

## 4. Diskussion

### I. Kritische Betrachtung des gewählten Patientenkollektivs

#### 4.1. Klinisches Kontroll- und Patientenkollektiv

In dieser Arbeit konnten insgesamt 314 Patientinnen in ihrem klinischen Krankheitsverlauf über längere Jahre systematisch nachbeobachtet werden.

Der **Beobachtungszeitraum** erstreckt sich von Juli 1988 bis Juli 2000; die Patientinnen wurden insgesamt über 12 Jahre im Verlauf ihrer Tumorerkrankung beobachtet.

Das **mediane Beobachtungsintervall** beträgt 33 Monate (8 - 144 Monate).

Bezüglich des Beobachtungszeitraums von 12 Jahren bzw. des medianen Beobachtungsintervalls von 33 Monaten ist dieses Kollektiv mit international anerkannten Untersuchungen vergleichbar<sup>83,102</sup>.

Die in der Studie untersuchten Patientinnen stellen mit ihren unterschiedlichen Mammakarzinomerkrankungen ein repräsentatives Patientenkollektiv dar. Dabei handelt es sich nicht um ein selektives Patientengut, sondern um ein zufällig ausgewähltes Patientenkollektiv in Form einer Stichprobe, deren prozentuale Verteilung hinsichtlich ihrer Tumorcharakteristika mit denen der Literatur übereinstimmt<sup>98,102</sup>.

#### 4.2. Bedeutung der Reproduzierbarkeit DNA-zytometrischer Daten

Zu Beginn der durchzuführenden DNA-Analysen stellten wir ein Kontrollkollektiv aus verschiedenen Mammakarzinomen zusammen, an dem unser repräsentatives Patientengut überprüft werden konnte. Das DNA-Profil an menschlichen Tumorzellen ist eine objektiv messbare Größe und gut reproduzierbar<sup>66,67</sup>.

Die methodische Reproduzierbarkeit der DNA-Bildanalysen ist hier von besonderem Stellenwert, da es aufgrund von starken individuellen Schwankungen zu unterschiedlichen Messergebnissen und damit zu falschen Ergebnissen kommen kann<sup>68,40</sup>. Wir prüften dazu die Übereinstimmung zwischen zwei Messungen (*Interobserver agreement*), indem die Mammakarzinome von zwei unabhängigen erfahrenen Untersuchern getrennt zytometrisch untersucht wurden. An insgesamt 85 Fällen betrug die *Interobserver agreement* 98 % (83 Fälle). In 2 % (2 Fälle) entschieden sich die Untersucher für angrenzende DNA-Profile. Die mehrmalige Messung eines Befundes durch einen Untersucher (*Intraobserver agreement*) ergab ebenfalls eine hohe Übereinstimmung.

Zur näheren Betrachtung der Objektivierbarkeit der statischen DNA-Zytometrie als international gängige Methode, sind in der Literatur ebenfalls Vergleichsmessungen zwischen unabhängigen Messpersonen in verschiedenen Instituten beschrieben. In einer Arbeit wurde die Interobserver- und Intraobserver-Übereinstimmung an 361 Mammakarzinomen geprüft; dabei zeigte sich eine Interobserver- und Intraobserver-Übereinstimmung von 70 %<sup>68</sup>.

## II. Moderne Prognoseparameter

### 4.3. Aneuploidiegrad als Malignitätsmarker

Der Begriff „Aneuploidie“ beschreibt eine vom normalen Chromosomensatz abweichende Chromosomenzahl des Zellkerns menschlicher Zellen und wird zur Beurteilung der Proliferationsaktivität maligner Zellen herangezogen. Die Aneuploidie wird heute als zuverlässiger Marker für das Vorliegen *neoplastisch transformierter Zellen* angesehen, wenn andere bekannte Ursachen für eine Aneuploidie, wie beispielsweise der Einfluß ionisierender Strahlen oder Zytostatikagaben, ausgeschlossen sind.

Zahlreiche Studien an unterschiedlichen Neoplasien bestätigen, daß ein höherer Aneuploidiegrad im Zellkern mit einer höheren Malignität und damit schlechteren Prognose der Tumorerkrankung assoziiert ist. Der Nachweis von DNA-Aneuploidie läßt in vielen Fällen die Diagnose eines neoplastischen Wachstums zu, denn maligne Transformationen werden stets durch aneuploide Kernveränderungen angekündigt<sup>69,70</sup>. Im Bereich der Onkologie kann der Aneuploidiegrad in Grenzfällen der zusätzlichen Dignitätsdiagnostik dienen und ergänzend zu gewöhnlichen klinischen und morphologischen Parametern prämaligne von malignen Veränderungen unterscheiden.

