

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik  
Tübingen

Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

Flowzytometrische und immunhisto-  
chemische Untersuchungen zur  
Bestimmung der Tumorerogenität  
beim Ovarialkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen

vorgelegt von  
**Cosima Zeeb**  
aus Stuttgart

2002

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Franz
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. P. Hirnle

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1	<u>Allgemeines</u>	1
1.2	<u>Prognosefaktoren</u>	2
1.2.1	<u>Bestimmung der Ploidie mittels DNA-Flowzytometrie</u>	2
1.2.2	<u>Immunhistochemie, HER2/neu</u>	3
<b>2</b>	<b><u>Ziel der Arbeit</u></b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>5</b>
3.1	<u>DNA-Flowzytometrie (FCM)</u>	5
3.1.1	<u>Zellbiologische Grundlagen</u>	5
3.1.2	<u>Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers</u>	7
3.2	<u>Auswahl des Probenmaterials</u>	10
3.3	<u>Präparation des Gewebes für die FCM-Analyse</u>	10
3.4	<u>Datenerhebung und –auswertung</u>	11
3.4.1	<u>Dot-Plot</u>	11
3.4.2	<u>Histogramm</u>	12
3.5	<u>Bestimmung der Ploidie mit Hilfe des DNA-Index (DI)</u>	13
3.5.1	<u>Das diploide Histogramm</u>	13
3.5.2	<u>Das aneuploide Histogramm</u>	13
3.6	<u>Qualität der Messergebnisse</u>	15
3.7	<u>Immunhistochemische Untersuchungen der HER2/neu Rezeptor-Expression</u>	15
3.8	<u>Statistische Auswertung</u>	17
<b>4</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>18</b>
4.1	<u>Überblick</u>	18
4.1.1	<u>Das Patientenkollektiv (Alter, Histologie, Grading, Tumorrest)</u>	18
4.1.2	<u>Ein- und Ausschlusskriterien</u>	19
4.2	<u>Intratumorale DNA-Heterogenität</u>	20
4.3	<u>Korrelation der Durchflußzytometrie mit den klinischen Parametern</u>	20
4.4	<u>Korrelation der Immunhistochemie mit den klinischen Parametern</u>	26
4.5	<u>Analyse des klinischen Verlaufes</u>	30
4.5.1	<u>Rezidivfreie Zeit</u>	30
4.5.2	<u>Überlebenszeit</u>	35
<b>5</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>40</b>
5.1	<u>Ploidie</u>	40
5.2	<u>HER2-Status</u>	47
<b>6</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b><u>Anhang</u></b>	<b>52</b>
7.1	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	52
7.2	<u>Tabellenverzeichnis</u>	53
7.3	<u>Literaturverzeichnis</u>	54
	<b><u>Danksagung</u></b>	<b>71</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Das Ovarialkarzinom ist unter den bösartigen Genitaltumoren der Frau der dritthäufigste mit etwa 15 - 28 % (124). Die Zahl der Todesfälle, die auf diesen Tumor entfallen, liegt jedoch mit 47 % deutlich höher. Dieser ungünstigen Prognose liegt die Tatsache zugrunde, dass die Erkrankung selten Frühsymptome oder häufig nur unspezifische Symptome verursacht. Somit befinden sich bei Erstdiagnose bereits 40 - 50 % im Stadium III, 15 - 20 % sogar im Stadium IV (6, 109, 124). Die 5-Jahres-Überlebensrate in diesen Stadien liegt bei 5-15 %.

Charakteristisch für das Ovarialkarzinom ist seine biologische Heterogenität. Das Spektrum reicht von „Tumoren niedriger Malignität“ bis zu äußerst aggressiv wachsenden, schnell proliferierenden, metastasierenden Karzinomen, die häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

Histologisch lassen sich die Ovarialtumoren in verschiedene Untergruppen aufteilen: Man findet epitheliale Tumoren, Keimstrang- und Keimdrüsen-Stromatumoren, Keimzelltumoren, Bindegewebstumoren und metastatische Malignome. Epitheliale Tumoren lassen sich wiederum untergliedern in seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige und Mischtumoren. In dieser Arbeit wurden nur epitheliale Ovarialkarzinome untersucht, da diese mit 70 % den Hauptanteil der malignen Ovarialtumoren darstellen.

Die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms ist momentan die operative radikale Tumorentfernung bzw. -reduktion inklusive pelviner und paraaortaler Lymphknotenentfernung. In den meisten Fällen muss eine weitere Therapie angeschlossen werden. Zur Verfügung stehen derzeit die adjuvante oder palliative Chemotherapie, die Strahlentherapie sowie Hormon- und Immuntherapien. Die Wahl der postoperativen Folgetherapie ist häufig problematisch. Dies liegt u.a. an der Heterogenität der tumorösen Zellpopulation hinsichtlich ihrer malignen Potenz. Die Kriterien für die

## Einleitung

Therapieauswahl sollten deshalb individuelle intra- und postoperativ ermittelte, objektive Prognose- und Risikomerkmale darstellen.

Die häufig nicht unerheblichen Nebenwirkungen, aber auch das Alter und der Allgemeinzustand der Patientinnen machen es notwendig, Patientenkollektive zu definieren, die mit einer vertretbaren Wahrscheinlichkeit von einer aggressiven Therapie profitieren.

### 1.2 Prognosefaktoren

Als wichtigste Prognosefaktoren gelten derzeit Alter, International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)-Stadium, histologischer Typ, histologische Differenzierung, Nachweis von Aszites und Durchmesser des nach Operation noch verbleibenden Tumorgewebes (90, 91, 135). Man vermutet dabei einen engen Zusammenhang bzgl. rezidivfreier Zeit und / oder Überlebenszeit (124). Dabei handelt es sich jedoch z.T. um subjektive Parameter (FIGO-Stadium, histologische Differenzierung), da sie durch die Interpretation des jeweiligen Untersuchers beeinflusst sind. Es ist daher notwendig, objektivierbare, reproduzierbare Kriterien zu finden, mit denen man das aggressive Potential bzw. das zu erwartende biologische Verhalten des jeweiligen Tumors besser und individueller abschätzen kann, um somit eine Gruppe von Hochrisikopatientinnen definieren zu können.

#### 1.2.1 Bestimmung der Ploidie mittels DNA-Flowzytometrie

Zahlreiche Untersuchungen ergaben den Hinweis, dass der DNA-Gehalt eines Tumors einen bedeutenden Prognosefaktor bei vielen Malignomen des Menschen darstellt (63, 65, 92, 117, 130, 136, 140).

Änderungen des normalen diploiden Chromosomensatzes findet man häufig auch bei Ovariakarzinomen, insbesondere in fortgeschritteneren Stadien (10, 15, 77, 108). Über die Wertigkeit der Aneuploidie herrscht jedoch noch Uneinigkeit: Während einige Studien zu dem Ergebnis kamen, dass es sich hierbei um einen unabhängigen Prognosefaktor handelt (9, 36, 39, 60, 76, 79, 106, 105, 144), konnten andere Untersucher diese Aussage nicht bestätigen (21, 108, 112,113).

### 1.2.2 Immunhistochemie, HER2/neu

Um die Aggressivität eines Tumors besser abschätzen zu können, werden zunehmend immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, die die Proliferationstendenz bzw. den Grad der Entdifferenzierung (Grad der Fähigkeit einer Zelle normale Zellfunktion auszuüben) beschreiben. In dieser Arbeit wurde die Überexpression des HER2/neu-Rezeptor untersucht (synonym: Her2, c-erbB-2):

Das zelluläre Protein c-erbB-2 wurde erstmals 1986 von Akiyama et al. beschrieben (2). Es wird von dem gleichnamigen Gen kodiert und ähnelt in seiner Struktur und Funktion den EGF-(epidermale growth-factor) Rezeptoren. Es wird daher auch zu den EGF-Rezeptoren gerechnet. Funktionell handelt es sich um einen membranständigen Rezeptorkomplex, von denen bislang vier Subtypen bekannt sind (HER1, HER2, HER3 und HER 4). Die Funktion des Rezeptors liegt in einer allgemeinen Stimulation des Zellwachstums (17). Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Steigerung der Proliferation, Hemmung der Apoptose, Erleichterung der Metastasierung und Chemo-resistenz (83). Diese Eigenschaften führen klinisch zu einer ausgesprochen schlechten Prognose.

In gesundem Gewebe findet sich HER2/neu nur residual, während sich in Tumorgewebe häufig eine Überexpression nachweisen lässt. Die Amplifikation - also die Vervielfachung des Gens im Genom einer Tumorzelle - führt zu einer Zunahme der Konzentration des Rezeptors im Tumorgewebe. Diese Konzentrationszunahme korreliert mit der Proliferationsrate (123). Es handelt sich also beim Nachweis einer HER2/neu-Überexpression um einen Proliferationsmarker und damit um einen Marker, den man zur Beschreibung der Aggressivität bzw. der Wachstumstendenz eines Tumors heranziehen kann.

Bei verschiedenen Karzinomen ist bereits der Zusammenhang zwischen der Überexpression von HER2/neu und einer damit verbundenen schlechteren Prognose bekannt. So ist z. B. beim Mammakarzinom der Nachweis einer HER2/neu-Überexpression mit einer geringeren rezidivfreien Zeit bzw. Gesamtüberlebenszeit assoziiert (110, 131, 133, 83). Auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen konnten Untersuchungen eine statistisch signifikant verschlechterte Prognose bei HER2/neu-Überexpression nachweisen (96): Hauptsächlich in der Gruppe der histologisch schlecht differenzierten Tumore war der Nachweis von HER2/neu mit einer verringerten durchschnittlichen Überlebenszeit verbunden.

## 2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der DNA-Flowzytometrie die Tumorheterogenität bei Ovarialkarzinomen bestimmt werden. Es wurde außerdem an ausgewählten Fällen eine immunhistochemische HER2/neu-Bestimmung durchgeführt. Zielsetzung der Arbeit war es herauszufinden, ob Zusammenhänge bestehen zwischen Ploidie, dem HER2-Status und den bereits etablierten morphologischen und klinischen Faktoren wie z.B. dem histologischen Grading, dem FIGO-Stadium, dem histologischen Typ, dem Alter der Patientin, dem Nachweis von Aszites und der Größe des nach operativer Tumorreduktion noch verbliebenen Tumorgewebes.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Wie häufig kann beim Ovarialkarzinom eine intratumorale DNA-Heterogenität nachgewiesen werden ?
- Besteht eine Korrelation zwischen Ploidie und ausgewählten, etablierten Prognosefaktoren ?
- Besteht eine Korrelation zwischen dem HER2-Status und ausgewählten, etablierten Prognosefaktoren ?
- Besteht eine Korrelation zwischen Ploidie und dem HER2-Status ?
- Erlaubt die Analyse der Ploidie und des HER2-Status eine Schlussfolgerung auf die Prognose beim Ovarialkarzinom zu ziehen, insbesondere auf die Überlebenszeit oder rezidivfreie Zeit ?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 DNA-Flowzytometrie (FCM)

Die Durchflußzytometrie ist ein automatisiertes Verfahren, das es ermöglicht, innerhalb kurzer Zeit mehrere tausend Zellkerne auf ihren DNA-Gehalt zu untersuchen. Die Markierung der DNA erfolgt mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z. B. Propidiumjodid). Dieser lagert sich proportional zum im Zellkern vorhandenen DNA-Gehalt an. Mit einem Laserstrahl angeregt, werden die ausgesendeten Lichtimpulse auf elektronischem Wege registriert und analysiert. Die Intensität der Fluoreszenz gibt somit Auskunft über den DNA-Gehalt des jeweiligen Zellkerns.

Voraussetzungen für diese Methode sind

- a) die stöchiometrische Anlagerung des Farbstoffes an die nukleäre DNA
- b) eine hohe Selektivität des verwendeten Farbstoffes für nukleäre DNA
- c) das Vorliegen einer Einzelzellkernsuspension

#### 3.1.1 Zellbiologische Grundlagen

Der flowzytometrischen DNA-Messung liegt die Tatsache zugrunde, dass sich der DNA-Gehalt einer Zelle während eines Zellzyklus entsprechend den verschiedenen Teilungsphasen ändert.

Jeder Zellzyklusphase läßt sich ein entsprechender DNA-Gehalt zuordnen.

Zellen eines einheitlichen Zellkollektivs lassen sich also aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes den verschiedenen Phasen eines Zellzyklus zuordnen.

