

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Sankt Gertrauden Krankenhaus in Berlin, Wilmersdorf
Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prognostische Bedeutung der Wachstumsfraktion Ki-67
für das progressionsfreie Überleben
von Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Eine retrospektive Kohortenstudie an 309 Patientinnen
mit einem follow-up von mindestens 48 Monaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcelo Bustamante

aus Buenos Aires

Datum der Promotion: 11.12.2015

Zusammenfassung

Einleitung: Diese Studie wurde konzipiert, um den prognostischen Wert des Ki-67 Proliferationsindex und anderer klinischer und immunhistochemischer (IHC) Parameter bei insgesamt 309 Patienten mit primärem invasivem Mammakarzinom bewerten zu können.

Methodik: Von allen Patientinnen, die mit einem primären Mammakarzinom (N= 3104) am Sankt Gertrauden Krankenhaus von März 2005 bis August 2011 behandelt wurden, hatten 104 ein Rezidiv (P_R-Gruppe). Aus dem Tumorregister wurden 205 Patientinnen ohne Rezidiv als Vergleichsgruppe ausgewählt, bei denen eine Tumorfreiheit über mindestens 48 Monate lang nachgewiesen wurde (P_K-Gruppe). Die Gewebeproben wurden auf den Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, eine HER-2/neu (HER-2)-Überexpression und den Ki-67 Proliferationsindex hin analysiert. Die Spezifität und Sensitivität der Bestimmung des Ki-67 Index wurden mittels ROC-Kurven untersucht. Eine logistische Regressionsanalyse und eine multivariable Cox-Analyse mit klinischen und immunhistochemischen Daten wurden durchgeführt, um mit einem Rezidiv assoziierte Faktoren identifizieren zu können.

Ergebnisse: Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem progressionsfreien Überleben und einem Ki-67 Proliferationsindex mit einem „Cut-off“-Wert von 11% nachgewiesen werden, wobei es keinen scharfen „Cut-off“, sondern einen dynamischen Bereich mit fließenden Übergängen zwischen 11% und 20% gibt. Ein Ki-67 Proliferationsindex von über 20% sowie das Grading hatten in dieser Studie keinen Einfluss auf ein erhöhtes Risiko eines Rezidivs. Des Weiteren sind die folgenden Faktoren signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs korreliert: die Tumorgroße, ein positiver Nodalstatus, das Alter und die Infiltration von Lymphgefäßen. Die Fehlerrate bezüglich der prä- und intra-analytischen Phasen ist in dieser Studie geringer, da alle Proben unter gleichen Bedingungen an einer Klinik gewonnen, aufgearbeitet und ausgewertet wurden.

Schlussfolgerung:

Der Ki-67 Proliferationsindex kann als unabhängiger prognostischer Faktor eingesetzt werden. Andere klassische Prognosefaktoren wie Alter, Nodal-Status, Tumorgroße und Lymphangiosis waren nur relevant, wenn der Ki-67 Proliferationsindex unter 20% lag. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Ki-67 Proliferationsindex zwischen 11% und 20% mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom korreliert.

Abstract

Purpose: This study was designed to evaluate a prognostic value of the Ki-67 proliferation index and other clinical and immunohistochemical (IHC) features in 309 patients with primary invasive breast cancer.

Patients and Methods: For this analysis we selected consecutive data from 3104 patients with primary breast cancer treated from March 2005 to August 2011 at the Sankt-Gertrauden Hospital, Berlin, Germany, of which 104 patients had a breast cancer recurrence (P_R-group). For comparison, 205 recurrence free patients were selected as a control group whose disease-free survival was observed for at least 48 months (P_K-group). The tissue samples were stained for estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2/neu (HER-2) and Ki-67 proliferation index. In order to analyze the specificity and sensitivity of the determination of the Ki-67 proliferation index, we employed ROC-curves. A logistic regression analysis and a multivariable Cox analysis with clinical and immunohistochemical data were performed in order to identify associated factors to relapse.

Results: We found a significant correlation between relapse and a Ki-67 proliferation index with a cut-off value of 11%, whereby this cut-off value represents a dynamic range with smooth transitions between 11% and 20%. A Ki-67 proliferation index of more than 20% and the grading are not associated in this study with an increased risk of relapse. Furthermore the following parameters were found to have a significant correlation with the occurrence of relapse: the tumor size, the node positivity, the age and involvement of lymphatic vessels. The error rate regarding pre- and intra-analytical phases in this study is lower, since all probes were obtained, processed and evaluated under standard conditions.

Conclusion: The Ki-67 proliferation index can be used as an independent prognostic factor. Other classical prognosis factors like age, node status, lymphatic pathways, and tumor size are only relevant when the Ki-67 proliferation index is below 20%. Thus, a Ki-67 proliferation index between 11% and 20% correlates with a worse prognosis of primary invasive breast cancer.

Inhaltsverzeichnis

Datum der Promotion:	1
1 Einleitung	5
2 Aufgabenstellung	12
3 Methoden	13
3.1 Patientinnen	13
3.2 Ablauf der immunhistologischen Färbung	13
3.3 Scoring	14
3.4 Statistische Analyse	14
3.4.1 Deskriptive Analyse	15
3.4.2 Logistische Regression	15
3.4.3 Cox-Regression	15
4 Ergebnisse	17
4.1 Alter der Patientinnen	17
4.2 Grading	18
4.3 TumorgroÙe	19
4.4 Nodalstatus	21
4.5 Hormonrezeptor	22
4.6 HER-2/neu Status	24
4.7 Subtypen des Mammakarzinoms	25
4.8 Ki-67-Wert	26
5 Diskussion	33
5.1 Durchschnittliches Alter	33
5.2 Grading	34
5.3 TumorgroÙe	34
5.4 Nodalstatus	35
5.5 Hormonrezeptor	35
5.6 HER-2/neu Status	36
5.7 Ki-67-Index	36
6 Schlussfolgerungen	41
7 Literaturverzeichnis	42
8 Anhang	54

1 Einleitung

Weltweit repräsentiert das Mammakarzinom ein großes Gesundheitsproblem. In Deutschland lag die Zahl der erkrankten Frauen im Jahr 2012 bei ca. 69.200. In Folge dieser Erkrankung starben ca. 17.500 Frauen (GeKid, 2010). Zunehmendes Alter bleibt der wichtigste Risikofaktor für Brustkrebs und mehr als die Hälfte aller Brustkrebsfälle in Nordamerika und der Europäischen Union treten bei Frauen von 65 Jahren und älter auf (Wittherby SM et al., 2005). In Deutschland wurde die 5-Jahres-Überlebensrate in 2008 mit 78% angegeben (RKI, 2012). Als nicht-beeinflussbare Risikofaktoren gelten: existierende Erkrankung bei Verwandten 1. Grades, Mutationen in den Genen BRCA-1 und BRCA-2 oder p53 (selten), frühe Menarche, später Eintritt in die Wechseljahre und Alter (Muir C, et al, 1987; Huber et al., 2004; Beral et al., 2003). Als beeinflussbare Faktoren können Übergewicht und Ernährung (Hauner D, et al., 2011; Calle E et al., 2004), Nikotinabusus (Reynolds et al., 2004), Bewegungsmangel (Mc Tiernan et al., 2003) und Alkoholkonsum (Hamajima N et al., 2002) betrachtet werden. Zu berücksichtigen sind des Weiteren auch folgende Faktoren: Nullipara, Alter bei 1. Schwangerschaft > 30 Jahre (Britt K et al., 2012), frühere Strahlenexposition (Preston DL et al., 2002) und Anwendung oraler Kontrazeptiva über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren (Stavraky K et al., 1974). Manche reproduktive Faktoren (z.B. Schwangerschaft) können als Schutz dienen (Balogh GA et al., 2007; Britt K et al., 2007).

Zur Diagnostik und Früherkennung des Mammakarzinoms in Deutschland werden maßgeblich die Selbstuntersuchung der Brust, die klinische Brustuntersuchung und die Mammographie zusammen mit der Mammasonographie eingesetzt und gelten als komplementär. Im Alter zwischen 50 und 69 Jahren ist in Deutschland ein Mammographie-Screening zwecks früher Detektion eines Mammakarzinoms indiziert (BMG, 2003; Engel et al., 2000). Die Überlebensrate bei dieser Erkrankung als präinvasive Form oder im frühen invasiven Stadium liegt bei 90% (Michaelson J. S et al., 2002).

Patientinnen die eine auffällige Anamnese in der Familie aufweisen, sollten ab dem 25. Lebensjahr neben der Selbstuntersuchung eine zusätzliche Untersuchung und Beratung erhalten. Als Merkmale einer auffälligen Anamnese können gelten (S3 Leitlinien):

- mindestens 3 Frauen sind an Brustkrebs erkrankt
- mindestens 2 Frauen sind an Brustkrebs erkrankt, von denen 1 vor dem 51. Lebensjahr
- mindestens 1 Frau ist an Brustkrebs und 1 Frau an Eierstockkrebs erkrankt

- mindestens 2 Frauen sind an Eierstockkrebs erkrankt
- mindestens 1 Frau ist an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt
- mindestens 1 Frau mit 35 Jahren oder jünger ist an Brustkrebs erkrankt
- mindestens 1 Frau mit 50 Jahren oder jünger ist an bilateralem Brustkrebs erkrankt
- mindestens 1 Mann ist an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt

Sowohl bei klinischen Auffälligkeiten als auch bei solchen, die sich im Rahmen bildgebender Verfahren zeigen (bei Frauen unter 40 Jahren), wird in der Regel eine Ultrasonographie bevorzugt (Nothacker M et al., 2007; Nothacker M et al., 2009). Bei einem suspekten Befund (BIRADS 4-5) muss eine Probe (Stanzbiopsie oder Vakuumbiopsie) zur histologischen Abklärung aus dem suspekten Areal entnommen werden (NICE, 2009; Kreienberg R et al., 2012). Nach Bestätigung der Diagnose eines Mammakarzinoms folgen eine Stadieneinteilung, das Grading und die Bestimmung des entsprechenden Hormon- und HER-2/neu Status. Die klassische klinische Einteilung eines Mammakarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (Wittekind C et al., 2004), während das histologische Grading nach Bloom und Richardson vorgenommen wird (Bloom et al., 1957; Elston CW et al., 1991): Kategorie G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (schlecht differenziert). Diese Stadieneinteilung wird durch den Befall von Lymphbahnen (L) und Blutgefäßen (V), sowie durch den Hormonrezeptorstatus (ER und PR) und den HER-2/neu Status ergänzt.

Der Hormonrezeptorstatus, das heißt, der Nachweis von Steroidhormon-Rezeptoren im Zellkern, repräsentiert einen exzellenten prädiktiven Marker für das Ansprechen einer antihormonellen Therapie. Ungefähr 70% aller Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv (Lumachi F et al., 2013). Der human-epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER-2/neu) ist ein Protein, das sich auf ca. 25-30% der Oberfläche tumoraler Zellen befindet (Slamon DJ et al., 1989). Die Überexpression dieses Faktors ist häufiger bei Patientinnen unter 70 Jahren anzufinden und korreliert mit einem schlechteren Verlauf der Erkrankung (Anders CK et al., 2008) und ist ein sehr guter prädiktiver Faktor für die Wirksamkeit des Antiköpers Trastuzumab gegen dieses epitheliale Protein.

Ein prognostischer Faktor ist ein Parameter, der zu einem spezifischen Zeitpunkt, z.B. bei Erstdiagnose vorliegt und, sofern keine weitere Therapie erfolgt, mit dem krankheitsfreien oder dem Gesamtüberleben d.h. mit dem natürlichen Krankheitsverlauf korreliert. Als prädiktiven Faktor versteht man einen Parameter, der das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie definiert. Als klassische Prognosefaktoren, mit denen z. B. eine Therapie mit Hilfe eines

Kalkulationsprogramms eingeschätzt werden kann (Olivotto I et al., 2005), gelten wie in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet:

Tab. 1: Prognostische Faktoren (nach den AGO-Leitlinien 2012).

Faktor	Oxford/ AGO LoE /GR		
Tumorgröße	1a	A	++
Lymphknotenstatus	1a	A	++
Grading	2a	B	++
Gefäßinvasion	2b	B	+
Hormonrezeptorstatus	2a	B	++
HER-2/neu Status	2b	B	+/-
Alter	2a	B	++

Das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Brustkrebs ist durch die Größe des Tumors und den Befall axillärer Lymphknoten beeinflusst (James S et al., 2003; Rosen PP et al., 1991; Carter CL et al., 1989; Fisher ER et al., 1993; Rosen PP et al., 1993; Quiet CA et al., 1996). Jeder positive Lymphknoten erhöht die Mortalitätsrate um 6% (Michaelson JS et al., 2003). Tumorgrad und das Vorhandensein einer lymphatischen Invasion scheinen mäßig stärkere prognostische Faktoren sein, wobei jedoch die Reproduzierbarkeit schlecht ist, wenn es sich vor allem um Grad 2 Tumore handelt.

Invasionen in benachbarte Blut- und Lymphgefäße und das Grading scheinen stärkere prädiktive Faktoren für die Wirksamkeit einer adjuvanten Chemotherapie zu sein. Die Reproduzierbarkeit, vor allem bei Grad 2 Tumoren, ist jedoch ebenfalls als schlecht einzuschätzen (Hayes DF, 2005). Üblicherweise sind Mammakarzinome in Hormonrezeptor-positive und -negative Gruppen unterteilt. Osborne et al. konnten die Nutzung einer adjuvanten antihormonellen Therapie mit Tamoxifen in 1978 nachweisen (Osborne CK et al., 1978).

Östrogen-Rezeptor (ER)-Expression ist der wichtigste Indikator für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie (ET). Circa 70% der menschlichen Brustkrebs (BC)-Zellen sind hormon-abhängig und ER-positiv (Lumachi F et al., 2013).

Die Amplifikation des HER-2/neu Gen ist ein signifikanter prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben als auch für die Zeit bis zum Rezidiv bei Patientinnen mit Brustkrebs. Dieser Faktor behält seine Bedeutung, auch wenn eine Anpassung für andere bekannte prognostische Faktoren vorgenommen wurde (DJ Slamon et al., 1987). Diagnosen bei Patientinnen junger

Altersstufen korrelieren mit schlechten Prognosen und definieren eine Teilmenge von Brustkrebs mit einem gemeinsamen Muster der Genexpression (Carey K et al., 2008). Mehrere Studien belegen, dass die Bestimmung weiterer Parameter als neue Prognosefaktoren dienen kann (Tab. 2).

Tab. 2: Weitere Prognostische Faktoren (nach den AGO-Leitlinien 2012).

