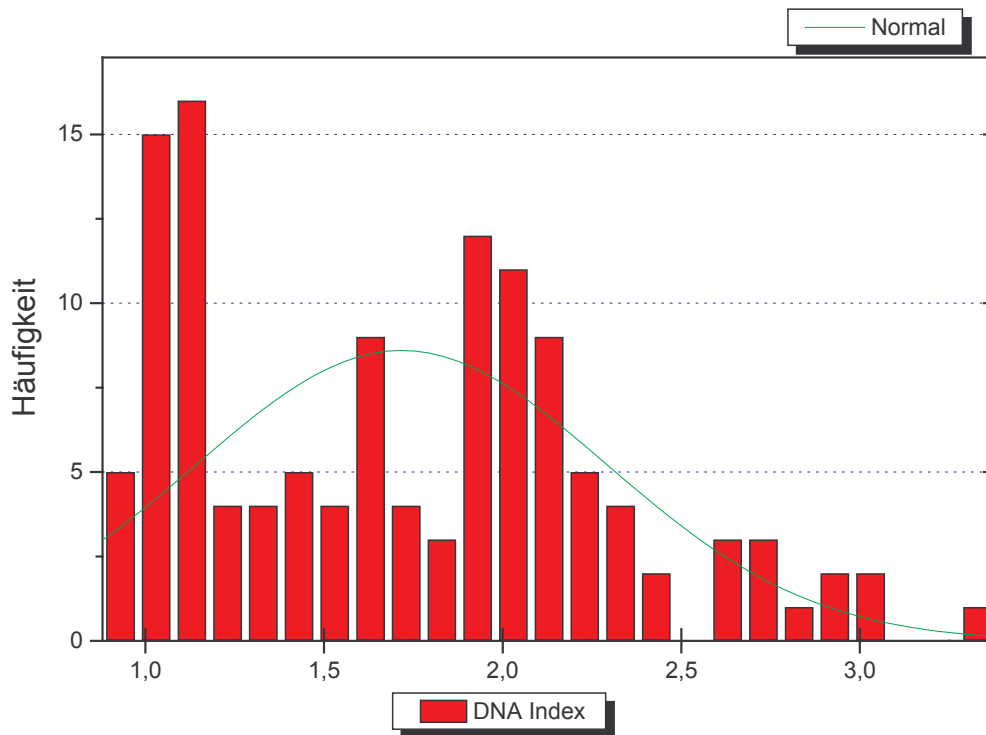


Abb.20: – Häufigkeitsverteilung des DNA-Index der Mammakarzinome

Betrachtet man die euploiden und die aneuploiden Mammakarzinome separat (s. Abbildungen 21 und 22), so findet sich bei den euploiden Karzinomen ein Häufigkeitsgipfel des DNA-Index zwischen 0,95 und 1,14 (21 Fälle), bei den aneuploiden Karzinomen finden sich zwei Häufigkeitsgipfel bei einem DNA-Index zwischen 1,15 und 1,24 (9 Fälle) und zwischen 1,85 und 2,04 (23 Fälle). 95,4 % der euploiden Karzinome weisen somit einem DNA-Index mit einem Wert zwischen 0,95 und 1,14 auf. Bei den aneuploiden Karzinomen weisen 22,6 % einen DNA-Index zwischen 1,85 und 2,04 auf. Die restlichen aneuploiden Karzinome weisen keine weiteren prägnanten Bereiche relativer Dichte des DNA-Index (Häufigkeit > 10 %) auf.

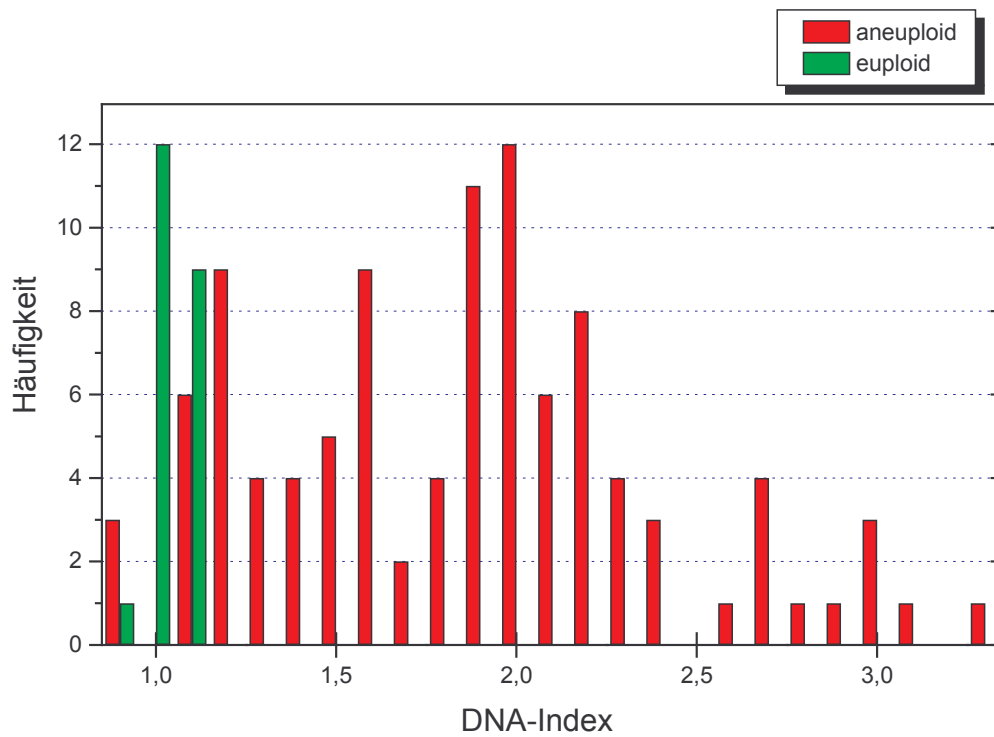


Abb.21: – Häufigkeitsverteilung des DNA-Index der Mammakarzinome bezogen auf die DNA-Diagnose „aneuploid“ und „euploid“

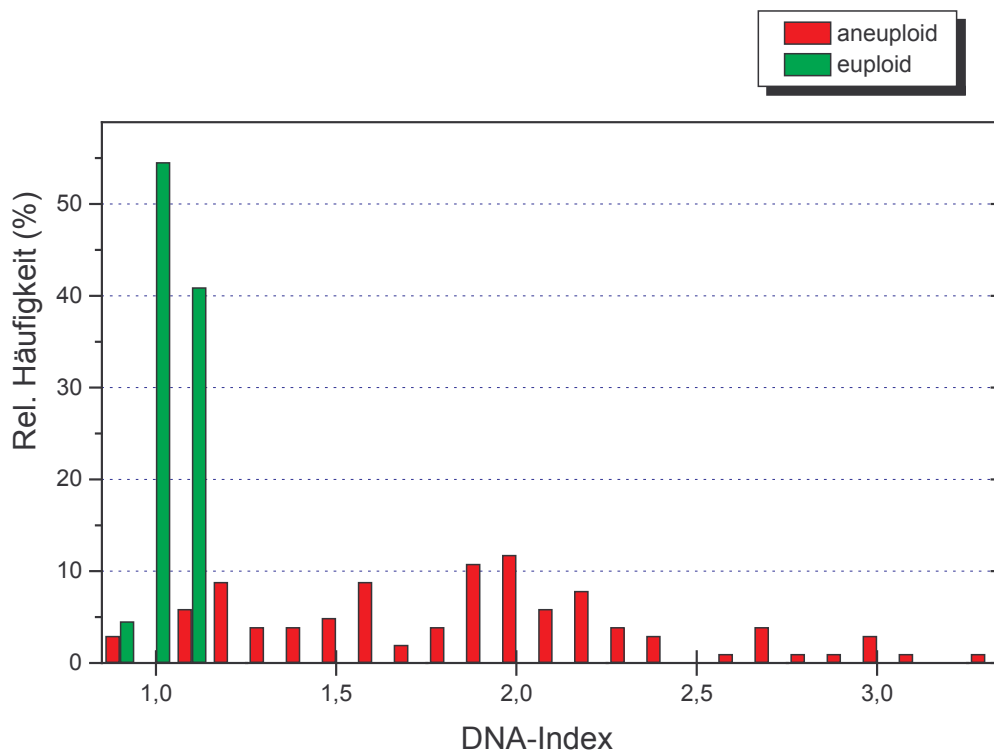


Abb.22: – Relative Häufigkeitsverteilung (%) des DNA-Index der Mammakarzinome bezogen auf die DNA-Diagnose „aneuploid“ und „euploid“

Der Mittelwert des DNA-Index für die 125 Mammakarzinome liegt bei 1,71 ( $\pm 0,052$ ). Die euploiden Karzinome haben im Mittel einen DNA-Index von 1,04 ( $\pm 0,010$ ) und die aneuploiden Karzinome weisen einen mittleren DNA-Index von 1,85 ( $\pm 0,053$ ) auf. Zwischen dem mittleren DNA-Index der euploiden und der aneuploiden Karzinome besteht ein hochsignifikanter Unterschied.

Die folgende Tabelle 12 zeigt die Mittelwerte ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index der verschiedenen untersuchten Tumorklassifikationen. Hier bestehen bis auf die Stadieneinteilung nach Auer hinsichtlich der mittleren Werte des DNA-Index keine signifikanten Unterschiede. Insbesondere zeigt sich kein Zusammenhang zwischen DNA-Index und Tumorgröße oder Lymphknotenbefall. Auch eine positive Korrelation zwischen DNA-Index und den Stadien nach AJCC liegt nicht vor. Das Stadium IIIB z. B. zeigt mit einem mittleren DNA-Index von 1,44 ( $\pm 0,22$ ) einen niedrigeren Wert als das Stadium IIA mit 1,71 ( $\pm 0,12$ ). Lediglich beim Grading zeigt sich die Tendenz einer Zunahme des DNA-Index mit Abnahme des Differenzierungsgrades (s. Tabelle 12).



Tumorklassifikationen		Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index	
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	1,62	0,0
	T1	1,59	0,09
	T2	1,76	0,08
	T3	1,96	0,15
	T4	1,50	0,16
<b>N-Klassifikation</b>	N0	1,63	0,08
	N1	1,85	0,09
	N2	1,56	0,21
	Nx	1,64	0,13
<b>M-Klassifikation</b>	M0	1,67	0,07
	M1	1,55	0,28
	Mx	1,75	0,08
<b>Grading</b>	G1	1,53	0,17
	G2	1,67	0,06
	G3	1,91	0,11
<b>Stadieneinteilung nach AJCC</b>	I	1,58	0,11
	IIA	1,71	0,12
	IIB	1,84	0,11
	IIIA	1,81	0,16
	IIIB	1,44	0,22

Tab.12: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index der verschiedenen Tumorklassifikationen der 125 Mammakarzinome

Für die 475 erfassten Mammakarzinome ergeben sich folgende Mittelwerte ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index. Der Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index für diese Gruppe lag bei 1,611 ( $\pm$  0,033).

Tumorklassifikationen		Anzahl (N)	Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index	
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	16	1,56	0,11
	T1	157	1,51	0,06
	T2	147	1,66	0,05
	T3	36	1,76	0,12
	T4	49	1,66	0,08
<b>N-Klassifikation</b>	N0	183	1,54	0,05
	N1	101	1,73	0,06
	N2	19	1,77	0,18
	Nx	96	1,61	0,07
<b>M-Klassifikation</b>	M0	59	1,67	0,07
	M1	3	1,55	0,28
	Mx	62	1,75	0,08
<b>Grading</b>	G1	31	1,34	0,10
	G2	281	1,58	0,04
	G3	80	1,88	0,09
<b>Stadieneinteilung nach AJCC</b>	I	106	1,48	0,06
	IIA	84	1,61	0,08
	IIB	52	1,79	0,10
	IIIA	29	1,70	0,11
	IIIB	31	1,69	0,11

Tab.13: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index der verschiedenen Tumorklassifikationen der 475 Mammakarzinome

Zwischen dem mittleren DNA-Index der verschiedenen T-Klassifikationen findet sich ein schwachsignifikanter Unterschied. Für die Tis- und T1-Karzinome liegt der DNA-Index schwachsignifikant unter dem der T2- bis T4-Karzinome. Ebenso findet sich ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des DNA-Index zwischen den 3 Differenzierungsgraden G1-G3. Mit fallendem Differenzierungsgrad steigt der Mittelwert des DNA- Index. Auch bei den Stadien nach AJCC ist der mittlere DNA-

Index schwachsignifikant unterschiedlich mit deutlich niedrigerem mittleren DNA-Index des Stadiums I im Vergleich zu den Stadien IIA bis IIIB.

### 8.3.3. DNA-Malignitätsgrad

Die Variabilität der Chromosomenanomalien, entsprechend der Varianz des DNA-Index um den Normalwert, hat sich prognostisch als besonders valide erwiesen. Diese Varianz kommt im sogenannten 2c-Deviation-Index (2c-DI) zum Ausdruck. Der DNA-Malignitätsgrad (DNA-MG) steht in logarithmischer Beziehung zum 2c-DI und erreicht Werte zwischen 0 und 3 (s. a. Kapitel DNA-Zytometrie).

Nach Böcking et al. (1994) ist der DNA-Malignitätsgrad wie folgt definiert:

$$MG = 0,84 \times \log(2cDI \times 5cER + 1) !$$

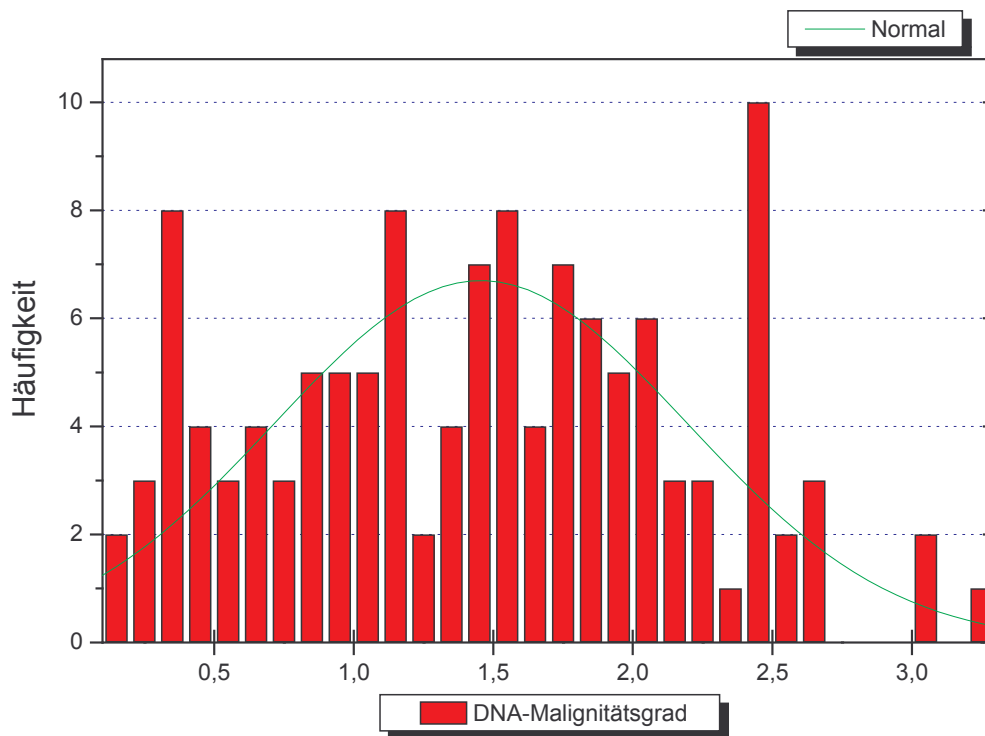


Abb.23: – Häufigkeitsverteilung des DNA-Malignitätsgrades der Mammakarzinome

Der DNA-Malignitätsgrad aller Mammakarzinome (s. Abbildung 23) zeigt einen Bereich relativer Häufigkeitsdichte bei einem DNA-Malignitätsgrad zwischen 2,40

und 2,49 (10 Fälle). Drei weitere Häufigkeitsgipfel mit jeweils 8 Fällen finden sich bei einem DNA-Malignitätsgrad zwischen 0,30-0,39, 1,10-1,19 und 1,50-1,59.

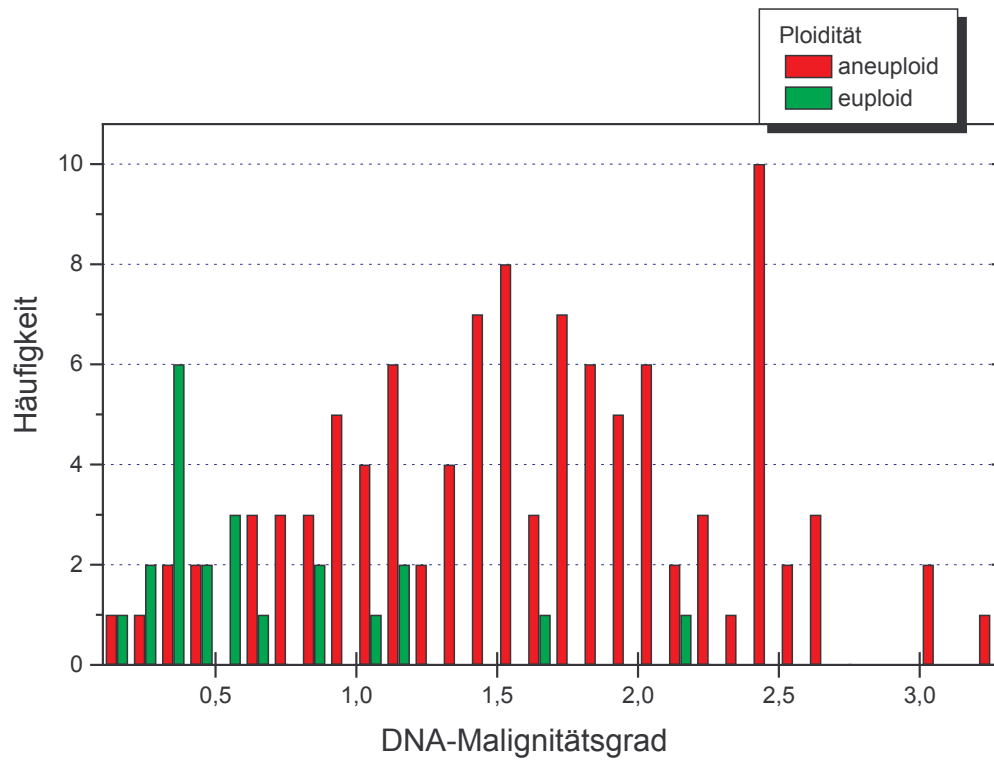


Abb.24: – Relative Häufigkeitsverteilung (%) des DNA-Malignitätsgrades der Mammakarzinome bezogen auf die DNA-Diagnose „aneuploid“ und „euploid“

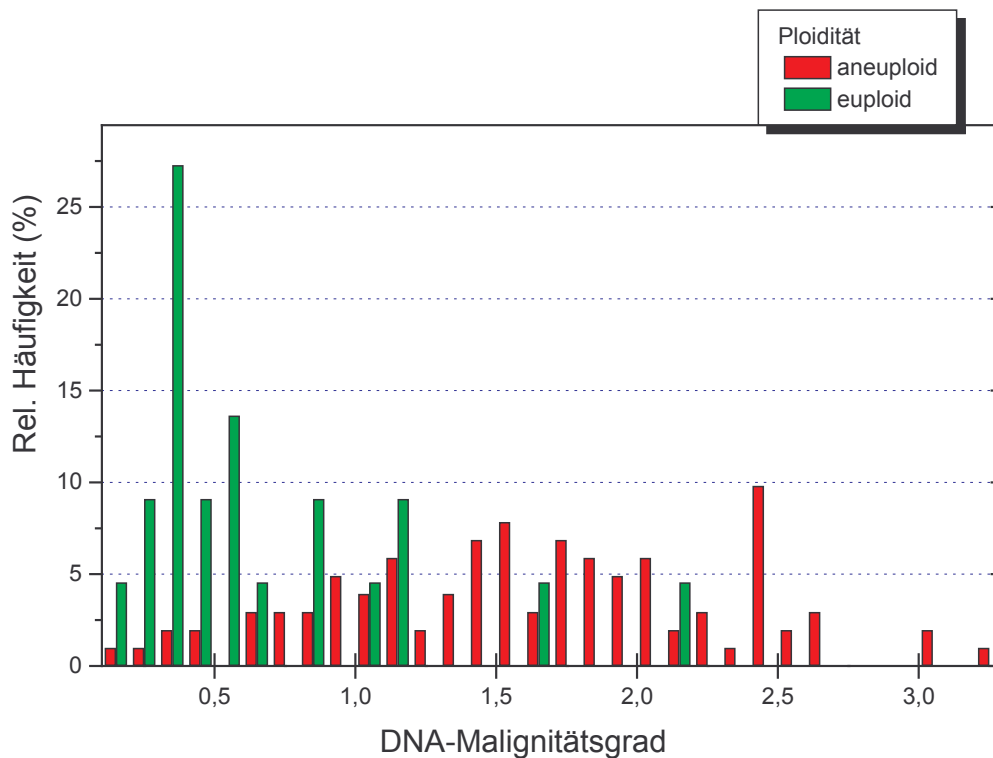


Abb.25: – Relative Häufigkeitsverteilung (%) des DNA-Malignitätsgrades der Mammakarzinome bezogen auf die DNA-Diagnose „aneuploid“ und „euploid“

Bei den euploiden Karzinomen findet sich ein Häufigkeitsgipfel bei einem DNA-Malignitätsgrad zwischen 0,30 und 0,39 (6 Fälle/27,3 %). Die aneuploiden Karzinome haben ebenfalls einen Häufigkeitsgipfel mit 10 Fällen bei einem Bereich zwischen 2,40 und 2,49 (9,8 %). Weitere Bereiche relativer Häufigkeitsdichte finden sich bei Werten zwischen 1,50-1,59 (8 Fälle/7,8 %) und 1,70-1,79 (7 Fälle/6,9 %).