Der normale Zyklus einer Zelle umfasst das Intervall vom Abschluß der vorausgegangenen bis zum Ende der stattfindenden Zellteilung.

Man unterscheidet 5 verschiedene Zellzyklusphasen:



## Material und Methoden

### **1. G<sub>0</sub>-Phase (Ruhephase):            diploider Chromosomensatz = 2n**

Zellen, die ihre Teilungsaktivität einstellen und in einen Dauerzustand übergehen, oder solche Zellen, die für einen längeren Zeitraum in einem Ruhezustand verharren ohne ihre Regenerationsfähigkeit aufgeben zu haben, verbleiben in der G<sub>0</sub>-Phase.

### **2. G<sub>1</sub>-Phase (Präsynthesephase):    diploider Chromosomensatz = 2n**

Diese Phase bezeichnet die Wachstumsphase der Zelle. Die Synthese der Proteine, die für die Replikation notwendig sind, wird wieder aufgenommen, die RNA-Synthese steigt an. Der DNA-Gehalt bleibt weiterhin konstant.

### **3. S-Phase (Synthesephase):        2n < Chromosomensatz < 4n**

In dieser Phase findet die Replikation der DNA statt. Nach Abschluss dieses Prozesses liegt das gesamte genetische Material der Zelle verdoppelt vor. Der DNA-Gehalt der Zelle nimmt in dieser Phase stetig zu. Am Ende der S-Phase enthält die Zelle einen tetraploiden Chromosomensatz.

### **4. G<sub>2</sub>-Phase (Postsynthesephase):**

In dieser Phase kommt es zur Auflösung der Kernmembran, die Zelle vergrößert ihr Volumen und rundet sich ab, sie steht unmittelbar vor der Kernteilung - der Mitose.

### **5. Mitose-Phase:**

Bei der Mitose wird das in den vorangegangenen Phasen replizierte Genmaterial auf zwei Tochterzellen verteilt, wobei beide Zellen den gleichen diploiden Chromosomensatz enthalten.

Zusammenfassend können auf Grund des DNA-Gehaltes einer Zelle vier Untergruppen definiert werden:

- I)      diploider Chromosomensatz (**x = 2n**): **G<sub>0</sub> - oder G<sub>1</sub> - Phase**
- II)     Chromosomensatz liegt zwischen diploidem und tetraploidem Chromosomensatz (**2n < x < 4n**): **S - Phase**
- III)    tetraploider Chromosomensatz (**x = 4n**): **G<sub>2</sub> - oder Mitosephase**
- IV)    aneuploider Chromosomensatz (**x ≠ 2n oder 4n**)

(n = einfacher bzw. haploider Chromosomensatz)

## Material und Methoden

Bei der physiologischen Zellvermehrung wird in der S-Phase die genetische Information verdoppelt. In der sich anschließenden Mitosephase wird durch Kernteilung das replizierte DNA-Material auf beide Tochterzellen exakt verteilt. Beide Tochterzellen enthalten die gleiche genetische Information.

In besonders spezialisierten Zellen - aber auch unter pathologischen Bedingungen, z.B. im Rahmen der Zellentartung - kann es zu einer Vermehrung des normalen Chromosomensatzes kommen. Man bezeichnet diesen Vorgang als Endomitose. Die Folge ist eine Vervielfachung des ursprünglichen Chromosomensatzes, eine Polyploidie. Üblicherweise werden durch Polyploidisierung alle Chromosomen einer Zelle verdoppelt, bzw. vervierfacht usw. Bei einer partiellen Endomitose können jedoch auch nur einzelne Chromosomen betroffen sein. Man findet dann in diesen Fällen der pathologischen Zellvermehrung einen aneuploiden Chromosomensatz. Solche Fehlverteilungen von Chromosomen findet man auch bei vielen soliden Tumoren, wobei nicht selten mehrfache Anomalien mit Vervielfachung oder das Fehlen bestimmter Chromosomen, sowie strukturelle Chromosomenmutationen auftreten können (20, 58).

### **3.1.2 Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers**

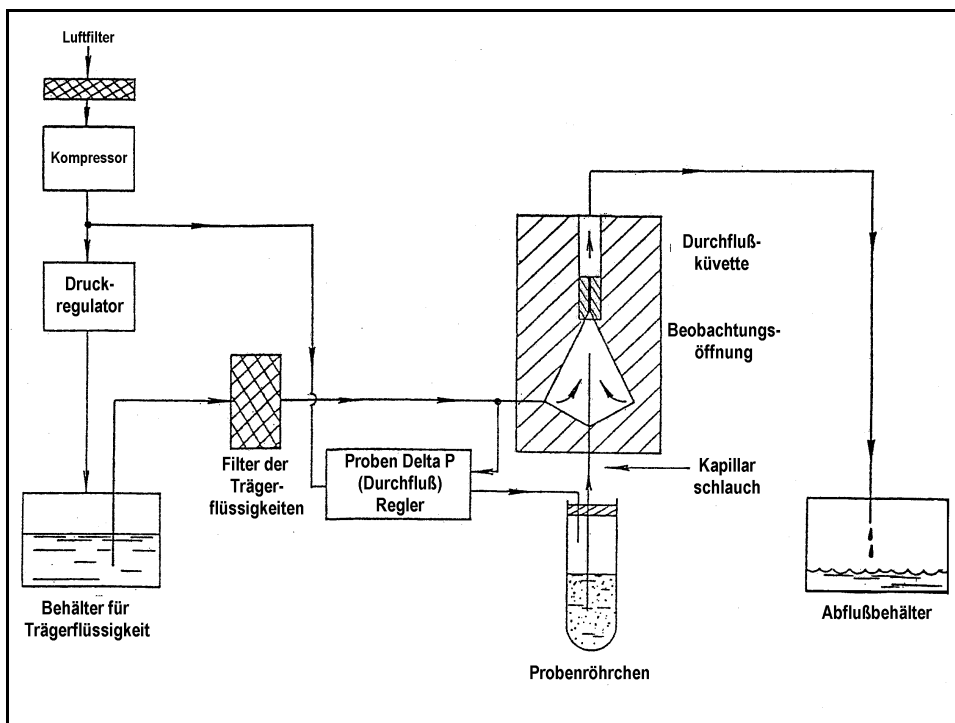
Der FACScan (Fluorescence Activated Cell Analyzer) identifiziert und charakterisiert Zellen, während diese - eine nach der anderen - durch einen fokussierten Laserstrahl fließen. Die mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbten Zellkerne reflektieren - entsprechend ihres DNA-Gehaltes - eine bestimmte Energie in eine bestimmte Richtung. Die von diesen Zellmessungen erzeugten optischen und elektrischen Signale werden für die Bearbeitung durch den Rechner digitalisiert.

Die DNA-Messungen wurden an einem FACScan der Firma Becton Dickinson (San Jose, CA) ausgeführt.

## 3.1.2.1 Das strömungsmechanische System des FACScan

In diesem System fließen die Zellen in einem laminaren Strom einzeln durch den optischen Sensorbereich.

Die Abbildung 1 zeigt des strömungsmechanische System des FACScan. Der Kompressor erzeugt im Behälter der Trägerflüssigkeit und im Probenröhrchen einen Überdruck und treibt dadurch sowohl Trägerflüssigkeit als auch die angefärbte Zellkernsuspension in die Messküvette. Nach dem Prinzip der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung umgibt die Trägerflüssigkeit als Hüllstrom die Zellkerne und fokussiert diese, sodass die Kerne einzeln und zentriert die Messküvette mit dem darin enthaltenen Laser passieren.



**Abbildung 1** Das strömungsmechanische System des FACScan

(aus: FACScan™ Handbuch, Becton Dickinson )

## 3.1.2.2 Das optische System des FACScan

Das optische System basiert auf einem luftgekühlten 15 mW Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm.

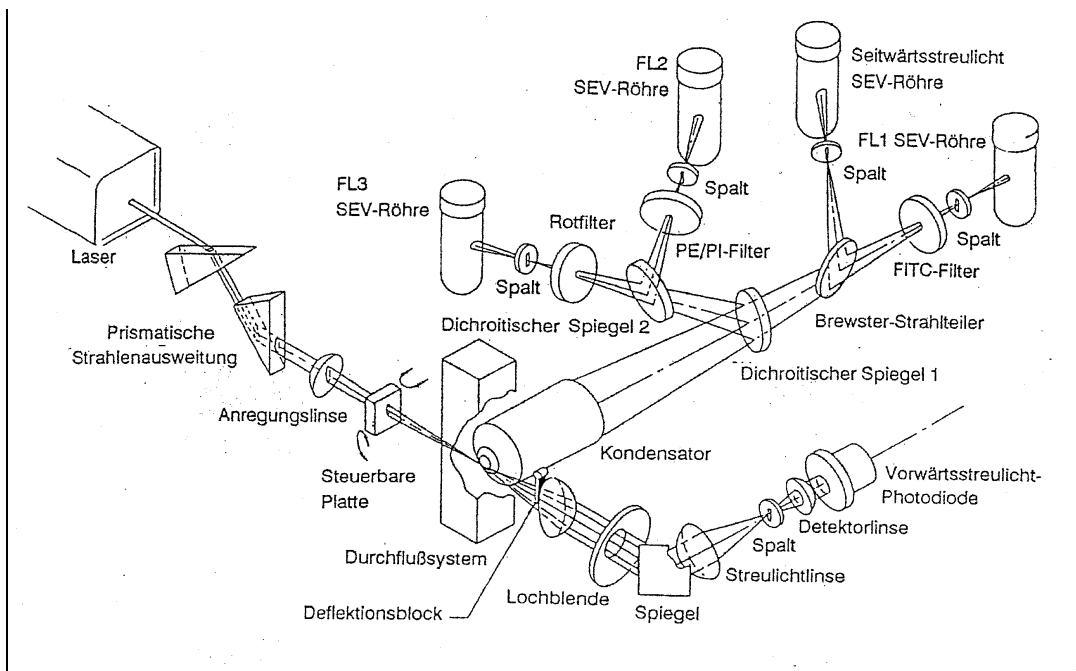
Abbildung 2 zeigt das Prinzip des optischen Systems des FACScan.

## Material und Methoden

Der kreisförmige Ausgangsstrahl wird prismatisch ausgeweitet und mit Hilfe einer Anregungslinse in eine elliptische Form gebracht. Mittels einer Steuerplatte wird der Laserstrahl auf den Zellkernstrom fokussiert. Mit den o.g. Steuerelementen lassen sich Helligkeit, Empfindlichkeit und Messgeschwindigkeit regulieren.

Die mit Propidiumjodid gefärbten Zellkerne passieren eine Ebene senkrecht zum Laserstrahl. Das an die DNA gebundene Propidiumjodid absorbiert die einstrahlende Lichtenergie und wird in einen angeregten Zustand versetzt. Die absorbierte Energie wird in Form von Photonen einer bestimmten Wellenlänge wieder emittiert. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt für Propidiumjodid bei 610 nm (Bandbreite 550 nm bis 650 nm).

Durch verschiedene Spiegel- und Filtersysteme gelangt das vom Zellkern ausgesandte Signal zu den Detektoren und kann somit hinsichtlich seiner Intensität, Wellenlänge und Richtung analysiert werden. „Unerwünschte“ Signale können somit z.T. herausgefiltert werden.



**Abbildung 2** Das optische System des FACScan

(aus: FACScan™ Handbuch, Becton Dickinson )

### 3.1.2.3 Das elektronische System des FACScan

Durch einen sogenannten Photomultiplier werden die im Detektor ankommenden optischen Signale in analoge elektrische Impulse transformiert und können somit als

## Material und Methoden

digitale Daten zu einem Histogramm verarbeitet werden. Man erhält eine Graphik mit einer „Punkte-Wolke“ - einem sogenannten „Dot-Plot“ - in dem jedem gemessenen Zellkern ein definierter DNA-Gehalt zugeordnet werden kann. Ein Punkt entspricht dabei einem analysierten Partikel. In der Regel handelt es sich dabei um einzelne Zellkerne, es befinden sich darunter jedoch auch Zellkerntrümmer und Zellkernverklumpungen, die aus mehreren Zellkernen bestehen. Diese führen zu unerwünschten Signalen, da sie zu Unschärfen der Histogramme führen können (vgl. Abbildung 3 - Abbildung 6).