Zur Bestimmung des Aneuploidiegrades haben wir den DNA-Gehalt einer Tumorzelle mittels computerassistierter DNA-Bildanalyse (statische DNA-Zytometrie) quantitativ gemessen und analysiert. Unter den durch DNA-Bildanalyse bestimmbaren Parametern hat der Anteil *aneuploider (Zellen > 5c) und hochaneuploider Zellen (Zellen > 9c)* in einer Tumorphilipulation eine wichtige Bedeutung erlangt<sup>45,71</sup>. Da sich der DNA-Gehalt aneuploider und hochaneuploider Zellen nicht im Bereich ganzzahliger Potenzen befindet und einen abnormen gesteigerten DNA-Gehalt aufweist, wird ihnen eine maligne Potenz zugeschrieben. Aus diesem Grund wählten wir in unserer Arbeit die Anzahl aneuploider Zellen > 5c und hochaneuploider Zellen > 9c als Untersuchungsparameter aus, um das Verhaltensmuster maligner Zellen am Beispiel des Mammakarzinoms präziser definieren zu können.

#### 4.4. Auer-Klassifikation als unzureichende Einteilungsmethode

Histogramme stellen den mittels DNA-Bildanalyse gemessenen DNA-Gehalt einer Tumorphilpopulation graphisch dar. In Abhängigkeit vom DNA-Profil eines Histogramms (euploid oder aneuploid) haben *Auer et al.*<sup>104</sup> erstmals im Jahre 1980 die **Histogrammklassifikation nach Auer** entwickelt. Diese Klassifikation sieht eine Einteilung in vier prognostisch unterschiedliche Gruppen vor (Auer I-IV) (**Tabelle 6**). Histogramme vom Typ Auer I und Auer II werden als euploid und solche vom Typ Auer III und Auer IV als aneuploid gewertet. Auer postuliert in seinen Studien, daß Patientinnen mit Mammakarzinomen der Auer-Gruppe I und II eine ungleich bessere Prognose haben als Patientinnen mit einem Karzinom der Auer-Gruppe III und IV<sup>72, 84</sup>.

Anhand der Histogrammtypisierung nach Auer wird heute eine Prognoseabschätzung verschiedenster Mammakarzinome vorgenommen. Vergleichende Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Auer-Klassifikation wurden publiziert und ergaben einen hohen Grad an Übereinstimmung und Signifikanz<sup>73,74, 75,101,102</sup>.

Für die vergleichende Untersuchung der Mammakarzinome teilten wir die DNA-Histogramme unseres Patientenkollektivs nach der Auer-Klassifikation ein. Gemäß der Auer-Klassifikation konnten etwa 14 % der Patientinnen der Auer-Gruppe I und II (low-risk), hingegen 86 % der Patientinnen der Auer-Gruppe III und IV (high-risk) zugeordnet werden. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß Patientinnen der low-risk Gruppe im Vergleich zur high-risk Gruppe gleich hohe Rezidivraten aufweisen (27 % versus 29 %). Desweiteren ergibt sich bezüglich der Überlebensrate keine Signifikanz, denn nach 5 Jahren sind 11 % der Patientinnen der low-risk Gruppe und 15 % der high-risk Gruppe verstorben. Die statistische Auswertung an Überlebenskurven für das rezidivfreie Intervall und Gesamtüberleben ergibt keine signifikanten Prognoseeinschätzungen für das Patientenkollektiv.

Die prozentual ungleiche Verteilung gemäß der Auer-Klassifikation verdeutlicht, daß die überwiegende Mehrheit (86 %) der Patientinnen in die prognostisch ungünstige Gruppe der Mammakarzinome fallen. Die detaillierte Analyse dieses Hochrisikokollektivs zeigt aber, daß es sich bei dem zu untersuchenden Patientengut um ein nicht einheitlich

definierbares Patientengut handelt. Vielmehr umfaßt es einen uneinheitlichen Pool verschiedenster Mammakarzinome mit jeweils unterschiedlichen individuellen Tumorcharakteristika, die im Rahmen der Auer-Klassifikation nicht gesondert berücksichtigt werden können.

Die Auer-Klassifikation stellt nach unseren Ergebnissen eine nur sehr grobe Einteilungsmethode dar und erbringt keine überzeugende Risikoabschätzung in den großen Pool unklassifizierbarer Mammakarzinome. Parallel zu einigen anderen Autoren können wir anhand der Auer-Klassifikation keine Übereinstimmung mit dem tatsächlichen klinischen Erkrankungsverlauf bestätigen und können uns damit den übereinstimmenden Ergebnissen nicht anschließen<sup>76,68</sup>.

Zusammenfassend ist eine zuverlässige Einschätzung des individuellen Risikos für Patientinnen mit Mammakarzinomen anhand der alleinigen Anwendung der bisher etablierten Auer-Klassifikation nicht ausreichend bzw. nicht möglich. Verderio et al. zeigt in seiner Untersuchung, daß die Auer-Klassifikation nicht reproduzierbar ist und schlägt die Ausarbeitung alternativer Klassifikationen in der Zukunft vor<sup>77</sup>.