Der mittlere DNA-Malignitätsgrad der Gesamtgruppe liegt bei 1,44 ( $\pm 0,07$ ). Bei den euploiden Mammakarzinomen liegt ein mittlerer DNA-Malignitätsgrad von 0,65 ( $\pm 0,1$ ) vor und bei den aneuploiden Karzinomen von 1,62 ( $\pm 0,07$ ). Der mittlere DNA-Malignitätsgrad der aneuploiden Mammakarzinome ist hochsignifikant höher als der entsprechende mittlere DNA-Malignitätsgrad der euploiden Karzinome. Die Abbildungen 24-26 zeigen diesen hochsignifikanten Unterschied deutlich. Die euploiden Mammakarzinome weisen in der Hauptsache DNA-Malignitätsgrade im unteren Bereich bis 1,19 auf. Lediglich zwei Fälle zeigen höhere DNA-

Malignitätsgrade mit den Werten 1,60 und 2,15. Abbildung 26 zeigt den Bezug des DNA-Malignitätsgrades zum DNA-Index und der DNA-Diagnose. Die euploiden Karzinome finden sich im Gegensatz zu den aneuploiden Karzinomen nur in den unteren Bereichen des DNA-Index und des DNA-Malignitätsgrades.

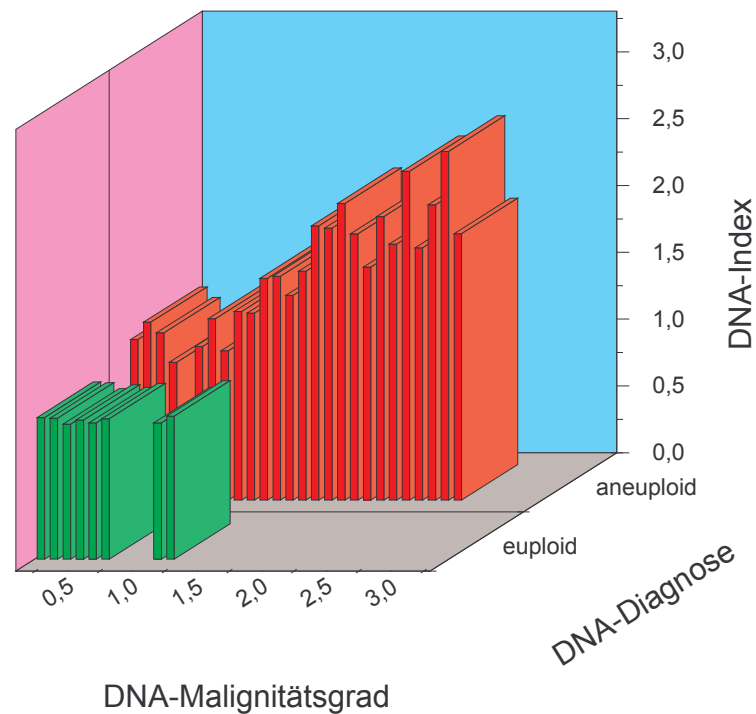


Abb. 26: –Mittelwerte( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index bezogen auf den DNA-Malignitätsgrad (Häufigkeitsklassen mit einer Klassenbreite von 0,1) der Mammakarzinome und auf die DNA-Diagnose „aneuploid“ und „euploid“

Die folgende Tabelle 14 zeigt die jeweiligen Mittelwerte ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades bezogen auf die untersuchten Tumorklassifikationen

Tumorklassifikationen		Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades	
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	1,93	0,0
	T1	1,25	0,12
	T2	1,59	0,09
	T3	1,59	0,18
	T4	1,15	0,25
<b>N-Klassifikation</b>	N0	1,43	0,11
	N1	1,54	0,09
	N2	1,23	0,31
	Nx	1,38	0,19
<b>M-Klassifikation</b>	M0	1,46	0,10
	M1	1,08	0,39
	Mx	1,46	0,09
<b>Grading</b>	G1	0,89	0,22
	G2	1,39	0,08
	G3	1,85	0,10
<b>Stadieneinteilung nach AJCC</b>	I	1,25	0,15
	IIA	1,50	0,15
	IIB	1,68	0,12
	IIIA	1,41	0,18
	IIIB	1,11	0,33

Tab.14: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades der verschiedenen Tumorklassifikationen

Hinsichtlich der TNM-Klassifikation und der Stadieneinteilung nach AJCC besteht kein signifikanter Zusammenhang zum DNA-Malignitätsgrad. Bei den Mammakarzinomen korreliert somit der DNA-Malignitätsgrad nicht mit der Tumorgroße bzw. mit dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls. Auch die Tatsache einer Metastasie-

rung des Primärtumors geht nicht mit einem höheren DNA-Malignitätsgrad einher. Beim Grading hingegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der drei Differenzierungsgrade. So steigt der DNA-Malignitätsgrad signifikant mit der Abnahme des Differenzierungsgrades. Im Detail ist der DNA-Malignitätsgrad bei den gut differenzierten Mammakarzinomen (G1) mit im Mittel 0,89 ( $\pm 0,22$ ) signifikant niedriger als der mittlere DNA-Malignitätsgrad der mäßig differenzierten Karzinome (G2) mit 1,39 ( $\pm 0,08$ ) und dieser wiederum signifikant niedriger als der mittlere DNA-Malignitätsgrad der undifferenzierten Mammakarzinome (G3), welcher einen Mittelwert von 1,85 ( $\pm 0,10$ ) aufweist.

#### 8.3.4. DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer

Die Einteilung in die DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer (s. Kapitel Tumorbio­logie und DNA-Zytometrie) erfolgt anhand der DNA-zytometrischen Kriterien der Ploidität.

Die meisten Mammakarzinome (63,4 %) hatten ein Stadium IV nach Auer. Nur 31 Mammakarzinome (25,2 %) hatten ein Stadium II und 11,4 % (14 Fälle) ein Stadium III nach Auer. Keins der Mammakarzinome befand sich im Stadium I nach Auer.

		Anzahl n	Häufigkeit in %
<b>Stadieneinteilung nach Auer</b>	0	1	0,8
	I	0	0,0
	II	31	25,0
	III	14	11,3
	IV	78	62,9

Tab.15: - Häufigkeitsverteilung der Mammakarzinome innerhalb der DNA-zytometrischen Klassifikation nach Auer



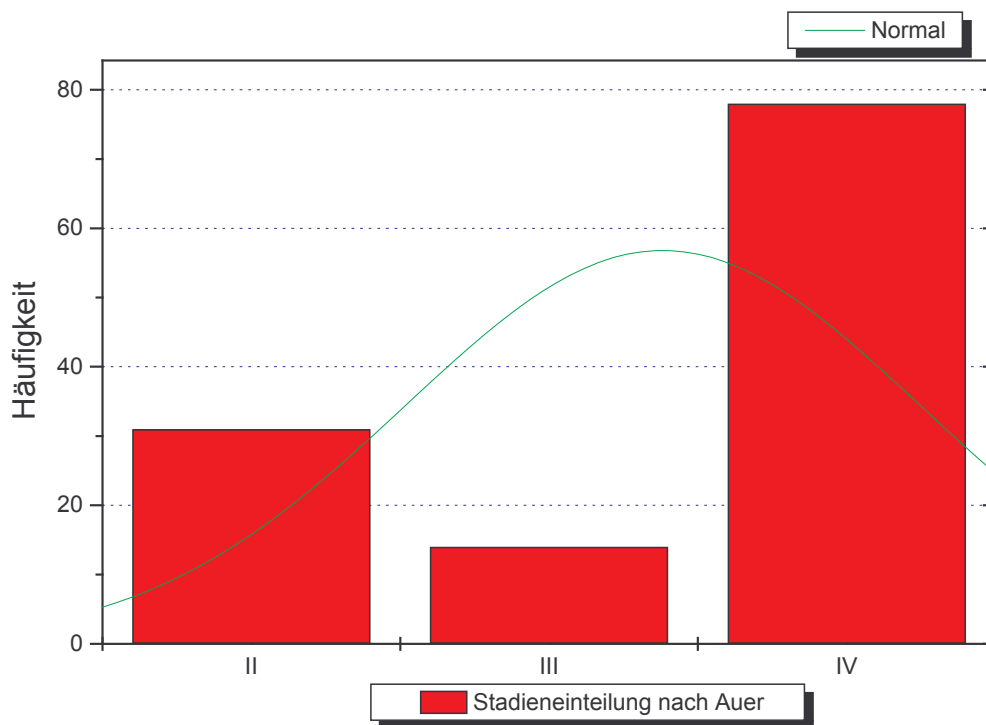


Abb.27: – Rel. Häufigkeit (%) der Stadien nach Auer der Mammakarzinome

### Alter

Das mittlere Alter (J) der Patientinnen innerhalb der vier Stadien nach Auer zeigt Tabelle 16. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des jeweiligen mittleren Alters innerhalb der vier untersuchten Stadien nach Auer.

Stadien nach Auer	Anzahl (N)	Mittelwert Alter (J)	±S.E.M.
I	0	0	0
II	21	56,8	3,1
III	12	56,3	3,1
IV	54	57,6	1,8
<b>Gesamt</b>	<b>87</b>	<b>57,2</b>	<b>1,4</b>

Tab. 16: – Mittelwerte (S.E.M.) des Alters (J) bezogen auf das jeweilige Stadium nach Auer der Mammakarzinome

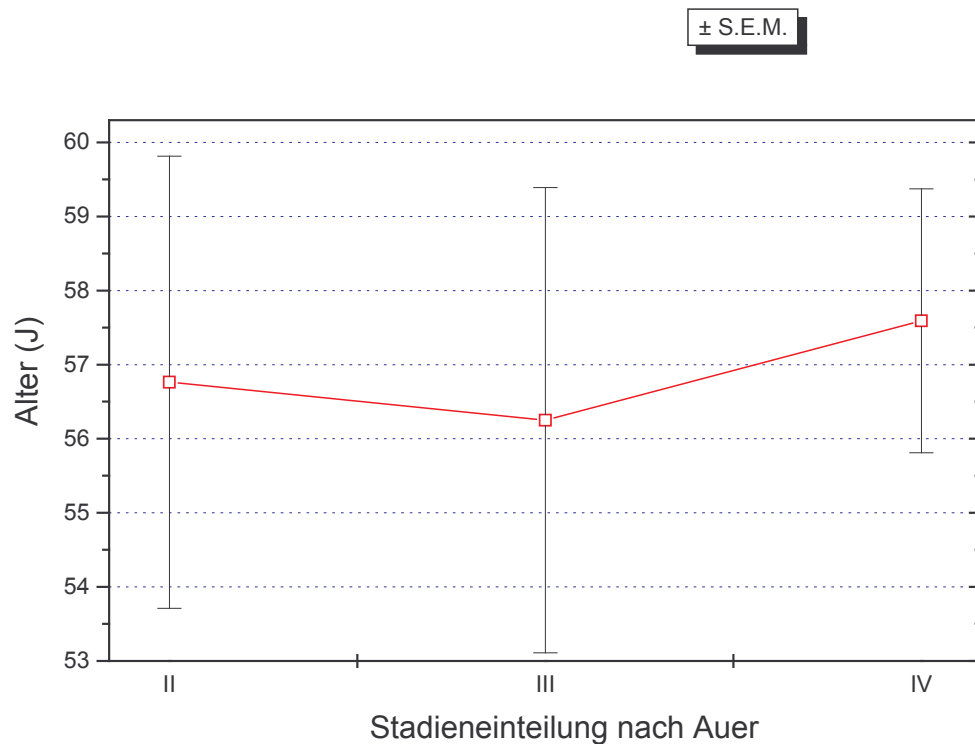


Abb. 28: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des Alters (J) der Stadien nach Auer der Mammakarzinome

### DNA-Diagnose (Ploidität)

* Spaltenhäufigkeit in Prozent ** Zeilenhäufigkeit in Prozent		DNA-Diagnose					
		euploid			aneuploid		
		Anzahl n	%*	%**	Anzahl n	%*	%**
<b>Stadien nach Auer</b>	II	14	63,6	45,2	17	16,8	54,8
	III	3	13,6	21,4	11	10,9	78,6
	IV	5	22,7	6,4	73	72,3	93,6

Tab. 17: – Häufigkeitsverteilung der DNA-Diagnosen innerhalb der DNA-zytometrischen Klassifikation nach Auer

Von den euploiden Karzinomen sind 63,6 % dem Stadium II nach Auer einzuordnen, während nur 16,8 % der aneuploiden Karzinome dem Stadium II nach Auer einzuordnen sind. Umgekehrt sind 72,3 % der aneuploiden Karzinome dem Stadium IV nach Auer zuzuordnen und nur 22,7 % der euploiden Karzinome. Diese be-

schriebenen Unterschiede hinsichtlich der DNA-Diagnose der vier Stadien nach Auer sind hochsignifikant.

#### *DNA-Index*

		<b>Mittelwert (<math>\pm</math>S.E.M.) des DNA-Index</b>	
<b>Stadien nach Auer</b>	II	1,22	0,06
	III	1,32	0,07
	IV	1,95	0,06

*Tab.18: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index der DNA-zytometrischen Klassifikation nach Auer*

Die Stadien nach Auer zeigen einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich des mittleren DNA-Index. So ist der mittlere DNA-Index im Stadium II mit 1,22 ( $\pm$ 0,06) hochsignifikant niedriger als der mittlere DNA-Index des Stadiums IV mit 1,95 ( $\pm$ 0,06).

#### *DNA-Malignitätsgrad*

		<b>Mittelwert (<math>\pm</math>S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades</b>	
<b>Stadien nach Auer</b>	II	0,72	0,07
	III	0,71	0,12
	IV	1,85	0,06

*Tab.19: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades der DNA-zytometrischen Klassifikation nach Auer*

Der mittlere DNA-Malignitätsgrad der Stadien II und III nach Auer ist signifikant niedriger als der mittlere DNA-Malignitätsgrad des Stadiums IV nach Auer (s. Tabelle 16).

Für die 475 erfassten Mammakarzinome ergeben sich folgende Mittelwerte ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades. Der Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades für diese Gruppe lag bei 1,358 ( $\pm$  0,037).

Tumorklassifikationen		Anzahl (N)	Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index	
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	16	1,39	0,18
	T1	157	1,15	0,06
	T2	147	1,52	0,06
	T3	36	1,54	0,11
	T4	49	1,37	0,10
<b>N-Klassifikation</b>	N0	183	1,31	0,06
	N1	101	1,50	0,07
	N2	19	1,60	0,18
	Nx	96	1,26	0,08
<b>M-Klassifikation</b>	M0	59	1,46	0,10
	M1	3	1,08	0,39
	Mx	62	1,47	0,09
<b>Grading</b>	G1	31	0,80	0,13
	G2	281	1,30	0,04
	G3	80	1,84	0,07
<b>Stadieneinteilung nach AJCC</b>	I	106	1,20	0,07
	IIA	84	1,39	0,09
	IIB	52	1,67	0,09
	IIIA	29	1,51	0,13
	IIIB	31	1,43	0,11

Tab.20: – Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Malignitätsgrades der verschiedenen Tumorklassifikationen der 475 Mammakarzinome

Der mittlere DNA-Malignitätsgrad der T-Klassifikation zeigt hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der 5 verschiedenen Gruppen mit niedrigeren mittleren DNA-Malignitätsgraden für die Schweregrade Tis, T1 und T4 im Vergleich zu T2

und T3. Bei Betrachtung der jeweiligen Standardfehler und der Anzahl der untersuchten Fälle ist der mittlere DNA-Malignitätsgrad der Gruppe T1 mit 1,15 ( $\pm 0,06$ ) im Vergleich zum entsprechenden Wert der Gruppe T2 mit 1,51 ( $\pm 0,06$ ) am aussagekräftigsten. Der DNA-Malignitätsgrad der Gruppe T1 ist hochsignifikant niedriger als der DNA-Malignitätsgrad der Gruppe T2. Weitere schwachsignifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten des DNA-Malignitätsgrades finden sich zwischen den Lymphknotenstadien N0 bis N2 und Nx, hochsignifikante Unterschiede zwischen den Differenzierungsgraden G1 bis G3 und signifikante Unterschiede zwischen den Stadien nach AJCC (s. Tabelle 20).

## **8.4. Retrospektive Verlaufsanalyse**

### **Überlebenszeit**

Die mittlere Überlebenszeit der Studienpatienten wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Survivalanalyse ermittelt. Hierzu wurde der jeweilige Beobachtungszeitraum des Patienten und der Status „verstorben“ bzw. „nicht verstorben“ am Beobachtungsende herangezogen.

### **Beobachtungszeitraum**

Von den 125 Patientinnen der Gesamtgruppe wurden 80 Patientinnen (64 %) mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 32,1 ( $\pm 1,8$ ) Monaten hinsichtlich ihres Krankheitsverlaufs sowie Nachbehandlung dokumentiert. 27 Patientinnen (21,6 %) sind während der Beobachtungszeit verstorben. Bei 87 Patientinnen (69,6 %) konnte zum Ende des Beobachtungszeitraums der Status „nicht verstorben“ dokumentiert werden und bei 11 Patientinnen (8,8 %) lag bezüglich des Verlaufs keine Informationen vor.

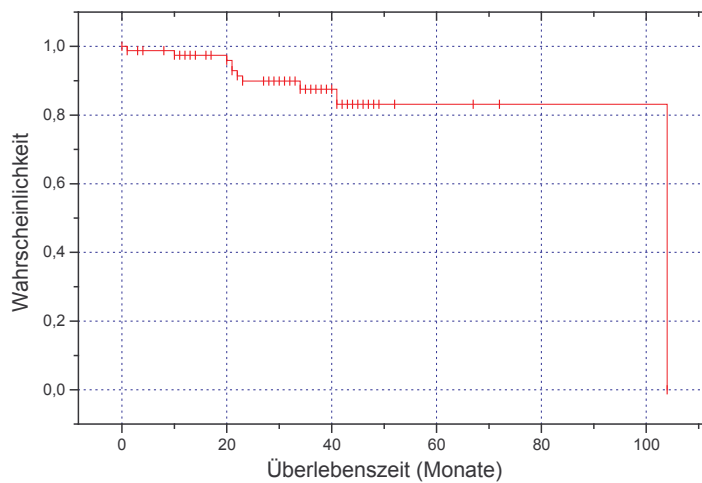


Abb.29: – Überlebenswahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten der Gesamtgruppe

### Stadieneinteilung nach AJCC

Die Auswertung der mittleren Beobachtungszeiten bezogen auf die Stadien nach AJCC ergibt die in der folgenden Tabelle 21 angegebenen Werte. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Beobachtungszeiten der verschiedenen AJCC-Stadien.