### **3.2 Auswahl des Probenmaterials**

Es wurde Gewebe von insgesamt 81 Fällen epithelialer Ovarialkarzinome mittels Flowzytometrie (FCM) untersucht. Alle Patientinnen wurden im Zeitraum zwischen 1986 und 1992 in der Frauenklinik der Universität Tübingen operiert. Das Karzinomgewebe wurde ursprünglich mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Postoperativ wurde gemäß WHO- Klassifikation der Tumortyp sowie der Grad der Differenzierung (Grade I: gut differenziert bis Grade III: undifferenziert) festgelegt. Es wurde Gewebe des Primärtumors, des kontralateralen Ovars, des großen Netzes sowie weiterer metastatischer Absiedelungen - soweit vorhanden - analysiert. Die klinischen Daten wurden aus dem Tumorarchiv der Frauenklinik der Universität Tübingen erhoben.

### **3.3 Präparation des Gewebes für die FCM-Analyse**

Zur Präparation der Kernsuspension wurde modifiziert die Technik nach Hedley angewendet (49, 50, 51). Um vorwiegend karzinomatös entartetes Gewebe zu analysieren, wurden lichtmikroskopisch Bereiche mit nekrotischem bzw. gesundem Gewebe von entartetem differenziert und am Paraffinblock entsprechend ausgeschnitten. Pro Block wurden drei bis fünf 30 µm dünne Schnitte zugeschnitten. Nach mehrmaligem Deparaffinisieren in Xylol und Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe vorsichtig zerkleinert und anschließend

## Material und Methoden

in einer 1%-igen Pepsinlösung (Pepsin SIGMA: P-6887; pH 1,5; 37°C; 0,9% NaCl) inkubiert. Der Andauprozeß wurde nach zwei Stunden mit 8°C-kalter 0.9%-iger NaCl-Lösung abgestoppt. Nach Filtration durch ein 30 µm Nylonnetz und Zentrifugation wurde die Kernsuspension in 0,1%-iger RNase-Lösung (SIGMA: R-4875) bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kerne mit Propidiumjodid (0,05 mg/ml in 0,2% Triton X 100) angefärbt und sofort am FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) analysiert. Bei einer Flußrate von 100-300 Kernen / s wurden 10000-30000 Kerne / Probe ausgemessen. Zur Konstruktion und Auswertung der Histogramme wurde die CellFit-Software (Becton Dickinson, San Jose, USA) verwendet.

### 3.4 Datenerhebung und –auswertung

Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mittels Dot-Plot bzw. den zugehörigen Histogrammen.

#### 3.4.1 Dot-Plot

Beim Dot-Plot werden jeder einzelnen Messung eines Partikels zwei verschiedene Parameter zugeordnet

- die Fluoreszenzintensität (FL2-Area), die dem relativen DNA-Gehalt entspricht
- das „vorwärts-gestreute“ Licht (FSC, Foward Scattered Light bzw. FL2-Width), das der Größe des gemessenen Partikels entspricht.

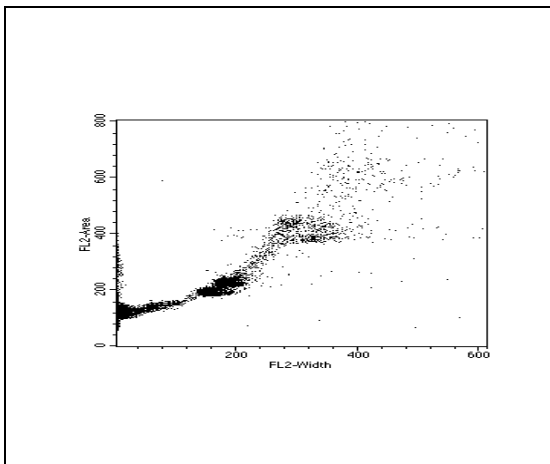
Man erhält ein „Dot-Plot“, wobei jeder einzelne Punkt einem gemessenen Partikel entspricht.

Indem man durch eine Begrenzung des „Dot-Plots“, das für die Berechnung des Histogramms herangezogen werden soll – also durch Festlegung eines sogenannten „gates“ - Punkte bzw. Messungen ausschließt, lassen sich Zellkernverklumpungen und Zelltrümmer herausfiltern, die ansonsten zu einer Unschärfe des Histogramms führen würden (s. auch 3.1.2.3).

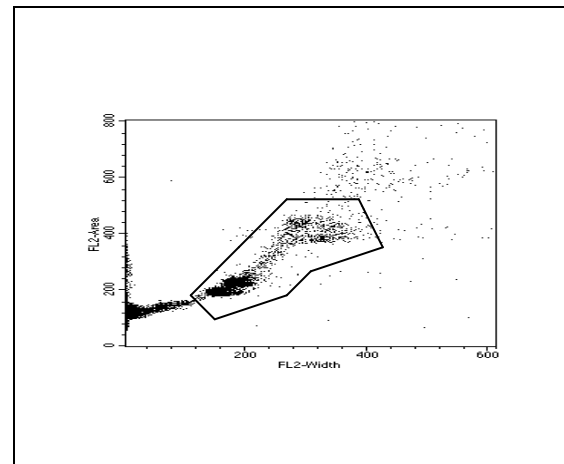
### 3.4.2 Histogramm

Die Daten werden, entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität in verschiedene Kanäle (hier insg. 1024) aufgeteilt. Dabei stellt die x-Achse die Fluoreszenzintensität (FL2-Area) dar, die dem relativen DNA-Gehalt entspricht. Auf der y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Zellkerne je Fluoreszenzintensität (counts) aufgetragen.

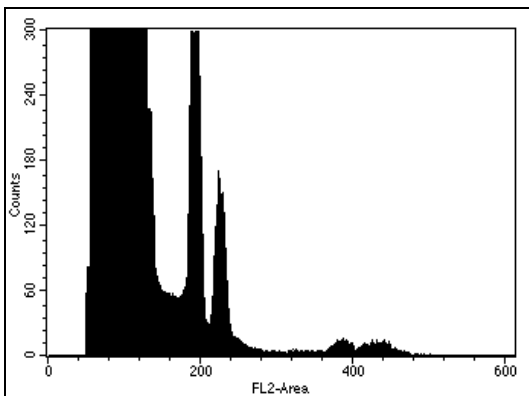
Die folgenden Abbildungen zeigen ein Dot-Plot mit und ohne gate und die entsprechenden Histogramme.



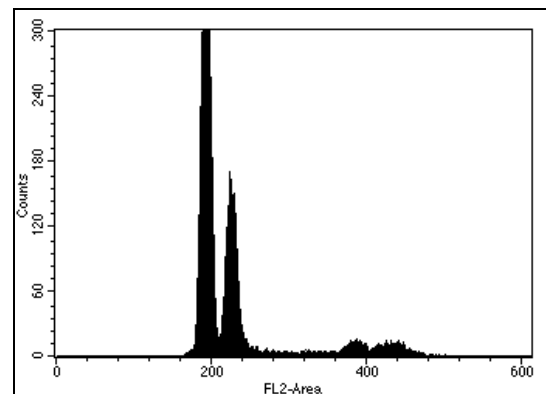
**Abbildung 3** Dot-plot 1 (ohne gate)



**Abbildung 5** Dot-plot 2 (mit gate)



**Abbildung 4** Histogramm zu Dot-Plot 1



**Abbildung 6** Histogramm zu Dot-plot 2

### 3.5 Bestimmung der Ploidie mit Hilfe des DNA-Index (DI)

Der DNA-Index (DI) definiert das Ausmaß der Abweichung des zellulären DNA-Gehaltes im Vergleich zu einer normalen, diploiden Zellpopulation.

Es gilt:  $DI = \text{DNA-Gehalt der untersuchten Probe} / \text{diploider DNA-Gehalt}$ .

Ein diploider Tumor hat einen  $DI = 1$ , ein aneuploider Tumor hat einen  $DI \neq 1$ .

In den DNA Histogrammen werden die unterschiedlichen Muster und Ausprägungen des DNA-Gehaltes bzw. der Aneuploidie aufgezeigt:

#### 3.5.1 Das diploide Histogramm

Der „Haupt“-Peak setzt sich aus Zellen zusammen, die sich in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus befinden. Der deutlich geringer ausgeprägte Peak stellt die Zellen dar, die sich in der Mitosephase befinden und somit einen vierfachen Chromosomensatz besitzen. Dieser Peak befindet sich in exakt doppeltem Abstand zum diploiden „Haupt“-Peak.

Die Abbildung 8 zeigt das Histogramm eines diploiden Tumors.

#### 3.5.2 Das aneuploide Histogramm

Ein Tumor wird dann als aneuploid bezeichnet, wenn sich außer der normalen diploiden Stammlinie eine weitere Stammlinie mit einem DNA-Gehalt  $\neq 2n$  ( $n =$  einfacher Chromosomensatz) differenzieren lässt. Die diploide Stammlinie wird aus nicht entarteten gesunden Bindegewebszellen, Leukozyten und diploiden Tumorzellen gebildet. Aus dem Verhältnis beider Peaks zueinander ergibt sich der DNA-Index (DI). Abbildung 10 zeigt das Histogramm eines aneuploiden Tumors.

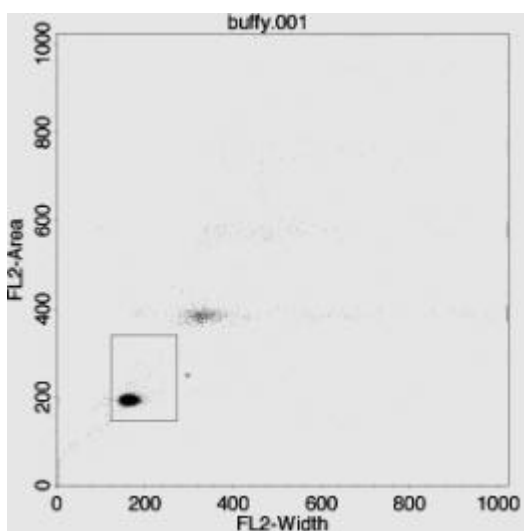
Üblicherweise wird der Peak, der dem geringeren DNA-Gehalt entspricht, als diploider Referenz-Peak bezeichnet. Das hat zur Folge, dass hypoploide Tumoren - also Tumore mit vermindertem DNA-Gehalt - nicht von hyperploiden Tumoren unterschieden werden können. Man unterscheidet also nur die Tatsache, ob der Tumor



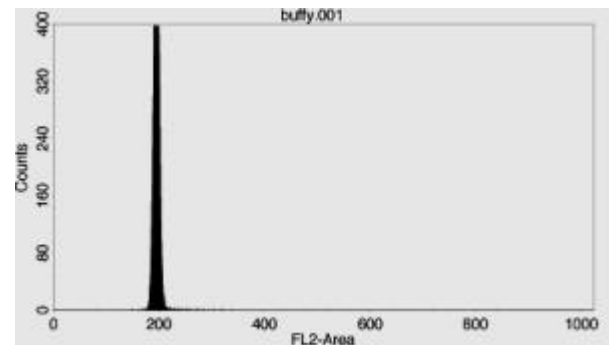
## Material und Methoden

Zellen mit nicht diploidem DNA-Gehalt enthält oder nicht. Ob eine Unterteilung in hypo- und hyperploid eine klinische Bedeutung besitzt, ist nicht bekannt (50).

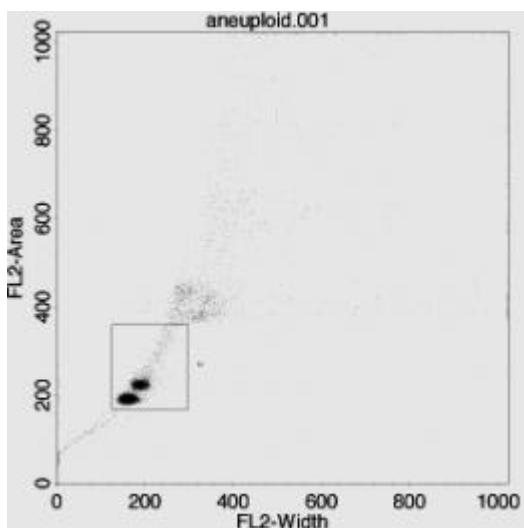
(Dieser Fehler ließe sich verhindern, wenn man externe Standards finden würde, die es ermöglichen, eindeutig den diploiden Peak identifizieren zu können. Dies ist bislang nur bei „frischem“ Gewebe, das nicht formalinfixiert wurde, möglich. Im Gegensatz zu in Paraffin eingebettetem und mit Formalin behandeltem Gewebe wird hier der relative DNA-Gehalt durch die verschiedenen Präparationsmethoden, die für die Konservierung notwendig sind, nicht beeinflusst.) *s. auch Diskussion*



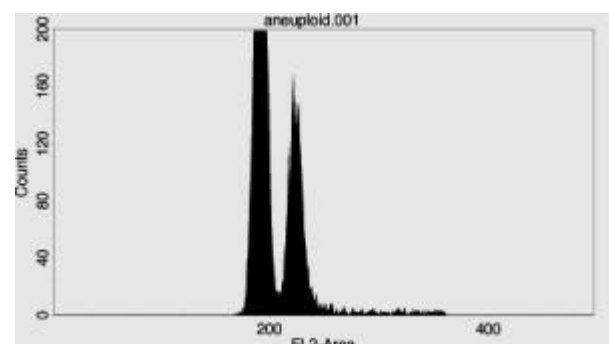
**Abbildung 7** Dot-plot eines diploiden Tumors



**Abbildung 8** Histogramm eines diploiden Tumors



**Abbildung 9** Dot-plot eines aneuploiden Tumors



**Abbildung 10** Histogramm eines aneuploiden Tumors

### 3.6 Qualität der Messergebnisse

Idealerweise sollte sich eine Zellpopulation mit genau definiertem DNA-Gehalt als „unendlich“ schmaler Peak in einem Histogramm darstellen. Bei den Messungen zeigen sich jedoch stattdessen Peaks mit unterschiedlich breiter Basis.

