

Aus der Frauenklinik des Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor : Prof. Dr. med. H. K. Weitzel

**Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie als
prospektiver Prognoseparameter
für das Mammakarzinom**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

des Fachbereichs Humanmedizin

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Selma Yildirim - Assaf

aus Berlin

2001

Referent : Prof. Dr. med W. Kühn

Coreferent : Prof. Dr. med. W. Lichtenegger

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am : 14.Dezember 2001

Meinen Eltern und unserer kleinen Tochter Thalia Sinem
gewidmet

	Seite
1. Einleitung	7
1.1. Gegenwärtige Bedeutung und Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
1.2. Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms	9
1.3. Klassifikation der Mammakarzinome <i>nach der WHO</i>	11
1.4. Klassische Prognoseparameter	14
1.4.1. TNM-Klassifikation	15
1.4.2. Histologisches Grading	16
1.4.3. Hormonrezeptorstatus	17
1.4.4. Wachstumsfraktion	17
1.5. Moderne Prognoseparameter	18
1.5.1. Molekularbiologische Faktoren	18
1.5.2. DNA als Erbinformation	20
1.5.3. DNA-Analysen	22
1.5.4. Stellenwert der DNA-Zytometrie	24
1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Klinisches Patientenkollektiv	26
2.1.1. Patientenrekrutierung und Datenerhebung	26
2.2. Grundlagen zytologischer Malignitätsdiagnostik	28
2.2.1. Zytologie des Mammakarzinoms	30
2.2.2. Präparatfärbung <i>nach Feulgen</i>	32
2.2.3. Zytologische Präparatfärbung <i>nach Papanicolaou</i>	34

2.3.	DNA-Zytometrie	36
2.3.1.	Meßvorgang	39
2.3.2.	Klassifizierung der DNA-Histogramme <i>nach Auer</i>	42
2.4.	Statistische Analysen	45
2.5.	Qualitätsprüfung	47
3.	Ergebnisse	48
I.	Beschreibung des klinischen Kontroll- und Patientenkollektivs	48
3.1.	Klinische Daten und Follow-up	48
3.2.	Reproduzierbarkeit der DNA-Bildanalysen	49
II.	Klassische Prognoseparameter	51
3.3.	Korrelation klassischer Prognoseparameter zum rezidivfreien Intervall (DFS) und zum Gesamtüberleben (OS)	51
3.3.1.	Histologische Tumortypen	52
3.3.2.	Tumorgröße	54
3.3.3.	Nodalstatus	56
3.3.4.	Metastasierung	57
3.3.5.	Histologisches Grading	59
3.3.6.	Wachstumsfraktion Ki-67	61
3.3.7.	Menopausenstatus	62
3.3.8.	Hormonrezeptorstatus	64
III.	Moderne Prognoseparameter	68
3.4.	DNA-Gehalt und DNA-Histogramme	68
3.5.	Auer-Klassifikation	68

3.6.	Differenzierung von low-risk und high-risk Konstellationen	73
3.7.	Statistische Analysen zur Grenzwertfestlegung (cut-off) des Aneuploidiegrades	73
3.7.1.	Cut-off für aneuploide Zellen > 5c	74
3.7.2.	Cut-off für hochaneuploide Zellen > 9c	76
3.8.	Korrelation der Auer-Klassifikation zur Ploidie	78
III.	Vergleichende Analyse zwischen klassischen und modernen Prognosefaktoren (Aneuploidiegrad) für das rezidivfreie Intervall (DFS) und das Gesamtüberleben (OS)	
3.9.	Korrelation klassischer Prognosefaktoren zur Aneuploidierate	80
3.9.1.	Korrelation histologischer Tumortypen zur Ploidie	80
3.9.2.	Korrelation der Tumorgroße zur Ploidie	83
3.9.3.	Korrelation des Nodalstatus zur Ploidie	86
3.9.4.	Korrelation der Metastasierung zur Ploidie	88
3.9.5.	Korrelation des histologischen Gradings zur Ploidie	89
3.9.6.	Korrelation der Wachstumsfraktion Ki-67 zur Ploidie	96
3.9.7.	Korrelation des Menopausenstatus zur Ploidie	97
3.9.8.	Korrelation des Hormonrezeptorstatus zur Ploidie	101
V.	Prognoseabschätzung mittels Kombination mehrerer klassischer Prognosefaktoren in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad	
3.10.	Korrelation des Nodalstatus zum Menopausenstatus	105
3.11.	Korrelation des Nodalstatus und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad	107
3.12.	Korrelation des Nodalstatus und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad bei Patientinnen mit und ohne Chemotherapie	110
VI.	Multivariate Analysen	112

