

3. Ergebnisse

I. Beschreibung des klinischen Kontroll- und Patientenkollektivs

3.1. Klinische Daten und Follow-up

Zu Beginn der Studie stellten wir ein Kontrollkollektiv aus 85 verschiedenen Mammakarzinomen zusammen, an dem wir unser repräsentatives Patientengut überprüfen konnten. Zur Objektivierung der vorliegenden DNA-Analysen wurde zunächst eine Kontrollgruppe mit Mammakarzinomen bei bekanntem Aneuploidiegrad zytometrisch untersucht. Hierbei ergab sich eine Übereinstimmung der Messergebnisse zwischen Kontroll- und neuer Untersuchungsgruppe (s. Kap. 3.2.).

370 Tupfpräparate von insgesamt 333 an einem Mammakarzinom erkrankte Patientinnen wurden mittels statischer DNA-Bildzytometrie untersucht. Zusätzlich wurden 37 Tupfpräparate von bilateralen Mammakarzinomen angefertigt.

Von 333 Mammakarzinom-Patientinnen konnten im Rahmen der Studie insgesamt 314 Patientinnen in ihrem klinischen Krankheitsverlauf systematisch über längere Jahre nachbeobachtet werden. Von ihnen sind 6 Patientinnen im Studienverlauf an einem nicht tumorbedingten Tod verstorben und bei 13 Patientinnen ist der klinische Krankheitsverlauf unbekannt geblieben. Diese Patientinnen wurden im Follow-up nicht berücksichtigt, sie gelten in der Studie als „drop outs“.

Das **mediane Erkrankungsalter** bei Primärdiagnose des Mammakarzinoms beträgt 57 Jahre; die jüngste Patientin war bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms 27 Jahre, die älteste Patientin hingegen 89 Jahre alt. Der **Beobachtungszeitraum** erstreckt sich von Juli 1988 bis Juli 2000; die Patientinnen wurden insgesamt über 12 Jahre in ihrem Krankheitsverlauf beobachtet. Das **mediane Beobachtungsintervall** beträgt in der Studie 33 Monate (8 - 144 Monate).

Im Rahmen von Verlaufsbeobachtungen einer Tumorerkrankung sind vor allem das Auftreten eines Rezidivs bzw. einer Metastase der Primärerkrankung oder der tumorbedingte Tod des Patienten maßgebend. Bezüglich des Mammakarzinoms ist das Rezidiv definiert als lokales Wiederauftreten des Primärtumors beispielsweise nach durchgeführter operativen Therapie oder Strahlentherapie. Rezidive treten beim Mammakarzinom in 60-70 % innerhalb der ersten 1-2 Jahren auf. Da ein Rezidiv mit einem erhöhten Malignitätsgrad des Primärtumors einhergeht, ist das Rezidiv bewiesenermaßen ein prognostisch ungünstiges Symptom und Ausdruck einer unvollständigen Tumorelimination durch die jeweilige Primärtherapie⁶⁴.

Der aktuelle Krankheitsverlauf der Patientinnen ergibt, daß 71 % (n = 224) der Patientinnen tumorfrei leben, 14 % (n = 44) bereits ein Rezidiv ihrer Erkrankung erlitten haben und 15 % (n = 46) der Frauen zum Zeitpunkt der Studiauswertung bereits verstorben sind.

3.2. Reproduzierbarkeit der DNA-Bildanalysen

Zu Beginn der durchgeführten DNA-Messungen stellten wir ein Patientenkontrollkollektiv aus verschiedenen Mammakarzinomen zusammen, an dem wir das zu untersuchende Patientengut für die Studie prüften. Um die Reproduzierbarkeit zytometrisch erhobener DNA-Analysen zu überprüfen, führten wir als Voruntersuchung eine Testung der *Interobserver- und Intraobserver-Übereinstimmung (Interobserver und Intraobserver agreement)* durch. Mammakarzinompräparate einer Kontrollgruppe von 85 Mammakarzinom-Patientinnen mit bekanntem DNA-Histogrammprofil wurden von zwei erfahrenen Untersuchern per DNA-Bildzytometrie analysiert. An dem identischen Tupfpräparat wurden jeweils 100 für den Untersucher auffällige Zellen zytophotometrisch vermessen und computerisiert ausgewertet. Hierbei ergab sich folgende Übereinstimmung zwischen *zwei* unabhängigen Untersuchern (*Interobserver agreement*):

Die Messergebnisse stimmten bezüglich ihres Aneuploidiegrades in 98 % (83 Fälle) überein, obwohl die Untersucher unterschiedliche Tumorzellen pro Tupfpräparat als auffällig werteten. In nur 2 % (2 Fälle) wurde ein angrenzendes DNA-Profil gewählt. Die

absolute Anzahl aneuploider ($> 5c$) bzw. hochaneuploider Zellen ($> 9c$) differierte; ein auffälliges DNA-Profil wurde von beiden Untersuchern immer als high-risk analysiert.

Die Analyse bezüglich der *Intraobserver agreement* durch *einen* Untersucher ergab bei der mehrmaligen DNA-Messung immer ein high-risk DNA-Profil (**Tabelle 7**).

Tabelle 7 : Intraobserver agreement bei der DNA-Analyse

DANN-Messung	polyploide Zellen	aneuploide Zellen $> 5c$	hochaneuploide Zellen $> 9c$	DNA-Profil
1	82	13	5	high-risk
2	81	15	4	high-risk
3	55	14	7	high-risk
4	36	22	16	high-risk

II. Klassische Prognoseparameter

Die Bestimmung von Prognoseparametern beim Mammakarzinom hat das Ziel, den individuellen Krankheitsverlauf einer an einem Mammakarzinom erkrankten Patientin prospektiv möglichst genau abzuschätzen. Im folgenden Kapitel wird die Korrelation klassischer Prognosefaktoren zum rezidivfreien Intervall (DFS) und zum Gesamtüberleben (OS) der Patientinnen ausführlich dargestellt.

3.3. Korrelation klassischer Prognoseparameter zum rezidivfreien Intervall (DFS) und zum Gesamtüberleben (OS)

International etablierte klassische Prognosefaktoren werden in ihrer prognostischen Wertigkeit an unserem Patientenkollektiv einzeln überprüft. Hier verwenden wir zur exakten Analyse die Beschreibung der *histologischen Karzinomtypen*, der *histopathologischen Stadieneinteilung* nach der international bewährten TNM-Klassifikation, des *histologischen Gradings*, der *Wachstumsfraktion*, des *Menopausenstatus* sowie des *Hormonrezeptorstatus*.

Die Wahrscheinlichkeit für ein mögliches Rezidiv der Erkrankung wird an dem rezidivfreien Intervall bzw. für den Tod an der Gesamtüberlebenszeit berechnet und als statistische *Überlebenskurven nach Kaplan-Meier*⁶² graphisch dargestellt.

3.3.1. Histologische Tumortypen

Innerhalb des Kollektivs zeigt sich bei Erstdiagnose folgende Aufteilung **histologischer Tumortypen** :

In 85 % (n = 267) finden sich invasiv duktales Mammakarzinome, in 8 % (n = 25) invasiv lobuläre Mammakarzinome. Als sonstige Mammakarzinome sind Präkanzerosen in 2 % (n = 5) ein Carcinoma ductale in situ (CDIS) und in 1 % (n = 3) ein Carcinoma lobulare in situ (CLIS) vertreten. In 2 % (n = 7) wurden muzinöse Mammakarzinome, in 2 % (n = 5) medulläre Mammakarzinome, in jeweils 0,3 % (n = 1) ein papilläres und ein spindelzelliges (n = 1) Mammakarzinom diagnostiziert (**Tabelle 8**).

Da die invasiv duktales und invasiv lobulären Mammakarzinome prozentual am häufigsten vorkommen, werden in den folgenden Überlebenskurven lediglich diese beiden histologischen Differenzierungstypen betrachtet. Der Anteil anderer Tumortypen ist zu gering, als daß sie eine Aussage über das DFS bzw. das OS zulassen könnten.

Tabelle 8 : Verteilung der histologischen Tumortypen bei 314 Mammakarzinomen

Histologische Tumortypen	Anzahl in %	Anzahl n
invasiv duktales Mammakarzinome	85 %	n = 267
invasiv lobuläre Mammakarzinome	8 %	n = 25
sonstige Mammakarzinome	7 %	n = 22

Die Überlebenskurven zeigen, daß beim invasiv duktales Mammakarzinom (n = 267) im Vergleich zum invasiv lobulären Mammakarzinom (n = 25) signifikant häufiger Rezidive auftreten (31 % vs. 12 %) und innerhalb kürzerer Zeit zum Tode führen (4 % vs. 15 %). Bei den prognostisch günstigeren invasiv lobulären Mammakarzinomen ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) von 90 % und für die prognostisch ungünstigen invasiv duktales Karzinome eine 5-JÜR von 75 %. Dieses Ergebnis belegt, daß histomorphologische Kriterien beim Mammakarzinom eine prognostische Relevanz für das DFS ($p < 0,05$) und OS ($p < 0,10$) haben (**Abbildung 12** und **Abbildung 13**).

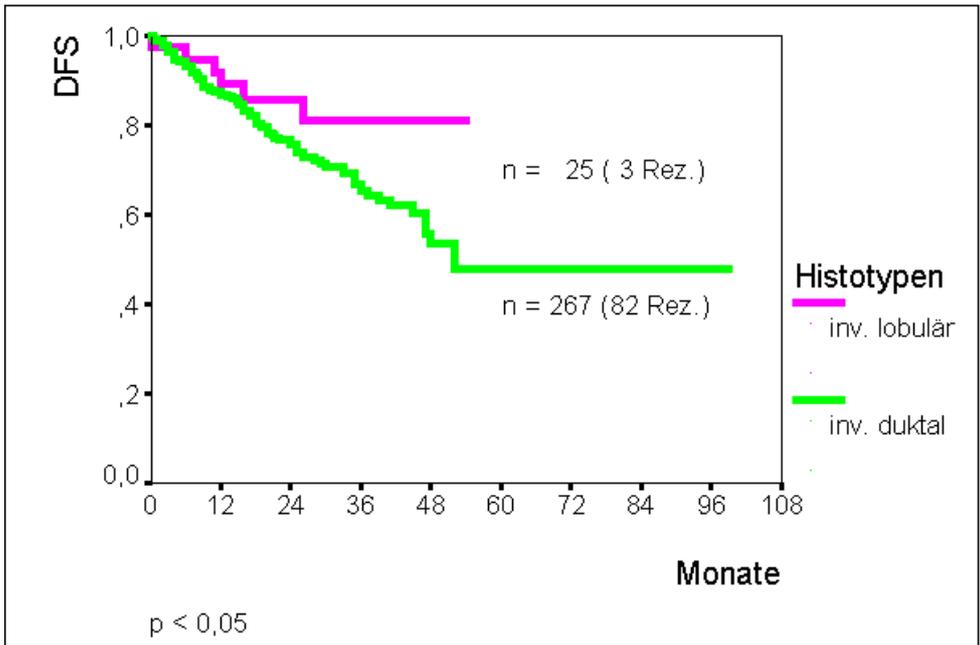


Abbildung 12 : Darstellung der häufigen histologischen Tumortypen bei 292 Mammakarzinomen für das DFS

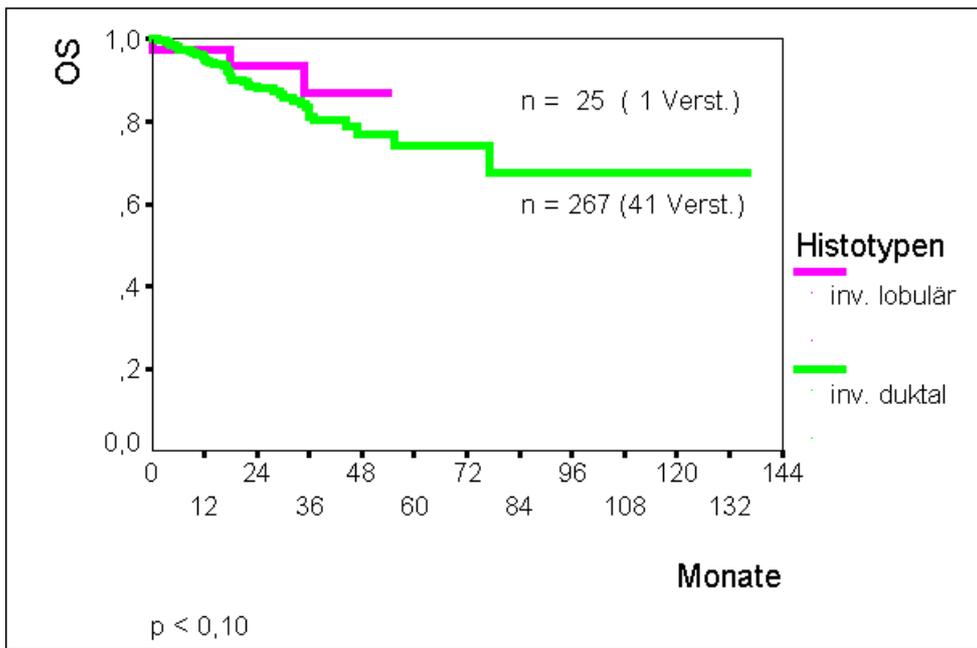


Abbildung 13 : Darstellung der häufigen histologischen Tumortypen bei 292 Mammakarzinomen für das OS

3.3.2. Tumorgröße

Nach der **TNM-Klassifikation**²⁴ kann das Patientenkollektiv bezüglich ihrer Tumorcharakteristika näher definiert werden :

Für die **Tumorgröße (T)** ergibt sich in 34 % (n = 106) ein T1-Stadium, in 48 % (n = 150) ein T2-Stadium, in 6 % (n = 20) ein T3-Stadium und in 12 % (n = 38) ein T4-Stadium. Abhängig vom Tumorstadium können anhand von Überlebenskurven drei Risikokonstellationen definiert werden. Da sich kein signifikanter Unterschied innerhalb des T3- und T4-Stadiums bezüglich des DFS und OS ergeben hat, werden sie in eine Gruppe zusammengefasst. Innerhalb des T1-Stadium erlitten 19 % (n = 20) der Patientinnen ein Rezidiv, im T2-Stadium 33 % (n = 49) und im T3- / T4-Stadium waren es bereits 36 % (n = 21) der Frauen ($p < 0,0000$) (**Abbildung 14**).

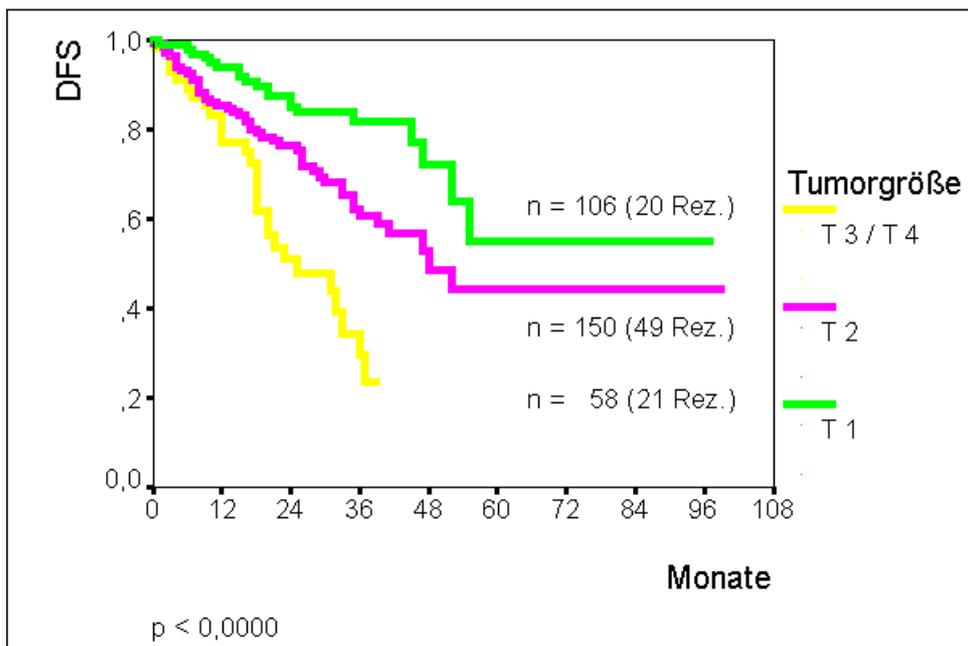


Abbildung 14 :Darstellung der stadienabhängigen Tumorgröße bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

Die Betrachtung der Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen ergibt, daß innerhalb des T1-Stadiums etwa 8 % (n = 8), im T2-Stadium 15 % (n = 23) und im T3- / T4-Stadium 26 % (n = 15) der Patientinnen verstorben sind (p < 0,009) (**Abbildung 15**). Die 5-JÜR beträgt für T1-Karzinome 85 %, für T2-Karzinome 77 % und für die prognostisch ungünstigen T3- / T4-Karzinome etwa 30 %.

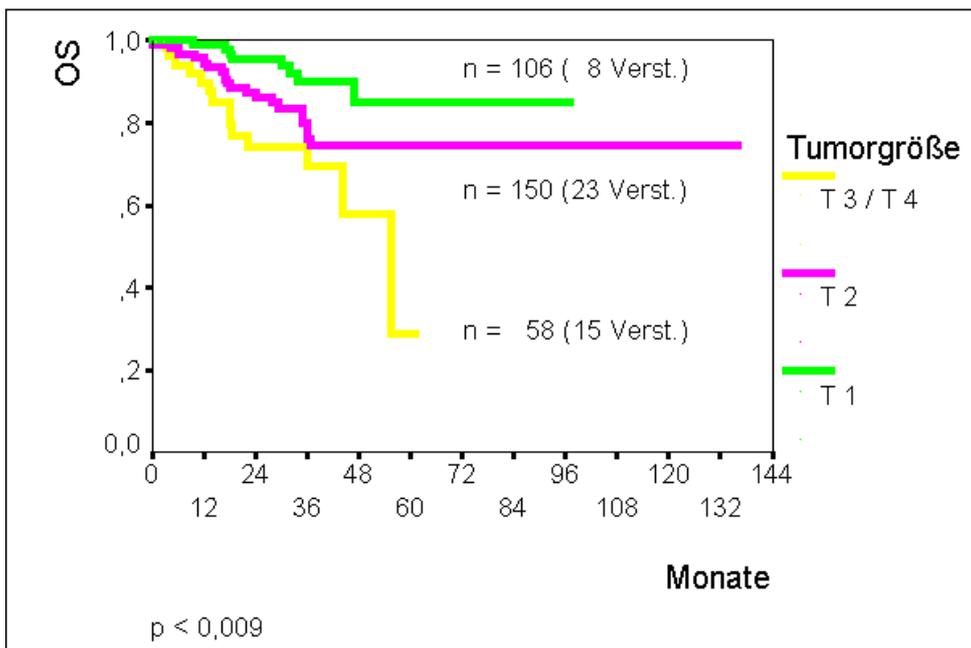


Abbildung 15 :Darstellung der stadienabhängigen Tumorgröße bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.3.3. Nodalstatus

Der axilläre Lymphknotenbefall ist der derzeit wichtigste Parameter für die prognostische Beurteilung des primären Mammakarzinoms.

Bezüglich des **Nodalstatus (N)** kann das Kollektiv in zwei prozentual etwa gleich große Gruppen eingeteilt werden. Am Gesamtkollektiv betrachtet finden sich in 49 % (n = 155) nodal negative und in 51 % (n = 159) nodal positive Patientinnen. Innerhalb der Gruppe nodal positiver Patientinnen liegt in 47 % (n = 148) ein N1-Status, in 3 % (n = 9) ein N2-Status und in 1 % (n = 2) ein N3-Status vor. Abhängig vom DFS kann das Kollektiv in drei Untergruppen eingeteilt werden : Im N0-Status erlitten 19 %, im N1-Status 37 % und im N2- / N3-Status bereits 45 % der erkrankten Frauen ein Rezidiv ($p < 0,0000$) (**Abbildung 16**).

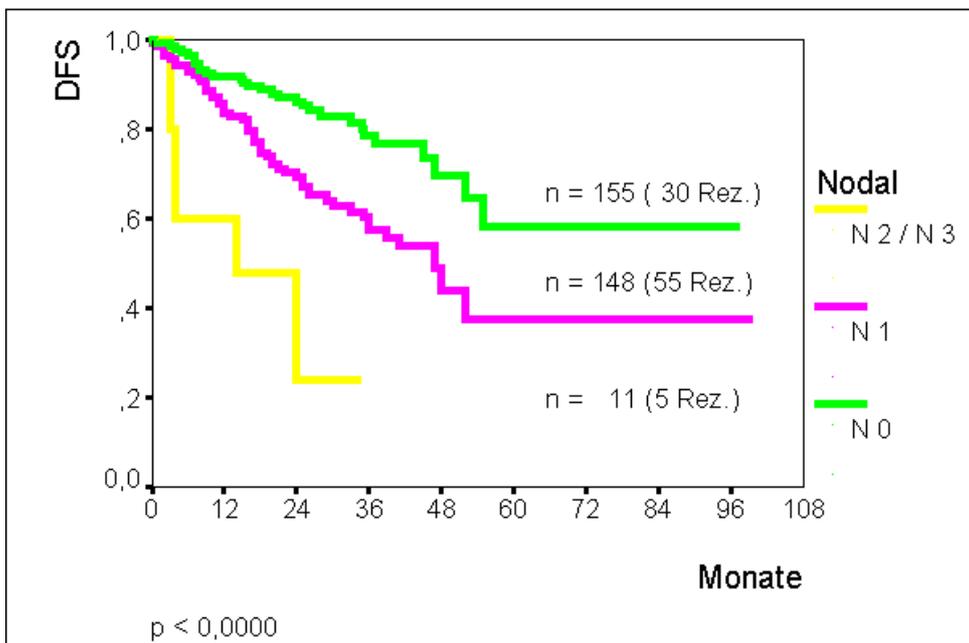


Abbildung 16 : Darstellung des Nodalstatus bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

Für das Gesamtüberleben ergibt sich folgende Konstellation : Innerhalb des N0-Status verstarben 10 %, im N1-Status 18 % und im N2- / N3-Status bereits 36 % der Frauen ($p < 0,0003$) (**Abbildung 17**).

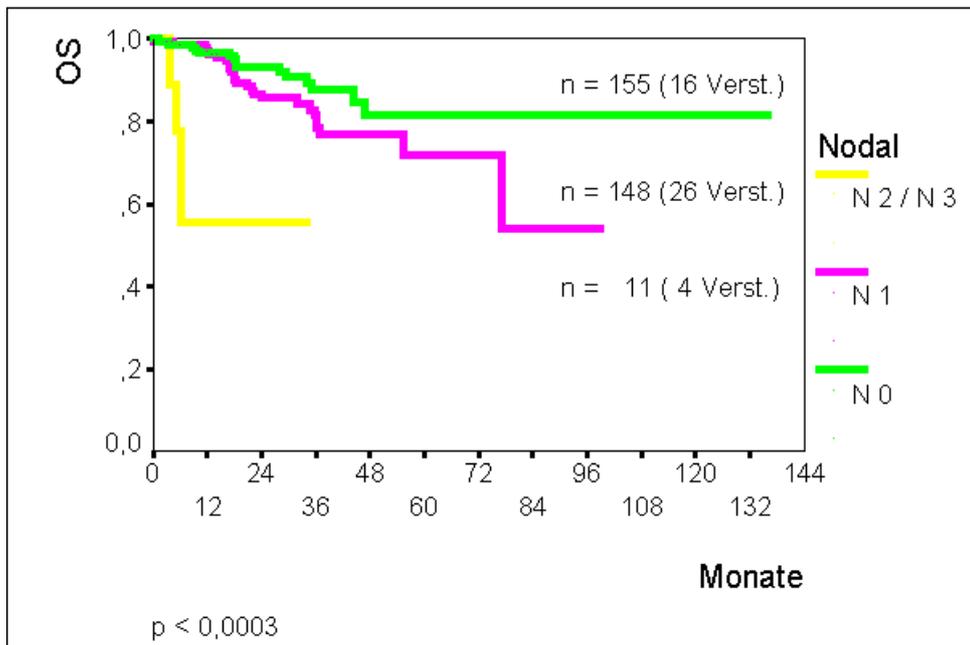


Abbildung 17 : Darstellung des Nodalstatus bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.3.4. Metastasierung

Bezüglich der **Metastasierung (M)** bei Primärdiagnose der Erkrankung werden insgesamt 94 % ($n = 295$) der Patientinnen aufgrund fehlender Fernmetastasierung dem M0-Stadium zugeordnet; in 6 % ($n = 19$) liegt bereits ein primär metastasiertes Mammakarzinom vor.

Patientinnen mit fehlender Metastasierung bei Primärdiagnose eines Mammakarzinoms weisen ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall auf als Patientinnen, bei denen bereits eine Fernmetastasierung vorliegt (26 % vs. 74 %, $p < 0,000$) (**Abbildung 18**).