Faktor	Oxford/ AGO LoE /GR		
Proteolysefaktoren uPA/PAI-1	1a	A	+
Genexpressionsprofile	2b(-)	D	-
Disseminierte Tumorzellen (KM)	2b	B	+ / -
Proliferationsmarker (Ki-67)	1b	B	+

Es kann mittlerweile als erwiesen gelten, dass die Invasion und Metastasierung bei soliden Tumoren durch die Wirkung von Tumor-assoziierten Proteasen gefördert wird, welche die Auflösung der umgebenden Tumor-Matrix und Basalmembran unterstützen. Der Serinprotease Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), welcher in soliden Tumoren erhöht ist, scheint eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen zu spielen (Jänicke MD et al., 1993). Mit Hilfe der Invasionsfaktoren uPA/PAI-1 kann das Rezidivrisiko für Patientinnen mit Nodal-negativem Mammakarzinom besser abgeschätzt werden. Die Bestimmung von Tumor-Invasionsfaktoren, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Inhibitor Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) sind empfohlene Krebs-Biomarker (American Society of Clinical Oncology (ASCO)) für die Beurteilung, ob Nodal-negative Brustkrebspatientinnen auf eine adjuvante Chemotherapie verzichten können (Harris L et al., 2007; Kreienberg R et al., 2008). Nichtsdestotrotz hat das Panel von Experten im Rahmen der Konferenz von St. Gallen von 2013 wiederum gegen die Bestimmung von uPA/PAI-1 als prädiktiven Faktor und für den Einsatz einer Chemotherapie votiert.

Mit der Entwicklung und Durchführung von Genexpressionsprofilen ist es möglich, anhand der verschiedenen intrinsischen Subtypen, der Prognose (Sortie et al., 2001) und das Metastasierungsmuster (Smid M et al., 2008), das Ansprechen auf eine primäre (neo)adjuvante Chemotherapie besser einzuschätzen (van 't Veer LJ et al., 2002). In Deutschland werden diese Tests von Oncotype-DX (Paik S et al., 2004), Mammaprint (van 't Veer LJ et al., 2002; Druker CA et al., 2013) und EndoPredict (Martin Filipits et al., 2011) eingesetzt.

Die Anwesenheit von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) bei Patientinnen mit Brustkrebs, die sich mit der CellSearch-Methode detektieren lassen, ermöglicht es, das

progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben vorherzusagen (Cristofanilli et al., 2006; Stathopoulou et al., 2002). Diese Methode ist jedoch nur durch die FDA in den USA und bei bestimmtem Krebsarten zugelassen.

Biomarker sind Moleküle, die sich im Blut, in Körperflüssigkeit oder Gewebe als Zeichen eines normalen bzw. anormalen Prozesses oder im Rahmen einer Erkrankung befinden. Durch ihre Bestimmung es ist möglich, den Verlauf krankheitsspezifischer Prozesse sowie das Ansprechen einer bestimmten Therapie zu beurteilen. Der Biomarker Ki-67 ist ein nukleares Antigen, das durch das MIB1-Gen kodiert ist. Die Funktion des Ki-67-Antigens ist bislang noch unbekannt. Das Histone-Protein Ki-67 wurde durch Gerdes et al. im Jahr 1983 erstmals identifiziert (Gerdes et al., 1983). Dieses befindet sich im langen Arm des Chromosoms 10 (10q25) (Fonatsch C et al., 1991). Dieses Gen ist mit der RNA-Ribosomal-Transkription assoziiert. Das Antigen wird im Zellkern produziert und ausschließlich im Rahmen der Proliferation der Zellen und während der G1- bis zur M-Phase exprimiert (Scholzen T et al., 2000; Gerdes J et al., 1983). Der entsprechende Antikörper wurde wenig später von der gleichen Gruppe in Kiel (daher "Ki") nach der Immunisierung von Mäusen mit der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 (67 bezieht sich auf die Klon-Nummer auf der Well-Platte, in der er gefunden wurde) beschrieben (Gerdes J et al., 1983). Der monoklonale Antikörper Ki-67 reagiert mit einem menschlichen, nuklearen, proliferationsassoziierten Antigen, das sich in allen aktiven Teilen des Zellzyklus befindet (Cattoretti G et al., 1992). Die Expression des Antigens erhöht sich während der Zellteilung, insbesondere in der zweiten Hälfte der S-Phase, und erreicht ein Maximum in der G2M-Phase (Sasaki K et al., 1987). Das Protein wird nicht in inaktiven Zellen produziert. Deshalb dient es als exzellenter Marker für die Proliferationsrate eines Tumors. Deren Bestimmung, der sogenannte Ki-67-Labeling-Index, (Prozent der Zellen mit Ki-67 mit positiver nukleärer Immunofärbung) erlaubt eine Aussage zur Prognose des Mammakarzinoms (Viale G et al., 2008; Williams DJ et al., 2011; Tanei T et al., 2011; E de Azambuja et al., 2007).

Die Behandlung des Mammakarzinoms umfasst die Chirurgie (brusterhaltende Operation der Brust (BET) oder Ablatio mit oder ohne Rekonstruktion), die autolog oder heterolog sein kann, eine primär systemische, adjuvante oder palliative Endokrin-, Chemo-, oder Antikörpertherapie und die Bestrahlung (mit oder ohne Boost der Brust und der LAW). Eine BET wird durchgeführt, wenn zwischen Tumor (invasives Karzinom und begleitendes DCIS) und Schnittrand ein Sicherheitsabstand von mindestens 1 mm gewährleistet ist (NICE, 2009; Dunne C et al., 2009). Diese Behandlung wird anhand der Stadieneinteilung und der Bestimmung der Prognosefaktoren und prädiktiven Faktoren im Rahmen einer Tumorkonferenz

festgelegt. Ziel der Therapie ist die Vermeidung eines Rezidivs der Krankheit. Als Rezidiv versteht man das Wiederauftreten einer Erkrankung nach ihrer völligen Abheilung.

Die aktuelle Behandlung der AGO nach brusterhaltenden Operationen bei invasivem Brustkrebs ist die Bestrahlung mit oder ohne Boost. Eine intraoperative Radiotherapie hat sich als sinnvoll erwiesen (Veronesi et al., 2010; Vaidya JS et al., 2011).

Für die Indikationsstellung einer adjuvanten antihormonellen Therapie ist es notwendig, die Situation des Rezeptorstatus nachzuweisen. Bezüglich einer adjuvanten Chemotherapie ist die Situation nicht ganz klar definiert. Ziel einer Chemotherapie ist es, die möglichen verstreuten Tumorzellen abzutöten, um ein Rückfallrisiko zu minimieren. Studien weisen darauf hin, dass zwei Drittel der Frauen durch die alleinige Operation geheilt werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. 1998). Das verbleibende Drittel entwickelt ohne weitere Therapie Metastasen und profitiert von einer Chemotherapie in unterschiedlicher Weise. Typischerweise ist eine Chemotherapie bei befallenen Lymphknoten, endokrin nicht sensitiven Tumoren, HER-2/neu-positiven Tumoren, schlecht differenzierten Tumoren und sehr jungen Patientinnen indiziert (Ferguson T et al., 2007).

Auf dem Expertentreffen in St. Gallen im Jahr 2009 (Goldhirsch A et al., 2009) wurde eine Risiko-Klassifikation erstellt, welche in Tabelle 3 dargestellt ist.

Tab. 3: Übersicht über die Risiko-Klassifikation von St. Gallen (2009).

Risiko		
Niedriges Risiko	pT < 1cm und N0 (kein weiteres Risiko)	oder alle der folgenden Kriterien: N0, HR+, pT ≤ 2cm, G1, Alter > 35 Jahre, HER-2/neu, VI0
Mittleres Risiko	N0 und HR+ und 1 weiteres Risiko: pT ≤ 2cm, G2-3, HER-2/neu+, VI0	oder N1-3 und HR+ und kein weiteres Risiko
Hohes Risiko	N ≤ 4	oder N1-3 und weiteres Risiko oder HR- (jedes weitere Risiko)

Anhand dieser Klassifikation werden sich die meisten Patientinnen in der mittleren Risiko-Klasse befinden, in der eine Chemotherapie relativ indiziert ist. Unter dieser Konstellation erhalten 60–80% aller Nodal-negativen Patientinnen mit T1-2-Tumoren und positivem Hormonrezeptorstatus eine adjuvante Chemotherapie. Hier werden nur 5% der Patientinnen davon profitieren, da die Chemotherapie in nur ca. 25–30% der Fälle das relative Risiko reduzieren kann (A. Hartkop et al., 2007).

Mit Hilfe von Multiparameter-Genexpressionsanalysen lässt sich das Mammakarzinom in vier molekulare Subtypen unterteilen: in einen „Luminal-A-Typ“, der einen positiven Rezeptor und eine gute Differenzierung aufweist, einen „Luminal-B-Typ“ mit einem höheren Tumorigrad und ebenfalls positivem Hormonrezeptor, einen „HER-2/neu-Typ“ mit einer HER-2/neu Überexpression, und einen Triple-Negative-Subtyp mit negativem Hormon/HER-2/neu-Rezeptor (Perou, C.M., et al., 2000; Kuo-Jang Kao et al., 2011).

Aufgrund der verschiedenen Subtypen bei Mammakarzinomen und anhand des Ki-67-Werts (Cheang et al., 2009) wurden 2011 und 2013 in St. Gallen folgende therapeutische Empfehlungen gegeben (Tab. 4). Diese Einteilung ermöglicht es zukünftig besser zwischen Patientinnen, die tatsächlich von einer Chemotherapie profitieren und solchen, die durch eine Chemotherapie übertherapiert wären, zu unterscheiden (Melcher C et al., 2012).

Tab. 4: Subtypen des Mammakarzinoms und therapeutische Optionen nach den St. Gallen-Empfehlungen (2011).

	ER	PR	Ki-67	Alternative Marker	HER-2	ET	CHT	AntiH2
Luminal A	+	+ oder –	≤ 14 %	G1-G2	–	+	–	–
Luminal B	+	+ oder –	> 14 %	G3	–	+	+	–
Luminal B HER-2 Pos	+	+ oder –	jeder Wert	ISH oder I	+	+	+	+
HER-2/neu Pos	–	–	jeder Wert		+	–	+	+
Triple negativ	–	–	jeder Wert		–	–	+	–

2 Aufgabenstellung

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist:

die Festsetzung eines „Cut-off“-Wertes des Ki-67-Index für Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko und die Beurteilung der Präzision der Bestimmung des Ki-67-Wertes als prognostische Bedeutung für das progressionsfreie Überleben.

Die sekundären Ziele dieser Arbeit sind:

- 1) zu untersuchen, bei welchen Faktoren die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv erhöht ist.
- 2) den Einfluss des Ki-67-Wertes auf das krankheitsfreie Überleben („disease-free survival“) zu analysieren.
- 3) zu untersuchen, ob eine vermehrte Expression von Ki-67 mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist (Etablierung einer Korrelation zwischen Ki-67 und TNM bzw. ICH).
- 4) einen „Cut-off“-Wert des Ki-67-Index von 14% zu verifizieren.
- 5) die eigenen Ergebnisse mit anderen bereits veröffentlichten Studien zu vergleichen.

3 Methoden

3.1 Patientinnen

Die Daten aller Patientinnen (N= 3104) wurden in das Tumorregister des Sankt Gertrauden Krankenhaus von März 2005 bis August 2011 eingetragen. Davon wurden alle Patientinnen mit einem lokalen, lokoregionären und distanten Rezidiv eines invasiven Mammakarzinoms ausgewählt, bei denen der Ki-67-Wert erfasst wurde. Diese Patientinnen-Gruppe wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „**P_R-Gruppe**“ bezeichnet und umfasst 104 Patientinnen. Als Vergleichsgruppe wurden alle Patientinnen des Tumorregisters ohne Rezidiv ausgewählt, bei denen der Ki-67-Wert bestimmt wurde und bei denen mindestens 48 Monate nach der Ersterkrankung eine Tumorfreiheit nachgewiesen werden konnte. Die Erstdiagnose wurde somit zwischen März 2005 und August 2007 festgestellt. Diese Patientinnen-Gruppe wird nachfolgend als „**P_K-Gruppe**“ bezeichnet und ergibt eine Stichprobe von 205 Patientinnen.

Übliche allgemeine Angaben der Patientinnen (Name, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht, Identifikationsnummer) neben histologischem Typ, Grading, TNM-Klassifikation, Hormonrezeptor des Tumors sowie die Therapie und Eintreten des Rezidivs bzw. das Sterbedatum lagen vor. Patientinnen die aufgrund der Chemotherapie oder aufgrund anderer Erkrankungen (z.B. Uterussarkom) verstorben sind, wurden nicht analysiert. Kontralateral aufgetretene Mammakarzinome wurden ausgeschlossen. Alle Angaben erfolgten durch unser Brustzentrum und durch Telefonate mit den Patientinnen, bzw. den weiterbetreuenden Arztpraxen.

3.2 Ablauf der immunhistologischen Färbung

Vorbereitung am Vortag:

Anfertigen von 2 Mikrom dicken Paraffinschnitten

Trocknen der Schnitte bei 25°C über Nacht

Immunfärbung:

Entparaffinieren der Schnitte für 20 min in Xylol

Rehydratisierung in absteigender Alkoholreihe; je 2 min. pro Alkohol

Spülen mit fließendem Leitungswasser
Antigendemaskierung
Spülen mit fließendem Leitungswasser
Spülen mit Waschpuffer (Tris-Kochsalz-Puffer, pH 7,6)
Inkubation mit dem Primär-Antikörper für 60 min.
Spülen mit Waschpuffer
Inkubation mit Post Block (Rabbit-anti Mouse) für 20 min.
Spülen mit Waschpuffer
Inkubation mit AP-Polymer anti-Rabbit für 30 min.
Spülen mit Waschpuffer
Inkubation Chromogen/Substrat (Permant Red)
Spülen mit Leitungswasser
Gegenfärben mit Hämatoxylin für 20 sec.
Abspülen mit Leitungswasser, 10 sec. Bläuen in Lithiumcarb. (1%)
Dehydratisierung in aufsteigender Alkoholreihe; je 1 min. pro Alkohol
Xylol für 5 min.
Eindeckeln mit permanentem Eindeckmedium

Diese Arbeiten erfolgten im Institut für Pathologie im Sankt Gertrauden-Krankenhaus.

3.3 Scoring

Der Antikörper zeigt ein positives Ergebnis in den Kernen proliferierender Zellen in Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe. Der Ki-67-Index wird als Prozentsatz der Gesamtzahl der Tumorzellen mit Kernfärbung definiert (Yerushalmi M et al., 2010; Dowset et al., 2011). Diese Bewertung ist im Sankt Gertrauden standardisiert. Seit Einführung und Etablierung dieser Technik gab es keine Änderungen der Bewertung der Ergebnisse.