Da das Mammakarzinom in biologischer und klinischer Hinsicht eine sehr heterogene Erkrankung ist, veranlaßte diese Problematik zu intensiven Überlegungen, inwieweit eine präzisere Patienteneinteilung in „risikoadaptierte Subkollektive“ möglich ist. Auf dieser Grundlage basiert der Gedanke über die Notwendigkeit einer Subklassifizierung der Mammakarzinome anhand eines modernen Prognosefaktors, der im Besonderen die Hochrisikogruppe der Mammakarzinome näher zu definieren vermag. Hierzu haben wir den *Aneuploidiegrad* als neu etablierten Prognosemarker herangezogen und den Schwerpunkt auf den relativen Anteil aneuploider und hochaneuploider Tumorzellen (> 5c und > 9c) einer Karzinompopulation gelegt.

Anhand des DNA-Profiles eines Histogramms ermittelten wir den prozentualen Anteil aneuploider und hochaneuploider Tumorzellen und verglichen den Aneuploidiegrad mit dem klinischen Tumorverlauf. Um den Anteil aneuploider und hochaneuploider Zellen zu präzisieren, entwickelten wir einen statistischen Grenzwert (cut-off) und definierten prognostisch unterschiedliche Risikogruppen mit vergleichbarem Aneuploidiegrad. Statistische Grenzwerte (cut-off's) können nach dem Prinzip der ROC-Analyse („Receiver

Operating Characteristic“) für die höchstmögliche Sensitivität und Spezifität errechnet werden. Die statistische Grenzwertfestlegung ergab in unserer Arbeit einen signifikanten Prognosesprung für aneuploide Zellen  $> 5c$  bei einem cut-off von 10 Zellen ( $p < 0,0010$ ) und für hochaneuploide Zellen  $> 9c$  bei einem cut-off von 1 Zelle ( $p < 0,0015$ ).

Anhand dieses cut-off's wird im nachfolgenden Kapitel die prognostische Wertigkeit der Aneuploidie als moderner Prognosemarker den bereits etablierten klassischen Prognoseparametern gegenübergestellt und in seinem Stellenwert diskutiert.

### III. Klassische Prognoseparameter

#### 4.5. Prognostische Bedeutung klassischer Prognoseparameter

Prognoseparameter werden zur präziseren Klassifikation eines Mammakarzinoms herangezogen. Die Bestimmung von Prognoseparametern beim Mammakarzinom hat das Ziel, den prospektiven Krankheitsverlauf einer an einem Mammakarzinom erkrankten Frau möglichst genau abschätzen zu können. Zu diesen bisher etablierten Parametern gehören insbesondere das Ausbreitungsstadium eines Tumors (TNM-Stadium mit Tumorgröße, axillärer Nodalstatus und Metastasierung), das individuelle Wachstumsmuster (histopathologischer Typ und Grading) und weitere biologische Merkmale (Hormonrezeptorstatus und Proliferationskinetik).

Im Folgenden werden diese einzeln erörtert und anschließend in ihrem prädiktivem Wert mit dem Aneuploidiegrad verglichen.

##### 4.5.1. Histologische Tumortypen

In unserem Kollektiv finden sich 85 % invasiv duktales Mammakarzinome, 8 % invasiv lobuläre Karzinome, 2 % muzinöse Karzinome, 2 % medulläre Karzinome und in jeweils 0,3 % papilläre und spindelzellige Mammakarzinome. Karzinomvorstufen wie das Carcinoma ductale in situ (2 %) und Carcinoma lobulare in situ (1 %) sind selten.

Laut Literaturangaben ist unter den invasiven Mammakarzinomen das invasiv duktales Karzinom mit 65-85 % der bei weitem häufigste histologische Tumortyp. In der Häufigkeit folgen das invasiv lobuläre Karzinom mit 5-20 % und die Sonderformen wie das medulläre (3 %), das tubuläre (1-15 %), das muzinöse (1-2 %) und das papilläre (1-7 %) Mammakarzinom. Unter den invasiven Mammakarzinomen gelten das tubuläre, das papilläre und das muzinöse Karzinom als prognostisch günstig mit einer 5-Jahresüberlebensrate von ca. 95 %<sup>23,78</sup>.

Ähnliche Angaben wurde in einem Bericht des National Cancer Institute der USA von *Berg und Hutter*<sup>79</sup> (1995) über die Inzidenz und 5-Jahresüberlebensraten von 158 621

invasiven und 10 639 nicht invasiven Mammakarzinomen der Jahre 1973-1987 veröffentlicht. Hier zeigt die häufigste Gruppe der invasiv duktalem Mammakarzinome eine Inzidenz von 68 %, es folgen die lobulären Karzinome mit 6 %, die medullären Karzinome mit 3 %, die muzinösen Karzinome mit 2 %, die papillären Karzinome mit 1 % und die tubulären Karzinome mit 1 %. Damit entspricht die prozentuale Verteilung der histologischen Tumortypen unseres Kollektivs weitgehend den Literaturangaben.

Da invasiv duktalem und invasiv lobuläre Mammakarzinome die häufigsten histologischen Tumortypen darstellen, werden sie in dieser Studie hinsichtlich ihrer Prognose besonders beleuchtet. In unserer Arbeit erleiden Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinomen signifikant häufiger Rezidive (31 %) als Patientinnen mit invasiv lobulären Mammakarzinomen (12 %). Nach unseren Ergebnissen scheinen invasiv lobuläre Karzinome ebenfalls eine günstigere Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens zu haben. Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) beträgt hier etwa 90 % im Vergleich zu invasiv duktalem Karzinomen mit einer 5-JÜR von etwa 75 %.