Als Maß für die Gütequalität der jeweiligen Messergebnisse wird der Variationskoeffizient - der CV-Wert (coefficient of variation) - bestimmt (144).

Er wird durch die Weite des diploiden G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> - Peaks festgelegt. Seine Berechnung erfolgt unter der Annahme einer Gauß'schen Normalverteilung für den G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> - Peak.

Es gilt folgende Gleichung:

$$\mathbf{CV = Standardabweichung / Mittelwert \times 100}$$

Die Qualität der Messergebnisse ist umso besser, je kleiner der Wert des Variationskoeffizienten ist. In der Literatur findet man Untersuchungen, bei denen Messungen mit einem CV > 10,0 berücksichtigt wurden, z. T. werden jedoch auch keine Angaben gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur Histogramme mit einem CV < 7,0 berücksichtigt. (Variationsbreite von 0,30 bis 6,89).

### 3.7 Immunhistochemische Untersuchungen der HER2/neu Rezeptor-Expression

Diese Untersuchungen wurden ebenfalls an paraffineingebettetem Gewebe von Ovarialkarzinomen durchgeführt. Es wurde dabei ein polyklonaler „rabbit-anti-human“-Antikörper verwendet. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines automatisierten Färbeverfahrens (Firma DAKO, Glostrup, Dänemark) durchgeführt.

## Material und Methoden

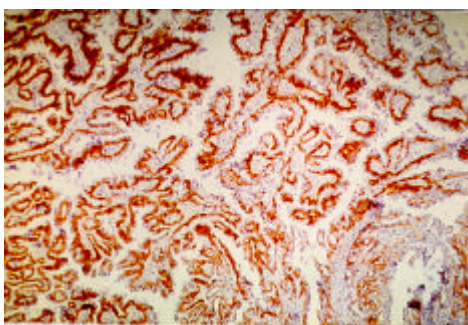
Die immunhistochemische Färbung beruht auf einer indirekten Streptavidin-Biotin-Methode und wurde mit einem Färbeautomaten durchgeführt (Boitek TechMate, Biotek Solutions, Newport Beach, California).

Hier die Kurzzusammenfassung des Färbeprotokolls:

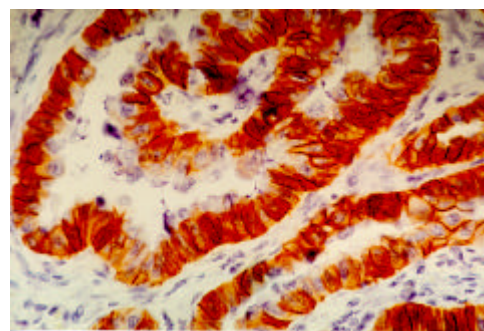
Nach Applikation des Primärantikörpers über 30 min erfolgte die Zugabe des Kaninchen-Antikörpers (DAKO ChemMate™ Detection Kit) für weitere 30 min. In einem nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte für 3x2,5 min in eine Peroxidase-Blocking Lösung (Peroxidase Blocking Solution, HP Block, DAKO ChemMate™ ) gebracht. Anschließend folgte eine 25-min Einwirkphase einer Streptavidin-Peroxidaselösung (Streptavidin Peroxidase, HRP, DAKO ChemMate™-Detection Kit).

Die Objektträger gelangten daraufhin für 3x5 min in eine Lösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid und 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrate Solution, DAKO ChemMate™ Detection Kit). Es folgte die Färbung mittels Hematoxylin (HEMA, Hematoxylin, DAKO, ChemMate™ ). Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte in verschiedene Waschpuffer gebracht (Washing Buffer 1-3, BUF 1-3, DAKO, ChemMate™ Puffer-Kit).

Zwei voneinander unabhängige Untersucher beurteilten die Färbeintensität der immunhistochemischen Schnitte. Eine vermehrte Expression des HER2/neu-Rezeptors wurde definiert als eine mäßige (2+) bzw. starke (3+) Anfärbung von > 10% der im Gewebeschnitt vorhandenen Tumorzellen. Dabei wurden unspezifische zytoplasmatische Anfärbungen nicht berücksichtigt. Die Abbildung 11 zeigt ein HER2/neu positives Tumorgewebe.



a



b

**Abbildung 11** HER2/neu positives Tumorgewebe  
(Vergrößerung a 1:10, b Vergrößerung 1:500)

### 3.8 Statistische Auswertung

Die Überlebenszeit bzw. die rezidivfreie Zeit wurde vom Monat der Operation bis zum Monat des Todes bzw. des erneuten Auftretens der Erkrankung berechnet. Bei allen Patientinnen, die aus irgendwelchen Gründen einer weiteren Beobachtung entgingen, wurde der Monat der letzten Information als Beobachtungszeitraum für die Berechnungen zugrunde gelegt. Diese Daten gingen dann als sog. zensierte Zeitwerte in die Berechnungen ein. Die Überlebensraten wurden nach Kaplan-Meier geschätzt (74).

Der univariate Einfluss eines Parameters wurde mit Hilfe des Logrank-Tests berechnet (69).

Zur Untersuchung des gemeinsamen Einflusses mehrerer Faktoren auf die Überlebenszeit / rezidivfreie Zeit wurde das Cox-Regressions-Modell verwendet (23). Es wurden dabei nur die Patientinnen berücksichtigt, bei denen vollständige Daten aller untersuchten Parameter vorlagen.

Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gewählt. Bei der Berechnung des multiplen Signifikanzniveaus wurden die p-Werte nach Bonferonie-Holm korrigiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überblick

#### 4.1.1 Das Patientenkollektiv (Alter, Histologie, Grading, Tumorrest)

Es wurden insgesamt 81 Patientinnen untersucht, die im Zeitraum von August 1986 bis Oktober 1992 an der Universitätsfrauenklinik Tübingen wegen eines Ovarialkarzinoms behandelt wurden. Bei allen Patientinnen wurde primär eine operative Tumorreduktion durchgeführt. In 45 Fällen wurde zusätzlich eine pelvine und / oder paraaortale Lymphknotenresektion angeschlossen. Dabei zeigte sich in 58 % der Fälle (26/45) ein positiver Lymphknotenbefall.

Bei 67 Patientinnen wurde im Anschluß an die operative Therapie eine Chemotherapie durchgeführt. 87 % (58/67) der Chemotherapien waren platinhaltige Therapie-schemata.

13 Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Stadium I, 3 Patientinnen im Stadium II, bei 56 Patientinnen wurde ein Stadium III diagnostiziert, während sich 9 Patientinnen bereits im Stadium IV befanden. Dies entspricht der in der Literatur üblicherweise angegebenen Stadienverteilung.

Die histologische Differenzierung ergab 45 seröse, 17 endometrioid, 8 muzinöse, 7 mesonephroide, 2 gemischte und ein Gallert - Karzinom. Bei einem Fall wurde keine Angabe zur histologischen Klassifizierung gemacht.

Angaben zum Differenzierungsgrad lagen bei 79 Patientinnen vor, bei zwei Patientinnen wurde keine Angabe zum Grading gemacht. Die Verteilung ist der Abbildung zu entnehmen. Sie entspricht der üblichen Gradingverteilung.



**Abbildung 12** Grading des Gesamtkollektivs

Die Patientinnen waren durchschnittlich  $61,0 \pm 11,9$  Jahre alt (Median 61 Jahre, Spannweite 34 - 84 Jahre).

Intraoperativ zeigte sich bei mindestens 54 % (44/81) der Patientinnen Aszitesbildung. In 22 Fällen wurde kein Aszites gefunden, in 15 Fällen wurde darüber keine Angabe gemacht.

70 % (57/81) der Patientinnen konnten radikal operiert werden - d.h. die größte zurückbelassene Tumormenge war  $< 1$  cm. Bei 23 Patientinnen war die zurückbelassene Tumormenge  $> 1$  cm.

#### 4.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Patientinnen, die eine präoperative Chemo- oder Strahlentherapie erhalten hatten oder an einer anderen Klinik bereits voroperiert worden waren, wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen. Es wurden retrospektiv nur Patientinnen in die Arbeit eingeschlossen, bei denen ausreichend archivierte Gewebe zur Verfügung stand. Die Ausschlusskriterien bezüglich der Messgenauigkeit der DNA-FACS-Analyse sind bereits unter 3.6 aufgeführt.

### 4.2 Intratumorale DNA-Heterogenität

In der vorliegenden Arbeit wurden bis zu vier Gewebeproben eines Tumors analysiert - sofern Gewebelöcke zur Verfügung standen. Ein Tumor wurde dann als aneuploid bezeichnet, wenn mindestens eine Gewebeprobe ein aneuploides Histogramm zeigte.

Von den 81 untersuchten Fällen konnten 31 als diploid und 50 als aneuploid klassifiziert werden. Bei 60 Patientinnen stand mehr als eine Tumorlokalisierung zur Bestimmung der Ploidie zur Verfügung. In 11 Fällen konnten 2 Blöcke, in 42 Fällen 3 Blöcke und in 7 Fällen 4 Blöcke pro Patientin analysiert werden. Bei 51,7 % (31/60) der Fälle zeigte sich eine intratumorale DNA-Heterogenität. 35,0 % (21/60) der Fälle, bei denen mehr als eine Probe untersucht werden konnte, zeigten sich als rein diploid, 13,3 % (8/60) zeigten in sämtlichen Proben eine Aneuploidie. Betrachtet man die Gruppe der aneuploiden Tumoren zeigte sich bei 62,0 % (31/50) der aneuploiden Tumoren eine intratumorale Ploidieheterogenität, d.h. es konnten sowohl diploide als auch aneuploide Gewebeproben gefunden werden. Bei 16,0 % (8/50) konnte in sämtlichen Gewebeproben eine Aneuploidie nachgewiesen werden, bei 22,0% (11/50) der aneuploiden Tumoren stand nur eine Tumorlokalisierung zur Auswertung zur Verfügung.

### 4.3 Korrelation der Durchflußzytometrie mit den klinischen Parametern

Wie bereits erwähnt waren 38,3 % (31/81) der Tumoren diploid, 61,7 % (50/81) waren aneuploid.

Die mediane Überlebenszeit betrug bei diploiden Tumoren 36,1 Monate, bei aneuploiden Tumoren 41,6 Monate. Der Median für die rezidivfreie Zeit lag für die diploiden Tumoren bei 24,7 Monaten, für aneuploide Tumoren bei 30,1 Monaten.

Die folgende Tabelle 1 zeigt einen Gesamtüberblick über das untersuchte Patientenkollektiv.