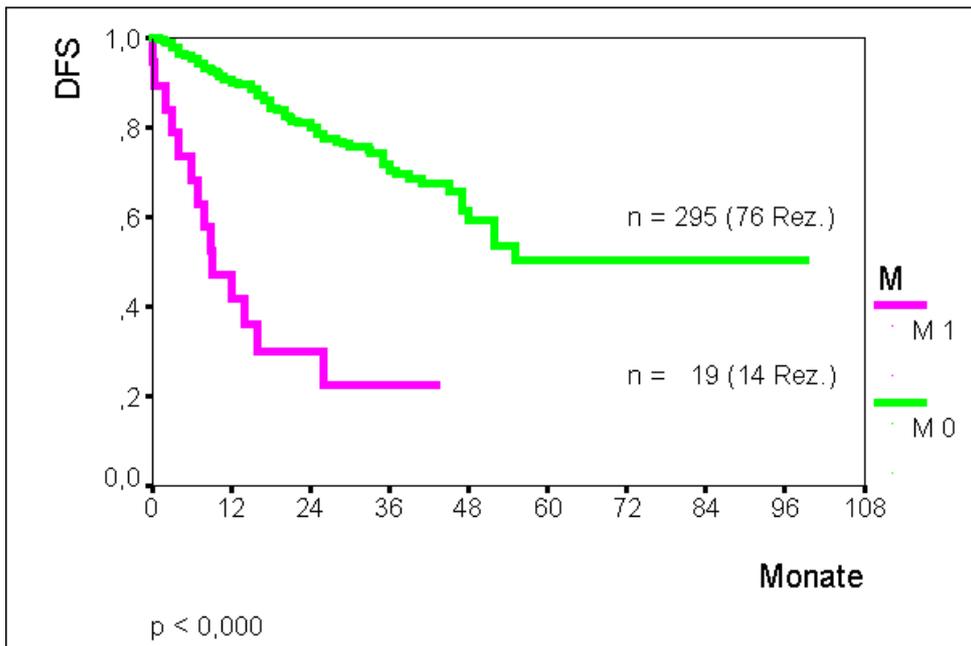


Abbildung 18 : Vergleich des Metastasierungsstadium bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

Ebenso ist die Gesamtüberlebenszeit bei Patientinnen des M0-Stadiums signifikant länger als bei Patientinnen, die sich bereits zu Erkrankungsbeginn im M1-Stadium befinden (13 % vs. 47 % , $p < 0,000$) (**Abbildung 19**).

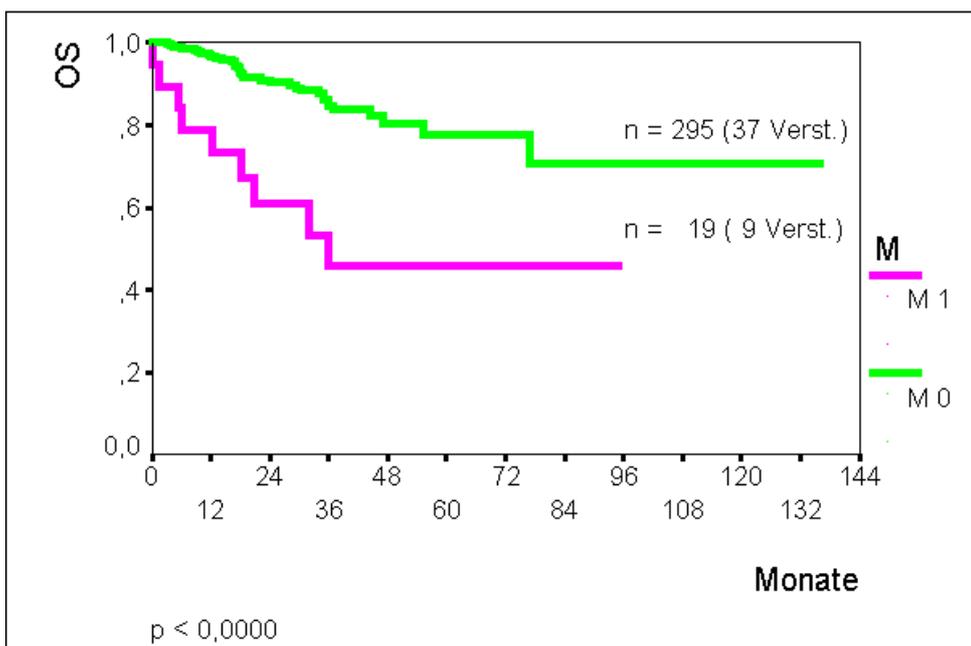


Abbildung 19 : Vergleich des Metastasierungsstadium bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.3.5. Histologisches Grading

Das **histologische Grading** (Differenzierungsgrad) der Mammakarzinome erfolgt gemäß der Einteilung von *Bloom und Richardson*²⁵ und ergibt in 12 % (n = 38) hoch differenzierte Karzinome (G1), in 45 % (n = 140) mittelgradig differenzierte Mammakarzinome (G2) und in 35 % (n = 111) niedrig differenzierte Mammakarzinome (G3). Bei 50 % der untersuchten Mammakarzinome liegt histopathologisch ein mittlerer Differenzierungsgrad (G2) vor.

Die invasiv lobulären Mammakarzinome (n = 25) werden keinem histologischen Grading zugeführt. Dies beruht auf einer internationalen Richtlinie, nach der invasiv lobuläre Mammakarzinome in die Gruppe der weitgehend einheitlich differenzierten Mammakarzinome gehören. Nach Elson und Ellis⁶⁵ entsprechen die invasiv lobulären Mammakarzinome einem mittelgradig differenzierten G2-Mammakarzinom. Die invasiv lobulären Karzinome sind aus diesem Grund nicht in der Überlebenskurve berücksichtigt.

Wie in der nachfolgenden Kaplan-Meier-Kurve dargestellt, besteht eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem histologischen Grading und dem rezidivfreien Überleben ($p < 0,0000$) (**Abbildung 20**). Mit abnehmendem histologischem Differenzierungsgrad verkürzt sich das rezidivfreie Intervall deutlich. Mammakarzinome des G1-Stadiums zeigen in 5 % (n = 2), im G2-Stadium in 19 % (n = 27) und im G3-Stadium in bereits 45 % (n = 50) Rezidive.

Das Gesamtüberleben der Patientinnen verschlechterte sich signifikant mit abnehmender histologischer Differenzierung ($p < 0,0000$) (**Abbildung 21**). In der Gruppe der G1-Karzinome verstarben 3 % (n = 1), bei den G2-Karzinomen 6 % (n = 9) und bei den G3-Karzinomen immerhin schon 23 % (n = 26) der Frauen.

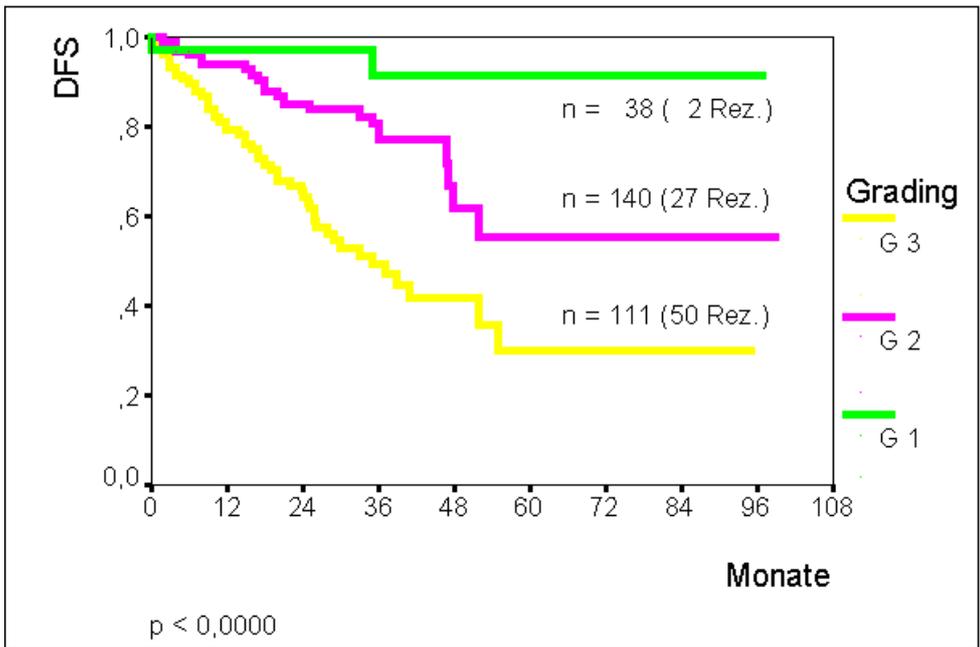


Abbildung 20 : Vergleich histologischer Differenzierungsgrade (Grading) bei 289 Mamma-karzinomen für das DFS

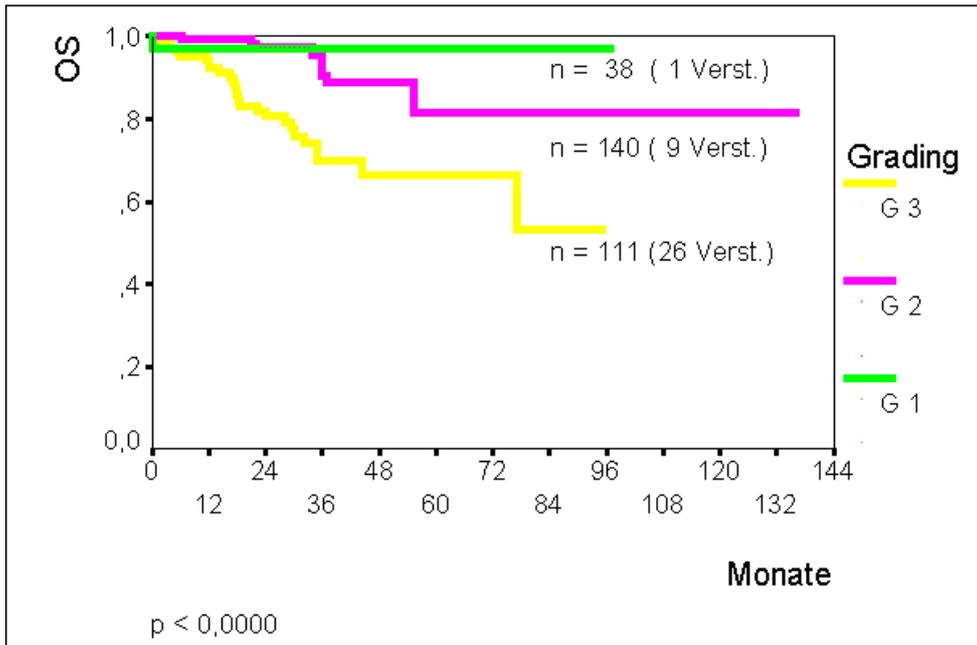


Abbildung 21 : Vergleich histologischer Differenzierungsgrade (Grading) bei 289 Mamma-karzinomen für das OS

3.3.6. Wachstumsfraktion Ki-67

Die **Wachstumsfraktion**, gemessen an dem Proliferationsmarker Ki-67, zeigt ein breitflächiges Verteilungsmuster innerhalb der immunhistochemisch untersuchten Mammakarzinompräparate; die minimale Wachstumsfraktion beträgt 1 %, die maximale hingegen 80 %. Die mediane Wachstumsfraktion der Mammakarzinome beträgt circa 15 % für das Gesamtkollektiv.

Bezüglich der Wachstumsfraktion läßt sich das Kollektiv in zwei einheitliche Gruppen unterteilen. Anhand der ROC-Analyse (s. Kapitel 2.4.) kann ein statistischer cut-off Wert bei 20 % berechnet werden. Innerhalb dieser Kollektive lassen sich signifikante Unterschiede sowohl für das DFS als auch für das OS herausarbeiten.

Demnach kann bei 63 % (n = 198) der Mammakarzinome eine Wachstumsfraktion von ≤ 20 % und bei 37 % (n = 116) > 20 % nachgewiesen werden. Nach Erstellung der Überlebenskurven ergibt sich ein prognostisch niedriges Risiko bei Vorliegen des Ki-67 Antigens ≤ 20 % und ein prognostisch hohes Risiko bei einer Expression von > 20 % für das Erleiden eines Rezidivs (23 % vs. 39 %, $p < 0,000$) (**Abbildung 22**).

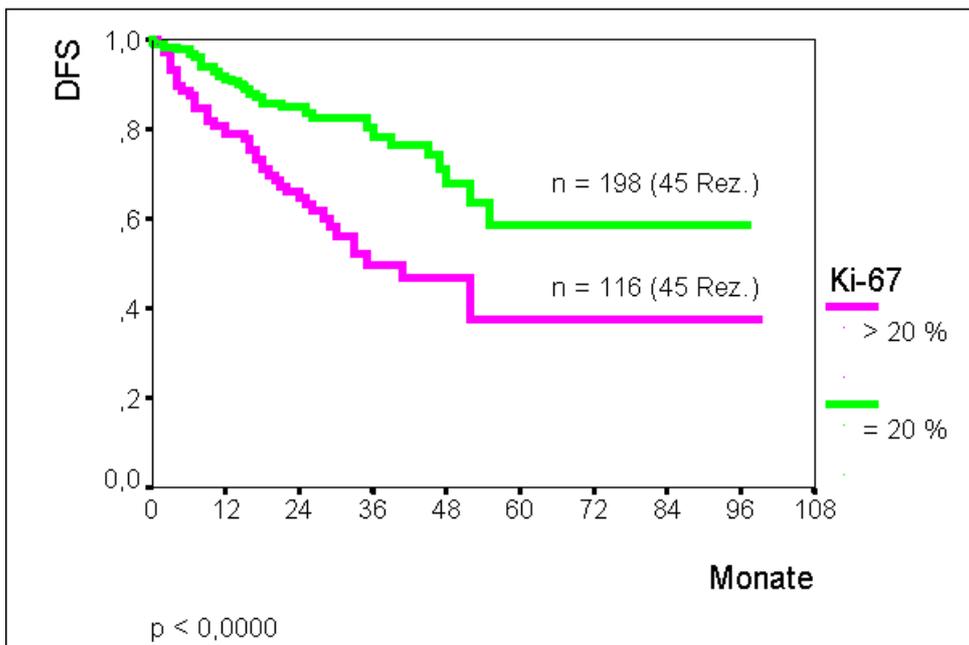


Abbildung 22 :Vergleich der Wachstumsfraktion mittels Ki-67 bei 314 Mammakarzinomen für das DFS.

Im Gesamtüberleben ergibt sich ein statistischer Unterschied zwischen Karzinomen niedriger und hoher Wachstumsfraktion ($p < 0,0095$) (**Abbildung 23**). Während bei Mammakarzinomen niedriger Wachstumsfraktion ($< 20\%$) circa 12% ($n = 24$) der Erkrankten verstarben, waren es 20% ($n = 22$) bei hoher Wachstumsfraktion ($> 20\%$).

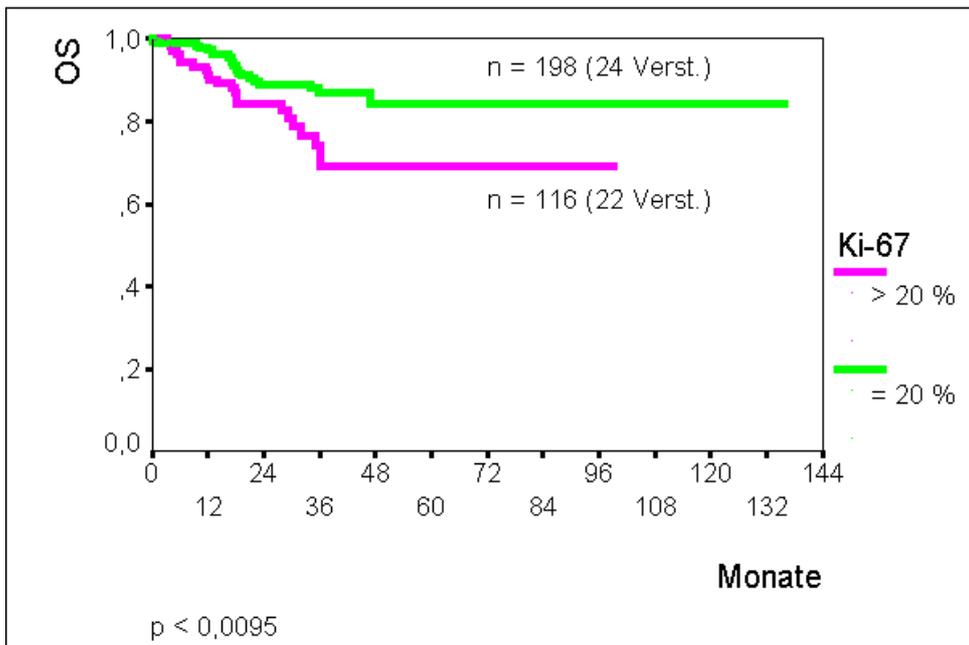


Abbildung 23 : Vergleich der Wachstumsfraktion mittels Ki-67 bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.3.7. Menopausenstatus

Hinsichtlich des **Menopausenstatus** werden gemäß internationaler Richtlinien Frauen, die bei Erstdiagnose der Erkrankung jünger als 50 Jahre sind als prämenopausal und Frauen nach dem 50. Lebensjahr als postmenopausal eingestuft. Dementsprechend befinden sich in unserem Kollektiv 26% ($n = 83$) der Frauen im prämenopausalen und 74% ($n = 231$) der Frauen im postmenopausalen Status.

Die dargestellten Überlebenskurven demonstrieren, daß prämenopausale Frauen mit Mammakarzinomen kürzere rezidivfreie Intervalle und kürzere Gesamtüberlebenszeiten aufweisen als postmenopausale Erkrankte ($p < 0,040$ vs. $p < 0,091$) (**Abbildung 24** und **Abbildung 25**).

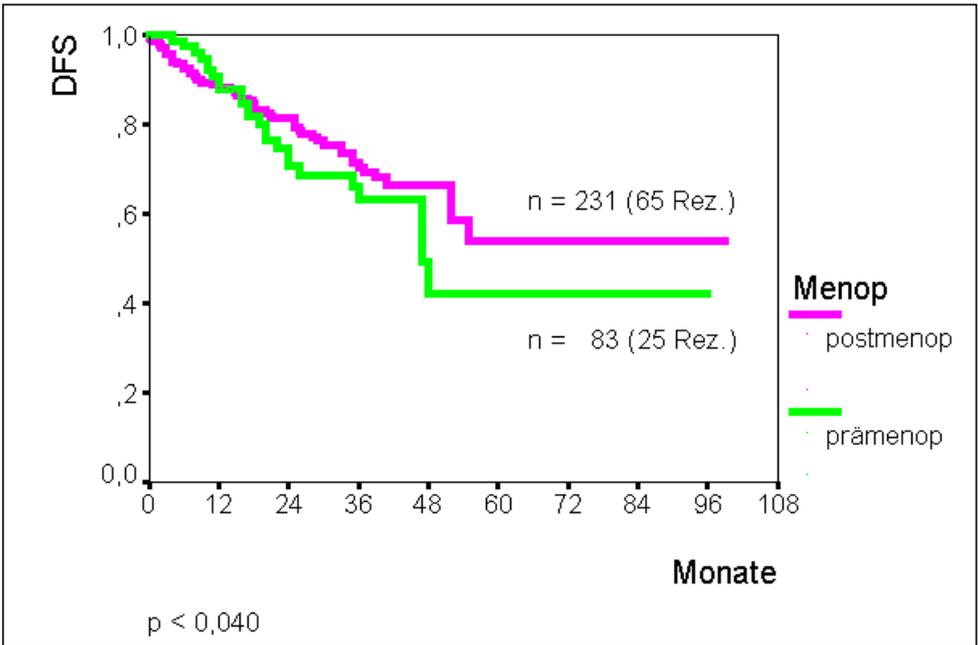


Abbildung 24 : Vergleich des Menopausenstatus bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

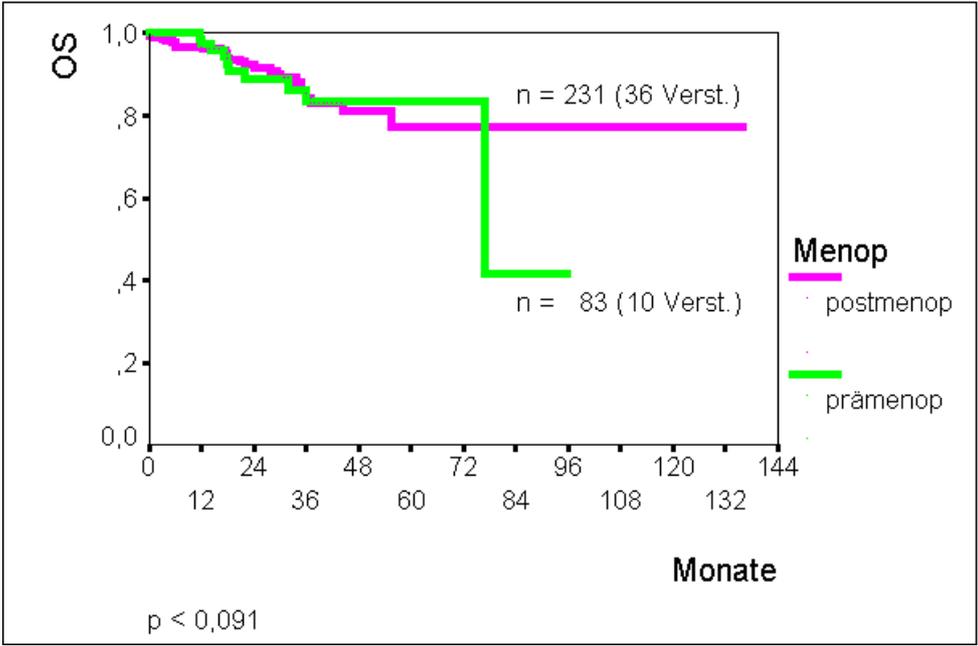


Abbildung 25 : Vergleich des Menopausenstatus bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.3.7. Hormonrezeptorstatus

Die quantitativ immunhistochemische Bestimmung des **Hormonrezeptorstatus** ergibt, daß 65 % (n = 203) der untersuchten Mammakarzinome sowohl Östrogenrezeptoren (ER) als auch gleichzeitig Progesteronrezeptoren (PR) exprimieren. Hingegen kann bei 22 % (n = 70) der Karzinome keine gleichzeitige Positivität für Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden. In 8 % (n = 26) der Fälle sind bei Frauen mit negativem Progesteronrezeptorstatus positive Östrogenrezeptoren und in 5 % (n = 15) bei negativem Östrogenrezeptorstatus positive Progesteronrezeptoren nachzuweisen.

Innerhalb des Gesamtkollektivs lassen sich drei Risikogruppen voneinander unterscheiden, die nach einem cut-off Wert mittels ROC-Analyse (s. Kapitel 2.4.) festgelegt werden können. Die prognostisch günstige Gruppe weist > 50 % Östrogenrezeptoren (n = 164), die mittlere Gruppe weist 1-50 % Östrogenrezeptoren (n = 65) und die ungünstige Gruppe mit 0 % keine Östrogenrezeptoren (n = 85) auf. 19 % der Patientinnen mit hoch positivem ER-Status (> 50 %), 29 % mit mittlerem ER-Status (1-50 %) und schließlich 47 % der Patientinnen mit fehlendem ER (0 %) erlitten ein Rezidiv (p < 0,0000) (**Abbildung 26**).

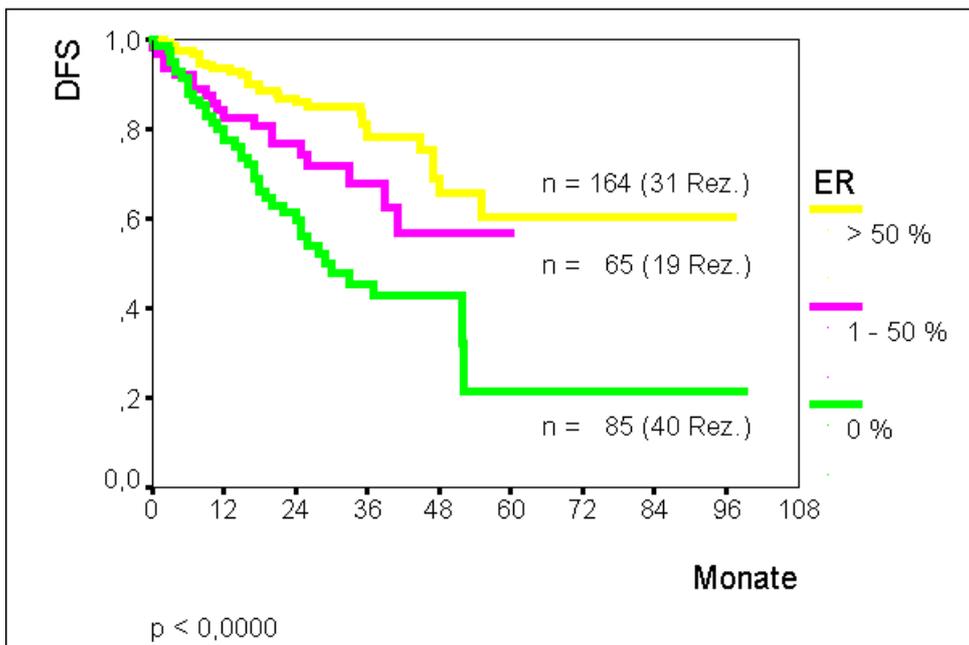


Abbildung 26 :Darstellung des Östrogenrezeptorstatus (ER) bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

Die Darstellung des Östrogenrezeptorstatus für das Gesamtüberleben ergibt ebenfalls eine prognostisch wichtige Relevanz ($p < 0,0000$) (**Abbildung 27**).