Es ist bereits in Studien belegt, daß invasiv lobuläre Mammakarzinome aufgrund ihres geringeren Malignitätsgrades, des diploiden DNA-Profiles, der niedrigeren Tumorproliferation und der geringeren Metastasierungstendenz eine biologisch günstigere Prognose aufweisen als invasiv duktalem Mammakarzinome. Die histomorphologischen Unterschiede bedingen einen deutlichen Prognoseunterschied für die 5-JÜR der Patientinnen. Entsprechend zeigen sich folgende Überlebensdaten in der Literatur: invasiv duktalem Mammakarzinome weisen mit einer 5-JÜR von 63-79 % eine deutlich ungünstigere Prognose auf als invasiv lobuläre Mammakarzinome mit einer 5-JÜR von 78-84 %. Die 5-JÜR der medullären Mammakarzinome beträgt 82 %, die der muzinösen und papillären Karzinome 95 % und die der tubulären Karzinome etwa 96 %<sup>79, 80</sup>.

Bezüglich des *Aneuploidiegrades* weisen invasiv duktalem Mammakarzinome einen höheren aneuploiden DNA-Gehalt auf als invasiv lobuläre Karzinome mit diploidem DNA-Gehalt. Abhängig vom histologischen Tumortyp konnte parallel zu unserem Ergebnis gezeigt werden, daß invasiv duktalem Mammakarzinome in 34 % einen diploiden und in 66 % einen aneuploiden DNA-Gehalt haben; invasiv lobuläre Karzinome hingegen in circa 71 % einen

diploiden und in 29 % einen aneuploiden DNA-Gehalt. Tubuläre, muzinöse und papilläre Mammakarzinome sind vorwiegend diploid, medulläre Karzinome zumeist aneuploid<sup>81</sup>.

Um diesen Prognoseunterschied innerhalb der Tumortypen zu verifizieren, verglichen wir die mediane Anzahl aneuploider ( $> 5c$ ) und hochaneuploider Zellen ( $> 9c$ ) bei invasiv duktalem und invasiv lobulärem Mammakarzinomen. Invasiv duktales Mammakarzinome weisen signifikant mehr aneuploide und hochaneuploide Zellen auf als invasiv lobuläre Mammakarzinome (15 Zellen und 2 Zellen vs. 2 Zellen und 0 Zellen). Die Anwesenheit hochaneuploider Tumorphysen unterstreicht das aggressivere Tumorverhalten invasiv duktales Mammakarzinome im Vergleich zu invasiv lobulären Karzinomen.

#### 4.5.2. Tumorgröße

In unserer Arbeit sind bezogen auf die Tumorgröße der Mammakarzinome 34 % der Patientinnen dem T1-Stadium, 48 % dem T2-Stadium, 6 % dem T3-Stadium und 12 % dem T4-Stadium zuzuordnen. Hier zeigt sich mit zunehmender Tumorgröße bei Erstdiagnose eine schlechtere Prognose bezüglich des DFS und OS ( $p < 0,000$  und  $p < 0,009$ ). Parallel dazu beträgt die 5-JÜR für T1-Karzinome etwa 85 %, für T2-Karzinome 77 % und für die prognostisch ungünstigen T3- / T4-Karzinome 30 %.

Der direkte Zusammenhang zwischen zunehmender Tumorgröße und der Verschlechterung der Prognose beim Mammakarzinom konnte durch Carter et al.<sup>82</sup> nachgewiesen werden. In einer retrospektiven Aufarbeitung der Krankheitsverläufe 13 464 nodal negativer Patientinnen wurde bei T1-Tumoren (43 %) eine 5-JÜR von 97 %, bei T2-Tumoren (51 %) von 87 % und T3-Tumoren (6 %) von 82 % errechnet. Hiermit zeigt sich, daß die Verteilung der Tumorgröße und der Überlebensraten unseres Kollektivs weitgehend bisher publizierten Arbeiten entspricht<sup>86</sup>.

Mithilfe des *Aneuploidiegrades* können wir in Abhängigkeit von der Tumorgröße einzelne Subkollektive definieren. Innerhalb der T1-/T2-Karzinome haben Patientinnen mit einer niedrigen Aneuploidierate eine günstigere Prognose als diejenigen mit hoher Aneuploidierate. Dasselbe ergibt sich für das T3-/T4-Tumorstadium.

#### 4.5.3. Nodalstatus

Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus der stärkste Prädiktor für das Auftreten eines Rezidivs und das Gesamtüberleben erkrankter Frauen<sup>86</sup>. Bei circa 40 % aller invasiven Mammakarzinome werden axilläre Lymphknotenmetastasen gefunden<sup>83</sup>.