3.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen (logistische Regression) wurden mit dem Programm SPSS (Version 17.0), der Chi-Quadrat-Test mit dem Programm GraphPad InStat (Version 3) und der T-Test mit

dem Programm Excel von Microsoft Office durchgeführt. Die ROC-Kurven wurden mit dem Programm R durchgeführt.

3.4.1 Deskriptive Analyse

Die kategorischen Daten wurden verteilungsfrei getestet. Numerische Daten mit ordinaler oder kontinuierlicher Verteilung wurden Normalitätstests unterzogen, um zu prüfen, ob sie nach diesen Kriterien parametrisch oder verteilungsfrei sind.

Zur Prüfung von Verteilungshypothesen wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt (Grading, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptor und HER-2/neu). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die Analyse der Sensitivität und Spezifität mit verschiedenen „Cut-off“ Werten wurde mit einer ROC-Kurve durchgeführt. Rezidiv wurde als Variablenresultat genommen.

3.4.2 Logistische Regression

Ziel der Analyse war es, mögliche Variablen oder Faktoren, die das Auftreten eines Rezidivs beeinflussen können, zu detektieren. Die logistischen Regressionen wurden mit verschiedenen „Cut-offs“ für Ki-67 und dafür folgende unabhängige Variablen (Alter, Grading, Immunohistochemie, Tumorgröße und Therapie) analysiert. Für jede logistische Regression wurden die Koeffizienten B der Variablen mit den Signifikanzen, die zugehörige Odds Ratio und die Konfidenzintervalle von 95% bestimmt. Alle Variablen waren, außer den numerischen Variablen „Alter“ (in Jahren eingegeben), kategorisch. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

3.4.3 Cox-Regression

Es wurde eine „Survival Analyse“, auch als Cox-Regression bekannt, durchgeführt, um den Zeitpunkt festzustellen, zu dem ein Rezidiv auftreten kann.

Bei jeder Patientin wurden folgende Daten in eine Excel-Tabelle eingetragen:

- 1) Alter der Patientin (in Jahren).
- 2) Datum der Diagnose des Mammakarzinoms.
- 3) Grading des Tumors (G1, G2, G3).
- 4) Immunohistochemie des Tumors (HR, HER-2/neu).

- 5) TNM Klassifikation.
- 6) Wachstumsfaktor des Tumors in Prozent (Ki-67-Index).
- 7) Therapie (Chemotherapie, Bestrahlung, Antihormonelle Therapie).
- 8) Im Falle der Patientinnen mit Rezidiv (lokal oder systemisch mit Ausnahme von kontralateralen Mammakarzinomen) wurde der Zeitpunkt aufgeführt, wann dieses auftrat.

Zur Bewertung der Faktoren, die einen Einfluss auf das Auftreten eines Rezidivs haben, wurde die negative Expression von Hormonrezeptoren als negativer Faktor eingetragen. Der Nachweis der Überexpression von HER-2/neu wurde als negativer Faktor aufgelistet. Alle Faktoren wurden mit der logistischen Regression analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Alter der Patientinnen

Es wurde das Alter der Patientinnen mit Rezidiv (P_R -Gruppe) und der Patientinnen der Kontrollgruppe (P_K -Gruppe) mit einem ungepaarten, zweiseitigen T-Test analysiert. In dieser Studie betrug der Mittelwert 63,61 Jahre für die P_R -Gruppe und 59,95 Jahren für die P_K -Gruppe (Tab. 5, Abb. 1). Der Altersunterschied der beiden Patientinnen-Gruppen ist signifikant verschieden.

Tab. 5: Altersunterschied der beiden Patientinnen-Gruppen.

	P_R-Gruppe	P_K-Gruppe
Mittelwert	63,61	58,95
Varianz	203,85	131,93
Anzahl der Patientinnen	104	205
P(T<=t) zweiseitig	0,0021	

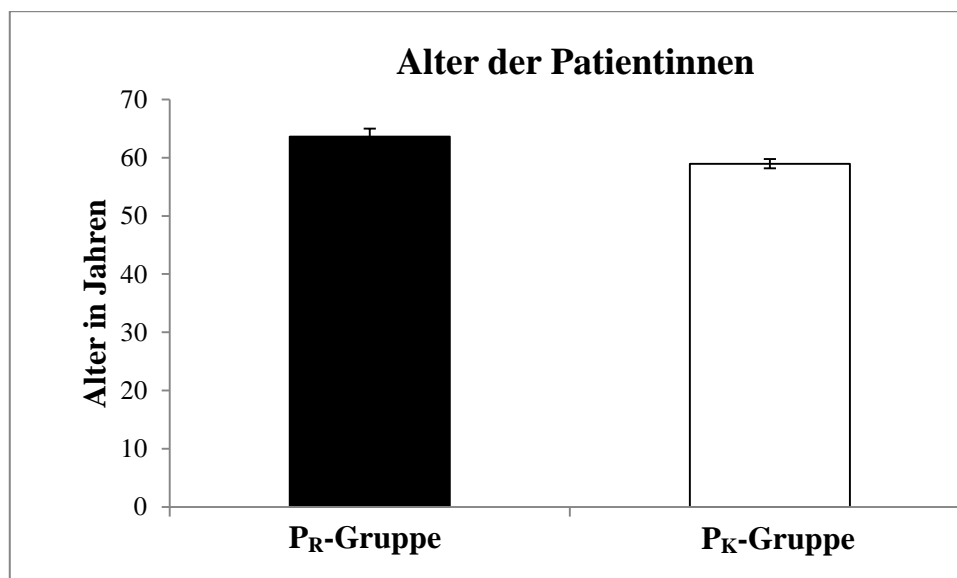


Abb. 1: Mittelwert des Alters der beiden Patientinnen-Gruppen in Jahren mit Standardfehler.

Die Altersverteilung der Patientinnen ist in Abbildung 2 dargestellt. Das Alter der Mehrheit der Patientinnen beträgt 50 bis 70 Jahre.

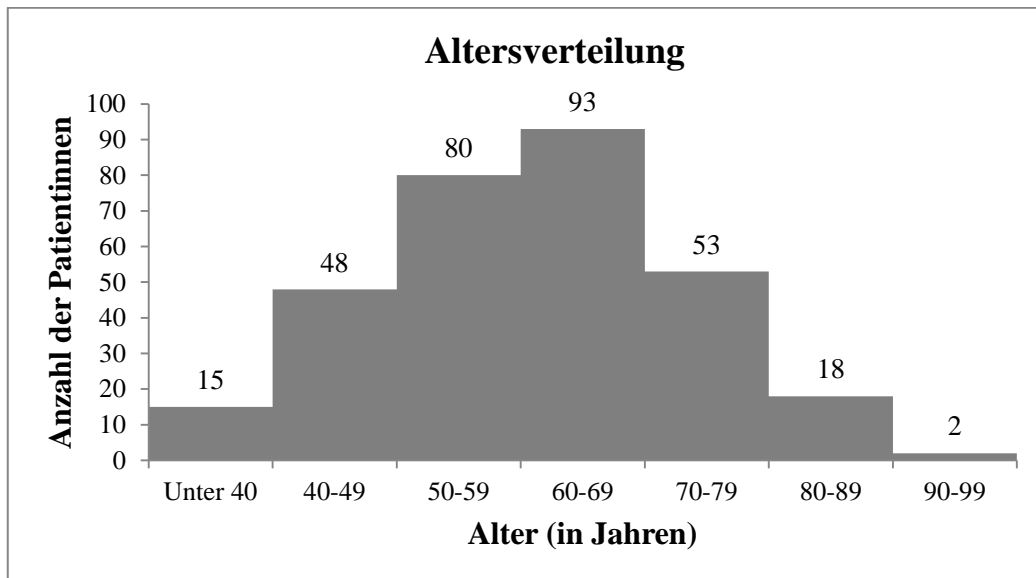


Abb. 2: Altersverteilung (in Jahren) der beiden Patientinnen-Gruppen.

4.2 Grading

Bei unseren Patientinnen erbrachte diese Studie, dass 11% aller Tumore gut differenziert (G1) waren, 59% als mäßig differenziert (G2) und 30% als schlecht differenzierte (G3) Karzinome klassifiziert wurden (Abb. 3).

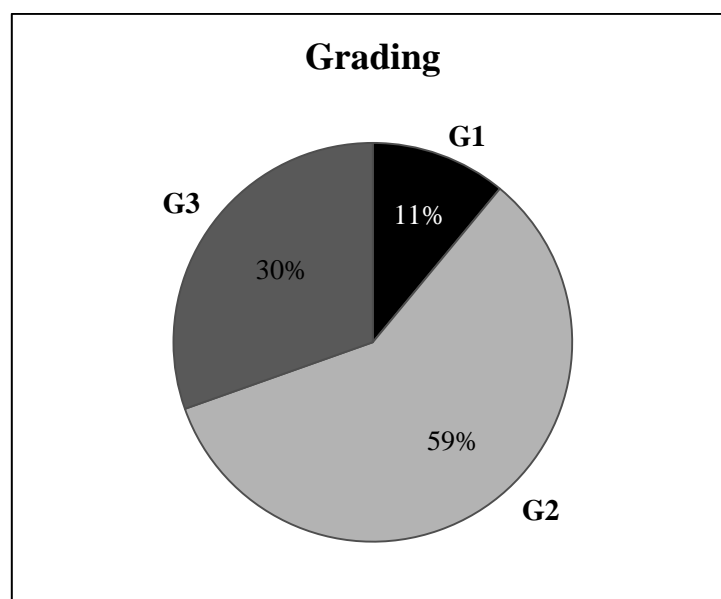


Abb. 3: Grading-Typen bei den Patientinnen in Prozent.

Betrachtet man nun die Patientinnen-Gruppen getrennt voneinander, so ergibt sich, dass die Kontrollgruppe (P_K-Gruppe) vorwiegend den Grading-Typ G2 aufweist, wohingegen die Patientinnen mit einem Rezidiv (P_R-Gruppe) eine fast gleiche Verteilung bei den Grading-Typen G2 und G3 zeigen (Abb. 4).

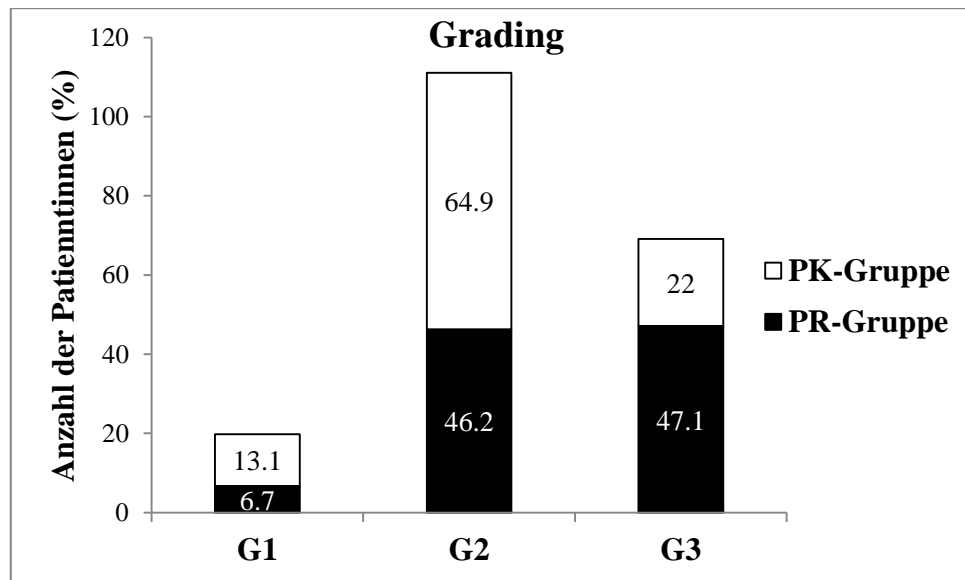


Abb. 4: Verteilung der Grading-Typen bei den Patientinnen-Gruppen in Prozent.

Es konnte beim Chi-Quadrat-Test nach Pearson statistisch nachgewiesen werden, dass die beiden Patientinnen-Gruppen eine hochsignifikant unterschiedliche Verteilung der Grading-Typen aufweisen (Chi-quadrat = 21,093, Freiheitsgrade = 2, $p < 0,0001$).

4.3 Tumorgröße

Die Bestimmung der Tumorgröße bei unseren Patientinnen erbrachte, dass 47% (146) aller Patientinnen als T1, 39% (120) als T2, 11% (33) als T3 und 3% (10) als T4 eingestuft werden konnten (Abb. 5). Das bedeutet, dass bei fast 50% der Patientinnen ein Mammakarzinom in einem früheren Stadium diagnostiziert wurde.

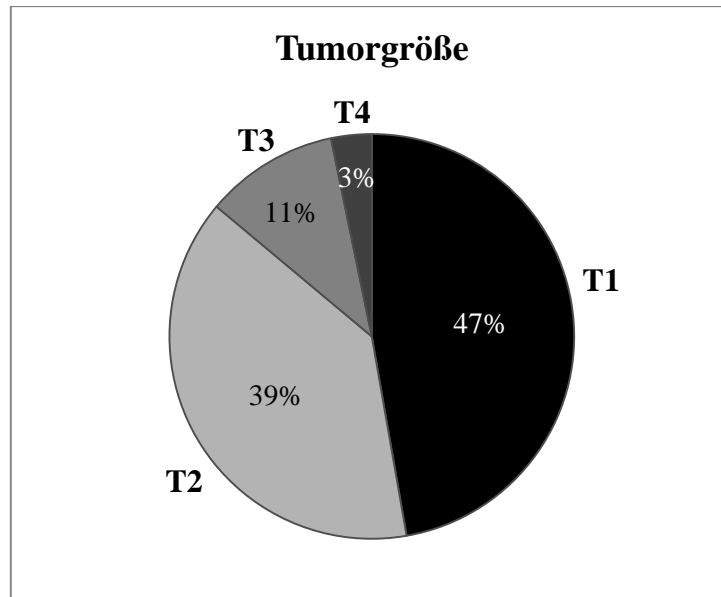


Abb. 5: Grading-Typen bei den Patientinnen in Prozent.

Vergleicht man die Tumorgöße der beiden Patientinnen-Gruppen getrennt voneinander, so zeigt sich, dass die Mehrheit der Patientinnen der Kontrollgruppe (P_K -Gruppe) eine T1-Klassifikation besitzt, wohingegen die Mehrheit der Patientinnen mit einem Rezidiv (P_R -Gruppe) der T2-Klassifikation zugeordnet werden können (Abb. 6).