Bei einem Nachweis von $> 50\%$ Östrogenrezeptoren leben die Patientinnen entscheidend länger als bei niedrigem oder sogar fehlendem Östrogenrezeptornachweis (8 % vs. 14 % vs. 28 %).

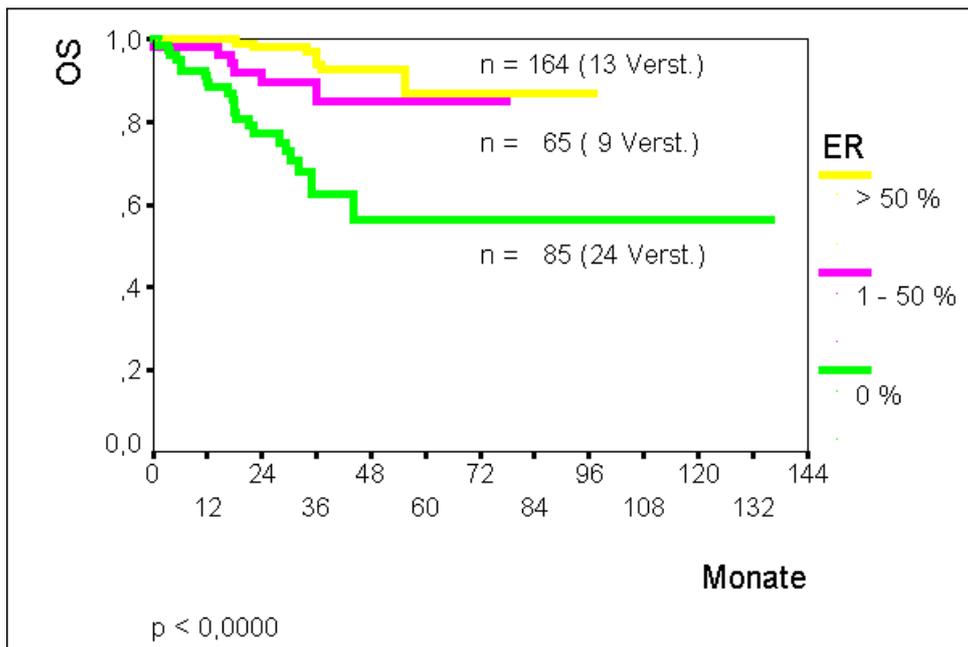


Abbildung 27 : Darstellung des Östrogenrezeptorstatus (ER) bei 314 Mammakarzinomen für das OS

Für den Progesteronrezeptor (PR) verwenden wir die gleiche cut-off Berechnung mittels ROC-Analyse, so daß auch hier eine Differenzierung in drei Risikokollektive möglich ist. 20 % der Patientinnen mit hoch positivem PR-Status (> 50 %), 28 % mit mittlerem PR-Status (1-50 %) und schließlich 41 % der Patientinnen mit fehlendem PR (0 %) erlitten ein Rezidiv ($p < 0,0009$) (**Abbildung 28**).

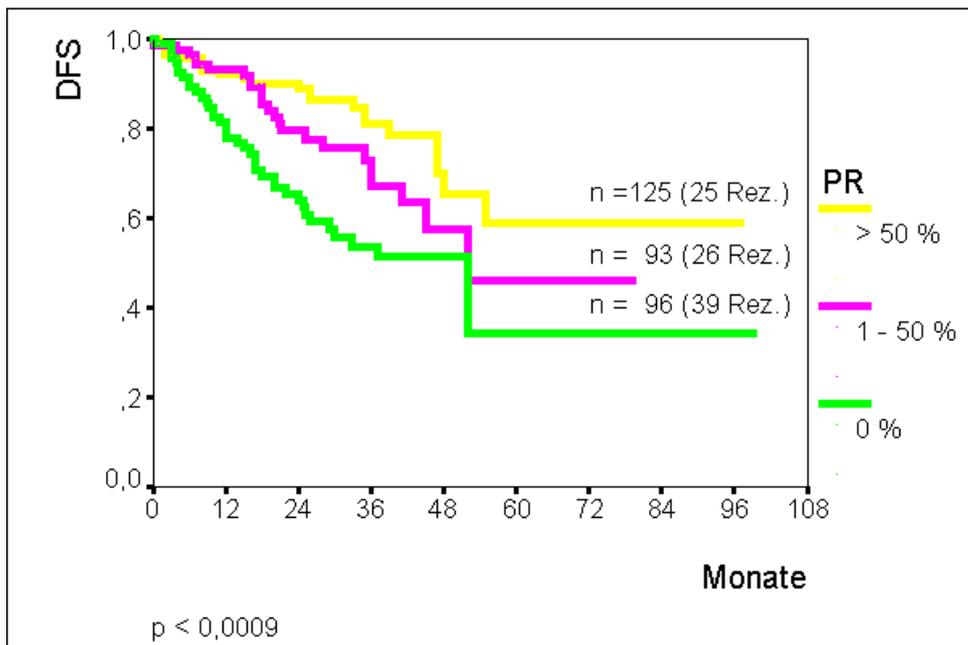


Abbildung 28 : Darstellung des Progesteronrezeptorstatus (PR) bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

Bezüglich der Gesamtüberlebensrate lebten Patientinnen mit hoch positivem PR-Status signifikant länger als Patientinnen mit Mammakarzinomen ohne Nachweis desselben (8 % vs. 13 % vs. 25 %, $p < 0,0000$) (**Abbildung 29**).

Zusammenfassend haben Mammakarzinom-Patientinnen mit niedrigem Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorstatus eine signifikant ungünstigere Prognose als Patientinnen mit hoch positivem Steroidrezeptorstatus. Der Steroidhormonrezeptorstatus ist ein wichtiger therapierelevanter Faktor.

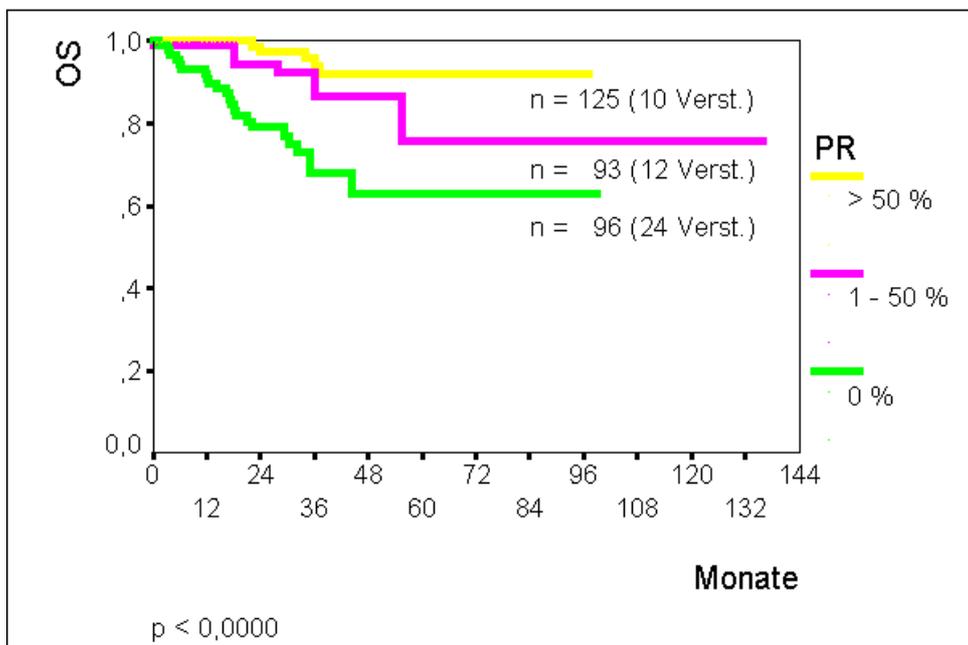


Abbildung 29 : Darstellung des Progesteronrezeptorstatus (PR) bei 314 Mammakarzinomen für das OS

III. Moderne Prognoseparameter

3.4. DNA-Gehalt und DNA-Histogramme

An einem Tupfpräparat wird das DNA-Profil eines Mammakarzinoms mittels statischer DNA-Bildzytometrie ermittelt. Dazu werden jeweils 100 morphometrisch auffällige Mammakarzinomzellen pro Tupfpräparat detektiert und deren DNA-Gehalt gemessen. Die erhobenen Meßwerte werden als Häufigkeitsverteilungen in Form von Säulen in einem Histogramm graphisch dargestellt.

3.5. Auer-Klassifikation

DNA-Histogramme vermessenener Mammakarzinome können gemäß der *DNA-Histogrammeinteilung nach Auer*⁶⁸ in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Die nach *Auer* benannte Klassifikation beruht auf DNA-Messungen ausgewählter Tumorzellen, die nach visuellen Kriterien in vier prognostisch unterschiedliche Gruppen (Auer I-IV) unterteilt werden.

Insgesamt sind 3 % (n = 10) der Patientinnen der Auer I-Gruppe, 11 % (n = 35) der Auer II-Gruppe, 22 % (n = 69) der Auer III-Gruppe und schließlich 64 % (n = 200) der Auer IV-Gruppe zuzuordnen (**Tabelle 9**).

Tabelle 9 : Verteilung der Auer-Gruppen (Auer I-IV) auf 314 Mammakarzinome

Auer-Gruppen	Anzahl in %	Anzahl in n
Auer I	3 %	n = 10
Auer II	11 %	n = 35
Auer III	22 %	n = 69
Auer IV	64 %	n = 200

Basierend auf dem Einteilungsprinzip *nach Auer* haben wir abhängig von den definierten vier Auer-Gruppen Überlebenskurven für das DFS und OS erstellt.

Die erstellten Kaplan-Meier-Kurven zeigen keine statistischen Signifikanzen bezüglich des DFS und OS. Ein Rezidiv erlitten etwa 30 % der Patientinnen der Auer I-Gruppe, 26 % der Auer II-Gruppe, 13 % der Auer III-Gruppe und 35 % der Auer IV-Gruppe ($p < 0,019$) (**Abbildung 30**).

Bei scheinbar signifikanten p-Werten zeigen die Kurvenverläufe einzelner Auer-Gruppen keine statistischen Unterschiede und verlaufen nicht auseinander. Aufgrund der nicht zuletzt ungleich großen Patientenzahl einer Auer-Gruppe läßt sich keine Prognoseabschätzung formulieren.

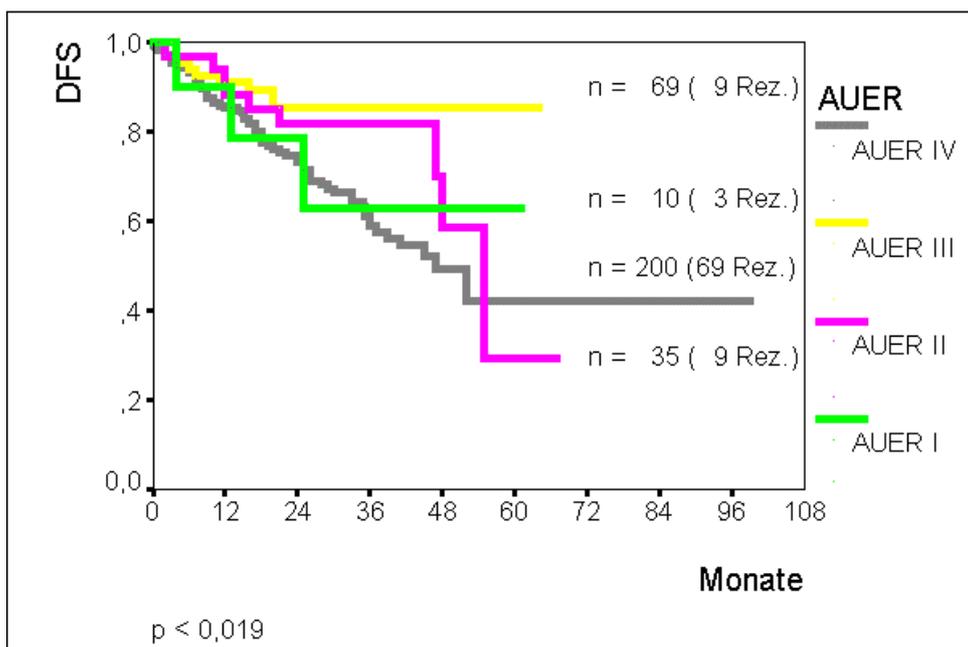


Abbildung 30 : Vergleich der Auer-Gruppen bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

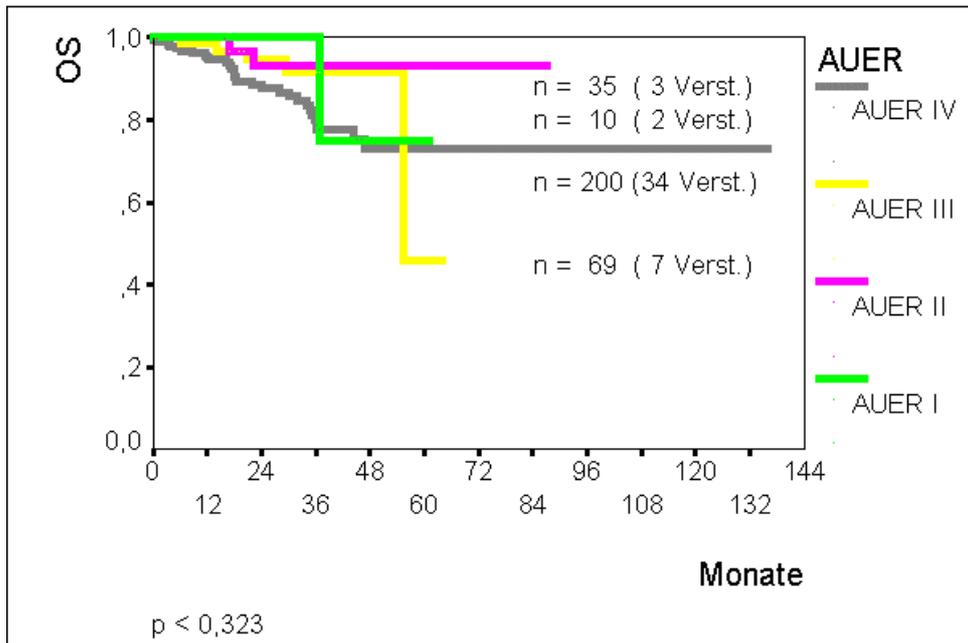


Abbildung 31 : Vergleich der Auer-Gruppen bei 314 Mammakarzinomen für das OS

Insgesamt verstorben sind 20 % der Patientinnen der Auer I-Gruppe, 9 % der Auer II-Gruppe, 10 % der Auer III-Gruppe und 17 % der Auer IV-Gruppe ($p < 0,323$) (**Abbildung 31**).

Auch eine Unterteilung in zwei prognostische Untergruppen als Auer I / II (low-risk) und Auer III / IV (high-risk) erbringt keine Signifikanzen bezüglich des DFS und OS (**Abbildung 32** und **Abbildung 33**).

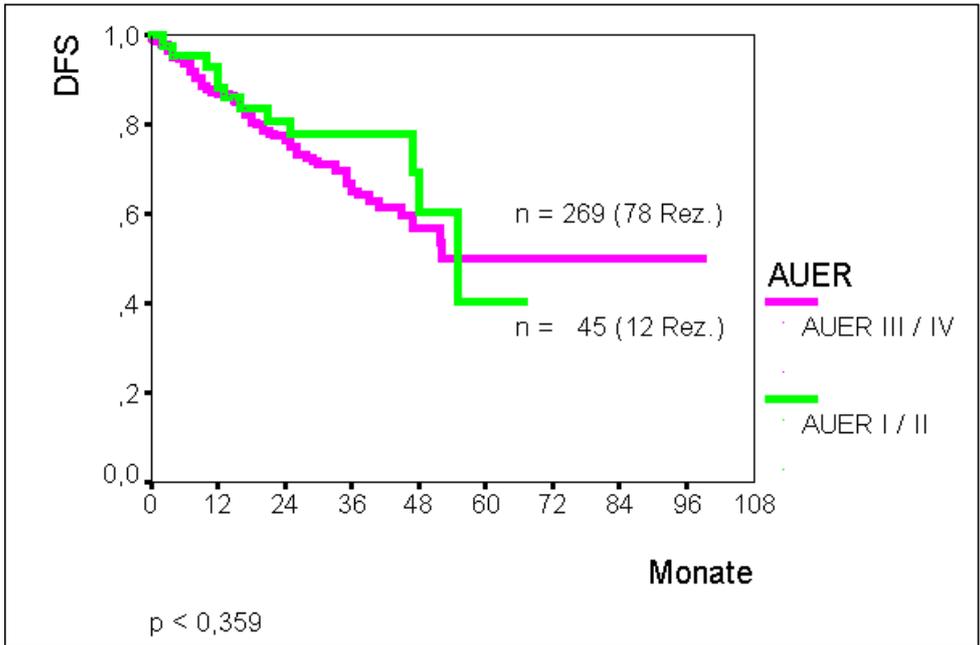


Abbildung 32 :Darstellung nach Aufteilung der Auer-Gruppen bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

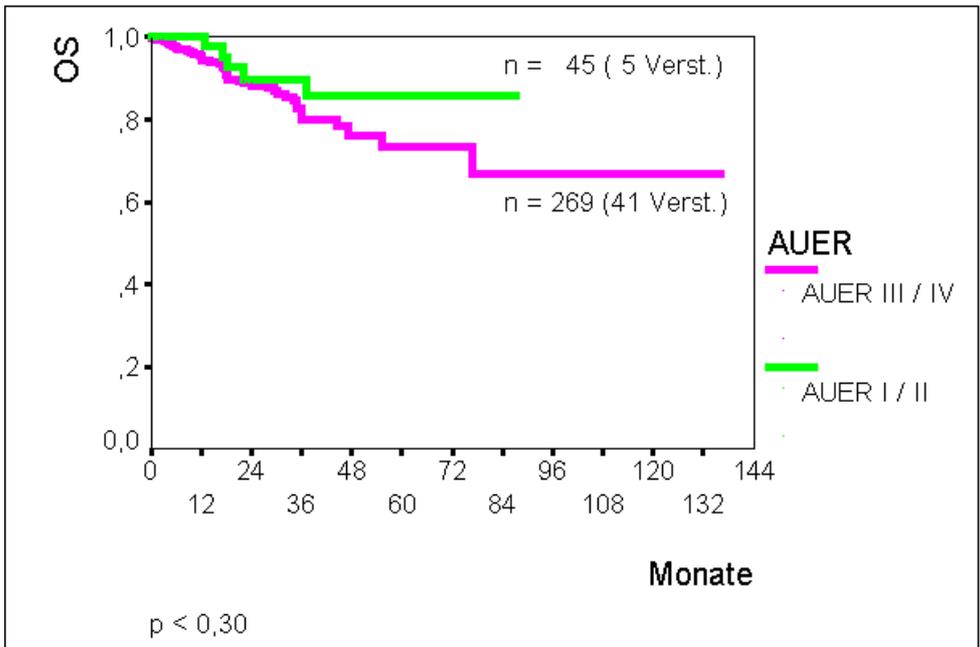


Abbildung 33 :Darstellung nach Aufteilung der Auer-Gruppen bei 314 Mammakarzinomen für das OS

Gemäß **Tabelle 9** werden Mammakarzinome mit günstigen Malignitätskriterien und guter Prognose als low-risk, hingegen schnell wachsende Mammakarzinome mit aggressivem Charakter als high-risk Karzinome bezeichnet.

Teilt man die Auer-Gruppen in Risikokollektive ein, so befinden sich lediglich 14 % der Patientinnen (n = 45) in einer low-risk (Auer I und II) und 86 % der Patientinnen (n = 269) in einer high-risk Situation (Auer III und IV). Da es sich bei dem uns vorliegenden Patientenkollektiv um eine Vielzahl heterogen gemischter Mammakarzinome handelt, wird anhand der prozentualen Verteilung der Mammakarzinome nach der Auer-Klassifikation deutlich, daß die Mehrzahl der Mammakarzinome (86 %) undefiniert bleibt.

Betrachtet man den klinischen Krankheitsverlauf der Erkrankten zeigt sich, daß etwa 71 % (n = 224) der Patientinnen tumorfrei leben. Hier ergibt sich eine große Diskrepanz zwischen der Prognoseabschätzung nach der Auer-Klassifikation und dem tatsächlich klinischen Verlauf der Tumorerkrankung. Hier ist die Abschätzung risikoadaptierter Subkollektive bezüglich ihrer Prognose unbedingt notwendig, um eine einheitliche Untergliederung insbesondere im großen Pool unklassifizierbarer Mammakarzinome zu ermöglichen.

Allein anhand der *Klassifikation nach Auer* scheint dies *nicht* möglich.

Daher wird im Hauptteil dieser Arbeit die Bedeutung der DNA-Zytometrie als neu etablierter Prognoseparameter zur Risikoabschätzung beim Mammakarzinom überprüft. Zur einheitlichen Klassifizierung verschiedener Mammakarzinome wird zunächst eine Differenzierung von low-risk und high-risk Kollektiven vorgenommen.

3.6. Differenzierung von low-risk und high-risk Konstellationen

Das Mammakarzinom ist in biologischer und klinischer Hinsicht eine sehr heterogene Erkrankung. Die Problematik der weitreichenden Heterogenität veranlaßte zu intensiven Überlegungen, inwieweit eine präzisere Einteilung der Patientinnen in risikoadaptierte Subkollektive möglich ist. Anhand definierter Subgruppierungen könnte sich eine prospektive Risikoeinschätzung für die individuelle Patientin voraussagen lassen.

Da die Auer-Klassifikation eine nur sehr unzureichende Einteilung der Patientinnen in prognostische Risikogruppen zuläßt, entwickelten wir die mittels DNA-Zytometrie gemessene Aneuploidie als einen neuen modernen Prognoseparameter. Den Aneuploidiegrad (Zellen $> 5c$ und $> 9c$) der Mammakarzinome verglichen wir untereinander.

Anhand eines statistisch berechneten Grenzwertes (cut-off) für aneuploide ($> 5c$) und hochaneuploide ($> 9c$) Zellen lassen sich enger definierte Risikogruppen beim Mammakarzinom definieren.

3.7. Statistische Analysen zur Grenzwertfestlegung (cut-off) des Aneuploidiegrades

Zur Definierung des optimalen cut-off Wertes für den Aneuploidiegrad beim Mammakarzinom wurde folgende statistische Analyse verwendet : Nach dem Prinzip einer **ROC-Analyse** („Receiver Operating Characteristic“) wird für die **Sensitivität und Spezifität** aneuploider ($> 5c$) bzw. hochaneuploider ($> 9c$) Zellen ein sog. cut-off Wert berechnet. Bei möglichst geringem Sensitivitätsverlust wird der cut-off Bereich innerhalb des statistischen Feldes so gewählt, daß sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der DNA-Analysemessungen am größten ist. Durch Variierung der errechneten cut-off's wird anhand der erstellten Kaplan-Meier-Kurven ein optimaler Schwellenwert jeweils für die aneuploiden Zellen $> 5c$ und die hochaneuploiden Zellen $> 9c$ gefunden, der mit den p-Werten aus dem log-rank Test in Life-tables verifiziert werden konnte.

Wir verwendeten die cut-off Bestimmung nach dieser statistischen Methode für die prozentuale Grenzwertfestlegung beim Hormonrezeptorstatus sowie bei der Wachstumsfraktion Ki-67.

3.7.1. Cut-off für aneuploide Zellen > 5c

Auf der Grundlage der erläuterten statistischen Berechnungen wird der cut-off-Wert für aneuploide Zellen (> 5c) bei **10 Zellen** festgelegt, da durch Verschieben des Grenzwertes bei 10 Zellen > 5c die Sensibilität und Spezifität der Analyse am größten ist.

Dabei können nach Erstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad zwei Risikogruppen unterschieden werden : zum einen eine low-risk Gruppe von Patientinnen, in deren DNA-Profil ≤ 10 Zellen aneuploide Zellen > 5c nachzuweisen sind und zum anderen eine high-risk Gruppe von Patientinnen, deren DNA-Profil > 10 Zellen aneuploide Zellen zeigen.