Stadium	Anzahl (N)	Mittelwert Beobachtungszeitraum (Monate)	±S.E.M.
I	19	31,3	2,8
IIA	20	32,7	2,8
IIB	17	34,9	4,0
IIIA	7	30,4	5,4
IIIB	3	24,3	10,2
<b>Gesamt</b>	<b>66</b>	<b>32,2</b>	<b>1,7</b>

Tab.21: – Mittelwerte (S.E.M.) des Beobachtungszeitraumes (Monate) bezogen auf die Stadieneinteilung nach AJCC

Auch die Überlebensanalyse mittels der Kaplan-Meier-Kurve ergibt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen

der untersuchten AJCC-Stadien. D. h., die Patientinnen mit einem Stadium I-Tumor haben keine signifikant höhere Lebenserwartung als die Stadium IIIB-Patientinnen. Tendenziell zeigt sich jedoch eine, wenn auch geringfügige, Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit mit Zunahme des Stadiums. Insgesamt ist die diesbezüglich erfasste Datenmenge zu gering, um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

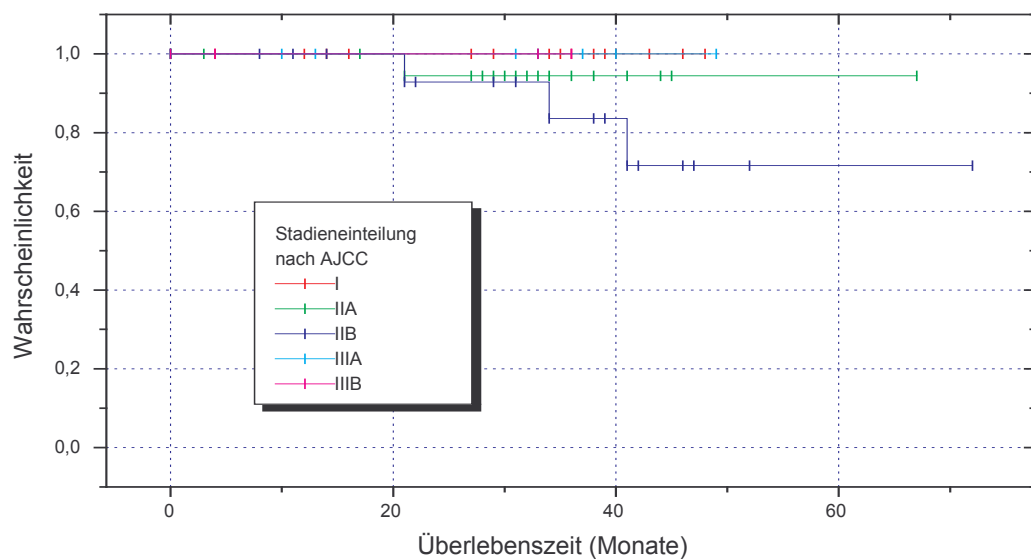


Abb.30: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die Stadieneinteilung nach AJCC

### TNM-Klassifikation

Die folgende Tabelle 22 zeigt die mittleren Beobachtungszeiten der verschiedenen Klassifikationen des TNM-Systems. Innerhalb der TNM-Klassifikation finden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mittleren Beobachtungszeiten. Tendenziell zeigt sich bei Auswertung der T-Klassifikation eine Abnahme der mittleren Beobachtungszeit mit Zunahme der Tumorgröße (T3 und T4 im Vergleich zu T1 und T2).

Tumorklassifikationen		Anzahl (N)	Mittelwert Beobachtungszeitraum (Monate)	±S.E.M.
<b>T-Klassifikation</b>	Tis	1	32,0	0,0
	T1	28	30,9	2,8
	T2	37	35,3	2,9
	T3	8	28,3	4,0
	T4	6	22,8	6,9
<b>N-Klassifikation</b> (Lymphknotenbefall II)	N0	41	30,6	1,7
	N1	24	34,7	3,4
	N2	2	29,5	19,5
	Nx	12	32,1	7,8
<b>M-Klassifikation</b>	M0	38	32,4	2,2
	M1	1	1,0	0,0
	Mx	40	32,8	2,9

Tab.22: – Mittelwerte (S.E.M.) des Beobachtungszeitraumes (Monate) bezogen auf die TNM-Klassifikation

Die folgenden Abbildungen 31-33 zeigen die Kaplan-Meier Kurven der TNM-Klassifikation. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der verschiedenen T-Klassifikationen zeigen keine signifikanten Unterschiede. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der N-Klassifikation zeigen eine schwachsignifikante Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen sinkt schwachsignifikant bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1) im Vergleich zu den Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (N0). Für die Klassifikation N2 liegen zu wenige Daten vor (2 Fälle), um zu einer signifikanten Aussage zu kommen.

Da keine Daten für die M-Klassifikation M1 (Vorhandensein von Fernmetastasen) vorliegen, kann bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von Fernmetastasen keine Aussage getroffen werden. Zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten der Gruppen M0 und Mx besteht kein signifikanter Unterschied.



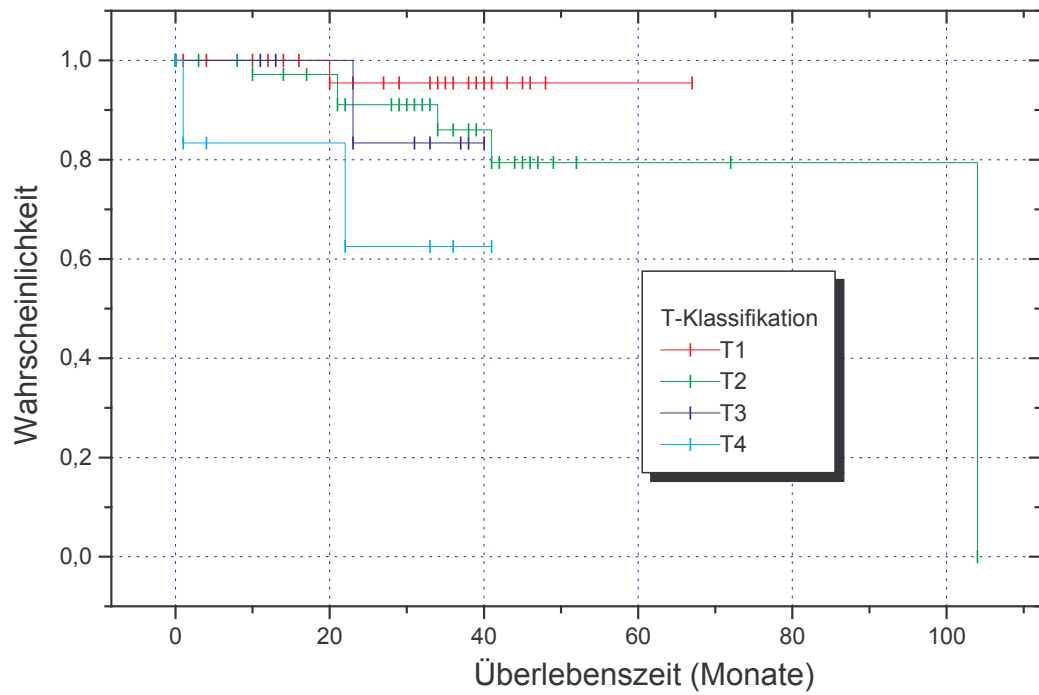


Abb.31: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die T-Klassifikation

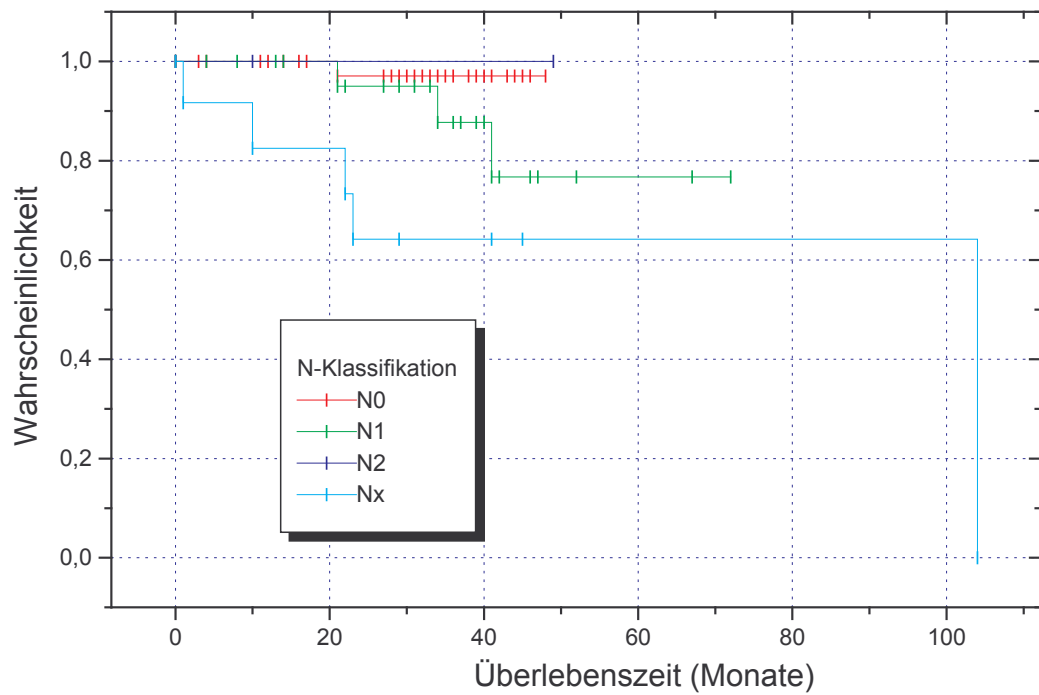
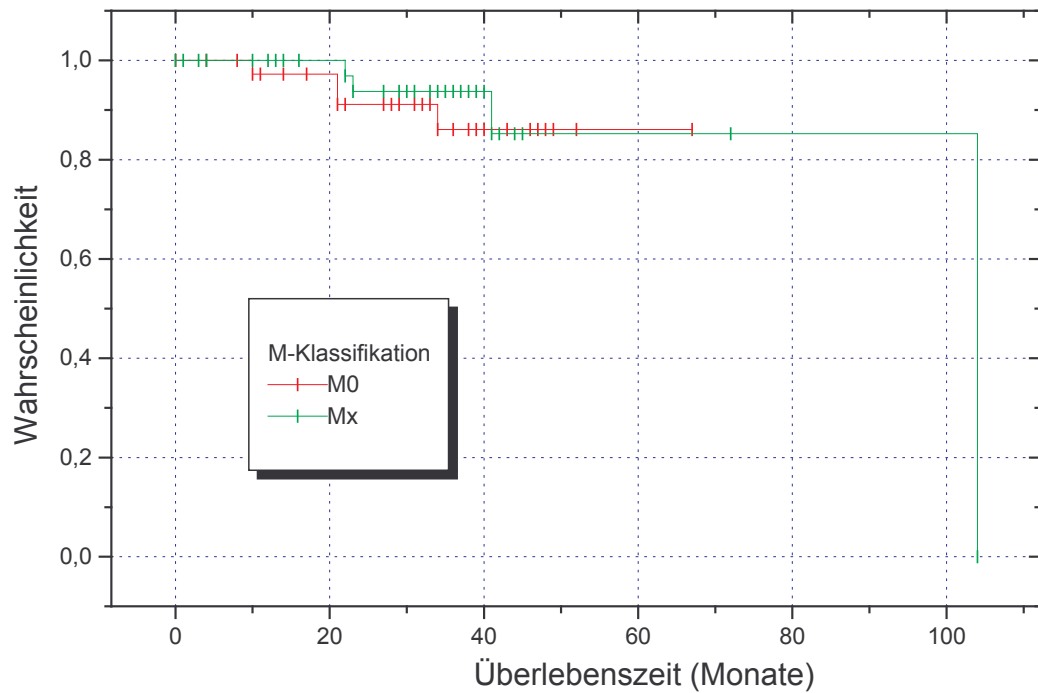


Abb.32:– Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die N-Klassifikation



*Abb.33:– Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die M-Klassifikation*

### Grading

Die mittleren Beobachtungszeiten der drei untersuchten Differenzierungsgrade G1 bis G3 zeigen einen schwachsignifikanten Unterschied. So ist die mittlere Beobachtungszeit der gut differenzierten Mammakarzinome (G1) mit 47,3 Monaten schwachsignifikant höher als die mittleren Beobachtungszeiten der Differenzierungsgrade G2 und G3 mit 29,8 und 31,4 Monaten.

<b>Grading</b>	<b>Anzahl (N)</b>	<b>Mittelwert Beobachtungszeitraum (Monate)</b>	<b>±S.E.M.</b>
G1	8	47,3	8,4
G2	51	29,8	2,1
G3	17	31,4	2,9

*Tab.23: – Mittelwerte (S.E.M.) des Beobachtungszeitraumes (Monate) bezogen auf die Differenzierungsgrade (Grading)*

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten innerhalb der drei Differenzierungsgrade G1 bis G3 zeigen keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell zeigen die gut differenzierten Mammakarzinome die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit vergleichsweise zu den mäßig und undifferenzierten Karzinomen der Mamma.

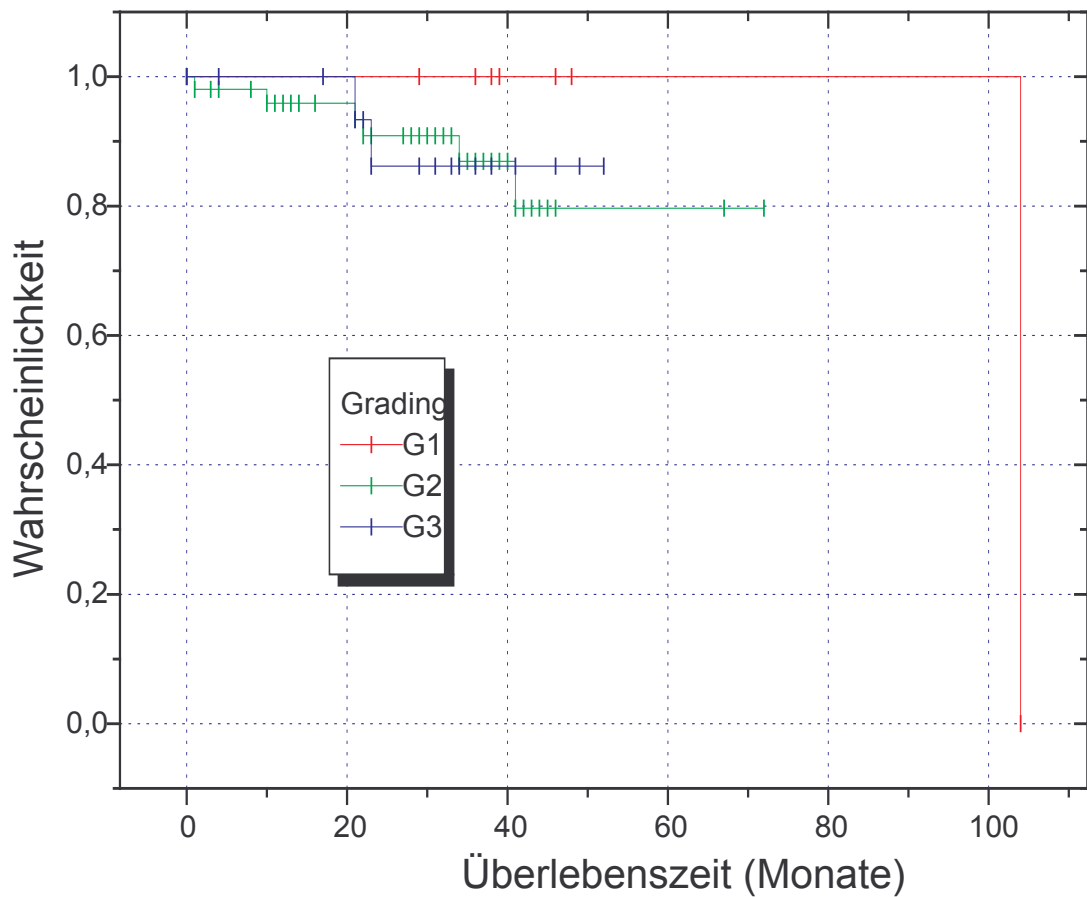


Abb.34: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf das Grading

### Stadieneinteilung nach Auer

Die mittleren Beobachtungszeiten der drei untersuchten Stadien nach Auer zeigen folgenden schwachsignifikanten Unterschied. So ist die mittlere Beobachtungszeit des Stadiums IV schwachsignifikant niedriger als die mittleren Beobachtungszeiten der Stadien II und III (s. Tabelle 24).

Stadium	Anzahl (N)	Mittelwert Beobachtungszeitraum (Monate)	±S.E.M.
II	18	38,8	3,4
III	11	36,3	7,6
IV	50	28,6	1,9

Tab.24: – Mittelwerte (S.E.M.) des Beobachtungszeitraumes (Monate) bezogen auf die Stadieneinteilung nach Auer

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Stadien nach Auer zeigen keine signifikanten Unterschiede.

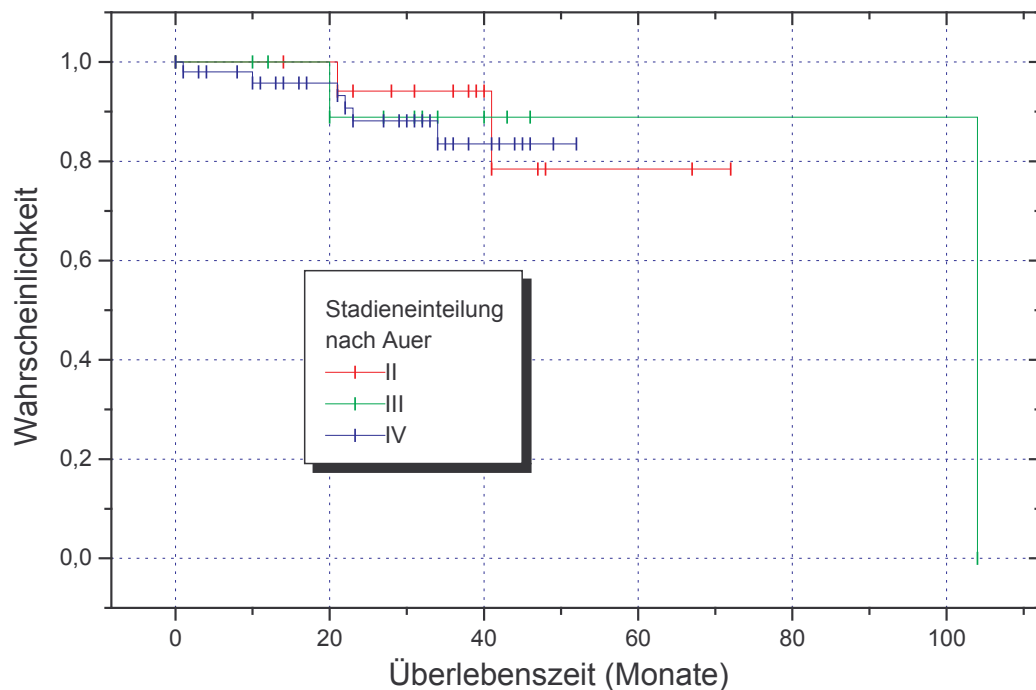


Abb.35: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die Stadieneinteilung nach Auer

### DNA-Diagnose

Die mittlere Beobachtungszeit der euploiden Mammakarzinome (14 Fälle) lag bei 34,1 ( $\pm 3,8$ ) Monaten und die der aneuploiden Mammakarzinome (65 Fälle) bei 31,6 ( $\pm 2,1$ ) Monaten. Die mittleren Beobachtungszeiten der euploiden und aneuploiden Mammakarzinome ist nicht signifikant unterschiedlich.

Auch hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeiten der eu- und aneuploiden Mammakarzinome finden sich keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der aneuploiden Karzinome etwas geringer als die der euploiden Karzinome (s. Abbildung 36).

