

**Verbesserung der prognostischen Aussagekraft
beim Mammakarzinom durch AgNOR Analyse
von MIB-1 positiven Tumorzellen**

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen
Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin

vorgelegt von
Faraneh Farokhzad
aus
Düsseldorf

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

**Verbesserung der prognostischen Aussagekraft
beim Mammakarzinom durch AgNOR Analyse
von MIB-1 positiven Tumorzellen**

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Faraneh Farokhzad
aus
Düsseldorf

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Stefan Biesterfeld

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Werner Rath

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2003

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2	Prognosefaktoren beim Mammakarzinom	1
1.2.1	Die klassischen Prognosefaktoren.....	1
1.3	Therapie des Mammakarzinoms	5
1.4	Neuere Prognosefaktoren.....	7
1.4.1	NOR-Nukleolus organisierende Regionen	7
1.4.2	Ki-67-ein Proliferationsantigen.....	9
1.5	Zusammenfassendes Fazit des Standes der Forschung.....	10
1.6	Parallele Anwendung von AgNOR- und MIB-1-Analyse zur Bestimmung der Proliferationsaktivität "in vitro".....	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Untersuchungsgut.....	13
2.2	Aufarbeitung des Materials.....	13
2.3	Die Simultanfärbung.....	14
2.3.1	Die MIB-1-Rezeptorfärbung – eine immunhistochemische Technik	14
2.3.1.1	Materialien:	14
2.3.1.2	Allgemeine Richtlinien	14
2.3.1.3	Färbevorgang	15
2.3.2	Die AgNOR-Färbung - eine Versilberungstechnik	15
2.3.2.1	Materialien:	15
2.3.2.2	Allgemeine Richtlinien	16
2.3.2.3	Färbeablauf.....	16
2.3.3	Das Färberesultat	16
2.4	Messung der Präparate.....	17
2.4.1	Das Bildverarbeitungssystem AMBA	17
2.4.2	Interaktive Messung der AgNORs mit dem Programm AMBA\norcolor	17
2.4.2.1	AgNOR-Merkmale	18
2.5	Statistik.....	19

3. ERGEBNISSE	21
3.1 Univariate Überlebensanalyse	21
3.1.1 Tumorstadium	21
3.1.2 Gradierung (G)	25
3.1.3 Hormonrezeptor Status	29
3.2 Übersicht über die MIB-1 und AgNOR Datenverteilung	31
3.2.1 MIB-1 und AgNOR Parameter für alle 89 Patientinnen	33
3.2.1.1 MIB-1 _{mean}	33
3.2.1.2 AgNOR-Parameter	35
3.2.1.2.1 AgNOR-Zahl	35
3.2.1.2.2 AgNOR-Area	37
3.2.2 MIB-1 und AgNOR Parameter der zweiten Meßreihe	39
3.2.2.1 MIB-1 _{mean}	39
3.2.2.1 AgNOR-Parameter	41
3.2.2.1.1 AgNOR-Zahl _{MIB-1pos.}	41
3.2.2.1.2 AgNOR-Area _{MIB-1pos.}	43
3.3 Überprüfung der Brugal-Hypothese	45
3.3.1 Beziehungen der Kombination einzelner Parameter miteinander	45
3.3.1.1 "richtiger Ansatz"	46
3.3.1.2 "Gegenmodell"	50
3.4 Multivariate Analyse: Cox Modelle	54
3.4.1 Vergleich der prognostischen Relevanz der klinischen Parameter mit den Grundgrößen MIB-1, AgNOR-Zahl, AgNOR-Zahl _{MIB-1pos.} , AgNOR-Area und AgNOR-Area _{MIB-1pos.}	54
3.4.2 Multivariate Analyse der neueren Prognosefaktoren	55
4. DISKUSSION	59
4.1 Prognostik des Mammakarzinoms mit klassischen Parametern	59
4.2 Prognostik des Mammakarzinoms durch Bestimmung der Proliferationsfraktion	60
4.3 Nukleolus organisierende Regionen als neue Prognosefaktoren	62
4.4 Konzepte zur klinischen Anwendung	63
4.5 Klinische Umsetzung	65
5. ZUSAMMENFASUNG	69

6. DATENSAMMLUNG	71
7. LITERATUR	83
8. DANKSAGUNG	91
9. LEBENSLAUF	93

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom bildet die häufigste Tumorerkrankung der Frau in den westlichen Industrieländern. Beim Mann kommt das Mammakarzinom äußerst selten vor. Die Mortalität des Mammakarzinoms bei Frauen beträgt ca. 10% (Hölzel et al. 1996).

Das Mammakarzinom repräsentiert somit eine epidemiologisch und sozioökonomisch wesentliche Erkrankung. Insgesamt gesehen sind sehr unterschiedliche Verläufe möglich, die von Heilungen bis zur schnellen Tumorprogression reichen.

1.2 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Generell kann man sagen, daß es keine Prognosefaktoren beim Mammakarzinom gibt, welche genaue Aussagen über den Verlauf der Erkrankung machen. Man kann aber eine Reihe von Faktoren im Zusammenhang betrachten, um den Fall bezüglich seines Verlaufes und seines Rezidivrisikos einschätzen zu können. Eine adjuvante Primärtherapie und adjuvante Therapie wird entsprechend geplant und durchgeführt.

1.2.1 Die klassischen Prognosefaktoren

In der Routine-Diagnostik werden als valide Prognosefaktoren das Staging entsprechend der pTNM-Klassifikation (UICC 1987), das Grading entsprechend Bloom und Richardson (1957) und der Hormonrezeptor Status verwendet.

Die pTNM-Klassifikation (UICC 1987) beschreibt die Tumorausbreitung. Es wird die Größe und Ausdehnung des Tumors (T), der Tumorbefall der regionalen Lymphknoten (N) sowie der Nachweis eventuell vorhandener Tumormetastasen (M) bestimmt.

Das Grading entsprechend Bloom und Richardson beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumors. Es handelt sich um eine Einschätzung der Ähnlichkeit des Tumorgewebes mit dem Ursprungsgewebe. Es gibt 3 verschiedene Stufen, G1-G3, wovon bei G1 das Tumorgewebe dem Ursprungsgewebe ähnelt und sich klinisch gutartiger verhält, als ein G3 Tumor. Der G3 Tumor weist keinerlei

Ähnlichkeit mehr mit dem Ursprungsgewebe auf und zeigt sich klinisch als schneller, infiltrativer und destruierend wachsender Tumor. G2 nimmt eine Zwischenstufe ein.

Eine Schwierigkeit bildet die Subjektivität, mit der die Gradierung vorgenommen wird, wodurch ihre schlechte Reproduzierbarkeit von nur ca. 70% Übereinstimmung zustande kommt (Champion and Wallace 1971, Stenkvist et al. 1979).

Der Hormonrezeptor Status beschreibt die Dichte von Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR). Der größte Nutzen des Hormonrezeptor Status liegt wohl in seiner Aussagekraft über ein mögliches Ansprechen des Tumors auf eine endokrine Therapie und einer dadurch verbesserten Prognose (Paridaens et al. 1980, Dao et al. 1980, McCarty et al. 1990, Andersen et al. 1991, Railo et al. 1993, Esteban et al. 1994).

Bei der Bestimmung der Hormonrezeptoren gibt es zwei konkurrierende Methoden. Seit den siebziger Jahren werden an homogenisiertem Tumorfrischmaterial die ER- und PR-Rezeptoren biochemisch als Konzentration im zytosolischen Kompartiment bestimmt. Demgegenüber steht die immunhistochemische Untersuchung, die seit ca. 1990 auch am Paraffinschnitt möglich ist und bei der im Falle einer ER- oder PR-Expression ein Signal im Zellkern entsteht.

Beide Methoden haben eine Konkordanz der Ergebnisse von ca. 80 % (Biesterfeld et al 1998), so daß sie nicht in allen Fällen als äquivalent anzusehen sind. Derzeit geht demnach der Trend dahin nur eine der beiden Methoden anzuwenden, wobei die immunhistochemische Methode bevorzugt wird.

Die folgenden Daten stammen aus dem Tumorregister München (Hölzel et al. 1996) und zeigen aktuelle Daten zum Mammakarzinom. Es standen die Daten von >13000 Patientinnen mit Follow-up zur Verfügung.

Es zeigt sich, daß die beste Aussage über die Prognose durch die Anzahl der positiven Lymphknoten gemacht werden kann. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Patientinnen ohne positive Lymphknoten bei 96%. Sie vermindert sich auf 37% bei mehr als 15 positiven Lymphknoten.

Tab. 1: Überlebensraten [%] in Abhängigkeit von der Zahl befallener Lymphknoten

	n (Follow up > 5 Jahre)	Abs. 5 Jahresüber- leben	Rel. 5 Jahresüber- leben	Abs. 10 Jahresüber- leben	Rel. 10 Jahresüber- leben
0	732	89	96	77	92
1	143	79	85	59	71
2	96	77	83	55	65
3	66	72	78	51	62
4-6	91	63	68	46	56
7-10	55	50	54	33	39
11-15	23	46	51	16	20
> 15	21	33	37	18	23

Ebenso zeigt sich, daß bei Zunahme der Tumorgroße sich die Überlebensprognose verschlechtert.

Tab. 2: Überlebensraten [%] in Abhängigkeit von der Tumorgroße

	n (Follow up > 5 Jahre)	Abs. 5 Jahresüber- leben	Rel. 5 Jahresüber- leben	Abs. 10 Jahresüber- leben	Rel. 10 Jahresüber- leben
pT1	844	91	99	77	94
pT2	429	79	87	59	74
pT3	39	75	82	53	65
pT4	34	58	71	43	67

Beim Grading zeigt sich ebenfalls ein Abfall der 5-Jahres-Überlebensrate bei Abnahme des Differenzierungsgrades (100% bei G1, 67% bei G3).

Tab. 3: Überlebensraten [%] in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung

	n (Follow up > 5 Jahre)	Abs. 5 Jahresüber- leben	Rel. 5 Jahresüber- leben	Abs. 10 Jahresüber- leben	Rel. 10 Jahresüber- leben
G1	104	91	100	76	94
G2	799	78	86	57	71
G3	314	62	67	44	54

Beim Hormonrezeptorstatus zeigt sich, daß die Prognose beim ER Rezeptor bis ca. 25 fmol/mgP ansteigt und danach annähernd gleich bleibt.

Tab. 4: Überlebensraten [%] in Abhängigkeit von der ER Rezeptor Expression

	n (Follow up > 5 Jahre)	Abs. 5 Jahresüber- leben	Rel. 5 Jahresüber- leben	Abs. 10 Jahresüber- leben	Rel. 10 Jahresüber- leben
ER<10 fmol/mgP	85	61	65	52	61
ER<10-19 fmol/mgP	90	73	78	67	79
ER<20-29 fmol/mgP	73	81	86	69	79
ER<30-49 fmol/mgP	112	83	90	73	86
ER<50-99 fmol/mgP	115	83	91	62	76
ER>99 fmol/mgP	232	77	90	54	77

Beim PR Rezeptor sieht es ähnlich aus, die Grenze liegt hier bei 15 fmol/mgP.

Tab. 5: Überlebensraten [%] in Abhängigkeit von der PR Rezeptor Expression

	n (Follow up > 5 Jahre)	Abs. 5 Jahresüber- leben	Rel. 5 Jahresüber- leben	Abs. 10 Jahresüber- leben	Rel. 10 Jahresüber- leben
PR<10 fmol/mgP	81	57	63	49	61
PR<10-19 fmol/mgP	100	79	86	62	76
PR<20-49 fmol/mgP	147	80	88	67	83
PR<50-99 fmol/mgP	115	80	87	73	88
PR>99 fmol/mgP	225	81	90	66	84

Die Ergebnisse betrachten die Prognosefaktoren nur als einzelne Komponenten (univariat). Man kann daher keine Aussage über ihre Korrelationen machen.

Es zeigt sich, daß Frauen, die an einem Mammakarzinom leiden, häufig länger leben als Frauen mit anderen bösartigen Erkrankungen. Unbehandelte Patientinnen weisen eine durchschnittliche Lebensdauer von 3,5 Jahren auf. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit unbehandelter Patientinnen beträgt 22%, die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 5%. Bei behandelten Patientinnen hat man dagegen eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 74% und eine 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 52%.

1.3 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapieplanung des Mammakarzioms beruht auf den klassischen Prognosefaktoren. Je nach Ausbreitung, Gradierung und Hormonrezeptorstatus stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

Lokal wird das Mammakarzinom operativ behandelt. In Abhängigkeit von der Tumorgroße bzw. dem Verhältnis von Brustgröße zur Tumorgroße werden je nach Tumorstadium abgestufte chirurgische Verfahren eingesetzt (vgl. Untch et al. 2000).

Derzeit werden 50-80% der Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom brusterhaltend therapiert. Eine gleichzeitige axilliäre Lymphonodektomie ist erforderlich. Eine brusterhaltende Therapie (BET) kann bei multizentrischen Karzinomen, inflammatorischen Karzinomen, bei Lymphangiosis cacinomatosa, bei ausgedehntem DCIS sowie bei ungünstigem Verhältnis von Brustgröße zur Tumorgroße nicht durchgeführt werden. In diesen Fällen ist eine modifizierte radikale Mastektomie indiziert. Die radikale Mastektomie wird in der Regel nicht mehr durchgeführt.

Nach BET ist die Radiotherapie der Brust mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy (Einzeldosis 1,8 Gy) sowie einem Boost mit einer Gesamtdosis von 10 Gy (Einzeldosis 2 Gy) obligat. Es ist nachgewiesen, daß eine adjuvante Radiotherapie die Überlebensrate statistisch signifikant erhöht. Vor allem trägt sie zu einer Reduzierung der Quote von Lokalrezidiven von 35% auf 10% bei (Untch et al. 2000). Auf eine Radiotherapie kann nur verzichtet werden, wenn alle Anforderungen der folgenden Konstellation erfüllt sind:

- Tumorgroße < 1cm ohne Lymphangiose; G1
- Keine extensive intraduktale Komponente
- Positiver Östrogen- und Progesteronstatus
- pN0 Axilla
- Postmenopausenstatus

Die postoperative Radiotherapie sollte nicht mit einer Chemotherapie kombiniert werden (außer CMF-Schema), da vermehrt Nebenwirkungen beschrieben worden sind. Adjuvant systemisch wird das Mammakarzinom in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus behandelt.

Beim nodalnegativen, hormonrezeptornegativen Mammakarzinom werden Patientinnen, deren Tumorrisiko als niedrig eingestuft wird, nicht therapiert. Jede andere Risikostufe bei diesen Patientinnen wird durch Chemotherapie (Cyclophosphamid, Methotrexat und Fluoruracil (CMF), Epirubicin und Cyclophosphamid (EC) oder Fluoruracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC)) behandelt.

Beim nodalnegativen, hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom werden prämenopausale Patientinnen, deren Tumorrisiko als niedrig eingestuft wird, mit Ovarialablation +/- Tamoxifen behandelt, bei jeder anderen Risikostufe mit Tamoxifen +/- GnRH-Analoga +/- Chemotherapie (s.o.). Postmenopausale Patientinnen mit niedrigem Tumorrisiko werden mit Tamoxifen behandelt. Bei jeder anderen Risikostufe werden sie mit Tamoxifen +/- Chemotherapie behandelt.

Beim nodalpositiven, hormonrezeptornegativen Mammakarzinom ist eine Therapie mit CT indiziert. Bei nodalpositivem, hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom besteht bei prämenopausalen Patientinnen nach individueller Abschätzung des Risikos die Möglichkeit einer Behandlung mit Chemotherapie (s. o.) und Tamoxifen, mit Ovarialablation und/oder Tamoxifen sowie mit Kombinationen aus diesen Möglichkeiten. Postmenopausale Patientinnen werden mit CT und Tamoxifen behandelt.

1.4 Neuere Prognosefaktoren

Ergänzend zu Stadium, Tumordifferenzierung und Hormonrezeptorstatus werden derzeit diverse morphologische Parameter, darunter p53, HER/2-neu und EGFR in der Prognostik des Mammakarzinoms erprobt. Da vielfach widersprüchliche Ergebnisse berichtet wurden bzw. methodische Vorbehalte nicht ausgeräumt werden konnten, haben sich diese Verfahren bislang noch nicht in der Routine etablieren können.

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein neuer Ansatz vorgestellt werden, bei dem zwei Teilaspekte der für die Tumorprogression anerkannten Proliferation synergistisch koppeln soll, nämlich die parallele Betrachtung der AgNOR-Ausstattung und der Expression des Proliferationsmarkers MIB-1. Beide Verfahren sollen im folgenden zunächst einzeln erläutert werden.

1.4.1 NOR-Nukleolus organisierende Regionen

Bei den NORs handelt es sich um Nukleolus organisierende Regionen. Die Bezeichnung geht auf Heitz (1931) zurück, welcher Zellzyklusanalysen an Pflanzenzellen durchführte. Ferguson-Smith (1964) führte analoge Analysen an menschlichen Chromosomen durch und stieß auf das gleiche Phänomen. Es handelt sich um schleifenartig angeordnete Kernproteine, auf denen die ribosomalen Gene (r-DNA) liegen. Sie sind verantwortlich für die Synthese ribosomaler Ribonukleinsäuren, daher auch der Name „Ribosomenfabrik“ der Zelle. Insofern

haben sie somit eine wichtige Bedeutung für die gesamte Proteinbiosynthese (Fakan und Hernandez-Verdun 1986). Die r-DNA ist auf den Satelliten der akrozentrischen Chromosomen lokalisiert (Gruppe D: 13-15; Gruppe G: 21, 22). Dieses Phänomen bezeichnet man als "Satelliten-Assoziation", wobei die Satelliten (kurze Arme der akrozentrischen Chromosomen) während der Interphase Teil des Nukleolus werden. Ultrastrukturell läßt sich der Nukleolus in drei Teile unterteilen:

- fibrillar centers
- dense fibrillar component
- granular component

Während der Interphase befinden sich die NORs in der fibrillar component und in der dense fibrillar component.

Die Darstellung der NORs ist durch Silber möglich. Das Silber bindet sich nicht direkt an die r-DNA, sondern an azidische Proteine (Schwarzacher et al. 1978). Ursprünglich sind die NORs durch eine Mehr-Schritt Silberreaktion bei 60 °C dargestellt worden. Das Prinzip der Färbung beruht auf zwei Reaktionsschritten. Zunächst erfolgt eine Imprägnationsphase mit Silberionen (AgNO_3). Anschließend erfolgt die Entwicklungsphase mit Reduktionsmitteln. Howell und Black führten 1980 die Ein-Schritt Silberreaktion bei Raumtemperatur ein (Howell et al. 1980). Diese wurde 1986 von Ploton so modifiziert, daß sie auch bei Raumtemperatur an Paraffinschnitten durchgeführt werden konnte (Ploton et al. 1986). Die so sichtbar gemachten NORs bezeichnet man als AgNORs. Die AgNOR-Proteine werden hauptsächlich durch das Nukleolin und das Protein B23 repräsentiert, welche die ribosomale Transkriptionsaktivität regulieren (Roussel et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, daß der Gehalt an AgNORs der Tumorzellen in enger Beziehung zur Zell-Proliferationsrate und der Dauer des Zellzyklus steht (Trerè et al. 1989, Derenzini et al. 1990, Öfner et al. 1992, Hittmair et al. 1994, Sirri et al. 1995). Somit kann die AgNOR-Analyse als Parameter für die Proliferationsaktivität angesehen werden. Vergleicht man Tumorzellen mit normalen Zellen, so ist die Anzahl der AgNORs in den Tumorzellen höher, die Fläche der AgNORs hingegen kleiner (Crocker und Egan 1988). Desweiteren besteht eine hohe Korrelation zwischen AgNOR-Fläche und Zellproliferation (Derenzini et al. 1990). Derenzini und seine Mitarbeiter haben in ihrer Arbeit gezeigt, daß eine Korrelation zwischen den AgNORs und der DNA-Synthese besteht (Abb. 1). Sie haben 12 neoplastische Zelllinien untersucht. Um die

Proliferationsaktivität der Zelllinien zu bestimmen haben sie die DNA-Synthese mit ^3H Thymidin gemessen.

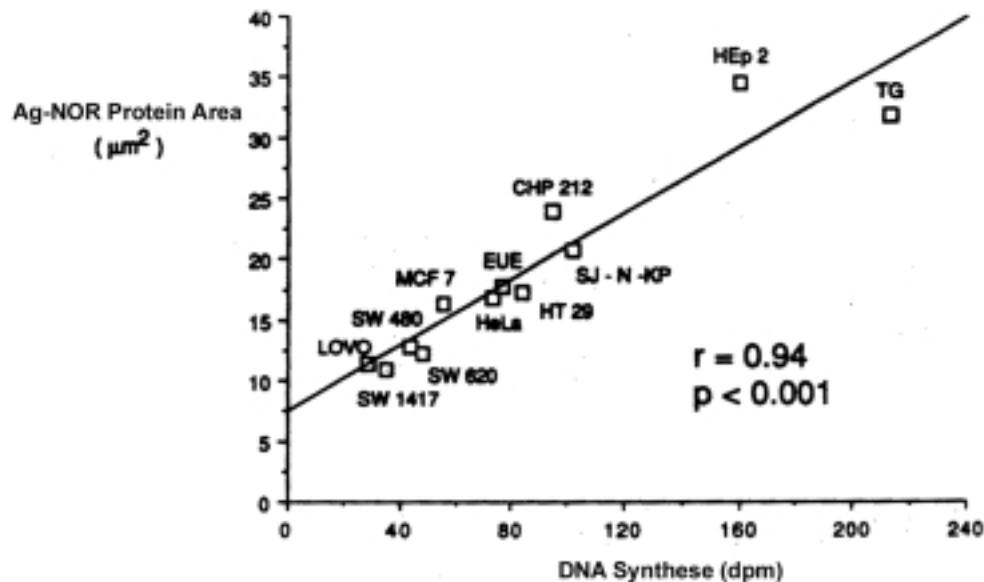


Abbildung 1: Korrelation zwischen AgNOR Area und der DNA-Synthese von Tumorzelllinien (Derenzini et al. 1990)

1.4.2 Ki-67-ein Proliferationsantigen

Ki-67 ist ein DNA bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 395 und 345 kDa. Es handelt sich um einen der zuverlässigsten Proliferationsmarker, der in allen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) nachweisbar ist. In nicht aktiven Zellen hingegen ist er nicht nachzuweisen (Gerdes et al. 1984, 1991). Ki-67 scheint für die Proliferation unentbehrlich zu sein. Der Ki-67 positive Anteil spiegelt die Wachstumsfraktion wider, den Anteil aktiver Zellen des Zellzyklus und ermöglicht somit eine Beurteilung des Wachstumsverhaltens durch Markierung der an der Proliferation beteiligten aktiven Zellen des Zellzyklus. Als Vorteil stellte sich die Entwicklung des immunhistochemischen Antikörpers MIB-1 heraus, der in der Lage ist das Ki-67 Antigen von Paraffinschnitten nach Demaskierung des Epitops durch Mikrowellenbehandlung zu erkennen. Bis vor nicht allzu langer Zeit war dieses nur durch den ursprünglichen Ki-67 Antikörper an Gefrierschnitten möglich. Ki-67 bzw.

MIB-1 ermöglichen es eine Aussage über die Anzahl der proliferierenden Zellen zu machen, jedoch ist es nicht möglich eine Angabe zur Proliferationsdauer zu machen.

1.5 Zusammenfassendes Fazit des Standes der Forschung

- Mit der alleinigen AgNOR-Analyse läßt sich durch ihre enge Beziehung zur Zellproliferationsrate und die Dauer des Zellzyklus eine Aussage über die Generationszeit (T) machen.
- Mit der alleinigen Untersuchung von MIB-1 läßt sich die Anzahl der proliferierenden Zellen bestimmen und somit die Wachstumsfraktion (G) darstellen.

1.6 Parallele Anwendung von AgNOR- und MIB-1-Analyse zur Bestimmung der Proliferationsaktivität "in vitro"

Neben Faktoren wie Tumordifferenzierung, Ausbreitung und Hormonrezeptorstatus spielt insbesondere die Tumormasse eine Rolle für die Prognostik. Die Tumormasse, -größe und -ausdehnung stehen in engem Zusammenhang mit der Proliferationsaktivität (P).