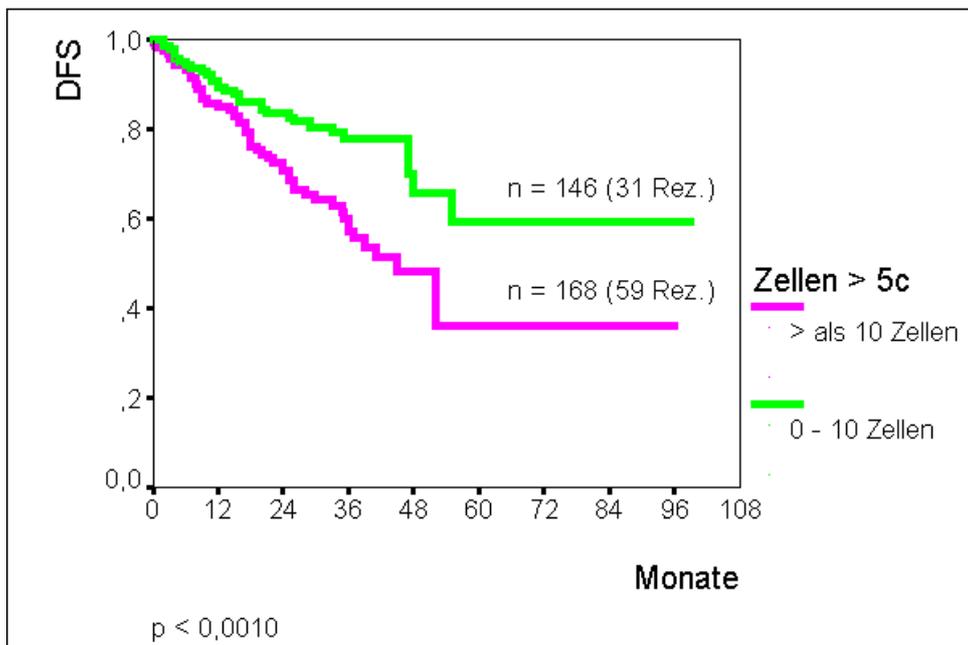


Abbildung 34 : Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) für aneuploide Zellen > 5c für das rezidivfreie Intervall (DFS) bei 314 Mammakarzinomen

Die Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Intervall (DFS) zeigt eine deutliche Unterteilung in zwei unterschiedliche Patientengruppen.

Innerhalb der low-risk Gruppe (n = 146) erlitten etwa 21 % (n = 31) der Patientinnen ein Rezidiv, in der high-risk Gruppe (n = 168) hingegen 35 % (n = 59) der Patientinnen (p < 0,0010) (**Abbildung 34**).

Für das Gesamtüberleben (OS) zeigt die Überlebenskurve ein ähnliches Ergebnis. In der low-risk Gruppe (n = 146) sind etwa 12 % der Frauen (n = 18) verstorben und in der high-risk Gruppe (n = 168) 17 % (n = 28) der Frauen ($p < 0,013$) (**Abbildung 35**).

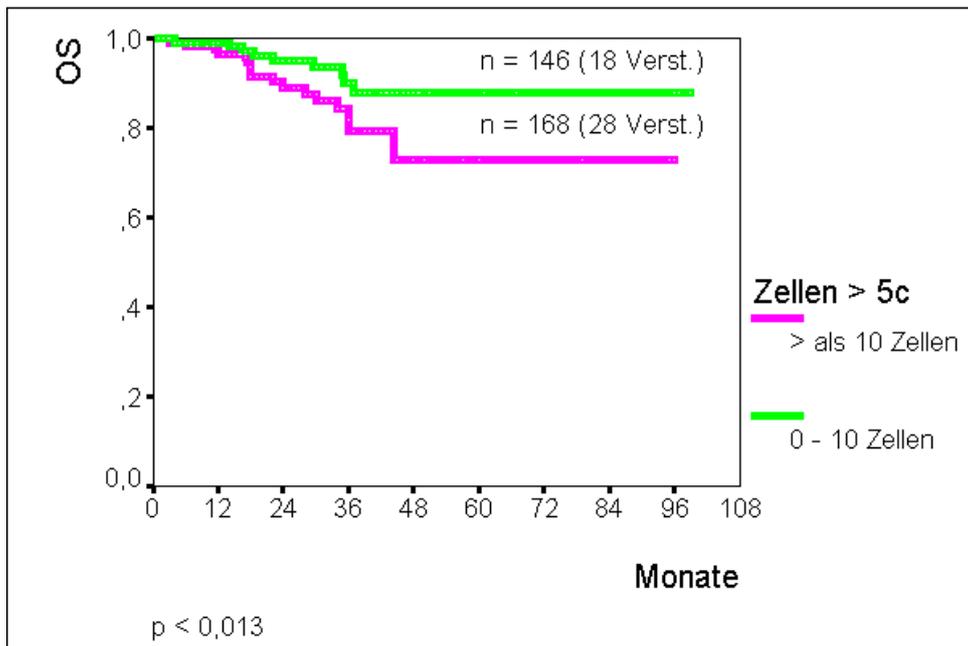


Abbildung 35 : Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) für aneuploide Zellen > 5c für das Gesamtüberleben (OS) bei 314 Mammakarzinomen

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen deutlich, daß sich bei einem **cut-off Wert von 10 Zellen > 5c** ein signifikanter Prognosesprung ($p < 0,0010$ vs. $p < 0,013$) für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben ergibt.

3.7.2. Cut-off für hochaneuploide Zellen > 9c

Der cut-off Wert für hochaneuploiden Zellen (> 9c) wird nach statistischen Berechnungen bei **1 Zelle** festgelegt. Auch für hochaneuploiden Zellen stellen sich Risikogruppen dar, wobei hier anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurven eine prognostische Differenzierung abhängig von der Anzahl hochaneuploider Zellen möglich ist. Eine low-risk Gruppe von Patientinnen mit ≤ 1 Zelle hochaneuploide Zellen > 9c in der DNA-Analyse unterscheidet sich signifikant von einer high-risk Gruppe mit > 1 Zelle hochaneuploide Zellen. Diese Signifikanz ergibt sich sowohl für das rezidivfreie Intervall als auch für die Gesamtüberlebenszeit ($p < 0,0015$ vs. $p < 0,052$).

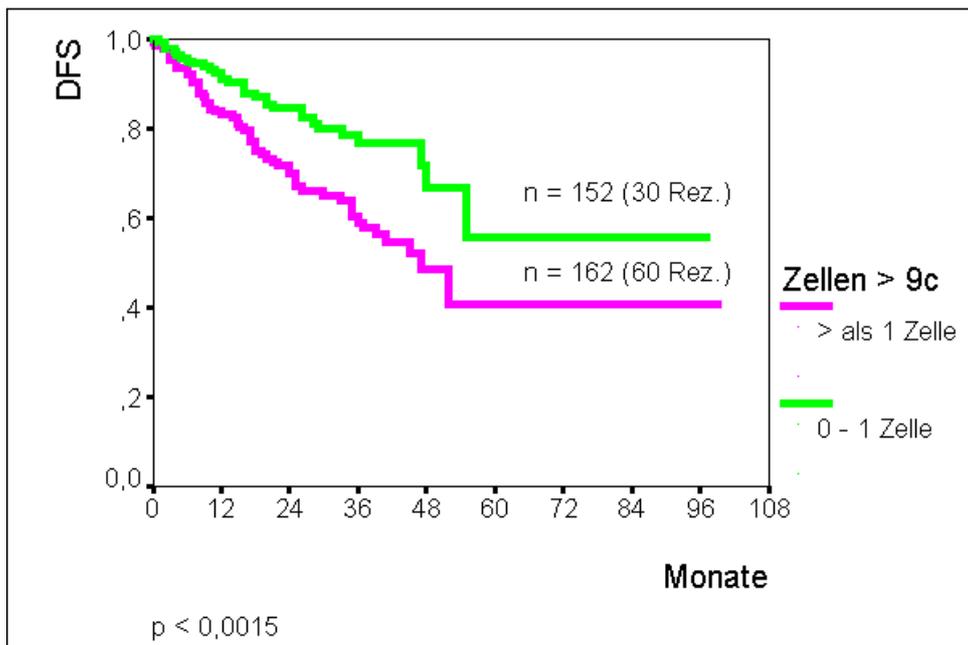


Abbildung 36 : Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) für hochaneuploide Zellen > 9c für das rezidivfreie Intervall (DFS) bei 314 Mammakarzinomen

In der prognostisch günstigeren low-risk Gruppe ($n = 152$) sind 20 % ($n = 30$) der Patientinnen an einem Rezidiv erkrankt, in der high-risk Gruppe ($n = 162$) etwa 37 % ($n = 60$) der Patientinnen ($p < 0,0015$) (**Abbildung 36**).

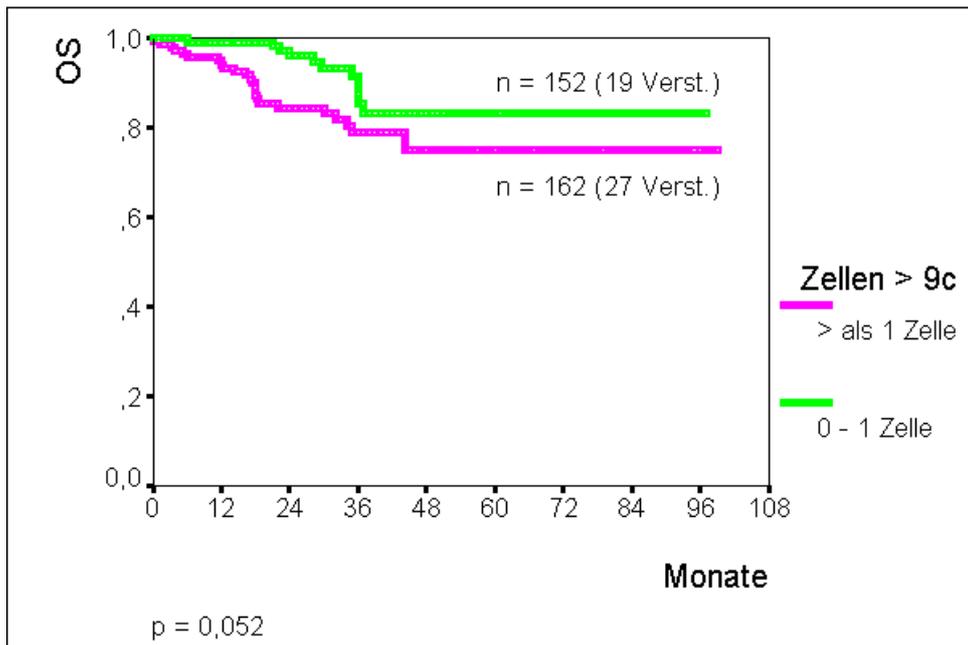


Abbildung 37 : Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) für hochaneuploide Zellen > 9c für das Gesamtüberleben (OS) bei 314 Mammakarzinomen

Abhängig von der Anzahl hochaneuploider Zellen > 9c sind in der low-risk Gruppe etwa 13 % Patientinnen (n = 19); in der high-risk Gruppe etwa 17 % (n = 27) der Patientinnen verstorben ($p < 0,052$) (**Abbildung 37**).

Die Kaplan-Meier-Kurven stellen deutlich dar, daß sich bei einem **cut-off Wert von 1 Zelle > 9c** ein ebenfalls signifikanter Prognosesprung ($p < 0,0015$ vs. $p < 0,052$) für das rezidivfreie Intervall (DFS) und das Gesamtüberleben (OS) ergibt.

Die statistisch ermittelten Grenzwerte für aneuploide ($> 5c$) und hochaneuploide Zellen ($> 9c$) ermöglichen eine präzisere Untergliederung in Risikokollektive. Im Folgenden wird die etablierte *Auer-Klassifikation* anhand der Aneuploidierate überprüft und in ihrem Aussagewert reevaluiert.

3.8. Korrelation der Auer-Klassifikation zur Ploidie

Zunächst zeigt die nachstehende **Tabelle 10** die Verteilung der aneuploiden (> 5c) und hochaneuploiden (> 9c) Zellen auf die vier Auer-Gruppen.

Tabelle 10 : Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen innerhalb low-risk bzw. high-risk Gruppen in Abhängigkeit von Auer-Klassen an 314 Mammakarzinomen

Auer – Gruppen	5c (0-10 Zellen)	5c (> 10 Zellen)	9c (0-1 Zelle)	9c (> 1 Zelle)
	low-risk	high-risk	low-risk	high-risk
Auer I (n = 10)	3 % (10)	--	3 % (9)	0,3 % (1)
Auer II (n = 35)	11 % (35)	--	10 % (32)	1 % (3)
Auer III (n = 69)	22 % (69)	--	21 % (66)	1 % (3)
Auer IV (n = 200)	10 % (32)	54 % (168)	14 % (45)	50 % (155)

Die grobe Verteilung verhält sich wie folgt : Bezüglich aneuploider Zellen > 5c gehören 46 % (n = 146) der Patientinnen dem low-risk Kollektiv und etwa 54 % (n = 168) dem high-risk-Kollektiv an. In der Gruppe hochaneuploider Zellen > 9c sind 48 % (n = 152) der low-risk Gruppe und 52 % (n = 162) der Patientinnen der high-risk Gruppe zuzuordnen.

Es wird deutlich, daß im Vergleich zu Patientinnen der Auer-Gruppen I-III, Patientinnen der Auer-Gruppe IV bezüglich ihrer Anzahl aneuploider und zugleich hochaneuploider Zellen als Hochrisikokollektiv angesehen werden müssen. Die Auer-Gruppen I-III stellen im Hinblick auf ihren Aneuploidiegrad keine Hochrisikokollektive dar.

Die Verteilung aneuploider Zellen > 5c zeigt, daß 9 % (n = 29) der Patientinnen keine aneuploiden Zellen, hingegen 37 % (n = 117) der Patientinnen 1-10 Zellen > 5c und 54 % (n = 168) mehr als 10 Zellen > 5c aufweisen. 40 % (n = 127) der Patientinnen haben keinerlei hochaneuploide Zellen, 8 % (n = 25) haben 1 Zelle > 9c und 52 % (n = 162) mehr als 1 Zelle > 9c. Innerhalb des Kollektivs haben 6 % (n = 27) der Patientinnen keinerlei aneuploide Zellen; sie weisen lediglich euploide Zellen auf.

Anhand der Auer-Gruppe IV stellen wir die prognostisch übergeordnete Bedeutung des Aneuploidiegrades im Vergleich zur Auer-Klassifikation fest (**Abbildung 38** und **Abbildung 39**). Innerhalb dieser high-risk-Gruppe kann mittels Bestimmung der Ploidie eine präzisere Risikoabschätzung an Subkollektiven erfolgen.

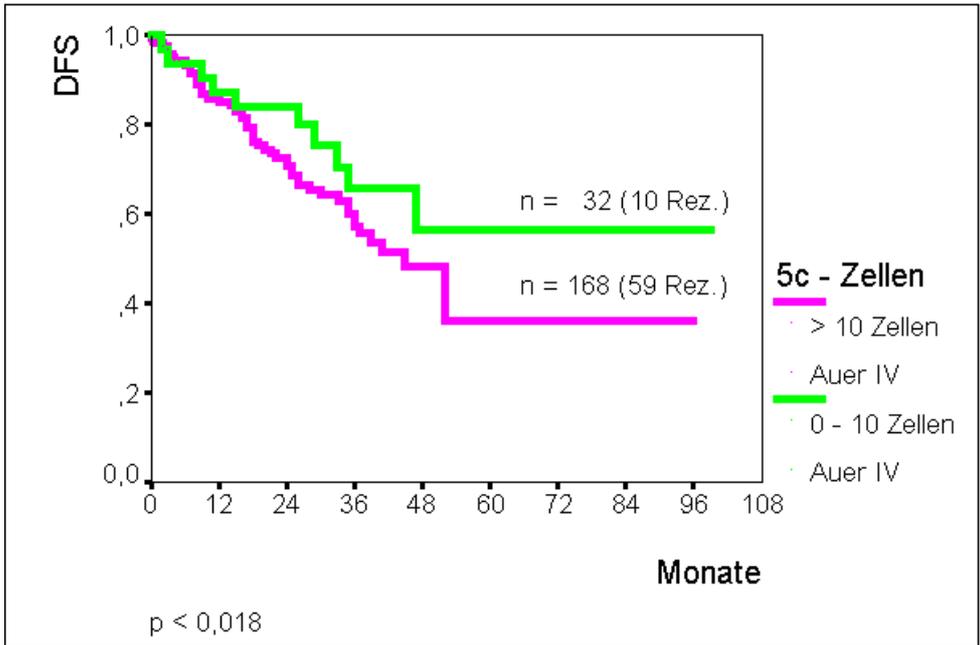


Abbildung 38 : Aneuploide Zellen (> 5c) innerhalb der Auer-Gruppe IV (n = 200)

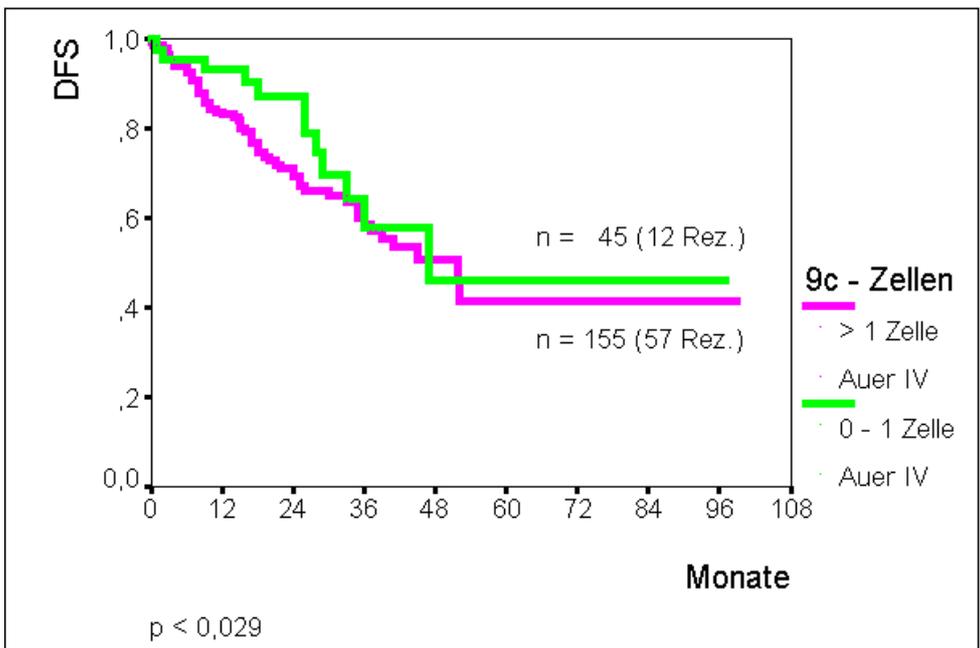


Abbildung 39 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) innerhalb der Auer-Gruppe IV (n = 200)

IV. Vergleichende Analyse zwischen klassischen und modernen Prognosefaktoren (Aneuploidiegrad) für das rezidivfreie Intervall (DFS) und Gesamtüberleben (OS)

Im Folgenden wird die Aneuploidie als zu prüfender moderner Prognoseparameter mit klassischen Prognosefaktoren systematisch verglichen und in seiner prospektiven Aussagefähigkeit überprüft. Dazu wird die Korrelation einzelner Prognoseparameter zum Ploidiegrad dargestellt, um die Möglichkeit einer präziseren Subklassifizierung der Mammakarzinome zu erarbeiten.

3.9. Korrelation klassischer Prognosefaktoren zur Aneuploidierate

3.9.1. Korrelation histologischer Tumortypen zur Ploidie

Da der Anteil invasiv duktaler Mammakarzinome mit ca. 85 % (n = 267) den häufigsten histologischen Tumortyp ausmacht, soll untersucht werden, inwieweit sich diese Mammakarzinome in ihrem Ploidiestatus unterscheiden. Die unten aufgeführte **Tabelle 11** demonstriert die mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen invasiv duktaler Mammakarzinome im Vergleich zu anderen Tumortypen, insbesondere zu den weniger aggressiven invasiv lobulären Mammakarzinomen. Bei invasiv duktalem Mammakarzinomen liegt sowohl die mediane Anzahl aneuploider Zellen mit 15 Zellen > 5c als auch der hochaneuploiden Zellen mit 2 Zellen > 9c deutlich höher als bei invasiv lobulären Mammakarzinomen. Die invasiv lobulären Karzinome weisen eine mediane Anzahl aneuploider Zellen von 2 Zellen > 5c und fehlende hochaneuploiden Zellen > 9c auf. Präkanzerosen unterscheiden sich untereinander ebenfalls in ihrem Ploidiestatus : Das CDIS hat im Gegensatz zum CLIS eine signifikant höhere mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen.

Tabelle 11 : Aneuploide und hochaneuploide Zellen bei 314 Mammakarzinomen unterschiedlicher Histologien (Median)

Histologische Tumortypen	mediane Anzahl aneuploider Zellen > 5c	mediane Anzahl hochaneuploider Zellen > 9c
invasiv duktal (n = 267)	15	2
invasiv lobulär (n = 25)	2	--
CDIS (n = 5)	13	1
CLIS (n = 3)	3	--

Bei invasiv duktalem Mammakarzinom kann mittels Ploidiestatus zwischen Karzinomen niedriger und hoher Aggressivität unterschieden werden ($p < 0,0021$ vs. $p < 0,019$) (Abbildung 40 und Abbildung 41).

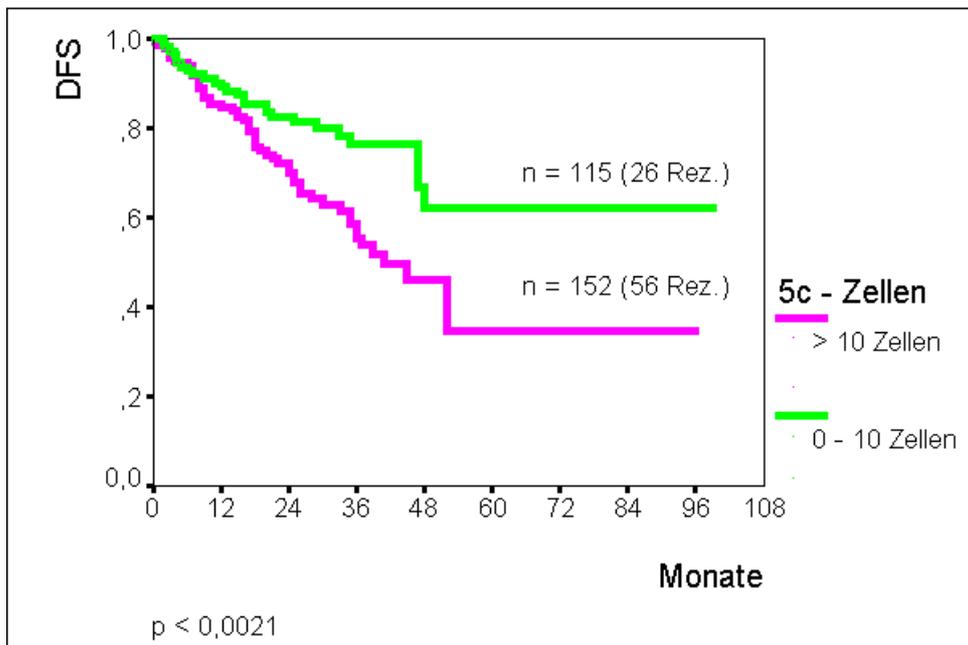


Abbildung 40 : Aneuploidiegrad (> 5c) bei 267 invasiv duktalem Mammakarzinom für das DFS

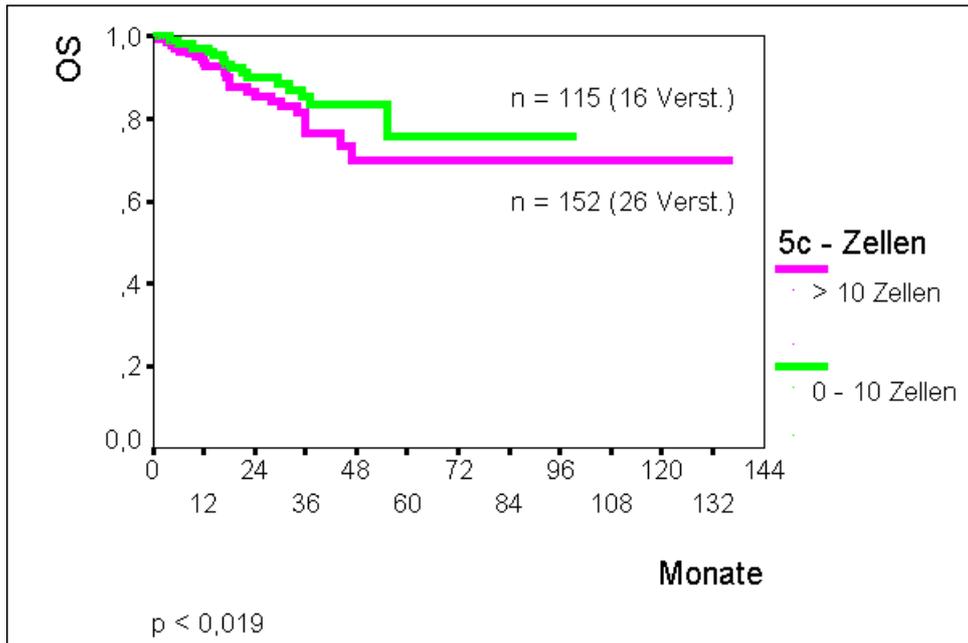


Abbildung 41 : Aneuploidiegrad (> 5c) bei 267 invasiv duktafen Mammakarzinomen für das OS

Bei invasiv duktafen Mammakarzinomen ergeben sich für hochaneuploide Zellen > 9c im DFS ($p < 0,0046$) signifikante Unterschiede (**Abbildung 42**); dieses trifft jedoch nicht im OS zu ($p < 0,56$) (**ohne Abbildung**).