In unserem Kollektiv ist die prozentuale Verteilung nodal negativer (49 %) und nodal positiver (51 %) Patientinnen etwa gleich groß. Nodal negative Patientinnen (N0) haben ein signifikant längeres DFS und OS im Vergleich zu nodal positiven Patientinnen (N1 und N2/N3). Innerhalb der ersten 5 Jahre erlitten 41 % der nodal negativen Patientinnen ein Rezidiv. Im Vergleich dazu sind es bei nodal positiven Patientinnen etwa 62 % im N1-Status und 75 % im N2-/N3-Status. Die 5-JÜR beträgt nach unseren Ergebnissen 81 % beim N0-Status, 54 % beim N1- und 55 % beim N2-/N3-Status. Diese Ergebnisse entsprechen den Angaben anderer Studienergebnisse<sup>84, 85, 86</sup>.

Es kann gezeigt werden, daß insbesondere bei nodal negativen und nodal positiven Frauen der DNA-Gehalt und die Proliferationsaktivität einer Tumorzelle mittels DNA-Zytometrie als prognostischer Marker eingesetzt werden kann<sup>102</sup>.

Ein wesentliche Kernpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der prognostischen Bedeutung des *Aneuploidiegrades* bei nodal negativen und nodal positiven Mammakarzinomen. In Abhängigkeit vom Nodalstatus zeigen Patientinnen des N0-Status eine signifikant geringere mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen (2 Zellen und 1 Zelle) als nodal positiven Frauen des N1- (13 Zellen und 2 Zellen) oder N2-Status (29 Zellen und 5 Zellen). Die Folgerung unserer Analyse ist dahingehend, daß nodal negative Frauen mit hoher Aneuploidierate bezüglich ihrer Prognose nodal positiven Frauen mit niedriger Aneuploidierate gleichzusetzen sind. Dies bedeutet, daß Patientinnen mit hohem Aneuploidiegrad unabhängig von ihrem Nodalstatus ähnlich kurze rezidivfreie Intervalle aufweisen wie Frauen mit niedrigem Aneuploidiegrad.

In der Arbeit von Steinbeck et al.<sup>72</sup> wird die Bedeutung der Aneuploidie als zusätzlich prognostischer Marker innerhalb nodal negativer und nodal positiver Kollektive hervorgehoben. Mithilfe der DNA-Analyse können Patienten mit unterschiedlichem

Lymphknotenstatus bezüglich ihrer Prognose in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Patientinnen mit diploiden Tumoren und negativem Nodalstatus haben mit 95 % eine ausgezeichnete 10-JÜR. Dagegen beträgt die 10-JÜR bei aneuploiden Tumoren und positivem Nodalstatus weniger als 41 %. Diploide Tumoren mit nodal positivem Lymphknotenstatus weisen noch eine gute 10-JÜR mit 76 % auf.

#### 4.5.4. Histologisches Grading

Das histologische Grading des Mammakarzinoms ist als Prognoseparameter international anerkannt und weist einen hohen Stellenwert auf.

Im Pathologischen Institut unserer Klinik wurde nach internationalen Richtlinien die Malignitätsgraduierung zur Beurteilung des histologischen Gradings *nach Bloom und Richardson*<sup>25</sup> herangezogen. In 12 % (n = 38) wurden hoch differenzierte G1-Tumoren, in 45 % (n = 140) mittelgradig differenzierte G2-Tumoren und in 35 % (n = 111) niedrig differenzierte G3-Tumoren diagnostiziert. Unsere Ergebnisse verdeutlichen die prozentuale Verteilung des histologischen Gradings zugunsten der mittelgradig differenzierten G2-Mammakarzinome.

Unsere Ergebnisse zeigen übereinstimmend mit den aus der Literatur bekannten Angaben<sup>86</sup> eine hochsignifikante Korrelation des histologischen Differenzierungsgrades zum rezidivfreien Intervall und Gesamtüberleben, denn mit abnehmendem Differenzierungsgrad verkürzt sich das DFS und OS entscheidend. Die 5-JÜR beträgt bei den G1-Karzinomen etwa 98 %, bei G2-Karzinomen 82 % und bei G3-Karzinomen 68 %.

Bezüglich des *Aneuploidiegrades* zeigt sich sehr deutlich, daß die mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad schwankt. G1-Karzinome (16 Zellen und 3 Zellen) haben eine signifikant geringere Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen als G2-Karzinome (18 Zellen und 5 Zellen) und G3-Karzinome (24 Zellen und 8 Zellen).