Die parallele Anwendung von AgNOR- und MIB-1- Analyse geht von der Gleichung $P=G/T$ aus, d. h. von der Vorstellung, daß sich die eigentliche Proliferationsaktivität aus dem Quotienten von Wachstumsfraktion G und der Generationszeit T bestimmen läßt. Da weder Wachstumsfraktion noch Generationszeit unter in vitro Bedingungen zugänglich sind, war bislang eine Abschätzung der Proliferationsaktivität am fixierten Gewebe nicht möglich.

Bei der separaten Analyse der AgNORs oder der MIB-1-Expression wird "nur" eine Momentaufnahme gemacht und nicht der dynamischen Prozess dargestellt. Mit ihrer Hilfe kann man "lediglich" die Anzahl der Zellen abschätzen, die sich in der G₁-, S- oder G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden. Es ist jedoch nicht möglich, die Dauer der verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. Demzufolge kann auch keine Aussage bezüglich der Generationszeit der Zellpopulation gemacht werden, die Proliferationszeit kann also nicht hinreichend bestimmt werden.

Vor einigen Jahren stellten Brugal und seine Mitarbeiter die Hypothese auf, die Proliferationsaktivität indirekt bestimmen zu können (Brugal 1994). Er stellte sich vor,

die Wachstumsfraktion mit MIB-1 darzustellen. Die Generationszeit sollte durch die AgNOR-Ausstattung der Zelle abgebildet werden.

Die Grundlage ihrer Idee basiert zum einen darauf, daß als Indikator der Wachstumsfraktion G Ki-67 ausschließlich den Anteil der sich in Proliferation befindlichen Teile des Zellzyklus kennzeichnet. Zum anderen wird die Anzahl der AgNORs als Indikator der Generationszeit T angesehen. Sie ist umgekehrt proportional zur Dauer des Zellzyklus: Je schneller der Zellzyklus, desto höher die Anzahl der AgNORs (Derenzini 1990, Derenzini 1991).

Von diesen Voraussetzungen ausgehend kamen sie zu dem Schluß die tatsächliche Proliferationsrate einer Zellpopulation indirekt bestimmen zu können (Bigras et al. 1996, Brugal 1994), indem sie die AgNOR Messungen auf die Ki-67 (MIB-1) positiven Bereiche des Tumorgewebes beschränken ($\text{AgNOR}_{\text{MIB-1pos.}}$).

Die Formel $P=G/T$ kann somit ersetzt werden durch $P=\text{MIB-1} \cdot \text{AgNOR}_{\text{MIB-1pos.}}$. Seitens der Gruppe um Brugal liegen aber keine abschließenden klinischen Daten vor, sondern lediglich Kurzstudien mit wenigen Fällen, die zur Erprobung der Hypothese aber nicht ausreichen.

Obwohl ein enger Zusammenhang von AgNORs und MIB-1 in vielen konventionellen Studien untersucht und belegt worden ist, gibt es jedoch kaum Untersuchungen über ihre Beziehung in simultan gefärbten Präparaten. Munakata und Hendricks beschrieben 1994 erstmals eine Simultanfärbung, die sie an in Paraffin eingebetteten normalen Tonsillengewebe durchgeführt haben. Sie betrachteten MIB-1 positive und MIB-1 negative Bereiche im Vergleich und erhielten signifikante Unterschiede für AgNOR Anzahl und AgNOR Fläche. Für beide fanden sich in den MIB-1 positiven Bereichen höhere Werte. Kürzlich sind erstmalig Untersuchungen an malignem Gewebe, und zwar zur Rezidivrate an Blasenkarzinomen, durchgeführt worden (Tomobe et al. 1999). Neben dem ohnehin bekannten Zusammenhang zwischen Proliferation und AgNOR, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Rezidivrate und den AgNORs in den MIB-1 positiven Bereiche gefunden werden. Als weiteres Ergebnis konnte eine positive Korrelation zwischen dem Grading und der AgNOR-Zahl sowohl in den MIB-1 positiven als auch in den MIB-1 negativen Zellen aufgezeigt werden.

Bisher ist noch nicht auf den prognostischen Aspekt der Hypothese Brugals bezüglich der Überlebensrate eingegangen worden. Unser Ziel war es, den

prognostischen Aspekt der Hypothese Brugals unter Verwendung von klinischen Daten zu untersuchen. Zur weiteren Klärung haben wir Untersuchungen an 89 Mammakarzinomen durchgeführt. Diese sind Teil einer prospektiven auf Prognosebestimmung ausgerichteten Studie. Es liegen bereits Daten aus vorherigen Teilprojekten für MIB-1, PCNA, Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression, p53, EGF-R und andere Parameter vor.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Dieser Arbeit liegen 89 in Paraffin eingebettete und in Formalin fixierte prospektiv gesammelte Fälle von Mammakarzinomen zugrunde. Sie stammen aus dem täglichen Eingang des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen aus den Jahren 1988/89. Die im Durchschnitt 59.8 +/- 14.1 Jahre alten Patientinnen litten an primären unilateralen Mammakarzinomen verschiedenen histopathologischen Differenzierungsgrades.

Alle Patientinnen wurden nach Stadien-orientierten Standardprotokollen behandelt. In 70 Fällen wurde die befallene Brust komplett reseziert, in 19 Fällen wurde brusterhaltend operiert. Bei beiden Verfahren wurden eine axilläre Lymphadenektomie durchgeführt. Der brusterhaltenden Therapie folgte immer eine Bestrahlung mit 46 Gy und ein Boost von 6 Gy auf das Tumorbett. Sowohl prämenopausale als auch postmenopausale Patientinnen mit positivem Lymphknoten- und negativem Hormonrezeptorstatus bekamen sechs Zyklen einer adjuvanten Chemotherapie mit Cyclophosphamid (600 mg/m²), Methothrexat (40 mg/m²) und 5-Fluorouracil (600 mg/m²) alle vier Wochen. Postmenopausale Patientinnen mit positiven Östrogenrezeptoren (> 10 fmol/mg protein) bekamen Tamoxifen (30 mg/Tag) für mindestens zwei Jahre. Am Ende der Nachbehandlung haben 49 Patientinnen überlebt. 40 Patientinnen sind nach 3.1 +/- 2.0 Jahren gestorben.

Für alle Patientinnen ist die TNM-Klassifikation, das histologische Grading, der Hormonrezeptorstatus und das Ergebnis der MIB-1Immunhistometrie vorhanden.

2.2 Aufarbeitung des Materials

Ausgangspunkt der Aufarbeitung war in Formalin fixiertes und in Form von Paraffinblöcken archiviertes Tumormaterial.

Von den in Paraffin eingebetteten Tumorpräparaten wurden 4 µm dicke Parafftinschnitte aus dem Bereich des größten Tumordurchmessers angefertigt. Diese wurden auf zur besseren Haftung silanisierte und mit Poly-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen.

2.3 Die Simultanfärbung

2.3.1 Die MIB-1-Rezeptorfärbung – eine immunhistochemische Technik

2.3.1.1 Materialien:

Primär-Antikörper:

- Dianova 505 (Anti ki-67)

Sekundär-Antikörper und Immunmarkierungssubstanz:

- DAKO[®]LSAB 2 Kit K 0674
- Link-Reagenz: biotinylierter Sekundär-Antikörper
- Label-Reagenz: Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase

Substrat/Chromogen:

- SIGMA FAST[™]: Fast Red TR/Naphtol AS-MX

TRIS-Puffer:

- 9 g TRIS-Base (SIGMA[®]T1503)
- 68,5 g TRIS-HCL (Sigma[®]T3253)
- 57,5 g NaCl (Serva[®]A30183)
- Zitratpuffer: (pH=6,0) zum Autoklavieren
- Stammlösung: 18,91 g Zitronensäure und 120,55 g Na-Zitrat-di-Hydrat auf 5 l Aqua dest.
- Stammlösung 1:10 verdünnen
- Aqua dest

2.3.1.2 Allgemeine Richtlinien

Die Schnitte sollten gründlich entparaffiniert werden, da die Gefahr besteht, daß die Paraffinreste die unspezifische Hintergrundfärbung erhöhen.

Ein Demaskieren der nukleären Antigene am Paraffinmaterial durch Autoklavieren ist erforderlich, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Es führt sowohl zu einer verbesserten immunhistochemischen Färbung (Bier et al. 1995) als auch zu einer verbesserten Versilberungsreaktion (Öfner et al. 1994). Die Demaskierung erfolgt nur einmal vor der immunhistochemischen Färbung .

Der zum Autoklavieren verwendete Zitratpuffer sollte genau einen pH-Wert von 6,0 haben, da bereits geringe Abweichungen das Färbeergergebnis beeinträchtigen.

Die Schnitte müssen grundsätzlich in einer Feuchtkammer inkubiert werden, da sie während des gesamten Vorgangs nicht austrocknen dürfen.

Die verwendeten Antikörperlösungen sollten nicht direkt am Rand des Präparates enden, sondern müssen darüber hinaus reichen. Es kommt sonst zu lokalen Austrocknungseffekten (sogenannten „edge“ Effekten) mit verstärkter unspezifischer Hintergrundfärbung.

2.3.1.3 Färbevorgang

Als erstes werden die Präparate mindestens 20 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend erfolgt die Behandlung mittels der absteigenden Alkoholreihe und die kurzzeitige Immersion in TRIS-Puffer.

Der nächste Schritt dient der Antigendemaskierung. Dieses wird durch fünf minütiges Autoklavieren in Citrat-Puffer erreicht. Es erfolgt eine erneute Immersion in TRIS-Puffer.

Nun erfolgt die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in der Feuchtkammer. Bei einer Verdünnung von 1: 50 und 200 µl pro Präparat wird 45 Minuten inkubiert. Eine anschließende Spülung (3x2 min in TRIS- Puffer) ist obligat.

Es folgt die Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper, welcher der Link-Reagenz aus dem DAKO LSAB®Kit K 0674 entspricht. Die Inkubation erfolgt mit 2-3 Tropfen pro Präparat für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Eine erneute Spülung (3x2 min) in TRIS-Puffer ist notwendig.

Nun wird jedes Präparat mit 2-3 Tropfen der Immunmarkierungssubstanz für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Es handelt sich um Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase, welches dem Label-Reagenz aus dem DAKO LSAB®2Kit K 0674 entspricht. Anschließend wird wieder 3x2 min in TRIS-Puffer gespült.

Der letzte Schritt ist die Inkubation mit Substrat/Chromogen-Lösung (SIGMA FAST™Fast Red TR/Naphtol AS-MX) für 5 Minuten. Erneute Spülung mit TRIS-Puffer und Überführung in Aqua dest.

2.3.2 Die AgNOR-Färbung - eine Versilberungstechnik

2.3.2.1 Materialien:

- Silbernitrat (Merck® 1.01512.)
- Blattgelatine (farblos)
- Ameisensäurelösung (1%)

2.3.2.2 Allgemeine Richtlinien

Man sollte darauf achten, daß Silberfärbungen nur mit deionisiertem und destilliertem Wasser in gut gereinigten Gefäßen durchgeführt werden. Zudem sollte keine überlagerte Gelatine verwendet werden, da es sonst zu einer ockergelben Hintergrundfärbung kommt (Rüschhoff 1992). Die Gelatine muß zuvor vorsichtig auf einer Platte mit Magnetrührer aufgelöst werden.

Maximal eine bis zwei Stunden vor der Anwendung sollte die Silber-Kolloid-Gebrauchslösung angefertigt werden.

Das Standard-Färbeschema des histochemischen Labors des Instituts für Pathologie der Charité zur AgNOR-Darstellung wurde verändert. Zum einen ist kein Autoklavieren der Schnitte vor Inkubation mit der Silber-Kolloid-Gebrauchslösung nötig, da dieses schon vor der MIB-1-Rezeptorfärbung erfolgt ist. Zum anderen wird nach der Versilberungsreaktion keine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Es käme sonst zu einem „Ausbleichen“ der Immunfärbung.

Eingedeckt werden die Präparate zuerst mit Crystal-Mount™, die Färbungen konserviert, und danach werden sie in Kanadabalsam eingebettet.

2.3.2.3 Färbeablauf

Zunächst wird die Färbelösung hergestellt. Es handelt sich um:

- Lösung A: 5 g AgNO₃ in 20 ml Aqua bidest
- Lösung B: 200 mg Gelatine in 10 ml 1% HCOOH-Lösung

Lösung B wird in Lösung A gegeben.

Die Schnitte werden in einer Glasküvette mit einer frisch hergestellten Silber-Kolloid-Gebrauchslösung inkubiert. Die Färbung erfolgt bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nach 20 Minuten wird die Färbung mittels Mikroskop kontrolliert. Die Dauer der Färbung beträgt 30 Minuten.

Die folgende Spülung (3x5 min in Aqua dest) dient der Entfernung überschüssiger Silberpräzipitate.

Zuletzt werden die Präparate mit Crystal-Mount™ konserviert und in Kanadabalsam eingebettet.

2.3.3 Das Färberesultat

Als Resultat stellen sich im mikroskopischen Bild die AgNORs als schwärzliche Punkte vor einem gelblichen oder rötlichen Hintergrund dar. Die MIB-1-negativen

Zellkerne nehmen eine gelbliche Farbe an, welche Artefakt der Versilberungsreaktion ist. Die MIB-1-positiven Zellen stellen sich rötlich dar.

2.4 Messung der Präparate

2.4.1 Das Bildverarbeitungssystem AMBA

Die Grundlage der AgNOR-Messungen bildet das Bildverarbeitungssystem AMBA. Es wurde im Pathologischen Institut der Charité Berlin im Labor für automatisierte Mikroskopbildanalyse entwickelt.

Im wesentlichen gibt es folgende Hauptkomponenten (Roth et al. 1989):

- Programmiersprache LAMBA
- Ein Editor zur Quellenprogrammierarbeit
- Ein Compiler zur Erzeugung lauffähiger Programme
- Ein Steuerteil für Dialog- und Programmbearbeitung
- Ein Paket von Unterprogrammen

Zur Hardware gehören:

- Mikroskop: Jenaval, Zeiss Jena
- CCD-Kamera
- Farbmonitor
- Framegrabber/Graphikkarte
- Personal Computer

2.4.2 Interaktive Messung der AgNORs mit dem Programm AMBA\norcolor

Die Messung wurde mit dem Programm AMBA/norcolor durchgeführt. Während der Messungen wurde die Kamera- und Mikroskopeinstellung nicht verändert. Es wurde mit vierhundertfacher Vergrößerung gearbeitet (Objektiv x 40, Projektiv x 10). Es wurden zwei Meßreihen durchgeführt. In der ersten Meßreihe wurden 150 zufällig ausgewählte Zellkerne von Tumorzellen auf ihre AgNOR-Parameter untersucht, gleichgültig, ob es sich um MIB-1 positive oder MIB-1 negative Zellen handelt. In der zweiten Meßreihe wurden 100 Zellkerne in ausschließlich MIB-1-positiven Zellkernen gemessen. Die zweite Meßreihe umfaßte lediglich 67 Präparate, da in 21 Präparaten die MIB-1-Expression in so geringer Anzahl vorhanden waren, daß es nicht möglich war 100 Zellkerne zu messen, die MIB-1 positiv waren.

Zunächst wurde im zu untersuchenden Präparat ein entsprechender Tumorbereich ausgewählt. Dieser wurde eingestellt und entsprechend Helligkeit, Kontrast und Fokus über Kontrolle des Monitorbildes eingestellt.

Das so abgestimmte Bild wird von der CCD-Kamera abgetastet und durch die „Scan“-Aufforderung in den Framegrabber eingescannt.

Nun wurden die einzelnen Zellkerne segmentiert, indem ein Zellkern ausgewählt wurde und dessen Umrandung mit dem Cursor durch bedienen der linken Maustaste gekennzeichnet wurde. Die Kernkontur erhielt eine farbige Umrandung. Gelingt dieses nicht direkt, kann der Untersucher die Schwellenwerte interaktiv optimieren, bis die abgebildete Kernkontur möglichst genau mit der tatsächlichen Kernform übereinstimmt. Es existiert außerdem die Möglichkeit für den Untersucher mit der rechten Maustaste Kontur- bzw. Trennlinien zu ziehen, welche insbesondere bei direkt aneinander grenzenden Zellkernen in Anspruch genommen wird. Ist die Kernsegmentierung abgeschlossen wird dieses mit der mittleren Maustaste bestätigt. Darauf folgte die automatische Messung der AgNOR-Merkmale. Um zu verhindern, daß die Zellkerne doppelt gezählt werden, werden die bereits gezählten Zellkerne blau dargestellt.

So werden alle Tumorzellkerne im jeweiligen Gesichtsfeld gemessen. Sind alle Zellkerne vermessen worden, wird ein neues Gesichtsfeld eingestellt und wie oben beschrieben bearbeitet.

Die Anzahl der bereits erfaßten Zellkerne konnte man in einem Fenster zu jedem Meßzeitpunkt sehen.

2.4.2.1 AgNOR-Merkmale

Es können insgesamt 40 AgNOR-Merkmale gemessen werden. Man kann sie unterscheiden in :

- AgNOR-Anzahl
- AgNOR-Menge
- AgNOR-Lage

Es wird weiter unterschieden in primäre und sekundäre AgNOR-Merkmale. Durch Messung der AgNORs und der Zellkerne werden die primären Merkmale direkt bestimmt, die sekundären Merkmale stellen dagegen die Beziehung zweier primärer Merkmale dar.

Primäre Merkmale der AgNOR-Anzahl:

NORNMB_M: Mittelwert der unkorrigierten Anzahl der AgNORs pro Zellkern; AgNor-Cluster werden als ein AgNOR gezählt

NORNBC_M: Mittelwert der korrigierten Anzahl der AgNORs pro Zellkern; AgNOR-Cluster werden als zwei AgNOR gezählt.

NOR_Kx: Anzahl der Zellkerne, die x AgNORs pro Zellkern enthalten, wobei x einen Wert zwischen 0 und 10 annehmen kann

Primäre Merkmale der AgNOR-Menge:

AREA_M: Mittelwert der in μm^2 gemessene Zellkernschnittfläche

S_AREA_M: Mittelwert der in μm^2 gemessenen Summe der Schnittflächen aller AgNORs eines Zellkerns

MAX_NOR_M: Mittelwert der Schnittfläche des jeweils Größten AgNORs im Zellkern

Für diese Untersuchung waren insbesondere die Merkmale bezüglich der Anzahl und der Fläche interessant. Die sekundären Merkmale der AgNOR-Anzahl und der AgNOR-Fläche sind hier nicht weiter aufgeführt, da sie für diese Untersuchung nicht von Bedeutung sind.

2.5 Statistik

Die statistische Bearbeitung der Meßwerte wurde mit Hilfe der statistischen Programme des Department of Biomathematics (BMDP) der University of California, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA durchgeführt.

Um die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Parametern zu analysieren sind die Korrelationskoeffizienten berechnet worden; zusätzlich wurde der Kolmogoroff-Smirnov-Test verwendet. Zur Gruppierung der Patienten für die Erstellung von Mehr-Felder-Tafeln und Überlebenskurven ist entsprechend der Mittelwerte eine 1:1 Gruppierung erfolgt. Die Mehr-Felder-Tafeln wurden mit dem Pearson Chi²-Test ausgewertet.

Nach Kaplan und Meier wurde die univariate Überlebensanalyse erstellt und mit Hilfe des Wilcoxon-Breslow-Tests (Cox 1972) beurteilt.

Die multivariate Überlebensanalyse wurde nach dem Cox-Model erstellt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ (Cox-Model $p < 0,10$) festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Univariate Überlebensanalyse

Nachfolgend werden die Überlebensdaten der Patientinnen dargestellt. Die einzelnen Parameter werden einerseits in Form von Mehr-Felder-Tafeln dargestellt und andererseits mit Hilfe von Kaplan Meier Überlebenskurven analysiert.

Bei den Mehr-Felder-Tafeln werden innerhalb des untersuchten Parameters die medianen Überlebenszeiten der unterschiedlichen Patienten Gruppen miteinander verglichen und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Sind keine medianen Überlebenszeiten vorhanden, so liegt das daran, daß in dieser Gruppe über 50% der Patientinnen noch leben und dieser Wert nicht berechnet werden konnte.

3.1.1 Tumorstadium

Das postoperative Tumorstadium pTNM zeigt eine eindeutige prognostische Relevanz, da sich in Abhängigkeit vom Tumorstadium signifikant unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeiten nachweisen lassen (Tab. 6, Abb. 2). Gleiches gilt auch für seine Komponenten, den Lymphknotenstatus (Tab. 8, Abb. 4) und im Trend auch für die Tumorgröße (Tab. 7, Abb. 4), für welche die Unterschiede im Überleben aber nicht signifikant waren.

Im folgenden werden die genannten Parameter in Form von Mehr-Felder-Tafeln und Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt.