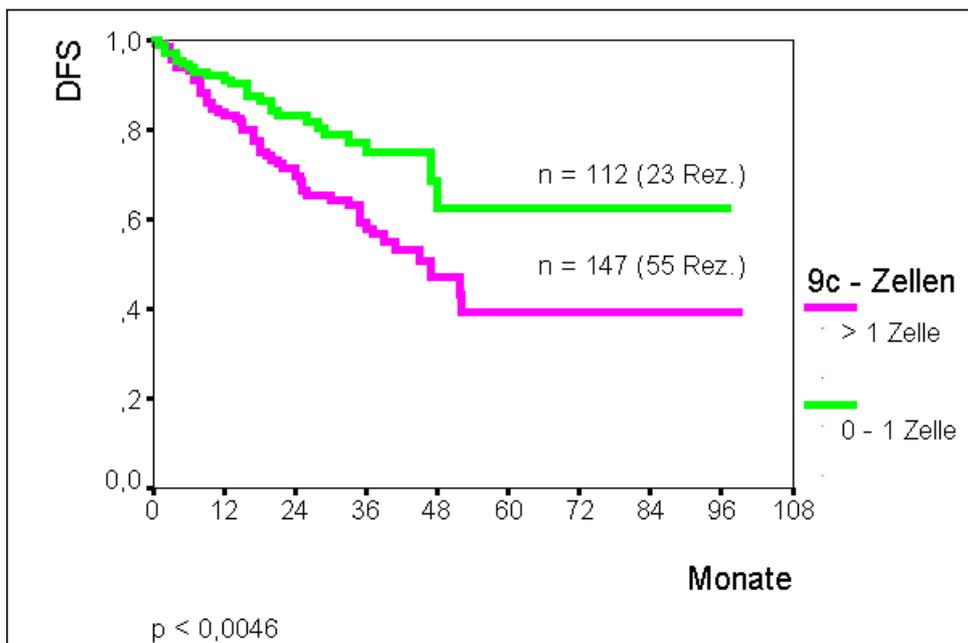


Abbildung 42 : Aneuploidiegrad (> 9c) bei 267 invasiv duktafen Mammakarzinomen für das DFS

3.9.2. Korrelation der Tumorgröße zur Ploidie

Die Tumorgröße eines Mammakarzinoms hat bei Primärdiagnose der Erkrankung prognostische Relevanz. Mithilfe des Aneuploidiegrades können auch hier Subkollektive unterschiedlicher Prognose definiert werden. Patientinnen mit einer Tumorgröße < 2 cm bzw. ≤ 5 cm (T1 bzw. T2 nach TNM-Stadium) und niedriger Aneuploidierate für 5c und 9c weisen ein entscheidend längeres DFS auf als Patientinnen mit hoher Aneuploidierate ($p < 0,0058$, $p < 0,0128$) (**Abbildung 43** und **Abbildung 45**). Bei einer Tumorgröße > 5 cm bzw. Infiltration von Haut / Thoraxwand (T3 bzw. T4 nach TNM-Stadium) stellt der Aneuploidiegrad ebenfalls einen signifikanten Prognosefaktor dar ($p < 0,0343$, $p < 0,012$) (**Abbildung 44** und **Abbildung 46**).

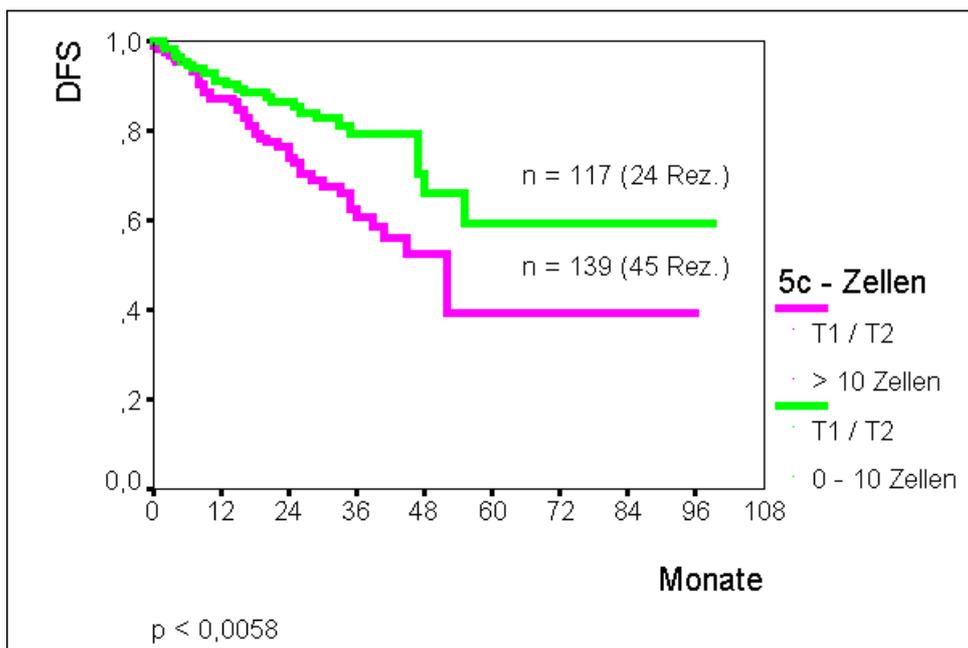


Abbildung 43: DFS in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad ($> 5c$) bei 256 Mammakarzinomen des T1-/ T2-Stadiums

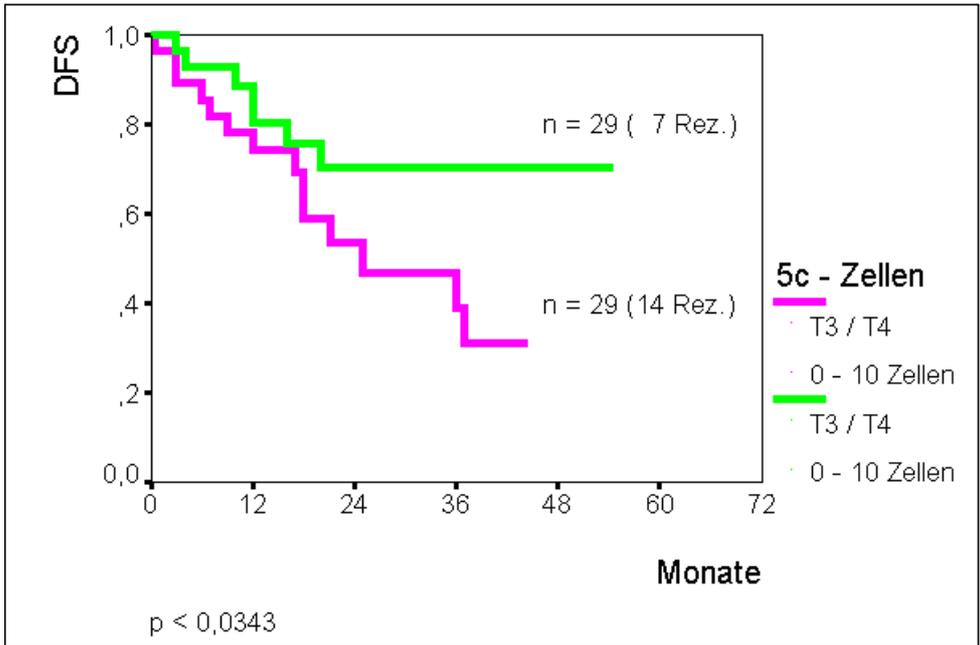


Abbildung 44 :DFS in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad (> 5c) bei 58 Mammakarzinomen des T3-/ T4-Stadiums

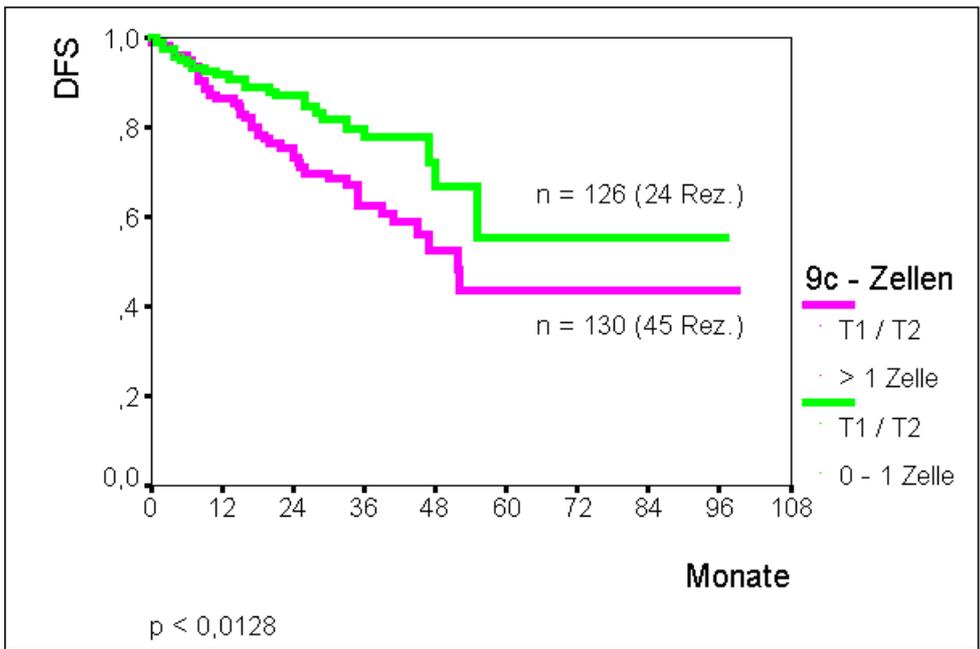


Abbildung 45 :DFS in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad (> 9c) bei 256 Mammakarzinomen des T1-/ T2-Stadiums

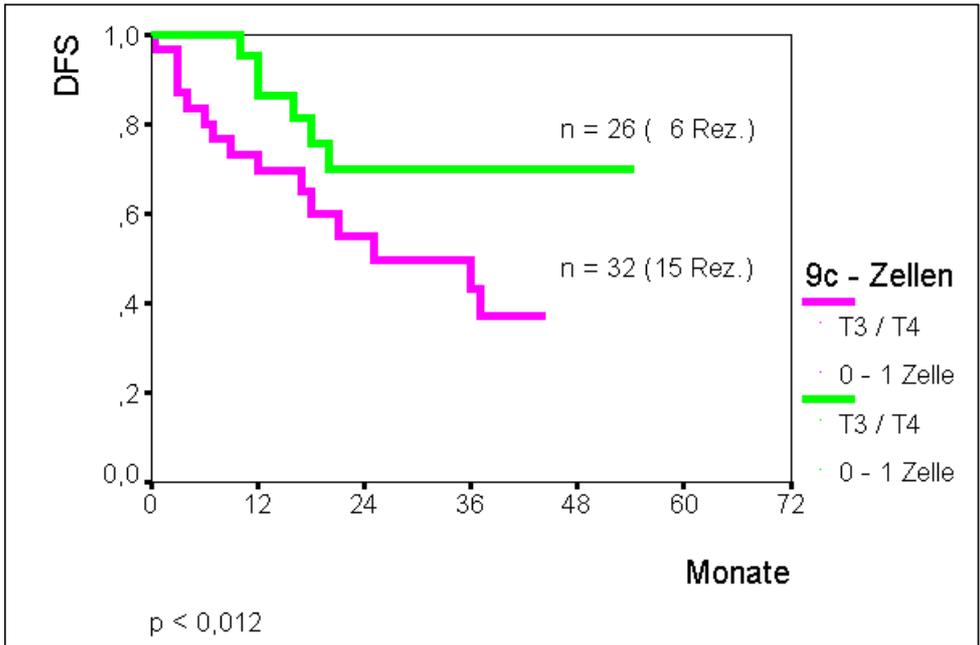


Abbildung 46: DFS in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad (> 9c) bei 58 Mammakarzinomen des T3-/ T4-Stadiums

3.9.3. Korrelation des Nodalstatus zur Ploidie

Da der Lymphknotenstatus den derzeit stärksten Prognosefaktor für das Mammakarzinom darstellt, war es von besonderer Bedeutung die Wertigkeit des Aneuploidiegrades am Lymphknotenstatus des Mammakarzinoms zu eruieren.

Hierzu gibt die **Tabelle 12** die mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen in Abhängigkeit vom Nodalstatus bei annähernd gleicher Kollektivgröße wider.

Tabelle 12 : Aneuploide und hochaneuploide Zellen bei 314 Mammakarzinomen unterschiedlichen Lymphknotenstatus (Median)

Nodalstatus n = 314	mediane Anzahl aneuploider Zellen > 5c	mediane Anzahl hochaneuploider Zellen > 9c
N 0 (n = 155)	2	1
N 1 (n = 148)	13	2
N 2 (n = 9)	29	5
N 3 (n = 2)	14	10

Nodal negative Patientinnen (low-risk Gruppe) haben bei Erstdiagnose ihrer Tumorerkrankung eine günstigere Prognose hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls und Gesamtüberleben als nodal positive Patientinnen (high-risk Gruppe). In Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad können nodal negative und nodal positive Erkrankte in prognostische Subkollektive untergliedert werden.

Innerhalb der definierten Subkollektive zeigen Patientinnen mit hoher Aneuploidierate (> 5c, > 9c) signifikant kürzere rezidivfreie Intervalle als Erkrankte mit niedriger Aneuploidierate. Im Besonderen ergibt sich, daß nodal negative Patientinnen (n = 155) mit hoher Aneuploidierate im DFS nodal positiven Patientinnen (n = 159) mit niedriger Aneuploidierate gleichzusetzen sind ($p < 0,0000$ vs. $p < 0,0000$) (**Abbildung 46** und **Abbildung 47**). Dies bedeutet, daß Frauen mit befallenen Lymphknoten und niedriger Aneuploidie eine gleichwertig schlechte Prognose zeigen wie Frauen ohne befallene Lymphknoten und gleichzeitig hoher Aneuploidie. Unsere Ergebnisse zeigen, daß der Aneuploidiegrad dem Nodalstatus hinsichtlich der Prognose eindeutig überlegen ist.

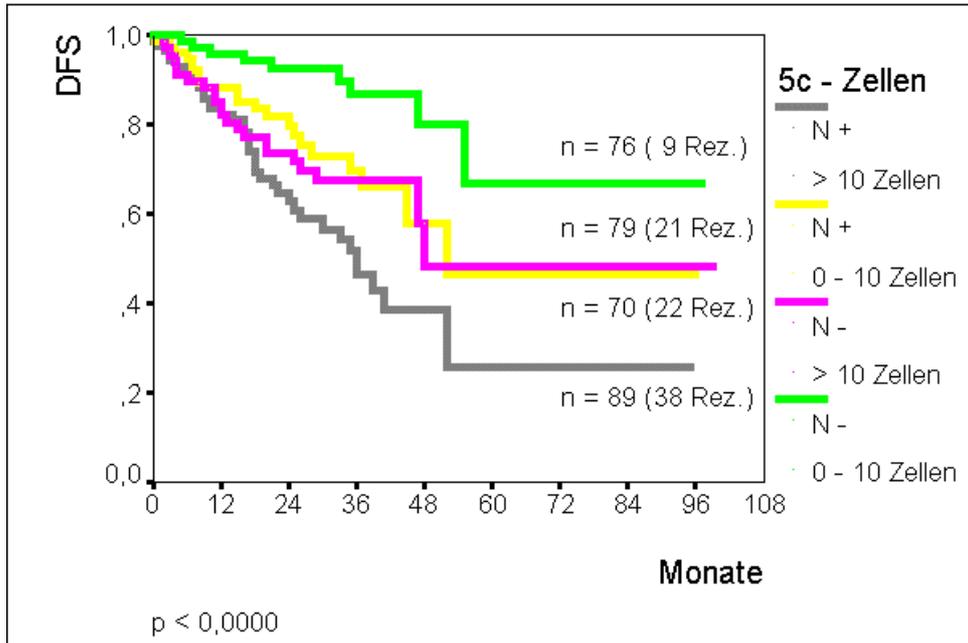


Abbildung 46 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit nodal negativen (n = 155) und nodal positiven (n = 159) Mammakarzinomen für das DFS

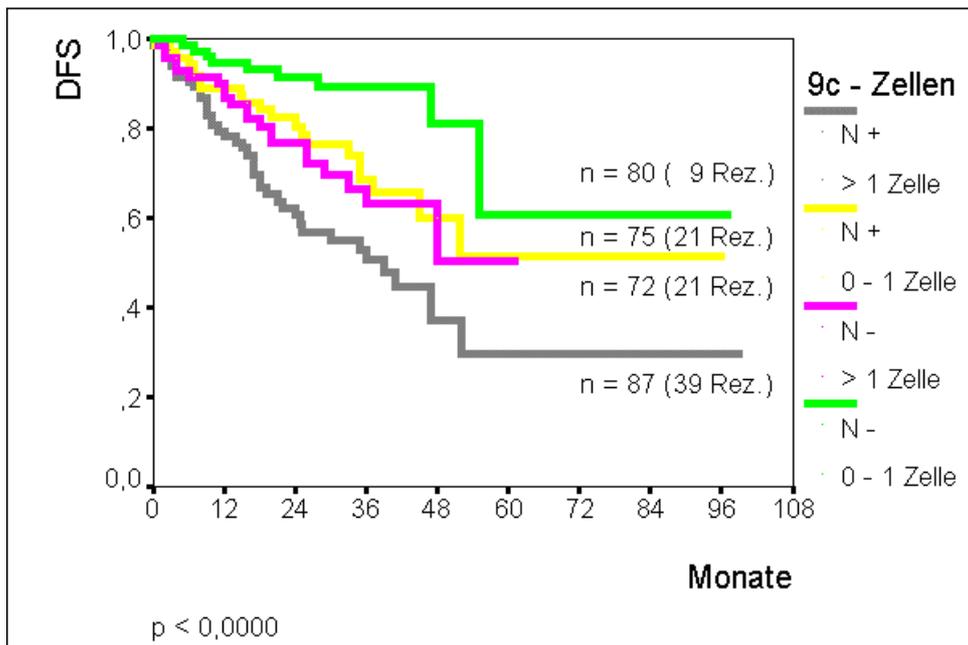


Abbildung 47 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 314 Frauen mit nodal negativen (n = 155) und nodal positiven (n = 159) Mammakarzinomen für das DFS

3.9.4. Korrelation der Metastasierung zur Ploidie

Abhängig von der Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen zeigen sich signifikante Unterschiede bei Erkrankten ohne Fernmetastasierung (M0) und Erkrankten, die bereits bei Tumorerstdiagnose eine Metastasierung aufweisen (M1) (**Abbildung 48** und **Abbildung 49**).

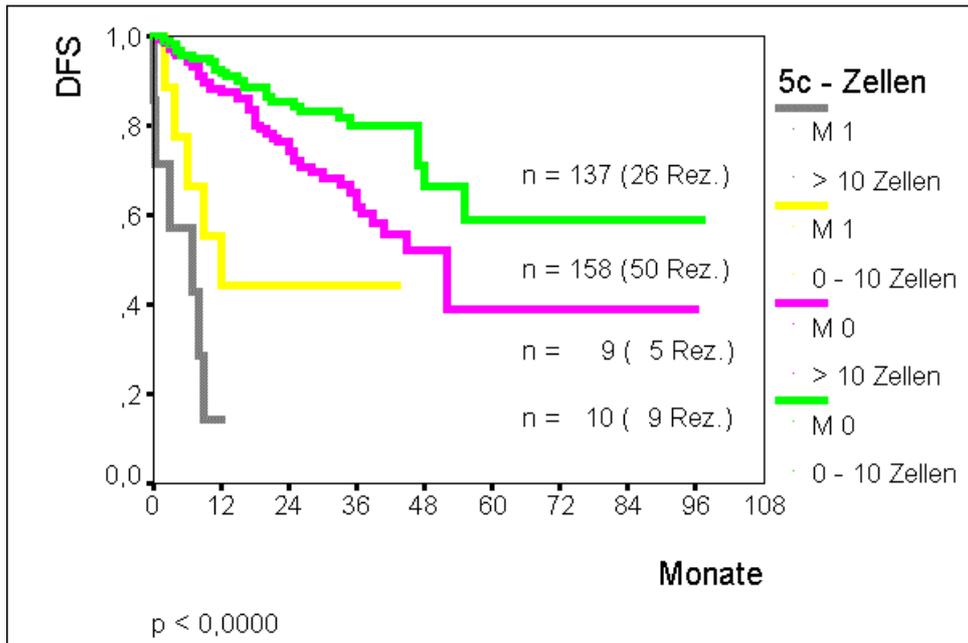


Abbildung 48 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit primär nicht metastasierten (n = 295) und metastasierten (n = 19) Mammakarzinomen für das DFS

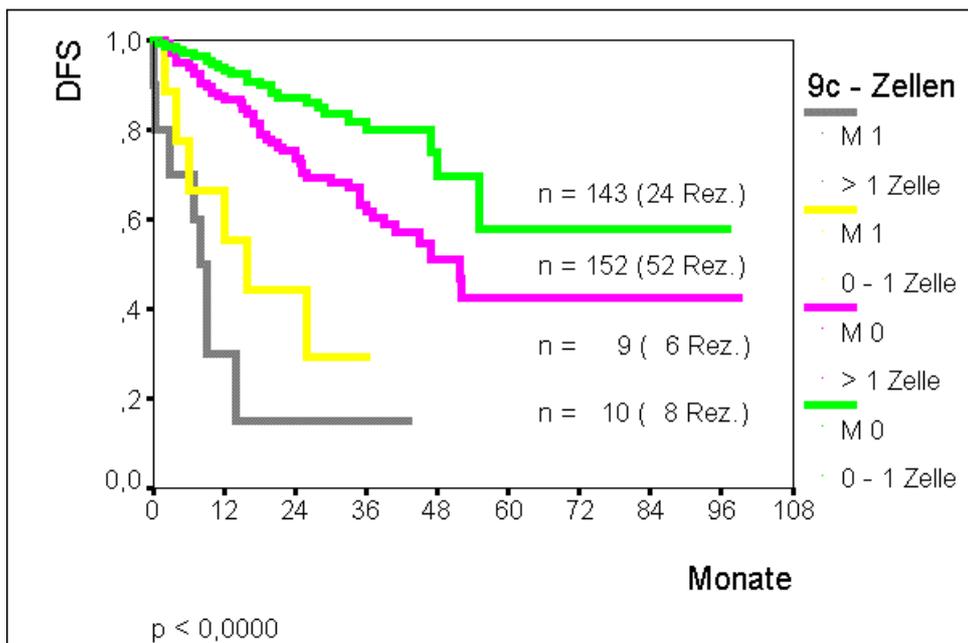


Abbildung 49 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 314 Frauen mit primär nicht metastasierten (n = 295) und metastasierten (n = 19) Mammakarzinomen für das DFS

3.9.5. Korrelation des histologischen Gradings zur Ploidie

Das histologische Grading (G) ist ein wichtiger anerkannter Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Die aufgeführte **Tabelle 13** veranschaulicht die Verteilung der medianen Anzahl aneuploider ($> 5c$) und hochaneuploider Zellen ($> 9c$) auf die histologischen Differenzierungsgrade der Mammakarzinome.

Tabelle 13 : Aneuploide ($> 5c$) und hochaneuploide Zellen ($> 9c$) bei 314 Mammakarzinomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades (Median)

Histologisches Grading n = 314	mediane Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$	mediane Anzahl hochaneuploider Zellen $> 9c$
G 1 (n = 38)	16	3
G 2 (n = 140)	18	5
G 3 (n = 111)	24	8

In der **Abbildung 50**, **Abbildung 51** und **Abbildung 52** werden abhängig von der Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen die Kurvenverläufe von G1- und G3-Karzinomen für das DFS und OS gezeigt. Die G1- und G3-Karzinome unterscheiden sich am deutlichsten in ihrem Differenzierungsgrad voneinander ($p < 0,0001$). Aufgrund der besonderen Stellung der G2-Karzinome werden diese in diesem Abschnitt gesondert besprochen.