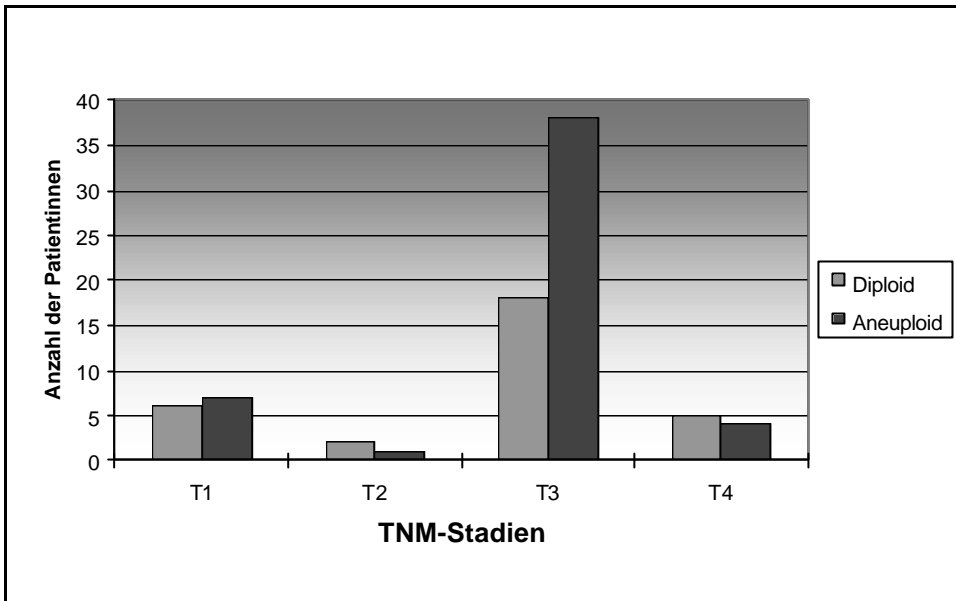
## Ergebnisse

**Tabelle 1** Gesamtüberblick über untersuchtes Patientenkollektiv (Ploidie)

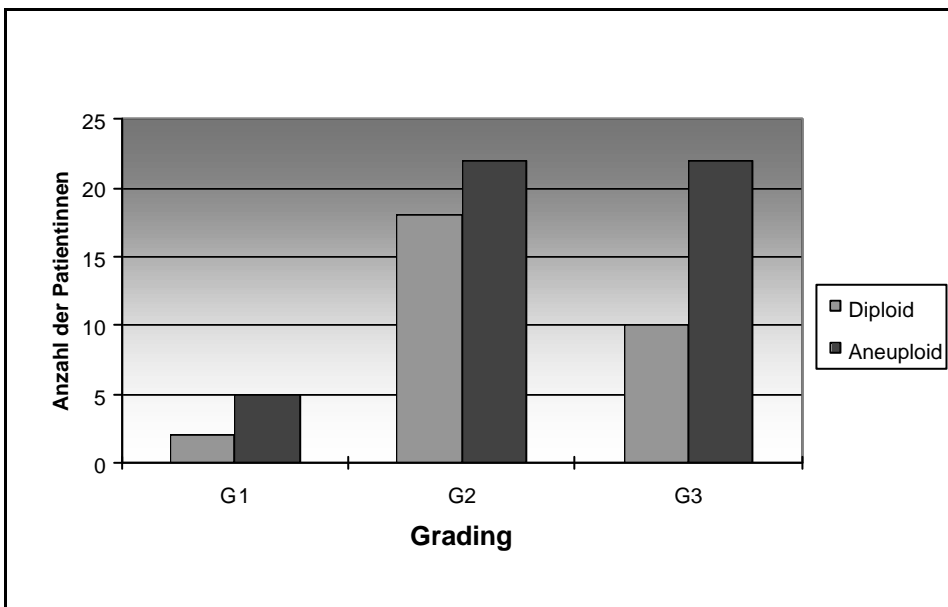
				Ploidie	
		Gesamtzahl	Diploid	Aneuploid	
<b>Stadium</b>	I	13	46,2 % (6)	53,8 % (7)	
	II	3	66,7 % (2)	33,3 % (1)	
	III	56	32,1 % (18)	67,9 % (38)	
	IV	9	55,6 % (5)	44,4 % (4)	
<b>Histologie</b>	serös	45	31,1 % (14)	68,9 % (31)	
	muzinös	8	50,0 % (4)	50,0 % (4)	
	endometrioid	17	47,1 % (8)	52,9 % (9)	
	mesonephroid	7	42,9 % (3)	57,1 % (4)	
	gemischt	2	50,0 % (1)	50,0 % (1)	
	Gallert - Ca	1	100 % (1)	- (0)	
	keine Angaben	1	- (0)	100 % (1)	
<b>Grading</b>	1	7	28,6 % (2)	71,1 % (5)	
	2	40	45,0 % (18)	55,0 % (22)	
	3	32	31,2 % (10)	68,8 % (22)	
	keine Angaben	2	50,0 % (1)	50,0 % (1)	
<b>Alter</b>	< 50 Jahre	16	50,0 % (8)	50,0 % (8)	
	50 - 70 Jahre	44	40,9 % (18)	59,1 % (26)	
	> 70 Jahre	21	23,8 % (5)	76,2 % (16)	
<b>Lymphknoten- dissektion</b>	ja Lk positiv	26	26,9 % (7)	73,1 % (19)	
	Lk negativ	19	52,6 % (10)	47,4 % (9)	
	nein	36	38,9 % (14)	61,1 % (22)	
<b>größter zurück- belassener Tumor</b>	< 1 cm	57	36,8 % (21)	63,2 % (36)	
	≥ 1 cm	23	43,5 % (10)	56,5 % (13)	
	keine Angaben	1	- (0)	100 % (1)	
<b>Aszites</b>	ja	44	22,7 % (15)	65,9 % (29)	
	nein	22	45,4 % (10)	54,5 % (12)	
	keine Angaben	15	40,0 % (6)	60,0 % (9)	
<b>Chemotherapie</b>	ja Platin	58	39,7 % (23)	60,3 % (35)	
	Ø Platin	9	33,3 % (3)	66,6 % (6)	
	nein	12	41,7 % (5)	58,3 % (7)	
	keine Angaben	2	- (0)	100 % (2)	