Postoperatives Tumorstadium (pTNM)

Tabelle 6: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Stadien des TNM-Systems; n = 88 Patientinnen

pTNM	1	2	3	4
Anzahl der Patienten (n)	8	62	10	8
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	100	69	50	25
Medianes Überleben (Jahre)	-	7	3,6	2,4
Mittleres Überleben (Jahre)	7	5,6	4,6	2,9

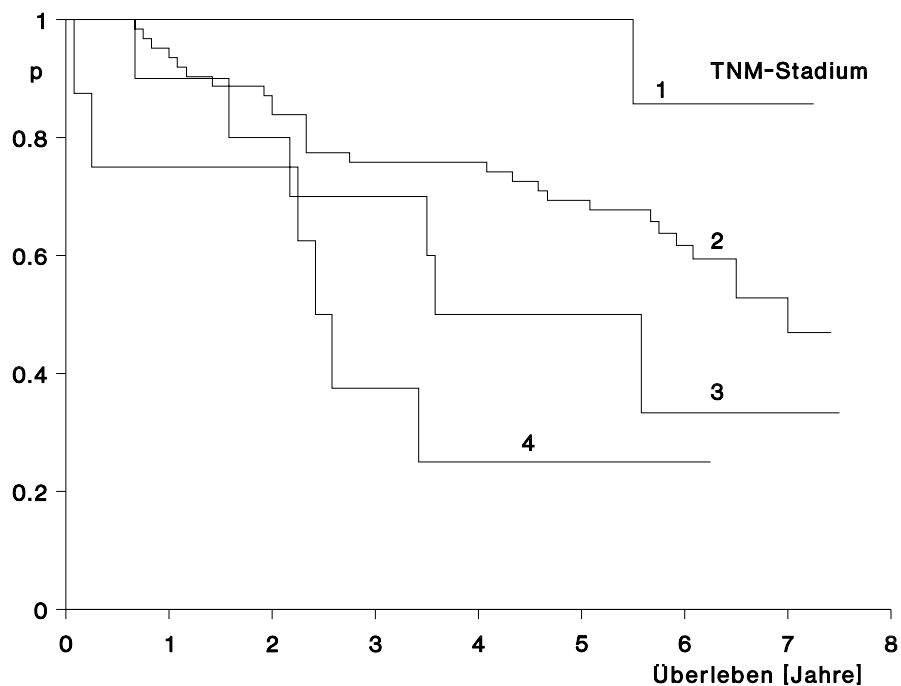


Abbildung 2: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für pTNM; p = 0.0076

Postoperative Tumorgröße (pT)

Tabelle 7: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Tumorgrößen

pT	1	2	3	4
Anzahl der Patienten (n)	13	55	15	6
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	85	69	53	33
Medianes Überleben (Jahre)	-	-	5,6	3,4
Mittleres Überleben (Jahre)	6,3	5,6	4,7	3,4

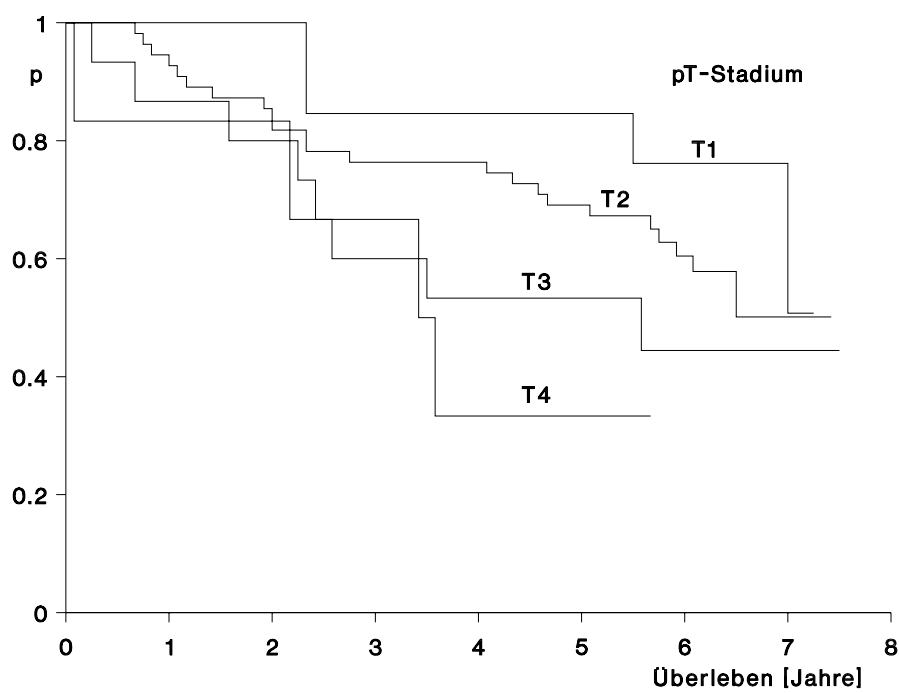


Abbildung 3: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für pT; $p = 0.1116$

Postoperativer Lymphknotenstatus (pN)

Tabelle 8: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Lymphknotenstadien; n=88

pN	0	1
Anzahl der Patienten (n)	42	46
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	80	52
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,1
Mittleres Überleben (Jahre)	6,3	4,6

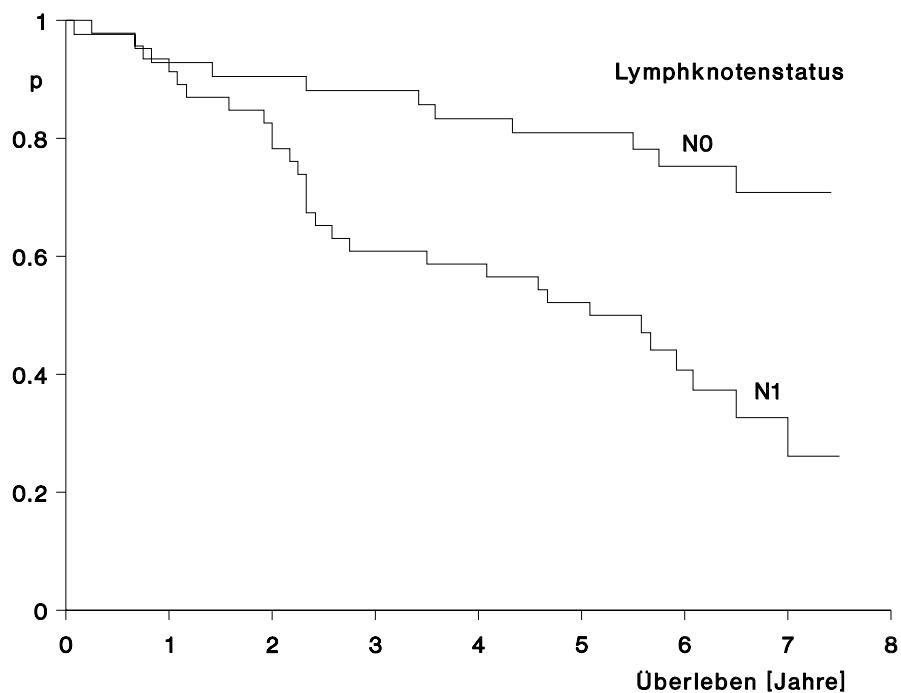


Abbildung 4: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für pN; p=0.0016

3.1.2 Gradierung (G)

Bei der histomorphologischen Gradierung lässt sich ebenfalls eine deutliche Korrelation mit den Überlebensdaten finden. Das Überleben der unterschiedlichen Patientengruppen nimmt mit zunehmender Entdifferenzierung (G1/G2 vs. G3) signifikant ab.

Tabelle 9: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Ausprägungen der histomorphologischen Gradierung; n=88

G	1	2	3
Anzahl der Patienten (n)	14	39	35
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	79	74	51
Medianes Überleben (Jahre)	-	6,5	5
Mittleres Überleben (Jahre)	6,1	6	4,5

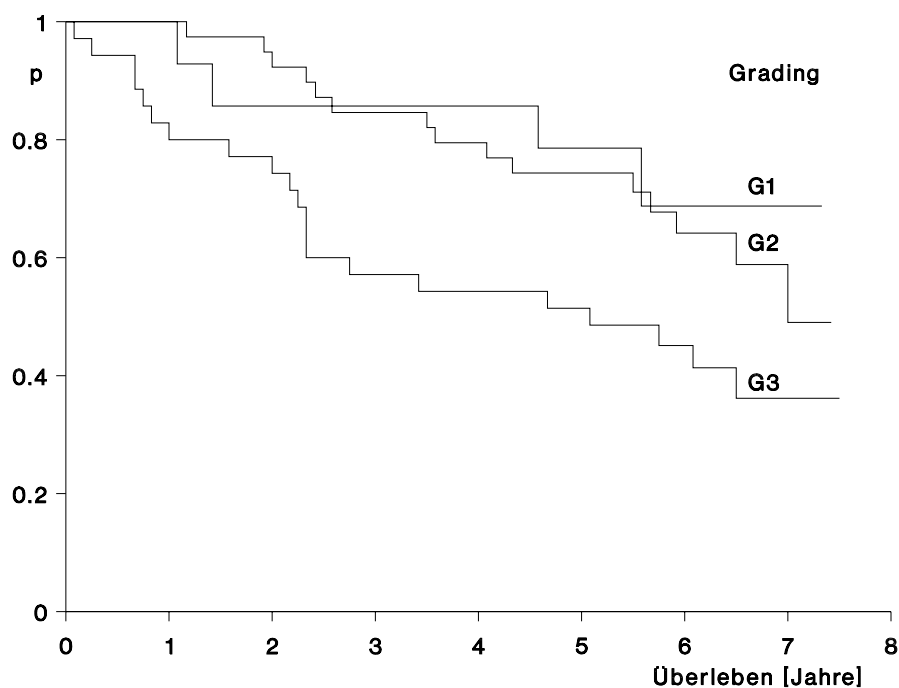
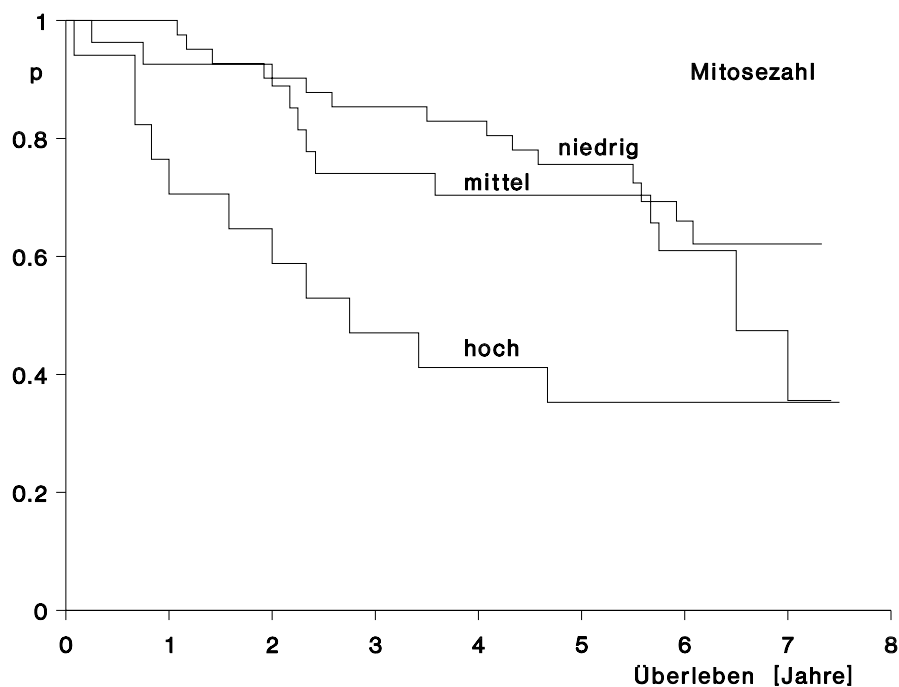


Abbildung 5: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für G; p=0,0162

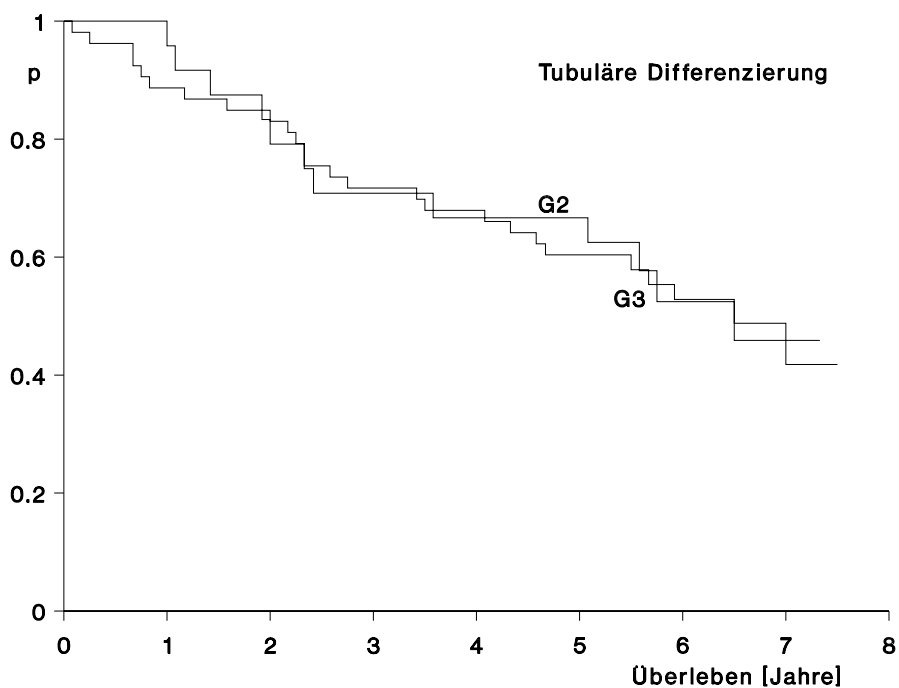
Mitoserate (MIT)Tabelle 10: Überlebensunterschiede für die verschiedenen Ausprägungen der Mitoserate; n=85

MIT	1	2	3
Anzahl der Patienten (n)	41	27	17
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	76	70	35
Medianes Überleben (Jahre)	-	6,5	2,8
Mittleres Überleben (Jahre)	6	5,5	3,8

Abbildung 6: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für MIT; $p=0,0051$

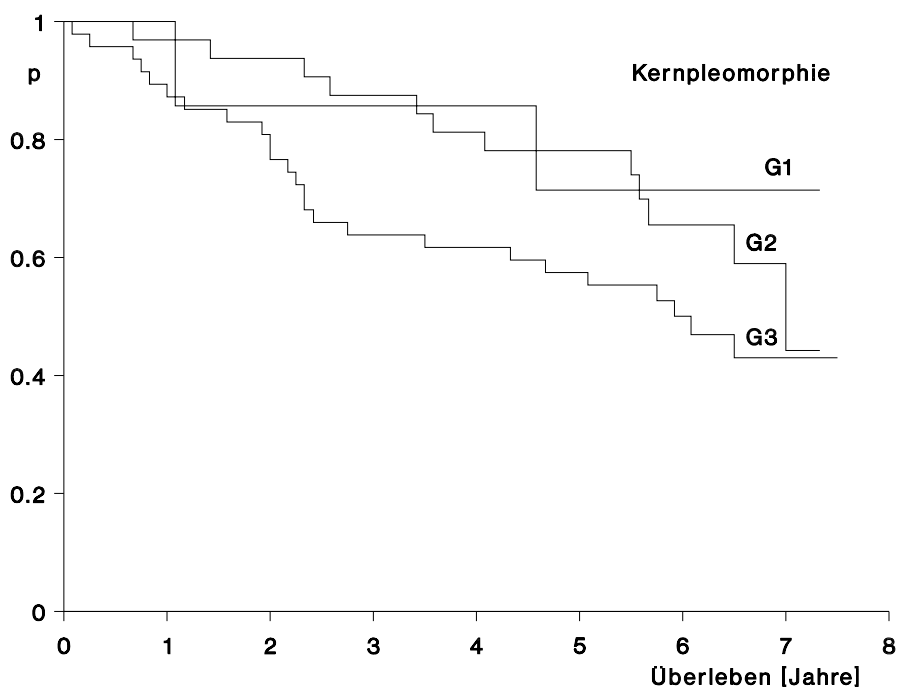
Tubuläre Differenzierung (TD)**Tabelle 11:** Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Ausprägungen der tubulären Differenzierung; n= 80

TD	1	2	3
Anzahl der Patienten (n)	3	24	53
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	100	67	60
Medianes Überleben (Jahre)	-	6,5	6,5
Mittleres Überleben (Jahre)	7,4	5,2	5,2

**Abbildung 7:** Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für TD; p=0,3684

Kernpleomorphie (KP)Tabelle 12: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Ausprägungen der Kernpolymorphie; n=86

KP	1	2	3
Anzahl der Patienten (n)	7	32	47
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	71	78	58
Medianes Überleben (Jahre)	-	7	6,1
Mittleres Überleben (Jahre)	6,1	6	4,9

Abbildung 8: Überlebenskurve nach Kaplan und Meier für KP; p=0,1141

3.1.3 Hormonrezeptor Status

Östrogenrezeptor Status (ER)

Tabelle 13: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Ausprägungen des Östrogenrezeptor Status; n=88

ER	Negativ (maximale Bindungskapazität <10 fmol/mg)	positiv (maximale Bindungskapazität >9 fmol/mg)
Anzahl der Patienten (n)	21	68
5-Jahre- Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	52	71
Medianes Überleben (Jahre)	5,5	7
Mittleres Überleben (Jahre)	4,5	5,7

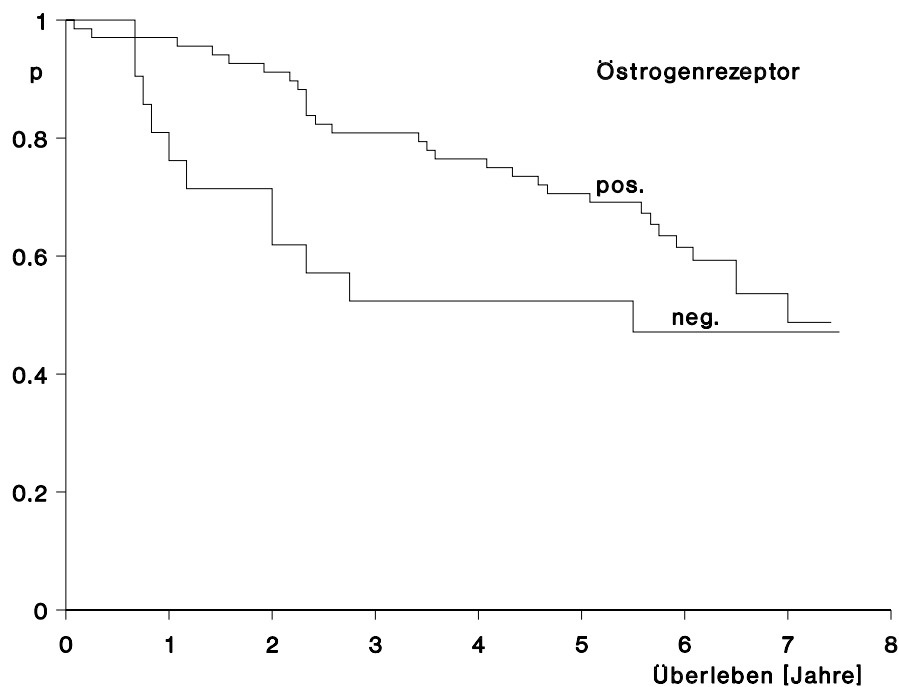


Abbildung 9: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für ER; p=0.0452

Progesteronrezeptorstatus (PR)

Tabelle 14: Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Ausprägungen des Progesteronrezeptor Status

PR	negativ (maximale Bindungskapazität <20 fmol/mg)	positiv (maximale Bindungskapazität >19 fmol/mg)
Anzahl der Patienten (n)	43	46
5-Jahre- Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	54	78
Medianes Überleben (Jahre)	5,9	-
Mittleres Überleben (Jahre)	4,7	6,1

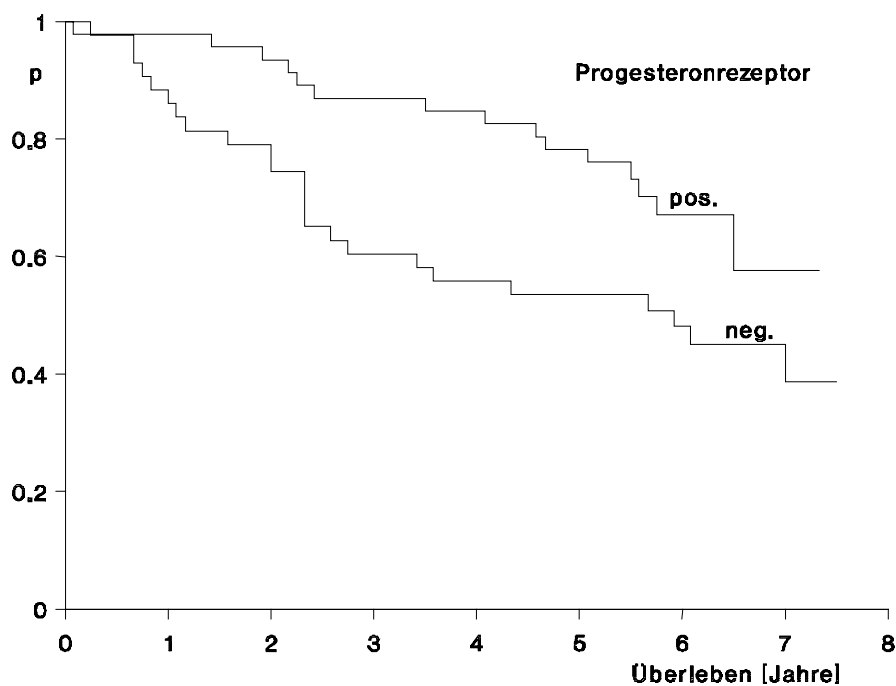


Abbildung 10: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für PR; $p=0,0153$

Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus verfügen über eine bessere Überlebensprognose, als Patientinnen mit negativem Befund. Sowohl bei Östrogen- als auch bei Progesteronrezeptoren finden sich statistisch signifikante Werte, wobei allerdings der Einfluß des Rezeptorstatus auf das Überleben beim Progesteronrezeptor deutlich stärker ausgeprägt ist.

3.2 Übersicht über die MIB-1 und AgNOR Datenverteilung

Die statistischen Grundgrößen zu den MIB-1- und AgNOR-Parametern sind in Tabelle 15 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit beziehen sich die Angaben nur auf die 67 Patientinnen, für die auch Werte aus der zweiten Meßreihe (NOR Zahl_{MIB-1pos.}, NOR Area_{MIB-1pos.}) vorlagen.

Tabelle 15: Mittelwerte, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte sowie Mediane der AgNOR-Parameter

	Mittelwert +/- Standard- abweichung	Datenverteilung von bis		Median
MIB-1 _{mean}	10,8 +/- 9,7	0,4	40,8	8,1
NOR-Zahl (n)	2,7 +/- 0,7	1,4	4,9	2,6
NOR-Area (µm ²)	5,1 +/- 2,1	2,8	10,8	4,3
NOR-Zahl _{MIB-1pos.} (n)	3,9 +/- 1,1	1,7	6,6	3,6
NOR-Area _{MIB-1pos.} (µm ²)	7,5 +/- 2,4	3,1	14,1	7,1
P 3	45,4 +/- 45,6	0,8	227,4	31,4
P 4	89,9 +/- 93,6	1,6	422,6	67,8

In der folgenden Tabelle ist die Datenverteilung und die Korrelation der Variablen dargestellt.

Tabelle 16: Statistische Analyse von MIB-1_{Mean} und den AgNOR Parameter.
Rechts oben: Korrelationskoeffizient; links unten: P-Werte

	MIB-1 mean	AgNOR- Zahl	AgNOR- Area	AgNOR- Zahl _{MIB- 1pos}	AgNOR- Area _{MIB- 1pos}	P 3	P 4
MIB-1 _{mean}	-	0,530	0,535	0,192	0,243	0,938	0,924
AgNOR- Zahl	<0,001	-	0,625	0,315	0,234	0,600	0,515
AgNOR- Area	<0,001	<0,001	-	0,072	0,501	0,527	0,665
AgNOR- Zahl _{MIB- 1pos}	>0,05	0,014	>0,05	-	0,428	0,446	0,254
AgNOR- Area _{MIB- 1pos}	0,047	>0,05	<0,001	<0,001	-	0,280	0,502
P 3	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		-	0,885
P 4	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	-

AgNOR-Zahl und AgNOR-Zahl_{MIB-1pos} zeigen unterschiedliche Mittelwerte und Standardabweichungen, sind aber dennoch miteinander korreliert ($r=0,315$; $P=0,014$). AgNOR-Area und AgNOR-Area_{MIB-1pos} zeigen trotz unterschiedlicher Mittelwerte und Standardabweichungen eine engere Verbindung zueinander auf ($r=0,501$; $P<0,001$). Die MIB-1_{mean} Werte korrelieren signifikant mit der AgNOR-Zahl ($r=0,530$; $P<0,001$) und der AgNOR-Area ($r=0,535$; $P<0,001$), jedoch nur schwach mit der AgNOR-Zahl_{MIB-1pos} ($r=0,192$; $P>0,05$) und AgNOR-Area_{MIB-1pos} ($r=0,243$; $P=0,047$). Abbildung 11 zeigt, daß die AgNOR Parameter höhere Werte in den MIB-1 positiven Zellkernen aufweisen ($P<0,01$).

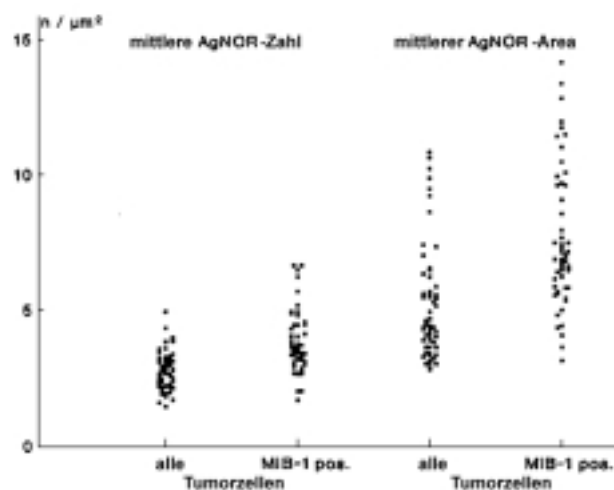


Abbildung 11: Datenverteilung der AgNOR-bezogenen Parameter

3.2.1 MIB-1 und AgNOR Parameter für alle 89 Patientinnen

3.2.1.1 MIB-1_{mean}

Im Mittel lagen die Werte der Proliferationsfraktion bei 9,27% mit einem Maximum bei 61,2% und einem Minimum bei 0,0%. Nach einer 1:2:1 Quantilisierung erhält man als Begrenzungen der Quantile 2,45% und 12,7%. Es zeigt sich auch hier eine deutliche Korrelation zwischen den drei Quantilen (Q1, Q2, Q3) der Proliferationsfraktion und den Überlebensdaten.