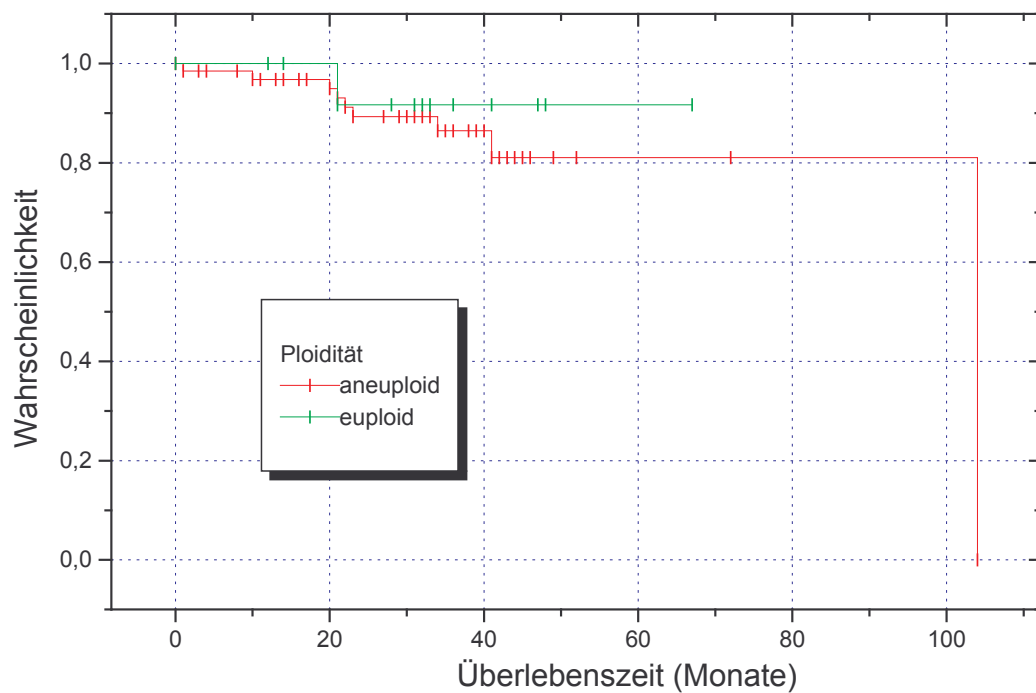


Abb.36: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die DNA-Diagnose (Ploidität)

### DNA-Index

Untersucht man drei DNA-Index-Klassen mit einer Klassenbreite von 0,10 (s. Abbildung 37), so finden sich hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeiten keine signifikanten Unterschiede.

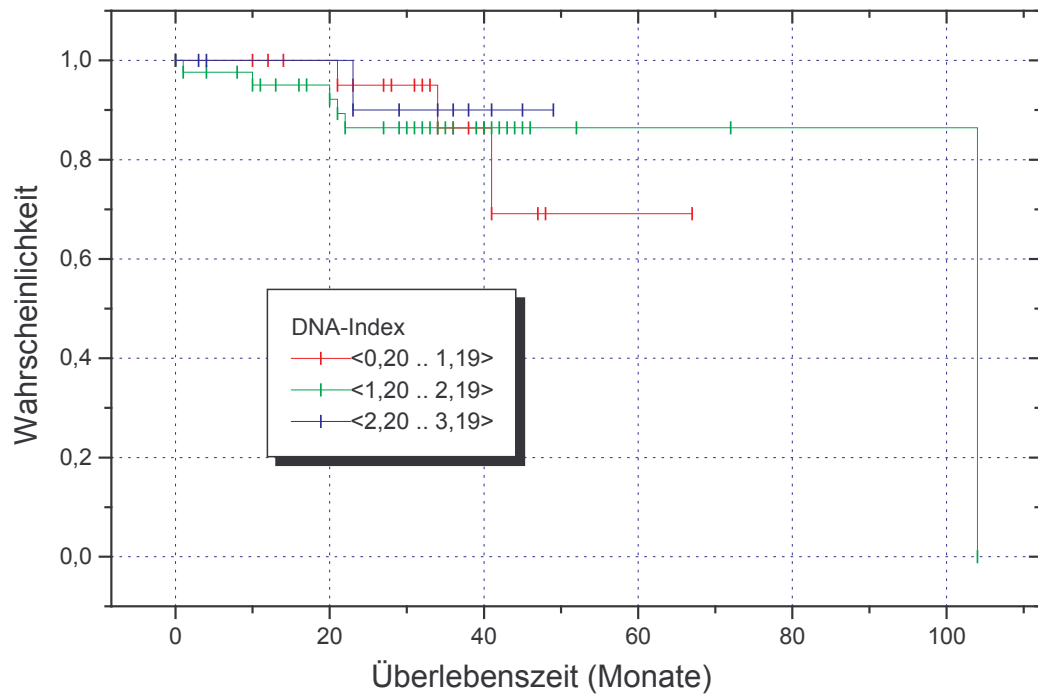


Abb. 37: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf den DNA-Index

### DNA-Malignitätsgrad

Bezüglich des DNA-Malignitätsgrades werden ebenfalls Klassen mit einer Klassenbreite von 0,1 hinsichtlich der entsprechenden Überlebenswahrscheinlichkeiten untersucht. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis, welches keine signifikanten Unterschiede innerhalb der vier untersuchten DNA-Malignitätsgrad-Klassen bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeiten aufweist.

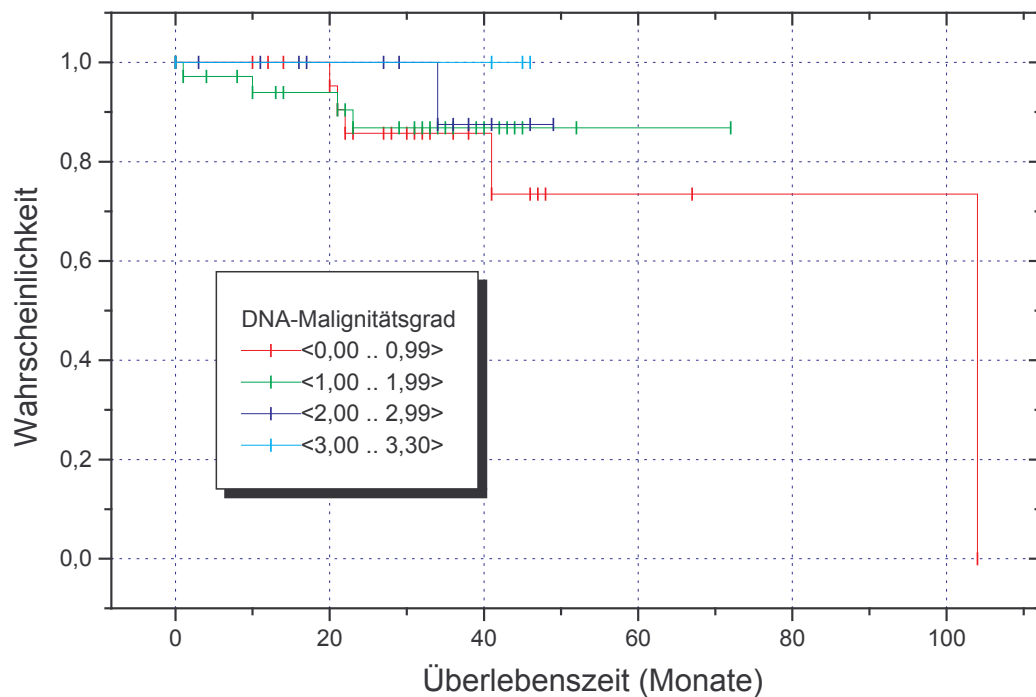


Abb. 38: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf den DNA-Malignitätsgrad

### Vollremission

Bei 113 (90,4 %) Patientinnen wurde dokumentiert, ob zum Ende des Beobachtungszeitraumes eine Vollremission stattgefunden hatte oder nicht. Wie bei der Überlebenszeit wird im folgenden eine Kaplan-Meier-Kurve für die verschiedenen untersuchten Parameter erstellt, um zu zeigen, wie wahrscheinlich das Eintreten einer Vollremission in Abhängigkeit von dem entsprechenden Parameter ist.

Bei 78 (62,4 %) Patientinnen war am Ende des Beobachtungszeitraumes eine Vollremission eingetreten. Bei 35 (28,0 %) der Patientinnen war zu diesem Zeitpunkt keine Vollremission eingetreten und bei 12 (9,6 %) Patientinnen war am Ende der Studie der Zustand hinsichtlich Vollremission oder nicht unbekannt.

Der mittlere Beobachtungszeitraum der Patientinnen mit Vollremission lag bei 33,7 ( $\pm 1,5$ ) Monaten und derjenigen ohne Vollremission bei 29,5 ( $\pm 8,1$ ) Monaten. Es

liegt hinsichtlich des mittleren Beobachtungszeitraumes der beiden Gruppen „Vollremission“ und „keine Vollremission“ kein signifikanter Unterschied vor.

Abbildung 39 zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Vollremission anhand der Daten der Gesamtgruppe.

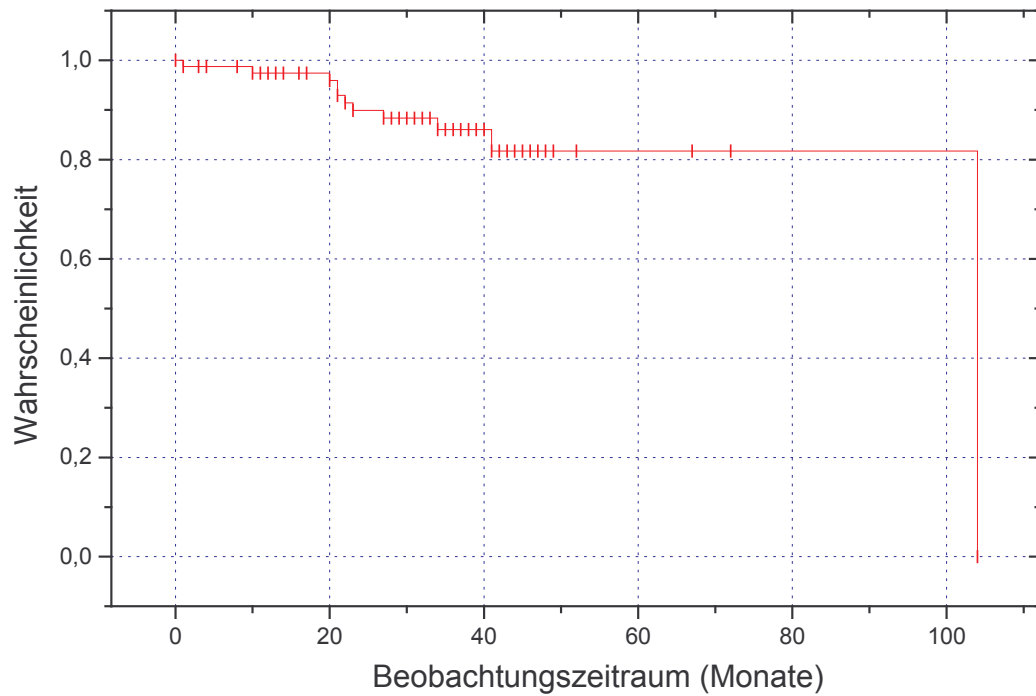


Abb.39: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“

Wie bei der Überlebenszeit zeigen die folgenden Abbildungen die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten des Ereignisses „Vollremission“ bezogen auf die verschiedenen histopathologischen und DNA-zytometrischen Parameter. Es finden sich hier keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten Parametern hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Vollremission.



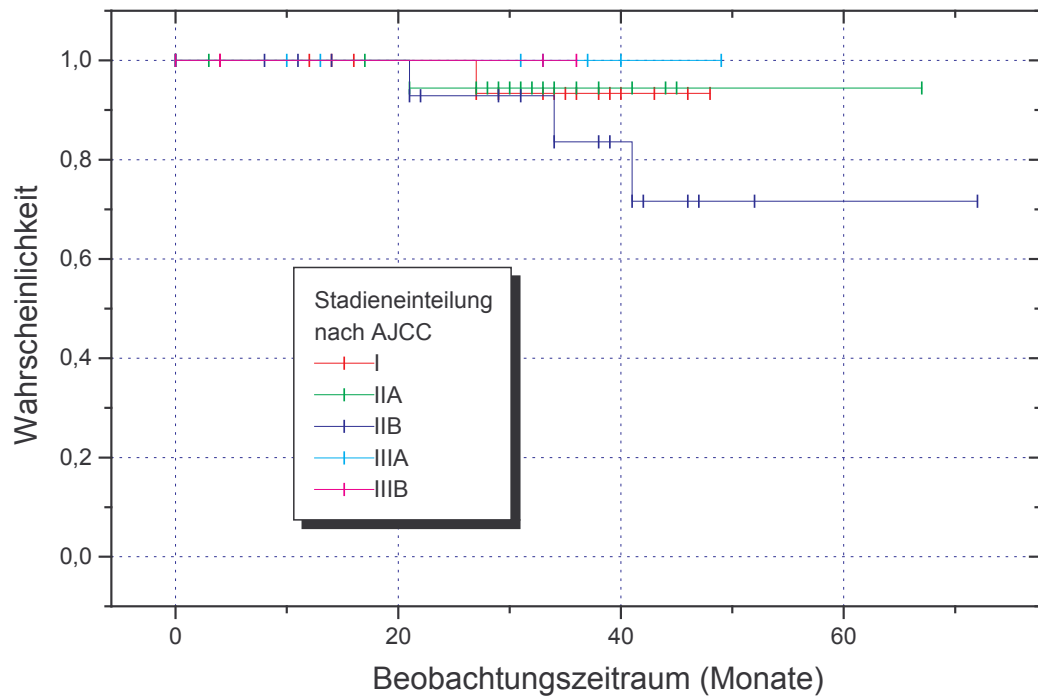


Abb.40: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die Stadieneinteilung nach AJCC