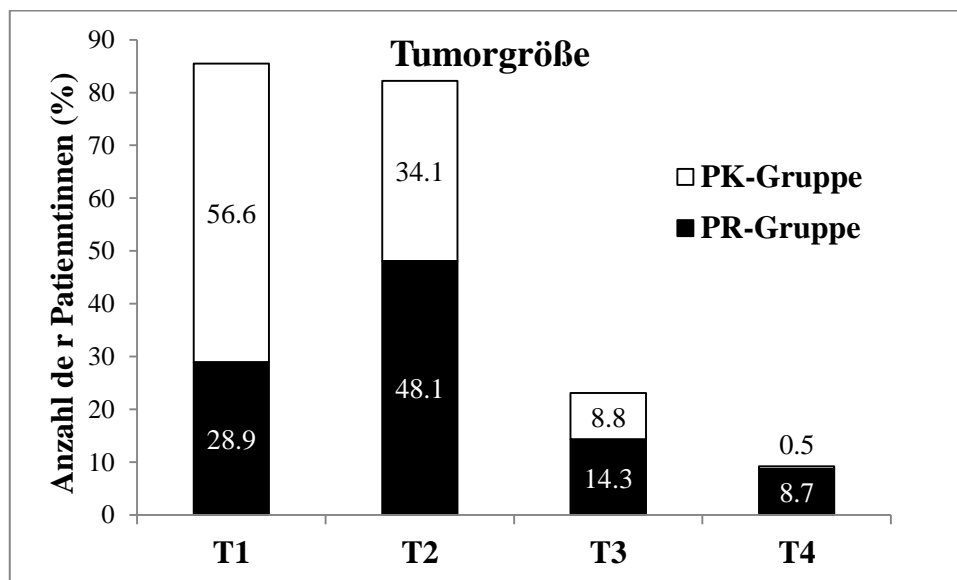


Abb.6: Verteilung der Tumorgöße bei den Patientinnen-Gruppen in Prozent.

Die unterschiedliche Verteilung der Tumorgöße wurde mit einem Chi-Quadrat-Test nach Pearson analysiert. Das Ergebnis zeigt einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen der

Tumorgröße und dem Auftreten eines Rezidivs (Chi-quadrat = 30,958, Freiheitsgrade = 3, $p < 0,0001$).

4.4 Nodalstatus

Der Nodalstatus in dieser Studie ergab, dass bei 181 Patientinnen (59%) die Lymphknoten nicht betroffen waren (N0). Bei 81 Patientinnen (26%) war ein N1-Status nachzuweisen. 23 Patientinnen davon (7%) hatten einen N2-Status und 24 (8%) Patientinnen hatten einen N3-Status (Abb. 7).

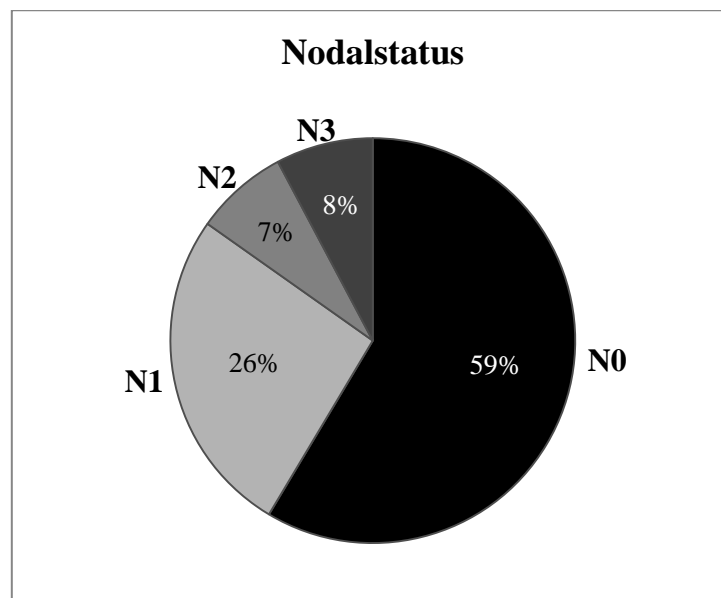


Abb.7: Nodalstatus bei den Patientinnen in Prozent.

Bei der Betrachtung der beiden Patientinnen-Gruppen getrennt voneinander ist ersichtlich, dass bei der Mehrheit der Patientinnen der Kontrollgruppe die Lymphknoten nicht betroffen sind (Nodalstatus 0). Die Patientinnen mit einem Rezidiv zeigen dagegen einen positiven Nodalstatus (Abb. 8).

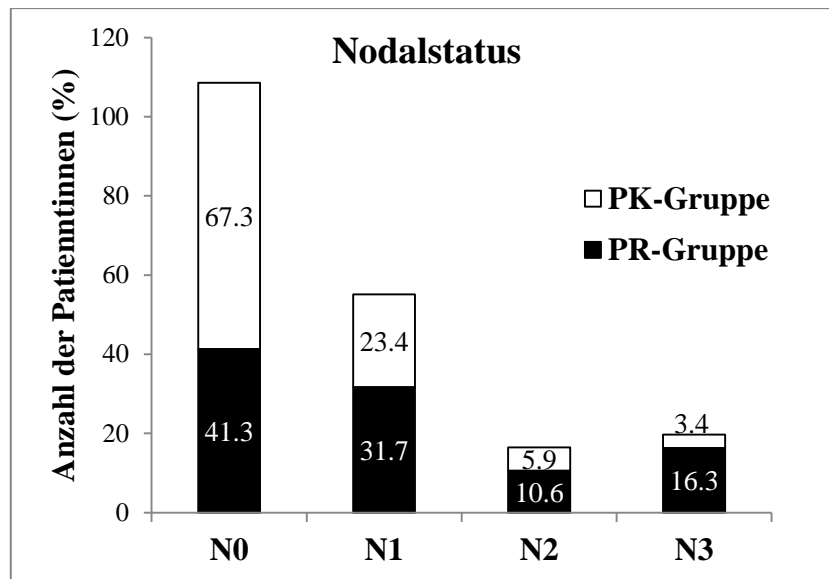


Abb. 8: Verteilung des Nodalstatus bei den Patientinnen-Gruppen in Prozent.

Die oben beschriebene Beobachtung wird durch die statistische Analyse unterstützt. Ein Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigt einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen dem Nodalstatus und dem Auftreten eines Rezidivs (Chi-Quadrat = 26,688 Freiheitsgrade = 3, $p < 0,0001$).

4.5 Hormonrezeptor

Bei jedem Mammakarzinom wird die Hormonabhängigkeit des Tumors untersucht. Die Abwesenheit von Hormonrezeptoren (Östrogen und Progesteron) im Tumor ist mit einem früheren Wiederauftreten der Krankheit korreliert. Manche Studien weisen darauf hin, dass die Anwesenheit des Progesteronrezeptors als besserer Prognosefaktor und das Auftreten des Östrogenrezeptors als besserer prädiktiver Faktor betrachtet werden können. In Übereinstimmung mit der angegebenen Literatur, besaßen 79% der Patientinnen einen positiven Hormonrezeptor-Status (Abb. 9). Der Anteil des Progesteronrezeptor bei den Patientinnen in dieser Studie betrug 61,1%.

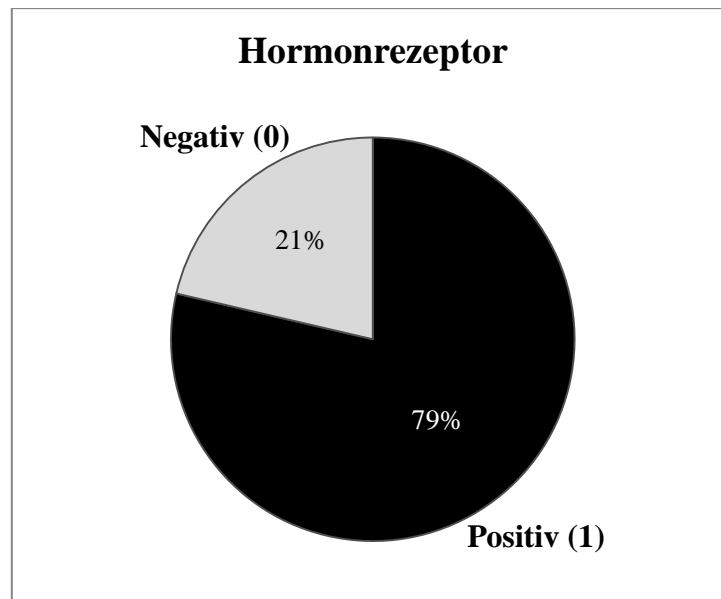


Abb.9: Hormonrezeptor bei den Patientinnen in Prozent.

Die getrennte Darstellung des Hormonrezeptor-Status der beiden Patientinnen-Gruppen zeigt, dass die Kontrollgruppe vorwiegend Hormonrezeptor-positiv ist. Auch bei der P_R-Gruppe überwiegt ein positiver Hormonrezeptor-Status, jedoch ist hier das Verhältnis zu einem negativen Hormonrezeptor-Status geringer (Abb. 10).

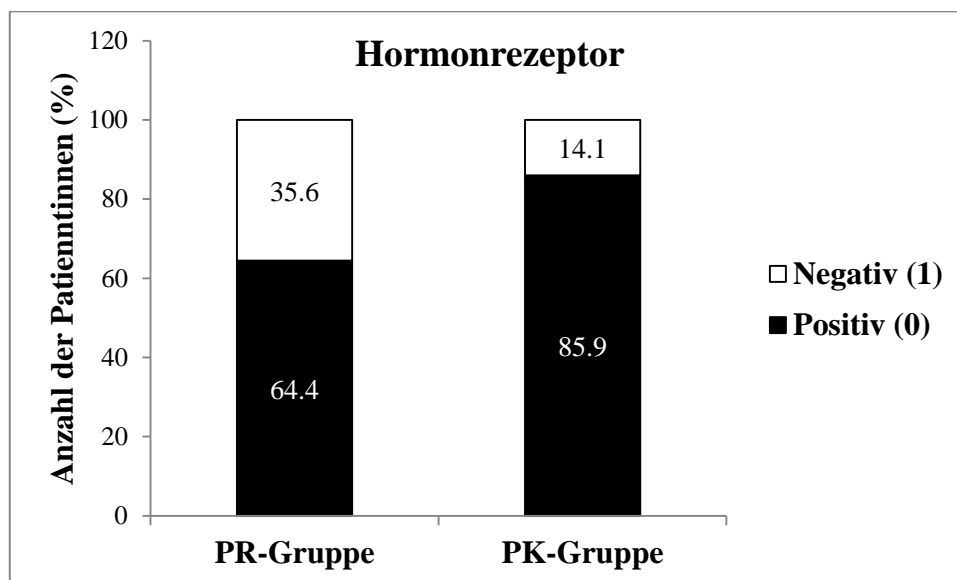


Abb. 10: Verteilung des Hormonrezeptors bei den Patientinnen-Gruppen in Prozent.

Die statistische Analyse bestätigt wiederum die oben genannte Beobachtung: der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergibt, dass Patientinnen mit einem Rezidiv(P_R-Gruppe) ein signifikant

niedrigeres Auftreten des Hormonrezeptors aufweisen (Chi-quadrat = 18,865, Freiheitsgrade = 1, $p < 0,0001$).

4.6 HER-2/neu Status

Bei der vorliegenden Studie hatten 19% der Patientinnen einen positiven HER-2/neu Status (HER-2/neu in IHC überexprimiert (3+) oder in der FISH-/CISH- Analyse amplifiziert). (Abb. 11).

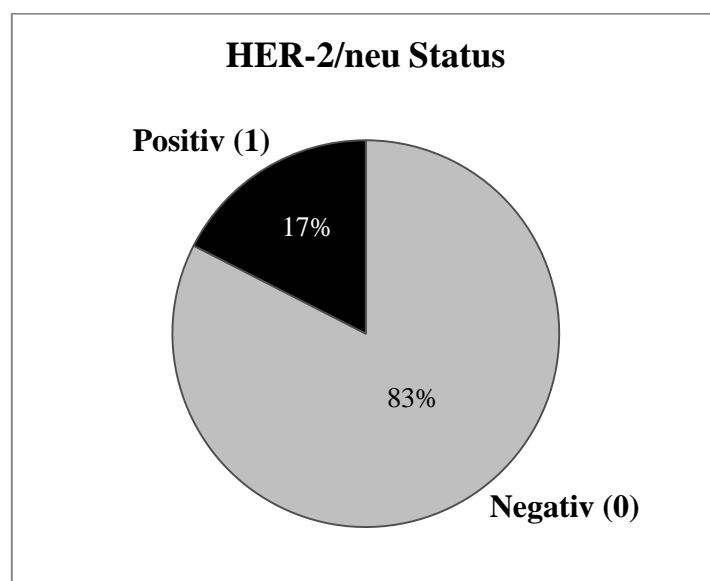


Abb.11: Hormonrezeptor bei den Patientinnen in Prozent.

Betrachtet man den HER-2/neu-Status der beiden Patientinnen-Gruppen, so erhält man für beide Gruppen eine ähnliche Verteilung (Abb. 12).

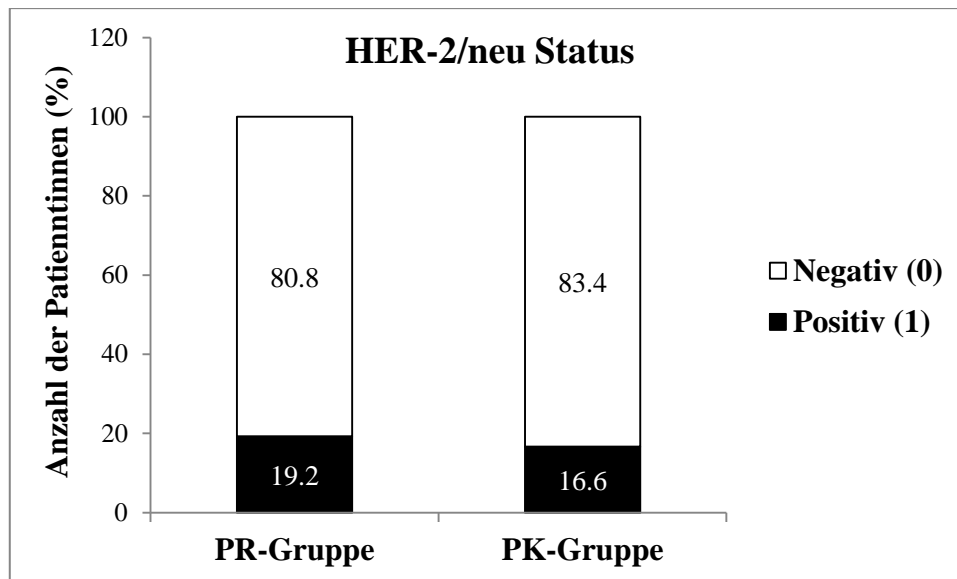


Abb.12: Verteilung des HER-2/neu Status bei den Patientinnen-Gruppen in Prozent

Es konnte im Chi-Quadrat-Test kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Chi-quadrat= 0,3348, Freiheitsgrade= 1, p=0,5628).