4. Diskussion	114
I. Kritische Betrachtung des gewählten Patientenkollektivs	114
4.1. Klinisches Kontroll- und Patientenkollektiv	114
4.2. Bedeutung der Reproduzierbarkeit DNA-zytometrischer Daten	115
II. Moderne Prognoseparameter	116
4.3. Aneuploidiegrad als Malignitätsmarker	116
4.4. Auer-Klassifikation als unzureichende Einteilungsmethode	117
III. Klassische Prognoseparameter	120
4.5. Prognostische Bedeutung klassischer Prognoseparameter	120
4.5.1. Histologische Tumortypen	120
4.5.2. Tumorgroße	122
4.5.3. Nodalstatus	123
4.5.4. Histologisches Grading	124
4.5.5. Wachstumsfraktion	127
4.5.6. Menopausenstatus	128
4.5.7. Hormonrezeptorstatus	129
4.5.8. Chemotherapie	130
IV. Multivariate Analysen	131
5. Zusammenfassung und Ausblick	132
6. Literaturverzeichnis	135
7. Wissenschaftliche Beiträge	146
8. Danksagung	148
9. Lebenslauf	149

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Mammakarzinom ist in Deutschland das häufigste Malignom der Frau. Es ist jährlich mit 50 000 Neuerkrankungen und 15 000 Sterbefällen zu rechnen. Die Statistik zeigt, daß die Erkrankungshäufigkeit in der Tendenz weiterhin ansteigt; ein Rückgang der Brustkrebsmortalität ist derzeit nicht erkennbar.

Kleine im Frühstadium entdeckte Mammakarzinome haben eine ungleich bessere Heilungschancen als größere fortgeschrittene Karzinome. Diese Tatsache verdeutlicht, daß die ansteigende Erkrankungshäufigkeit und die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten ein fachübergreifendes und qualitätsgesichertes Mammakarzinom-Früherkennungsprogramm in Deutschland dringend notwendig macht. Gefordert wird ein interdisziplinäres Management bestehend aus klinischer Untersuchung, apparativer Diagnostik, operativer Therapie und pathomorphologischer Begutachtung. Daraus wächst das Bedürfnis nach klinischen und histopathologischen Prädiktoren, welche eine prognostische Abschätzung bezüglich des Rezidivrisikos und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom zuverlässig voraussagen können. Für klinische Entscheidungen beim Mammakarzinom haben sich klassische Prognosefaktoren wie die Tumorphistologie, der Nodalstatus, die Wachstumsfraktion, das histologische Grading, der Hormonrezeptor- und Menopausenstatus bewährt.

An diesem Punkt knüpft die vorliegende Arbeit an, die sich mit der *DNA-Zytometrie als moderner Prognoseparameter* zur prospektiven Verlaufsanalyse beim Mammakarzinom beschäftigt. Die mittels DNA-Bildanalyse ermittelte *Aneuploidie* (aneuploide Zellen $> 5c$ und hochaneuploide Zellen $> 9c$) ist ein nachgewiesener Malignitätsmarker. Anhand statischer DNA-Bildanalyse wird die prognostische Wertigkeit und Relevanz des Aneuploidiegrades an einem breiten Patientenkollektiv von 314 Mammakarzinomen geprüft. Die bisher postulierte *Auer-Klassifikation* zur prognostischen Einteilung auffälliger DNA-Profile maligner Tumoren konnte in seinem Aussagewert nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, daß der Aneuploidiegrad durch eine präzisere Einteilung in risikoadaptierte Subkollektive einen zusätzlichen Informationsgewinn zu bereits etablierten Prognosefaktoren erbringt. Insbesondere die Gruppe der schwer graduierbaren G2-Mammakarzinome können mittels der Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen einheitlich klassifiziert werden. Hierbei stellt sich die Aneuploidie

als wertvoller Ansatz zur näheren Differenzierung des uneinheitlichen Pools mittelgradig differenzierten G2-Karzinome heraus.