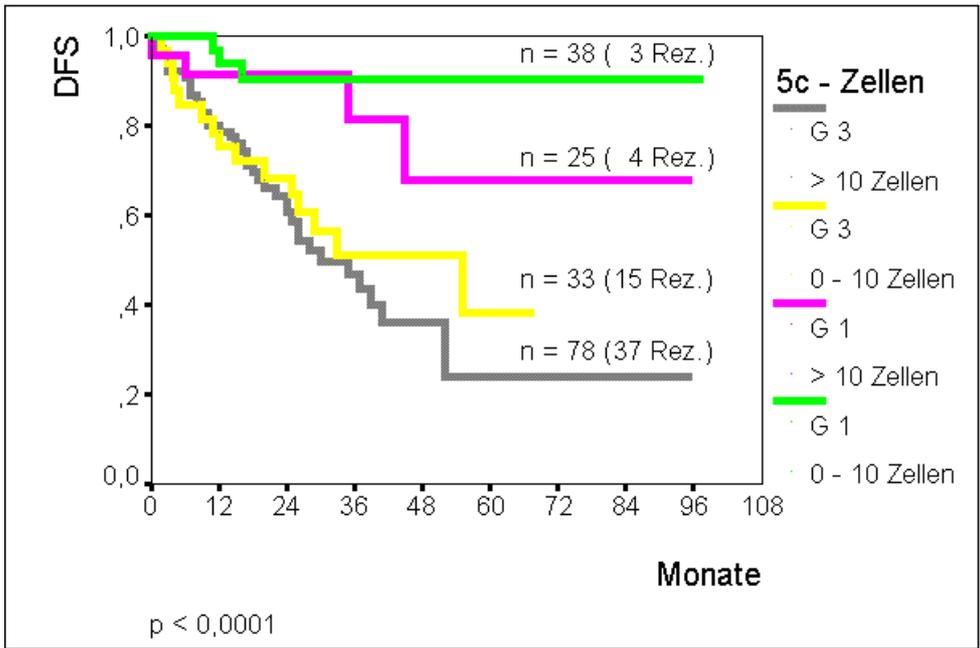


Abbildung 50 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 174 Mammakarzinomen mit G1- (n = 38) und G3-Karzinomen (n = 111) für das DFS

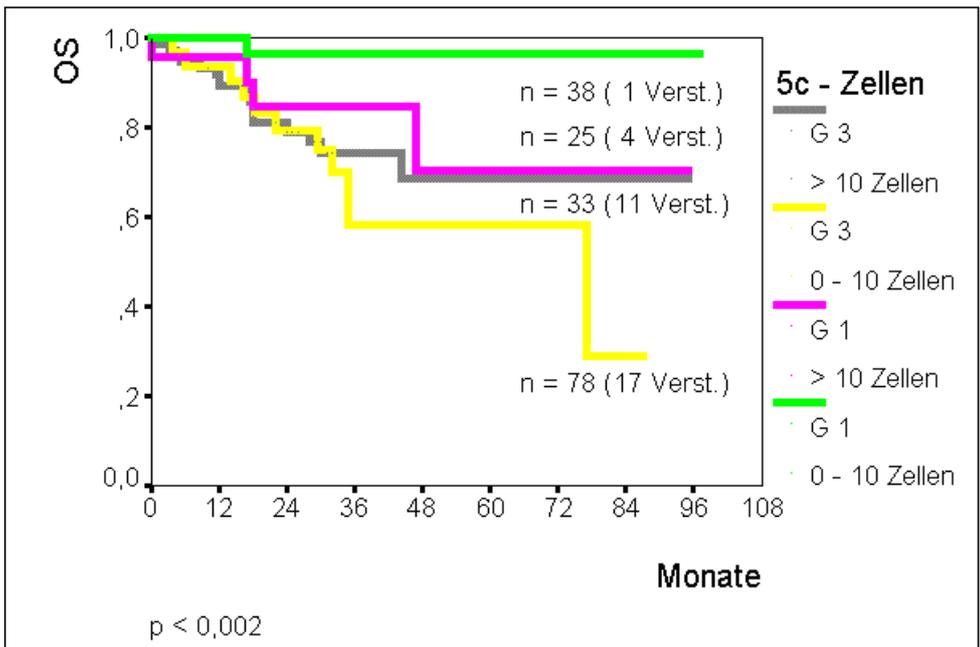


Abbildung 51 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 174 Mammakarzinomen mit G1- (n = 38) und G3-Karzinomen (n = 111) für das OS

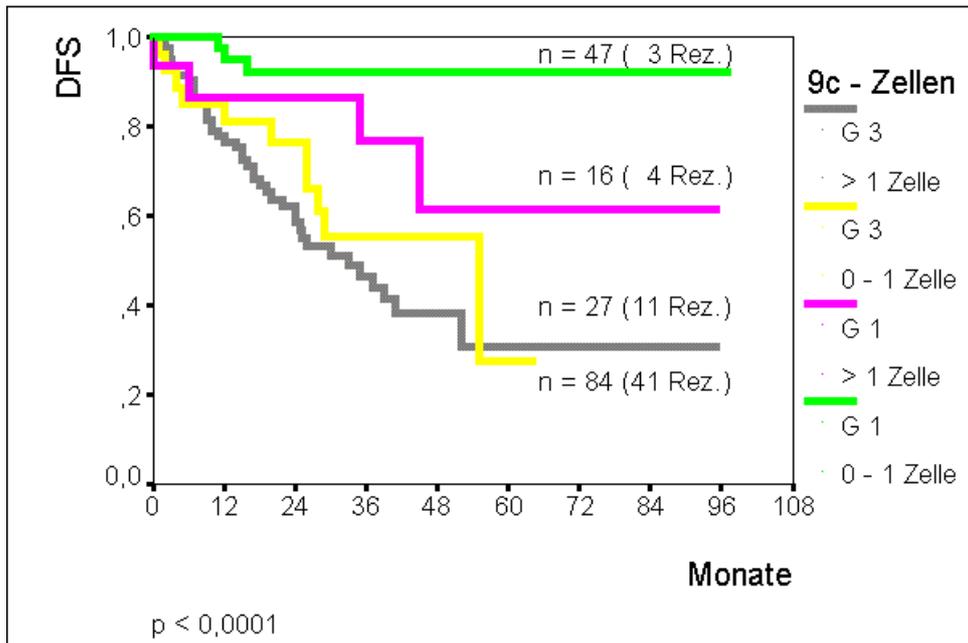


Abbildung 52 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 174 Mammakarzinomen mit G1- (n = 38) und G3-Karzinomen (n = 111) für das DFS

G2 - Karzinome :

Mittelgradig differenzierte G2-Karzinome (n = 140) sind mit 45 % als häufigster Differenzierungsgrad in unserer Studie vertreten. Die Gruppe der G2-Karzinome stellt ein Problem dar, da Interobserver- und Intraobserver-Übereinstimmungen schwanken und die Mehrzahl der Mammakarzinome schwer graduierbar sind und daher meist als mittelgradig differenzierte G2-Karzinome angesehen werden.

Wir untersuchen, inwieweit die DNA-Bildanalyse als moderner Prognoseparameter zu einer präziseren Klassifikation in dieser Problemgruppe führt und vergleichen die Auer-Klassifikation anschließend mit der Ploidie als moderner Prognosefaktor.

In der Gruppe der G2-Karzinome korreliert die Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen signifikant zur Auer-Klassifikation ($p < 0,01$ vs. $p < 0,03$) (**Tabelle 14**).

Tabelle 14 : Korrelation des Aneuploidiegrades zur Auer-Klassifikation bei 140 G2-Karzinomen

Auer-Gruppen	Zellen > 5c 0 – 10 Zellen	Zellen > 5c > 10 Zellen	Zellen > 9c 0 – 1 Zelle	Zellen > 9c > 1 Zelle
Auer I / II	100 % (25)	0	92 % (23)	8 % (2)
Auer III / IV	36 % (41)	64 % (74)	48 % (55)	52 % (60)

Die Auer-Klassifikation nimmt bei den G2-Karzinomen keinen signifikanten Einfluß auf das Follow up ($p < 0,44$ und $p < 0,31$) (

Abbildung 53 und **Abbildung 54**).

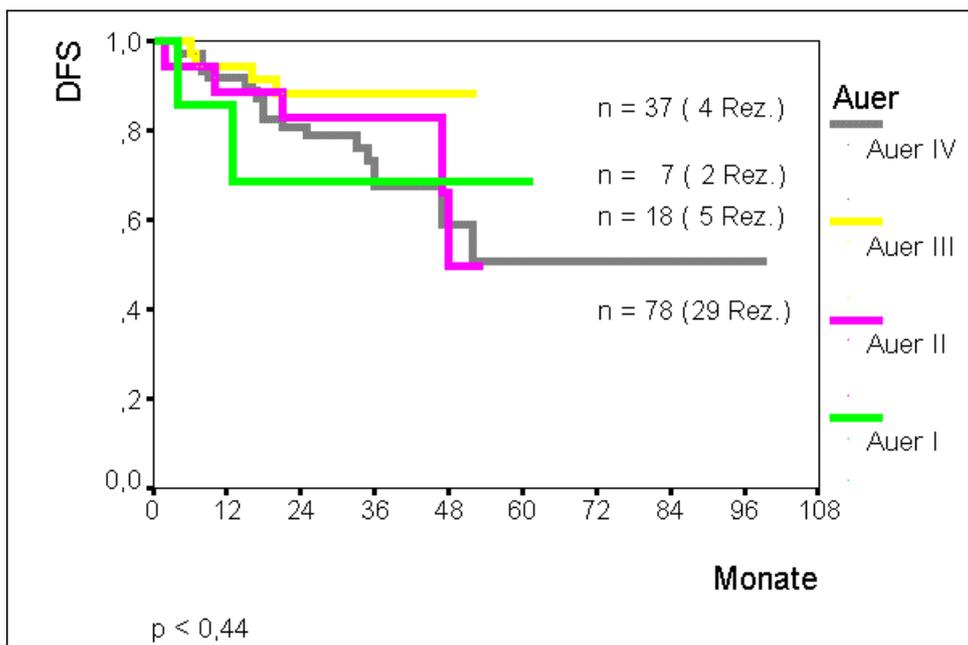


Abbildung 53 : Auer-Klassifikation bei 140 G2-Karzinomen für das DFS

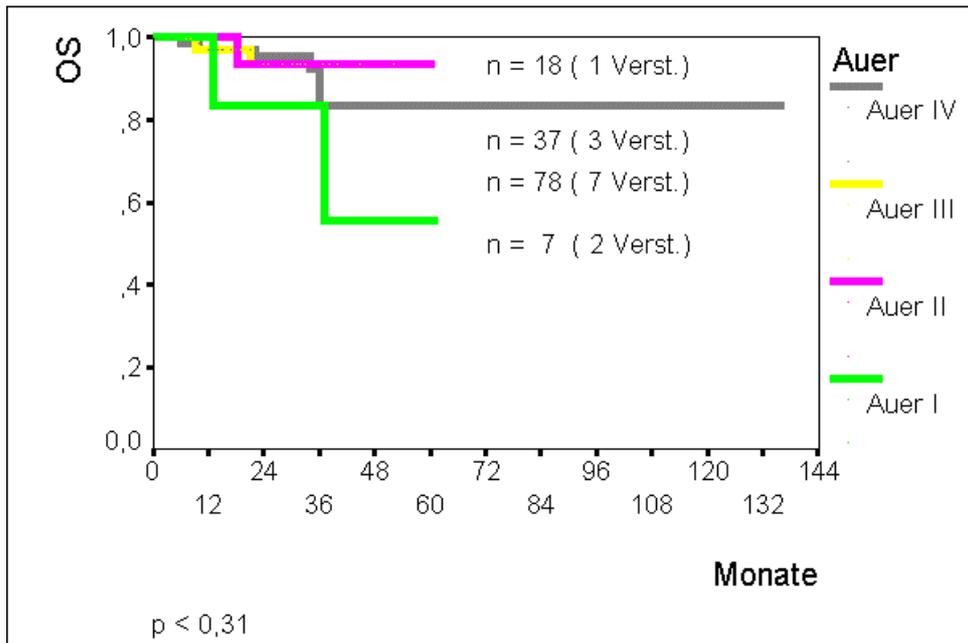


Abbildung 54 : Auer-Klassifikation bei 140 G2-Karzinomen für das OS

Innerhalb der G2-Karzinome gehören abhängig von der Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$ circa 54 % ($n = 75$) der Patientinnen der low-risk Gruppe und 46 % ($n = 65$) der high-risk Gruppe an. In der low-risk Gruppe erlitten 17 % ($n = 13$) der Patientinnen ein Rezidiv, in der high-risk Gruppe circa 28 % ($n = 18$); verstorben sind 1 % ($n = 1$) in der ersten und 11 % ($n = 7$) in der letzten Gruppe. Im Gegensatz zur Auer-Klassifikation korreliert die Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$ bei diesen Karzinomen zum klinischen Verlauf ($p < 0,0149$ vs. $p < 0,0249$) (**Abbildung 55** und **Abbildung 57**). Die hochaneuploiden Zellen $> 9c$ beeinflussen das DFS und das OS nicht ($p < 0,125$ vs. $p < 0,5426$) (**Abbildung 57, ohne Abbildung**). Die Ploidie erweist sich innerhalb der G2-Karzinome der Auer-Klassifikation überlegen.

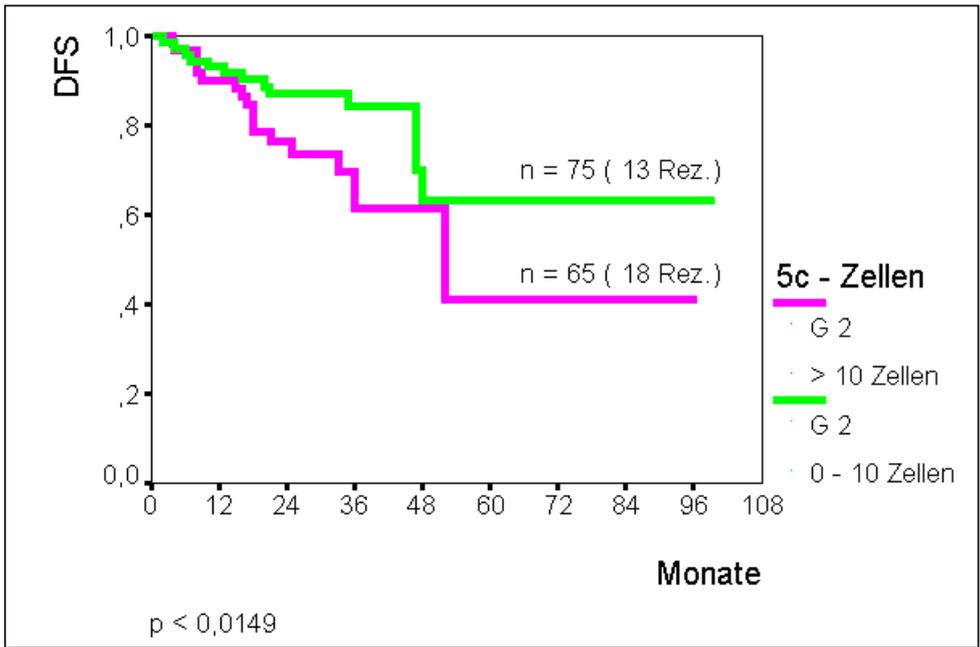


Abbildung 55 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 140 G2-Mammakarzinomen für das DFS

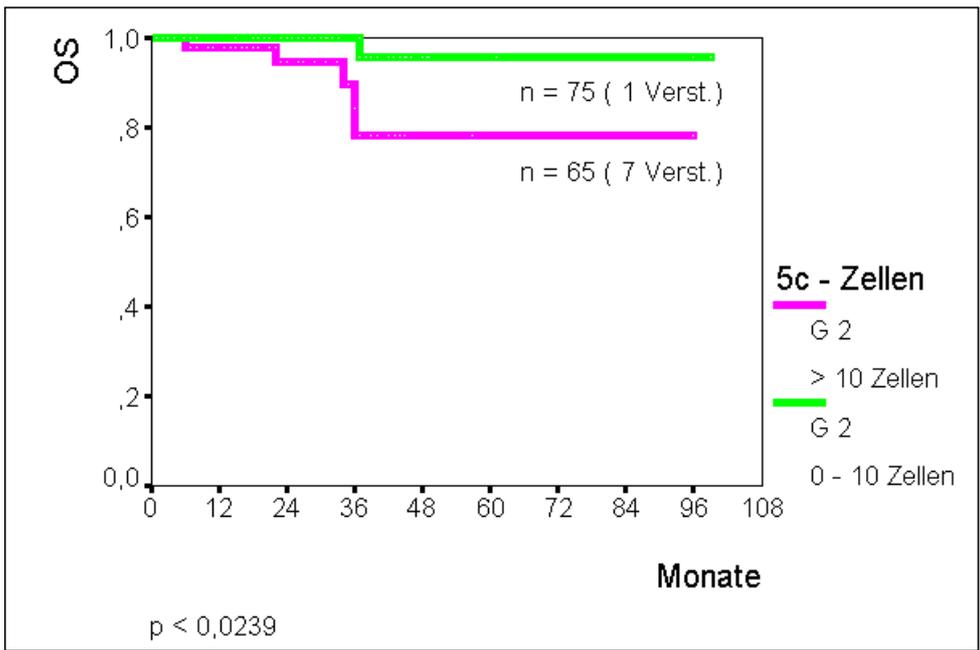


Abbildung 56 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 140 G2-Mammakarzinomen für das OS

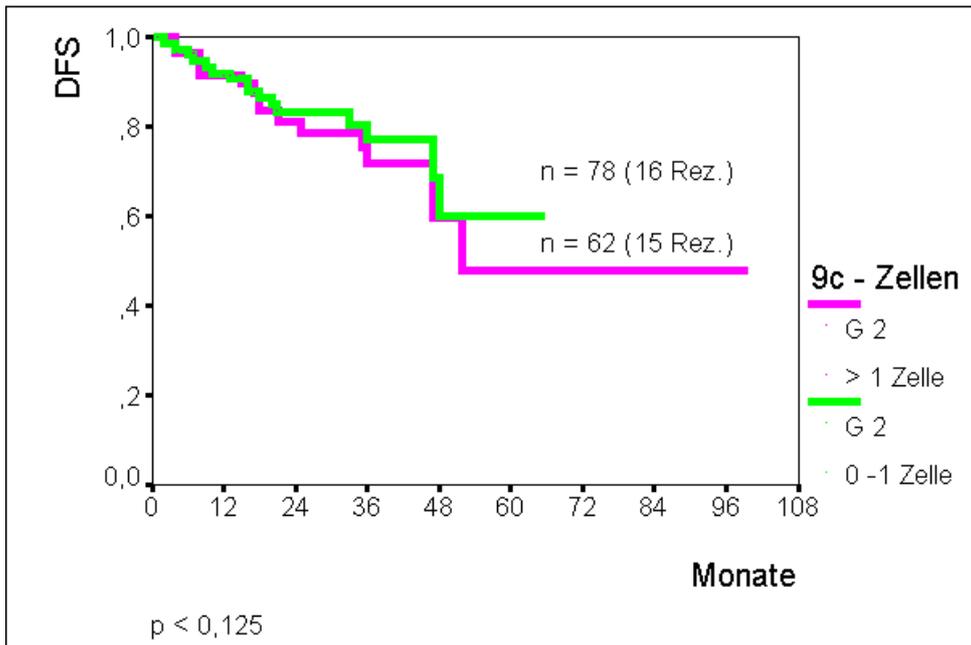


Abbildung 57 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 140 G2-Mammakarzinomen für das DFS

Unsere Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der aneuploiden Zellen > 5c insbesondere auch bei den morphologisch schwer klassifizierbaren G2-Karzinomen das prospektive Verhalten gut abzuschätzen ist.

3.9.6. Korrelation der Wachstumsfraktion Ki-67 zur Ploidie

Die Aneuploidierate bestimmt in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion Ki-67 das DFS im Gesamtkollektiv ($p < 0,0001$ vs. $p < 0,0001$) (**Abbildung 58** und **Abbildung 60**).

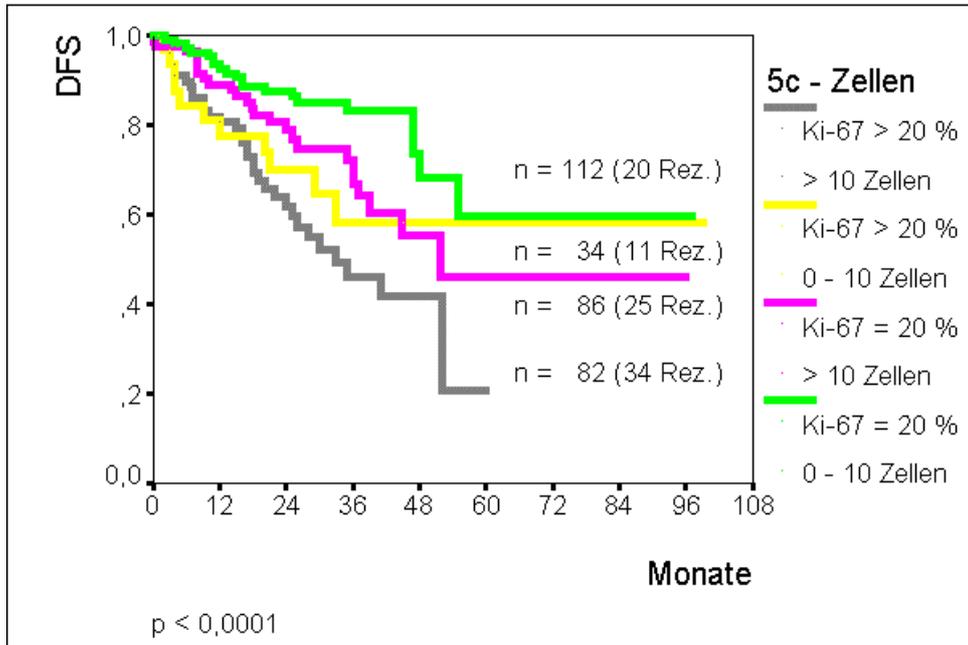


Abbildung 58 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Mammakarzinomen in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion Ki-67 für das DFS

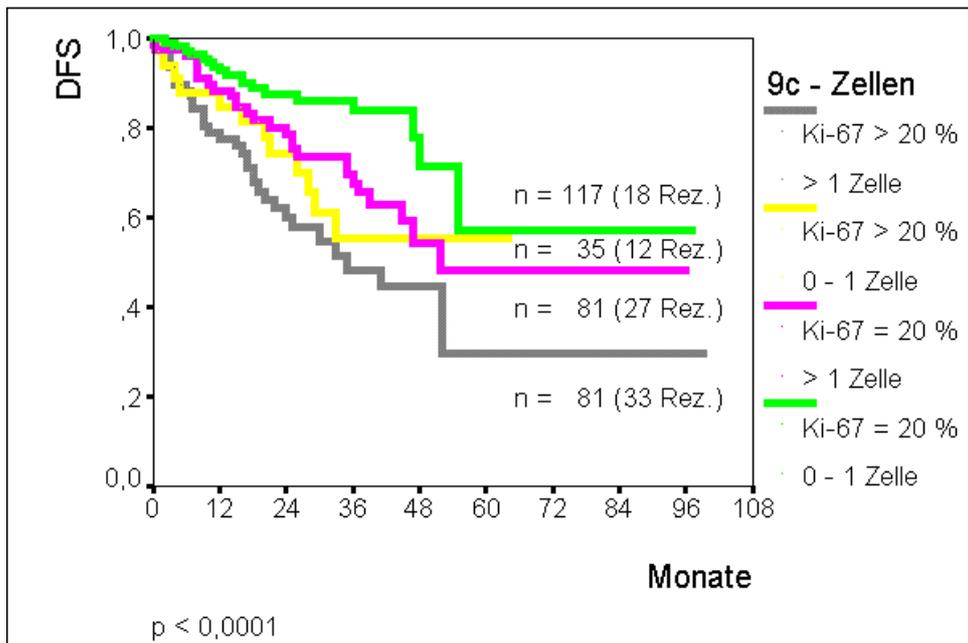


Abbildung 59 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 314 Mammakarzinomen in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion Ki-67 für das DFS

Abhängig von der prozentualen Wachstumsrate ($Ki-67 \leq 20\%$ (low-risk) vs. $Ki-67 > 20\%$ (high-risk)) erlaubt der Aneuploidiegrad eine Prognoseabschätzung für das rezidivfreie Intervall.

3.9.7. Korrelation des Menopausenstatus zur Ploidie

Im Kollektiv prämenopausaler Frauen ($n = 83$) lassen sich 40 % der Frauen ($n = 33$) in eine low-risk Gruppe und 60 % der Frauen ($n = 50$) in eine high-risk Gruppe bezüglich der Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$ einteilen. Etwa 43 % der Patientinnen ($n = 36$) gehören zur low-risk Gruppe und 57 % ($n = 47$) der high-risk Gruppe bezüglich hochaneuploider Zellen $> 9c$. Die mediane Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$ beträgt 15 Zellen; für hochaneuploide Zellen $> 9c$ immerhin 2 Zellen.

Postmenopausale Patientinnen ($n = 231$) weisen als low-risk Kollektiv in 49 % ($n = 113$) und als high-risk Kollektiv in 51 % ($n = 118$) aneuploide Zellen $> 5c$ auf; für hochaneuploide Zellen sind es 50 % ($n = 116$) der Frauen mit niedrigem Risiko und in 50 % ($n = 115$) der Frauen mit hohem Risiko. Für postmenopausale Patientinnen ergibt sich eine mediane Anzahl aneuploider Zellen $> 5c$ von 12 Zellen und hochaneuploider Zellen $> 9c$ von 1 Zelle.

Zusammenfassend weisen prämenopausale Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zu postmenopausalen Patientinnen eine zugleich höhere mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen auf.