4.7 Subtypen des Mammakarzinoms

Eine Analyse der beiden Patientinnen-Gruppen bezüglich der verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms ergibt eine unterschiedliche Verteilung vor allem für den Subtyp Luminal A. Dieser Subtyp ist mit einer besseren Prognose korreliert und ist wesentlich häufiger bei der Kontrollgruppe (P_K-Gruppe) vertreten (Abb. 13).

Einige Patientinnen konnten jedoch nicht anhand der Klassifikation nach den Empfehlungen von St. Gallen zugeordnet werden, welche als „nicht klassifizierbar“ in Abb. 13 dargestellt sind.

Diese Patientinnen sind wie folgt:

- Östrogen positiv / Progesteron negativ / Herceptin negativ (29 Patientinnen)
- Östrogen negativ / Progesteron positiv / Herceptin positiv (2 Patientinnen)
- Östrogen negativ / Progesteron negativ / Herceptin negativ (3 Patientinnen)

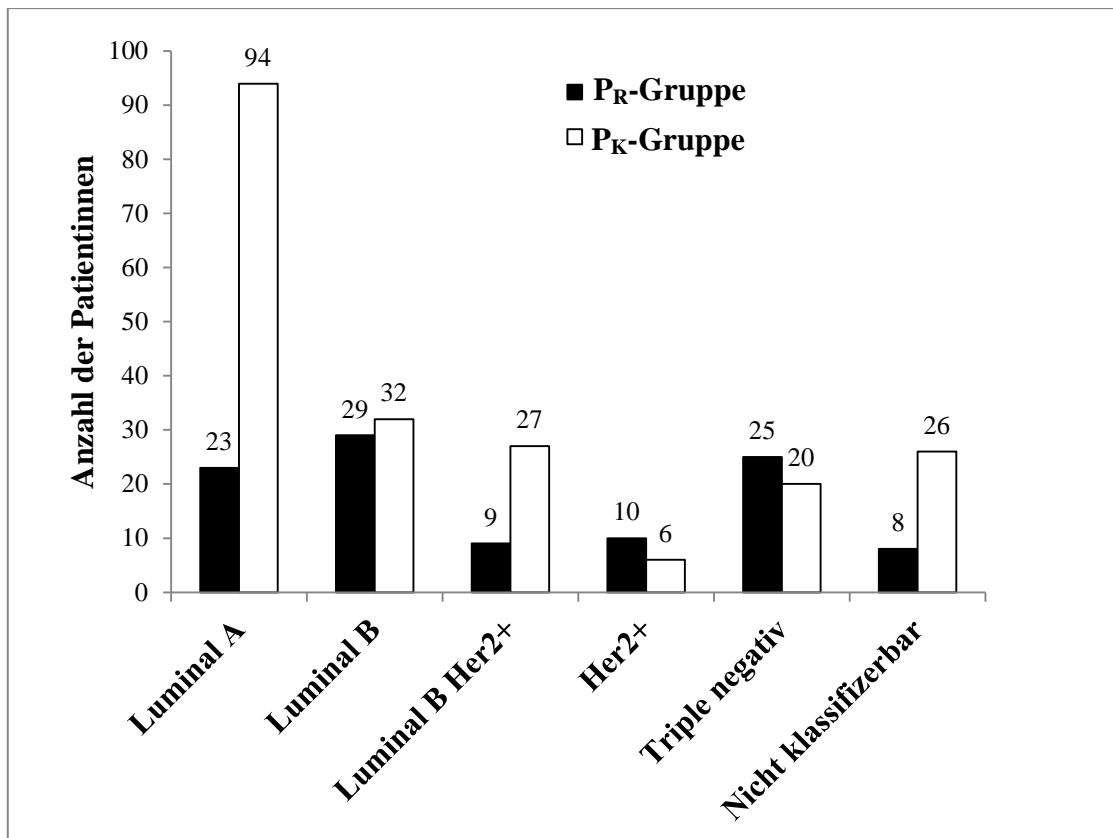


Abb. 13: Verteilung der Subtypen des Mammakarzinoms aus den Empfehlungen von St. Gallen.

4.8 Ki-67-Wert

Die Bestimmung des Ki-67-Wertes wurde bei allen Patientinnen mittels immunhistochemischer Färbung durchgeführt. Der Ki-67-Index lag zwischen 1% bis 90%. Der Mittelwert aller Patientinnen betrug 18,7 %, wobei der Mittelwert der P_R-Gruppe bei 25,3% und der Mittelwert der P_K-Gruppe bei 15,3% lagen (Abb. 14). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist hochsignifikant ($p < 0,001$, ungepaarter T-Test) (Tab. 6).

Tab. 6: Ki-67-Mittelwerte der beiden Patientinnen-Gruppen.

	P _R -Gruppe	P _K -Gruppe
Mittelwert	25,3	15,3
Varianz	502,2	312,9
Anzahl der Patientinnen	104	205
P(T<=t) zweiseitig	0,000026	

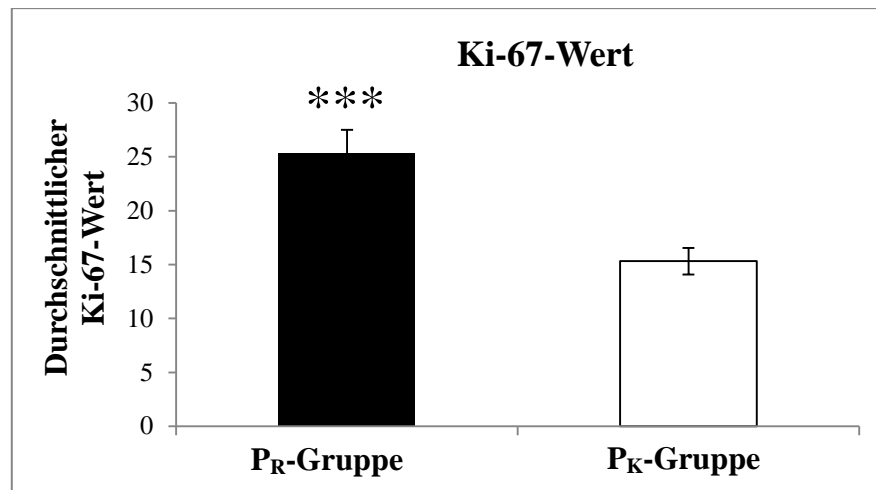


Abb. 14: Mittelwert des Ki-67 bei den Patientinnen mit Rezidiv und der Kontrollgruppe.

Eine multivariate Analyse mit kategorischen und kontinuierlichen Variablen wurde mit dem Ziel einer Korrelation des Ki-67-Index zu prognostischen Kriterien bei Mammakarzinomen durchgeführt. Alle Faktoren wurden mit verschiedenen „Cut-offs“ für Ki-67, welche willkürlich ausgewählt wurden, getestet, um einen Einfluss auf das Auftreten eines Rezidivs nachweisen zu können. Zunächst wurde ein Ki-67-Index mit einem „Cut-off“ von 10% analysiert. Als Variablen wurden der Hormonrezeptorstatus, die Anwesenheit des HER-2/neu, das Grading, die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, die Lymphangiosis carcinomatosa und das Alter der Patientinnen herangezogen.

Tab. 7: Variablen der Analyse des Ki-67-Index mit einem „Cut-off“ von 10%.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Ki-67(1)	-,506	,366	1,910	1	,167	,603	,294	1,236
e1(1)	-,161	,753	,046	1	,831	,851	,195	3,723
p1(1)	,776	,436	3,164	1	,075	2,173	,924	5,111
her(1)	,952	,738	1,664	1	,197	2,591	,610	11,008
grading			3,430	2	,180			
grading(1)	-,939	,695	1,825	1	,177	,391	,100	1,527

grading(2)	-,812	,446	3,315	1	,069	,444	,185	1,064
t			11,114	3	,011			
t(1)	-3,603	1,315	7,505	1	,006	,027	,002	,359
t(2)	-2,877	1,309	4,831	1	,028	,056	,004	,732
t(3)	-2,876	1,374	4,382	1	,036	,056	,004	,833
n			13,745	3	,003			
n(1)	-2,161	,675	10,254	1	,001	,115	,031	,432
n(2)	-1,226	,671	3,335	1	,068	,293	,079	1,094
n(3)	-,986	,768	1,647	1	,199	,373	,083	1,682
l(1)	-1,175	,418	7,894	1	,005	,309	,136	,701
alter	,039	,015	6,808	1	,009	1,039	1,010	1,070
radiatio(1)	-,327	,378	,748	1	,387	,721	,344	1,512
antihor(1)	1,665	,748	4,959	1	,026	5,288	1,221	22,900
Constant	-,808	1,010	,639	1	,424	,446		

In der Tabelle 7 zeigt sich, dass bei einem Ki-67-Index von 10%, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs nicht erhöht ist. Nur bei dem Alter der Patientinnen und keiner Durchführung einer antihormonellen Therapie steigt das Risiko an. Der Nodalstatus, das Grading und die Lymphangiosis carcinomatosa hatten keinen Einfluss auf einen Rezidiv.

In dem Fall mit einem Ki-67-Wert von 11% erhöht sich das Risiko eines Auftretens eines Rezidivs um das durchschnittlich 2,8-fache ($p < 0,005$) (Tab. 8). Ebenso zeigen sich folgende Faktoren als statistisch signifikant:

- 1- Tumorgöße (T): $p=0,012$ (T2 vs. T1: $p=0,026$, T3 vs. T1: $p=0,242$, T4 vs. T1: $p = 0,006$)
- 2- Nodalstatus (N): $p=0,002$ (N1 vs. N0: $p=0,016$, N2 vs. N0: $p=0,056$, N3 vs. N0: $p=0,001$)
- 3- Lymphangiosis carcinomatosa (L): $p=0,004$
- 4- Antihormonelle Therapie: $p=0,028$
- 5- Alter: $p=0,014$

6- Chemotherapie: Bei Patientinnen, die eine Chemotherapie bekommen haben, reduziert sich die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu bekommen um das 0,43-fache.

Als nicht signifikante Faktoren zeigen sich das Grading, die Bestrahlung und die Gabe von Herceptin.

Tab. 8: Variablen der Analyse des Ki-67-Index mit einem „Cut-off“ von 11%.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Ki-67(1)	1,030	,366	7,933	1	,005	2,800	1,368	5,732
e1(1)	,136	,750	,033	1	,856	1,145	,263	4,978
p1(1)	-,804	,442	3,314	1	,069	,447	,188	1,064
her(1)	-1,048	,780	1,804	1	,179	,351	,076	1,618
grading			1,397	2	,497			
grading(1)	,096	,571	,028	1	,867	1,101	,360	3,369
grading(2)	,622	,708	,773	1	,379	1,863	,465	7,458
t			10,989	3	,012			
t(1)	,751	,337	4,983	1	,026	2,120	1,096	4,101
t(2)	,623	,532	1,372	1	,242	1,864	,657	5,285
t(3)	3,516	1,286	7,477	1	,006	33,648	2,707	418,249
n			14,726	3	,002			
n(1)	,886	,366	5,855	1	,016	2,425	1,183	4,971
n(2)	1,170	,612	3,658	1	,056	3,223	,971	10,695
n(3)	2,350	,680	11,954	1	,001	10,489	2,768	39,754
l(1)	1,216	,422	8,304	1	,004	3,372	1,475	7,708
radiatio(1)	-,359	,383	,881	1	,348	,698	,330	1,478
chemo(1)	-,827	,420	3,881	1	,049	,437	,192	,996
antihor(1)	1,639	,747	4,810	1	,028	5,148	1,190	22,268

herceptin(1)	1,203	,908	1,752	1	,186	3,329	,561	19,749
alter	,037	,015	6,046	1	,014	1,037	1,007	1,068
Constant	-,716	1,008	,504	1	,478	,489		

Mit einem „Cut-off“ des Ki-67-Wertes von 14% und 15% erhält man im Wesentlichen das gleiche Ergebnis, d.h. die gleichen Signifikanzen, als mit einem „Cut-Off“ des Ki-67-Wertes von 11% (Daten nicht gezeigt).

Bei einem „Cut-off“ des Ki-67-Wertes von 20% zeigt der Ki-67-Wert überraschenderweise keine signifikante Korrelation mit den anderen Faktoren (Tab. 9). Es gibt nur einen signifikanten Einfluss des Alters und das Verzichten einer antihormonellen Therapie auf einen Rezidiv, wenn man alle anderen Faktoren konstant hält ($p < 0,154$).

Tab. 9: Variablen der Analyse des Ki-67-Index mit einem „Cut-off“ von 20%.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Ki-67(1)	-,590	,414	2,033	1	,154	,554	,246	1,247
e1(1)	-,140	,761	,034	1	,854	,869	,196	3,863
p1(1)	,708	,436	2,645	1	,104	2,031	,865	4,768
her(1)	,848	,750	1,280	1	,258	2,335	,537	10,151
grading			2,305	2	,316			
grading(1)	-,818	,717	1,303	1	,254	,441	,108	1,798
grading(2)	-,707	,472	2,237	1	,135	,493	,195	1,245
t			12,306	3	,006			
t(1)	-3,822	1,343	8,103	1	,004	,022	,002	,304
t(2)	-3,049	1,336	5,206	1	,023	,047	,003	,651
t(3)	-3,018	1,399	4,655	1	,031	,049	,003	,759
n			14,484	3	,002			
n(1)	-2,293	,684	11,226	1	,001	,101	,026	,386
n(2)	-1,380	,682	4,092	1	,043	,252	,066	,958
n(3)	-1,062	,771	1,895	1	,169	,346	,076	1,568

l(1)	-1,149	,420	7,501	1	,006	,317	,139	,721
alter	,037	,015	6,201	1	,013	1,038	1,008	1,068
radiatio(1)	-,383	,381	1,010	1	,315	,682	,323	1,439
chemo(1)	-,833	,417	3,992	1	,046	,435	,192	,984
antihor(1)	1,515	,762	3,958	1	,047	4,550	1,023	20,239
herceptin(1)	1,221	,893	1,869	1	,172	3,390	,589	19,505
Constant	-,453	1,012	,200	1	,655	,636		

Um zu analysieren welchen Einfluss ein „Cut-off“-Wert des Ki-67 von 11% auf das progressionsfreie Überleben hat, wurde eine Survival-Analyse mittels der Cox-Regression durchgeführt, die es ermöglicht, das Auftreten eines Ereignisses, in diesem Fall eines Rezidivs, zu prognostizieren (Abb. 15). Bei der Betrachtung der Kurve, zeigt sich, dass das progressionsfreie Überleben bei Patientinnen mit einem Ki-67-Wert über 11% kürzer ist als bei Patientinnen mit einem Ki-67 unter 11%.