## Ergebnisse

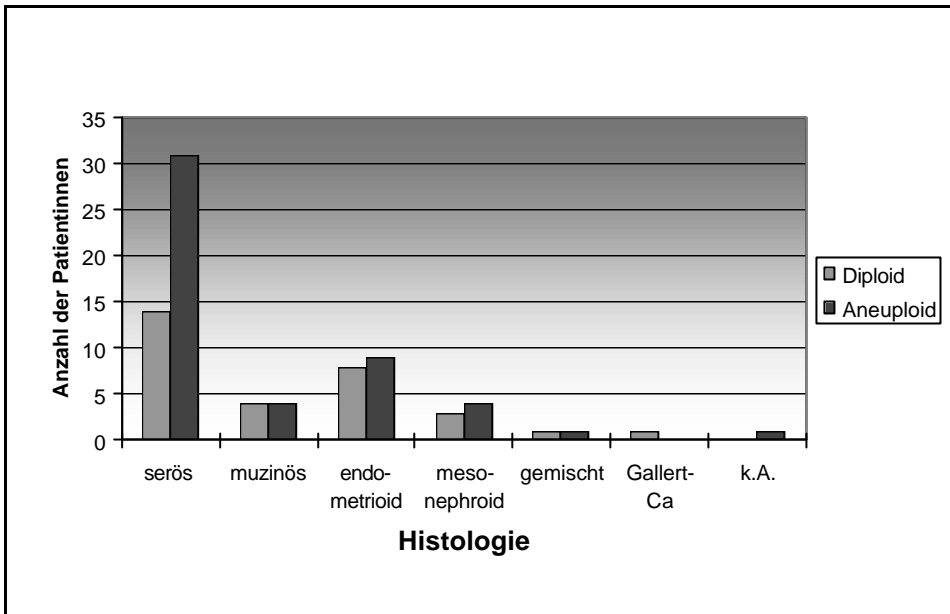


**Abbildung 13** Ploidie und Stadienverteilung

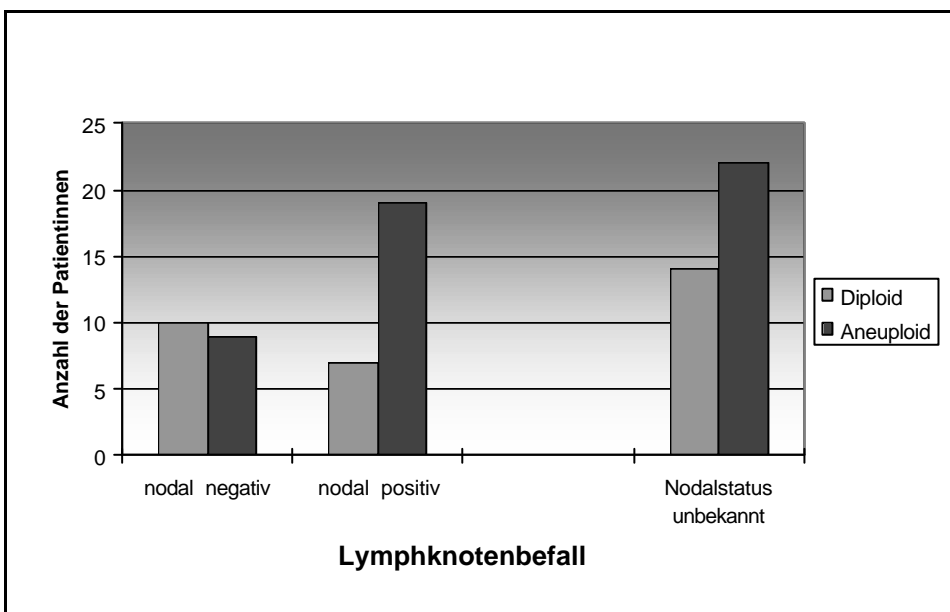


**Abbildung 14** Ploidie und Grading

## Ergebnisse

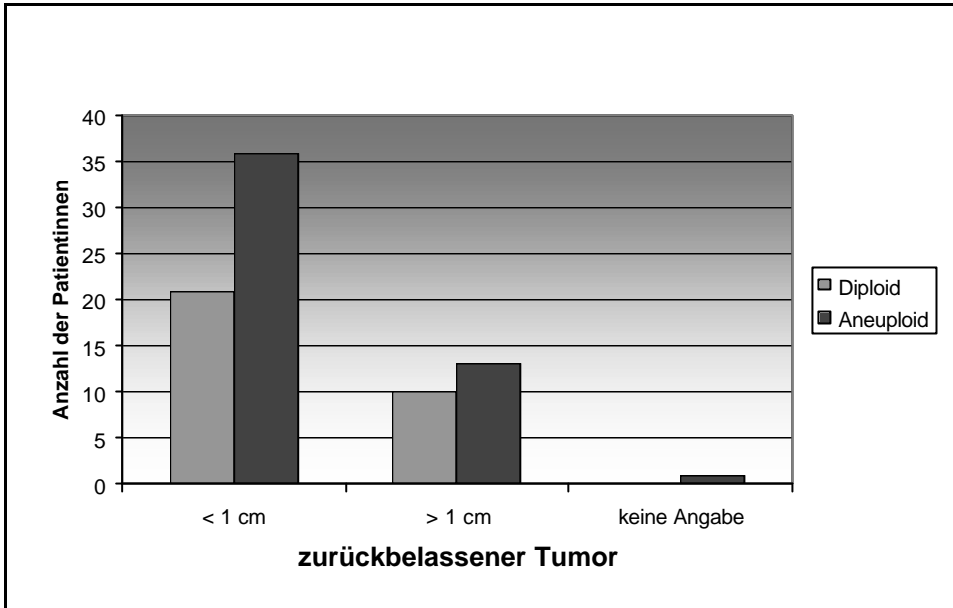


**Abbildung 15** Ploidie und Histologie

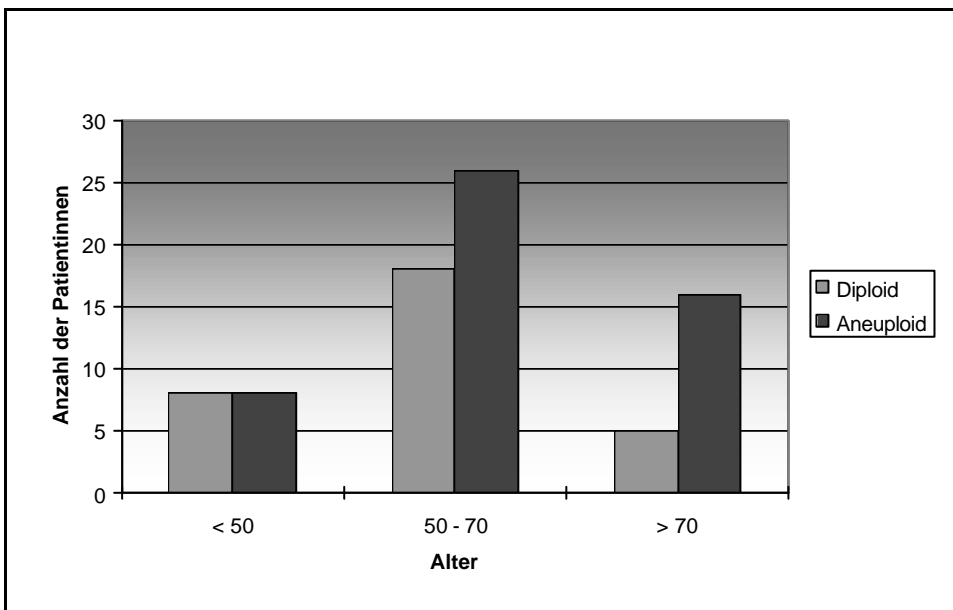


**Abbildung 16** Ploidie und Lymphknotenbefall

## Ergebnisse

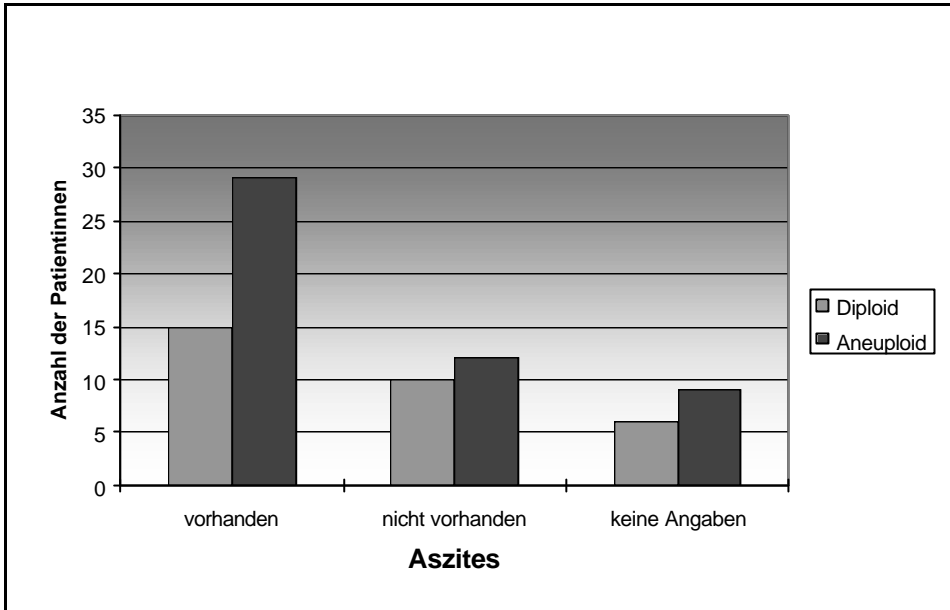


**Abbildung 17** Ploidie und zurückbelassener Tumorrest

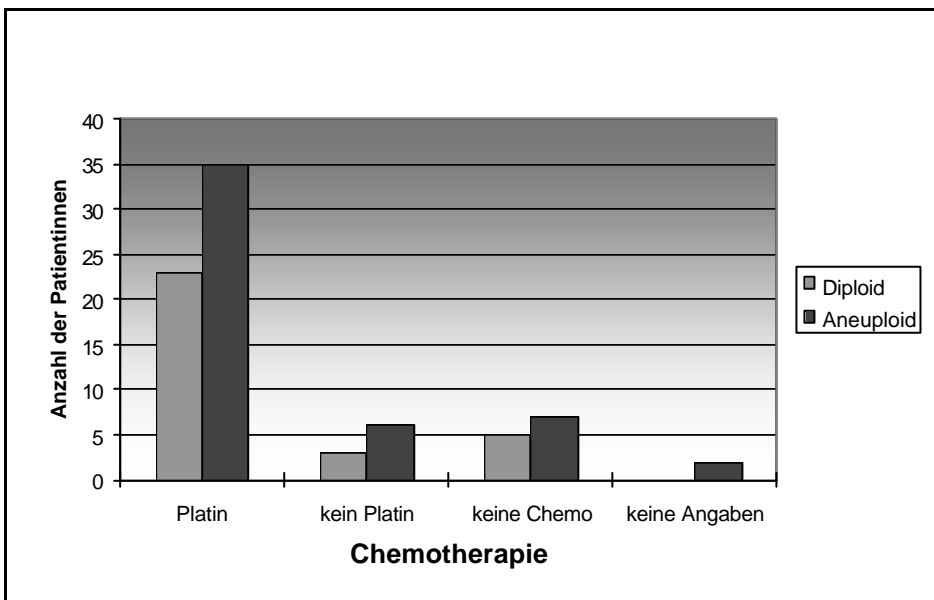


**Abbildung 18** Ploidie und Alter

## Ergebnisse



**Abbildung 19** Ploidie und Aszites



**Abbildung 20** Ploidie und Art der Chemotherapie

#### **4.4 Korrelation der Immunhistochemie mit den klinischen Parametern**

Insgesamt wurden 42 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (Stadium pT3 und pT4) untersucht. Bei allen Patientinnen wurde primär die maximal mögliche operative radikale Tumorreduktion angestrebt, 90,5 % (38/42) erhielten eine Chemotherapie, der überwiegende Anteil war platinhaltig (86,8 %).

In 52,4 % der Fälle konnte eine vermehrte HER2/neu-Expression nachgewiesen werden (22/42). In dieser Gruppe war das mediane rezidivfreie Intervall verkürzt (24,4 Monate) im Vergleich zur Gruppe der Patientinnen, bei denen keine HER2/neu-Expression nachgewiesen werden konnte (30,1 Monate). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der medianen Gesamtüberlebenszeit beider Gruppen (36,1 bzw. 38,4 Monate). Es lässt sich außerdem kein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von HER2/neu und dem Tumorgrading oder dem Tumorstadium nachweisen.

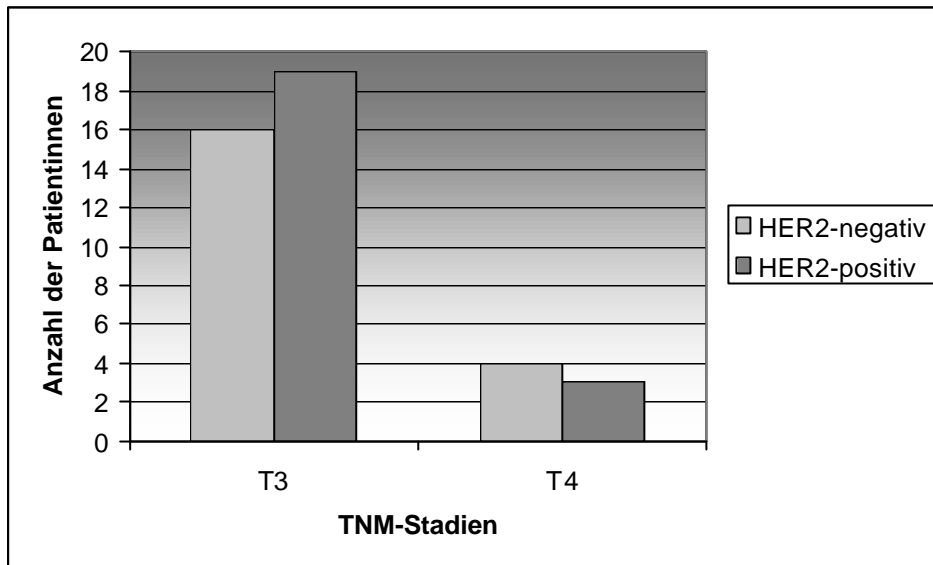
Jedoch konnte bei positivem Lymphknotenbefall eine erhöhte Rate an HER2/neu – Expression nachgewiesen werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen u.a. die Abhängigkeit verschiedener Prognosefaktoren vom HER2/neu -Rezeptstatus.

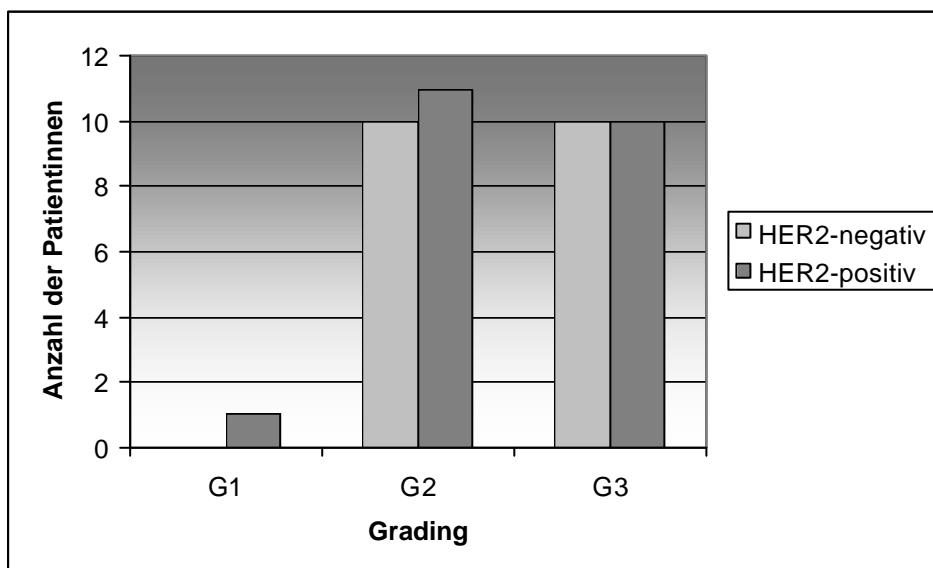
**Tabelle 2** Gesamtüberblick über untersuchtes Patientenkollektiv (Ploidie)

		Gesamtzahl	HER 2/neu	
			negativ	positiv
<b>Stadium</b>	III	35	45,7 % ( 16 )	54,3 % ( 19 )
	IV	7	57,1 % ( 4 )	42,9 % ( 3 )
<b>Histologie</b>	serös	28	50,0 % ( 14 )	50,0 % ( 14 )
	muzinös	2	- ( 0 )	100 % ( 2 )
	endometrioid	6	66,7 % ( 4 )	33,3 % ( 2 )
	mesonephroid	2	50,0 % ( 1 )	50,0 % ( 1 )
	gemischt	2	- ( 0 )	100 % ( 2 )
	Gallert - Ca	1	100 % ( 1 )	- ( 0 )
	keine Angaben	1	- ( 0 )	100 % ( 1 )
<b>Grading</b>	1	1	- ( 0 )	100 % ( 1 )
	2	21	47,6 % ( 10 )	52,4 % ( 11 )
	3	20	50,0 % ( 10 )	50,0 % ( 10 )
<b>Alter</b>	< 50 Jahre	9	55,6 % ( 5 )	44,4 % ( 4 )
	50 - 70 Jahre	22	50,0 % ( 11 )	50,0 % ( 11 )
	> 70 Jahre	11	36,4 % ( 4 )	63,6 % ( 7 )
<b>Lymphknoten-Dissektion</b>	ja			
	Lk positiv	20	30,0 % ( 6 )	70,0 % ( 14 )
	Lk negativ	5	60,0 % ( 3 )	40,0 % ( 2 )
	nein	17	64,7 % ( 11 )	35,3 % ( 6 )
<b>größter zurück-belassener Tumor</b>	< 1 cm	29	48,3 % ( 14 )	51,7 % ( 15 )
	≥ 1 cm	12	50,0 % ( 6 )	50,0 % ( 6 )
	keine Angaben	1	- ( 0 )	100 % ( 1 )
<b>Aszites</b>	ja	29	58,6 % ( 17 )	41,4 % ( 12 )
	nein	9	11,1 % ( 1 )	88,9 % ( 8 )
	keine Angaben	4	50,0 % ( 2 )	50,0 % ( 2 )
<b>Chemotherapie</b>	ja			
	Platin	33	51,5 % ( 17 )	48,5 % ( 16 )
	Ø Platin	5	40,0 % ( 2 )	60,0 % ( 3 )
	nein	4	25,0 % ( 1 )	75,0 % ( 3 )