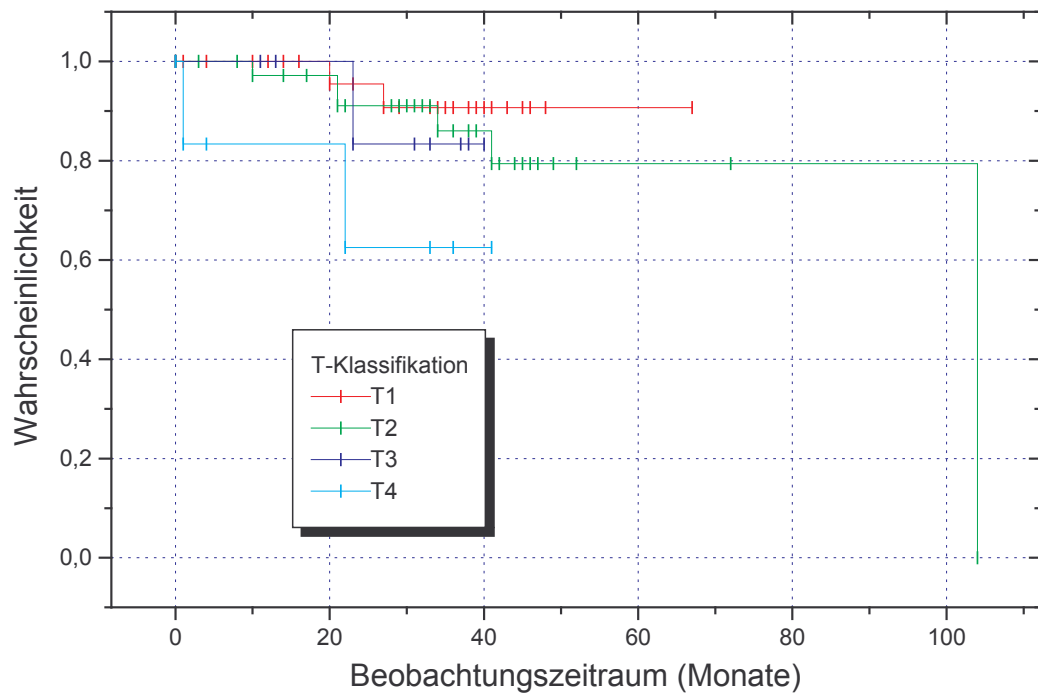


Abb.41: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die T-Klassifikation

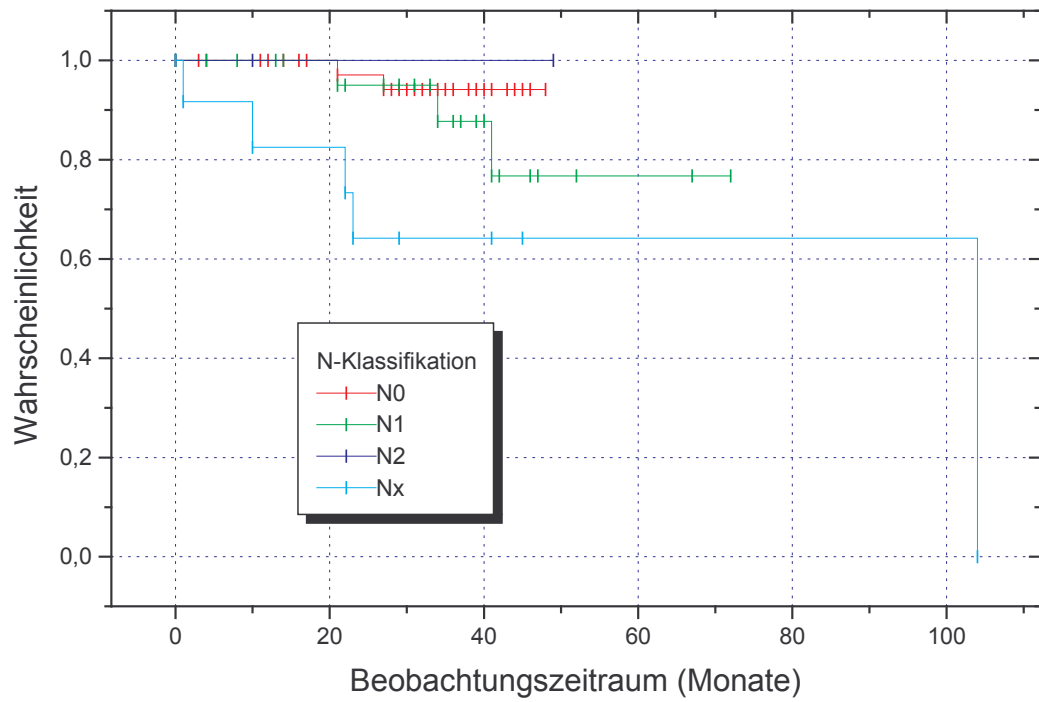


Abb.42: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die N-Klassifikation

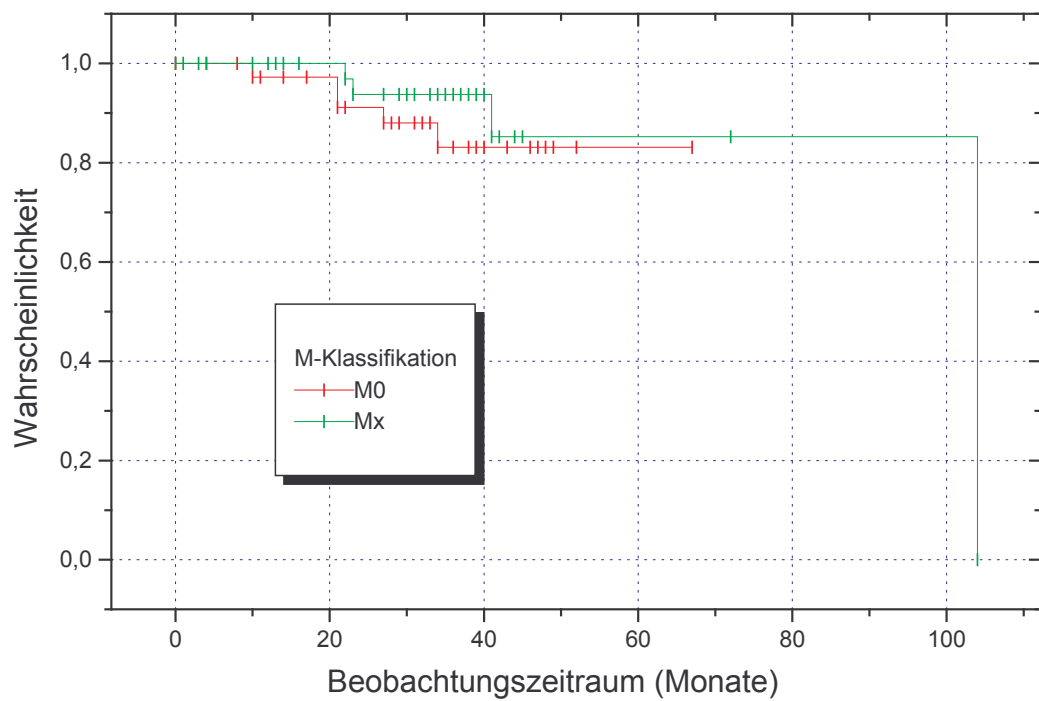


Abb.43: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die M-Klassifikation

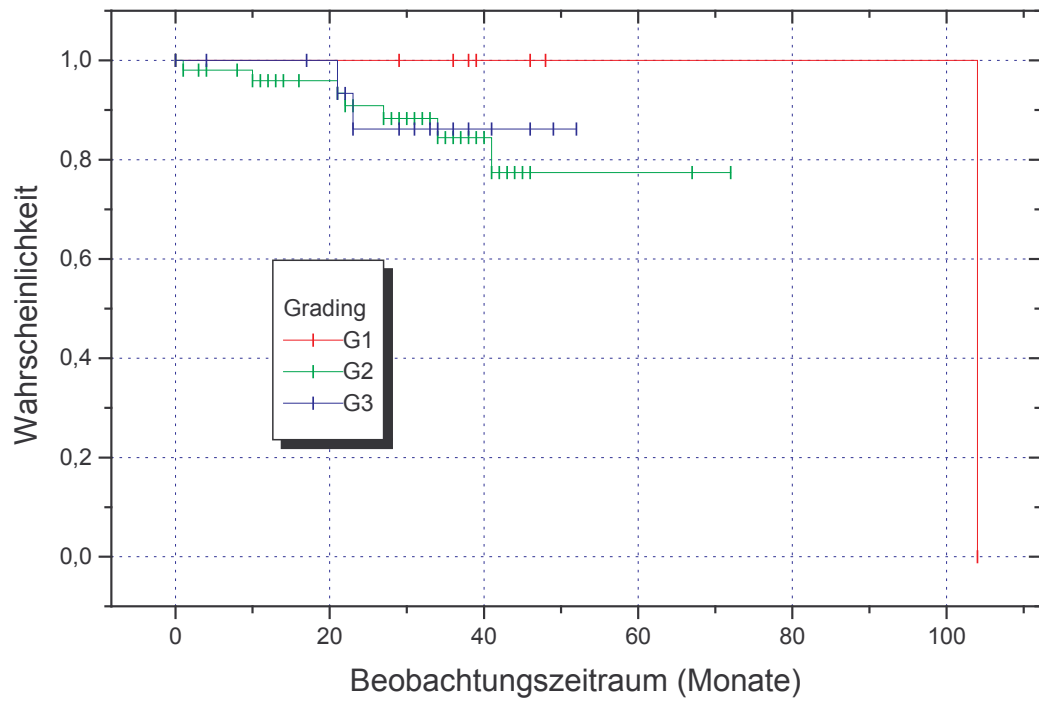


Abb.44: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf das Grading

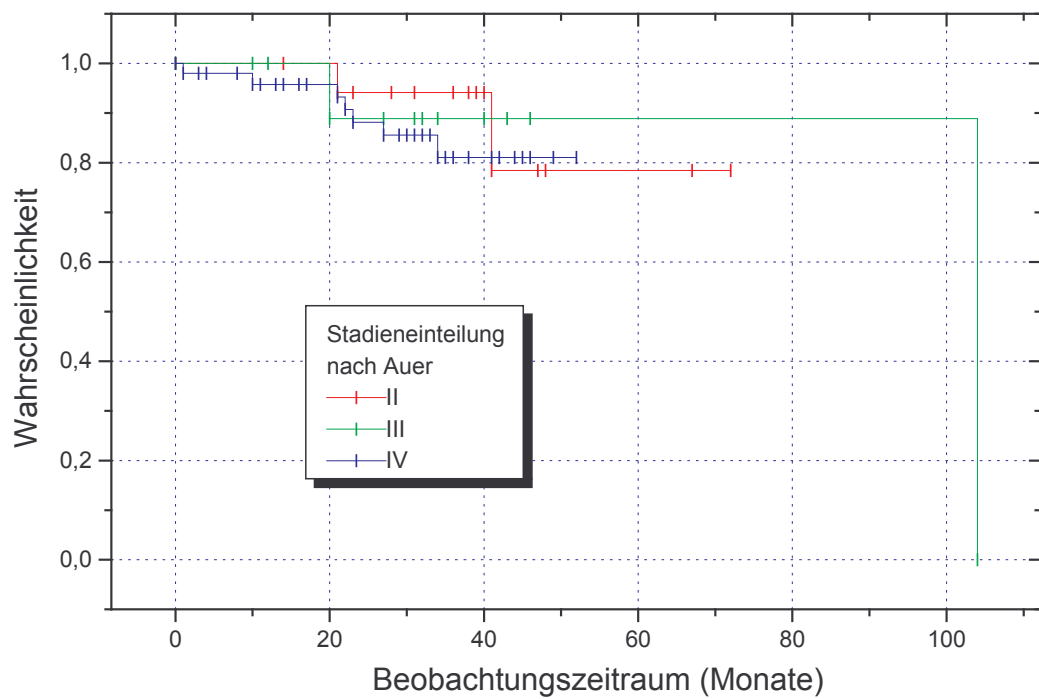


Abb.45: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die Stadieneinteilung nach Auer

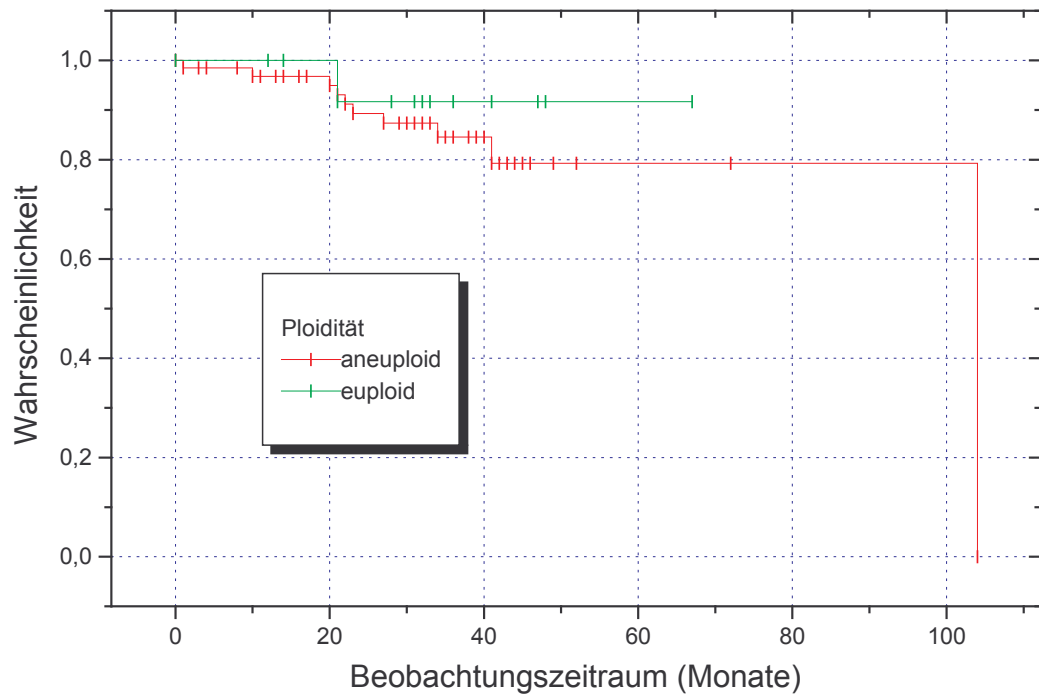


Abb.46: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf die DNA-Diagnose (Ploidität)

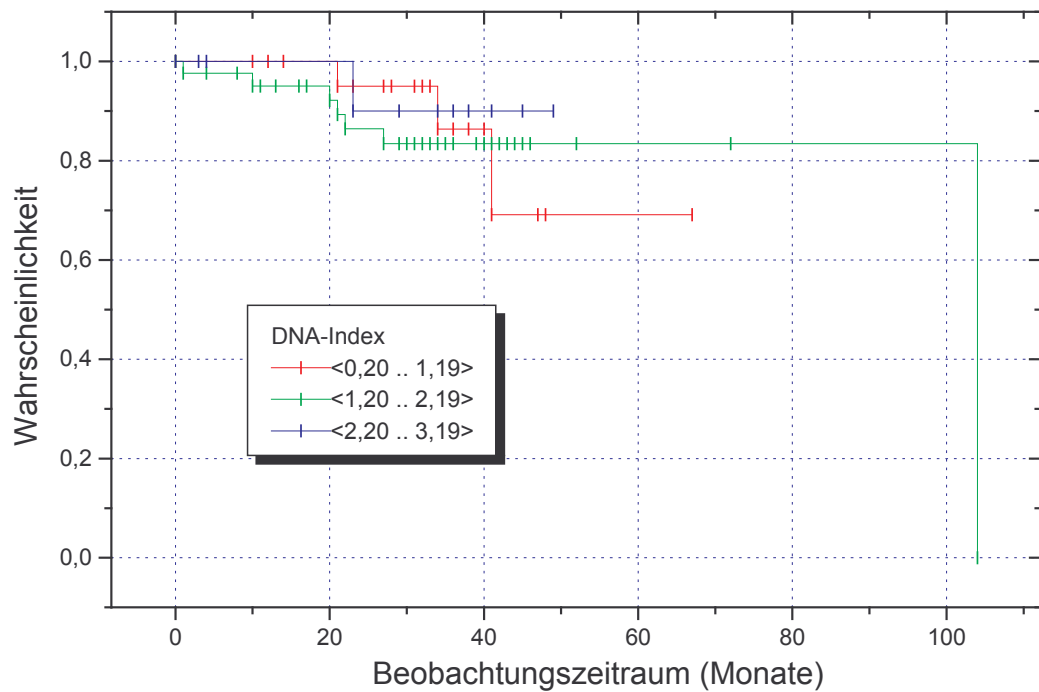


Abb.47: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf den DNA-Index

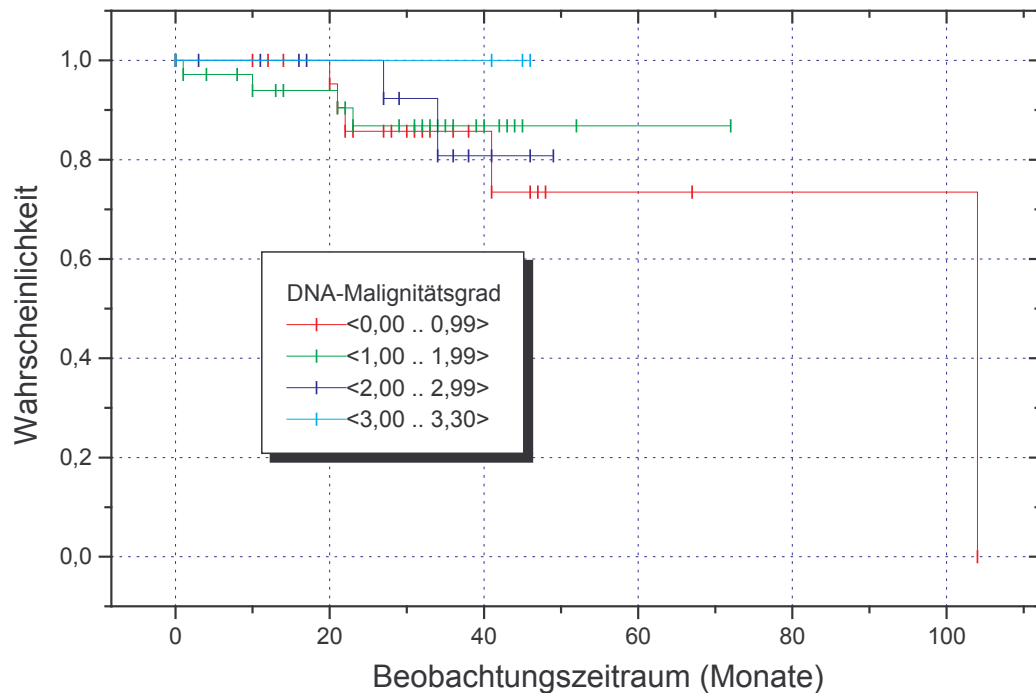


Abb.48: –Wahrscheinlichkeit (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten für das Ereignis „Vollremission“ bezogen auf den DNA-Malignitätsgrad

### Rezidiv

Bei den 125 Patientinnen der Gesamtgruppe wurde bei 32 (25,6 %) das Auftreten eines Rezidivs registriert. Bei den verbliebenen 93 (74,4 %) Patientinnen trat entweder kein Rezidiv auf (s. a. Kapitel „Vollremission“) oder der Verlauf war aufgrund fehlender Informationen unbekannt.

Die folgende Tabelle 25 zeigt die Häufigkeit des Auftretens eines Rezidivs innerhalb der verschiedenen histopathologischen und DNA-zytometrischen Einteilungen. Für die Stadieneinteilung nach AJCC findet sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit eines Rezidivs zwischen den beschriebenen Stadien. Trat ein Rezidiv auf, so war der Primärtumor in 77,8 % der Fälle den Stadien IIB, IIIA und IIIB zuzuordnen

Tumorklassifikationen		Rezidiv					
		Ja			Nein		
		Anzahl	%*	%**	Anzahl n	%*	%**
* Spaltenhäufigkeit in Prozent		n					
** Zeilenhäufigkeit in Prozent							
<b>T- Klassifikation</b>	Tis	0	0,0	0,0	1	1,1	100,0
	T1	5	16,1	11,9	37	39,8	88,1
	T2	17	54,8	29,8	40	43,0	70,2
	T3	5	16,1	38,5	8	8,6	61,5
	T4	4	12,9	36,4	7	7,5	63,6
<b>N- Klassifikation</b>	N0	6	18,8	11,3	47	51,1	88,7
	N1	17	53,1	36,2	30	32,6	63,8
	N2	5	15,6	62,5	3	3,3	37,5
	Nx	4	12,5	25,0	12	13,0	75,0
<b>M- Klassifikation</b>	M0	13	40,6	22,0	46	50,0	78,0
	M1	1	3,1	33,3	2	2,2	66,7
	Nx	18	56,3	29,0	44	47,8	71,0
<b>Grading</b>	G1	2	6,5	16,7	10	10,9	83,3
	G2	16	51,6	21,1	60	65,2	78,9
	G3	12	38,7	40,0	18	19,6	60,0
	Gx	1	3,2	20,0	4	4,3	80,0
<b>Stadien nach AJCC</b>	I	3	11,1	11,5	23	29,1	88,5
	IIA	3	11,1	10,0	27	34,2	90,0
	IIB	10	37,0	37,0	17	21,5	63,0
	IIIA	8	29,6	50,0	8	10,1	50,0
	IIIB	3	11,1	42,9	4	5,1	57,1
<b>Stadien nach Auer</b>	II	8	25,8	25,8	23	25,0	74,2
	III	3	9,7	21,4	11	12,0	78,6
	IV	20	64,5	25,6	58	63,0	74,4

Tab.25: –Häufigkeiten für das Auftreten eines Rezidives innerhalb der verschiedenen Tumorklassifikationen

Nur jeweils 11,1 % der Patientinnen mit Rezidiv hatten einen Stadium I oder Stadium IIA Primärtumor. In der Gruppe der Patientinnen ohne Rezidiv (bzw. Information fehlend) hingegen hatten 63,3 % einen Primärtumor der Stadien I und IIA.

Für die T- und M-Klassifikation, das Grading und die Stadieneinteilung nach Auer finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Analyse der N-Klassifikation zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und dem Lymphknotenstatus des Erstbefundes. Bei den Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (N1 und N2) trat in 40 % der Fälle (22 von 55 Patientinnen) ein Rezidiv auf, während nur 11,3 % der Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen (N0) ein Rezidiv entwickelten.

Die DNA-Diagnose (Ploidität) des Primärtumors zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit. Von 22 euploiden Mammakarzinomen entwickelten 7 (31,8 %) ein Rezidiv und bei den 102 aneuploiden Karzinomen trat in 25 Fällen (24,5 %) ein Rezidiv auf. Von 32 Rezidivpatienten hatten 25 (78,1 %) einen aneuploiden Primärtumor der Mamma und 7 (21,9 %) einen euploiden Primärtumor. Bei den rezidivfreien Patientinnen lag in 77 Fällen (83,7 %) ein aneuploider und in 15 Fällen (16,3 %) ein euploider Primärtumor vor.

Der Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) des DNA-Index lag für die Tumoren, welche später ein Rezidiv entwickelten, bei 1,66 ( $\pm$ 0,11) und für die rezidivfreien Verläufe bei 1,72 ( $\pm$ 0,06). Es findet sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des mittleren DNA-Index zwischen den Primärtumoren mit späterem Rezidiv und jenen ohne Rezidiventwicklung.

Für den DNA-Malignitätsgrad gilt gleiches. Der Mittelwert ( $\pm$ S.E.M.) liegt für die Tumoren mit späterem Rezidiv bei 1,45 ( $\pm$ 0,12) und für die rezidivfreien Tumore bei 1,44 ( $\pm$ 0,08).

Auf die Überlebenswahrscheinlichkeiten hatte die Entwicklung eines Rezidives ebenfalls keinen signifikanten Einfluß (s. Abbildung 49).

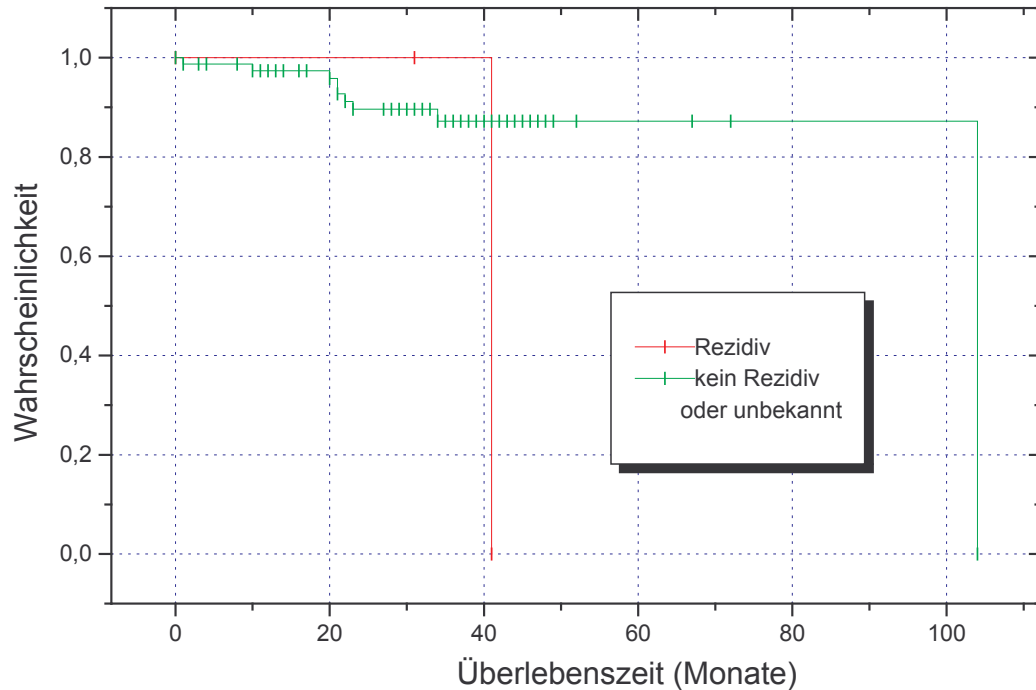


Abb.49: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf das Ereignis „Rezidiv“

## 8.5. Nachbehandlung

Bei den Patientinnen wurde dokumentiert, ob eine adjuvante Nachbehandlung in Form einer Chemotherapie oder Strahlentherapie bzw. die Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie stattfand. Bei 15 (11,6 %) Patientinnen wurde eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt, bei 36 (27,9 %) Patientinnen eine Strahlentherapie und 20 (15,5 %) der insgesamt 125 Patientinnen erhielten eine Chemo- sowie eine Strahlentherapie. Bei 45,0 % der Patientinnen (58 Fälle) fand keine Chemo- oder Strahlentherapie statt. 56 Patientinnen (44,8 %) erhielten im Anschluss an die operative Versorgung des Primärtumors eine adjuvante Therapie. Von den Rezidivfällen wurden (von 33 dokumentierten Fällen) 26 Fälle (78,8 %) adjuvant nachbehandelt. In 11 dieser Fälle erfolgte sowohl im Anschluss an die Operation



des Primärtumors als auch nach Diagnose des Rezidives eine adjuvante Therapie in Form einer Chemotherapie und/oder Strahlentherapie.