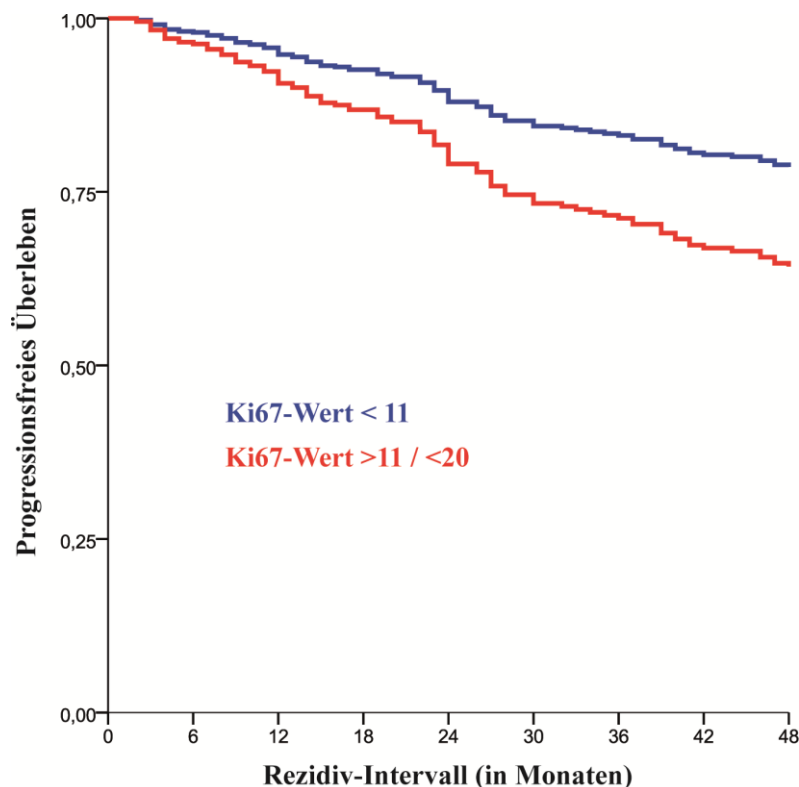


Abb. 15: Cox-Regression für Patientinnen mit einem Ki-67-Wert unter 11% und Patientinnen mit einem Ki-67-Wert zwischen 11 und 20%.

Bei der Survival-Analyse waren folgende weitere Faktoren signifikant: Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Lymphabflußwege und Alter.

Des Weiteren wurde mittels einer „Receiver operating characteristic“ (ROC) Kurvenanalyse der „Cut-off“-Wert für den Ki-67 mit der höchsten Sensitivität und Spezifität und das Risiko eines Rezidivs bestimmt (Abb. 16). Der beste „Cut-off“-Wert für Patientinnen mit einem Rezidiv lag bei 11,5% bei einer Sensitivität von 0,7115, einer Spezifität von 0,619 und einer Genauigkeit von 0,650. Die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) beträgt 0,6765 mit einem Konfidenzintervall von 0.613-0.7399. Interessanterweise stimmt der „Cut-off“-Wert gut mit dem Ergebnis der logistischen Regression überein, aus der ein „Cut-off“-Wert von 11% resultierte.

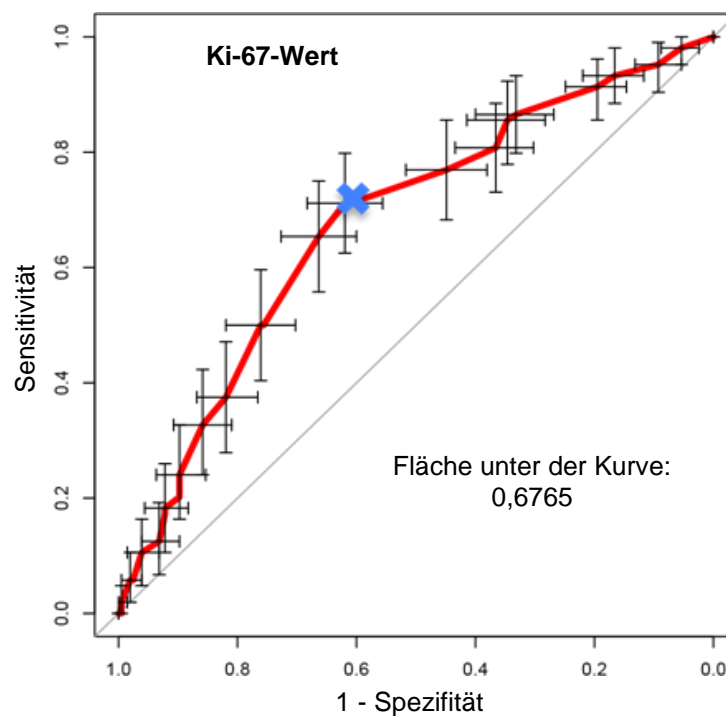


Abb. 16: “Receiver operating characteristic” (ROC) Kurve des Ki-67-Wertes. Das blaue Kreuz markiert den „Cut-off“ mit der höchsten Sensitivität und Spezifität. Dieser Ki-67-Wert beträgt 11,5%.

5 Diskussion

Das Mammakarzinom ist das am häufigsten vorkommende Karzinom bei Frauen. Es hat bezüglich der Überlebenschancen eine der besten Prognosen, falls diese Erkrankung in einem frühen Stadium diagnostiziert wird. Die Zahl der Erkrankungen stieg bis 2004 um mehr als 65% auf jährlich ca. 75.000 an (Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010; Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI). Bei der Behandlung von Brustkrebs kommt es in erster Linie auf eine möglichst frühe Detektion der Erkrankung an, um eine richtige, adäquate und personalisierte Therapie gewährleisten zu können.

Nach dem aktuellen Kenntnisstand sind die wichtigsten Prognoseparameter beim Mammakarzinom das Tumorstadium, der axilläre Lymphknotenstatus, das Grading, der Hormonrezeptorstatus, der HER-2/neu Status, die Invasion in Blut- und Lymphgefäßen und das Alter der Patientin bei der Diagnosestellung.

5.1 Durchschnittliches Alter

Das mittlere Auftreten eines Mammakarzinoms bei Frauen in Deutschland liegt, laut einer Studie des Robert Koch Instituts zwischen 1990 und 2010 (GeKid 2010), bei 63 Jahren. Das Alter stellt einen Risiko- als auch einen Prognosefaktor dar. Wie in früheren Studien gezeigt wurde, treten Lokalrezidive bei Frauen unter 35 Jahren häufiger auf. Multivariate Analysen haben gezeigt, dass die Überlebensraten bei Frauen in jüngerem Alter im Vergleich zu älteren Frauen schlechter sind. In diesem Sinne ist das Alter ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten eines Rezidivs. Bei rund 7% der Frauen mit Brustkrebs wird dieser vor dem Alter von 40 Jahren diagnostiziert (Carey K et al., 2008; Albain KS et al., 1994; de la Rochefordiere A et al., 1993; Nixon AJ et al., 1994). Brustkrebs in einem frühen Alter ist eher mit einem erhöhten familiären Risiko verbunden, vor allem bei Frauen mit einer vorhandenen Keimbahn BRCA1-Mutation (Antoniou A et al., 2003). Wenn man das Alter der beiden Gruppen betrachtet, so ist auffällig, dass die Patientinnen mit einem Rezidiv signifikant älter sind als die Kontroll-Gruppe. Auch in der multivariaten Analyse (logistische Regression und Cox-Regression), zeigt sich, dass das Alter einen signifikanten Einfluss hat. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da man eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten eines Rezidivs erwarten würde. Mit dem Alter steigt die

Wahrscheinlichkeit, bei Patientinnen mit Brustkrebs, nach abgeschlossener Behandlung, ein Rezidiv zu bekommen. Dennoch wird in der internationalen Literatur beschrieben, dass junge Frauen ein erhöhtes Rezidivrisiko haben. Hierbei ist zu beachten, dass eventuell die Stichprobe in dieser Arbeit zu klein ist, um eine genügend große Zahl junger Frauen mit einem Rezidiv für die Risikoberechnung einzuschließen.

5.2 Grading

Die Bestimmung des Gradings hängt von der Erfahrung des Pathologen ab. Die 10 Jahres-Überlebensrate von Grad-1 Tumoren beträgt 80 %, die von Grad-2 Tumoren knapp 60 % und die von Grad-3 Tumoren nur 45 %. (Kollias J et al., 1997; Fischer B et al., 1969). Mit dem Grading können verschiedene „Index Scores“ berechnet werden.

Die Verteilung der Grading-Typen der beiden Gruppen ergab beim Chi-Quadrat-Test einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben. Das bedeutet, dass Patientinnen mit einem Rezidiv häufiger einen schlecht differenzierten Tumor aufweisen. Sowohl bei der logistischen Regression als auch bei der Cox-Regressions-Analyse konnte kein Einfluss auf das progressionsfreie Überleben nachgewiesen werden.

In der aktuellen Literatur existieren widersprüchliche Aussagen bezüglich des Einflusses des Gradings auf ein Rezidiv. In einer Studie von Po-Han Lin et al. von 2013 wurde eine stärkere Korrelation sowohl bei dem Chi-Quadrat-Test als auch bei der logistischen Regression nachgewiesen. Im Gegenteil war hierzu in einer Studie von Davila-Arias et al. (2013) das Grading nicht signifikant. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen Beobachtungszeiträume, Anschluss-Kriterien als auch Patientinnen-Zahlen und Therapien sein.

5.3 Tumorgröße

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass eine Beziehung zwischen der Tumorgröße und dem Gesamtüberleben vorliegt (Fischer B et al., 1969). Dies ist ein Prognosefaktor und dient als Empfehlung in dem Konsens von Sankt Gallen 2005. Die 5-Jahres-Überlebensrate mit einer Tumorgröße von kleiner als 1 cm ist größer als 94 %. Wenn der Tumor gleich oder größer als 1 cm und kleiner als 3 cm ist, ist die 5-Jahres-Überlebensrate kleiner als 86 %. Mit einem Tumor

größer als 3 cm ist die 5-Jahresüberlebensrate kleiner als 77 %. Und wenn der Tumor größer als 5 cm ist die 5-Jahresüberlebensrate kleiner als 63 %.

Wie zu erwarten, ergaben die einzelnen Beobachtungen der Tumorgröße beider Gruppen einen signifikanten Unterschied in Bezug auf das progressionsfreie Überleben. Dieser signifikante Unterschied des Risikos eines neuen Auftretens der Erkrankung mit der Tumorgröße konnte sowohl mittels des Chi-Quadrat-Tests als auch in den multivariaten Analysen (logistische Regression bei Ki-67 „Cut-off“ von 11% und 20% und Cox-Regression) gezeigt werden. Diese Studie stimmt mit den Ergebnissen mehrerer Autoren überein (Gabos Z et al., 2010; Davila-Arias et al., 2013; Mirza AN et al., 2002).

5.4 Nodalstatus

Der axilläre Nodalstatus steht mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen in Beziehung. Es wurde gezeigt, dass bei keinem Befall der Lymphknoten das Überleben nach 5 Jahren 89% beträgt. Zwischen 1-3 befallene Lymphknoten verringerte sich die Überlebensrate auf 72%. Mit vier oder mehr befallenen Lymphknoten beträgt das Überleben nur 63 bis 33 % (Dixon M. et al., 2005; Carter CL et al., 1989). Ein negativer axillärer Lymphknotenstatus liegt bei ungefähr zwei Drittel der Brustkrebsfälle vor (McGuire WL et al., 1992).

Es konnte durch den Chi-Quadrat-Test nachgewiesen werden, dass der Nodalstatus wegen seiner negativen Auswirkung auf das progressionsfreie Überleben einen bedeutenden Risikofaktor darstellt. Dieser signifikante Unterschied des Risikos eines neuen Auftretens der Erkrankung mit dem Nodalstatus konnte auch mittels der multivariaten Analysen (logistische Regression bei Ki-67 „Cut-off“ von 11% und 20% und Cox-Regression) gezeigt werden. Diese Studie deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Autoren (Davila-Arias et al., 2013; Mazouni C et al., 2013; Pogoda K et al., 2013; Yamashiro H et al., 2013). Als wesentlicher Faktor zur Verkürzung des progressionsfreien Überlebens stellt der Nodalstatus ein besonderes Risiko dar.

5.5 Hormonrezeptor

Das Ansetzen einer endokrinen Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom und positivem Hormonrezeptor hat in verschiedenen Studien zu einer Erhöhung des Gesamtüberlebens geführt (Kaufmann M et al., 2009; Early Breast Cancer Trialists Collaborative

Group, 2005; Boccardo F et al., 2006; Coombes R et al., 2007). Das ist auch der Fall in dieser Studie, die mit Hilfe des Chi-Quadrat-Test und der logistischen Regression analysiert wurde.

5.6 HER-2/neu Status

Das HER-2 Onkogen (c-erb B-2 oder neu) ist ein Onkogen, das einen membranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptor kodiert (Schechter AL et al., 1984). Mehrere Studien belegen, dass die Amplifikation dieses Onkogens mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium korreliert ist (DJ Slamon et al., 1987). Mit Hilfe einer molekulargenetischen Analyse, der sogenannten Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH-Analyse), lässt sich die Zahl der HER-2 Gene untersuchen. Diese Gene produzieren normale Mengen eines wachstumsfördernden Zelloberflächen-Eiweißes. Wenn dieses überexprimiert ist (das ist der Fall bei ca. 25% aller primären Mammakarzinome), ist die Erkrankung mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Der HER-2/neu Status ist weder bei den einzelnen Betrachtungen, die mittels des Chi-Quadrat-Test analysiert wurden, noch bei der logistischen Regression oder der Cox-Regression mit einem Risiko eines Rezidives signifikant korreliert. Zahlreiche Studien widersprechen den Ergebnissen dieser Studie (Rouanet P et al., 2014; Petrelli F et al., 2012; Livi L et al., 2012; Gonzalez-Angulo AM et al., 2009). In unserer Studie erhielten alle Patientinnen Trastuzumab zusammen mit einer Chemotherapie. Das erklärt wahrscheinlich den fehlenden Einfluss des HER-2/ neu Status auf die Rezidivhäufigkeit.

5.7 Ki-67-Index

Die Expression des Proteins Ki-67 ist in normalem Brustgewebe sehr gering. Mammakarzinome, die einen hohen Ki-67-Index aufweisen, sind mit einer schlechteren Prognose verbunden als Karzinome mit einem geringen Index (Domagala W et al., 1996; Trihia H et al., 2003; Colozza M et al., 2005). Mehrere Studien haben belegt, dass eine primär systemische Chemotherapie in diesem Fall gut anspricht (Chang J et al., 2000; Archer CD et al., 2003).