Wichtige weiterführende Ergebnisse sind, daß der Aneuploidiegrad einen prädiktiven Wert insbesondere im Kollektiv nodal negativer und nodal positiver Frauen besitzt. Es zeigt sich, daß *nodal negative* Patientinnen mit *hoher Aneuploidierate* (5c- und 9c-exceeding rate) hinsichtlich ihrer Prognose für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben *nodal positiven* Patientinnen mit *niedriger Aneuploidierate* gleichzusetzen sind. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Aneuploidiegrad die Prognose dieser Frauen unabhängig vom Nodalstatus bestimmt.

Die Korrelation zwischen Nodal- und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad ergibt ein neues Ergebnis:

Prämenopausal nodal negative Frauen mit hoher Aneuploidierate erleiden signifikant früher ein Tumorrezidiv nach Erstdiagnose als nodal negative Frauen mit niedriger Aneuploidierate.

Postmenopausal nodal negative Frauen mit hoher Aneuploidierate weisen im Vergleich zu nodal positiven Frauen mit niedriger Aneuploidierate ein signifikant kürzeren rezidivfreies Intervall auf. Im Kollektiv postmenopausaler Patientinnen scheint eine niedrige Aneuploidierate auch bei befallenen Lymphknoten prognostisch günstiger zu sein als eine hohe Aneuploidierate bei fehlendem Lymphknotenbefall. Daraus ergibt sich, daß in der *Prämenopause* der Nodalstatus dem Aneuploidiegrad prognostisch überlegen ist und in der *Postmenopause* dagegen dem Aneuploidiegrad dem Nodalstatus.

In reinen Subkollektiven (keine Therapie bzw. Chemotherapie) zeigen Patientinnen mit hoher 5c- und 9c-exceeding rate (5c- und 9c-ER) signifikant kürzere rezidivfreie Intervalle als Erkrankte mit geringer Aneuploidierate. In Subkollektiven ohne Chemotherapie sind bei prämenopausal nodal negativen Frauen die 5c-ER für das DFS bestimmend. Bei prämenopausal nodal positiven Frauen mit Chemotherapie ist die 9c-ER für das DFS von Bedeutung.

Die DNA-Bildanalyse kann die Prognoseeinschätzung einzelner Patientengruppen bezüglich des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens präzisieren und damit in Therapieentscheidungen einfließen. Die Arbeit zeigt exemplarisch, daß die mittels DNA-Bildanalyse ermittelte Aneuploidie eine objektivierbare Größe von hoher reproduzierbarer Validität ist und zu einer risikoadaptierten Klassifizierung maligner Tumoren eingesetzt werden kann.

Zusammenfassend scheint nach den vorliegenden Daten die Messung des DNA-Gehaltes zur Bestimmung der Aneuploidierate mittels statischer DNA-Zytometrie zusätzlich zu den klinischen, histomorphologischen und biochemischen Prognoseparametern sinnvoll zu sein.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Feuer EJ, Lap-Ing Wun, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T (1993): The lifetime risk of developing breast cancer. Reports. J Natl Cancer Inst.; 85: 892-897
- ² Ebert AD, Wechselberger C, Brandt R, Martinez-Lacaci I, Bianco C, Salomon DS (1999): Bedeutung der EDF-verwandten Peptide und ihrer Rezeptoren beim Mammakarzinom. Geburtshilfe und Frauenheilkunde; 59: 495-506
- ³ American Cancer Society, Atlanta (1995): Cancer facts and figures: 10-11
- ⁴ Tumorzentrum München (1998): Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Mammakarzinome. 7. Auflage, München
- ⁵ Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W (1992): Breast cancer (first of three parts). N Engl J Med.; 327: 319-328
- ⁶ American Cancer Society (1991): Cancer Statistics 1991, CA-A Cancer Journal for clinicians 4: 18
- ⁷ De Waard F (1975): Breast cancer incidence and nutritional status with particular reference to body weight und height. Cancer Res.; 35: 3351-3356
- ⁸ Newman B, Austin MA, Lee M, King MC (1988): Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc Natl Acad Sci. USA; 85: 3044-3048
- ⁹ Szabo CI, King MC. (1997): Population genetics of BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet.; 60: 1013-1020
- ¹⁰ Anderson DE, Badzioch MD (1985): Risk of familial breast cancer. Cancer; 56: 383-387
- ¹¹ Anderson DE, Badzioch MD (1986): Survival in familial breast cancer patients. Cancer; 58: 360-365