Anhand prä- und postmenopausaler Risikogruppen wird die Bedeutung des Ploidieparameters überprüft und nachfolgend graphisch dargestellt :

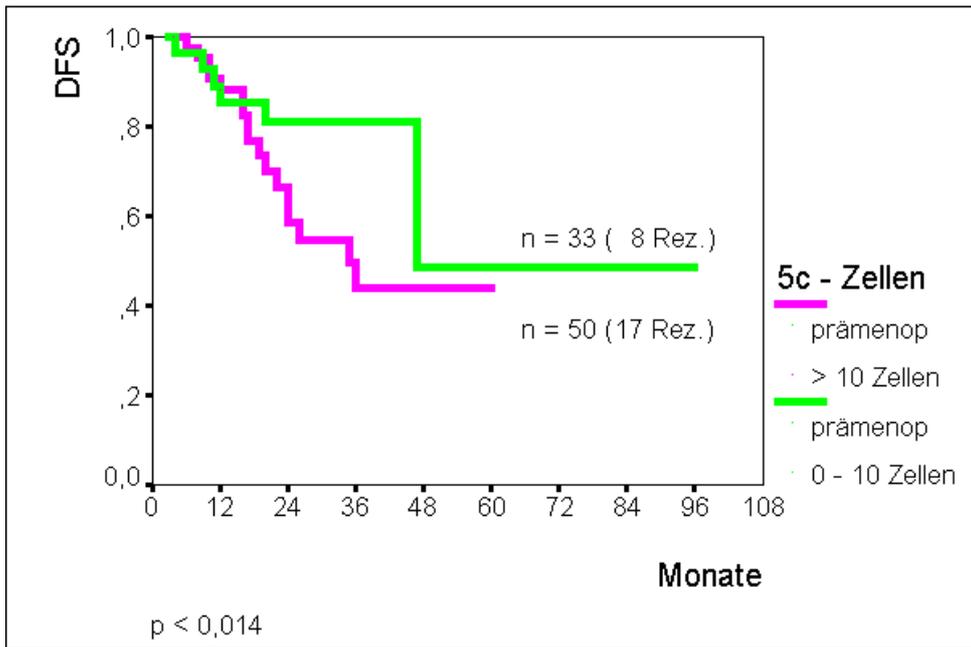


Abbildung 60 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 83 prämenopausalen Frauen mit Mammakarzinomen für das DFS

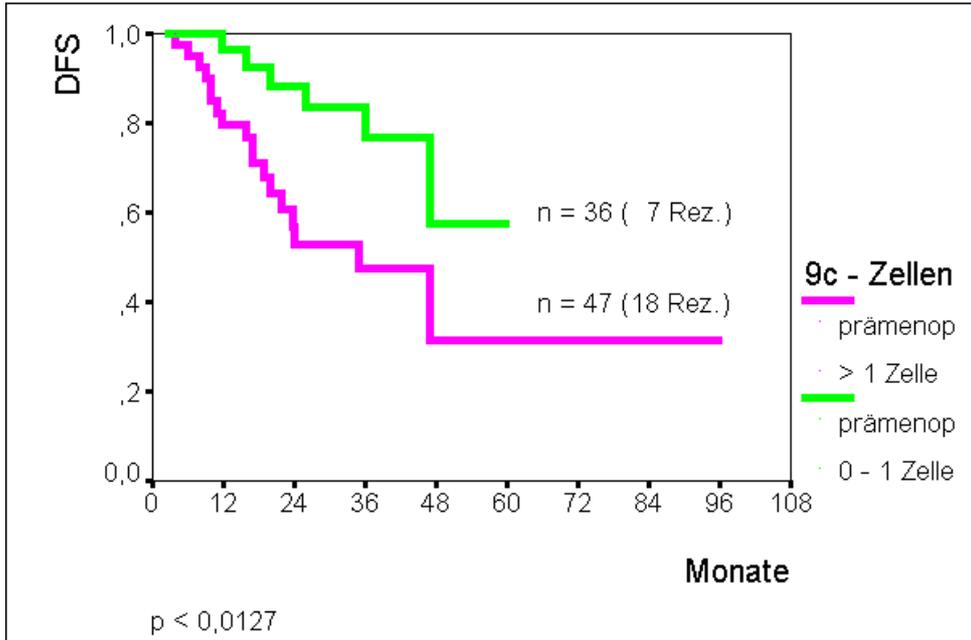


Abbildung 61 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 83 prämenopausalen Frauen mit Mammakarzinomen für das DFS

Die **Abbildung 60** und **Abbildung 61** zeigen deutlich, daß bei dem klinisch interessanten Hochrisikokollektiv der prämenopausalen Frauen der Aneuploidiegrad das DFS bestimmt ($p < 0,014$ vs. $p < 0,012$).

Im Kollektiv prämenopausaler Frauen ergibt sich für das Gesamtüberleben hinsichtlich der Aneuploidierate keine Signifikanz ($p < 0,999$ vs. $p < 0,2383$) (**ohne Abbildung**). Auch bei postmenopausalen Frauen kann der Aneuploidiegrad eine Subklassifizierung innerhalb dieses Kollektivs für das DFS herbeiführen (**Abbildung 62** und **Abbildung 63**).

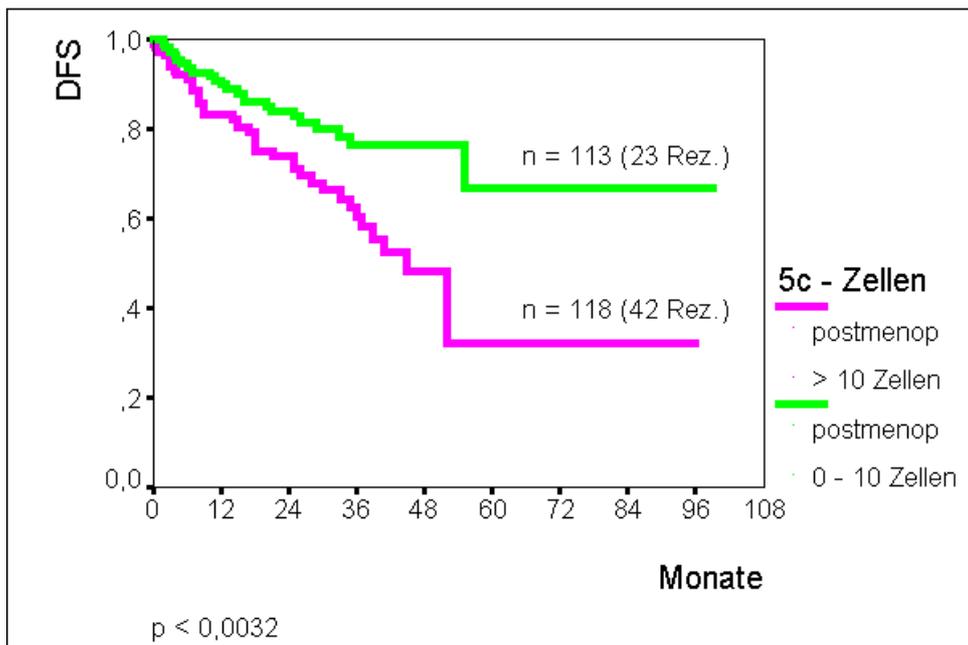


Abbildung 62 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 231 postmenopausalen Frauen mit Mammakarzinomen für das DFS

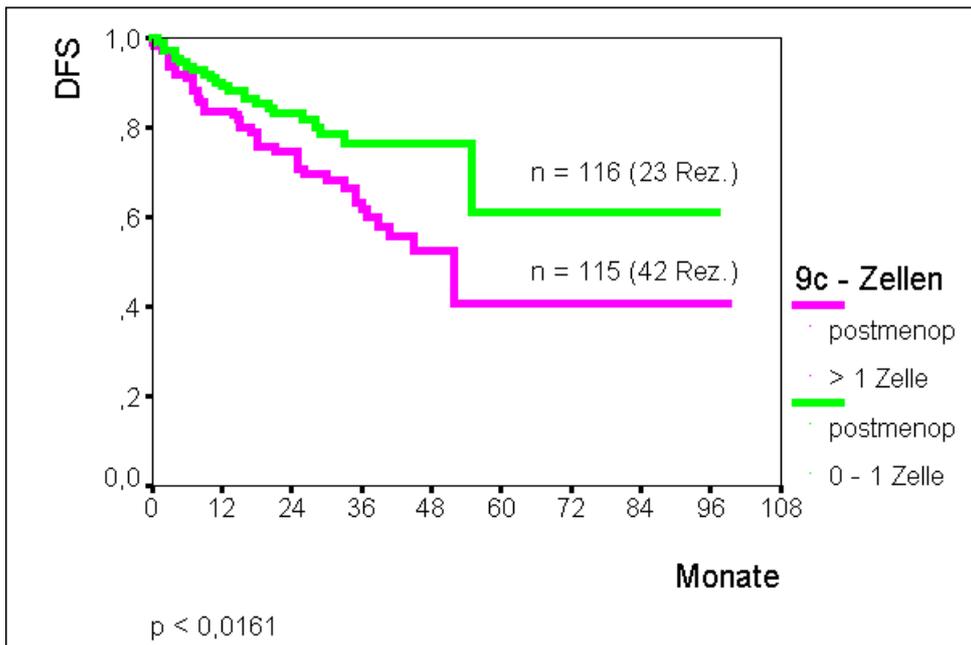


Abbildung 63 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 231 postmenopausalen Frauen mit Mammakarzinomen für das DFS

Für aneuploide Zellen > 5c ist bei postmenopausalen Frauen im Gesamtüberleben eine Unterscheidung in Risikogruppen möglich ($p < 0,051$) (**Abbildung 64**); für hochaneuploiden Zellen > 9c im OS jedoch nicht ($p < 0,561$) (**ohne Abbildung**).

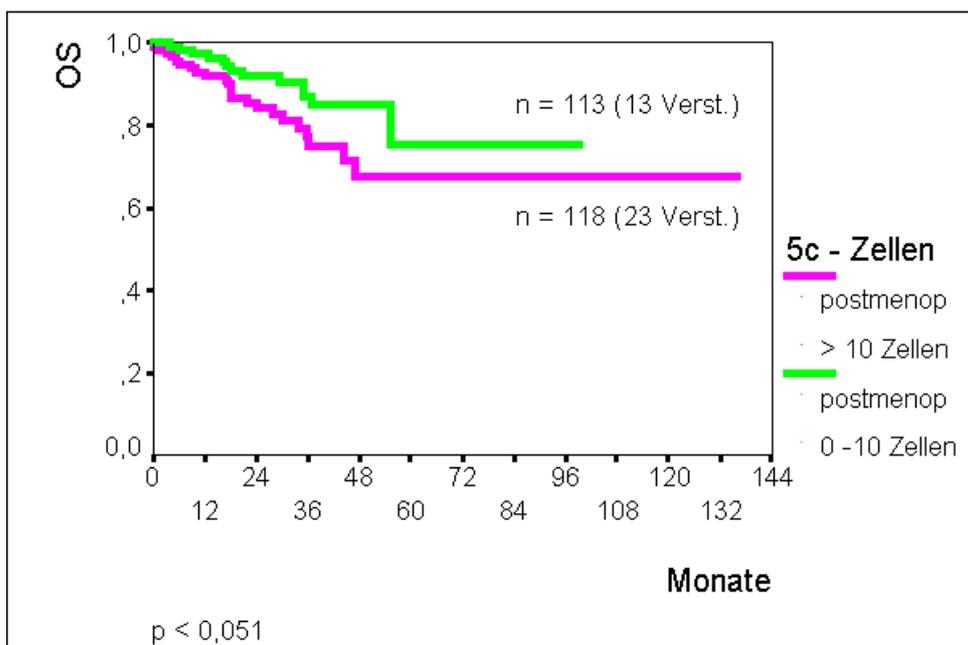


Abbildung 64 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 231 postmenopausalen Frauen mit Mammakarzinomen für das OS

3.9.8. Korrelation des Hormonrezeptorstatus zur Ploidie

Die Überlebenskurven zeigen, daß Frauen mit negativen Hormonrezeptorstatus ein kürzeres DFS und OS aufweisen als Frauen mit positiven Hormonrezeptorstatus.

Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus haben bei hoher Aneuploidierate für Zellen > 5c (n = 62) ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall als Patientinnen mit geringer Aneuploidierate für Zellen > 5c (n = 23). Gleichermaßen ist die rezidivfreie Zeit bei Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus und hoher Aneuploidierate für Zellen > 5c (n = 106) signifikant kürzer als bei Patientinnen mit geringer Aneuploidierate (n = 123) (p < 0,0000 vs. p < 0,0000) (**Abbildung 65** und **Abbildung 66**).

Parallel dazu zeigen Frauen mit negativem Östrogenrezeptorstatus und hoher Aneuploidierate für Zellen > 9c (n = 69) ein signifikant kürzeres DFS als Frauen mit geringer Aneuploidierate für Zellen > 9c (n = 16). Frauen mit positivem Östrogenrezeptorstatus und hoher Aneuploidierate > 9c (n = 93) zeigen ein signifikant kürzeres DFS als die mit geringer Aneuploidierate (n = 136) (p < 0,0000) (**Abbildung 67**).

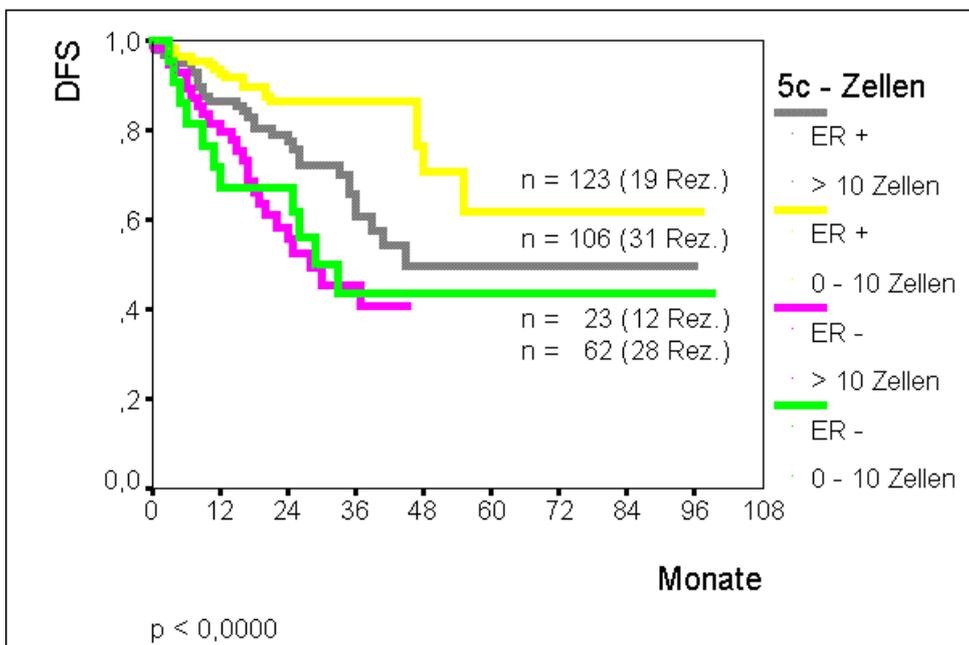


Abbildung 65 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit negativem (n = 85) und positivem (n = 229) Östrogenrezeptorstatus (ER) für das DFS

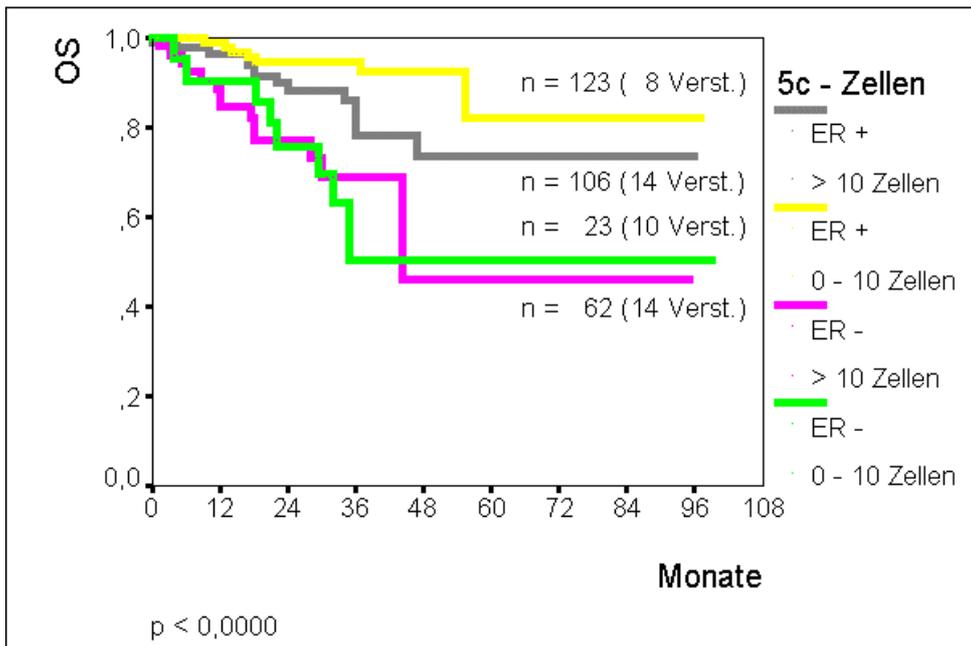


Abbildung 66 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit negativem (n = 85) und positivem (n = 229) Östrogenrezeptorstatus (ER) für das OS

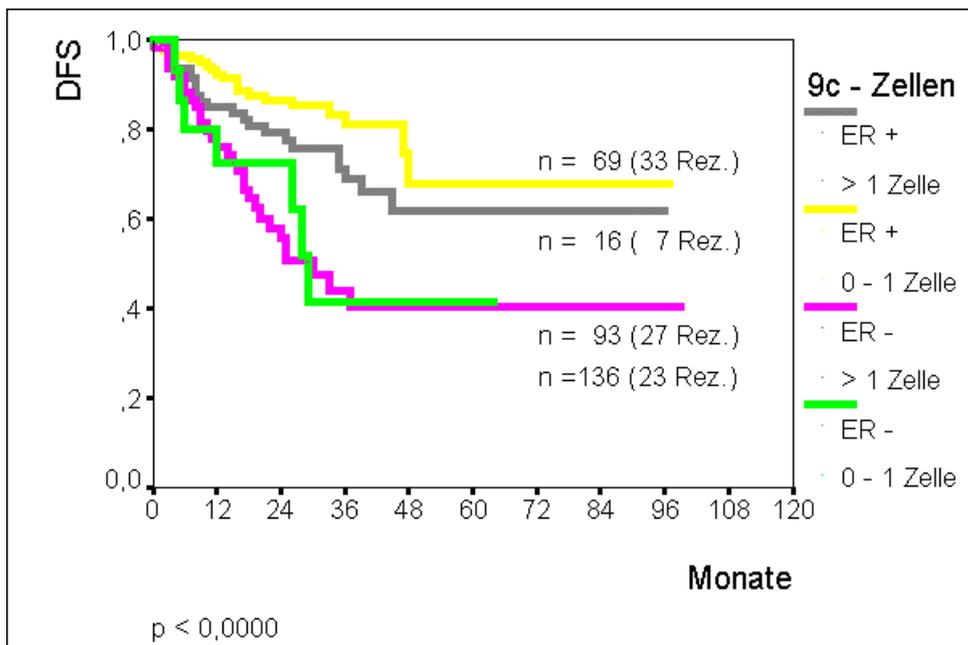


Abbildung 67 : Aneuploide Zellen (> 9c) bei 314 Frauen mit negativem (n = 85) und positivem (n = 229) Östrogenrezeptorstatus (ER) für das DFS

Für das Gesamtüberleben ergibt sich für die hochaneuploiden Zellen > 9c keine Signifikanz (**ohne Abbildung**).

Der Einfluß der Aneuploidierate auf den Nachweis positiver Progesteronrezeptoren beim Mammakarzinom wird in der **Abbildung 68** und **Abbildung 69** dargestellt : Auch hier hat der positive Progesteronrezeptorstatus eine mit dem Östrogenrezeptorstatus vergleichbare Bedeutung. Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptorstatus und niedriger Aneuploidie haben ein längeres rezidivfreies Intervall und Gesamtüberleben als Patientinnen mit negativem Progesteronrezeptorstatus und gleichzeitig hoher Aneuploidie ($p < 0,0001$ vs. $p < 0,0005$).

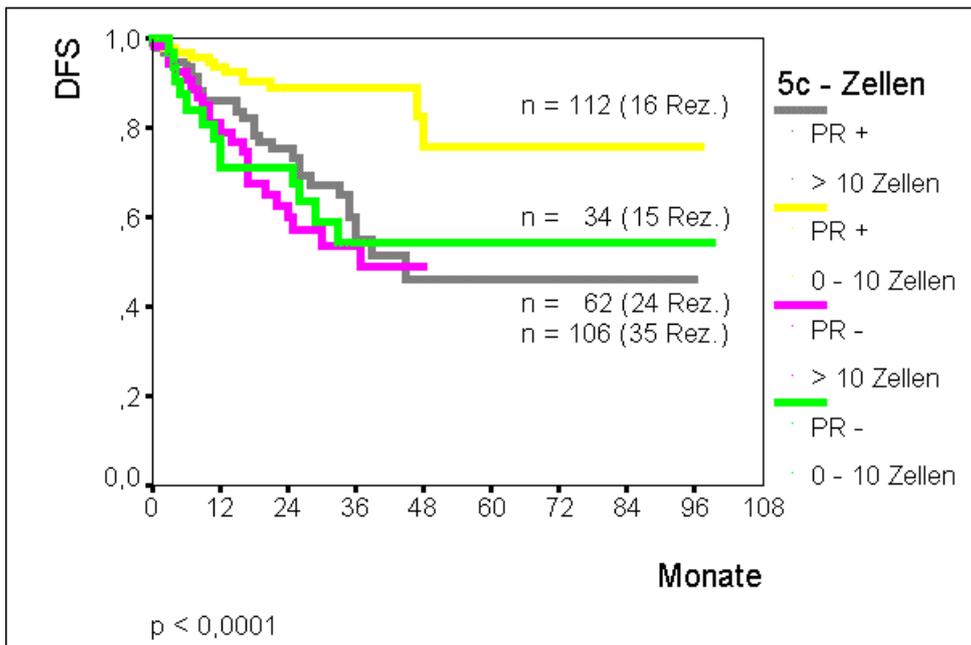


Abbildung 68 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit negativem (n = 96) und positivem (n = 218) Progesteronrezeptorstatus (PR) für das DFS

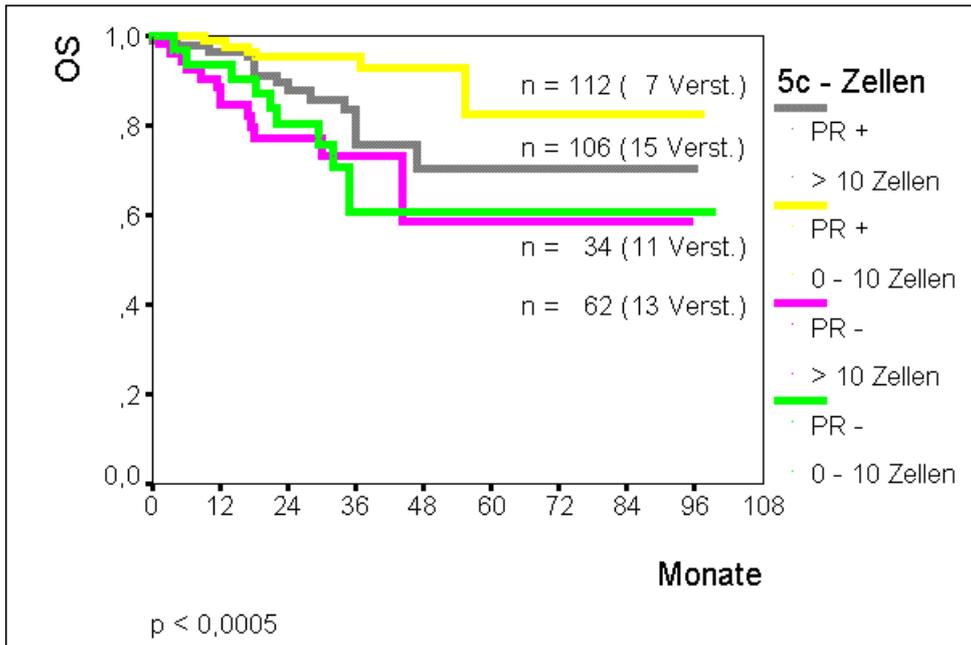


Abbildung 69 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 314 Frauen mit negativem (n = 96) und positivem (n = 218) Progesteronrezeptorstatus (PR) für das OS

V. Prognoseabschätzung mittels Kombination mehrerer klassischer Prognosefaktoren in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad

3.10. Korrelation zwischen Nodalstatus und Menopausenstatus

Die Betrachtung klassischer Prognoseparameter wie Nodal- und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad ist von wesentlicher Bedeutung in der Arbeit, um den prospektiven Stellenwert der Ploidie gegenüber etablierten klassischen Prognosefaktoren objektiv einschätzen zu können. Zunächst wird die Bedeutung klassischer Prognosefaktoren zueinander demonstriert und anschließend vergleichend in Beziehung zum Aneuploidiegrad gesetzt. Aufgrund der Größe einzelner Patientenkollektive analysieren wir *prämenopausale und postmenopausale Patientenkollektive* getrennt voneinander.

Nodal negative Frauen (n = 155) haben ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall und Gesamtüberleben als nodal positive Frauen (n = 159). Prämenopausal nodal negative Patientinnen (n = 34) sind länger rezidivfrei und leben deutlich länger als prämenopausal nodal positive Patientinnen (n = 49). Dasselbe gilt für postmenopausal nodal negative Frauen (n = 121) im Vergleich zu postmenopausal nodal positiven Frauen (n = 110). Prämenopausal nodal negative Patientinnen haben innerhalb dieses Kollektivs das längste DFS, prämenopausal nodal positive Erkrankte das kürzeste DFS.

Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen eine enge Korrelation zwischen Nodal- und Menopausenstatus für das DFS und OS ($p < 0,000$ vs. $p < 0,043$) (**Abbildung 70** und **Abbildung 71**).

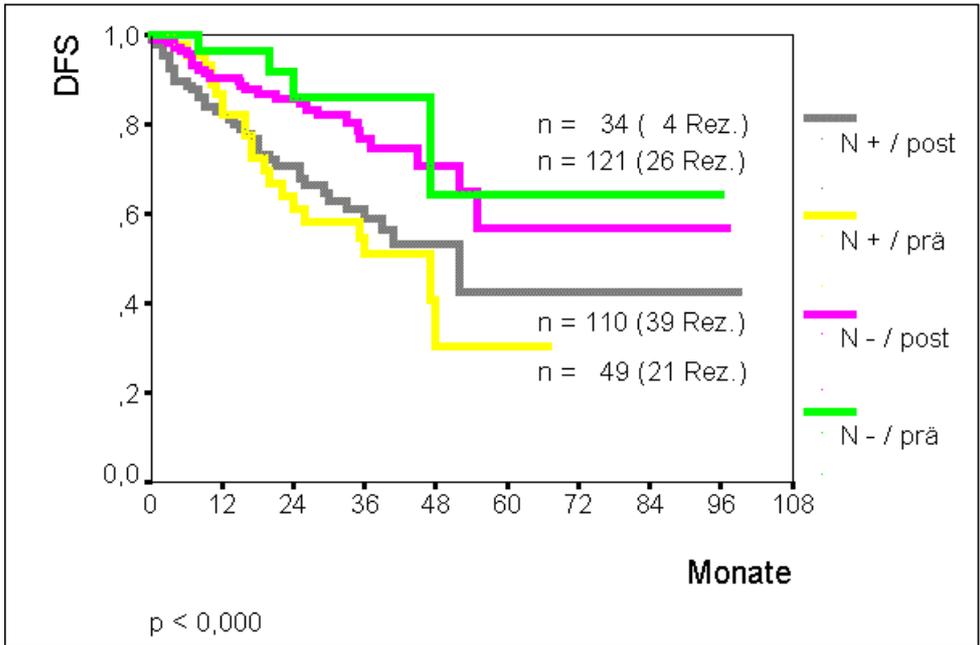


Abbildung 70 : Korrelation des Nodalstatus zum Menopausenstatus bei 314 Mammakarzinomen für das DFS

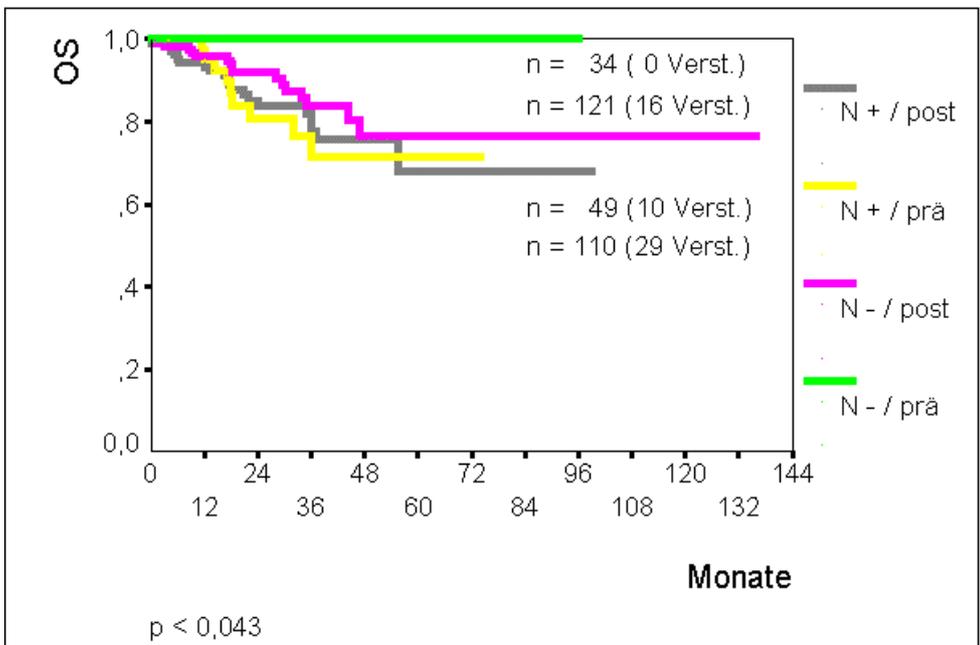


Abbildung 71 : Korrelation des Nodalstatus zum Menopausenstatus bei 314 Mammakarzinomen für das OS

3.11. Korrelation des Nodalstatus und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad

Die gleichzeitige Betrachtung von 3 Prognoseparametern (Nodal-, Menopausenstatus und Aneuploidiegrad) basiert auf der Grundlage der zuvor gezeigten Kaplan-Meier-Kurven (**Abbildung 70** und **Abbildung 71**).

Wir betrachten zunächst das Kollektiv *prämenopausaler Frauen* in Abhängigkeit von ihrem Nodal- und Menopausenstatus. Die **Abbildung 72** und **Abbildung 73** zeigen jeweils die Beziehung prämenopausal nodal negativer und nodal positiver Frauen in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad ($p < 0,0021$ vs. $p < 0,0024$) für das DFS. Deutlich wird hier, daß sich abhängig vom Aneuploidiegrad folgende Risikokonstellationen ergeben: prämenopausal nodal negative Frauen mit niedriger Aneuploidie haben ein längeres DFS als prämenopausal nodal negative Frauen mit hoher Aneuploidie. Dasselbe ist für prämenopausal nodal positive Frauen festzustellen. In Abhängigkeit vom Nodalstatus sind im Kollektiv prämenopausaler Patientinnen Subkollektive mittels Aneuploidie definierbar. In der Prämenopause ist der Nodalstatus dem Aneuploidiegrad überlegen.

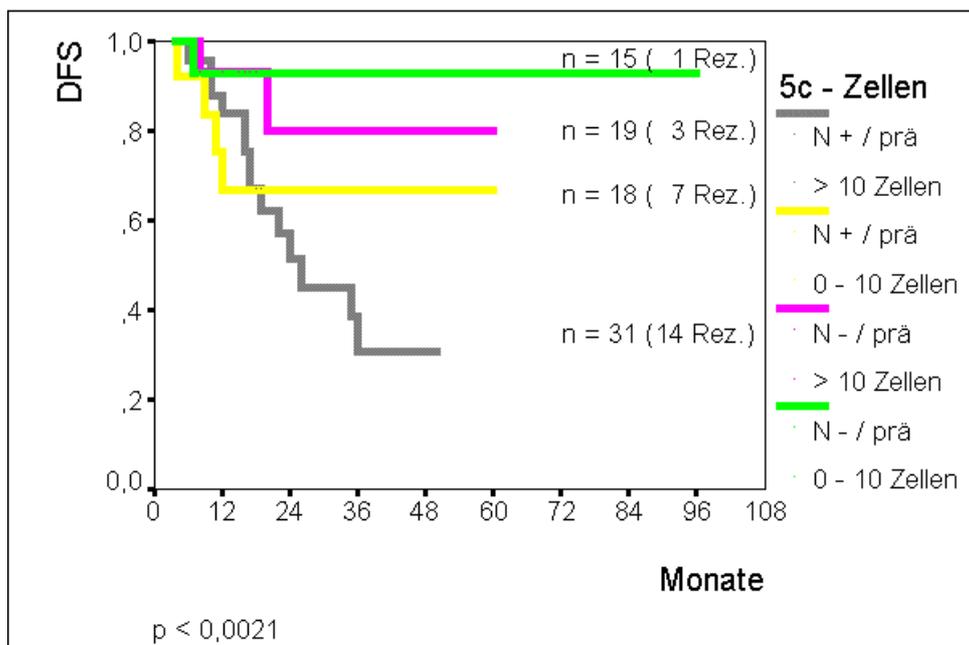


Abbildung 72 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 83 prämenopausalen Frauen mit nodal negativen (n = 34) und nodal positiven (n = 49) Mammakarzinomen für das DFS

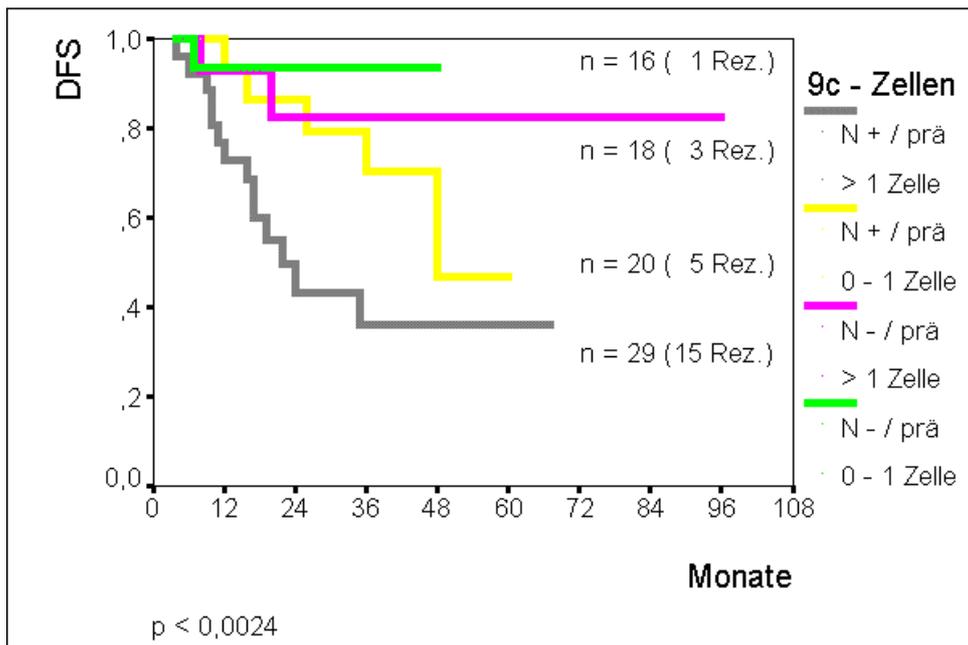


Abbildung 73 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 83 prämenopausalen Frauen mit nodal negativen (n = 34) und nodal positiven (n = 49) Mammakarzinomen für das DFS

Im Gegensatz zum prämenopausalen Patientenkollektiv ergibt sich für das *postmenopausale Kollektiv* in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad : postmenopausal nodal negative Frauen mit niedriger Aneuploidie haben ein längeres DFS als postmenopausal nodal positive mit hoher Aneuploidie. Hingegen ergibt sich für postmenopausal nodal positive Frauen folgendes Ergebnis : postmenopausal nodal positive Erkrankte mit niedriger Aneuploidie haben ein längeres DFS als postmenopausal nodal negative Erkrankte unabhängig von ihrem Aneuploidiegrad ($p < 0,0004$ vs. $p < 0,0016$) (**Abbildung 74** und

Abbildung 75). Dies bedeutet, daß im postmenopausalen Kollektiv der Aneuploidiegrad dem bewährten Nodalstatus statistisch eindeutig überlegen ist. Prognostisch scheint es günstiger zu sein, bei befallenen Lymphknoten eine niedrige Aneuploidie aufzuweisen als bei nicht befallenen Lymphknoten eine hohe Aneuploidierate.

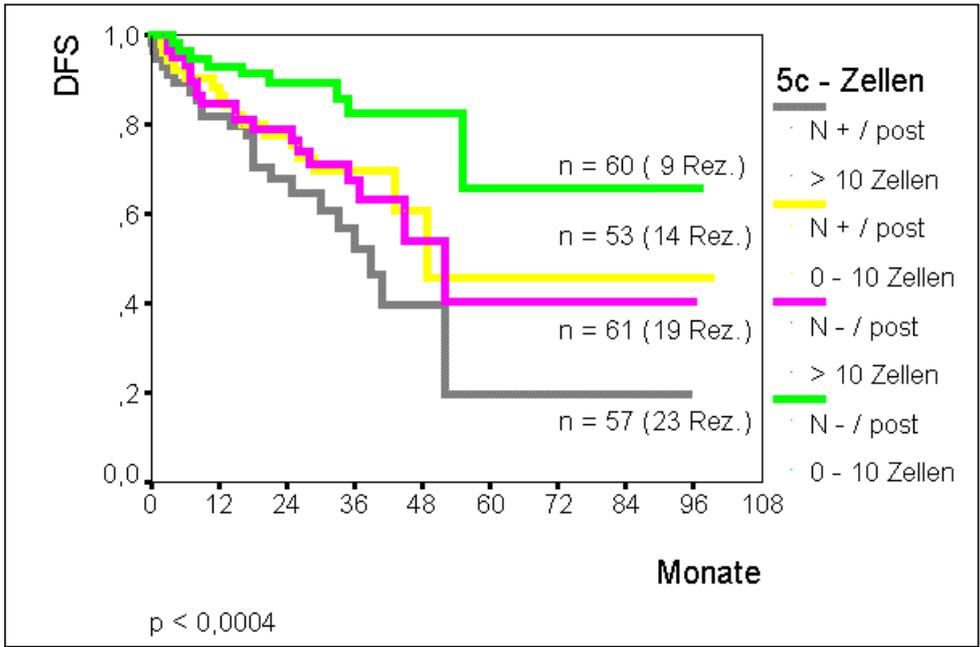


Abbildung 74 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei 231 postmenopausalen Frauen mit nodal negativen (n = 121) und nodal positiven (n = 110) Mammakarzinomen für das DFS

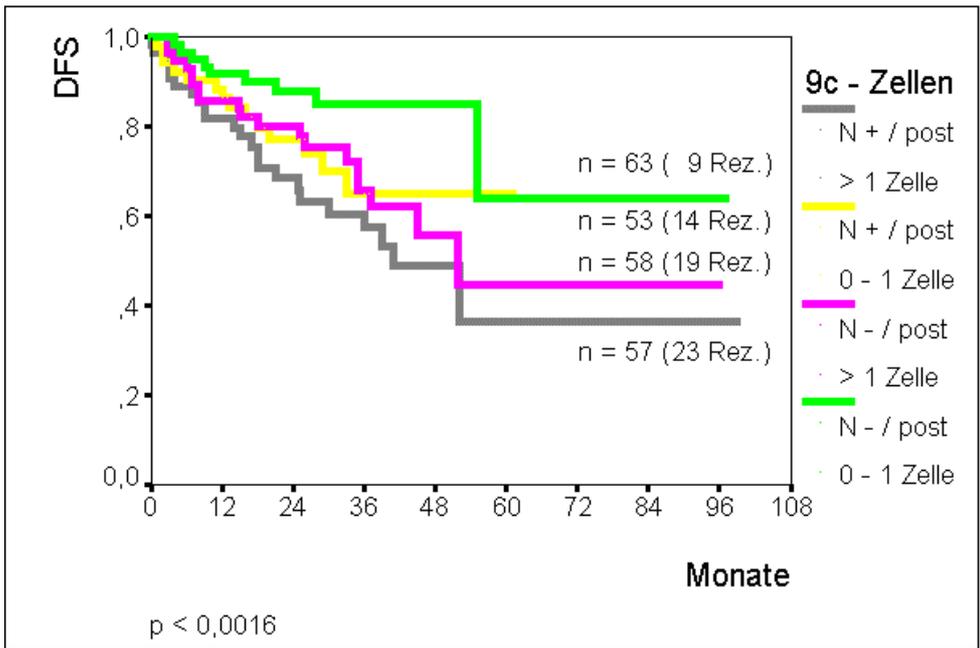


Abbildung 75 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei 231 postmenopausalen Frauen mit nodal negativen (n = 121) und nodal positiven (n = 110) Mammakarzinomen für das DFS

3.12. Korrelation des Nodalstatus und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad bei Patientinnen mit und ohne Chemotherapie

An reinen Subkollektiven prämenopausaler Patientinnen wird die Bedeutung der Aneuploidierate an nodal negativen und nodal positiven Risikogruppen in Abhängigkeit von einer zytostatischen Therapie überprüft. Die **Tabelle 15** und **Tabelle 16** veranschaulichen die Verteilung der Patientinnen innerhalb des prä- und postmenopausalen Kollektivs mit und ohne Chemotherapie.

Tabelle 15 :Anzahl prämenopausaler Patientinnen in Abhängigkeit vom Nodalstatus und Therapie

Prämenopausal (n = 83)	nodal negativ (n = 34)	nodal positiv (n = 49)
ohne Chemotherapie	n = 27	n = 8
mit Chemotherapie	n = 7	n = 41

Tabelle 16 :Anzahl postmenopausaler Patientinnen in Abhängigkeit vom Nodalstatus und Therapie

postmenopausal (n = 231)	nodal negativ (n =121)	nodal positiv (n = 110)
ohne Chemotherapie	n = 117	n = 70
mit Chemotherapie	n = 4	n = 40

Wir untersuchten die prognostische Bedeutung der 5c- und 9c-exceeding rate (5c- und 9c-ER) im interessanten Kollektiv prämenopausaler Patientinnen in Abhängigkeit vom Nodalstatus und der durchgeführten Therapie nach Erstdiagnose der Tumorerkrankung.

Prämenopausal nodal negative Patientinnen, die keine Chemotherapie erhalten haben (n = 27), haben bei niedriger Aneuploidierate ein längeres rezidivfreies Intervall als Patientinnen mit hoher Aneuploidierate. Hier ist die 5c-ER für das DFS bestimmend ($p < 0,14$) (**Abbildung 76**). Die 9c-ER scheint in diesem Kollektiv statistisch unbedeutend zu sein.

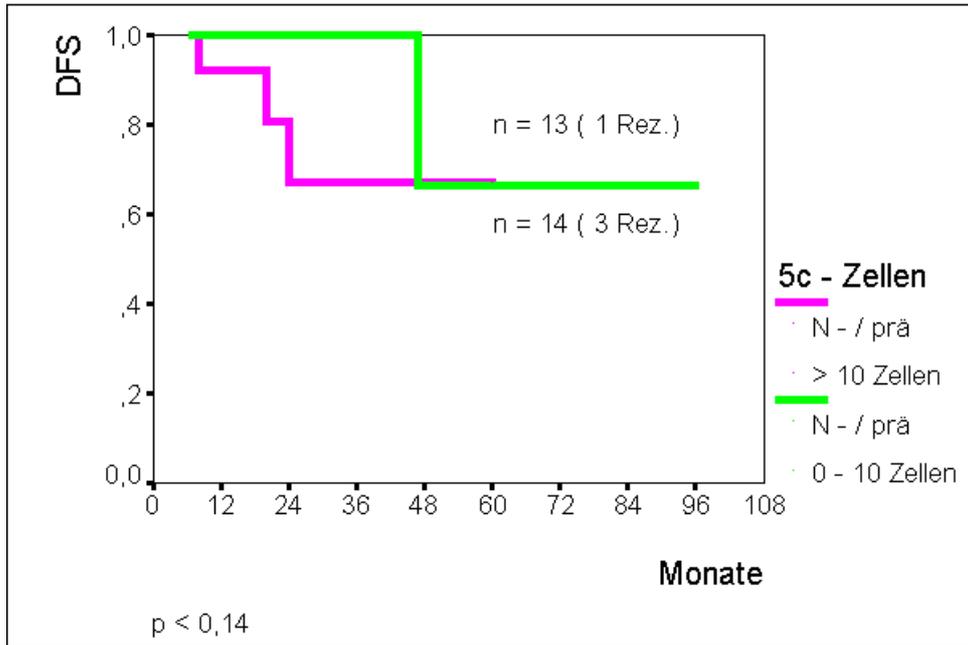


Abbildung 76 : Aneuploide Zellen (> 5c) bei prämenopausal nodal negativen Frauen ohne Chemotherapie (n = 27) für das DFS

Prämenopausal nodal positive Frauen, die eine Chemotherapie erhalten haben (n = 41), erlitten bei niedriger Aneuploidie signifikant weniger Rezidive als Frauen mit hoher Aneuploidie. Die 9c-ER erweist sich in diesem Kollektiv für das DFS als bedeutsam ($p < 0,040$) (

Abbildung 77).

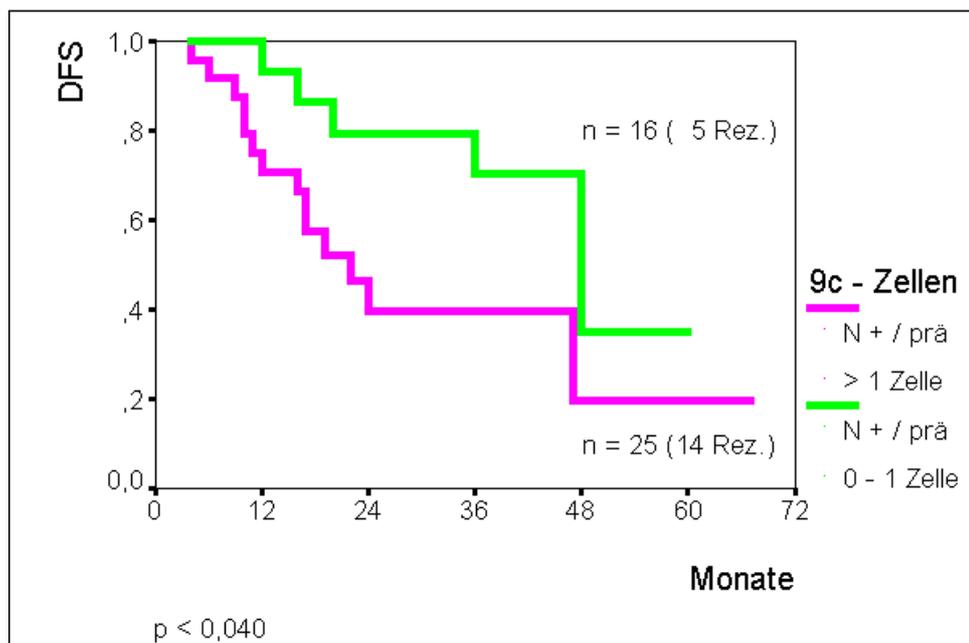


Abbildung 77 : Hochaneuploide Zellen (> 9c) bei prämenopausal nodal positiven Frauen mit Chemotherapie (n = 41) für das DFS

VI. Multivariate Analysen

Multivariate Analysen untersuchen die statistische Beziehung zwischen einem Merkmal und unabhängigen Variablen.

Die *multivariate Überlebensanalyse nach Cox*⁶³ dient in dieser Überlebensstudie als ein wichtiger statistischer Test, der den Zusammenhang zwischen Risikofaktoren als Einflußgrößen und Prognosefaktoren für den Krankheitsverlauf beschreibt. In die multivariaten Analyse können nicht beliebig viele Prognoseparameter eingebracht werden. Für die Validität dieser Untersuchung ist die Anzahl der zu überprüfenden Prognoseparameter statistisch limitiert (10-20 %); es können demnach innerhalb dieser Studie bei 314 Patientinnen lediglich 4 bis 5 Prognoseparameter in die Analyse einbezogen werden. Voraussetzung hierfür ist, daß alle zu untersuchenden Parameter *dichoton* sind, d.h. sie müssen in 2 Gruppen (z.B. positiv / negativ bzw. ja / nein) eingeteilt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit werden mittels multivariater Analyse verschiedene Prognoseparameter gegeneinander auf ihre klinische Relevanz hin überprüft, wobei hier der prädiktive Wert der Aneuploidie den klassischen Prognoseparametern gegenübergestellt wird. **Tabelle 17** zeigt die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse für das rezidivfreie Intervall und Gesamtüberleben mit den jeweiligen Konfidenzintervallen (C.I.).

Danach zeigen sich das histologische Grading, der Nodalstatus, die 5c- und 9c-exceeding rate (5c- und 9c-ER) als von prognostischer Bedeutung. Nach dem Grading ist die Lymphknotenbeteiligung der zweitwichtigste Parameter. Die 5c- und 9c-ER sind als moderne Prognoseparameter für das DFS und OS ebenfalls von signifikanter prognostischer Wertigkeit. Die Auer-Klassifikation scheint als Prognosefaktor keinen Einfluß auf das rezidivfreie Intervall und Gesamtüberleben zu haben.

Tabelle 17 : Multivariate Analyse (MVA) der Prognoseparameter bei 314 Mammakarzinomen für das DFS und OS mit Konfidenzintervallen (C.I.)

Prognoseparameter	Signifikanz p		C.I.
	DFS	OS	
GRADING	0,0005	0,0094	1,35 – 2,62
NODALSTATUS	0,0003	0,0382	1,31 – 2,65
5c – ER	0,0040	0,0005	1,00 – 1,02
9c – ER	0,0151	0,0185	0,95 – 1,01
AUER	0,8650	0,9649	0,85 – 1,03

In der multivariaten Analyse erweist sich das histologische Grading als der wichtigste Prognoseparameter, gefolgt vom Nodalstatus und der 5c- und 9c- exceeding rate (5c- und 9c-ER). Die Ploidie ist nach statistischer Berechnung in ihrer prognostischen Relevanz der Auer-Klassifikation übergeordnet. Innerhalb der Prognosefaktoren ergibt sich für die Auer-Klassifikation keine statistische Signifikanz ($p < 0,8650$ vs. $p < 0,9649$).