## Ergebnisse

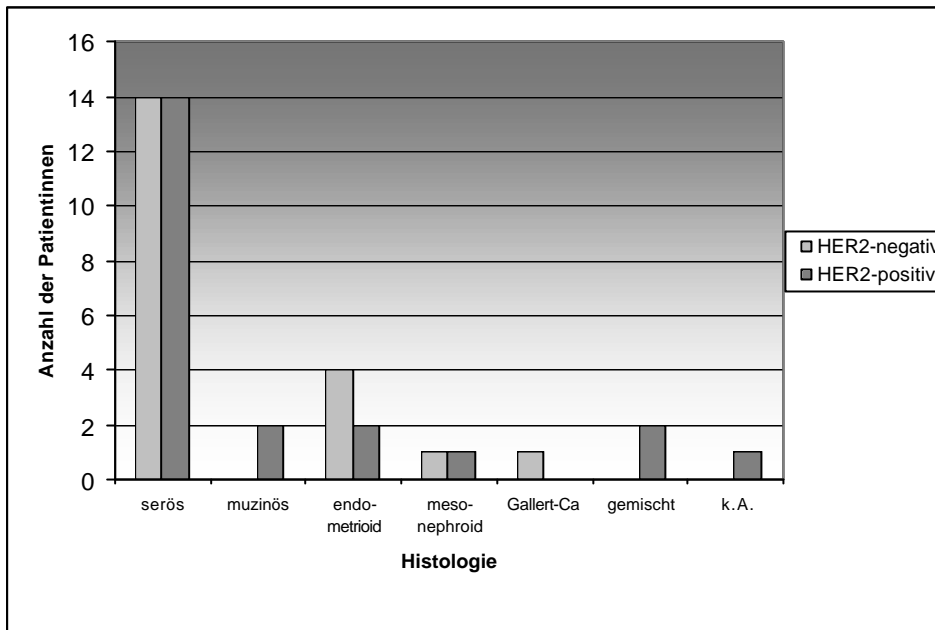


**Abbildung 21** HER2/neu-Status und Stadienverteilung

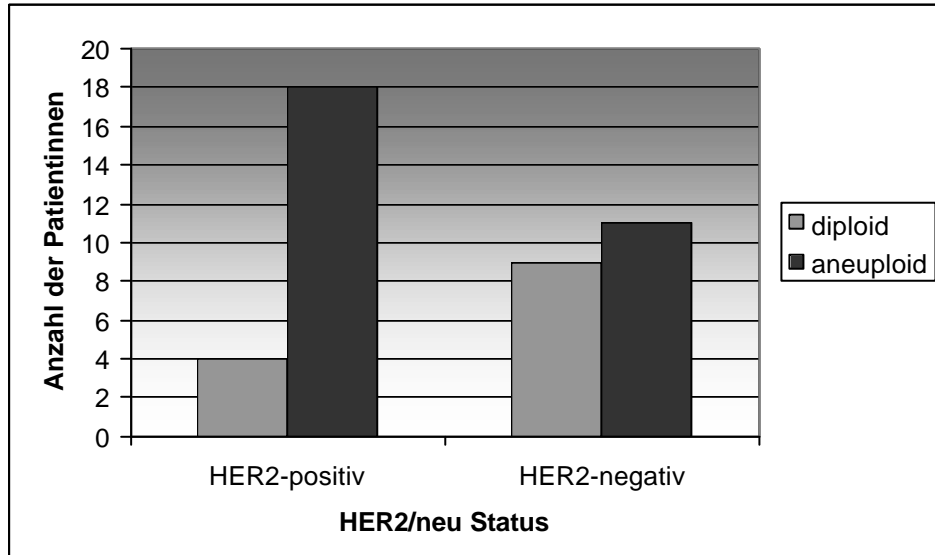


**Abbildung 22** HER2/neu-Status und Grading

## Ergebnisse



**Abbildung 23** HER2/neu-Status und Histologie



**Abbildung 24** HER2/neu-Status und Ploidie



## 4.5 Analyse des klinischen Verlaufes

### 4.5.1 Rezidivfreie Zeit

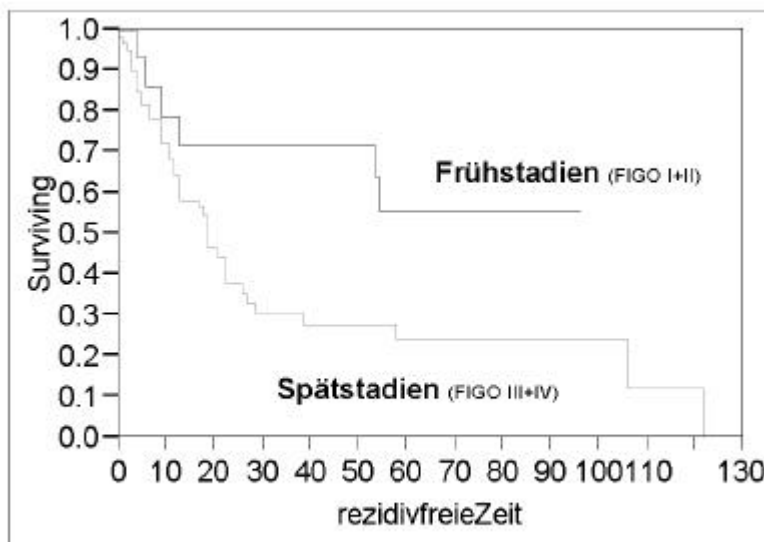
Als rezidivfreie Zeit wurde das Zeitintervall bis zum erneuten Auftreten der Erkrankung bezeichnet, bzw. der Zeitraum bis zur letzten Beobachtung, vorausgesetzt, die Patientin war rezidivfrei.

#### 4.5.1.1 Etablierte Prognosefaktoren

Die folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Parameter und deren Auswirkung auf die rezidivfreie Zeit.

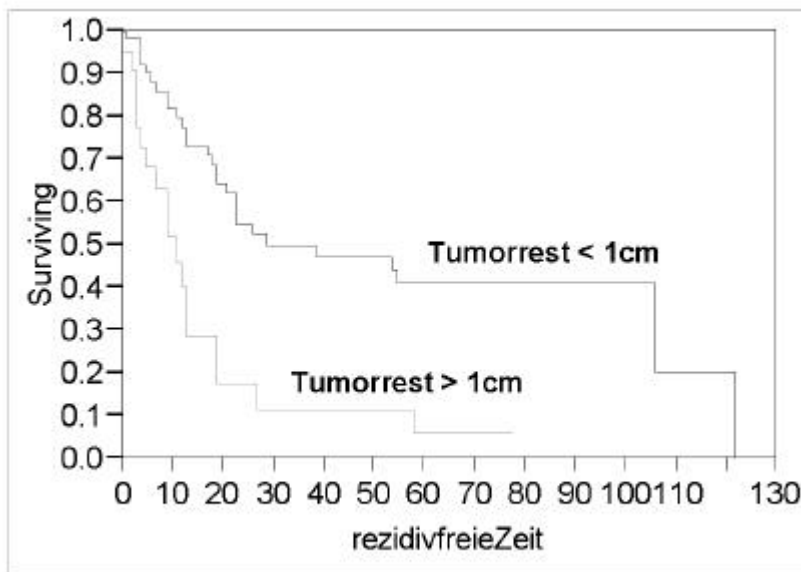
Es gilt dabei:

- X-Achse: rezidivfreie Zeit in Monaten
- Y-Achse (surviving): kumulativer Anteil des Patientenkollektivs, das den Beobachtungszeitraum rezidivfrei überlebt hat

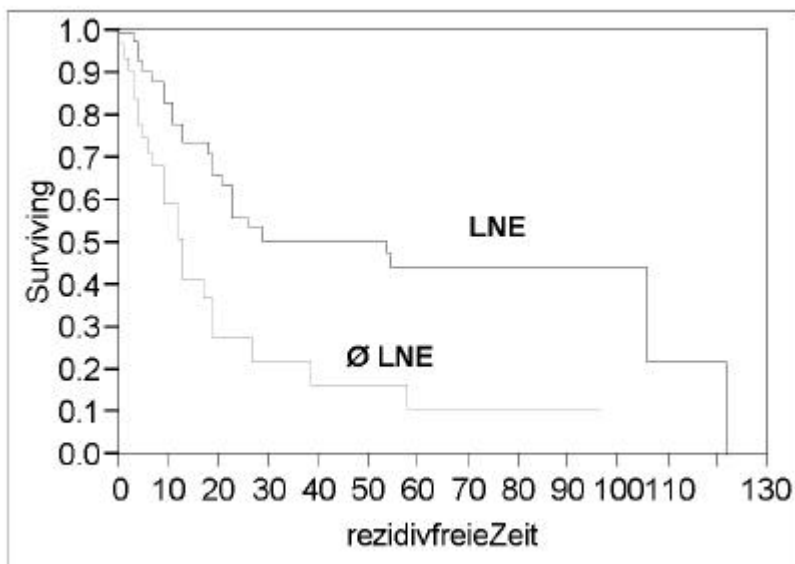


**Abbildung 25** TNM-Stadium (gruppiert) vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,04$ )

## Ergebnisse

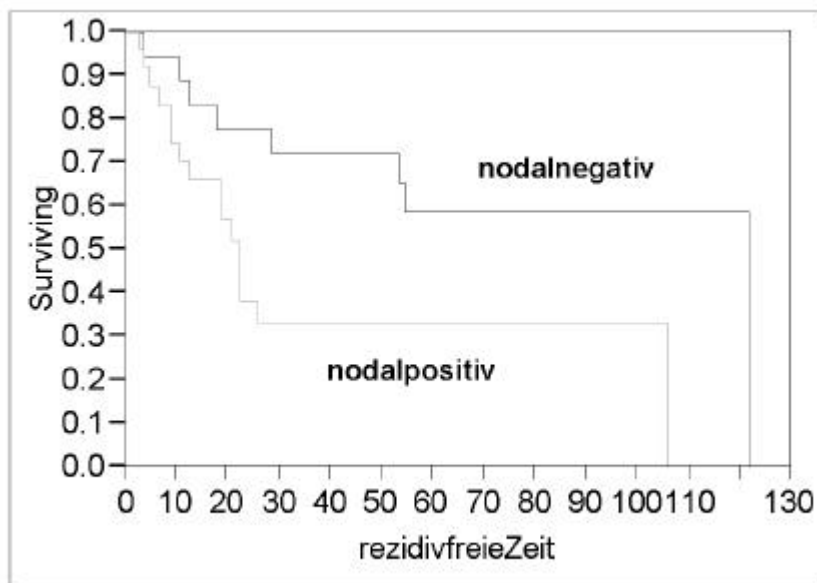


**Abbildung 26** verbliebener Tumorrest vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,0001$ )



**Abbildung 27** Lymphknotenentfernung vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,001$ )

## Ergebnisse



**Abbildung 28** Lymphknotenstatus vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,03$ )

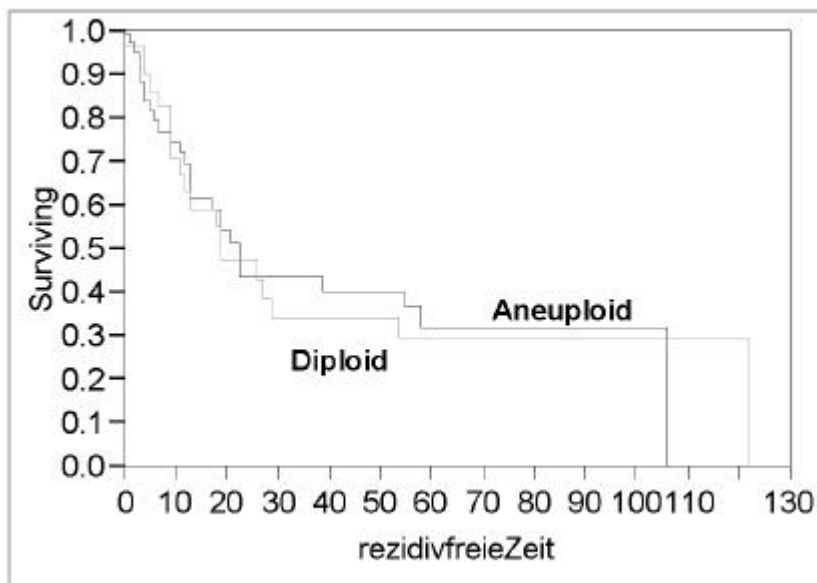
Wie zu erwarten war, zeigen Patientinnen in den Frühstadien ein längeres rezidivfreies Intervall. Auch ist die Zeit bis zum erneuten Auftreten der Erkrankung bei Patientinnen, bei denen der Primärtumor radikal operiert werden konnte, länger. Die Entfernung der Lymphknoten verlängert das rezidivfreie Intervall. Beim Nachweis von primärem Lymphknotenbefall kam es schneller zum Rezidiv.