-
- ¹² Claus EB, Risch NJ, Thompson WD (1990): Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.*; 131: 961-972
- ¹³ Kelsey JL et al. (1983): *Breast and gynecologic cancer epidemiology*. Boca Raton, Florida; CRC Press
- ¹⁴ Maass H (1994): Mammakarzinom: Epidemiologie. *Gynäkologe*; 27: 3-6
- ¹⁵ Fracchia AA, Robinson D, Legaspi A, Greenall MJ, Kinne DW, Groshen S. (1985): Survival in bilateral breast cancer. *Cancer*; 55: 1414-1421
- ¹⁶ Hislop TG, Elwood JM, Coldman AJ, Spinelli JJ, Worth AJ, Ellison LG (1984): Second primary cancers of the breast: incidence and risk factors. *Br J Cancer*; 49: 79-85
- ¹⁷ Prior P, Waterhouse JA (1978): Incidence of bilateral tumours in a population-based series of breast-cancer patients. I. Two approaches to an epidemiological analysis. *Br J Cancer*; 37: 620-634
- ¹⁸ WHO (1981): *International histological classification of tumors: Histological typing of breast tumors*, 2nd ed; World Health Organization; Geneva
- ¹⁹ Rosen P, Oberman HA (1993): *Tumors of the mammary gland. Atlas of Tumor Pathology*, 3rd ser. Fasc.7; Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC
- ²⁰ Ernster VL (1997): *Epidemiology and natural history of ductal carcinoma in situ*. Williams & Wilkins, Baltimore: 23-33
- ²¹ Frykberg ER, Bland KI (1994): Overview of the biology and management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*; 74: 350-61
- ²² Foote FW, Steward FW (1941): Lobular carcinoma in situ: A rare form of mammary cancer. *Am J Pathology*; 17: 491-495
- ²³ Bässler R. (1997): Mamma. In: Remmele W (Hrsg). *Pathologie Bd.4*; Springer Verlag, Heidelberg

-
- ²⁴ Wittekind C, Wagner G (1997): TNM-Klassifikation maligner Tumoren 5. Aufl., Springer-Verlag. Berlin Heidelberg
- ²⁵ Bloom HJW, Richardson WW (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer. *Brit J Cancer*; 11: 359-377
- ²⁶ Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L, Huff KK, Do HM, Aitken SC, Warren R (1980): Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*; 16: 323-331
- ²⁷ Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N (1987): Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res.*; 47: 6126-6133
- ²⁸ Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*; 31: 13-20
- ²⁹ Remmele W, Muhlfeit V, Keul HG (1995): Estimation of the proliferative activity of human breast cancer tissue by means of the Ki-67 and MIB-1 antibodies--comparative studies on frozen and paraffin sections. *Virchows Arch*; 426: 435-439
- ³⁰ Cross M, Dexter TM (1991): Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*; 64: 271-280
- ³¹ Gullick WJ (1990): The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer*; 5: 55-61
- ³² Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ (1998): Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol.*; 16: 2659-2671