Das Wachstumsverhalten von Tumoren wird durch das histopathologische Grading *nach Bloom und Richardson*<sup>25</sup> erfaßt. Hierbei wird anhand von verschiedenen morphologischen Kriterien (Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate) ein sogenannter Summenscore ermittelt, der die Aggressivität des Tumors widerspiegelt. Dieser Score unterliegt der **Subjektivität des jeweiligen Untersuchers** und ist somit schwer objektivierbar. Nicht immer ist eine sichere Identifikation der in der Mitosephase befindlichen Zellen möglich. Hyperchromasie, fragmentierte und pyknotische Zellkerne sowie die Ermittlung der Mitoserate aus vermutet repräsentativen Gesichtsfeldern können zu ungenauen Bestimmungen der mitotischen Aktivität und damit zu Fehleinschätzungen des Wachstumsverhaltens führen. In diesem Rahmen belegt die vergleichende Studie von Prechtel<sup>87</sup> im Jahre 1992 in Zusammenarbeit mit drei erfahrenen Pathologen, daß die Beurteilung des Malignitätsgrades nicht objektivierbar ist. An 460 Mammakarzinomen erfolgte hier nach einem Grading im Rahmen der Routinediagnostik ein Re-Grading dieser Fälle, die im Vergleich zur Erstuntersuchung Streuwerte zwischen 5 % und 23,5 % ergab. Studienergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen beleuchten diese Problematik im Besonderen, denn hier untersuchten 25 Pathologen unabhängig voneinander den Differenzierungsgrad invasiver Mammakarzinome. In nur 87 % kam es zur übereinstimmenden Zuordnung (Interobserver agreement) des histologischen Gradings<sup>88,89</sup>. Die individuellen Schwankungsbreiten variieren erheblich innerhalb der einzelnen Differenzierungsgrade : In der G1-Gruppe beträgt sie 17-28 %, in der G2-Gruppe etwa 34-57 % und in der G3-Gruppe 29-47 %. In Intraobservertests wurde eine Übereinstimmung in 60-80 % der Fälle gefunden. Die Reproduzierbarkeit des Gradings liegt nach Guski et al. bei 72,7 % für den gleichen Untersucher und bei circa 63,3 % für verschiedene Pathologen<sup>90</sup>.

Das Grading ist demnach eine semiquantitative Methode, die dem subjektiven Einfluß des Pathologen unterliegt, die wiederum durch Sorgfalt und Erfahrung des Untersuchers weitgehend determiniert werden kann.

Mittelgradig differenzierte G2-Mammakarzinome (n = 140) stellen mit 45 % den mit Abstand häufigsten Differenzierungsgrad innerhalb unseres Patientenkollektivs dar. Diese Diskrepanz zeigt eine offensichtliche Überbewertung der G2-Karzinome bei einer Unterschätzung der übrigen Malignitätsgrade, welches Ausdruck eines subjektiven Einflusses bei der histologischen Begutachtung ist.

Parallel zu der in unserem Kollektiv repräsentierten Verteilung der Differenzierungsgrade zeigen Vergleichsstudien eine ähnliche Verteilung mit 3 % G1-Karzinomen, 66 % G2-Karzinomen und 31 % G3-Karzinomen<sup>91</sup>. Insbesondere die Klassifizierung zahlreicher Karzinome in die Gruppe der mittelgradig differenzierten G2-Karzinome spiegelt das Problem morphologisch schwer graduierbarer Karzinome wider. Hierzu tragen verschiedene Faktoren bei :

1. Es finden sich morphologisch schwer oder nicht klassifizierbare Karzinome und
2. die mittelgradige Differenzierung wird oft zur Ausschlußdiagnose von G1- und G3-Karzinomen gewählt.

Um eine einheitliche Gliederung innerhalb dieses G2-Kollektivs herbeizuführen, untersuchen wir anhand des *Aneuploidiegrades*, inwieweit die DNA-Bildanalyse als moderner Prognoseparameter zu einer präziseren Subtypisierung in dieser Problemgruppe führt. G2-Karzinome können abhängig von ihrer Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen in Risikogruppen eingeteilt werden : 54 % der Patientinnen (n = 75) gehören 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 dagegen 28 % (n = 18); verstorben sind 1 % (n = 1) in der ersteren und 11 % (n = 7) in der letzteren Gruppe.

Unsere Ergebnisse bestätigen, daß die Ermittlung der Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen in der biologisch heterogenen Gruppe der G2-Tumoren eine präzisere Klassifizierung herbeiführt und individuelle therapeutische Entscheidungen erleichtern kann. Somit hat sich die prognostische Typisierung in Subkollektive als wertvoller Ansatz zur Differenzierung nicht klassifizierbarer G2-Karzinome herausgestellt.

#### 4.5.5. Wachstumsfraktion

Untersuchungen der Wachstumsdynamik von Tumoren sind von großer Bedeutung für das Verständnis der Biologie und des natürlichen Verlaufs maligner Erkrankungen. Zur Bestimmung der Wachstumsfraktion hat sich der immunhistochemisch darstellbare Antikörper Ki-67 als sensibler Proliferationsaktivitätsmarker erwiesen<sup>29,92</sup>.

In unserer Arbeit konnte die Grenzwertfestlegung mit einem cut-off Wert mittels ROC-Analyse für jeweils zwei Risikogruppen statistisch definiert werden. Bei einer Positivität des Ki-67 Antigens in  $\leq 20$  % liegt in unserer Studie ein niedriges Risiko und bei Werten  $> 20$  % ein hohes Risiko vor. Anhand dieses cut-off's kann das Kollektiv in eine Gruppe mit geringer Wachstumsfraktion (63 %) und mit hoher Wachstumsfraktion (37 %) unterteilt werden. In der Literatur wird bezüglich einer Grenzwertfestlegung für die Proliferationsrate beim Mammakarzinom ein cut-off bei  $< 20$  % für low-risk, 20-50 % für mean-risk und  $> 50$  % für high-risk Tumoren gewählt<sup>93</sup>.