Tabelle 17: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von MIB-1_{mean}

MIB-1 _{mean}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	20	44	25
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	90	61	56
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,9	6,1
Mittleres Überleben (Jahre)	6,8	5,1	4,8

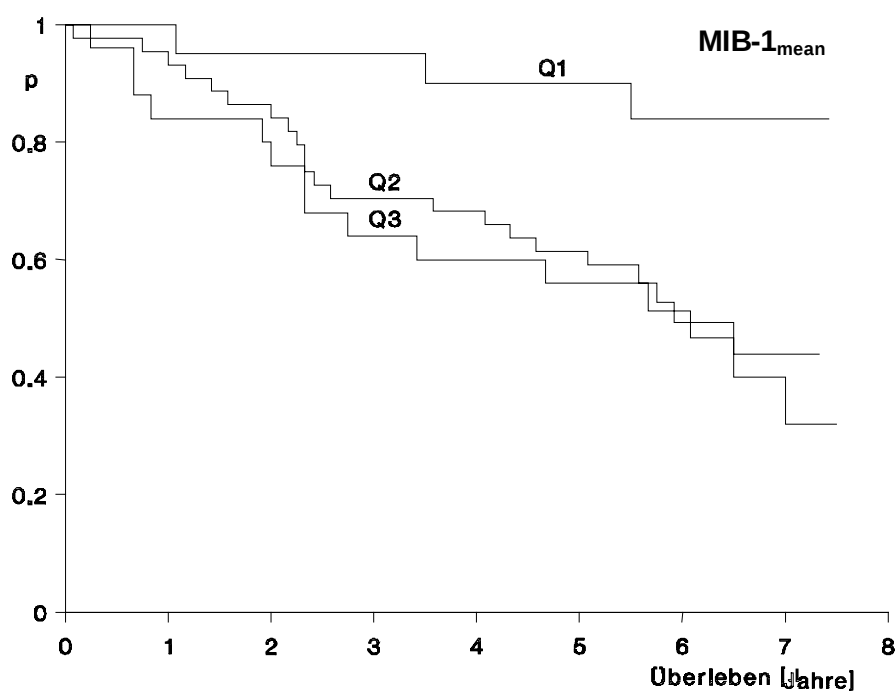


Abbildung 12: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für MIB-1_{mean}; p=0,0243

Bei Unterteilung des Kollektivs in zwei Gruppen mit dem Median (6,8) als Grenzwert zeigt sich auch hier eine deutliche Korrelation zwischen Proliferationsfraktion und Überleben.

Tabelle 18: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von MIB-1_{mean}

MIB-1 _{mean}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	45	44
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	84	47
Medianes Überleben (Jahre)	-	4,3
Mittleres Überleben (Jahre)	6,5	4,4

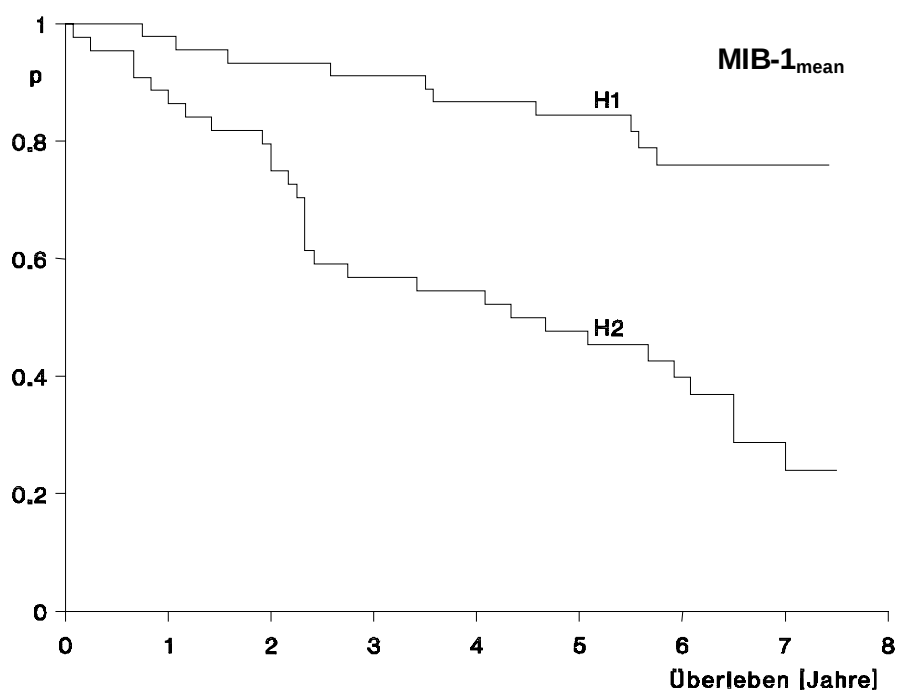


Abbildung 13: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für MIB-1_{mean}; $p < 0,0001$

3.2.1.2 AgNOR-Parameter

3.2.1.2.1 AgNOR-Zahl

Nach Auswertung von 89 Präparaten zeigt die Zahl der AgNORs alleine nach 1:2:1 Quantilisierung weder eine Korrelation, noch Signifikanz. Die Begrenzungen der Quantilen liegen bei 2,2 und 3,2.

Tabelle 19: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von AgNOR-Zahl.

AgNOR-Zahl	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	22	44	23
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	50	80	57
Medianes Überleben (Jahre)	4,7	-	5,9
Mittleres Überleben (Jahre)	5	6,1	4,6

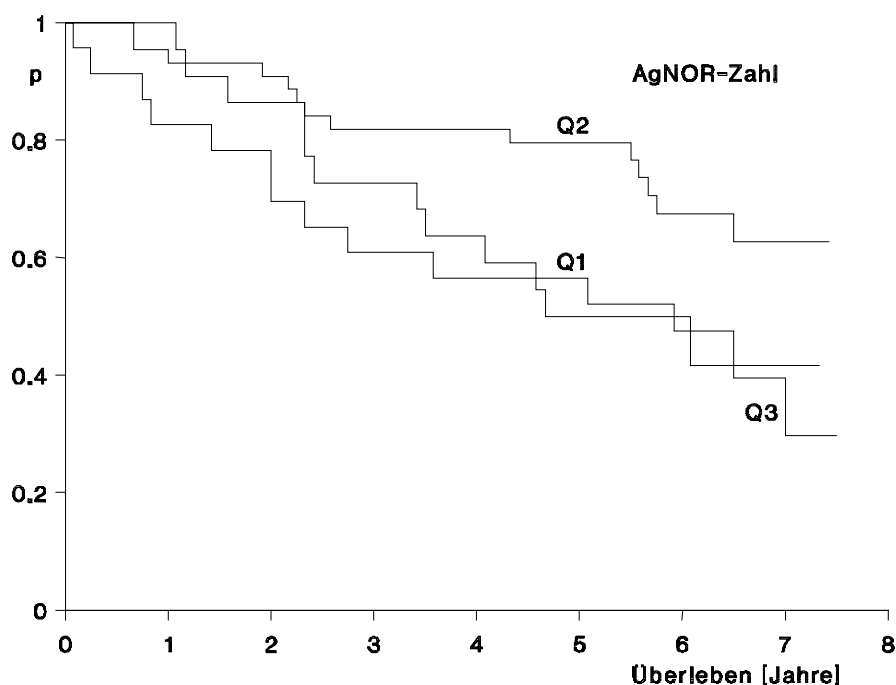


Abbildung 14: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Zahl; $p=0,059$

In gleicher Weise zeigt sich ebenfalls keine Signifikanz bei Unterteilung des Patientenkollektivs in zwei Hälften mit dem Median (2,6) als Grenzwert.

Tabelle 20: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von AgNOR-Zahl

AgNOR-Zahl	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	45	44
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	62	70
Medianes Überleben (Jahre)	6,1	-
Mittleres Überleben (Jahre)	5,3	5,6

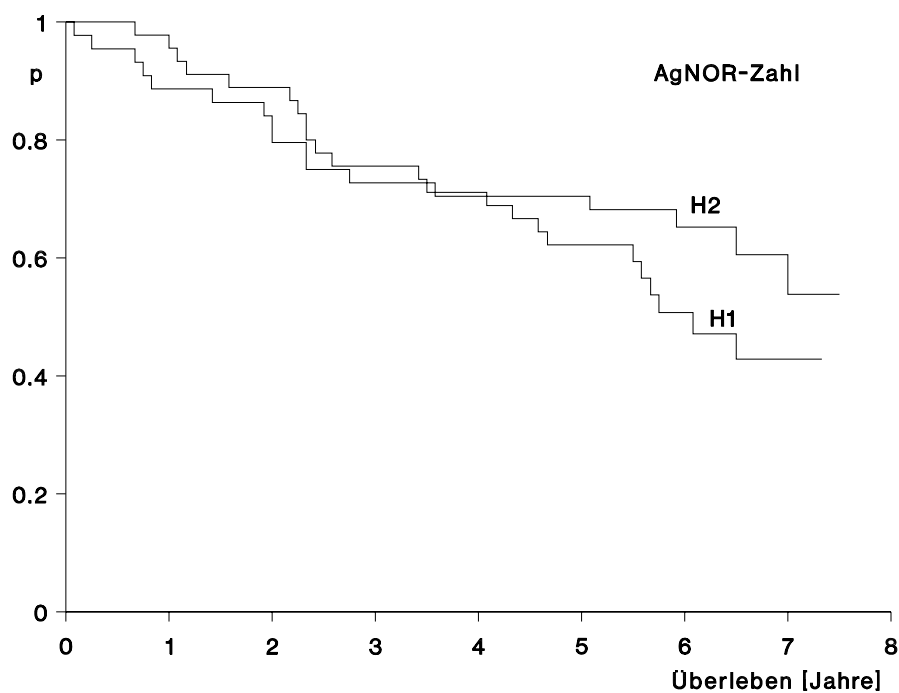


Abbildung 15: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Zahl; $p=0,5199$

3.2.1.2.2 AgNOR-Area

Nach Auswertung von 89 Präparaten zeigen sich auch hier für die Fläche AgNOR-Area alleine nach 1:2:1 Quantilisierung weder eine Korrelation, noch Signifikanz. Die Begrenzungen der Quantilen liegen bei 3,6 und 5,8.

Tabelle 21: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von AgNOR-Area.

AgNOR-Area	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	22	46	21
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	68	67	62
Medianes Überleben (Jahre)	6,1	6,5	-
Mittleres Überleben (Jahre)	5,4	5,5	5,2

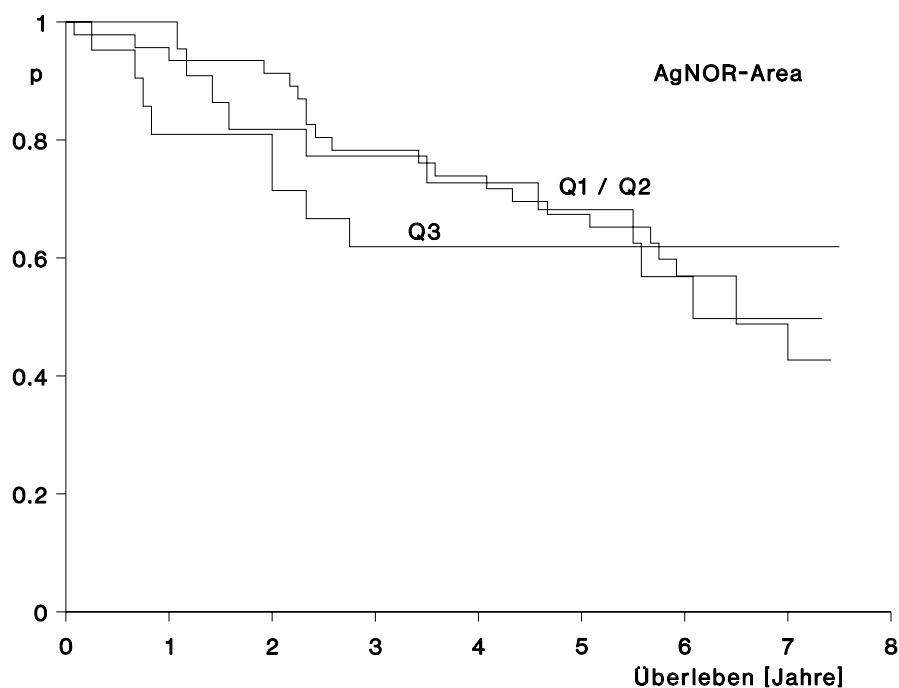


Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Area; $p=0,9077$

In gleicher Weise zeigt sich ebenfalls keine Signifikanz bei Unterteilung des Patientenkollektivs in zwei Hälften mit dem Median (4,33) als Grenzwert.

Tabelle 22: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von AgNOR-Area

AgNOR-Area	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	48	41
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	65	68
Medianes Überleben (Jahre)	-	7
Mittleres Überleben (Jahre)	5,5	5,4

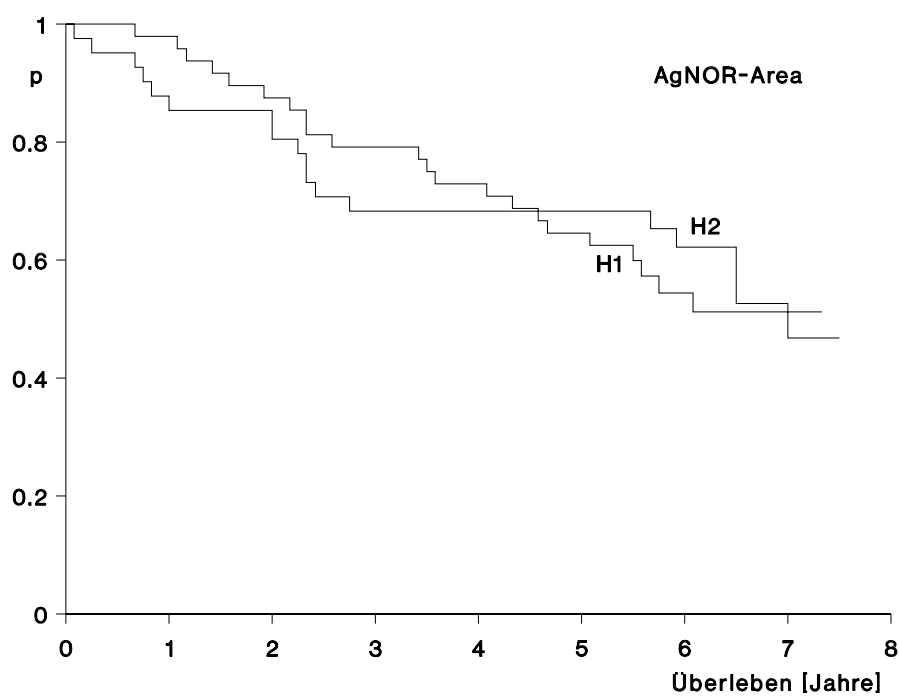


Abbildung 17: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR Area; $p=0,9514$

3.2.2 MIB-1 und AgNOR Parameter der zweiten Meßreihe

Insgesamt konnten für alle in dieser Meßreihe untersuchten Parameter 67 Fälle ausgewertet werden.

3.2.2.1 MIB-1_{mean}

Im Mittel lag der Wert der Proliferationsfraktion bei 10,8% mit einem Maximum bei 40,8% und einem Minimum bei 0,4%. Bei 1:2:1 Quantilisierung mit den Begrenzungen der Quantilen bei 4,1% und 13,4% zeigt sich weder eine Korrelation noch Signifikanz bezüglich des Überlebens.

Tabelle 23: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von MIB-1_{mean}.

MIB-1 _{mean}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	17	34	16
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	82	50	56
Medianes Überleben (Jahre)	-	4,3	6,5
Mittleres Überleben (Jahre)	6,1	4,5	4,8

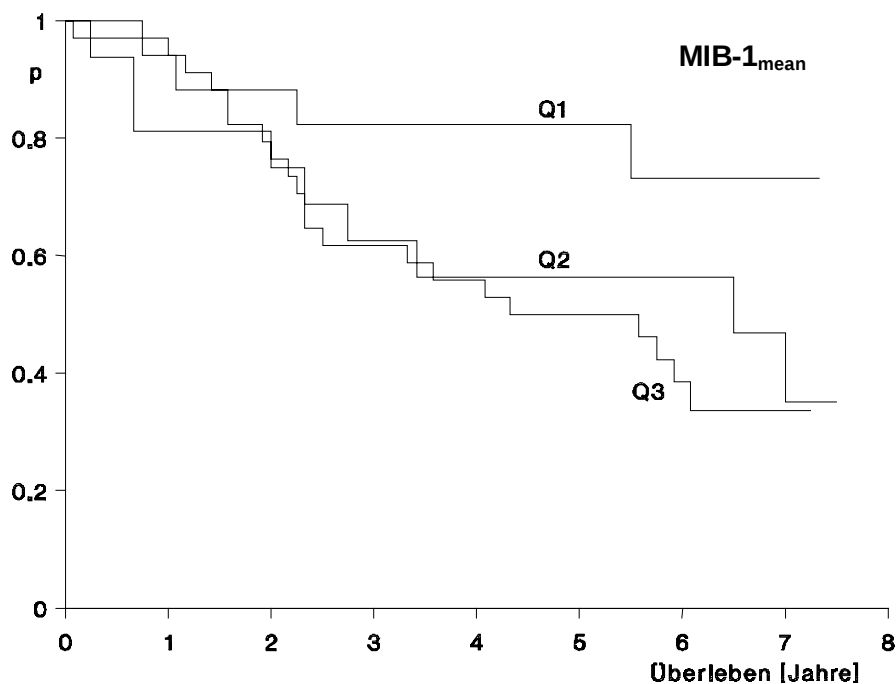


Abbildung 18: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für MIB-1_{mean}; p=0,1713

Bei einer Unterteilung in zwei Gruppen mit dem Median (8,1) als Grenzwert findet sich sowohl eine Korrelation bezüglich des Überlebens, als auch eine signifikante Abnahme des Überlebens mit steigender Proliferationsfraktion.

Tabelle 24: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von MIB-1_{mean} mit dem Median (8,1) als Grenzwert

MIB-1 _{mean}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	34	33
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	79	46
Medianes Überleben (Jahre)	-	2,8
Mittleres Überleben (Jahre)	6	4

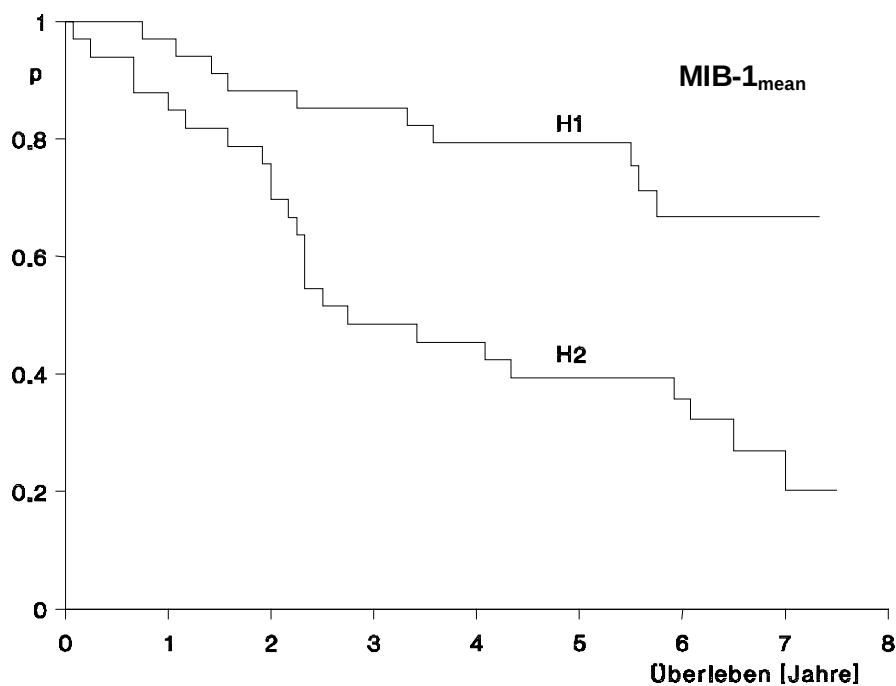


Abbildung 19: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für MIB-1_{mean}; $p=0,0018$

3.2.2.1 AgNOR-Parameter

3.2.2.1.1 AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.}

Im Mittel lag der Wert für NOR Zahl_{MIB-1pos.} bei 3,9 mit einem Maximum von 6,6 und einem Minimum von 1,7. Hier verhält es sich so, daß bei einer Unterteilung in 3 Gruppen mit den Begrenzungen der Quantilen bei 3,2 und 4,6 Signifikanz bezüglich des Überlebens vorliegt.

Tabelle 25: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.}

AgNOR-Zahl _{MIB-1pos.}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	17	34	16
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	53	74	38
Medianes Überleben (Jahre)	-	-	2,3
Mittleres Überleben (Jahre)	4,9	5,7	3,7

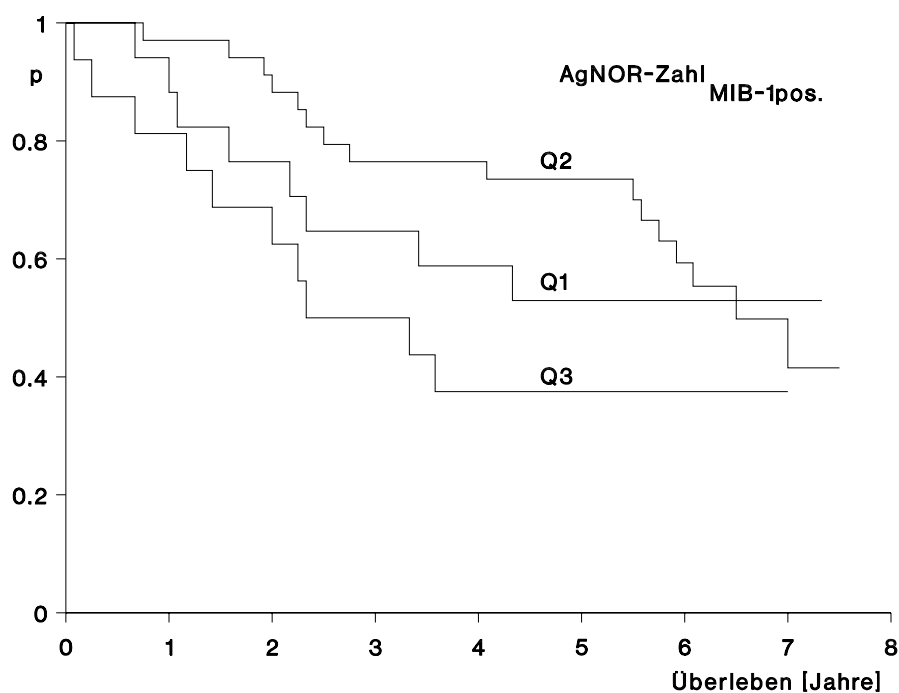


Abbildung 20: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Zahl_{MIB1-pos.}; p=0,0438

Bei Unterteilung in zwei Gruppen mit dem Median (3,6) als Grenzwert liegt keine Signifikanz bezüglich des Überlebens vor.