Bei den 56 primär adjuvant therapierten Patientinnen trat in 14 Fällen (25 %) ein Rezidiv auf und bei 69 nicht nachbehandelten Patientinnen trat in 18 Fällen (26,1 %) ein Rezidiv auf. Somit ist die Rezidivrate bei den adjuvant nachbehandelten Patientinnen nicht signifikant unterschiedlich zur Rezidivrate der Patientinnen ohne adjuvante Therapie.

Die Tatsache einer adjuvanten Therapie war nicht stadienspezifisch. So wurden von 26 Patientinnen des Stadiums I nach Auer 17 (65,4 %) primär adjuvant nachbehandelt, von 30 Stadium IIA Patientinnen 12 (40,0 %), von 27 Stadium IIB Patientinnen 11 (40,7 %), von 16 Stadium IIIA Patientinnen 6 (37,5 %) und von 7 Patientinnen des Stadiums IIIB 3 (42,9 %). Es bestehen somit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Tatsache „Nachbehandlung“ bzw. „keine Nachbehandlung“ für die verschiedenen Stadien der Einteilung nach AJCC.

Für die einzelnen Stadien der TNM-Klassifikation und des Gradings bestehen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Durchführung einer adjuvanten Nachbehandlung nach operativer Therapie des Primärtumor oder nach Diagnose eines Rezidives.

Auch die DNA-zytometrischen Faktoren Ploidität, DNA-Index und DNA-Malignitätsgrad sowie die Stadieneinteilung nach Auer weisen hinsichtlich einer adjuvanten Therapie keine signifikanten oder tendenziellen Unterschiede auf.

Die Tatsache einer Nachbehandlung des Mammakarzinoms sowie die Art der Nachbehandlung hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeiten (s. Abbildungen 50 und 51).

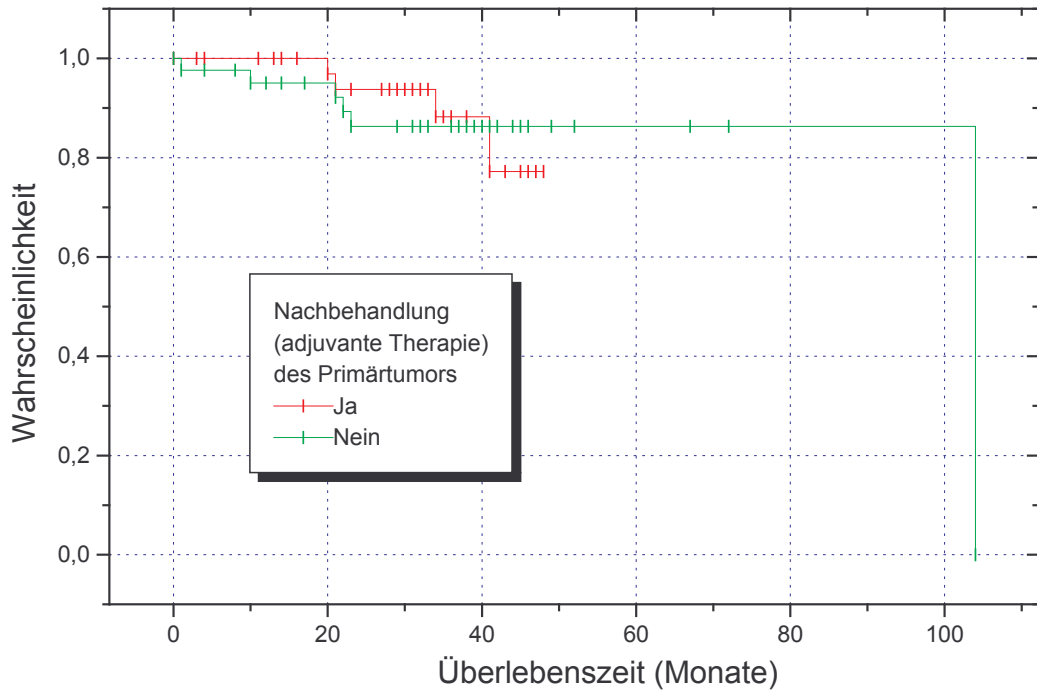


Abb. 50: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die Tatsache einer Nachbehandlung des Primärtumors

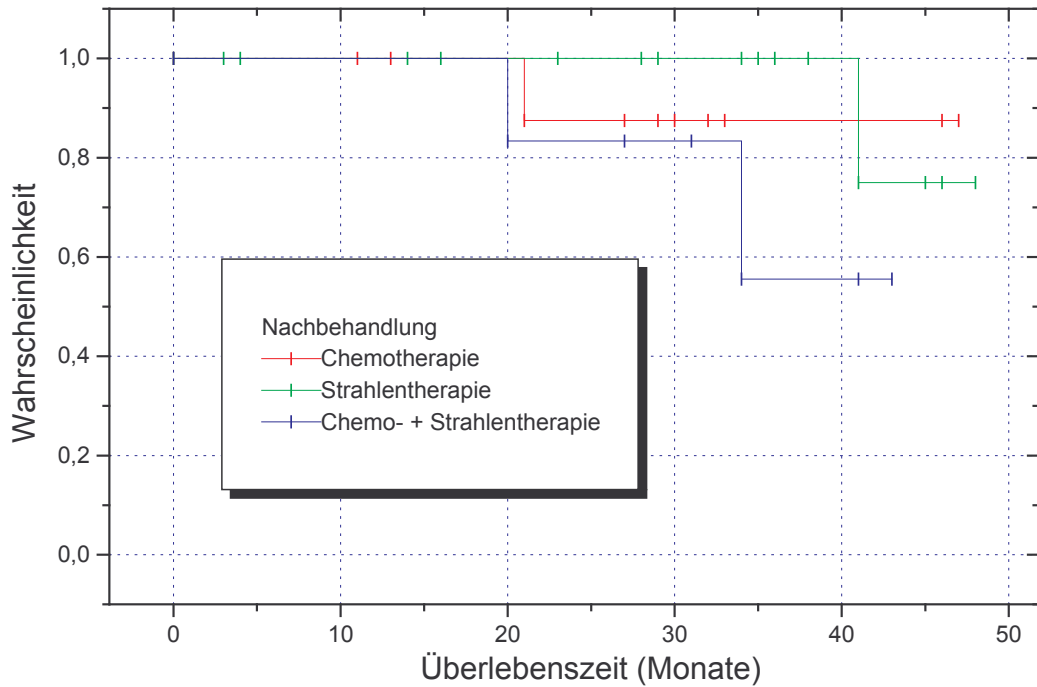


Abb. 51: – Überlebenswahrscheinlichkeiten (Kaplan-Meier-Kurve) in Monaten bezogen auf die Art der Nachbehandlung

## 9. Diskussion

Das Mammakarzinom ist immer noch in der Todesstatistik des weiblichen Geschlechtes führend (Becker et al.1984; Stat. Bundesamt 1995). Wegen der noch steigenden Zunahme der Karzinomerkrankung sind eine frühzeitige Erkennung und eine detaillierte Diagnostik zur Einleitung einer spezifischen Therapie erforderlich, um einen prognostisch günstigen Verlauf der Erkrankung zu erzielen. Ziel ist eine Heilung der Karzinomerkrankung! Sollte dies jedoch nicht erreicht werden, dann ist bei optimaler Therapie eine Verlängerung der Lebensquantität unter Beachtung einer möglichst hohen Lebensqualität anzustreben!

Dieses Ziel ist von vielen Faktoren abhängig und es ist schwer den Verlauf einer Karzinomerkrankung vorherzusagen. Darum ist jede systematische Untersuchung, sei es klinisch oder apparativ, zur Früherkennung des Karzinoms und zum frühen Rezidivnachweis von entscheidender Bedeutung für die Prognose. Neben Anamnese, Inspektion, körperlicher Untersuchung, Sonographie, Mammographie oder MRT ist die operative Gewebeentnahme zur Gewinnung histologischer Parameter prognostisch entscheidend. Die Untersuchungen am entnommenen Tumorgewebe sind nach heutigem Standard schon sehr differenziert und weitreichend aussagekräftig. Die Kenntnisse der histologischen Bestimmung der Tumorstadien TNM, des Grading, der Hormonrezeptoren und des Wachstumsfaktorrezeptor HER2 sind unverzichtbare Parameter für die Behandlung des Mammakarzinoms. Ergänzend zu diesen Informationen hat sich heutzutage ein weiterer zusätzlicher Diagnostikbereich entwickelt, der noch differenziertere Aussagen über die Heilungschancen des Mammakarzinoms bieten kann, - die zytogenetische Untersuchung des Tumorgewebes.

Im Rahmen dieser speziellen Untersuchung werden in dieser Arbeit die Parameter DNA-Diagnose (Ploidie), DNA- Index, DNA-Malignitätsgrad und zytogenetische Stadieneinteilung nach Auer, bestimmt durch die computergestützte bildanalyti-

sche DNA-Zytometrie, besonders betrachtet. Die Aussagefähigkeit bezüglich der Prognose wird mit den histologischen Parametern auf Korrelation verglichen.

Im Ergebnisteil (Kapitel 8) wurden aus einem, unselektierten Operationsgut von 469 Mammakarzinomen neben den klassischen Prognoseparametern der Histomorphologie, der Stadieneinteilung in TNM und AJCC und dem Grading zusätzlich DNA-Diagnose (Ploidie), DNA-Index, DNA-Malignitätsgrad und Stadieneinteilung nach Auer erhoben. Von diesem Patientengut wurde bei 125 Mammakarzinomen zusätzlich retrospektiv der Erkrankungsverlauf in der Zeit von 1 Monat bis 8 Jahre nach Diagnosefeststellung betrachtet. Desweiteren wurde berücksichtigt, ob und welche adjuvante Nachbehandlung bei diesen 125 Patienten stattgefunden hat.

Das Alter der an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen war von 21 bis 86 Lebensjahre gestreut, wobei mit 35 % im 5. Lebensjahrzehnt (51-60 Lj.) die maximale Häufigkeit der Karzinomerkrankten vorhanden war.

Die einzelnen prognostischen Parameter wurden mittels  $\chi^2$ -Test auf signifikante Beziehung zueinander untersucht. Die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse erfolgte unter besonderer Berücksichtigung tumorbiologischer Aspekte und Einbeziehung histomorphologischer auffälliger Befunde.

### **9.1. Histomorphologische Untersuchungen (TNM- und AJCC-Klassifikation, Grading)**

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung des Patientengutes bei der TNM-Klassifikation zeigen für die Tumorgroße ein Überwiegen der Erkrankten in den T-Stadien T1 (34%) und T2 (45%). Die Ausdehnung des Lymphknotenbefalls der Erkrankten kann in den N-Stadien N0 (42%) und N1-3 (38%) als ausgewogen bezeichnet werden. Das Vorhandensein von Metastasen bei den Erkrankten drückt sich in der M-Klassifizierung M0 (47%) aus und ist als ebenfalls ausgewogen zu bezeichnen, wobei aber hier zu beachten ist, dass bei 49% des Patientengutes keine definitive Aussage möglich war. In Kenntnis dieser Parameter erfolgte

dann die Umsetzung in die Einteilung nach AJCC. In dieser Einteilung sind in den Stadien I, IIA und IIB je 25 % Erkrankungshäufigkeiten zu verzeichnen. Hierbei ist festzustellen, dass kein signifikanter Unterschied des mittleren Erkrankungsalters zu diesen einzelnen Stadien besteht. Bei der Bestimmung des Grading besteht bei der Mehrzahl der Patienten eine mäßige Differenzierung G2 (65%). Auch ist hierbei kein signifikanter Unterschied von Gradingstadium und mittlerem Erkrankungsalter vorhanden. Die Ergebnisse dieser Arbeit, bezogen auf Einteilung in TNM, AJCC und Tumorgrading, zeigen eine deutliche Übereinstimmung mit den Aussagen anderer Studien. (Achenbach W, 1993, Becker N.1984, Granitzka S.1995, Prechtel K.1993, Statistisches Bundesamt 1995).

## **9.2. DNA - zytometrische Untersuchungen**

Eine der wesentlichen Anforderungen an Prognosefaktoren besteht darin, dass prognostische Parameter eine tumorbiologische Hypothese als Grundlage aufweisen sollten (Jänicke 1995). Die Proliferationskinetik stellt einen wichtigen Teilaspekt bei der Charakterisierung des biologischen Verhaltens von Neoplasien dar. Verschiedene Nachweisverfahren zur Erfassung proliferationskinetischer Phänomene beim Mammakarzinom stehen im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Neben immunhistochemischen Methoden, die Proliferationsantigene oder Enzyme im Zellzyklus identifizieren, und histomorphologischen Untersuchungen werden auch DNA-zytometrische Messungen am Tumorgewebe durchgeführt. Durch spezifische Anfärbungen der DNA kann das Verhalten der DNA abgeleitet und daraus der proliferative Zustand photometrisch ermittelt werden. Nicht alle diese Verfahren erfüllen die geforderten Standards, um routinemäßig klinische Einsetzbarkeit zu erlangen. Hohe Spezifität und Sensivität bezüglich der Erkennung der proliferierenden Zellen, einfache und schnelle Durchführbarkeit der Nachweismethoden, niedrige Kosten, Reproduzierbarkeit und nachweislich prognostische Validität sind einige grundlegende Voraussetzungen, die diese Nachweisverfahren erfüllen sollten (Mc Grogan et al.,1997).

Die Einschätzung der Bösartigkeit eines Malignoms ist eine zentrale Frage der Onkologie. Bei den Untersuchungen am genetischen Material der malignen Zellen steht das Ziel im Vordergrund, ein besseres Verständnis des biologischen Verhaltens von Tumoren zu erlangen (Kristen et al., 1991). Die DNA-Zytometrie, als ein technisch relativ einfaches, wenig aufwendiges, automatisiertes Verfahren erscheint sehr geeignet, tumorbiologische und zytogenetische Verhaltensweisen eines malignen Tumors aufzudecken. Ihre Aufgabe besteht vor allem darin, histopathologische Diagnosen durch quantitative Daten zur Proliferation und Ploidie zu ergänzen (Sinn et al., 1997).

Eine Verbesserung der Therapieeffizienz und die Vermeidung unnötiger adjuvanter Therapien sind nur durch eine prognoseorientierte Selektion möglich. Neben konventionellen Prognosefaktoren steht daher die Suche nach weiteren, alternativen bzw. ergänzenden Parametern im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses, die eine Einordnung von Patientinnen in eine low-risk- und high-risk-Gruppe zulassen. Klassische Staging- und Grading-Systeme sind als „Momentaufnahme“ der Tumorausdehnung bzw. der histomorphologischen Entdifferenzierung zu einem gegebenen Zeitpunkt zu verstehen (Fallenius et al., 1988 b). Demgegenüber besteht ein wachsendes Interesse an objektiven, reproduzierbaren Prognosefaktoren, die eine Aussage über das tumorbiologische Verhalten, die Proliferationsaktivität und eine erhöhte Aggressivität des Tumors, z. B. aufgrund genomischer Instabilität, zulassen. Zahlreiche Arbeiten haben speziell für das Mammakarzinom eine deutliche prognostische Wertigkeit des quantitativen DNA-Gehalts für den klinischen Verlauf dargestellt (Balslev et al., 1994; Norden et al., 1994; Fallenius et al., 1988 a). Die DNA-Zytometrie bietet sich als ein technisches Verfahren zur Messung des Ploidiegrades von Tumoren auch im klinischen Alltag an (Kristen et al., 1991).

Der Ursprung dieser Methode geht auf die Idee von Caspersson (1936) zurück, der bereits damals den DNA-Gehalt von Zellkernen bestimmen konnte. Zu den Techniken, die für die Bestimmung der Ploidie des Mammakarzinoms angewandt werden, gehören die statische Zytometrie und die DNA-Durchflußzytometrie. Bei der statischen DNA-Zytometrie werden zytologische Abklatsch- („Imprint“-) Präparate DNA-spezifisch angefärbt, in der Regel nach der Feulgen-Methode. Mittels

einer rechnergestützten Bildanalyse wird der DNA-Gehalt des einzeln erfaßten Zellkerns gemessen. Durch die gleichzeitige zytologische Beurteilung können zusätzlich morphologische Kriterien einbezogen werden. Bei der statischen DNA-Zytometrie besteht auch die Möglichkeit zur Messung sehr kleiner Gewebeprobe sowie aspirationstechnisch gewonnenen Tumormaterials. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, tausende Einzelzellen in relativ kurzer Zeit zu messen. Nur so ist auch eine statistisch zuverlässige Aussage über den Anteil der Zellen in der Synthesephase (S-Phase) möglich. Nachteilig ist, dass eine direkte morphologische Begutachtung der Zellen nicht möglich ist, so dass immer ein gewisser Anteil von Tumorstromazellen und Detritus mitgemessen wird. Bei aneuploiden, insbesondere multiploiden Tumoren, ist zudem die Abschätzung der S-Phase erschwert bzw. unmöglich, wenn es zu einer Überlagerung der verschiedenen Zellpopulationen kommt. Bei stromareichen, diploiden Tumoren wird die S-Phase zu niedrig errechnet, da neoplastische und nicht-neoplastische Zellen gleichermaßen in die Berechnung eingehen (Sinn et al., 1997 b; Jonat et al., 1994; Kristen et al., 1991). In der statischen DNA-Zytometrie werden häufig andere Deskriptoren als für die Durchflußzytometrie herangezogen. Weit verbreitet ist die Klassifikation der DNA-Zytophotogramme nach Auer et al. (1980). Ferner besteht die Möglichkeit der Ploidie-Beurteilung eines Tumors durch die Stammlinien-Interpretation. Die Stammlinie bezieht sich auf den modalen, d.h. am häufigsten vorkommenden DNA-Gehalt einer Zellpopulation. Liegt dieser Modalwert in einem aneuploiden Bereich, wird Aneuploidie der gesamten Population angenommen (Böcking et al., 1990). Die Stammlinien-Interpretation ist vergleichbar mit dem bei der Durchflußzytometrie häufig angewandten DNA-Index. Der DNA-Index ist der Quotient aus dem modalen DNA-Wert der gemessenen Tumorzellpopulation und dem modalen DNA-Wert der Referenzzellen und definiert somit die Lage der sog. Stammlinie.

Es herrscht weitgehender Konsens bezüglich der Verknüpfung zwischen Aneuploidie und erhöhter Tumoraggressivität (Peiro et al., 1997). Bei der Bestimmung der Ploidität konnte eine statistisch signifikante Beziehung zwischen DNA-Malignitätsgrad und AUER-Histogramm-Klassifikation in der vorliegenden Arbeit

festgestellt werden. Auch mehrere andere Arbeitsgruppen kamen übereinstimmend zu dem Befund, dass aneuploide Karzinome vorwiegend mit einer niedrigen Differenzierung, einer gesteigerten Malignität und Aggressivität des Tumorgewebes und mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind (Peiro et al., 1997; Ioakim-Liossi et al., 1997 a; Cook und Weaver, 1995; Auer et al., 1980). Fallenius et al. (1988) konnten 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 (Fallenius et al., 1988 b). 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.