Der Ki-67 Proliferationsindex ist ein gültiger prädiktiver und prognostischer Marker mit einem weiten Bereich unterschiedlicher Cut-points (Denkert C et al., 2012; Klauschen F et al., 2012). Im Rahmen der 12. St. Gallen Internationalen Brustkrebs-Konferenz wurde ein neuer Ansatz für die Einstufung von Patienten für therapeutische Zwecke vorgeschlagen. Dieser Index

ist ein guter Marker für die Differenzierung von Luminal A und B Tumoren (Goldhirsch A et al., 2011; Dowsett M et al., 2011). Patientinnen, die einem Luminal A-Typ zugeordnet werden können, erfordern in der Regel nur eine endokrine Therapie, die auch Teil der Behandlung des Luminal B Subtypes ist. Bei Patientinnen mit Luminal B, humanem epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (d.h. (HER2)-positiv) und Triple negativer (duktaler)-Krankheit, wird eine Chemotherapie mit der Zugabe von Trastuzumab empfohlen.

Unter Berücksichtigung dieser Prognoseparameter wird nun entschieden, ob eine adjuvante Chemotherapie sinnvoll ist oder nicht (EBCTCG 2005; Goldhirsch, A et al., 2001; Goldhirsch, A et al., 2009; Goldhirsch, A et al., 2011; Peto R et al., 1998). Um diesen Entscheidungsprozess zu optimieren, hat man das Mammakarzinom in verschiedene Subtypen unterteilt. Diese Subtypen berücksichtigen den Anteil (in Prozent) des Ki-67-Index sowie den Hormonrezeptor- und den HER-2/neu Status. Anhand dieser Klassifikation bezeichnet man die differenten Subtypen als Luminal A, Luminal B, HER-2/neu positiv und Basal-like. Damit wird die Diskriminierung zwischen Patientinnen, die eine Chemotherapie bekommen sollen, und eben jenen, die auf eine Chemotherapie nicht ansprechen, ermöglicht. Der Unterschied zwischen Luminal A und Luminal B liegt bei einem bestimmten „Cut-off“-Wert des Ki-67-Wertes. Basierend auf den Ergebnissen einer Metaanalyse liegt dieser Wert bei 14 %. Ein höherer Prozentanteil des Ki-67-Index im Primärtumor geht mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer geringeren Überlebensprognose einher (Cheang MC et al., 2009). Als alternative Marker wurde das Grading postuliert.

Bei dieser Studie wurden verschiedenen „Cut-offs“ mittels logarithmischer Regression und ROC-Kurven analysiert. Bei der logarithmischen Regression war die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs mit einem „Cut-off“ von 11 % signifikant erhöht. Die Bestimmung eines „Cut-off“-Wertes mit der höchsten Sensitivität und Spezifität wurde mit Hilfe einer ROC-Kurve durchgeführt. Der beste „Cut-off“-Wert für Patientinnen mit einem Rezidiv anhand der ROC-Kurve lag bei 11,5% bei einer Sensitivität, der sog. Trefferquote, von 0,7115 und einer Spezifität von 0,619. Die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) betrug 0,6765. Eine AUC zwischen 0,5 – 0,7 bedeutet eine schlechte Diskriminationsfähigkeit. Eine AUC zwischen 0,7 – 0,9 zeigt eine mäßige Diskriminationsfähigkeit, wobei eine AUC zwischen 0,9 – 0,1 eine hohe Diskriminationsfähigkeit aufweist. Eine AUC von 1 zeigt eine perfekte Diskriminationsfähigkeit (Akobeng A, 2007). Das bedeutet, dass bei der vorliegenden ROC-Kurve nur eine schlechte Diskriminationsfähigkeit vorliegt und dass nur bei ca. 70% der Patientinnen eine korrekte Vorhersage für ein Rezidiv möglich ist.

Des Weiteren wurden zur Auswertung der Überlebenszeiten der Patientinnen die verschiedenen Faktoren in einem proportionalen Hazard Modell, welches auch als Cox Modell bezeichnet wird, analysiert (Cox DR, 1972). Dieses Modell ermöglicht es, den Einfluss von bestimmten Variablen zu untersuchen (Ziegler A et al., 2007). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein Ki-67-Index zwischen 11% und 20%, die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, die Lymphabflußwege und das Alter einen signifikanten Einfluß auf das progressionsfreie Überleben haben.

Bei Betrachtung der verschiedenen Analysen der vorliegenden Studie kann der Ki-67-Index als unabhängiger prognostischer Faktor etabliert werden. Unser „Cut-off“-Wert von 11 % liegt im unteren Bereich im Vergleich zu anderen Studien. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass der, in St. Gallen vorgeschlagene Ki-67-Wert zur Abgrenzung der Unterteilung der luminalen ER-positiven Mammakarzinome herangezogen wird. Interessanterweise beweisen verschiedene andere Studien andere „Cut-off“-Werte des Ki-67-Wertes. Die Studien von Urruticoechea et al. (Urruticoechea A et al., 2005) und Goldhirsch et al. (Goldhirsch A et al., 2009) legen den „Cut-off“-Wert zwischen 5 und 34% fest. Nach einer Studie von Denkert et al. (Denkert et al., 2012) ist die prognostische Aussagekraft des Ki-67-Wertes zwischen 5 und 45%. Hierbei ist es wichtig anzumerken, dass die Reliabilität einer Messung deren Verlässlichkeit aussagt und, dass in dem vorliegenden Fällen eine unzureichende Reproduzierbarkeit des Verfahrens in den präanalytischen (z.B. Fixierung-Zeit oder die Heterogenität der Mammakarzinome), analytischen (z.B. Antikörper-Wahl, Beurteilung des gefärbten Schnittes) und postanalytischen Phasen z.B. Interobserver-Variabilität (Varga Z et al., 2012;) ein Problem darstellt (Romero Q et al., 2014). Die Interobserver-Variabilität wird durch die unterschiedlichen Ergebnisse eines Untersuchungs- bzw. Beobachtungsverfahrens bei Einsatz verschiedener Untersucher bestimmt. Sie ist ein Maß für die Abhängigkeit eines klinischen Untersuchungsverfahrens von der Person des Untersuchers. Ist die Variabilität hoch, sind die Sensitivität des Verfahrens und die Spezifität des Befundes stark vom Untersucher abhängig. Es ist interessanterweise nachgewiesen worden, dass je mehr Erfahrung der Untersucher besitzt, desto geringer ist die Variabilität bei der Diagnose (Narbona P et al., 2013).

Eine in 2012 publizierte Studie von Varga et al. zeigte, dass die Inter- und Intraobserver-Variabilität, trotz verschiedener Empfehlungen, eine größere Problematik darstellt als bisher gedacht. Erstaunlicherweise konnte kein einziger Faktor diese Variabilität erklären. Ein Präparat konnte z.B. mit einem Ki-67-Wert von 10% bewertet worden sein, während ein anderer Pathologe dasselbe Präparat mit einem Ki-67-Wert von 35% einstuft (Varga, Z et al., 2012).

Um die Interobserver-Variabilität zu minimieren wurde im Jahr 2013 bei Dr. Bubis ein E-Cadherin-Cocktail entwickelt.

Die Standards für die Bewertung des Ki-67-Wertes wurden bereits durch die internationale „Ki-67 Breast Cancer Working Group (IBCWG)“ publiziert. Es gab verschiedene Vorschläge für eine Vereinheitlichung der Kriterien (Goldhirsch A et al., 2013, Dowsett M et al., 2011, Mikami Y et al., 2013). Weiterhin berichtete die IBCWG in einer in 2013 publizierten Arbeit, dass zwischen den erfahrensten Laboratorien der Welt, eine wesentliche Variabilität des „Cut-off“-Wertes des Ki-67 bestehe (Polley, Mei-Yin et al. 2013 und 2015). Die Bestimmung der Interobserver-Variabilität wurde in einer Studie von Manucha et al. im Jahr 2014 mit den Empfehlungen der IBCWG bewertet. Somit konnte letztendlich eine Übereinstimmung von 89,1% erreicht werden (Manucha et al., 2014).

Die Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für klinische Krebsforschung (SAKK) veröffentlichte im April 2015 eine Studie, bei der sieben verschiedene Methoden bezüglich des Ki-67 „Cut-off“-Wertes von 14 und 20%, als auch deren Intraobserver Reliabilität analysiert wurden. Interessanterweise ergaben fünf der Methoden eine Intraklassenkorrelation (ICC) von 0,76 – 0,89 (gut), welche ein Maß der Beobachtungübereinstimmung darstellt (Varga et al., 2015). Eine weitere Studie, welche im Mai 2015 veröffentlicht wurde, postulierte ein sogenanntes „Visual Assessment“, d.h. eine visuelle Beurteilung des Ki-67-Wertes bei 10%, als Standard-Methode (Shui et al., 2015). Mittels dieser Methode konnte eine gute Intraklassenkorrelation (ICC) bei einem Ki-67-Wert von 30% nachgewiesen werden.

Insgesamt kann man sagen, dass sich die meisten Studien darüber einig sind, dass ein erhöhter Ki-67-Wert eine Verschlechterung des gesamten Überlebens der Patientin bedeutet, so auch die Studie von De Azambuja et al. (De Azambuja et al., 2007), die die Ergebnisse älterer Studien bestätigt. Trotz eines fehlenden Goldstandards bezüglich der Reproduzierbarkeit des Ki-67-Wertes, ist es sehr wahrscheinlich, dass Patientinnen mit einem erhöhtem Ki-67-Wert von einer primären systemischen Therapie profitieren können (Denkert C et al., 2013, Kim K et al., 2014, Juhasz-Böss Ingolf et al., 2014). Des Weiteren stellen die klassischen Prognosefaktoren (bis auf das Grading) immer noch aussagekräftige Parameter dar, die den Krankheitsverlauf beeinflussen, sobald der Ki-67-Index <20% bleibt. Ab einem Ki-67-Wert von 20% ist das Alter die einzige aussagekräftige Variable in dieser Studie. Zur genaueren Einschätzung der Aggressivität des Tumors kann sich eventuell die Durchführung von Genexpressionsprofiletests (Oncotype - DX (RF), Mammaprint (RF), und EndoPredict (RF)-Verfahren etablieren, da diese Ergebnisse vom lokalen pathologischen Institut weniger abhängig sind.

Angesichts der Tatsache, dass bei der vorliegenden Studie ein von anderen Studien abweichender Wert (niedriger „Cut-off“-Wert) resultiert, stellt sich die Frage, wie sicher dieser Parameter in der klinischen Praxis der Prognoseabschätzung in jeder Klinik verwendet werden kann. In dieser Studie ist die Reproduzierbarkeit des Verfahrens in den prä- und intraanalytischen Phasen maximiert, da das Prozedere seit Jahren im Sankt-Gertrauden Krankenhaus standardisiert ist und durch die gleiche Pathologin durchgeführt wird.

Die Kategorisierung des Ki-67-Werts und der Hormonrezeptoren durch immunhistochemische Methoden sind nicht teuer und können in jedem Labor durchgeführt werden, wobei obligate Qualitätssicherungsmaßnahmen erforderlich sind (Inwald EC et al., 2013). Das gegenwärtige Problem der fehlenden Auswertungsstandardisierung (z.B. des „Cut-off“-Wertes) muss zukünftig behoben werden. Dennoch kann dieses Prozedere zur Bestimmung des Ki-67-Index für die Differenzierung eines Tumors von Luminal A oder Luminal B keinen Ersatz für multigene Expressions-basierte Assays darstellen.

6 Schlussfolgerungen

- 1) Diese Studie kann den „Cut-off“-Wert des Ki-67-Wertes von 14-16 % anderer Studien nicht bestätigen. Er liegt in unserer Studie bei 11-20%.
- 2) Patientinnen in unserer Studie mit einem Ki-67-Wert von mehr als 20% hatten keine schlechtere Prognose. Das liegt wahrscheinlich an der relativ kleinen Patientenzahl.
- 3) Der Ki-67-Index ist ein unabhängiger prognostischer Faktor in der Anwesenheit von klassischen Variablen (Alter, Nodalstatus, Tumorgröße, Grading).
- 4) Es gibt in unserer Studie keine Korrelation des Ki-67-Wertes mit dem Grading.
- 5) Es fehlt eine Standardisierung der Beurteilung des gefärbten Schnittes. Hierbei sind die Heterogenität der Mammakarzinome und die hohe Interobserver-Variabilität zu beachten, welche ausführlich in der Diskussion erörtert wird.
- 6) Diese Arbeit bestätigt andere Studien in der internationalen Literatur, da der Ki-67 Index von 11-20 % im Bereich der anderen bisher veröffentlichten Werte liegt. Des Weiteren gibt es keinen scharfen „Cut-off“, sondern einen dynamischen Bereich mit fließenden Übergängen zwischen 11% und 20%, wobei unter 11% eine signifikant niedrigere und über 20% eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit vorliegt, dass ein prognostisch ungünstiges Mammakarzinom vorliegt.
- 7) Die Fehlerrate bezüglich der prä- und intra-analytischen Phasen ist geringer, da alle Proben unter gleichen Bedingungen an einer Klinik gewonnen, aufgearbeitet und ausgewertet wurden.
- 8) Abschließend bleibt zu sagen, dass auch wenn die Sensitivität der Ki-67-Wert-Bestimmung variabel und teilweise ungenau ist, ist die Verwendung dieses prognostischen Faktors hilfreich und wichtig für die Empfehlung einer Chemotherapie (neoadjuvant/adjuvant) in jenen Ländern, in denen kein Zugang zu einer multigenen Expressions-Analyse besteht.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Akobeng AK. Understanding diagnostic test 3: receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* 2007; 96 644-7.
- 2 Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcomes and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;16:35-42.
- 3 Anders CK, David S. Hsu, Gloria Broadwater et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol* 2008;26:3324-3330.
- 4 Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;72:1117-1130.
- 5 Archer CD, Parton M, Smith IE, et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89:1035-1041.
- 6 Balogh GA, Russo J, Mailo DA et al. The breast of parous women without cancer has a different genomic profile compared to those with cancer. *Int J Oncol* 2007;31:1165-1175.
- 7 Beral V. Million women study collaborators: Breast cancer and hormone replacement therapy in the million study. *Lancet* 2003; 362:419-227.
- 8 Bloom and W. W. Richardson. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. A Study of 1409 Cases of which 359 have been Followed for 15 Years. *Br J Cancer*. 1957; 11(3):359-377.
- 9 BMG. Bundesanzeiger der Ärzte und Krankenkassen über eine Änderung der Richtlinien über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungsrichtlinie) vom 1.12.2003. *Bundesanzeiger* 2004;Nr. 45 v. 6.3.2004:4213.
- 10 Boccardo F, Rubagotti A, Guglielmini P et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Ann Oncol* 2006; 17(Suppl.7): vii10-vii14

- 11 Britt K, Ashworth A, Smalley M: Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(4):907-33.
- 12 Britt K, Short R: The plight of nuns: hazards of nulliparity. *The Lancet* 2012;379:2322-2323
- 13 Bubis G, Hilly O, Bubis R, *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct;19(4):875-9. doi: 10.1007/s12253-013-9655-8. Epub 2013 Jul 7. A new Ki-67 / E-cadherin cocktail reduces inter-observer variation of the calculated proliferative index. *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct;19(4):875-9.
- 14 Calle E, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:579-591.
- 15 Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80(12):1943-1949.
- 16 Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-187.
- 17 Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168(4):357-63.
- 18 Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomized controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 559-570
- 19 Chang J, Ormerod M, Powles TJ, et al. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:2145-2152.
- 20 Cheang MC, Chia SK, Voduc D et al . Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 20; 101(10): 736-50
- 21 Cox DR, *Regression Models and life tables.* *J Roy Stat Soc B* 1972; 34: 187-220
- 22 Cristofanilli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2006;33:9-14.