Tabelle 26: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.}

AgNOR-Zahl _{MIB-1pos.}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	34	33
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	56	64
Medianes Überleben (Jahre)	7	6,1
Mittleres Überleben (Jahre)	5	5,1

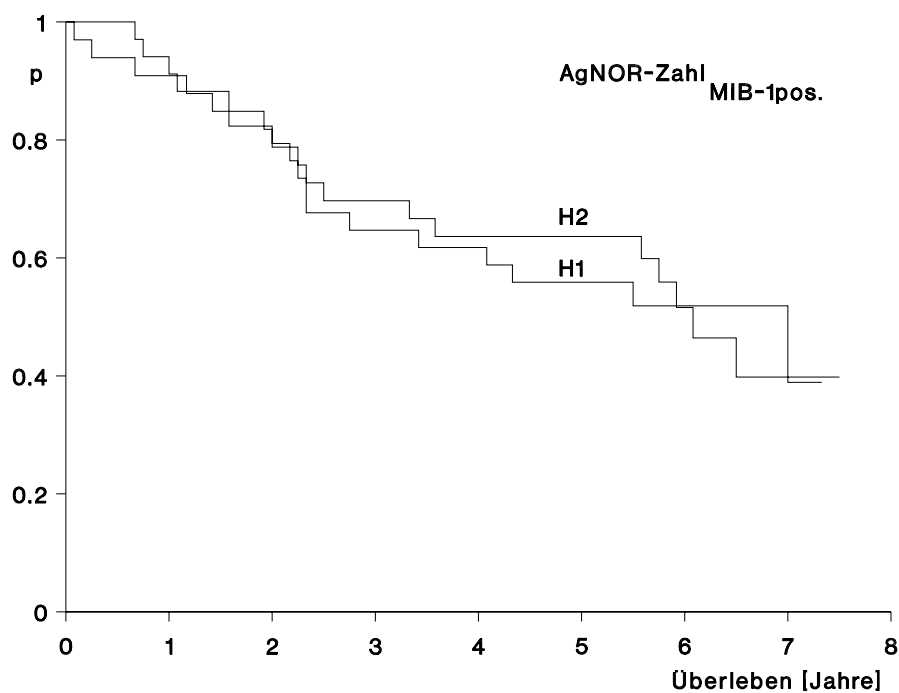


Abbildung 21: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Zahl_{MIB1-pos.}; $p=0,8522$

3.2.2.1.2 AgNOR-Area_{MIB1-pos.}

Im Mittel lag der Wert für AgNOR-Area_{MIB1-pos.} bei 7,5 mit einem Maximum von 14,1 und einem Minimum von 3,1. Bei einer Unterteilung in 3 Gruppen mit den Begrenzungen der Quantilen bei 6,0 und 8,7 liegt keine Signifikanz bezüglich des Überlebens vor.

Tabelle 27: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von AgNOR-Area_{MIB1-pos.}

AgNOR-Area _{MIB1-pos.}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	17	34	16
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	71	65	38
Medianes Überleben (Jahre)	7	6,5	2,3
Mittleres Überleben (Jahre)	5,6	5,3	3,8

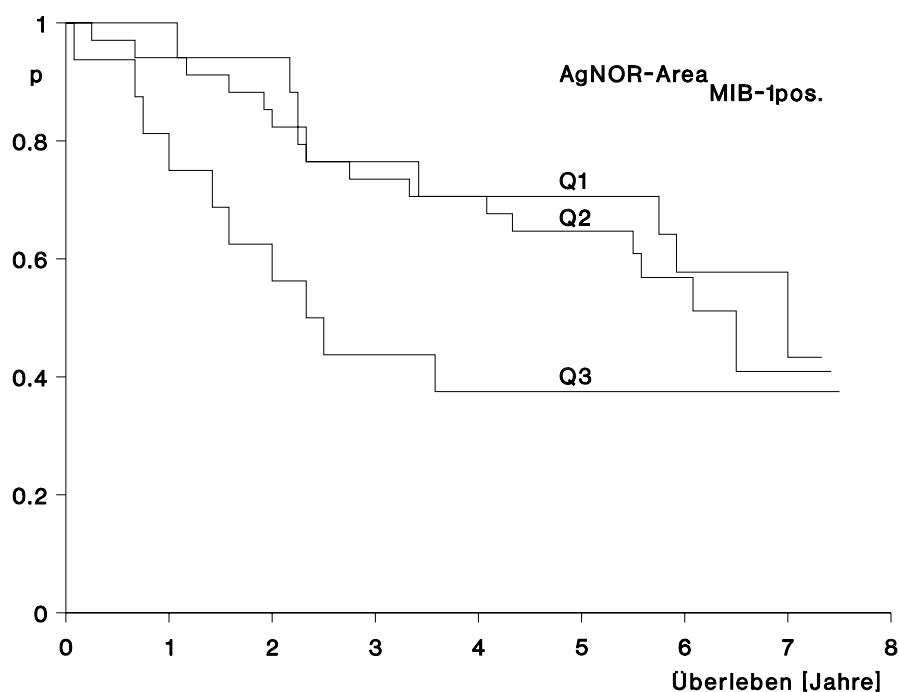


Abbildung 22: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR-Area_{MIB1-pos.}; p=0,0527

Bei Unterteilung in zwei Gruppen mit dem Median (7,1) als Grenzwert findet sich hingegen eine deutliche Signifikanz bezüglich des Überlebens.

Tabelle 28: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von AgNOR-Area_{MIB1-pos.}

AgNOR-Area _{MIB1-pos.}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	37	30
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	70	47
Medianes Überleben (Jahre)	-	3,6
Mittleres Überleben (Jahre)	5,6	4,3

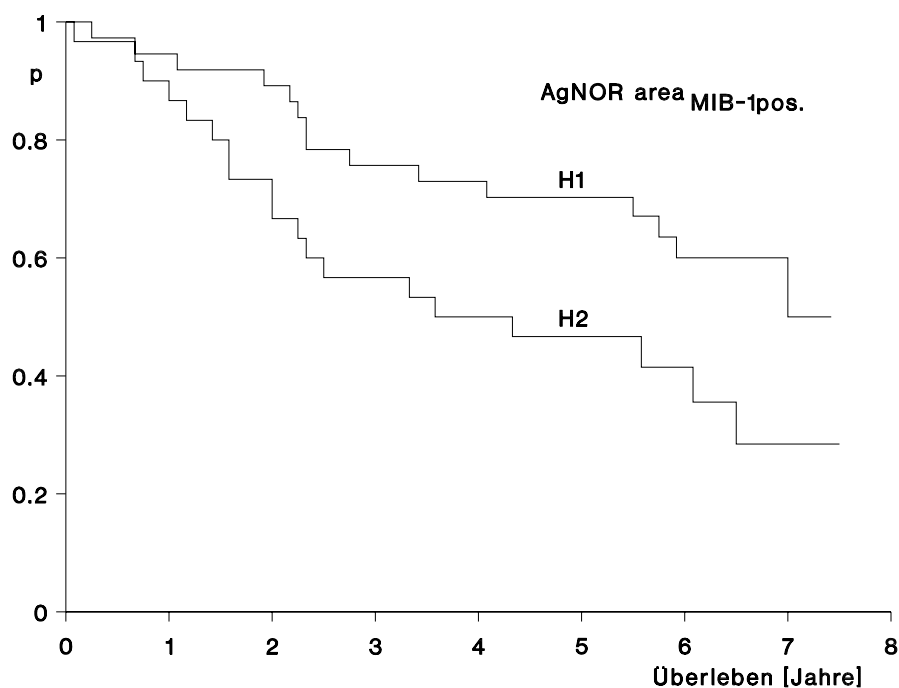


Abbildung 23: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für AgNOR Area_{MIB1-pos.}; p=0,0340

3.3 Überprüfung der Brugal-Hypothese

Entsprechend der oben hergeleiteten Formel $P=G/T$ soll diese nun anhand der experimentellen Ergebnisse überprüft werden. Man errechnet die Proliferationsaktivitäten P durch Einsetzen der MIB-1 Werte für G und der AgNOR Parameter für T .

3.3.1 Beziehungen der Kombination einzelner Parameter miteinander

Im folgenden werden der Ansatz, der die Hypothese Brugals bestätigen soll, einem Gegenmodell gegenübergestellt.

Zunächst werden die Proliferationsaktivitäten der zweiten Meßreihe für 67 Fälle berechnet. Dabei stellt $P3$ das Produkt aus $MIB-1_{mean}$ und $AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.}$ und $P4$ das Produkt aus $MIB-1_{mean}$ und $AgNOR-Area_{MIB-1pos.}$ dar.

Verglichen werden diese Ergebnisse mit dem Gegenmodell, welches die Proliferationsaktivitäten aller 89 Fälle darstellt. $P1$ stellt das Produkt aus $MIB-1_{mean}$ und $AgNOR-Zahl$ dar und $P2$ das Produkt aus $MIB-1_{mean}$ und $AgNOR Area$.

Bei beiden Modellen ist eine Unterteilung in zwei und in drei Gruppen erfolgt, die in Form von Mehr Felder Tafeln und Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt werden.

Danach werden zur vergleichenden Bewertung der Kombinationsparameter $P1$ bis $P4$ sowie der klinischen Daten Cox-Modelle vorgestellt (s. Kap. 3.6).

3.3.1.1 "richtiger Ansatz"

P 3 (MIB-1_{mean} x AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.})

Im Mittel lag der Wert für P 3 bei 45,5 mit einem Maximum von 227,4 und einem Minimum von 0,8. Bei einer Unterteilung in 3 Gruppen mit den Begrenzungen der Quantilen bei 16,03 und 56,29 liegt.

Tabelle 29: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von P 3
(MIB-1_{mean} x AgNOR-Zahl_{MIB-1pos.})

MIB-1 _{mean} x AgNOR-Zahl _{MIB-1pos.}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	17	34	16
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	82	56	44
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,8	2,3
Mittleres Überleben (Jahre)	6,1	4,9	3,9

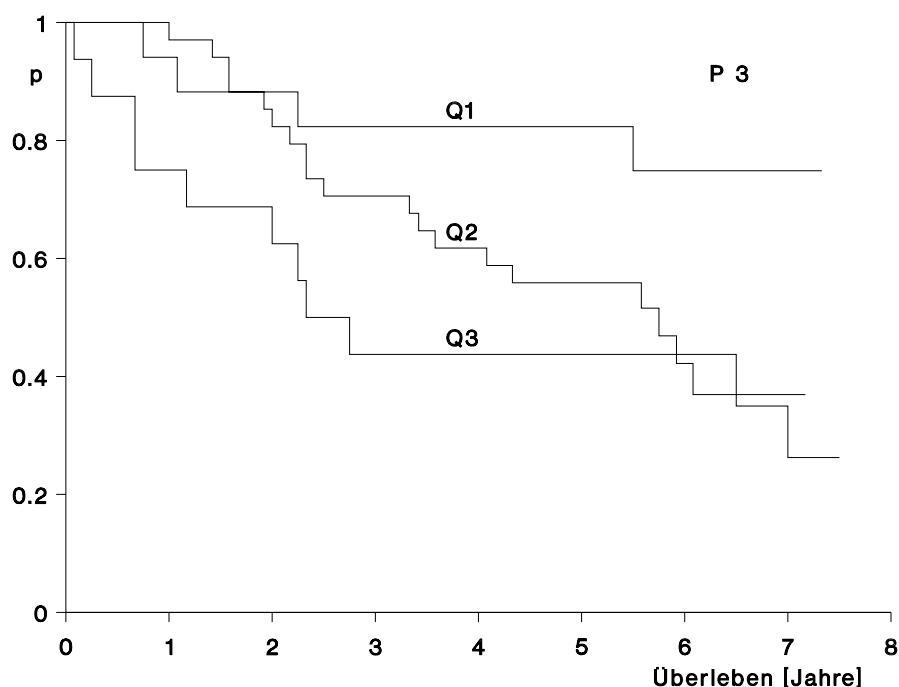


Abbildung 24: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 3; $p=0,0524$

Bei Unterteilung in 2 Gruppen zeigt sich mit $p=0,0195$ ein signifikanter Überlebensunterschied.

Tabelle 30: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von P 3
(MIB-1_{mean} x NOR-Zahl_{MIB-1pos.}) mit dem Median (31,4) als Grenzwert

MIB-1 _{mean} x NOR-Zahl _{MIB-1pos.}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	34	33
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	74	46
Medianes Überleben (Jahre)	-	3,4
Mittleres Überleben (Jahre)	5,8	4,2

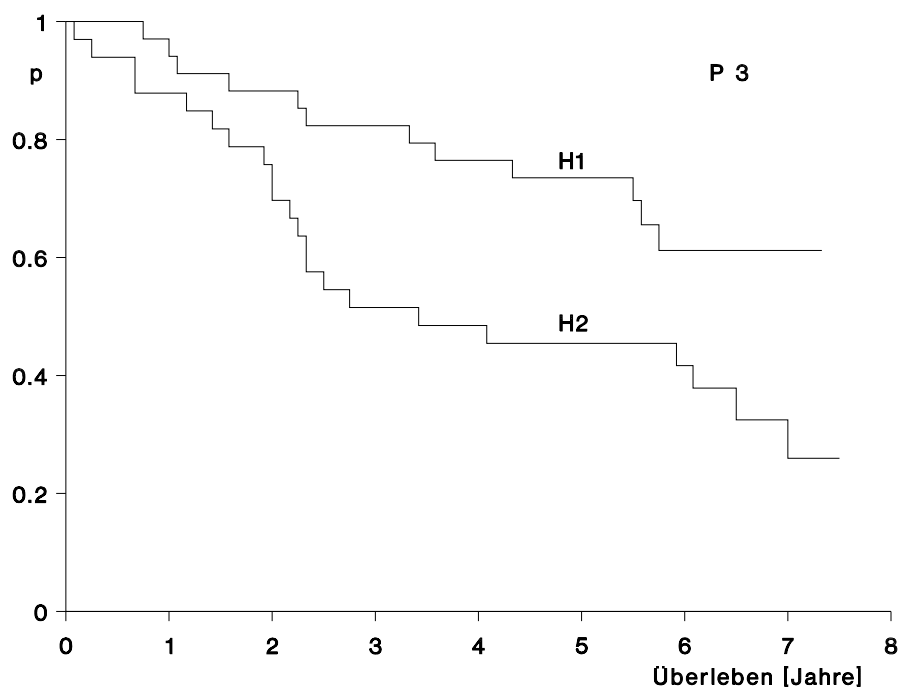


Abbildung 25: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 3; $p=0,0195$

P 4 (MIB-1_{mean} x NOR-Area_{MIB1-pos.})

Im Mittel lag der Wert für P 4 bei 89,9 mit einem Maximum von 422,6 und einem Minimum von 1,6. Bei der Unterteilung in drei Gruppen mit den Quantilgrenzen 26,07 und 104,68 finden sich signifikante Ergebnisse bezüglich des Überlebens.

Tabelle 31: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von P 4
(MIB-1_{mean} x NOR-Area_{MIB1-pos.})

MIB-1 _{mean} x NOR-Area _{MIB1-pos.}	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	17	34	16
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	88	56	38
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,8	2,3
Mittleres Überleben (Jahre)	6,5	4,8	3,7

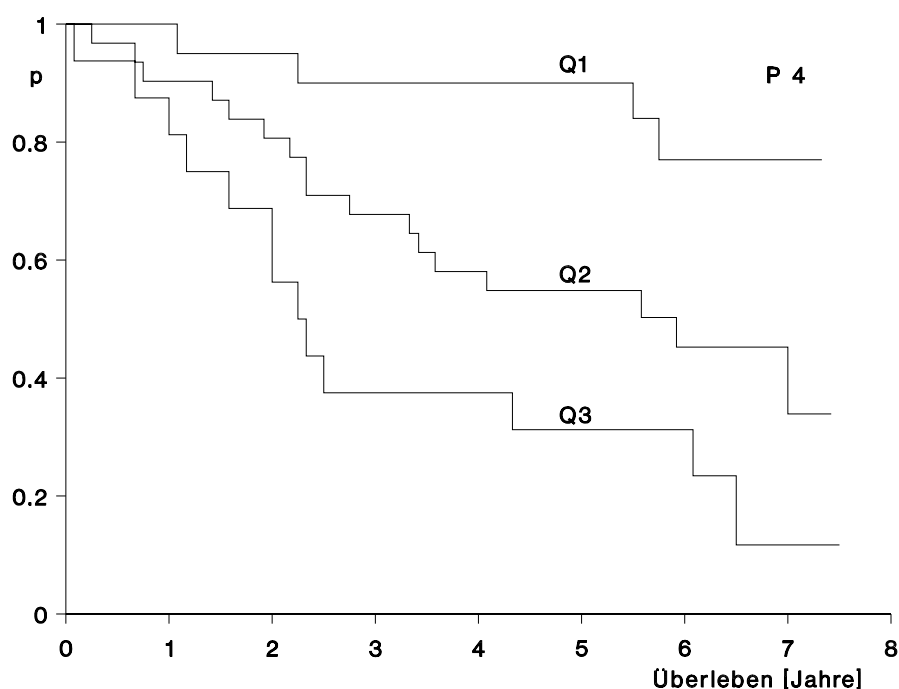


Abbildung 26: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P4; p=0,0014

Bei Unterteilung in zwei Gruppen mit dem Median (67,4) als Grenzwert finden sich signifikante Ergebnisse bezüglich des Überlebens.

Tabelle 32: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von P 4
(MIB-1_{mean} x NOR-Area_{MIB1-pos.})

MIB-1 _{mean} x NOR-Area _{MIB1-pos.}	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	34	33
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	74	46
Medianes Überleben (Jahre)	-	2,8
Mittleres Überleben (Jahre)	5,8	4,2

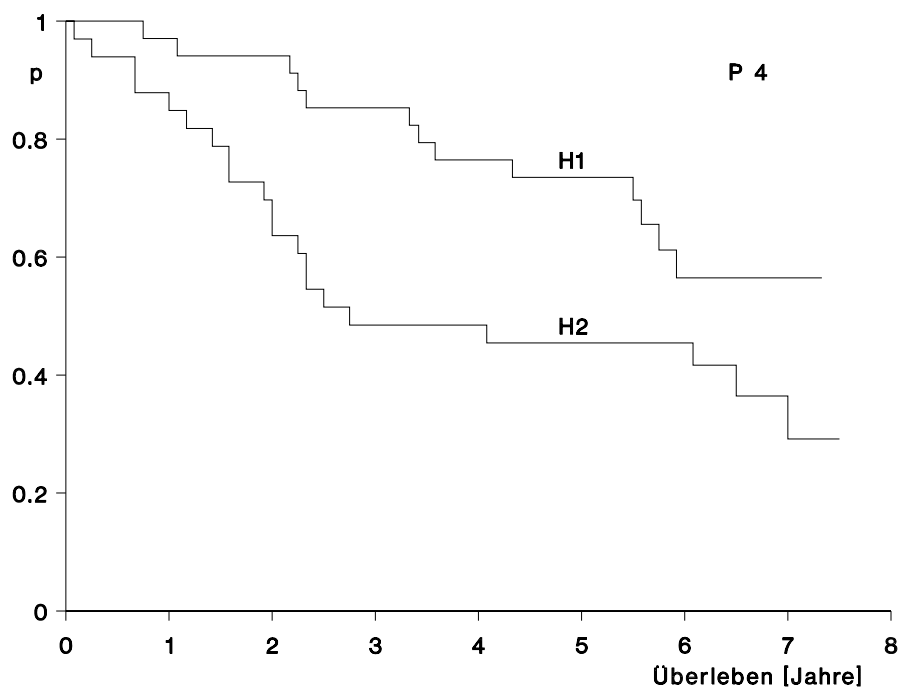


Abbildung 27: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 4; p=0,0135

3.3.1.2 "Gegenmodell"

P 1 (MIB-1_{mean} x NOR-Zahl)

Man erhält eine deutliche Korrelation. Durch 1:2:1 Quantilisierung mit den Quantilgrenzen 6,16 und 38,12 können drei Patientengruppen gebildet werden, deren Überleben signifikant abnimmt.

Tabelle 33: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von P 3 (MIB-1_{mean} x NOR-Zahl); n=89

MIB-1 _{mean} x NOR-Zahl	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	22	45	22
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	86	62	55
Medianes Überleben (Jahre)	-	6,1	5,7
Mittleres Überleben (Jahre)	6,7	5,2	4,6

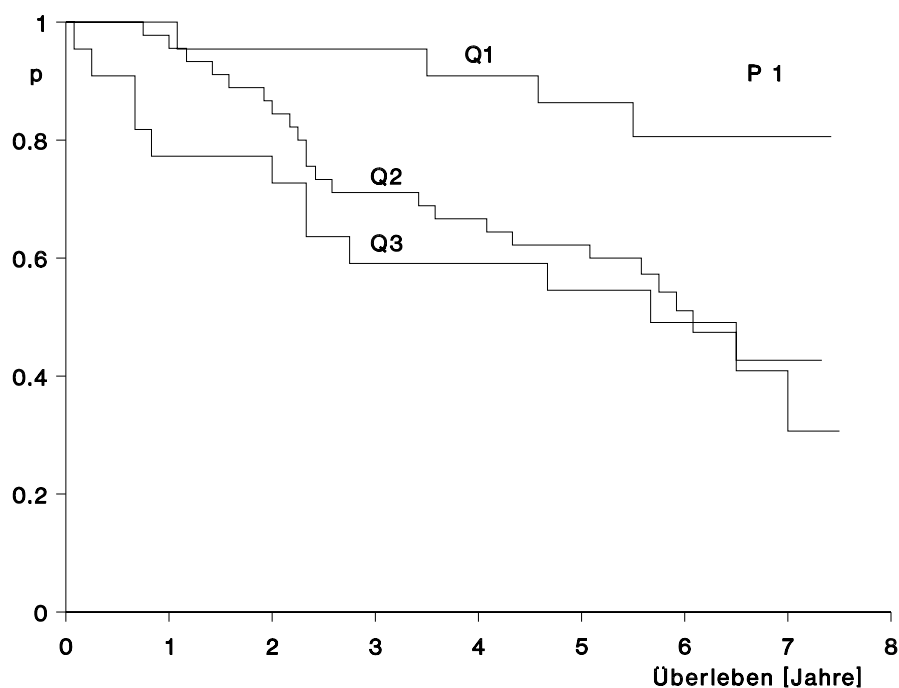


Abbildung 28: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 1; p=0,0236

Obiges gilt für eine Unterteilung in zwei Patientengruppen mit dem Median 17,19 als Grenzwert.

Tabelle 34: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von P 1 (MIB-1_{mean} x NOR-Zahl); n=89

MIB-1 _{mean} x NOR-Zahl	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	44	45
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	84	49
Medianes Überleben (Jahre)	-	4,7
Mittleres Überleben (Jahre)	6,5	4,4

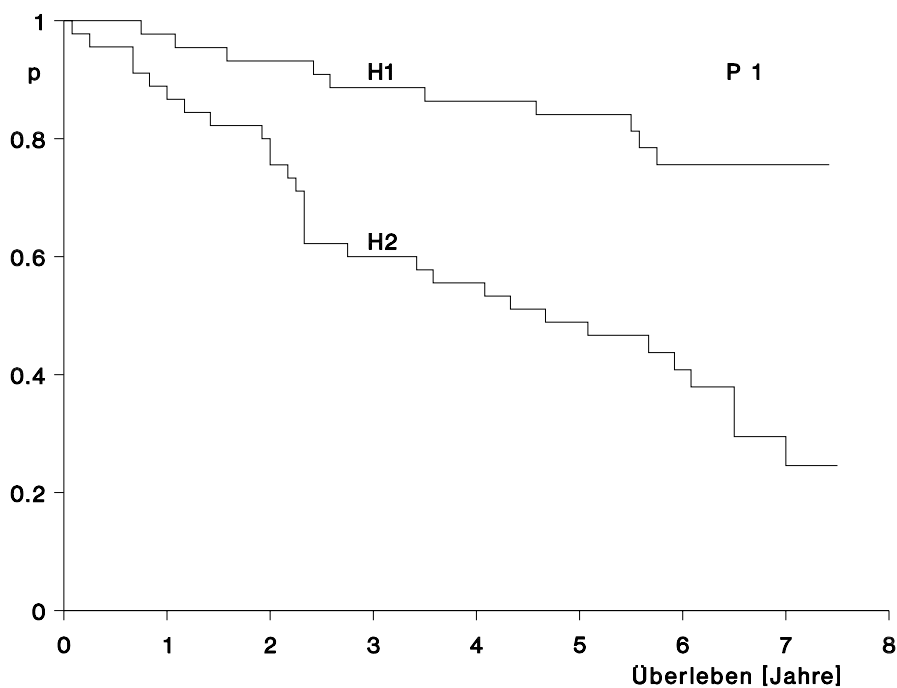


Abbildung 29: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 1; p= 0,0001

P 2 (MIB-1_{mean} x NOR-Area)

Eine deutliche Korrelation ist hier aufzuweisen. Durch 1:2:1 Quantilisierung mit den Quantilgrenzen 11,64 und 67,75 können drei Patientengruppen gebildet werden, deren Überleben signifikant abnimmt.