Die Beurteilung des DNA-Gehaltes der Zellen, d.h. deren Ploidie und proliferativer Anteil spielen schon in der morphologischen Beurteilung indirekt eine wesentliche Rolle. So wird beim histopathologischen Grading nach Bloom & Richardson die Hyperchromasie und Pleomorphie des Zellkerns und die Anzahl von Mitosen pro Gesichtsfeld zur Klassifikation mit herangezogen (Jonat et al., 1994). Gradingssysteme, die vorwiegend auf morphologischen Kriterien basieren, sind durch subjektive Interpretationen des jeweiligen Präparates in ihrer Aussage belastet. Die Repräsentativität derartiger Grading-Systeme wurde zudem durch die ausgeprägte morphologische Heterogenität vieler Tumoren in Frage gestellt (Böcking et al., 1989). Ein weiterer Kritikpunkt von Böcking et al. (1989) bestand in der Einteilung maligner Tumoren in nur 2-4 Malignitätsgruppen, in Orientierung an morphologische Grading-Kriterien. Ein kontinuierliches System könnte demgegenüber dem Phänomen heteromorpher Vielfalt sowie dem individuellen Fall besser gerecht werden. In früheren Studien erreichte das Bloom & Richardson-Grading für Mammakarzinome eine Interobserver-Reproduzierbarkeit von nur 65-72 % zwischen zwei und von 14,5 % zwischen sechs erfahrenen Pathologen (Böcking et al., 1989 a).



Diese Diskrepanzen veranlaßten Böcking et al. (1984) den sog. DNA-Malignitätsgrad einzuführen, eine logarithmische Umrechnung des 2c-Deviationsindex in die Skala eines DNA-Malignitätsgrades, die von 0 bis 3 reicht. Bei dieser Umrechnung wird die niedrigst denkbare Varianz um den diploiden Chromosomensatz von 0 als DNA-MG 0 gesetzt und der höchste beobachtete Wert (eines Osteosarkoms) von 51 als DNA-MG 3. Die prognostische Relevanz dieses DNA-Malignitätsgrades wurde bisher von Böcking et al. für maligne Lymphome, das Kehlkopf-, Prostata-, Mamma-, und Harnblasenkarzinom in follow-up-Studien statistisch belegt. Darüberhinaus zeigte der DNA-Malignitätsgrad ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Repräsentativität und erwies sich als guter Prädiktor für einen Lymphknotenbefall beim Mammakarzinom (Böcking et al., 1989). Mit Hilfe des DNA-Malignitätsgrades konnten Böcking et al. (1989) drei Patientinnengruppen mit signifikant unterschiedlichen Überlebenszeiten differenzieren.

Die Mehrzahl der Studien, die die Beziehung zwischen DNA-zytometrischen Parametern und tumorbiologischen Eigenschaften untersucht haben, kommen übereinstimmend zu dem Schluss, dass ein abnormer DNA-Gehalt mit einer erhöhten Tumoraggressivität assoziiert ist (Peiro et al., 1997; Ghali et al., 1992). Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit bei der Korrelation des mittleren DNA-Malignitätsgrades mit anderen histomorphologischen Faktoren (Tumorgrading) und DNA-zytometrischen Faktoren (DNA-Index und DNA-Diagnose (Ploidie) bestätigt werden. Der mittlere DNA-Malignitätsgrad war hochsignifikant bei aneuploiden Tumoren höher als bei euploiden Tumoren. Ebenfalls ließ sich bei der Korrelation DNA-Malignitätsgrad gegenüber dem Tumorgrading ein signifikanter Unterschied feststellen, der DNA-Malignitätsgrad stieg bei Abnahme des Differenzierungsgrades.

Diese Beobachtung konnte auch durch ähnliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden, die deutlich mehr Fälle mit abnormem DNA-Gehalt in der Gruppe der invasiv duktalem Karzinome verzeichneten als bei den invasiv lobulären Tumoren (Falkmer et al., 1990; Fallenius et al., 1988). Dieser Zusammenhang

wird vorwiegend mit der niedrigeren Malignität, der klinisch eher langsamen Progression und dem prognostisch günstigeren Verhalten des invasiv lobulären Karzinoms gegenüber invasiv duktalem Karzinom erklärt (Silverstein et al., 1994 b; Fallenius et al., 1988).

Die Auswertung der DNA-Malignitätswerte in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Tumorgroße, zeigt keinen kontinuierlichen Anstieg der Medianwerte bei den einzelnen Gruppen T1-T4. Einige Studien konnten dennoch eine signifikante Korrelation zwischen Tumoren mit abweichendem DNA-Gehalt und Tumorgroße herstellen (Falkmer et al., 1990; von Rosen et al., 1989; Fallenius et al., 1988). Möglicherweise induziert die hohe genomische Instabilität aneuploider Tumoren die schnelle Entwicklung neuer Phänotypen, die ihrerseits wiederum Voraussetzung für die Progression der Tumorerkrankung sind (Fallenius et al., 1988). Andererseits existieren Hinweise, dass eine genetische Dissoziation in Form aneuploider Chromosomensätze in Frühstadien der malignen Entartung stattfindet. Neben anderen Malignomen konnte auch für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass Alterationen des DNA-Gehalts zu einem raschen Fortschreiten des invasiven Krankheitsverlaufes geführt haben (Erhardt und Auer, 1987). Auer et al. (1984) beobachteten bei einigen Mammakarzinom-Typen eine hohe Stabilität des DNA-Gehalts über einen langen Zeitraum der Erkrankung. Darüberhinaus sprechen Ergebnisse, die aus der Berechnung von Tumorverdoppelungszeiten gewonnen wurden und darauf hinweisen, dass die klinisch-apparente Phase als die kürzeste Zeitspanne im Rahmen der Tumorentstehung und -progression zu werten ist, gegen eine Beziehung zwischen Ploidie und Tumorgroße (Fallenius et al., 1988).

Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen DNA-Malignitätsgrad und Lymphknotenbefall zeigten sich ein deutliches Überwiegen der niedrigeren Malignitätsgradgruppen bei den nodal-negativen Fällen sowie ein Ansteigen der höheren Malignitätsgradgruppen bei den nodal-positiven Tumoren. Böcking et al. (1989) konnten in ihren Studien zum DNA-Malignitätsgrad eine hochsignifikante Korrelation zwischen diesem DNA-zytometrisch ermittelten Parameter und dem Lymphknotenbefall aufzeigen und leiteten daraus eine mögliche prädiktive Funkti-

on des DNA-Malignitätsgrades bezüglich einer Lymphknotenmetastasierung ab. Darüberhinaus stellten Böcking et al. (1989) eine hohe Übereinstimmung des DNA-Malignitätsgrades zwischen dem Primärtumor und den Lymphknotenmetastasen fest. Dies könnte sich als Hilfestellung zur Voraussage des malignen Potentials primär nicht palpabler Tumoren aus aspirationstechnisch gewonnenem Material aus Lymphknotenmetastasen erweisen.

Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem DNA-Malignitätsgrad und dem Grading der Tumoren. Bei Abnahme des Differenzierungsgrades nimmt der Malignitätsgrad zu. Dies wird auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten bestätigt, es ergab sich eine statistisch gesicherte signifikante Beziehung zwischen DNA-Malignitätsgrad und histopathologischem Grading. Die nach dem Bloom & Richardson-System als niedrig differenziert eingestuft Tumoren gingen mit höheren DNA-Malignitätsgraden einher. Diese Beobachtung ist vom tumorbiologischen Standpunkt durchaus nachvollziehbar, da beide Grading-Systeme eine gemeinsame biologische Basis bezüglich ihrer letztlich resultierenden Aussagen über die Malignität eines Tumors besitzen. Zwar stützt sich das histopathologische Grading mehr auf morphologische Beurteilungskriterien, während der DNA-Malignitätsgrad vorwiegend Ausdruck genetischer Instabilität ist; dennoch ist in beiden Fällen die schrittweise Entdifferenzierung des Tumorgewebes Zeichen erhöhter Aggressivität und Malignität des Tumors.

Zusammenfassend läßt sich für den DNA-Malignitätsgrad herausstellen, dass eine gute Übereinstimmung zwischen den vom tumorbiologischen Verhalten zu erwartenden Beziehungen zu den anderen Parametern und den tatsächlich erhobenen Befunden besteht. Der DNA-Malignitätsgrad stellt möglicherweise eine geeignete, objektive und reproduzierbare Ergänzung zu dem klassischen histomorphologischen Grading-System dar.

Analog zu den Ergebnissen bei der Betrachtung des DNA-Malignitätsgrades finden sich für den DNA-Index in dieser Arbeit ebenfalls signifikante Unterschiede bezogen auf den Ploidiewert und dem histopathologischen Grading des Tumors. Der Medi-

anwert des DNA-Index ist 1,71, davon bei den euploiden Tumoren 1,04 und den aneuploiden Tumoren 1,85. Somit besteht zwischen dem mittleren DNA-Index der euploiden und der aneuploiden Karzinome ein hochsignifikanter Unterschied. Beim Grading zeigt sich die Tendenz einer Zunahme des DNA-Index mit Abnahme des Differenzierungsgrad. Dagegen sind bei der Bestimmung von Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Metastasierung und Einteilungen in AJCC-Stadien keine signifikanten Korrelationen festzustellen.

Die prognostische Relevanz der Auer-Klassifikation konnte in mehreren Studien bestätigt werden (Auer et al., 1980; 1984; Fallenius et al., 1988). Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Bewertung eines DNA-Histogramms mittels Auer-Klassifikation einerseits und der Stammlinien-Interpretation andererseits ist zugleich auch ein Kritikpunkt der zuletzt genannten Methode. Die einfache Abschätzung der Stammlinien-Position als modaler DNA-Wert einer Zellpopulation gibt wenig Auskunft über die Anzahl der Zellen, die außerhalb dieses peaks liegen. Demgegenüber werden in der Auer-Klassifikation durch die einzelnen Typen auch DNA-Modalwerte im euploiden (diploiden oder tetraploiden) Bereich sowie das Auftreten von Stammlinien zwischen dem 2c- und 4c-Bereich berücksichtigt. Die Auer-Klassifikation schließt demnach Variationen des DNA-Gehalts mit ein, weshalb dieser Methode eine stärkere prädiktive Potenz beigemessen wird (Fallenius et al., 1988 b).

Während bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Ploidie und Tumorgröße/Tumorausdehnung eine statistisch signifikante Beziehung in der vorliegenden Untersuchung nicht hergestellt werden kann, findet sich aber bei der Anwendung der Auer-Klassifikation als auch des DNA-Index (Stammlinien-Interpretation) eine auffällig hohe Anzahl von euploiden Tumoren (63 %) im Stadium II und eine auffallend hohe Zahl von aneuploiden Tumoren (93 %) im Stadium IV nach Auer. Dies deutet auf eine hohe Signifikanz der Ploide zur Stadieneinteilung nach Auer hin. Bemerkenswerterweise waren bei Anwendung des DNA-Index (Stammlinieninterpretation) ebenfalls hochsignifikante Beziehungen zur Auer-Klassifikation vorhanden – je höher die Stadieneinteilung, desto höher der DNA-Index. Die Ploidie lässt sich nicht in direktem Bezug zur Tumorgröße setzen, aber

auffallend sind Aneuploidie und DNA-Index direkt mit der Auer-Klassifikation korrelierend.

Diese Befunde stehen nicht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Während einige Studien eine positive Korrelation zwischen Aneuploidie und Tumorgroße aufzeigen (von Rosen et al., 1989; Falkmer et al., 1990; Fallenius et al., 1988), bestätigen andere Arbeitsgruppen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und sehen auch keinen Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen (Cook und Weaver, 1995; Kristen et al., 1991; Coulson et al., 1984).

Aneuploide Tumoren sind gekennzeichnet durch eine hohe genomische Instabilität, was einerseits zu einer schnelleren Entwicklung neuer Phänotypen und darüber zu einem raschen Fortschreiten der Tumorerkrankung führen kann (Fallenius et al., 1988). Andererseits muß Aneuploidie nicht konsekutiv mit einer höheren Tumorgroße assoziiert sein, was sich auch in dieser Arbeit widerspiegelt.

Bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Ploidie und histopathologischem Grading ist eine Abnahme der als euploid eingestuften Karzine sowie ein kontinuierlicher Anstieg der aneuploiden Fälle mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren zu beobachten. In der Literatur wurde mit überwiegender Mehrheit der Befund erhoben, dass mit fortschreitender Entdifferenzierung die Anzahl der aneuploiden Tumoren zunahm (Sinn et al., 1997; Cook und Weaver, 1995; Fallenius et al., 1988). Diese Beobachtung ist vom tumorbiologischen Standpunkt durchaus nachvollziehbar. Ein aneuploider DNA-Gehalt scheint mit einer schweren Beeinträchtigung zellbiologischer Funktionen und Regulationsmechanismen assoziiert zu sein (Uyterlinde et al., 1988).

**Zusammenfassend** scheint die computergestützte DNA-zytometrische Messung des DNA-Gehalts zur Bestimmung der DNA-Diagnose (Ploidie), des DNA-Index, des DNA-Malignitätsgrades und der Auer-Klassifikation zusätzlich zu den klinischen, histomorphologischen und biochemischen Parametern sinnvoll zu sein. Trotz großer technischer Fortschritte und einer Erleichterung der Durchführung DNA-zytometrischer Messungen durch Automatisierung ist das geschulte Auge des Pathologen für die Diagnosefindung nach wie vor Grundvoraussetzung. DNA-

zytometrische Befunde können, wie die vorliegende Arbeit beschreibt, die Diagnostik des Mammakarzinoms zwar objektiv erweitern, aber nur bedingt prognostische Hinweise für den individuellen Patienten geben.

### **9.3. Retrospektive Verlaufsanalyse**

Wegen der verhältnismäßig lückenhaften Dokumentation des Verlaufs der Karzinomerkrankungen ist daher nur eine eingeschränkte Beurteilung möglich. Die retrospektive Betrachtung des Karzinomerkrankungsverlaufes ist nicht Hauptthema dieser Arbeit und wird daher nur am Rande kurz analysiert, ohne Anspruch auf signifikante Aussagekraft. Es lassen sich nur bedingte Aussagen tätigen. Auf das Hauptthema dieser Arbeit hat diese Erörterung keinen Einfluß.

Von den 125 Patienten sind nur 80 (64 %) in einem durchschnittlichen Zeitraum von 32 Monaten nachbehandelt und nachbeobachtet worden. Davon waren 21% „verstorben“ und 69,9 % „nicht verstorben“. Die Überlebenszeit wurde anhand der Kaplan-Meier-Survivalkurve ermittelt. Im histomorphologischen Ergebnis findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Beobachtungszeitraum und der Einteilung in die TNM-Klassifikation, jedoch lässt sich tendenziell feststellen, dass mit Zunahme der Tumorgröße eine Abnahme der Überlebenszeit korreliert. Beim Tumor-Grading besteht ein schwach signifikanter Unterschied von durchschnittlicher Überlebenszeit und Gradinggrad – je differenzierter der Tumor, desto kürzer die Überlebenszeit (G1 = 47,3 Monate, G2/3 = 30 Monate).

Bei den DNA-zytometrischen Untersuchungen findet sich in der Beurteilung der Klassifikation nach Auer ebenfalls nur eine schwache Signifikanz zwischen den Stadien nach Auer und der Überlebenszeit - je höher das Stadium, desto geringer die Überlebenszeit (II = 38,8 Monate, IV = 22,6 Monate). Bei der DNA-Diagnose (Ploidie) findet sich nur ein schwacher Unterschied, der aber wiederum tendenziell auflistet, dass aneuploide Mammakarzinome eine kürzere Überlebenszeit haben als euploide Karzinome.

Bezüglich der Vollremission waren keine signifikanten Unterschiede zu histomorphologischen und DNA-zytometrischen Parameter auszumachen.

In der Rezidiv-Entwicklung trotz operativer Therapie und entsprechender adjuvanter Nachbehandlung liegt die Rezidiv-Rate bei 25 %. Auffallende Signifikanz konnte zwischen Rezidiv und Einteilung in die AJCC-Klassifizierung festgestellt werden, es fanden sich 77,8 % in den Stadien II B, IIIA und III B. Bezogen auf weitere histomorphologische und DNA-zytometrische Untersuchungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zur Rezidivrate.

Diese retrospektiven, statistischen Ergebnisse der Untersuchung stehen nicht im vollständigen Einklang mit den in der wissenschaftlichen Literatur angegebenen Feststellungen (Auer G. et al. 1980, Beckmann MW. et al. 1997, Böcking A. et al. 1989, Bollmann R. 1990, Eder M. 1990, Granitzka S. 1995, Sandritter W. 1981, Stat. Bundesamt 1995). Dies ist dadurch begründet, dass die Beobachtungszeiträume und Dokumentationen bei dieser Erhebung nicht vollständig sind.

## 10. Zusammenfassung

Die Erkrankung an einem Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Die wichtigsten Prognoseparameter des Mammakarzinoms sind die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse des Tumors zum Diagnosezeitpunkt. Trotz identischen histopathologischen Stadien und Differenzierungsgraden (Grading), sowie übereinstimmenden immunhistochemischen Aussagen gibt es aber unterschiedliche Krankheitsverläufe und Überlebensraten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob mittels Analyse der DNA durch Fluß-/Bildzytometrie wesentliche spezifischere Aussagen über die Prognose des Mammakarzinoms gemacht werden können, wie dies bereits bei anderen Tumoren, z.B. im Gastrointestinaltrakt, möglich ist. Es sollte speziell die Korrelation zwischen DNA-Zytometrie und Histomorphologie des Mammakarzinoms festgestellt und damit die Bedeutung der DNA-Zytometrie für die Prognose des Mammakarzinoms festgelegt werden.

In der wissenschaftlichen Literatur wird kontrovers diskutiert. Denn einige Studien zeigen eine signifikante Korrelation, andere Studien zeigen keine Korrelation zwischen konventionellen histologischen und DNA-zytometrischen Untersuchungsparameter. Hier besteht eine Skepsis gegenüber der prognostischen Aussagekraft der DNA-Zytometrie.

In der vorliegenden Arbeit wurden die konventionell-histologisch gesicherten und die bildanalytischen DNA-zytometrischen Daten von 125 bzw 469 Patienten mit Mammakarzinom ausgewertet. Ziel war, eine Korrelation zwischen histomorphologischen Daten bestehend aus Tumorigradung, TNM- und AJCC-Klassifikation einerseits und DNA-zytometrischen Parametern bestehend aus DNA-Diagnosen (Ploidiestatus), DNA-Index und DNA-Malignitätsgrad andererseits festzustellen und dies in Verbindung mit der Prognose des Mammakarzinoms darzustellen. Das Ergebnis stellt sich wie folgt dar:



1. Es besteht kein signifikanter Altersunterschied der Karzinomkranken in den einzelnen TNM-oder AJCC-Tumor-Stadien
2. Die Mehrzahl der Mammakarzinome hat eine mäßige Differenzierung (Grading G2)
3. Der mediane DNA-Malignitätsgrad ist hochsignifikant höher bei aneuploiden Mammakarzinomen als bei euploiden Mammakarzinomen.
4. Es besteht eine signifikante Korrelation des DNA-MG zum Tumor-Grading: Bei Ansteigen des DNA-MG bei Abnahme der Differenzierung.
5. Es läßt sich eine leichte signifikante Beziehung des DNA-MG zur AUER-Klassifikation feststellen:  
Ansteigen des medianen DNA-MG bei höherer Auer-Klassifizierung.
6. Der DNA-Index zeigt eine Korrelation zum Tumor-Grading: Bei Abnahme der Differenzierung erfolgt eine Zunahme des DNA-Index.
7. Die Auer-Klassifikation hat eine hochsignifikante Korrelationen zu DNA-Diagnose (Ploidie), DNA-Index und DNA-MG: Bei zunehmender Auer-Klassifizierung erhöhen sich Aneuploidität, DNA-Index und medianer DNA-Malignitätsgrad

Alle anderen DNA-zytometrischen Parameter zeigen keine signifikanten Korrelationen. Daher läßt sich nicht belegen, daß der DNA-zytometrische Befund in der Beurteilung der Prognose des Mammakarzinoms eine definitive Aussagekraft hat.