-
- ³³ Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*; 244: 707-712
- ³⁴ Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*; 235: 177-182
- ³⁵ Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H (1992): Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol.*; 10: 1044-1048
- ³⁶ Slamon DJ, Leyland-Jones B et al (1998): Addition of Herceptin™ (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. *Proc ASCO* 17: 98a
- ³⁷ Lakhani SR, Easton DF, Stratton MR for the Breast Cancer Linkage Consortium BCLC (1997): Pathology of familial breast cancer : differences between breast cancers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet*; 349: 1505
- ³⁸ Untch M (2000): Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. State of the Art 2000; Verlag München: 117-121
- ³⁹ Easton DF (1997): Breast cancer linkage consortium. Pisa
- ⁴⁰ Biesterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Bocking A (1994): Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol.*; 47: 38-42
- ⁴¹ Stenkvist B, Strande G (1990): Entropy as an algorithm for the statistical description of DNA cytometric data obtained by image analysis microscopy. *Anal Cell Pathol.*; 2: 159-165

-
- ⁴² Böcking A, Giroud F, Reith A (1995): Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *European Society for Analytical Cellular Pathology*; 8: 67-74
- ⁴³ Shackney SE, Burholt DR, Pollice AA, Smith CA, Pugh RP, Hartsock RJ (1990): Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. *Cytometry*; 11: 94-104
- ⁴⁴ Stenkvist B, Westman-Naeser S, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, Vegelius J, Eriksson O, Fox CH (1978): Computerized nuclear morphometry as an objective method for characterizing human cancer cell populations. *Cancer Res.*; 38: 4688-4697
- ⁴⁵ Haroske G, Giroud F, Reith A, Bocking A (1998): 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol.*; 17: 189-200
- ⁴⁶ Giroud F, Haroske G, Reith A, Bocking A (1998): 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol.*; 17: 201-208
- ⁴⁷ Colditz GA (1993): Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' health study. *Cancer*; 71: 1480-1489
- ⁴⁸ Soost H-J, Bauer S (1990): *Gynäkologische Zytodiagnostik - Lehrbuch und Atlas*. 5. Auflage; Thieme, Stuttgart.
- ⁴⁹ Feulgen R, Rossenbeck H (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z Physiol Chem.*; 135: 203-248
- ⁵⁰ Vendrely R, Vendrely C (1956): The results of cytophotometry in the study of the deoxyribonucleic acid (DNA) content of the nucleus. *Intern Rev Cytol.*; 5: 171-197

-
- ⁵¹ Casperson T (1932): Die quantitative Bestimmung von Thymonucleinsäure mittels fuchsinschwefliger Säure. *Biochem Z.*; 253: 97-110
- ⁵² Bauer H (1932): Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z Zellf.*; 15: 225-247
- ⁵³ Aubele M, Burger G, Rodenacker K (1994): Problems concerning the quality of DNA measurements on Feulgen-stained imprints. A study of five fixation techniques. *Anal Quant Cytol Histol.*; 16: 226-232
- ⁵⁴ Schulte EK, Wittekind DH (1990): Standardization of the Feulgen reaction: the influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. *Anal Cell Pathol.*; 2: 149-157
- ⁵⁵ Papanicolaou GN, Traut HF (1943): *Diagnosis of uterine cancer by vaginal smear.* The Commonwealth Fund, New York
- ⁵⁶ Chieco P, Jonker A, Melchiorri C, Vanni G, Van Noorden CJ (1994): A user's guide for avoiding errors in absorbance image cytometry: a review with original experimental observations. *Histochem J.*; 26: 1-19
- ⁵⁷ Ballouk F, Ambros RA, Malfetano JH, Ross JS (1993): Evaluation of prognostic indicators in squamous carcinoma of the vulva including nuclear DNA content. *Mod Pathol.*; 6: 371-375
- ⁵⁸ Danque PO, Chen HB, Patil J, Jagirdar J, Orsatti G, Paronetto F (1993): Image Analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. *Mod Pathol.*; 6: 270-275
- ⁵⁹ Schulte E, Wittekind D (1990): Standardization of the Papanicolaou stain. I. A comparison of five nuclear stains. *Anal Quant Cytol Histol.*; 12: 149-156