Tabelle 35: Überlebensunterschiede zwischen den Quantilen von P 2
(MIB-1_{mean} x NOR-Area); n=89

MIB-1 _{mean} x NOR-Area	Q1	Q2	Q3
Anzahl der Patienten (n)	22	45	22
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	86	60	59
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,9	6,5
Mittleres Überleben (Jahre)	6,7	5	5

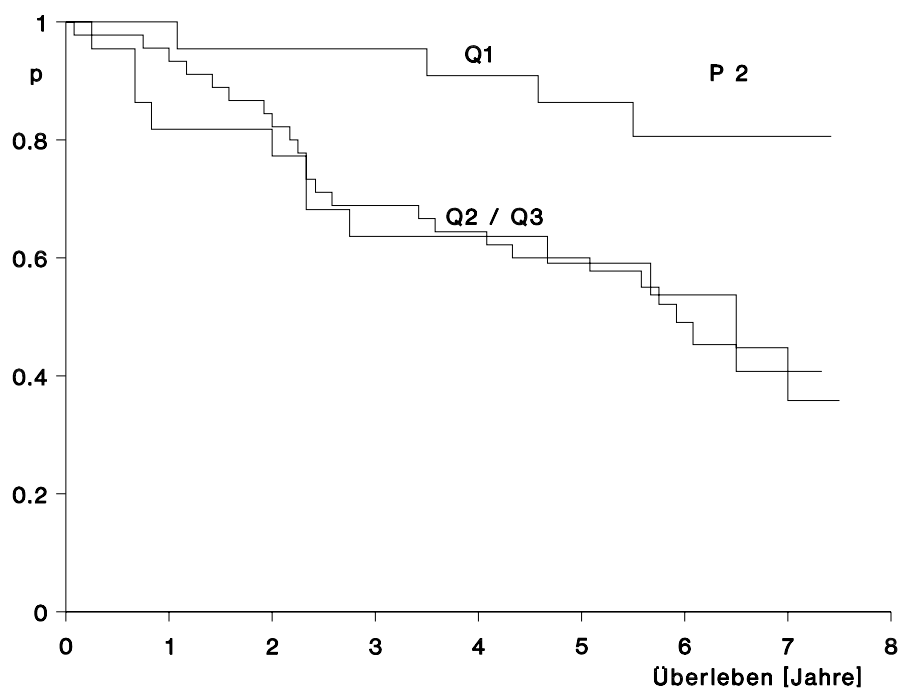


Abbildung 30: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 2; p=0,0353

Unterteilung in zwei Patientengruppen mit dem Median (31,68) als Grenzwert.

Tabelle 36: Überlebensunterschiede zwischen H1 und H2 von P 2
(MIB-1_{mean} x NOR-Area); n=89

MIB-1 _{mean} x NOR-Area	H1	H2
Anzahl der Patienten (n)	45	44
5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit (%)	80	52
Medianes Überleben (Jahre)	-	5,1
Mittleres Überleben (Jahre)	6,3	4,6

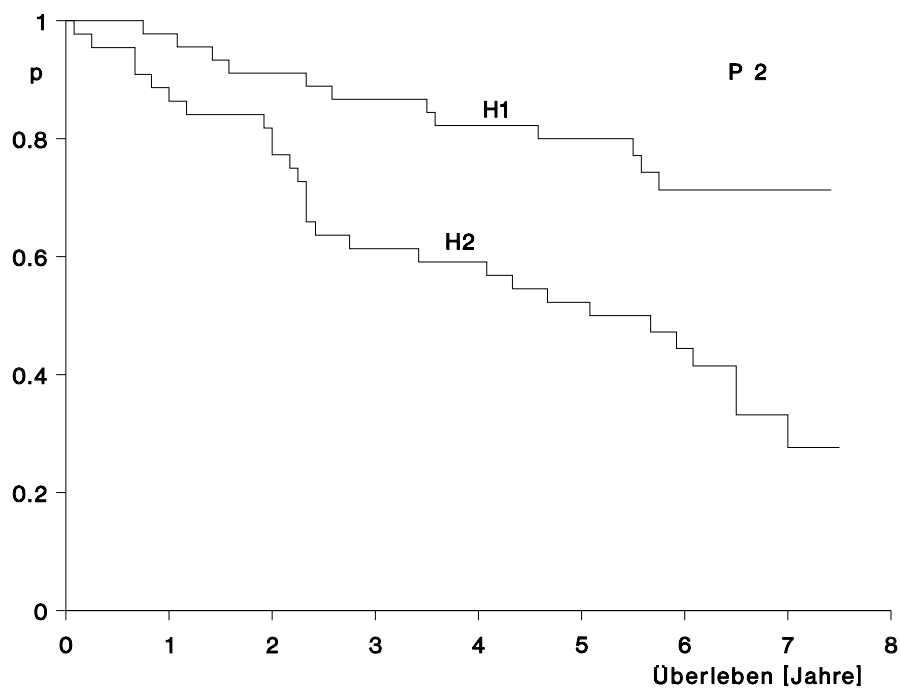


Abbildung 31: Überlebenskurven nach Kaplan und Meier für P 2; p= 0,0018

3.4 Multivariate Analyse: Cox Modelle

3.4.1 Vergleich der prognostischen Relevanz der klinischen Parameter mit den Grundgrößen MIB-1, AgNOR-Zahl, AgNOR-Zahl_{MIB-1pos}, AgNOR-Area und AgNOR-Area_{MIB-1pos}

Dargestellt sind der Chi²-enter- bzw. Chi²-remove-Wert sowie die zugehörigen p-Werte, bei denen die einzelnen Komponenten mit unabhängiger prognostischer Relevanz in das Modell aufgenommen werden bzw. im Modell gehalten werden. Angegeben ist jeweils die Ausgangsposition ("Schritt 0") und das Endergebnis nach der Aufnahme des letzten aufnahmefähigen Parameters ($p < 0.10$) ("Schritt x").

Im folgenden sind die klassischen Prognoseparameter, sowie die neueren in dieser Studie angewandten Prognoseparameter, bezogen auf die 89 Fälle der ersten Meßreihe, dargestellt.

Cox-Modell mit klassischen Staging- und Differenzierungsparametern

Schritt 0

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
pN	13,90		0,0002
MIB-1 _{max}	11,41		0,0007
MIB-1 _{mean}	10,45		0,0012
MIT	5,85		0,0156
G	4,63		0,0314
pT	4,18		0,0410
PRL	3,60		0,0579
KP	2,80		0,0940
ERL	1,76		0,1842
NOR-Area	0,21		0,6443
NOR-Zahl	0,12		0,7309

nach Schritt 5

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
MIB-1 _{mean}		13,75	0,0002
pN		12,30	0,0005
NOR Area		9,93	0,0016
pT		5,69	0,0171
PRL		4,35	0,0369
Andere Parameter	≤ 1,85		> 0,1000

Betrachtet man die klassischen Prognoseparameter und die neueren im Vergleich, so zeigt sich, daß MIB-1_{mean} die klassischen Prognoseparameter pT und pN "überholt", je weiter das Cox Modell voranschreitet. MIB-1_{mean} und pN können somit als die wichtigsten sich ergänzenden Parameter gelten.

Ersetzt man im Ansatz des Cox-Modells pN und pT durch das Gesamtstadium pTNM, so wird dieses nach MIB-1_{mean} und vor AgNOR Area als zweitbeste Größe aufgenommen.

3.4.2 Multivariate Analyse der neueren Prognosefaktoren

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Unterschiede zwischen den einzelnen globalen oder MIB-1_{mean}-bezogenen AgNOR-Parametern auch prognostisch auswirken, wurde ein Cox-Modell für die 67 Fälle der zweiten Meßreihe für ungestufte und gestufte Größen durchgeführt.

Schritt 0

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
MIB-1 _{mean}	3,71		0,0539
NOR-Zahl _{MIB-1pos.}	2,38		0,1226
NOR-Area	1,78		0,1820
NOR-Area _{MIB1-pos.}	1,74		0,1867
NOR-Zahl	0,00		0,9492

nach Schritt 3

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
NOR-Area		17,54	< 0,0001
MIB-1 _{mean}		12,73	0,0004
NOR-Area _{MIB1-pos.}		10,02	0,0015
Andere Parameter	≤ 2,09		> 0,1000

MIB-1_{mean} wird als erstes ins Cox Modell aufgenommen, gefolgt von NOR-Area und NOR-Area_{MIB1-pos.}, wobei MIB-1_{mean} nach Schritt 3 als zweitbeste Größe im Cox Modell aufgenommen wird und NOR-Area die beste Größe darstellt.

Es folgen die gestuften Werte für die 67 Fälle der zweiten Meßreihe.

Schritt 0

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
MIB-1 _{mean}	9,83		0,0017
NOR-Area _{MIB1-pos.}	3,84		0,0502
NOR-Zahl	1,00		0,3179
NOR-Area	0,46		0,4981
NOR-Zahl _{MIB-1pos.}	0,00		0,9547

nach Schritt 3

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
MIB-1 _{mean}		11,61	0,0007
NOR-Area _{MIB1-pos.}		4,63	0,0314
NOR-Area		3,84	0,0501
Andere Parameter	≤ 1,41		> 0,1000

Betrachtet man die gestuften Werte, so hat man hier MIB-1_{mean} als beste Größe wie auch bei dem Vergleich mit den klassischen Prognoseparametern. MIB-1_{mean} zeigt sich auch hier als diejenige Komponente, mit der höchsten prognostischen Relevanz.

NOR-Area_{MIB1-pos.} stellt die zweitbeste Größe dar und NOR-Area ist im letzten Schritt ebenfalls ins Cox Modell aufgenommen worden.

Beide Cox-Modelle belegen somit, daß NOR-Area_{MIB1-pos.} gegenüber NOR-Area eine eigenständige prognostische Information enthält, passend zu der Hypothese von Brugal. Diese beschäftigt sich mit der Kombination aus den neueren Prognoseparametern, für die bereits oben Cox Modelle erstellt worden sind. Um zu untersuchen, inwieweit Brugals Hypothese Gültigkeit hat und sich die Unterschiede zwischen den Kombinationsparametern auch prognostisch auswirken, wurde ein Cox-Modell für die Kombinationsparameter der 67 Fälle der zweiten Meßreihe durchgeführt.

Schritt 0

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
P 4	8,83		0,0030
P 3	6,74		0,0094
P 1	2,40		0,1210
P 2	0,84		0,3606

nach Schritt 2

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
P 4		11,81	0,0006
P 2		3,81	0,0509
Andere Parameter	≤ 0,36		> 0,1000

Innerhalb der gestuften Kombinationsparameter zeigt sich P 4 als beste Größe und derjenigen mit der höchsten prognostischen Relevanz. P2 erreicht zwar noch das Signifikanzniveau von $p < 0.10$, sein Einfluß ist jedoch nur schwach.

Um zu untersuchen, ob einer der Kombinationsparameter gegenüber den übrigen einzelnen MIB-1_{mean}- bzw. AgNOR-basierten Größen prognostisch von höherer

Relevanz ist, wurde ein weiteres Cox-Modell für die 67 Fälle der zweiten Meßreihe durchgeführt.

Schritt 0

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
P 4	8,83		0,0030
P 3	6,74		0,0094
NOR-Area _{MIB1-pos.}	2,56		0,1098
P 1	2,40		0,1210
MIB-1 _{mean}	2,24		0,1341
NOR-Area	1,94		0,1639
NOR-Zahl _{MIB-1pos.}	0,87		0,3522
P 2	0,84		0,3606
NOR-Zahl	0,04		0,8450

nach Schritt 2

	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
P 4		15,14	0,0001
NOR-Area		8,25	0,0041
Andere Parameter	≤ 2,56		>0,1000

Es zeigt sich, daß P 4 als beste Größe in das Cox Modell aufgenommen wird und neben ihm keinem anderen Kombinationsparameter, der angeboten wurde, sondern lediglich noch NOR Area unabhängige prognostische Relevanz zukommt. Dieses Ergebnis ist als Hinweis auf die biologische Bedeutung der Hypothese Brugals zu werten.

4. Diskussion

4.1 Prognostik des Mammakarzinoms mit klassischen Parametern

Für die Entscheidung der Therapieform bei Tumorerkrankungen ist die Prognoseeinschätzung von wesentlicher Bedeutung. Es gibt verschiedene Parameter, darunter klinische, pathohistologische, sowie deren Kombinationen, die dabei behilflich sind. Dennoch ist es schwierig, den Krankheitsverlauf genau vorherzusagen, da es immer Patienten gibt, die sich untypisch verhalten, z. B. Patienten, die T1N0 eingestuft wurden und nur eine geringe Überlebenszeit aufweisen, oder auch Patienten, die T3N1 eingestuft wurden und eine deutlich längere als die erwartete Überlebenszeit aufweisen. Es wäre also wünschenswert, neue Prognoseparameter zu finden oder bereits bekannte Parameter zu verfeinern bzw. zu modifizieren, anhand derer eine Verbesserung der Prognoseeinschätzung möglich ist. Um letzterem näher zu kommen, ist es hilfreich, diese in Beziehung zur Überlebenszeit oder zur Rezidivrate zu stellen.

Eines der wichtigsten angewandten Parameter für die Prognoseeinschätzung ist die Tumorausbreitung nach der TNM-Klassifikation (UICC 1987). Seine Validität ist durch viele Studien bestätigt worden (Baak et al. 1985, Biesterfeld et al. 1988, Railo et al. 1993, Hölzel et al. 1996, Shi et al. 1999). Unterstützend ist eine Signifikanz von $p=0,0076$ für das postoperative Tumorstadium und die Korrelation mit den Überlebensdaten dieser Arbeit, wobei das Überleben signifikant mit Zunahme des Stadiums abnimmt.

Der postoperative Lymphknotenstatus ist für die Prognoseeinschätzung ebenfalls von Bedeutung, insbesondere beim Mammakarzinom. Es gibt viele Arbeiten, so auch diese, die eine signifikante Korrelation des postoperativen Lymphknotenstatus mit den Überlebensdaten beschreiben (Biesterfeld 1988; Railo et al. 1993; Hölzel et al. 1996, Pierga et al. 1996). Mit einer Signifikanz von $p=0,0016$ bestätigt diese Arbeit, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit mit positivem postoperativem Lymphknotenstatus signifikant abnimmt. Nach Hölzel et al. (1996) und Shek et al. (1984) kann die beste Prognoseeinschätzung durch die Anzahl der positiven Lymphknoten gemacht werden. Falls keine positiven Lymphknoten vorhanden sind,

besteht bei Hölzel et al. eine 5-JÜLW von 96%, bei mehr als 5 positiven Lymphknoten sinkt sie auf 37%.

Die histomorphologische Gradierung nach Bloom und Richardson (1957) wird als valider Prognoseparameter, in der Literatur bestätigt (Biesterfeld et al 1988; Mitze et al. 1995, Pinder et al. 1995, Hölzel et al 1996, Seshadri et al 1997). Diese Arbeit bestätigt mit $p=0,0162$ eine signifikante Abnahme des Überlebens mit Abnahme des Differenzierungsgrades und somit die Validität der histomorphologischen Gradierung als Prognoseparameter.

Prognostische Relevanz zeigt sich auch bei der Untersuchung des biochemischen Hormonrezeptorstatus sowohl in der Literatur (Hölzel et al. 1996; Seshadri et al. 1997), als auch in dieser Arbeit. Es zeigen sich statistisch signifikante Werte von $p=0,0452$ für Östrogen- und $p=0,0133$ für Progesteronrezeptoren. Bei positivem Hormonrezeptorstaus überleben deutlich mehr Patientinnen als bei negativem Hormonrezeptorstatus. Wichtig ist die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus für den weiteren Therapieverlauf. Vor allem der Östrogenrezeptorstatus ist von Bedeutung, da die adjuvante Hormontherapie vor allem auf Antiöstrogenen basiert, z. B. Tamoxifen. Manche Autoren beschreiben auch keine bzw nur eine gering signifikante Korrelation für Östrogenrezeptoren (Gasparini et al. 1994, Mitze et al. 1995, Pichon et al 1997), ebenso wie für Progesteronrezeptoren (Gasparini et al. 1994, Mitze et al. 1995, Pichon et al 1997). Einige Autoren sehen ihren Nutzen lediglich in der therapeutischen Entscheidung. Trotz dieser Zweifel hat sich die Nutzung der Hormonrezeptoren in der klinischen Praxis bewährt. Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus gehört mittlerweile zur klinischen Routine und therapeutische Entscheidungen werden in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus getroffen.

4.2 Prognostik des Mammakarzinoms durch Bestimmung der Proliferationsfraktion

Ein weiterer Parameter, der für die Prognoseeinschätzung genutzt wird, ist das von Gerdes entdeckte Proliferationsantigen Ki-67 (Gerdes et al. 1983). Das Ki-67 Antigen kann durch den zugehörigen MIB-1 Antikörper (Cattoretti et al. 1992) in

Paraffinschnitten dargestellt werden. Hier ist eine vorherige Mikrowellenbehandlung zur Demaskierung des Epitops erforderlich. Die Identifikation ist in jedem Routinelabor möglich, sofern Kenntnisse zum immunhistochemischen Verfahren vorliegen. Alternativ besteht bei Vorliegen von Gefrierschnitten die Möglichkeit der Markierung des Ki-67 Antigens durch den ursprünglichen Ki-67 Antikörper. Das Proliferationsantigen Ki-67 markiert alle Zellen, die sich in der Proliferation befinden (G1-, S-, G2- und M-Phase). Es ist jedoch keine Aussage über die Dauer des Zellzyklus machbar. Viele Untersuchungen und Vergleiche sind zu diesem Thema gemacht worden, und es finden sich signifikante Korrelationen zwischen dem Überleben und der mit Hilfe von MIB-1 respektive Ki-67 bestimmtem Proliferation (Pietilainen et al. 1996; Querzoli et al. 1996; Sundblad et al. 1996). Mit $p = 0,0243$ unterstützt diese Arbeit diese Ergebnisse. Das Überleben nimmt mit Zunahme der Proliferationsfraktion $MIB-1_{mean}$ ab. Ki_{Max} als höchste Einzelwerte der Meßfelder zeigen ebenfalls statistische Signifikanz bezüglich der Überlebensdaten ($p = 0,0282$). Das Überleben nimmt auch hier mit steigender Proliferationsfraktion ab. Demnach ist die prognostische Relevanz für $MIB-1_{mean}$ und Ki_{Max} vergleichbar.

Tendentiell wurden Proliferationsmarker, wie MIB-1 oder der Mitoseindex, einzeln auf ihre prognostische Signifikanz untersucht. Es gibt aber auch einige vergleichende Untersuchungen von MIB-1 und dem Mitoseindex. Rudolph et al. führten 1998 eine vergleichende Untersuchung an invasiv duktalem Mammakarzinomen ($n=62$), Plattenepithelkarzinomen ($n=44$), kolorektalen Adenokarzinomen ($n=38$), nicht kleinzelligen ($n=23$) und kleinzelligen ($n=22$) Bronchialkarzinomen durch. Die höchste Korrelation fand sich bei den invasiv duktalem Mammakarzinomen ($p < 0,0000001$) und den nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ($p < 0,000022$). Das entspricht auch den Ergebnissen von Weidner et al. von 1994, die ebenfalls die Korrelation des Mitoseindex und der MIB-1 Expression bei Mammakarzinomen untersuchten. Natürlich gibt es Kontroversen. Die Studien von Isola et al. von 1990 und Keshgegian et al. von 1995 verglichen ebenfalls den Zusammenhang von MIB-1 und dem Mitoseindex an Mammakarzinomen. Bei beiden fand sich jedoch nur eine schwache Korrelation. Eine etwas schwächere Korrelation fand sich bei Rudolph et al. auch bei den kolorektalen Adenokarzinomen ($p = 0,0012$), keine Signifikanz trat bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen auf und erstaunlicherweise eine inverse Korrelation für die Plattenepithelkarzinome ($p = 0,0027$). Die Arbeitsgruppe von Rudolph untersuchte weiterhin den Zusammenhang zur Tumorgadierung ohne

Rücksicht auf den Ursprung des Tumors. Sie fanden eine signifikante Korrelation für G1 ($p=0,000005$) und G2 ($p=0,000001$) Tumore. Keine Signifikanz ergab sich jedoch bei G3 ($p=0,51$) Tumore. Sowohl Mitoseindex als auch die MIB-1 Expression korrelieren signifikant mit der Tumorgradierung, wobei MIB-1 mit $p<0,00005$ besser abschneidet als der Mitoseindex mit $p=0,0001$. Ähnliche Ergebnisse für den Zusammenhang zwischen MIB-1 und dem Mitoseindex fanden Schröder et al. 1991 bei der Untersuchung von Glioblastomen und Meningeomen. In dieser Studie fand sich ebenfalls eine prognostische signifikanz in der univariaten Analyse für den Mitoseindex und für MIB-1. Nach der multivariaten Analyse war der Mitoseindex im Cox Modell nicht mehr vertreten, wohingegen MIB-1 am Besten abschnitt.

4.3 Nukleolus organisierende Regionen als neue Prognosefaktoren

Als neuerer Prognosefaktor ist die Betrachtung von AgNORs zu sehen. Das Interesse an den Nukleolus organisierenden Regionen ist seit 1986, als Ploton eine vernünftige und praktikable Methode für AgNOR Färbungen eingeführt hat (Ploton et al. 1986), gestiegen. Dies zeigt sich auch an der Zunahme der publizierten Arbeiten auf diesem Gebiet. Zentraler Punkt vieler Untersuchungen war der Zusammenhang zwischen dem Anteil der Tumorzellen, die sich in der Proliferation befinden und der Geschwindigkeit ihrer Proliferation, um so Aussagen über das Tumorstadium und somit auch über die Prognose machen zu können.

Zu Beginn des "AgNOR-Zeitalters" ergaben sich Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der verschiedenen Untersuchungen, die zu diesem Thema durchgeführt wurden. Ploton beschrieb 1986 eine einfache Methode zur Visualisierung von AgNORs. Es stellte sich jedoch heraus, daß man abhängig von der Fixierung der Präparate, des Labors und des Untersuchers unterschiedliche Resultate erhielt und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen konnte. Die verwendeten Präparate waren häufig in Paraffin eingebettet. Dies hat unterschiedliche Auswirkungen auf das Gewebe. Man hat zum einen eine verbesserte Histomorphologie, zum anderen jedoch eine nicht zu vernachlässigende Abnahme der Sensitivität für alle immunhistochemischen Protein- und Rezeptornachweise. Die Proteine sind in ihrer Struktur durch die Fixierung und Einbettung verändert worden. Diese Problematik findet sich ebenfalls bei den AgNOR Proteinen. Die Versilberung ist bei in Paraffin eingebetteten Präparaten schlechter. Es haben verschiedene Untersuchungen stattgefunden, um dieses Problem zu beheben. Es stellte sich heraus, daß sowohl für die

immunhistochemische Färbung (Bier et al. 1995), als auch für die Darstellung der NORs (Öfner et al. 1994) die vorherige Demaskierung der Bindungsstellen durch Autoklavieren von essentieller Bedeutung ist. Diese Erkenntnis führte dazu, daß man nach Autoklavieren der Gewebeproben reproduzierbare Ergebnisse erhielt. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden 1994 offizielle Richtlinien zur standardisierten AgNOR Analyse durch das "International Committee on AgNOR Quantitation" (Aubele et al. 1994) veröffentlicht. Man hat sich an der Versilberungstechnik Plotons (Ploton et al. 1986) und an Öfners Modifizierung im Sinne des Autoklavierens (Öfner et al. 1994) orientiert.

Die AgNORs nehmen durch die Regulation der Transkriptionsaktivität Einfluß auf die Proliferationsgeschwindigkeit (Roussel et al. 1992). Korrelationen zwischen MIB-1 (Gerdes et al. 1983) bzw. PCNA (Bravo et al. 1987) als üblichen Proliferationsmarkern und AgNORs sind festgestellt worden. Positive Korrelationen für MIB-1 und AgNOR Quantität zeigten sich auch in Untersuchungen von Non-Hodgkin Lymphomen (Hall et al. 1988), Mammakarzinomen (Dervan et al. 1989, di Stefano et al. 1991, Raymond et al. 1989) und Glioblastomen (Hara et al. 1991). Die Korrelation für PCNA und AgNOR Quantität wurde an Kolorektalen- (Risio et al. 1993), und Blasenkarzinomen (Skopelitou et al. 1992) nachgewiesen. AgNORs können durch eine Vielzahl von Parametern beschrieben werden, in dieser Studie interessieren insbesondere die Anzahl und die Fläche der AgNORs. Beim Mammakarzinom haben Dervan et al. 1989 und Rüschoff et al. 1990 Korrelationen zwischen der Anzahl wie auch der Fläche der AgNORs und der Proliferationsfraktion nachweisen können.