- 23 Dávila-Arias C, Ocón O, Fernández MF, et al. Disease-free survival related factors in breast cancer. *Med Clin (Barc)* 2013;pii:S0025-7753(13)793-798.
- 24 De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96(10):1504-13).
- 25 de la Rochefordiere A, Asselain B, Campana F, et al. Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet* 1993;341:1039-1043.
- 26 Denkert C, Blohmer JU, Müller BM, et al. Ki-67 levels in pretherapeutic core biopsies as predictive and prognostic parameters in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Cancer* 2012 Res 72 (24 Suppl.):102s.
- 27 Denkert C, Loibl S, Müller BM, et al.: Ki67 levels in as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: A translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol* 2013;24:2786-2793
- 28 Dixon M. ABC of breast diseases. *BMJ Books* 2005, p. 43.
- 29 DJ Slamon, GM Clark, SG Wong, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;9:177-182.
- 30 Domagala W, Markiewski M, Harezga B, et al. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res* 1996; 2:147-154 .
- 31 Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki-67 in breast cancer: recommendations from the International Ki-67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-1664.
- 32 Drukker CA, Bueno-de-Mesquita JM, Retel VP, et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *International Journal of Cancer* 2013;133:929-936.
- 33 Dunne C, Burke JP, Morrow M., et al. Effect of margin status on local recurrence after breast conservation and radiation therapy for ductal carcinoma in situ. *J Clin Oncol* 2009; 27(10):1615-1620.

- 34 E de Azambuja, Cardoso F, G de Castro, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-1513.
- 35 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;352:930-942.
- 36 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472): 1687-1717.
- 37 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
- 38 Elston CW, Ellis IO. 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. *C Histopathology* 1991;19; 403-410.
- 39 Engel J, Baumert J, Holzel D. Early detection of breast cancer in Germany. Time to deal with the problem. *Radiologe* 2000;40:177.
- 40 Ferguson T, Wilcken N, Vagg R, et al. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2007.
- 41 Fischer B, Slack NH, Bross et al. Cancer of the breast: Size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969;24:1071-1080.
- 42 Fisher ER, Cosranino J, Fisher B, et al. Pathological findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer* 1993;71:2141-2150.
- 43 Fonatsch C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 1991;11:476-477.
- 44 Gabos Z, Thoms J, Ghosh S, et al. The association between biological subtype and locoregional recurrence in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Nov;124(1):187-94

- 45 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
- 46 Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010 Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- 47 Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20(8):1319-1329.
- 48 Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013; 24(9):2206-23.
- 49 Gonzalez-Angulo AM, Litton JK, Broglio KR, et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 1;27(34):5700-5706
- 50 Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al: Collaborative group on hormonal factors in Breast cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies including 58.515 women with breast cancer and 95.067 women without the disease. *Br J Cancer* 2002;87:1234-1245.
- 51 Harbek N, Eiermann W, Engel J, et al. Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. *Manual Mammakarzinome by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München* 2003; 67-71.
- 52 Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5287-5312.
- 53 Hartkop A, Banys M, Neubauer H, et al. Personalisierte Therapie des Mammakarzinoms. *Onkologie heute* 2011; 5:18-20.

- 54 Hauner D, Janni W, Rack B. Einfluss von Übergewicht und Ernährung auf die Prognose des Mammakarzinoms The Effect of Overweight and Nutrition on Prognosis in Breast Cancer. Dtsch Arztebl Int 2011;108(47):795-801.
- 55 Hayes DF, 2005. Prognostic and predictive Factors revisited. Breast 14;493-499.
- 56 Huber J. Grundlagen der Altersprävention. Verlag Maudrich, 2004:363-364.
- 57 Imwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. Breast Cancer Res Treat 2013;139(2):539-52.
- 58 James S. Michaelson, Silverstein M, Sgroi D, et al. The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. Cancer 2003; 98(10):2133-2143.
- 59 Jänicke FMD, Schmitt M, Pache L, et al Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment 1993; 24(3):195-208.
- 60 Juhasz-Böss I, Mavrova R, Moga S, et al.. Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? BioMed Research International. Volume 2014 (2014), Article ID 628217,
- 61 Kaufmann M, Rody R. Breast cancer: reduced mortality by early detection and adjuvant therapy. Geburtsh Frauenheilk 2009; 69: 218 - 232
- 62 Kim K, Lee K, Kim T, et al. Ki-67 as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. J Breast Cancer. 2014 Mar; 17(1): 40–46.
- 63 Klauschen F, Wienert S, Blohmer J-U, et al. Automated computational Ki-67 scoring in the GeparTrio breast cancer study cohort. Cancer Res 2012;24:72.
- 64 Kollias J, Elston CW, Ellis I, et al. Early onset breast cancer-histopathological and prognostic considerations. Br J Cancer 1997;75:1318-1323.
- 65 Kreienberg R, Albert U, Follmann M et al. Interdisziplinäre S-3 Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des MammaKarzinoms. Zuckschwerdt Vlg. München 2012.

66 Kriege M., Brekelmans C. T., Boetes C, et al. Efficacy of MRI and mammography for breastcancer screening in women with a familial or genetic predisposition. (Magnetic resonance imaging was more sensitive than Mammography for detecting breast cancer in highrisk women). *N Engl J Med* 2004;351(5):427-437.

67 Kuo-Jang Kao, Kai-Ming Chang, Hui-Chi Hsu, et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. *BMC Cancer* 2011;11:143

68 Livi L, Meattini I, Saieva C, et al. Prognostic value of positive human epidermal growth factor receptor 2 status and negative hormone status in patients with T1a/T1b, lymph node-negative breast cancer. *Cancer* 2012 Jul 1;118(13):3236-3243

69 Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, et al. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem* 2013;20(5):596-604.

70 M. Colozza, E. Azambuja, F. Cardoso, et al. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Annals of Oncology* 2005;16:1723-1739.

71 Manucha V, Zhang X, Thomas RM. The satisfactory reproducibility of the Ki-67 index in breast carcinoma, and it's correlation with the recurrence score. *Clin Cancer Investig J* 2014; 3:310-4).

72 Martin Filipits, Margaretha Rudas, Raimund Jakesz, et al. A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors. *Clin Cancer Res* 2011;17:6012-6020.

73 Mazouni C, Rimareix F, Mathieu MC, et al. Outcome in breast molecular subtypes according to nodal status and surgical procedures. *Am J Surg.* 2013;205(6):662-667

74 Mc Tiernan, Kooperberg C, White E, et al. Recreational physical activity and risk of breast cancer in premenopausal women: The Women's Health Initiative Cohort study. *JAMA* 2003;290:1331-1336.

- 75 McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:1756-1761.
- 76 Melcher C, Scholz C, Jäger B et al. Breast Cancer: State of the Art and New Findings. *Das Mammakarzinom: State of the Art und Neuigkeiten. Geburtsh Frauenheilk* 2012;72(3): 215-224.
- 77 Michaelson JS, Silverstein M, Wyatt J, et al. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. *Cancer* 2002; 95(4):713-723.
- 78 Mikami Y, Ueno T, Yoshimura K, et al. Interobserver concordance of Ki-67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group Ki-67 Ring Study. *Cancer Sci.* 2013; 104(11):1539-43.
- 79 Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002; 235(1):10-26.
- 80 Muir C, Waterhouse J, Mack T, et al. Cancer incidence in five continents. Vol. V. Inter Agency for research on cancer, Lyon 1987.
- 81 Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1993;41(8):1241-1246.
- 82 Narbona P, Dr. Nicolás Ignacio Carranza NI , Dr. Hernán Boccolini H, et al. Análisis de Variabilidad Inter e Intra Observador en el Diagnóstico Artroscópico de Lesión de SLAP. *Artrocopia* 2013; 20(2): 42-47
- 83 NICE. National Institute for Clinical Excellence (NICE). Advanced breast cancer: diagnosis and treatment 2009. Clinical Guideline 80.
- 84 Nixon AJ, Neuburg D, Hayes DF, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I and II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:888-894.

- 85 Nothacker M, Duda V, Hahn M, et al. Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer* 2009; 9:335.
- 86 Nothacker, M, Lelgemann, M., Giersiepen, K, et al. Evidenzbericht 2007 zur S3Leitlinie Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland 2007.
- 87 Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(12):2716-25.
- 88 Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:1609-1618.
- 89 Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:817-826.
- 90 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797):747-52.
- 91 Petrelli F, Barni S. Role of HER2-neu as a prognostic factor for survival and relapse in pT1a-bN0M0 breast cancer: a systematic review of the literature with a pooled-analysis. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(4):2586-93.
- 92 Pogoda K, Niwińska A, Murawska M, et al. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol*. 2013 Mar;30(1):388.
- 93 Po-Han L, Ming-Hsin Y, Liang-Chih L, et al. Clinical and pathologic risk factors of tumor recurrence in patients with node-negative early breast cancer after mastectomy. *Journal of Surgical Oncology* 2013;108: 352-357.
- 94 Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al. An international Ki67 reproducibility Study. *Journal of the National Cancer Institute* 2013;105(24):1897-1906.
- 95 Polley MY, Leung SC, Gao D, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Modern Pathology* 28, 778-786 (June 2015)

- 96 Preston DL, Mattsson, A., Holmberg, E., et al. Radiation Effects on Breast Cancer Risk: A Pooled Analysis of Eight Cohorts. *Radiat Res* 2002;158:220-235.
- 97 Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, et al. Natural history of node-positive breast cancer: the curability of small cancer with a limited number of positive nodes. *J Clin Oncol* 1996;14: 3105-3111.
- 98 Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE et al. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: Evidence from California teachers study. *J Natl Cancer Inst* 2004;96: 29-37.
- 99 RKI: Offizielle Mitteilungen des Robert- Koch-Institutes. Berlin 2012. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI.
- 100 Romero Q, Bendahl PO, Fernö M, Grabau D, Borgquist S1. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn Pathol.* 2014 Jun 16;9:118. doi: 10.1186/1746-1596-9-118.
- 101 Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-2100.
- 102 Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, et al. Prognosis of T2N0M0 Stage I breast carcinoma: a 20-year follow up. *J Clin Oncol* 1991;9:1650–1661.
- 103 Rouanet P, Roger P, Rousseau E, et al. HER2 overexpression a major risk factor for recurrence in pT1a-bN0M0 breast cancer: results from a French regional cohort. *Cancer Med.* 2014 Jan 10. doi: 10.1002/cam4.167.
- 104 Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, et al. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987;133:579-584.
- 105 Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature.* 1984; 6-12;312(5994):513-516.
- 106 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-322.

- 107 Shui R, Yu B, Bi R, et al. An Interobserver Reproducibility Analysis of Ki-67 Visual Assessment in Breast Cancer May 01, 2015 DOI: 10.1371/journal.pone.0125131
- 108 Slamon DJ, W Godolphin, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 707-712.
- 109 Smid M, Wang Y, Zhang Y et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008;68:3108 – 3114.
- 110 Sortie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 10869-10874.
- 111 Stathopoulou A, I. Vlachonikolis, D. Mavroudis, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002(16):3404-3412.
- 112 Stavrazy K, Emmons S. Breast cancer in premenopausal and postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:647–654.
- 113 Tanei T, Shimomura A, Shimazu K, et al. Prognostic significance of Ki-67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2011;37(2):155-161.
- 114 Trihia H, MurrayS, Price K, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostics factors- a suroogate marker? *Cancer* .2003;97(5):1321-1331.
- 115 Urruticoechea A, Smith IE, Dowset M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7212-7220
- 116 Vaidya JS, Baum M, Tobias JS, et al. Long-term results of targeted intraoperative radiotherapy (Targit) boost during breast-conserving surgery. *INT J Radiat Oncol, Biol, Phys* 2011;81:1091-1097.
- 117 van ‘t Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.

- 118 Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, et al. How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS ONE* 7(5):e37379
- 119 Varga Z, Cassoly E, Li Q, et al. Standardization for Ki-67 assessment in moderately differentiated breast cancer. A retrospective analysis of the SAKK 28/12 study. *PLoS One*. 2015 Apr 17;10(4):e0123435.
- 120 Veronesi U, Orecchia R, Luini A, et al, Intraoperative radiotherapy during breast conserving surgery: a study on 1,822 cases treated with electrons. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:141-151
- 121 Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, et al. Predictive Value of Tumor Ki-67 Expression in Two Randomized Trials of Adjuvant Chemoendocrine Therapy for Node-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:207-212.
- 122 Williams DJ, Cohen C, Darrow M, et al. Proliferation Ki-67 and Phosphohistone H3 and Oncotype DX Recurrence Score in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19(5):431-436.
- 123 Witherby SM, Muss HB. Special issues related to breast cancer adjuvant therapy in older women. *Breast* 2005;14:600-611.
- 124 Wittekind C, Tischoff I. Tumor classifications. *Pathologe*. 2004;25(6):481-490
- 125 Yamashiro H, Takada M, Nakatani E, et al. Prevalence and risk factors of bone metastasis and skeletal related events in patients with primary breast cancer in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2014 Oct;19(5):852-862
- 126 Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11:174-83
- 127 A. Ziegler, S. Lange, R. Bender. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 42-44.

8 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marcelo Bustamante, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prognostische Bedeutung der Wachstumsfraktion Ki-67 für das progressionsfreie Überleben von Patientinnen mit einem Mammakarzinom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 02.08.2015

Marcelo Bustamante

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. J.-U.-Blohmer bedanken, der mich mit seinem Wissen, seiner Geduld und seinem langjährigen Erfahrungsschatz immer unterstützt hat.

Mein Dank geht auch an Dr. Sonja Bisch-Knaden für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Auch Frau Weber bin ich für ihre Hilfe bei der Besorgung der erforderlichen Daten sehr dankbar.

A mis amigos que me bancaron y me apoyaron en esta movida. A Silke B (la iniciadora), Fabiana, Sergio, Ale, Grit, Holger, Su y Silke S (el toque, motivación y empuje final que me hacía falta). Porque mis logros son también parte de Ustedes, los quiero...

Para mis viejos...

Para Male y Cami...