-
- ⁶⁰ Altman DG (1991): Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall
- ⁶¹ Breslow N (1979): Statistical methods for censored survival data. Environ. Health Perspect; 32: 181
- ⁶² Kaplan EL, Meier P (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American Statistical Association; 53: 457-481
- ⁶³ Cox DR, Oakes D (1984): Analysis of Survival Data. London, New York; Chapman and Hall: 201
- ⁶⁴ Recht A, Hayes DF (1991): Local recurrence following mastectomy. In: Harris JR, Hellmann S, Henderson IC, Kinn DW (eds): Breast diseases, 2nd edn. Lippincott, Philadelphia: 527-540
- ⁶⁵ 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
- ⁶⁶ Böcking A, Auffermann W (1986): Algorithm for DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. Anal Quant Cytol Histol.; 8: 363
- ⁶⁷ Böcking A, Chatelain R, Homge M, Daniel R, Gillissen A, Wohltmann D (1989): Representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas. Anal Quant Cytol Histol.; 11: 81-86
- ⁶⁸ Burger G, Aubele M, Jutting U, Auer G (1992): Interactive cytometry, chance or evil of bias? Pathol Res Pract.; 188: 391-395
- ⁶⁹ Böcking A (1993): Präzisere Krebsdiagnostik durch Zytometrie. Sonderdruck aus dem Wirtschaftsmagazin RWTH-Themen

-
- ⁷⁰ Bocking A (1990): DNA cytometry and automation in clinical diagnostics. *Verh Dtsch Ges Pathol.*; 74: 176-185
- ⁷¹ Riesener KP, Fuzesi L, Biesterfeld S, Gotzen A, Kasperk R, Schumpelick V (1989): Prognostic value of DNA image cytometry in resected colorectal hepatic metastases. *Anal Quant Cytol Histol.*; 21: 311-318
- ⁷² Steinbeck RG, Askensten U, Auer G (1989): The value of DNA analysis of solid tumors. A review for the clinically active pathologist. *Pathologe*; 10: 171-176
- ⁷³ Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A (1984): Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. *Cancer Res.*; 44: 394-396
- ⁷⁴ Steinbeck RG, Auer GU, Zetterberg AD (1999): Reliability and significance of DNA measurements in interphase nuclei and division figures in histological sections. *Eur J Cancer*; 35: 787-795
- ⁷⁵ Auer G, Askensten U, Ahrens O (1989): Cytophotometry. *Hum Pathol.*; 20: 518-527
- ⁷⁶ Baldetorp B, Ferno M, Fallenius A, Fallenius-Vecchi G, Idvall I, Olsson H, Sigurdsson H, Akerman M, Killander D (1992): Image cytometric DNA analysis in human breast cancer analysis may add prognostic information in diploid cases with low S-phase fraction by flow cytometry. *Cytometry*; 13: 577-585
- ⁷⁷ Verderio P, Corletto V, Boracchi P, Gambacorta M, Giardini R (1996): Evaluation of the reproducibility of Auer's classification of DNA histogram in breast carcinoma. *Anal Cell Pathol.*; 11: 97-106
- ⁷⁸ Preiß J, Dornoff W (1999): *Onkologie - Empfehlungen zur Therapie*; Onkologische Arbeitsgemeinschaft: 120-133
- ⁷⁹ Berg JW, Hutter RV (1995): Breast cancer. *Cancer.*; 75: 257-269

-
- ⁸⁰ Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, Gierson ED, Colburn WJ, Senofsky GM, Gamagami P (1994): Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? *Cancer*; 73: 1673-1677
- ⁸¹ Frierson HF Jr (1991): Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol.*; 15: 358-367
- ⁸² Carter CL, Allen C, Henson DE (1989): Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*; 63: 181-187
- ⁸³ Moore MP, Kinne DW (1997): Axillary lymphadenectomy: a diagnostic and therapeutic procedure. *J Surg Oncol.*; 66: 2-6
- ⁸⁴ Aubele M, Auer G, Falkmer U, Voss A, Rodenacker K, Jutting U, Höfler H (1995): Identification of a low-risk group of stage I breast cancer patients by cytometrically assessed DNA and nuclear texture parameters. *J Pathol.*; 177: 377-384
- ⁸⁵ Aubele M, Auer G, Höfler H (1996): Analysis of DNA and morphometry in breast carcinoma. *Histochem Cell Biol.*; 106: 241-245
- ⁸⁶ Aubele M, Auer G, Höfler H (1996): Cytometric prognostic parameters in breast cancer. *Anticancer Res.*; 16: 3085-3087
- ⁸⁷ Bässler R, Böcker W, Hermanek P, Pickartz H, Prechtel K, Schauer A, Schnurch HG, Stegner HE (1992): Current status of grading in breast cancer. *Pathologe*; 13: 130-134
- ⁸⁸ Dalton LW, Page DL, Dupont WD (1994): Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer*; 73: 2765-2770
- ⁸⁹ Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C (1995): Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol.*; 26: 873-879