4.4 Konzepte zur klinischen Anwendung

Brugal und seine Mitarbeiter entwickelten 1994 eine Hypothese (Brugal et al. 1994, Bigras et al. 1996), die die Tumorkinetik durch die Kombination von zwei voneinander unabhängigen Faktoren erfassen sollte. Sie kombinierten MIB-1 zur Erfassung des Anteils der in Proliferation befindlichen Zellen mit den Nukleolus organisierenden Regionen zur Erfassung der Geschwindigkeit der Proliferation. In den frühen neunziger Jahren war die inverse Korrelation zwischen der AgNOR-Zahl und der Dauer des Zellzyklus in Experimenten mit Zellkulturen von verschiedenen Seiten belegt worden (Trere et al. 1989, Derenzini et al. 1990, Derenzini et al. 1991, Hittmair et al. 1994, Öfner et al. 1992, Rüschoff et al. 1994, Sirri et al. 1995). Diese Erkenntnis stellte einen der zwei grundlegenden Aspekte von Brugals Hypothese

dar. Genauso wichtig waren die Erkenntnisse über die Darstellung der in Proliferation befindlichen Zellen und das Bewußtsein, daß bei der Darstellung lediglich der Anteil und nicht die Geschwindigkeit der in Proliferation befindlichen Zellen dargestellt wird. So könnte ein Tumor mit wenigen schnell proliferierenden Zellen schneller wachsen, als ein Tumor mit vielen langsam proliferierenden Zellen, was man bei alleiniger Betrachtung der proliferierenden Zellen nicht unbedingt erwarten würde. Brugal und seine Mitarbeiter haben durch Entwicklung ihrer Hypothese theoretisch einen Ansatz gefunden, eine Aussage über die Generationszeit zu machen. Leider basiert sie bisher nur auf theoretischer Grundlage, ohne daß bisher Untersuchungen mit klinischen Daten durchgeführt worden sind.

Es gibt einige Berichte, die eine Korrelation zwischen separat erhobenen AgNOR-Merkmalen und der Immunreaktivität des Tumorgewebes für Ki-67, MIB-1 oder PCNA nachweist: Sie weisen zwar nicht alle eine streng lineare, aber dennoch eine auffällige Korrelation der untersuchten Parameter auf. Statistisch signifikante Korrelationen sind bei verschiedenen bösartigen Erkrankungen beschrieben worden wie akuter Leukämie (Shome et al. 1999), Non-Hodgkin- Lymphomen (Hendricks et al. 1995), Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhlen (Piffko et al. 1997, Yue et al. 1999), Nierenzellkarzinomen (Tannapfel et al. 1996) oder Mammakarzinomen (di Stefano et al. 1991, Mourad et al. 1994, Bellotti et al. 1997, Kesari et al. 1997, Bånkfalvi et al. 1998).

Desweiteren wurde die Simultanfärbung für AgNORs und für die immunhistochemisch darstellbaren Proliferationsmarker etabliert. Daraufhin hat man die AgNORs in den für die Proliferationsmarker positiven Bereichen mit denen in den für die Proliferationsmarker negativen Bereichen verglichen. Janmohamed et al. haben 1990 Untersuchungen an Gefrierschnitten von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), davon sieben indolente Lymphome und sechs aggressive Lymphome, durchgeführt. Die Gewebeproben wurden zunächst immunhistochemisch mit monoklonalen MIB-1 Antikörpern markiert, und anschließend wurde an den selben Gewebeproben die AgNOR Reaktion durchgeführt. Das Ergebnis war ein signifikanter Unterschied der AgNOR-Zahl in MIB-1 positiven und MIB-1 negativen Zellen ($p < 0,001$). In MIB-1 positiven Zellen fanden sich entsprechend mehr AgNORs als in MIB-1 negativen Zellen. Dies fand sich sowohl in den indolenten, als auch in den aggressiven Lymphomen, ebenso ist der Anteil an MIB-1 positiven Zellen in den

aggressiven Lymphomen deutlich höher als in den indolenten Lymphomen, was einen weiteren Hinweis für den Zusammenhang zwischen AgNORs und der Zellproliferation lieferte. Munakata et al. haben als Erstbeschreiber 1994 die Simultanfärbung an in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt. Sie untersuchten acht interfollikuläre Gewebeproben von Tonsillen, die MIB-1 positive und MIB-1 negative Zellen enthielten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen MIB-1 positiven und MIB-1 negativen Zellen für AgNOR-Area ($p < 0,001$) und AgNOR-Zahl ($p < 0,001$). Die Ergebnisse, die Janmohamed et al. 1990 an Gefrierschnitten zeigen konnte, haben sich in dieser Studie auch in Paraffin gebetteten Gewebeproben bestätigt. Bänkfalvis Arbeitsgruppe hat 1998 eine Simultanfärbung an Gewebeproben von zehn invasiv ductalen Mammakarzinomen durchgeführt. Auch hier fanden sich signifikante Unterschiede zwischen MIB-1 positiven und MIB-1 negativen Zellen für die Variationskoeffizienten von AgNOR-Area ($p = 0,005$) und AgNOR-Zahl ($p = 0,013$). Für alle zitierten Studien gilt, daß die AgNOR-Werte in den MIB-1 positiven Kernen im Durchschnitt höher waren als in den MIB-1 negativen.

4.5 Klinische Umsetzung

AgNORs sind als Indikator für die Aggressivität eines Tumors vielfach untersucht und bestätigt worden (Crocker et al. 1988). Natürlich gab es auch Arbeiten, die diese Korrelationen nicht fanden, z. B. untersuchten Hansen et al. 1992 und Zambelli et al. 1993 das Verhalten von AgNORs an Blasentumoren und konnten diese Ergebnisse nicht teilen. Die Kenntnis der Korrelation von AgNORs mit proliferierenden Zellen (Raymond et al. 1989, Pich et al. 1991) führte dazu, daß Tomobe et al. 1999 beide Parameter kombinierten, um so eine prognostische Aussage zu machen. Ihre über die Rezidivrate bei Blasenkarzinomen ist die erste, die die Bedeutung der Hypothese Brugals für die Klinik bezüglich Rezidiven untersucht. Es wurde an 50 Gewebeproben von Blasentumoren (pTa und pT1), davon 15 mit bekanntem Rezidiv im Verlauf, eine Simultanfärbung durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß die AgNOR Merkmale der MIB-1 positiven Tumorzellen die beste Vorhersage für die Rezidivhäufigkeit bot, insbesondere die $\text{AgNOR-Zahl}_{\text{MIB-1 pos.}}$ mit $p < 0,01$. Tumordifferenzierung, die Analyse von MIB-1 und die Analyse von AgNOR Merkmalen in der gesamten Tumorzellpopulation schnitten alle schlechter ab (Tomobe et al. 1999).

Die hier vorgelegte eigene Studie ist die erste Prognosearbeit mit kombinierter Simultanfärbung von MIB-1 und AgNOR. Zunächst ist die Menge der AgNORs zwischen der gesamten Tumorzellpopulation und den MIB-1 positiven Tumorzellen verglichen worden. Dieser Vergleich schien für klinische Zwecke angemessener zu sein, als der Vergleich von MIB-1 positiven und MIB-1 negativen Tumorzellen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß ein höherer Nutzen für die Klinik in der AgNOR-Analyse von MIB-1 positiven Tumorzellen liegt. Die Verteilung der AgNOR Merkmale unterscheidet sich signifikant von denen der gesamten Tumorzellpopulation und der prognostische Wert der Ergebnisse war für MIB-1 positive Bereiche deutlich besser (siehe Abb.11). Tab.15 zeigt im Vergleich für die AgNOR Summenfläche und die AgNOR-Zahl eine fast 50%ige Steigerung der Mittelwerte bei fast gleicher Standardabweichung. Betrachtet man die Korrelationen zwischen den MIB-1 und AgNOR Daten, zeigt sich, daß $MIB-1_{mean}$ keine bzw. nur grenzwertig signifikante Korrelationen zur AgNOR-Zahl bzw. AgNOR Summenfläche zeigt. Im Zusammenhang mit der multivariaten Analyse im Cox Modell, bei der sich sowohl $MIB-1_{mean}$ als auch $AgNOR_{sumarea}$ als relevante Prognosefaktoren darstellen, wird die Unabhängigkeit der Variablen voneinander belegt. Somit besteht die Möglichkeit ihres Einsatzes in der Bewertung klinischer Fälle und der Therapieplanung.

Insbesondere wichtig ist, daß die prognostische Signifikanz von dem kombinierten MIB-1-AgNOR Parameter P 4 höher ist, als die seiner Komponenten $MIB-1_{mean}$ und $AgNOR-Area_{MIB-1pos}$. In den Überlebenskurven nach Kaplan und Meier läßt sich eine Unterteilung in drei Patientengruppen mit statistisch unterschiedlichem Überleben vollziehen. (Wilcoxon-Breslow-Test: $MIB-1_{mean}$, $p = 0,0018$; $AgNOR_{area}$, $p > 0,05$; P 4 in drei Gruppen, $p = 0,0014$). Damit ist der Kombinationsparameter P 4 besser als seine Einzelkomponenten.

In dieser Studie sind Probleme aufgefallen, die die Simultanfärbung mit sich bringt. Diese Methode kann nicht in allen Fällen angemessen angewandt werden. Es ist zu erwähnen, daß Fälle mit einem geringen Anteil an MIB-1 positiven Tumorzellen, die nachweisbar eine gute Prognose haben (Biesterfeld et al. 1998), mit dieser Methode nur schlecht faßbar sind. Wenn der Anteil an MIB-1 positiven Tumorzellen nur 0,5% oder 1% beträgt, benötigt man 20000 bzw. 10000 Tumorzellen, um überhaupt auf

100 MIB-1 positive Tumorzellkerne zu kommen. Daher konnten in dieser Arbeit auch nur 67 Fälle (=75%) untersucht werden. Die übrigen 22 wiesen eine zu geringe Zahl an MIB-1 positiven Tumorzellkernen auf.

Die hier vorgestellte Ergebnisse sprechen für die Hypothese Brugals. Der Ansatz Brugals könnte insbesondere Patientinnen helfen, die man nach den klassischen Risikofaktoren in eine niedrige Risikogruppe einstufen würde, die aber dennoch eine geringe Überlebensrate haben. Eine zusätzlich Analyse im Sinne der Hypothese Brugals kann Auskunft über ein aggressives Tumorwachstum geben. Entsprechend könnte die Therapie angepaßt werden, und so eine bessere Überlebensrate für die Patientinnen erreicht werden. Dennoch ist es nötig, diese Hypothese durch weitere Untersuchungen an Mammakarzinomen und anderen Kollektiven maligner Tumore zu festigen.

5. Zusammenfassung

Die Dauer der einzelnen Phasen des Zellzyklus und die Generationszeit der Zellpopulation sind unter in vitro Bedingungen nicht zugänglich. Demnach kann die Proliferationsaktivität der Zellen nicht zuverlässig bestimmt werden. Vor einigen Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Proliferationsaktivität P einer Zellpopulation indirekt bestimmt werden kann. Dazu wird die Wachstumsfraktion mittels MIB-1 und die Generationszeit mit den AgNORs in den MIB-1 positiven Tumorzellen dargestellt. Das Produkt aus den genannten Größen läßt auf die Proliferationsaktivität P schließen: $P = \text{MIB-1} \times \text{AgNOR}_{\text{MIB-1 pos.}}$.

Um die prognostische Signifikanz dieser Hypothese zu überprüfen wurden in dieser Arbeit 89 Fälle von Mammakarzinomen einer 8-jährigen follow-up Studie untersucht. Die in Paraffin eingebetteten Präparate erhielten eine Simultanfärbung. Die Wachstumsfraktion wurde immunhistochemisch mit Hilfe von MIB-1 als Antikörper und die AgNORs wurden mittels Versilberungstechnik nach einem standardisiertem Schema dargestellt. Als Immunmarkierungssubstanz wurde für MIB-1 Streptavidin mit alkalischer Phosphatase verwendet. Für die Auswertung der AgNORs bot sich die Möglichkeit der Nutzung des Bildverarbeitungssystems AMBA, welches im Pathologischen Institut der Charité Berlin im Labor für automatisierte Mikroskopbildanalyse entwickelt wurde. Jedes Präparat wurde zweimal untersucht. Zuerst wurden die AgNOR Merkmale von 150 zufällig ausgewählten Zellkernen bestimmt, gleichgültig, ob sie MIB-1 positiv oder MIB-1 negativ waren. In einer zweiten Messung wurden in den Präparaten 100 Zellkerne auf ihren AgNOR-Bestand untersucht, wobei diese ausnahmslos MIB-1 positiv waren. Für jedes Präparat wurde die mittlere Anzahl und die mittlere Fläche der AgNORs bestimmt.

Vergleicht man die Werte der MIB-1 positiven Tumorzellkerne mit denen der gesamten Tumorzellpopulation, zeigt sich eine andere Verteilung der Werte. AgNOR-Zahl und $\text{AgNOR-Zahl}_{\text{MIB-1 pos.}}$ unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen ($2,7 \pm 0,7$ vs. $3,9 \pm 1,1$), obwohl sie signifikant korreliert sind ($r=0,315$; $p=0,014$). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich für die Fläche AgNOR Area und $\text{AgNOR-Area}_{\text{MIB-1 pos.}}$ ($5,1 \pm 2,1 \mu\text{m}^2$ vs. $7,5 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$; $r=0,501$; $p<0,001$). Überlebenskurven nach Kaplan und Meier ließen signifikante Unterschiede lediglich für $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ ($p=0,0018$) und $\text{AgNOR-Area}_{\text{MIB-1 pos.}}$ ($p=0,0340$) erkennen. Im Cox Modell ermöglichen $\text{MIB-1}_{\text{mean}}$ ($p=0,0025$) und $\text{AgNOR-Area}_{\text{MIB-1 pos.}}$ ($p=0,0775$) statistisch unabhängige prognostische Informationen. Die Proliferationsaktivität P

ermöglicht eine Unterteilung in drei Gruppen mit statistisch unterschiedlichem Überleben. Mit $p=0,0014$ hat P eine höhere prognostische Signifikanz als seine beiden Komponenten.

Demnach scheint die Kombination aus MIB-1 positiven Zellen und AgNORs eine bessere Aussagefähigkeit bezüglich der Prognose beim Mammakarzinom zu haben als die alleinige Betrachtung von MIB-1 positiven Zellen oder AgNORs.

6. Datensammlung

Tabelle 37:

Nr	Jahr	E-Nr	Alter	Leben	Status	pT	pN	M	Tu	G	TD	KP	MIT	ERL	PRL
1	88	12132	47	7.42	1	2	0	0	3.7	3	3	3	3	102	0
2	88	9194	51	7.50	1	3	1	0	5.0	3	3	3	3	0	0
3	88	13387	35	7.42	1	2	0	0	4.0	2	1	3	2	0	0
4	88	14502	38	6.50	0	2	1	0	3.2	3	3	3	2	12	119
6	88	16355	56	0.25	0	3	1	1	8.0	3	3	3	2	20	0
7	88	16526	32	7.33	1	2	1	0	2.5	1	2	1	1	12	39
9	88	23641	41	6.50	0	2	0	0	2.0	2	2	2	2	44	54
10	88	24147	50	7.08	1	1	0	0	0.7	1	1	2	1	100	0
11	88	35506	41	6.83	1	2	0	0	2.0	1	2	1	1	45	241
12	88	35702	53	6.83	1	1	0	0	1.5	2	2	3	1	0	0
13	89	248	54	6.67	1	1	0	0	1.3	2		2	2	102	0
14	88	16605	55	7.33	1	3	1	0	5.0	3	3	3	2	35	27
15	88	21571	55	7.17	1	2	0	0	2.5	3	2	3	3	197	78
17	88	38145	55	6.75	1	2	1	0	2.0	2	3	2	1	149	414
19	89	15569	64	6.33	1	2	0	0	2.1	2		2	1	1796	457
20	89	1740	66	1.92	0	2	1	0	2.5	2	2	3	1	876	3000
21	88	19448	65	7.33	1	2	0	0	4.0	2	3	2	1	70	178

Nr	Jahr	E-Nr	Alter	Leben	Status	pT	pN	M	Tu	G	TD	KP	MIT	ERL	PRL
22	88	18005	66	7.00	0	1	1	0	1.8	2	3	2	2	17	0
24	89	16172	49	6.25	1	2	0	0	2.0	3	3	3	2	0	0
25	89	21719	51	6.17	1	2	0	0	2.7	3	3	2	3	0	10
26	89	27522	62	6.00	1	2	0	0	2.5	2	2	3	1	409	301
27	89	16312	53	2.50	0	3	1	0	5.0	3	3	3	2	2	4
28	89	23477	34	4.67	0	2	1	0	4.5	3	3	3	3	52	86
31	88	19811	73	7.25	1	2	1	0	3.6	3	3	3	2	1446	0
32	88	33779	34	6.83	1	2	0	0	3.0	1		1	1	34	111
33	88	35584	54	2.25	0	3	1	1	5.0	3	3	3	2	170	95
34	88	16260	54	6.25	1	2	1	0	2.5	3	3	3	2	111	339
35	88	37752	85	4.58	0	2	1	0	2.4	1	3	1	1	130	357
36	89	8936	58	6.50	1	2	0	0	2.0	1	2	2	2	200	0
37	89	21113	32	3.33	0	2	1	0	4.0	1	3	3	2	62	40
38	89	29856	95	0.83	0	2	0	0	4.5	3	3	3	3	0	0
39	89	15678	65	6.08	0	2	1	0	2.1	3		3	1	1796	0
40	89	17454	41	3.50	0	3	1	0	5.0	2	3	3	1	16	102
41	89	18674	52	6.25	1	3	0	0	5.0	1	1	1	2	20	0
42	89	31359	39	2.00	0	2	1	0	3.0	3	3	3	3	0	0
43	88	35512	54	6.83	1	2	0	0	3.0	2	3	2	1	14	213
45	88	13388	71	5.75	0	2	0	0	2.5	3	2	3	2	235	90

Nr	Jahr	E-Nr	Alter	Leben	Status	pT	pN	M	Tu	G	TD	KP	MIT	ERL	PRL
47	88	39095	74	6.75	1	1	1	0	1.5	3	3	3	3	437	835
50	88	18798	67	7.25	1	2	0	0	2.0	2	2	3	1	558	0
51	88	18562	63	7.25	1	1	0	0	1.5	2	3	2	1	29	62
52	89	17587	63	2.33	0	2	0	0	4.5		3			836	18
53	88	30665	73	6.92	1	1	0	0	0.6	2	3	2	1	28	0
54	88	31159	74	6.92	1	2	0	0	3.5	2	3	2	1	544	609
55	89	30390	66	5.92	1	2	0	0	2.0	3	3	3	2	213	980
56	88	16933	85	2.25	0	2	0	0	4.8	2				2527	162
58	88	13592	90	0.08	0	4	0	1	5.0	3	3	3	3	78	24
59	88	27447	54	7.00	1	3	0	0	5.0	2	2	3	1	55	484
62	89	32700	81	5.92	1	2	0	1	2.2	2	3	2	1	0	0
63	89	17452	54	6.25	1	2	1	0	2.0	2	3	3	1	0	2
64	89	31831	82	5.50	0	1	0	0	1.5	2	3	2	1	0	58
65	89	20438	64	5.67	0	2	1	0	2.9	2	3	2	2	80	0
66	89	13674	63	5.92	0	2	1	0	2.5	2	3	3	1	179	0
67	89	23339	46	6.08	1	2	0	0	2.2	1	2	2	1	79	103
68	88	27813	89	3.58	0	4	0	0	3.0	2	2	2	2	15	0
69	88	33867	66	3.42	0	4	0	1	4.5	3	3	2	3	401	0
71	88	23958	81	2.00	0	2	1	0	2.5	2	2	3	2	0	0
73	89	14682	50	1.58	0	3	1	0	5.5	2	3	2	2	25	38

Nr	Jahr	E-Nr	Alter	Leben	Status	pT	pN	M	Tu	G	TD	KP	MIT	ERL	PRL
74	89	33788	45	2.75	0	2	1	0	3.5	3	3	3	3	0	0
75	89	35133	62	1.08	0	2	1	0	3.0	1	2	1	1	16	0
76	89	31903	52	5.92	1	3	0	0	5.0	2	3	3	1	40	0
77	89	36570	80	5.75	1	2	1	0	3.0	2				20	91
78	90	4474	78	2.17	0	4	1	0	6.0	3	3	3	2	367	410
80	90	3010	53	2.33	0	1	1	0	1.8	3	3	3	2	71	0
81	90	1284	56	5.08	0	2	1	0	2.0	3	2	3		39	28
82	90	1306	74	5.67	1	4	1		1.7	3		3	1	146	66
86	89	17586	83	6.25	1	1		1	1.5					79	67
88	89	10258	38	1.58	0	3	1	0	6.0	3	3	3	3	20	8
89	88	22820	61	2.58	0	3	1	1	5.5	2	3	2	1	19	0
90	88	24306	55	2.33	0	2	1	0	2.0	2	3	2	1	13	0
91	89	30773	58	1.00	0	2	1	0	2.5	3	2	3	3	0	0
93	89	38262	58	0.67	0	3	1	0		3	3	3	3	0	0
95	88	23105	54	0.75	0	2	1	0	4.0	3	3	3	2	0	0
96	88	30797	53	6.92	1	1	0	0	1.9	3	3	3	2	0	0
97	89	23234	72	6.08	1	2	1	0	3.5	2	3	2	1	489	602
100	90	11758	49	5.42	1	3	1	0	5.2	2	2	3	2	96	48
101	90	7858	51	5.50	1	2	1	0	3.5		2			460	0

Nr	Jahr	E-Nr	Alter	Leben	Status	pT	pN	M	Tu	G	TD	KP	MIT	ERL	PRL
102	90	23025	51	4.33	0	2	0	0	3.0	2	3	3	1	1056	0
104	90	20997	53	5.25	1	2	1	0	2.5	1	2	2	1	103	87
105	90	21043	76	5.25	1	2	1	0	4.0	2	3	2	2	68	148
106	90	16840	65	5.33	1	2	0	0	3.5	3	3	3	3	0	26
110	90	13244	53	5.42	1	3	0	0	5.0	2	3	2	1	14	134
111	89	31559	59	5.58	0	3	1	0	5.5	1	2	2	1	20	30
114	89	20381	82	1.42	0	2	0	0	2.1	1	2	2	1	270	75
115	90	13666	74	2.33	0	1	1	0	1.8	3	2	3	3	0	0
116	90	14323	51	5.42	1	4	1	0	4.0	2	3	2	1	89	1430
119	90	20229	57	2.42	0	3	1	1	5.0	2	2	3	2	408	36
121	90	13040	64	5.42	1	2	1	0	2.0	3	3	3	2	338	184
122	90	20711	54	5.25	1	1	0	0	1.8	1		2	1	11	20
123	90	18436	69	5.25	1	2	1	0	4.0	2	3	3	1	288	22
124	90	22584	75	0.67	0	2	0	0	2.2	3	3	2	3	0	0
126	90	14324	66	5.42	1	2	0	0	2.3	2	3	2	1	147	33
128	90	23649	44	4.08	0	2	1	0		2	3	2	1	30	55
130	90	21533	35	1.17	0	2	1	0	3.0	2	3	3	1	0	0
131	90	5823	77	5.58	1	1	0	0	1.4	2	2	2	2	0	0
133	90	19900	67	5.25	1	2	0	0	3.0	1	3	1	1	22	0

Erläuterungen zu Tabelle 37:

Pat Nr: Patienten Nummer

Jahr: Eingangsjahr

E-Nr: Eingangsnummer

Alter: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosstellung

Leben: Überlebensjahre zum Zeitpunkt der Datenerhebung

Status: 1=Leben; 2=Tod zum Zeitpunkt der Datenerhebung

pT: postoperative Tumorgroße

pN: postoperativer Lymphknotenstatus

M: Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Datenerhebung; 0=negativ; 1=positiv