In einigen Studien wurde festgestellt, daß Mammakarzinome große Unterschiede in ihren Wachstumsraten aufweisen. Die Wachstumsfraktion zeigt eine breite Streuung und beträgt nach heutigen Kenntnissen für benigne Mammaläsionen 3 % (2,25 - 5 %) und für das Mammakarzinom etwa 14,5 - 19,5 % (6,5 - 60 %)<sup>28,94</sup>.

Den Einfluß des *Aneuploidiegrades* konnten wir in Überlebenskurven verifizieren. Die Aneuploidierate bestimmt in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion Ki-67 das DFS und OS. Patientinnen mit einer niedrigen Wachstumsfraktion bei gleichzeitig niedriger Aneuploidierate haben ein längeres DFS und OS im Vergleich zu Patientinnen mit Karzinomen mit hoher Wachstumsfraktion und hoher Aneuploidie.

#### 4.5.6. Menopausenstatus

In der Arbeit werden prämenopausale Frauen (26 %) altersabhängig von postmenopausalen Frauen (74 %) unterschieden. In Überlebenskurven kann demonstriert werden, daß prämenopausale Frauen eine ungünstigere Prognose bezüglich des Rezidivrisikos und der Gesamtüberlebenszeit aufweisen als postmenopausale Frauen.

In Abhängigkeit vom *Aneuploidiegrad* können wir das prognostisch ungünstigere Kollektiv prämenopausaler Frauen zu 40 % in eine low-risk und zu 60 % in eine high-risk Gruppe unterteilen. 49 % der postmenopausalen Frauen gehören der low-risk und 51 % der high-risk Gruppe an.

Prämenopausale Frauen weisen eine statistisch signifikant höhere mediane Anzahl aneuploider und hochaneuploider Zellen (15 Zellen und 2 Zellen) auf als postmenopausale Frauen (12 Zellen und 1 Zelle).

Die Betrachtung der Korrelation des Nodal- und Menopausenstatus in Abhängigkeit vom Aneuploidiegrad zeigt ein bisher in der gängigen Literatur nicht bekanntes Ergebnis. Prämenopausal nodal negative Frauen mit niedriger Aneuploidierate haben ein kürzeres DFS als prämenopausal nodal negative Frauen mit hoher Aneuploidierate. Dies bedeutet, daß in der Prämenopause der Nodalstatus dem Ploidiegrad überlegen ist. Im Gegensatz dazu, ergibt sich bei postmenopausal nodal negativen Frauen mit hoher Aneuploidie ein kürzeres DFS als bei postmenopausal nodal positiven Frauen mit niedriger Aneuploidie. In der Postmenopause ist der Ploidiegrad dem Nodalstatus eindeutig überlegen. In Kenntnis dieser Tatsache scheint es prognostisch günstiger bei befallenen Lymphknoten eine niedrige Aneuploidierate zu haben als keine befallenen Lymphknoten bei hoher Aneuploidierate. Der Ploidiegrad stellt sich hier als ein prognostisch limitierender Faktor dar.

#### 4.5.7. Hormonrezeptorstatus

Nach einem immunreaktiven histologischen-Score (IRS) *nach Remmele und Stegner*<sup>95</sup>, der die absolute Anzahl positiv angefärbter Zellen pro Sichtfeld und ihre Färbeintensität beurteilt, wird der prozentuale Anteil der Hormonrezeptorexpression ermittelt.

Die Grenzwertfestlegung des Hormonrezeptorstatus mittels cut-off ergibt bei 0 % für high-risk Gruppen, 1-50 % für mean-risk Gruppen und > 50 % für low-risk Gruppen eine signifikante Beziehung der Kollektive untereinander. Insgesamt haben Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen eine ungünstigere Prognose als Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Karzinomen. Bezüglich des Östrogenrezeptorstatus kann gezeigt werden, daß nach knapp 5 Jahren Beobachtungszeit in der low-risk Gruppe 90 %, in der mean-risk Gruppe etwa 85 % und in der high-risk Gruppe nur noch 56 % der Frauen leben. Für den Progesteronrezeptorstatus ergibt sich bei gleichem cut-off eine 5-JÜR von 92 % in der low-risk Gruppe, 77 % in der mean-risk Gruppe und 63 % in der high-risk Gruppe.

Die prognostische Bedeutung der Hormonrezeptorexpression wird in einer Arbeit von Pichon und seinen Mitarbeitern<sup>96</sup> untersucht. Ein Wertigkeitsvergleich für den Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER) versus Progesteronrezeptoren (PR) ergibt, daß bezüglich des Östrogenrezeptorstatus ein signifikanter Unterschied zwischen ER-negativen und ER-positiven Kollektiven im DFS und OS vorliegt.