-
- ⁹⁰ Guski H, Winzer KJ, Seidenfaden U, Hufnagl P, Wolf G (1991): Frequency distribution, microscopic image analysis and grading of mammary carcinoma. *Zentralbl Pathol.*; 137: 249-255
- ⁹¹ Tawfik M, Borner P, Krause PH (1990): Microscopic DNA cytophotometry of axillary lymph node metastasis in mammary carcinomas. *Verh Dtsch Ges Pathol.*; 74: 258-261
- ⁹² Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H, Heidenreich W, Schwarting R, Kurtsiefer L, Stauch G, Stein H (1986): Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol.*; 39: 977-980
- ⁹³ Schönborn I, Zschesche W, Spitzer E, Minguillon C, Mohner M, Ebeling K, Grosse R (1994): C-erbB-2 overexpression in primary breast cancer: independent prognostic factor in patients at high risk. *Breast Cancer Res Treat.*; 29: 287-295
- ⁹⁴ Kunz J, Schmidt A (1993): Ki-67-Wachstumsfraktion von Karzinomen und benignen Läsionen der Brustdrüse. *Zentralbl Pathol.*; 139: 201-205
- ⁹⁵ Remmele W, Stegner HE (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*; 8: 138-140
- ⁹⁶ Pichon MF, Broet P, Magdelenat H, Delarue JC, Spyratos F, Basuyau JP, Saez S, Rallet A, Courriere P, Millon R, Asselain B (1996): Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *Br J Cancer*; 73: 1545-1551
- ⁹⁷ Esteban JM, Ahn C, Battifora H, Felder B (1994): Predictive value of estrogen receptors evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol.*; 102: 9-12
- ⁹⁸ Esteban JM, Ahn C, Mehta P, Battifora H (1994): Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol.*; 102: 158-162

-
- ⁹⁹ Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, Axiotis C (1996): Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. *Cancer*; 77: 2514-2519
- ¹⁰⁰ Remmele W, Schicketanz KH (1993): Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract.*; 189: 862-866
- ¹⁰¹ Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM (1988): Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer*; 62: 331-341
- ¹⁰² Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU (1988): Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. A retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer*; 62: 521-530
- ¹⁰³ Atkin NB (1972): Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast. *Br Med J.*; 1: 271-272
- ¹⁰⁴ Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS (1980): DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol.*; 2: 161-165
- ¹⁰⁵ Utada Y, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G (1998): Relationship between DNA ploidy and survival in breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.*; 25 Suppl 3: 431-435
- ¹⁰⁶ Pareira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO (1995): Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader ? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology*; 27 (3): 219-226

7. Wissenschaftliche Beiträge

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden bereits als wissenschaftliche Beiträge vorgetragen und publiziert :

- 1.) Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Foss HD, Kühn W
Prognostische Bedeutung der statischen DNA-Zytometrie an Mammakarzinomzellen in nodalpositiven, nodalnegativen und prä- und postmenopausalen Subkollektiven. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2000; S 1 : S. 115

- 2.) Coumbos A, Yildirim S, Ruhnke M, Foss HD, Kühn W
Bedeutung der 5c- und 9c-exceeding rate und der AUER-Klassifikation beim Mammakarzinom. Wissenschaftswoche des UKBF 1998; S. 362
Beitrag zur Wissenschaftswoche des Fachbereichs Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin

- 3.) Coumbos A, Ruhnke M, Yildirim S, Foss HD, Kühn W
Bedeutung der „5c- und 9c-exceeding rate“ und der AUER-Klassifikation bei 345 Mammakarzinomen. Archives of Gynecology and Obstetrics 1998; Vol. 261 (S1): S. 80

Verleihung des Posterpreises 1998 auf dem 52. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
Nürnberg, 08.-12.September 1998

- 4.) Coumbos A, Ruhnke M, Foss HD, Yildirim S, Kühn W
Grade of aneuploidy (5c- and 9c-exceeding rate) as a prognostic marker for breast cancer.
Posterpresentation at the 10th International Congress on Senology
Porto, 31st May - 4th June 1998

-
- 5.) Coumbos A, Ruhnke M, Foss HD, Yildirim S, Kühn W
Aneuploidie (5c- und 9c-exceeding rate) beim Mammakarzinom.
Besserer Prognoseparameter als das Grading ? Abstracts 1997: S. 147
Posterpräsentation auf der 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für
Senologie in Berlin, 06.-08.November 1997
- 6.) Coumbos A, Ruhnke M, Yildirim S, Kühn W
Aneuploidie (5c- und 9c-exceeding rate) als prognostischer Marker für das
Mamma-Carcinom.
Vortrag auf dem 9. Heidelberger Zytometrie Symposium
Heidelberg, 17.-19.Oktober 1996
- 7.) Coumbos, Ruhnke M, Yildirim S, Kühn W
Aneuploidie (5c- und 9c-exceeding rate) als prognostischer Marker für das
Mamma-Carcinom. Archives of Gynecology and Obstetrics 1996; Vol. 258 (S1):
S. 95

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.W.Kühn für die freundliche Überlassung des Themas und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr.A.Coumbos möchte ich mich herzlich für ihre stetig engagierte Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und gute Betreuung bedanken. Die Zusammenarbeit während der Vorbereitungen wissenschaftlicher Beiträge war sehr angenehm.

Herrn Prof.Dr.H-D.Foß danke ich für seine jahrelang hilfsbereite Kooperation bei der Anfertigung und Bereitstellung zahlreicher Tupfpräparate im Institut für Pathologie.

Herrn PD Dr.Dr.W.Hopfenmüller danke ich für die freundliche und zugleich kritische Beratung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Herrn Dr.M.Ruhnke danke ich für die Unterstützung in computertechnischen Fragen.

Außerdem danke ich Frau Kühnert, Frau Trenkel, Frau Salow und Frau Rieger, unseren medizinisch technischen Assistentinnen des Zytologischen Labors der Frauenklinik des Universitätsklinikum Benjamin Franklin, für die freundliche Unterstützung und vielfältige technische Hilfe während meiner Arbeit im Labor.

Meinem lieben Ehemann Chalid möchte ich meinen besonderen Dank für seine Kritikfähigkeit bei der Durchsicht der Arbeit und seine Geduld während dieser Zeit aussprechen.

9. Lebenslauf

Vor- und Zuname **Selma Yildirim – Assaf**, geb. Yildirim
Geburtsdatum / -ort 27. Juni 1971 in Berlin
Anschrift Bosestr. 44, 12103 Berlin

Eltern Ömer Yildirim, Diplom-Kaufmann, selbständig,
beeidigter Dolmetscher an deutschen Gerichten
Nurgül Yildirim, selbständig, Buchführungsbüro

Familie Eheschließung mit Chalid Assaf am 27.07.1999
Geburt unserer Tochter Thalia Sinem am 07.04.2001

Schulbildung

1977 – 1983 Gustav-Falke-Grundschule, Berlin
1983 – 1990 Lessing-Gymnasium, Berlin
1990 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife, Berlin

Hochschulbildung

1990 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1993 Ärztliche Vorprüfung, Berlin
1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Berlin
1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Berlin

Praktisches Jahr :

1. Trimester : Chirurgie: Raigmore Hospital NHS Trust, Inverness/Schottland sowie
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie,
Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin
(Leiter : Prof. Dr. med. H.J. Buhr)