**Zusammenfassend** lassen sich durch die DNA-Zytometrie anhand dieser Studie nur tendenzielle-prognostische Aussagen ergänzend zu den anderen Prognosefaktoren machen, denn es zeigen sich nur für DNA-Malignitätsgrad, DNA-Index und DNA-zytometrische Klassifikation nach Auer teilweise hochsignifikante Korrelationen zu den konventionellen histologischen Untersuchungsergebnissen.

## 11. Literaturverzeichnis

- Achenbach W. Rationale Praxis Onkologie. Balingen: Perimed-spittal Med. Verlagsgesellschaft mbH 1993: 159-176
- Auer G., Caspersson T., Wallgren A.: DNA content and survival in mammary carcinoma Anal Quant Cytol 2: 161-165 (1980)
- Auer G., Fallenius A.G., Erhardt K:Y., Sundelin B.: Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content Cytometry 5: 420-425 (1984)
- Auer G., Eriksson E., Azavedo E., Caspersson T., Wallgren A.: Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans Cancer Res 44: 394-396 (1984)
- Auffermann, W.; Repges, R. and Böcking, A.: Rapid diagnostic DNA Cytometry with an automatic microscope and TV Image-Analysis System. Anal. Quant. Cytol. 1984; 6: 179-84.
- Bässler R.: Mammakarzinom In: W. Remmele: Pathologie Band 4; 2. Auflage, Springer Verlag Berlin (1997)
- Bahnsen J.: Indikation für die adjuvante Strahlentherapie bei primär brusterhaltend und ablativ behandeltem Mammakarzinom. Gynäkologe 27: 64-69 (1994)
- Balslev L, Christensen LJ., Bruun Rasmussen B., Larsen J.K., Lykkesfeldt A.E., Thorpe S.M., Rose C., Briand P., Mouridsen H.T.: Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node-negative breast cancer. Int J Cancer 56: 16-25 (1994)
- Becker N, Frenzel-Beyme R, Wagner G. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. Berlin- Heidelberg- New York: Springer-Verlag, 1984
- Beckmann M.W., Niederacher D., Goecke T.O., Bodden-Heidrich R., Schnürch H.G., Bender H.G.: Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung. Dt Ärztebl 94 (Heft 4): A 161-167 (1997)
- Bickmann HJ, Strauss G, Knapstein P. In: Pschyrembel W, Strauss G, Petri E, Hrsg.. Praktische Gynäkologie, 5. Aufl.. Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1991 (a): 711-726
- Bickmann HJ, Strauss G, Knapstein P. In: Pschyrembel W, Strauss G, Petri E, Hrsg. .Praktische Gynäkologie, 5. Aufl..Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1991 (b):734-736
- Bishop, J.M.: Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991; 64: 235-248.
- Böcker W., Decker T., Ruhnke M., Schneider W.:

Duktale Hyperplasie und duktales Carcinoma in situ: Definition-Klassifikation--  
Differentialdiagnose  
Pathologe 18: 3-18 (1997)

Böcking A., Adler C.P., Common H.H., Hilgarth M., Granzen B., Auffermann W.,  
Böcking A. et al. 1990, Bollmann R. 1991,  
Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy Anal  
Quant Cytol 6: 1-7 (1984)

Böcking A., Chatelain R., Biesterfeld S., Noll E., Biesterfeld D., Wohltmann D.,  
Goecke C.:  
DNA grading of malignancy in breast cancer: Prognostic validity, reproducibility  
and comparison with other classifications  
Anal Quant Cytol Histol 11: 73-80 (1989)

Böcking A., Chatelain R., Homge M., Daniel R., Gillissen A., Wohltmann D.: Rep-  
representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas  
Anal Quant Cytol Histol 11: 81-86 (1989)

Böcking A.:  
DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik Beitr. Onkol., vol. 38:  
298-347; Karger, Basel (1990)

Böcking A., Füzezi L., Striepecke E.:  
Indikationen und tumorzytogenetische Grundlagen der diagnostischen DNA-  
Zytometrie Verh. Dtsch. Ges. Zyt. 18: 70-82 (1993)

Böcking, A.; Füzezi, L. und Striepecke, E.: Indikationen und tumorzytogenetische  
Grundlagen der diagnostischen DNA-Cyrometrie. Verh.Dtsch.Ges.Cyt. 199318: 70-  
82.

Böcking A., Giroud F., Reith A.:  
Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA  
image cytometry  
Analyt Cell Pathol 8: 67-74 (1995)

Böcking, A.; Adler, C.P.; Common, H.H.; Higarth, M. and Auffermann, W.:  
Algohythm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of  
malignancy.Analyt.Quant.Cytol.1984; 6: 1-8.

Böcking, A. and Auffermann, W.: Algohythm for DNA cytophotometric diagnosis and  
grading of malignancy.Analyt.Quant.Cytol.1986; 8: 363 ff.

Bollmann, R.: DNA-Cytometrie als Entscheidungshilfe in der morphologischen  
Tumordiagnostik. MTA 1990; 5: 334-37.

Bollmann, R.: DNA-Cytometrie in der Routinediagnostik.  
Verh.Dtsch.Ges.Path.1991; 75: 438.

Bollmann, R. und Nilles, N.: Interaktive DNA-Cytometrie von melanocytären Neubildungen. Zbl. Haut 1992; 161: 346.

Braendle W (1998) Hormone und Mammakarzinom. Stellungnahme einer Konsensus-Konferenz vom 16.-18.02 1997 in Berlin. Frauenarzt 39: 884-888

Bruce Bagwell, C.: DNA-Histogram Analysis for Node-negativ Breast Cancer . Wiley Interscience Cytometry Part A58 76-78 (2004)

Clark G.M., Dressler L.G., Owens M.A., Pounds G., Oldaker T., Mc Guire W.L.. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry  
N Engl J Med 320: 627-633 (1989)

Cook D.L., Weaver D.L.:  
Comparison of DNA content, S-Phase fraction and survival between medullary and ductal carcinoma of the breast  
Am J Clin Pathol 104: 17-22 (1995)

Correale M., Paradiso A., Abbate L, Mangia A., Dragone C.D., Tedone T., Filotico R., Schittulli F., De Lena M.: Cytosolic levels of estrogen-regulated pS2 protein in breast cancer: correlation with tumor proliferative activity . Tumor Biol 14: 30-37 (1993)

Diel LJ, Kaufmann M., Solomayer E.F., Wallwiener D., Gollan C., Goerner R., Kaul S., Costa S.D., von Minckwitz G., Holle R., Bastert G.:  
Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark im Vergleich zum Nodalstatus bei primärem Mammakarzinom. Geburtsh. u. Frauenheilk. 57: 333-341 (1997)

Diest, van P.J., Baak J.P.A.: Quantitative Cyto- and Histoprognosis in Breast cancer. Hardbound, ISBN:0-444-89374-1 (1992)

Dittrich, W. und Göhde, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspension. Z. Naturforsch. 1969; 24b: 360-61.

Dongen, van, J.A., Fentiman LS., Harris J.R., Holland R., Peterse J.L., Salvadori B., Stewart H.J.: In situ breast cancer: The EORTC consensus meeting Lancet 2: 25-27 (1989)

Dressler L.G., Seamer L.C., Owens M.A., Clark G.M., Mc Guire W.L.: DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens Cancer 61: 420-427 (1988)

Dupont-Lampert V., Zuber M., Laffer U., Almendral A., Landmann C, Harder F.: Lokale Behandlung des Mammakarzinoms: Wann ist eine brusterhaltende Therapie nicht geeignet?

Zentralbl Chir 120: 551-555 (1995)

Dutrillaux B., Gerbault-Sereau M., Remvikos Y., Zafrani B., Prieur M.: Breast cancer genetic evolution: I) Data from cytogenetics and DNA content Breast Cancer Res Treat 19: 245-255 (1991)

Eder M. Mamma. In: Eder M, Gedigk P, Hrsg.. Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. 33. Aufl.. Berlin- Heidelberg- New York: SpringerVerlag, 1990: 776-784

Elston CW Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 19: 403 -410

Erhardt K.Y., Auer G.U.: Mammary Carcinoma: Comparison of nuclear DNA content from in situ and infiltrative components Anal Quant Cytol 9: 263-267 (1987)

Falkmer U.G., Hagmar T., Auer G.: Efficacy of combined image and flow cytometric DNA assessments in human breast cancer: a methodological study based on a routine histopathological material of 2024 excised tumor specimens Anal Cell Pathol 2: 297-312 (1990)

Fallenius A.G., Franzen S.A., Auer G.: Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factor: a retrospective study of 227 consecutive cases. Cancer 62: 521-530 (1988)

Fallenius A.G., Auer G., Carstensen J.M.: Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. Cancer 62: 331-3 (1988)

Feichter G.E.: Durchflußzytometrie von Mammakarzinomen. Zentralbl Pathol 137: 220-226 (1991)

Fisher E.R., Gregorio R.M., Fisher B.: The pathology of invasive breast cancer Cancer 36: 1-85 (1975)

Feulgen, K. und Rosenbeck, H.: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus Fe der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Z.physiol. Chemie 1924; 135: 203-248.

Fleischhauer K. In: Fleischhauer K, Staubesand J, Zenker W, Hrsg.. Benninghoff Anatomie. 13./14. Aufl.. München- Wien- Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1985: 562-568

Füzesi, L.: Tumorzytogenetik: biologische Interpretation der DNA-Cytometrie. 28. Symposium der International Academy of Pathology (1993).

Göhring U: J., Scharl A., Ahr A.:

Der Stellenwert der immunhistochemischen Bestimmung von Rezeptoren, Gewebsproteasen, Tumorsuppressorproteinen und Proliferationsmarkern als Prognoseindikatoren beim primären Mammakarzinom. Geburtsh. u. Frauenheilk. 56: 177-183 (1996)

Granitzka S. In: Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Hrsg..Gynäkologische Onkologie.Stuttgart- New York (1995): 151-157

Hedley D.W., Rugg C.A., Gelber R.D.:

Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of node positive early breast cancer. Cancer Res 47: 4729-4735 (1987)

Heim, S. and Mittelman, F.: Cancer cytogenetics. New York;Alan R.Liss (1987)

Hermesen MA, Baak JP, Meijer GA, Weiss JM, Walboomers JW, Snijders PJ, van Diest PJ.: genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. J Pathol. 186(4): 356-362 (1998).

Heywang SH, Frenz! R, Eiermann W, Bassermann R, Krischke I. Kernspintomographie in der Mammadiagnostik. Fortschr Röntgenstr (1985); 141: 207-212

Heywang SH, Hilbertz T, Beck R, Bauer WM, Eiermann W, Permanetter W. Gd-DTPA enhanced MR imaging of the breast in patients with postoperative scarring and silicon implants. J Comp Assist Tomogr (1990); 14: 348-349

Hiddemann, W.; Schumann, J.; Andreef, M.; Barlogie, B.; Herman, C.J.; Leif, R.C.; Mayall, B.H.; Murphy, R.F. and Sandberg, A.A.: Convention on Nomenclature for DNA Cytometry. Cancer Gen. and Cytogen. (1984); 13: 181-183

Holzner JH. Brustdrüse. In: Grundmann E, Hrsg..Spezielle Pathologie. München/-Wien- Baltimore: Urban & Schwarzenberg, (1986)

Jänicke F.:Etablierte und neue Prognosefaktoren für das primäre Mammakarzinom Gyn Spectrum 2: 3-5 (1995); Beilage zu „Der Gynäkologe" 28 [3] (1995)

Jonat W., Eidtmann H., Friedrichs K.: Prognosefaktoren beim Mammakarzinom Gynäkologe 27: 37-44 (1994)

Kaiser WA, Zeitler E. Kernspintomographie der Mamma- Erste klinische Ergebnisse. Röntgenpraxis 1985; 38: 256-262

Kristen P., Kaesemann H., Rempfen A., Beier H. J., Caffier H.: DNA-Image-Zytometrie beim Mammakarzinom: Vergleich zu anderen Prognosekriterien. Gynäkol Rundsch 31 (Suppl 2): 302-304 (1991)

Kuhl H. Mammakarzinomrisiko und orale Kontrazeptiva Dtsch-Med Wschr 119: 892-894 (1994)

Kuhl H., Runnebaum B., Schneider H.P.G.: Langfristige Hormonsubstitution und Mammakarzinomrisiko: Aktuelle Bestandsaufnahme Zentralbl Gynäkol 117: 549-553 (1995)

Leonhardt H.: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme Verl. (1977)

Mac Grogan G., Jollet I., Huet S., Sieranowski G., Picot V., Bonichon F., Coindre J.M.: Comparison of quantitative and semiquantitative methods of assessing MIB-1 with the S-phase fraction in breast carcinoma. Mod Pathol 10 (8): 769-776 (1997)

McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000) Breast cancer - epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 321: 624-628 (2000)

Moldovan, A.: Scientific apparatus and laboratory methods. Photoelectric technic for the counting of microscopic cells. Science 1934; 80: 188.

Moureau-Zabotto L., Bouchet C., Ceari D., Uzan S., Lefranc JP., Antoine M., Genest C., Deniaud-Alexandre E., Beraudin JF., Touboul E., Fleury-Feith J.: Combined flow cytometry determination of S-phase fraction in node-negative invasive breast carcinoma. Cancer Res. Treat. 91(1): 61-71 (2005)

Oeser H.: Das Mammakarzinom, biometrisch betrachtet. Dtsch Med Wschr 105: 1124-1127 (1980)

Ploem-Zaajer, J.J.; Bayen-Boon, M.E.; Leyte-Veldstra, L. and Ploem, J.S.: Cytofluorometric and cytophotometric DNA measurements of cervical smears stained using a new bicolor method. Pressman, N.J.; Wied, G. (Hrsg.) : Automation of cancer cytology and cell image analysis, 1979; 225-35. Tutorial of cytology, Chicago.

Possinger K., Grosse Y.: Präoperative und postoperative adjuvante Behandlung des primären Mammakarzinoms. Onkologie 4 (10): 936-944 (1998)

Prechtel K. Altersabhängiger Strukturwandel der weiblichen Brustdrüse (Flächenprozentbestimmung). Verh Dtsch Ges Pathologie 1970; 54: 393 - 397

Prechtel K. Allgemeine Erläuterung zur Histomorphologie von Brustdrüsenerkrankungen. Fortschr Med 1974; 92: 374-380

Prechtel K. Pathologie der Mastopathie und des Mammakarzinoms. Radiologe 1993; 33: 236-242

Rocheftort H.: Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. Acta Oncol 31: 125-130 (1992)

Rosen, von A., Rutquist L.E., Carstensen J., Fallenius A., Skoog L., Auer G.: Prognostic value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to tumor size, nodal status and estrogen receptor content  
Breast Cancer Res Treat 13: 23-32 (1989)

Sandritter, W, and Carl, M.: Cytophotometric measurement of the DNA content of malignant human tumors by means of the Feulgen reaction. Acta cytol. 1966; 10: 26-30.

Sandritter, W.: Allgemeine Pathologie, Schattauer Verlag 1981, Stuttgart

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G. Gynäkologische Onkologie. Stuttgart- New York: Schattauer 1995: 105-115

Schnitt S.J., Silen W., Sadowsky N.L., Connolly J.L., Harris J.R.: Ductal carcinoma in situ (intraductal carcinoma) of the breast  
N Engl J Med 318: 898-903 (1988)

Schön, D.; Bertz, J. und Hoffmeister, H.: Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, Bd. II. bga Schrift 4/89. MMV Medizin, München 1989.

Seifert G, Uehlinger E, Hrsg.. Spezielle pathologische Anatomie, Bd 11, Berlin-Heidelberg- New York: Springer Verlag

Sinn H.P., Kellerhoff N.M., Kellerhoff R., Bastert G., Otto H.F.: Subtypisierung und Prognoseabschätzung beim invasiven lobulären Mammakarzinom Pathologie 18: 37-44 (1997)

Sinn H.P., Haag D., Ehemann V., Magener A., Goerttler K., Bastert G., Otto H.F.: DNA-Zytometrie beim Mammakarzinom: Übersicht zur Methode und zum Stellenwert bei der Prognoseabschätzung  
Pathologie 18: 19-26 (1997)

Stache G., Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. Versicherungsmedizin 46(6):196-199(1994)

Statistisches Bundesamt: Sterbefälle an bösartigen Neubildungen der Brustdrüse Pos.-Nr. 174,175 des früheren Bundesgebietes, Stand 1995

Tosi, P. and Cottier, H.: What's new in quantitative pathology? Past developments and outlook. Path. Res. Pract. 1989; 184: 652-55.



UICC: International Union against Cancer: Wittekind Ch., Wagner G. (Hrsg.):  
TNM-Klassifikation maligner Tumoren 5. Auflage;  
Springer Verlag Berlin (1997)

Uyterlinde A.M., Schipper N.W., Baak J.P.A., Peterse H., Matze E.:  
Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphometrical  
parameters in invasive ductal breast cancer  
Am J Clin Pathol 89 (3): 301-307 (1988)

Veronese S.M., Gambacorta M., Gottardi O., Scanzi F., Ferrari M., Lampertico P.:  
Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer  
Cancer 71: 3926-3931 (1993)

Visscher D.W., Tabaczka P., Long D., Crissman J.D.: Clinicopathologic analysis of  
macrophage infiltrates in breast carcinoma Path Res Pract 191: 1133-1139 (1995)

## 12. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Hans Schwering, außerplanmäßiger Professor für Chirurgie an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster und Chefarzt der Chirurgischen Abteilung des Akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital in Euskirchen für die Anregung und die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie für seine freundliche und kompetente Beratung.

Herrn Prof. Dr. med. R. Bollmann, Leiter des Pathologischen Institutes in Bonn-Duisdorf, bin ich für die Überlassung der Unterlagen und die freundliche und fachliche Beratung zu großem Dank verpflichtet.

Mein persönlicher Dank gilt Frau Dr. med. Claudia Gnettner, die mich bei der Erarbeitung des Themas, den fachlich-statistischen Methoden und der Korrektur des Manuskripts außerordentlich unterstützt hat.

Ganz besonderen Dank sage ich meiner Familie, die mir während der Zeit der Erstellung der Arbeit stets hilfreich zur Seite stand.

## 13. Lebenslauf

Am 19. Mai 1953 wurde ich als Sohn von Peter Axer, Chemiefacharbeiter, und Maria Axer, geb. Gaspers, in Dom-Esch geboren.

Nach meiner Volksschulzeit (1959-1964) wechselte ich in das erzbischhöfliche Internat, Konvikt Bad Münstereifel, und besuchte dort das städtische Gymnasium St. Michael, auf dem ich im altsprachlichen und naturwissenschaftlichen Zweig im Mai 1972 das Abitur bestand.

Im Anschluß daran leistete ich von 1972-1974 meinen Pflichtwehrdienst bei der Bundeswehr mit dem Abschluß als Fernmeldeoffizier ab.

In der Zeit von 1974 bis 1978 absolvierte ich im Marienhospital Euskirchen eine Ausbildung zum examinierten Krankenpflegehelfer und war dort im Krankenpflegebereich tätig.

Im Jahre 1978 nahm ich an der Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn das Studium der Humanmedizin auf. Das Studium schloß ich mit der Erlangung der Approbation zum Arzt am 13. Mai 1985 ab.

Im Jahre 1979 heiratete ich meine Ehegattin Elke Axer. Im Jahre 1988 wurde mein Sohn Christoph und im Jahre 1993 wurde meine Tochter Chantal geboren.

Beruflich war ich als Assistenzarzt im Fachgebiet Chirurgie im Sana-Krankenhaus Hürth 1985 –1988 (davon 1,5 Jahre als Assistenzarzt in der gynäkologischen, belegärztlichen Abteilung von Herrn Gynäkologen Dr. med. Louis aus Hürth) und im Kreiskrankenhaus Mechernich 1988 –1992 tätig. Im Februar 1993 legte ich erfolgreich meine Prüfung als Facharzt für Chirurgie ab.

In den Jahren 1993 – 1995 war ich als Assistenzarzt in dem Fachbereich Innere Medizin und Geriatrie ebenfalls im Kreiskrankenhaus Mechernich beschäftigt. Im Mai 1995 bestand ich erfolgreich die Prüfung als Facharzt für Allgemeinmedizin.

Seit dem 1. September 1995 bin ich als Facharzt für Allgemeinmedizin in Euskirchen-Kuchenheim niedergelassen.