In den Studien von Esteban et al. wird der prädiktive Wert von immunhistochemisch bestimmten Östrogenrezeptoren untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß Patienten abhängig von definierten Grenzwerten (cut-off) unterschiedlich hohe Risiken haben. Diese cut-off's liegen bei < 5 % für high-risk Patientinnen, zwischen 5 - 15 % und > 15 % für low-risk Patientinnen<sup>97,98</sup>. In zahlreichen Studien wird ein immunhistologischer cut-off von 10 % positiven Zellen angenommen<sup>99,100</sup>.

Bezüglich des *Aneuploidiegrades* läßt sich feststellen, daß Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus und niedriger Aneuploidierate ein längeres rezidivfreies Intervall

und Gesamtüberleben aufweisen als Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus und gleichzeitig hoher Aneuploidierate. Auch hier kann durch die Bestimmung des Aneuploidiegrades eine präzisere Voraussage bezüglich des rezidivfreien Intervalls und der Gesamtüberlebensdauer gemacht werden.

Zusammenfassend kann anhand unserer Ergebnisse gezeigt werden, daß der Aneuploidiegrad im Vergleich zu bereits etablierten Prognosefaktoren eine exaktere Subkollektiveinteilung herbeiführen und das Patientenkollektiv neu definieren kann. Inzwischen gilt der Aneuploidiegrad als neuer moderner Parameter, dessen klinische Relevanz für die Prognose beim Mammakarzinom in zahlreichen Untersuchungen publiziert wurde<sup>101,102</sup>.

Für das Mammakarzinom wurde erstmals von Atkin et al.<sup>103</sup> und Auer et al.<sup>104</sup> eine enge Korrelation der Ploidie von Karzinomzellen mit der Gesamtüberlebenszeit beschrieben. Auch Utada et al.<sup>105</sup> konnten in ihrer Studie eine enge Korrelation zwischen DNA-Ploidie und Überlebensprognose beim Mammakarzinom zeigen. Das von ihnen untersuchte Kollektiv umfaßte 35,2 % (n = 32) diploide und 64,8 % (n = 59) aneuploide Mammakarzinome. Hier war das Gesamtüberleben von Patientinnen mit aneuploiden Karzinomen signifikant schlechter als das der Patientinnen mit diploiden Karzinomen.

#### 4.5.8. Chemotherapie

In Subkollektiven ohne Chemotherapie (n = 27) sind bei prämenopausalen Patientinnen mit negativem Nodalstatus die Anzahl aneuploider Zellen > 5c für das rezidivfreie Intervall bestimmend. Dagegen zeigt sich im Kollektiv prämenopausal nodal positiver Patientinnen mit Chemotherapie (n = 41) die Anzahl hochaneuploider Zellen > 9c für das rezidivfreie Intervall von Bedeutung. Innerhalb dieser reinen Subkollektive spielt die zytometrisch nachgewiesene Aneuploidierate 5c- und 9c-exceeding rate (5c- und 9c-ER) eine übergeordnete prognostische Rolle hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls.

Statistische Untersuchungen zu Rolle von Therapieeffekten beim Mammakarzinom sind bisher nicht in die gängige Literatur eingegangen. Die prognostische Bedeutung der Chemotherapie wird in Subkollektiven nicht verfälscht.

#### IV. Multivariate Analysen

Die Anwendung statistischer Methoden (univariate und multivariate Analysen) kann eine individuelle Risikoabschätzung bezüglich des Krankheitsprogresses voraussagen<sup>63</sup>.

Anhand eines multivariaten Statistikmodells vergleichen wir die Aussagekraft und prognostische Relevanz des Aneuploidiegrades gegen die bereits bekannten Prognoseparameter und die Auer-Klassifikation.

Im Rahmen der multivariaten Analyse finden wir für die prognostische Voraussage bezüglich des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens beim Mammakarzinom vier signifikante Prädiktoren. Diese sind das *histologische Grading*, der *Nodalstatus* und der Aneuploidiegrad mit separater Analyse der *5c- exceeding rate* und *9c- exceeding rate*. In der multivariaten Überlebensanalyse unserer Studie erweist sich das histologische Grading als alleiniger unabhängiger Prognosefaktor noch vor dem Nodalstatus und dem Aneuploidiegrad. In Studien zeigt sich das histologische Grading in der multivariaten Analyse als wichtigsten unabhängigen Faktor bezüglich des Gesamtüberlebens<sup>106</sup>.

Der Nodalstatus erscheint als zweitwichtigster unabhängiger Prognosefaktor. Die multivariate Analyse zeigt ebenfalls, daß der Aneuploidiegrad in seiner Wertigkeit als moderner prognostischer Marker der Auer-Klassifikation eindeutig überlegen ist. Die Auer-Klassifikation erweist sich ohne Bedeutung für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben.

Wir folgern aus unseren Ergebnissen, daß mit den statistisch validen Prädiktoren das Risiko für das Auftreten eines Rezidivs und für den Tod beim primären Mammakarzinom mit akzeptabler Zuverlässigkeit vorausgesagt werden kann. Ebenso hat sich gezeigt, daß die prognostische Wertigkeit des mittels DNA-Zytometrie ermittelten Aneuploidiegrades höher liegt als die der Auer-Klassifikation.