Tu: Tumorgroße in cm

G: histologische Gradierung

TD: tubuläre Differenzierung

KP: Kernpleomorphie

MIT: Mitosefrequenz

Tabelle 38:

Nr	MIB-1 _{mean}	NOR-Area	NOR-Area2	NOR-Zahl	NOR-Zahl2	P 1	P 2	P 3	P 4
1	17.9	7.33	7.13	4.32	4.11	77.33	131.21	73.57	127.63
2	25.0	10.80	11.73	3.95	4.55	98.75	270.00	113.75	293.25
3	0.0	5.26		2.89		0.00	0.00		
4	13.5	5.13	7.46	3.10	4.46	41.85	69.26	60.21	100.71
6	32.1	5.86	6.46	3.83	4.78	122.94	188.11	153.44	207.37
7	1.5	5.53	5.80	2.75	3.01	4.12	8.30	4.51	8.70
9	8.1	4.66		2.30		18.63	37.75		
10	0.5	5.46		1.98		0.99	2.73		
11	1.3	4.20	6.60	1.68	3.37	2.1	5.46	4.38	8.58
12	3.7	3.46		2.64		9.77	12.80		
13	15.3	4.33	5.86	3.45	3.63	52.78	66.25	55.54	89.66
14	13.5	5.20		2.92		39.42	70.20		
15	8.1	9.20	11.00	3.19	4.03	25.84	74.52	32.64	89.10
17	4.2	3.40		2.36		9.91	14.28		
19	2.5	5.13		2.51		6.28	12.83		
20	13.4	3.86	6.86	2.63	3.77	35.24	51.72	50.52	91.92
21	3.7	3.46		2.11		7.81	12.80		
22	20.5	4.93	5.53	3.55	3.58	72.78	101.06	73.39	113.37
24	40.8	7.40	7.46	3.21	4.29	130.97	301.92	175.03	304.37

Nr	MIB-1 _{mean}	NOR-Area	NOR-Area2	NOR-Zahl	NOR-Zahl2	P 1	P 2	P 3	P 4
25	31.8	8.00		3.69		117.34	254.40		
26	1.1	3.26	6.13	2.47	3.96	2.72	3.59	4.36	6.74
27	11.3		10.20		4.55			51.42	115.26
28	23.9	3.80		1.89		45.17	90.82		
31	4.3	4.40	5.00	2.75	3.42	11.83	18.92	14.71	21.50
32	0.3	3.26		2.15		0.65	0.98		
33	11.2	5.46	7.66	2.18	5.15	24.42	61.15	57.68	85.79
34	14.2	5.53	6.66	3.24	3.73	46.01	78.53	52.97	94.57
35	3.3	3.13		1.44		4.75	10.33		
36	4.5	5.33		2.95		13.28	23.99		
37	5.6		7.40		4.79			26.82	41.44
38	61.2	7.73		4.32		264.38	473.08		
39	13.2	3.06	7.93	1.91	3.99	25.21	40.39	52.67	104.68
40	0.0	3.20		2.10		0.00	0.00		
41	11.8	6.46	6.26	3.12	3.16	36.82	76.23	37.29	73.87
42	37.0	9.86	8.53	3.80	3.54	140.60	364.82	130.98	315.61
43	1.4	3.13		1.90		2.66	4.38		
45	5.4	3.80	5.80	2.37	3.69	12.80	20.52	19.93	31.32
47	0.1	3.93		2.47		0.25	0.39		
50	4.7	3.80	5.33	2.47	3.41	11.61	17.86	16.03	25.05

Nr	MIB-1 _{mean}	NOR-Area	NOR-Area2	NOR-Zahl	NOR-Zahl2	P 1	P 2	P 3	P 4
51	0.1	4.20		2.71		0.27	0.42		
52	9.9	3.20	5.40	2.11	3.29	20.89	31.68	32.57	53.46
53	4.4		7.93		5.00			22.00	34.89
54	0.2	2.80		2.25		0.45	0.56		
55	5.3	4.33	6.80	2.80	5.66	14.84	22.95	30.00	36.04
56	3.5		5.00		3.39			11.87	17.50
58	11.9	5.26	9.93	3.36	6.21	39.98	62.59	73.90	118.17
59	15.4	3.60	7.00	2.37	4.87	36.50	55.44	75.00	107.80
62	3.7	4.46	4.80	1.58	2.66	5.85	16.50	9.84	17.76
63	0.0	3.60		2.84		0.00	0.00		
64	1.8	3.00	6.40	2.43	3.53	4.37	5.40	6.35	11.52
65	18.1	5.06		2.56		46.34	91.59		
66	11.4	4.60	5.66	3.23	3.62	36.82	52.44	41.27	64.52
67	6.8	3.40	5.60	2.27	3.30	15.44	23.12	22.44	38.08
68	5.6	4.06	9.60	3.07	4.93	17.19	22.74	27.61	53.76
69	15.5	3.60	4.33	2.17	2.88	33.64	55.80	44.64	67.11
71	8.7	6.20	14.13	3.11	6.47	27.06	53.94	56.29	122.93
73	12.7		8.06		3.26			41.40	102.36
74	36.7	5.66	6.73	3.26	3.57	119.64	207.72	131.02	246.99
75	0.4	2.80	4.06	1.96	2.00	0.78	1.12	0.80	1.62

Nr	MIB-1 _{mean}	NOR-Area	NOR-Area2	NOR-Zahl	NOR-Zahl2	P 1	P 2	P 3	P 4
76	4.8	8.60	3.13	2.15	1.66	10.32	41.28	7.97	15.02
77	2.2	5.40	7.40	3.00	4.00	6.60	11.88	8.80	16.28
78	12.7	3.60	4.40	2.56	2.64	32.51	45.72	33.53	55.88
80	20.3	5.26		2.64		53.59	106.78		
81	7.5	4.33		3.08		23.10	32.47		
82	3.8	3.00	6.86	2.09	4.88	7.94	11.40	18.54	26.07
86	0.5	3.60	3.60	2.83	2.00	1.41	1.80	1.00	1.80
88	6.8	3.33	11.40	1.94	2.71	13.19	22.64	18.43	77.52
89	2.9	4.20		2.49		7.22	12.18		
90	11.1	4.00	7.13	2.06	2.63	22.87	44.40	29.19	79.14
91	11.0	5.46	11.93	2.44	2.85	26.84	60.06	31.35	131.23
93	22.9	7.00	11.46	2.90	3.14	66.41	160.30	71.91	262.43
95	3.3	6.33	9.06	3.56	3.46	11.75	20.89	11.42	29.90
96	5.3	10.20	12.80	2.81	3.35	14.89	54.06	17.76	67.84
97	1.2	4.26	6.60	2.96	3.31	3.55	5.11	3.97	7.92
100	7.3	5.60	9.60	2.66	3.41	19.42	40.88	24.89	70.08
101	6.0		7.13		2.98			17.88	42.78
102	8.8	4.20	7.66	2.18	3.03	19.18	36.96	26.66	67.41
104	0.9	4.66		2.90		2.61	4.19		

Nr	MIB-1 _{mean}	NOR-Area	NOR-Area2	NOR-Zahl	NOR-Zahl2	P 1	P 2	P 3	P 4
105	11.9	6.53	6.20	3.82	3.05	45.46	77.71	36.29	73.78
106	31.7	9.46	13.33	2.60	3.08	82.42	299.88	97.64	422.56
110	2.1	4.33	7.93	2.96	2.98	6.22	9.09	6.26	16.65
111	4.3	3.40	7.26	2.22	4.44	9.55	14.62	19.09	31.22
114	7.6	3.40	9.66	3.04	6.62	23.10	25.84	50.31	73.42
115	34.3	10.60	10.46	4.91	6.63	168.41	363.58	227.41	358.78
116	4.1	3.13	6.46	2.23	4.42	9.14	12.83	18.12	26.49
119	7.0	4.53		1.98		13.86	31.71		
121	2.6	4.66	7.13	2.35	4.01	6.11	12.12	10.43	18.54
122	3.0	1.33		2.39		7.17	3.99		
123	4.1	4.20	10.06	1.44	4.88	5.90	17.22	20.01	41.25
124	22.6	3.86	6.60	2.39	4.86	54.01	87.24	109.84	149.16
126	6.4	4.06	8.73	2.69	4.91	17.22	25.98	31.42	55.87
128	11.8	3.60	6.33	2.15	3.32	25.37	42.48	39.18	74.69
130	12.3	2.86	7.80	1.88	4.88	23.12	35.18	60.02	95.94
131	12.9	3.86		2.74		35.35	49.79		
133	0.7	3.33	6.00	1.80	3.22	1.26	2.33	2.25	4.20

Erläuterungen zu Tabelle 38:

Pat Nr: Patientennummer

ERL: Bindungskapazität der Östrogenrezeptoren in fmol/mg

PRL: Bindungskapazität der Progesteronrezeptoren in fmol/mg

MIB-1_{mean}: prozentualer Mittelwert der Proliferationsfraktion

NOR Area: Mittelwert der in μm^2 gemessenen Zellkernschnittfläche

NOR Area2: Mittelwert der in μm^2 gemessenen Zellkernschnittfläche von MIB-1 positiven Tumorzellen

NOR Zahl: Mittelwert der Anzahl der gemessenen Zellkerne

NOR Zahl 2 : Mittelwert der Anzahl der gemessenen Zellkerne von MIB-1 positiven Tumorzellen

P 1: Produkt aus MIB-1_{mean} und NOR Zahl

P 2: Produkt aus MIB-1_{mean} und NOR Area

P 3: Produkt aus MIB-1_{mean} und NOR Zahl_{MIB-1pos}

P 4: Produkt aus MIB-1_{mean} und NOR Zahl_{MIB-1pos}

7. Literatur

Andersen J, Thorpe S, Rose C, Christensen I, Rasmussen B, Poulsen H:
Estrogen receptor in primary breast cancer estimate in paraffin-embedded tissue.
Acta Oncol 30: 685-690, 1991

Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Öfner D, Ploton D, Rüschoff:
Guidelines of AgNOR quantitation.
Zentralbl Pathol 140: 107-108, 1994

Baak J, van Dop H, Kurver P, Hermans J:
The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer.
Cancer 56: 374-382, 1985

Bánkfalvi A, Schmitz K, Mock T, Kemper M, Cubick C, Böcker W:
Relationship between AgNOR proteins, Ki-67 antigen, p53 immunophenotype and differentiation markers in archival breast carcinomas.
Anal Cellul Pathol 17: 231-242, 1998

Bellotti M, Elsner B, Kahn A, Bezodnick L, Pisilli L, Greco P:
Morphometric determination of AgNORs in breast carcinoma. Correlation with flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen.
Anal Quant Cytol Histol 19: 139-144, 1997

Bier B, Bankfalvi A, Grote L, Blasius S, Öfner D:
Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue.
Histochem J 27:148-154, 1985

Biesterfeld S, Klüppel D, Koch R, Schneider S, Steinhagen G, Mihalcea AM, Schröder W:
Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistometry of the most positive tumour focus. A prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR.
J Pathol 185: 25-31, 1998

Bigras G, Marcelpoil R, Brambilla E, Brugal G:
Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer.
Anal Cellul Pathol 11: 183-198, 1996

Bloom HJG, Richardson WW:
Histological grading and prognosis in breast cancer.
Br J Cancer: 11: 359-377, 1957

Bravo R, Frank R, Blundell PA, McDonald BH:
Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta.
Nature 1987; 326: 515-519

Brugal G:

Interpretation of proliferation markers. in: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenk U (eds.): Compendium of the computerized cytology and histology laboratory.

Tutorials of Cytology, Chicago, 1994, pp. 234-240

Cattoretti G, Becker M, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Gallet J, Gerdes J: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections Journal of Pathology 168: 357-363, 1992

Champion H, Wallace I:

Breast cancer grading.

Br J Cancer 25: 441-448, 1971.

Cox DR:

Regression models and life-tables.

J R Stat Soc 34: 187-220, 1972

Crocker J, Egan M J:

Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas.

J Pathol 156: 233-239, 1988

Dao T, Nemoto T:

Steroid receptors and response to endocrine ablations in women with metastatic cancer of the breast.

Cancer 46: 2779-2782, 1980

Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trerè D, Badiali M, Dehan P:

Relationship between interphase nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines.

Am J Pathol 134: 925-932, 1991

Derenzini M, Pession A, Trerè D:

The quantity of nucleolar silver stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells.

Lab Invest 63: 137-140, 1990

Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BM, Carney DN:

Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki-67 scores.

Am Clin Pathol 92: 401-407, 1989

Di Stefano D, Mignazzini PL, Scucchi L, Doetti M, Marinozzi V:

A comparative study on histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining and nucleolar organizer region- associated proteins in human breast cancer.

Cancer 1991; 67: 463-471

Esteban J, Ahn C, Mehta P, Battifora H:
Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer.
Am-J-Clin-Pathol 102: 158-162,1994

Fakan S , Hernandez-Verdun D:
The nucleolus and the nucleolar organizer region.
Biol Cell 56: 189-206, 1986

Ferguson-Smith MA:
The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes.
Cytogenetics 3: 124-125, 1964

Gasparini G, Boracchi P, Verderio P, Bevilacqua P:
Cell kinetics in human breast cancer: Comparison between the cytometric s-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunohistochemistry.
Int J Cancer 57: 822-829, 1994

Gerdes J, Schwab H, Lemke H, Stein H:
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.
Int J Cancer 31: 13-20, 1983

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H , Schwab U, Stein H:
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67.
The Journal of Immunology 133: 1710-1715, 1984

Gerdes J, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H:
Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody ki-67.
American Journal of Pathology 138: 867-873, 1991

Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AG:
A comparison of nucleolar organizer region staining Ki-67 immunostaining in non-hodgkin's lymphoma.
Histopathology 12: 373-381, 1988

Hansen AB, Bjerregaard B, Ovesen H, Horn, T:
AgNOR counts and histological grade in stage pTa bladder tumours: reproducibility and relation to recurrence pattern.
Histopathology 20: 257, 1992

Hara A, Hirayama H, et al.:
Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas.
Surg Neurol 1990; 33:320-324

Heitz E:
Nukleolen und Chromosomen der Gattung Vicia.
Planta 15: 495-505, 1931

Hendricks JB, Rainer R, Munakata S:
Computer assisted and visual methods of assessing cellular proliferation in tissue sections from non-Hodgkin's lymphoma a comparison.
Anal Quant Cytol Histol 17: 383-388, 1995

Hittmair A, Öfner D, Offner F, Feichtinger H, Ensinger C, Rogatsch H, Mikuz G:
In vitro investigations of interphase and metaphase argyrophilic nucleolar organizerregions and cellular proliferation in the human urothelial cancer cell line HOK-1.
Virchows Arch 424: 149-154, 1994

Hölzel D, Klamert A, Schmidt M:
Krebs: Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse.
W. Zuckschwert Verlag München, 1996

Howell WM, Black DA:
Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective-colloid developer: a 1 step method.
Experientia 36: 1014-1017, 1980

Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, et al.:
Evaluation of proliferation in breast carcinoma: Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DANN flow cytometric analysis and mitotic count.
Cancer 65: 1180-1184, 1990

Janmohamed RM, Murray PG, Crocker J, Leyland MJ:
Sequential demonstration of nucleolar organizer regions and Ki-67 immunolabeling in non-Hodgkin's lymphoma.
Clin Lab Haematol 12: 395-399, 1990

Kesari AL, Chellam VG, Nair PP, Madhavan J, Nair P, Nair MK, Pillai MR:
Tumor proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma.
Gen Diagn Pathol 143: 219-224, 1997

Keshgegian AA, Cnaan A:
Prolifertion markers in breast carcinoma: Mitotic finger count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1
Am J Clin Pathol 104: 42-40, 1995

McCarty K, Kinsel L, Georgiade G, Leight G, McCarty K Sr:
Long term prognostic implications of sex steroidreceptors in human breast cancer.
Prog Clin Biol Res 322: 279-293,1990.

Mitze M, Weikel W, Brumm C, Lippold R, Knapstein P:
Einfluß der Proliferationsrate auf den Krankheitsverlauf von nodal negativen Mammakarzinomen.
Geburtshilfe Frauenheilkunde 55:299-305, 1995

Mourad WA, Sneige N, Katz RL, Ordonez NG:
Correlations of two AgNOR counts with Ki-67 labelling index: a study in fine-needle aspirates of lymphoproliferative disorders and breast carcinoma.
Diagn Cytopathol 10: 113-119, 1994

Munakata S, Hendricks JB:
A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki 67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin embedded tissue.
J Histochem Cytochem 42: 789-793, 1994

Öfner D, Hittmair A, Marth C, Öfner C, Tötsch M, Daxenbichler G, Mikuz G, Margreiter R, Schmid KW:
Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (AgNORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines.
Pathol Res Pract 188: 742-746, 1992

Öfner D, Bánkfalvi A, Riehemann K, Böcker W, Schmid KW:
Wet autoclave pretreatment improves the visualisation of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (AgNORs) in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.
Mod Pathol 7: 946-950, 1994

Paridaens R, Sylvester R, Ferrazzi E, Legros E, Leclercq G, Heuson J:
Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer.
Cancer 46: 2889-2895, 1980

Peter M, Nakagawa J, Dore M, Labb JC, Nigg EA:
Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cd2 kinase.
Cell 60: 791-801, 1990

Pich A, Valente G, Azzoni L, Stramignoni A, Margaria E, Tasso M:
Argyrophilic nucleolar organizer region counts in human renal cell carcinoma.
Path Res Pract 187: 482, 1991

Pichon MF, Broet P, Magdelenat H, Delarue JC, Spyrtos F, Basuyau JP, Saez S, Rallet A, Courriere P, Millon R, Asselain B:
Prognostic value of steroid receptors after long-term follow up of 2257 operable breast cancers.
Eur J Cancer Clin Oncol 25 (2): 243-250, 1989

Pierga J, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H:
Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer.
Breast Cancer Res Treat 35: 57-64, 1996

Pietlainen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V, Syrjänen K:
The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis
in breast cancer.
J-Cancer-Res-Clin-Oncol, 122 (11):687-692, 1996

Piffkò J, Bánkfalvi À, Öfner D, Rasch D, Joos U, Schmid KW:
Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell
carcinomas.
J Pathol 182: 450-456, 1997

Pinder S, Wencyk P, Sibbering D, Bell J, Elston C, Nicholson R, Robertson J,
Blamey R, Ellis I:
Assesment of the new proliferation marker MIB-1 in breast carcinoma using image
analysis: associations with other prognostic factors and survival.
Br J Cancer 71: 146-149, 1995

Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ:
Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the
nucleolar organizer region at the optical level.
Histochem J 18: 5-14, 1986

Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, Rinaldi R, Magri E, Indelli M, Nenci I:
MIB 1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis.
J Clin Pathol 49: 926-930, 1996

Roth K, Wenzelides K:
Das interaktive Bildverarbeitungssystem AMBA/R.
Gegenbaurs Morphol Jahrb 135 : 25-32, 1989

Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllönen L, von Smitten K:
Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer.
Br J Cancer 68: 579-583, 1993

Raymond WA, Leong AS:
Nucleolar organizer regions related to growth fraction in human breast carcinoma.
Human Pathol: 20: 741-746, 1989

Risio M, Rossini FP:
Cell proliferation of colorectal adenomas containing invasive carcinoma.
Anticancer Res 1993; 13:43-47

Rüschoff J: Nukleolus-organisierende Regionen (NORs) in der
pathomorphologischen Tumordiagnostik
Veroff Pathol 139 : 1-144, 1992

Rüschoff J, Bittinger A, Neumann K, Schmitz-Moormann P:
Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the
sigmoid colon and rectum.
Pathol Res Pract 186: 85-91, 1990

Rüschoff J, Fauser G, Knüchel R, Hofstädter F:
AgNOR quantification with special reference to staining patterns.
Zentralbl Pathol 140: 23-30, 1994

Schröder R, Bien K, Kott R, et al.:
The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: Demonstration of the variability of the intermitotic cycle time.
Acta Neuropathol Berl 82: 389-394, 1991

Schwarzacher H G, Mikelsaar A V, Schnede W: The
nature of Ag-staining of nucleolusorganizer regions.
Cytogenetics and Cell Genetics 20: 24-39, 1978

Seshadri R, Horsfall D, McCaul K, Leong A:
A simple index to predict prognosis independent of axillary node information in breast cancer.
Aust-N-Z-J-Surg 67 (11): 765-770, 1997

Shek LL, Godolphin W:
Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage estrogen receptor concentration and tumor necrosis.
Minerva Med: 75 (13): 709-12, 1984

Shi Y, He L, Chen Y, Li J:
The correlation of clinicopathologic features, hormone receptor level with the prognosis of breast cancer: report of 308 cases in elderly women.
Radiology: 39 (7): 508-12, 1999

Shome DK, Khurana N:
Distinctive AgNOR patterns of myeloid and lymphoid blasts in acute leukemia.
Am J Hematol 61: 149-152, 1999

Sirri V, Persson A, Trerè D, Montanaro L, Derenzini M:
Proportionally constant quantitative transmission of nucleolin and protein B23 in cycling cancer cells.
J Clin Pathol 48: M264-M268, 1995

di Stefano D, Mingazzini L, Scucchi L, Doetti M, Marinozzi V:
A comparative study on histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki67 immunostaining and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer.
Cancer 67: 463-471, 1991

Stenkvist B, Westman-Naeser S, Vegelius J, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, Eriksson O:
Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma.
J Clin Pathol 32 979-985, 1979

- Sundblad A, Ahn C, Battifora H:
Immunohistochemical detection of bcl-2 and MIB-1/Ki-67 in breast cancer: retrospective analysis of 238 cases.
Medicina-B-Aires, 56 (3): 343-347, 1996
- Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW:
Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma.
Cancer 77: 164-171, 1996
- Tomobe M, Shimazui T, Uchida K, Hinotsu S, Akaza H:
Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor.
J Urol 162: 63-68, 1999
- Trerè D, Pession A, Derenzini M:
The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate.
Exp Cell Res 184: 131-137, 1989
- UICC (Union Internationale contre le cancer) TNM. Klassifikation maligner Tumoren.
Berlin: Springer Verlag, 1987.
- Untch M, Konecny G, Sitteck H, Keßler M, Reiser M, Hepp H: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, State of the art 2000;
W. Zuckschwert Verlag München
- Weidner N, Moore DH, Vartanian R: Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB-1 antibody.
Hum Pathol 25: 337-342
- Yue L, Iwai M, Furuta I:
Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinomas.
Oral Oncol 35: 70-76, 1999
- Zambelli S, Zanin A, Gaglio A, Zai G, Bosco E, Andron A, Magnani C:
Ki-67 scores and AgNOR counts in transitional cell carcinoma of the bladder: apparent lack of prognostic value.
Arch Ital Urol Androl 65: 665, 1993

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Mittermayr möchte ich für die Möglichkeit der Promotion im Institut für Pathologie danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. Stefan Biesterfeld, der mich während der Durchführung dieser Arbeit immer sehr gut betreut hat und mir für alle Fragen zur Verfügung stand.

Weiteren Dank schulde ich Dr. Peter Hufnagl, der mich bei der automatisierten Mikroskopbildanalyse an der Charité Berlin unterstützt hat.

Ebenso möchte ich Frau Jantzen danken, die mir durch ihre Erfahrung im Labor bei der Aufarbeitung und Färbung des Materials eine sehr große Hilfe war.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

9. Lebenslauf

Personalien

Name: Faraneh Farokhzad
Geburtsdatum: 25. November 1974
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dr. med . S. Farokhzad
Dr. med. P. Farokhzad geb. Darabi
Familienstand: ledig

Schule

Gymnasium Theodor Heuss, Hagen
Abiturnote 1,8

Universitäre Ausbildung

Studium

September 1994: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der RWTH Aachen
August 1996: Ärztliche Vorprüfung
August 1997: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/97-02/98: Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität
Wien
März 1998: Fortführung des Studiums der Humanmedizin an der RWTH-
Aachen
August 1999: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

Juli 2001- Dezember 2002

Beschäftigung als Ärztin im Praktikum am Universitätskrankenhaus Hamburg
Eppendorf in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Seit Januar 2003

Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätskrankenhaus
Hamburg Eppendorf in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. J. Schulte am Esch

Faraneh Farokhzad