Keine statistische Signifikanz wurde beim Grading, der Histologie, bei Nachweis von Aszites, bezügl. der Durchführung einer Chemotherapie, sowie Art der Chemotherapie (platinhaltig oder nicht platinhaltig) gefunden.

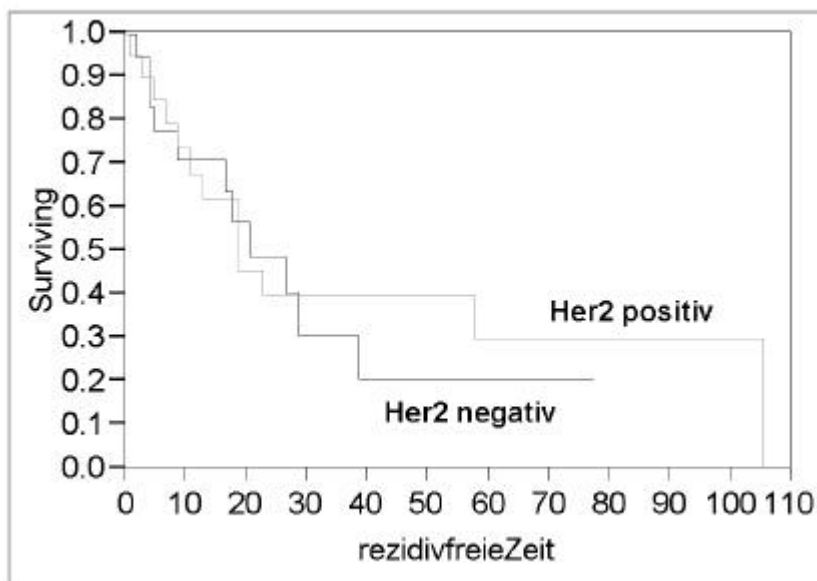
### 4.5.1.2 Ploidie/HER2-Status als Prognosefaktor

Die folgenden Abbildungen zeigen die Auswirkung der Ploidie und des HER2-Status auf die rezidivfreie Zeit:

## Ergebnisse



**Abbildung 29** Ploidie vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,9$ )



**Abbildung 30** HER2/neu-Status vs. rezidivfreie Zeit  
(log rank  $p=0,7$ )

Die Überlebensraten nach Kaplan-Meier zeigen kein statistisch signifikantes Niveau.

### 4.5.1.3 Multivariate Analysen

Zur Bestätigung des deskriptiven Teils wurde eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Es sollte die Unabhängigkeit einzelner Parameter überprüft werden. Es wurden sowohl die bereits etablierten Prognosefaktoren, wie TNM-Stadium, Grading und zurückbelassene Tumorgröße ( $\leq 1$  cm versus  $> 1$  cm), als auch der neue Parameter Ploidie miteinander verglichen. (Der HER2-Status wurde aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs nicht untersucht.)

Die Annahme der „proportional-Hazard“ galt als erfüllt. Es zeigte lediglich der Tumorrest eine statistische Signifikanz ( $p=0,007$ ).

**Tabelle 3** Multivarianzanalyse (rezidivfreie Zeit)

#### Effect Likelihood Ratio Tests

Prognoseparameter	(Likelihood-Ratio) $\chi^2$	Probabilität
Ploidie	0.00890464	0.9248
TNM-Stadium	1.65651567	0.6466
Grading	1.18820992	0.5521
Tumor 1cm oder größer	7.39978803	0.0065

## 4.5.2 Überlebenszeit

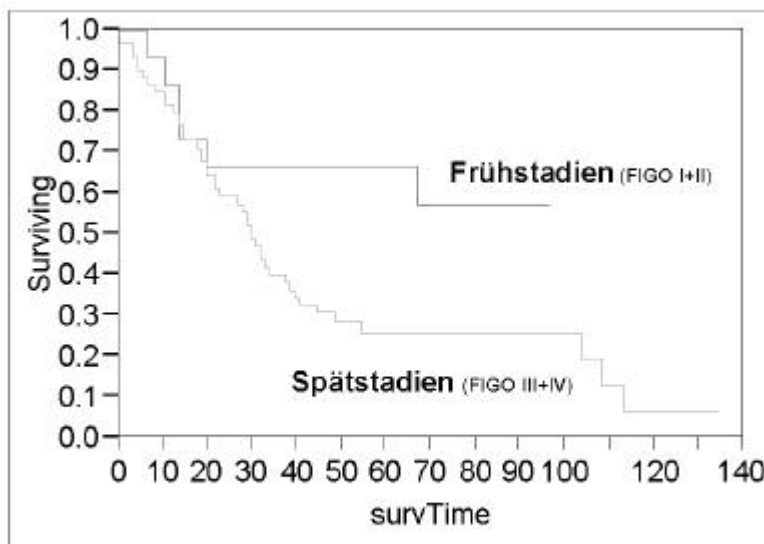
Als Überlebenszeit wurde das Zeitintervall bis zum Tod der Patientin bezeichnet, bzw. der Zeitraum bis zum letzten Kontakt.

### 4.5.2.1 Etablierte Prognosefaktoren

Die folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Parameter und deren Auswirkung auf die Gesamtüberlebenszeit.

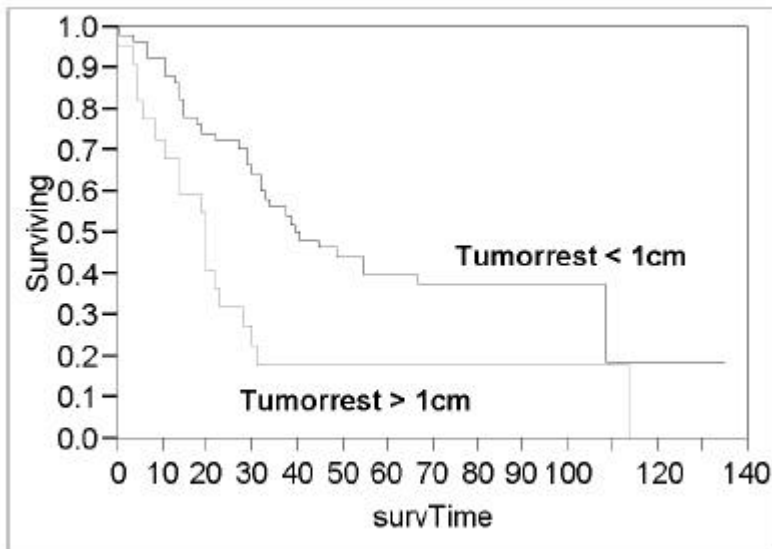
Es gilt dabei:

- X-Achse: Überlebenszeit in Monaten
- Y-Achse (surviving): kumulativer Anteil des Patientenkollektivs, das den Beobachtungszeitraum überlebt hat

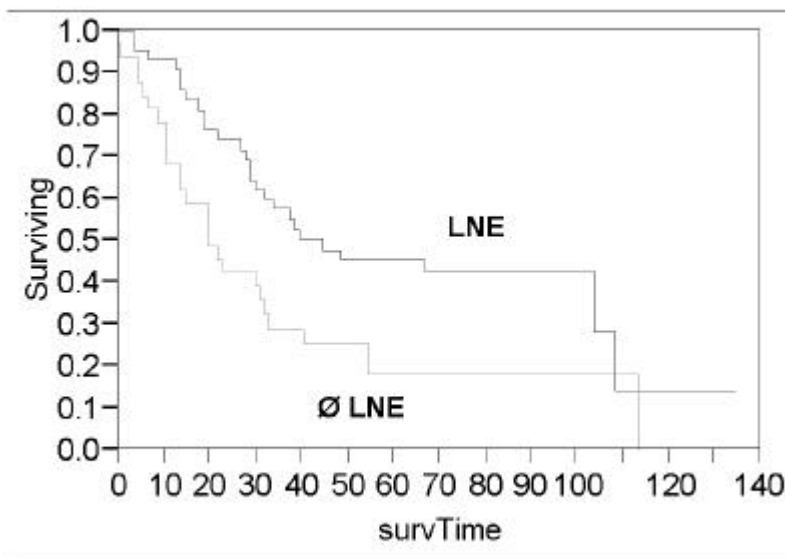


**Abbildung 31** TNM-Stadium (gruppiert) vs. Überlebenszeit  
(log rank  $p=0,04$ )

## Ergebnisse

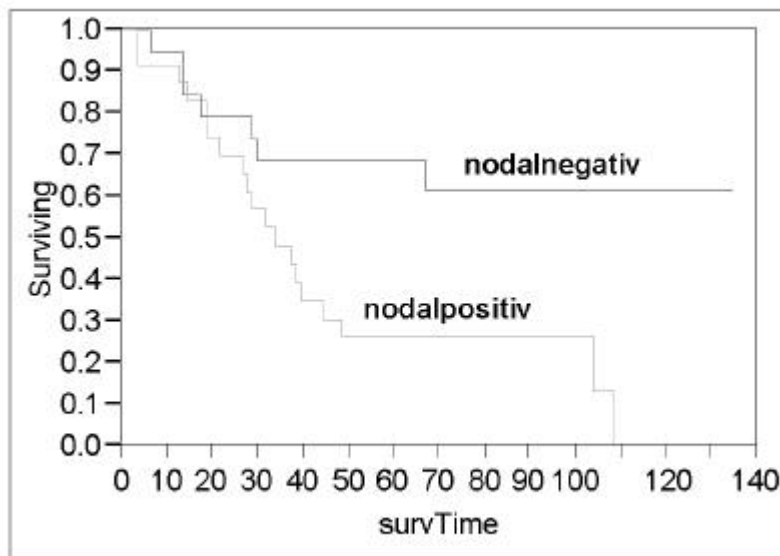


**Abbildung 32** verbliebener Tumorrest vs. Überlebenszeit  
(Log rank  $p=0,003$ , Wilcox  $p=0,001$ )



**Abbildung 33** Lymphknotenentfernung vs. Überlebenszeit  
(Log rank  $p=0,01$ , Wilcox  $p=0,006$ )

## Ergebnisse



**Abbildung 34** Lymphknotenstatus vs. Überlebenszeit  
(log rank  $p=0,02$ )

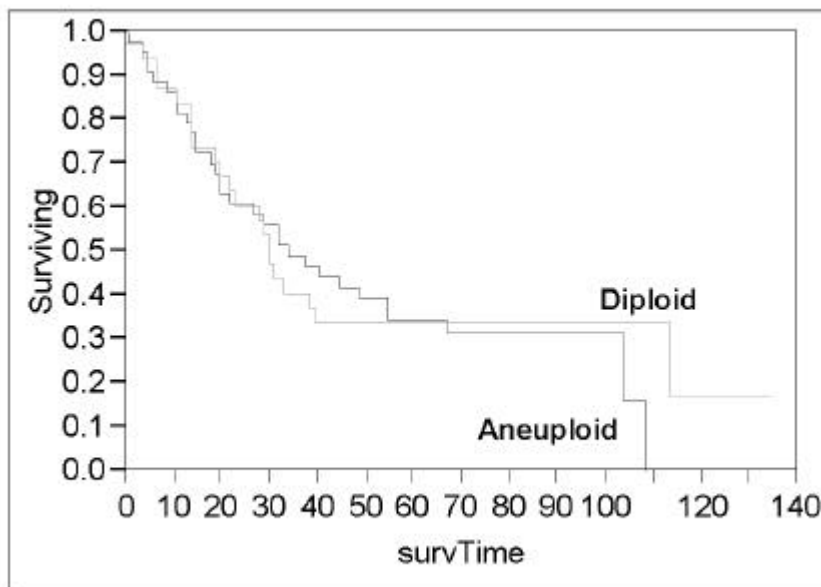
Für die Gesamtüberlebenszeit wurden die gleichen statistisch signifikanten Prognosefaktoren gefunden wie bei der rezidivfreien Zeit: Patientinnen in den Frühstadien lebten länger. Die Radikalität der Operation hat sich mit einer verlängerten Überlebenszeit ausgewirkt. Eine Entfernung der Lymphknoten verlängerte die Gesamtüberlebenszeit. Bei primär positivem Lymphknotenbefall war die Gesamtüberlebenszeit verkürzt. Keine statistische Signifikanz wurde beim Grading, der Histologie, bei Nachweis von Aszites, bezgl. der Durchführung einer Chemotherapie, sowie Art der Chemotherapie (platinhaltig oder nicht platinhaltig) gefunden.

### 4.5.2.2 Ploidie/HER2-Status als Prognosefaktor

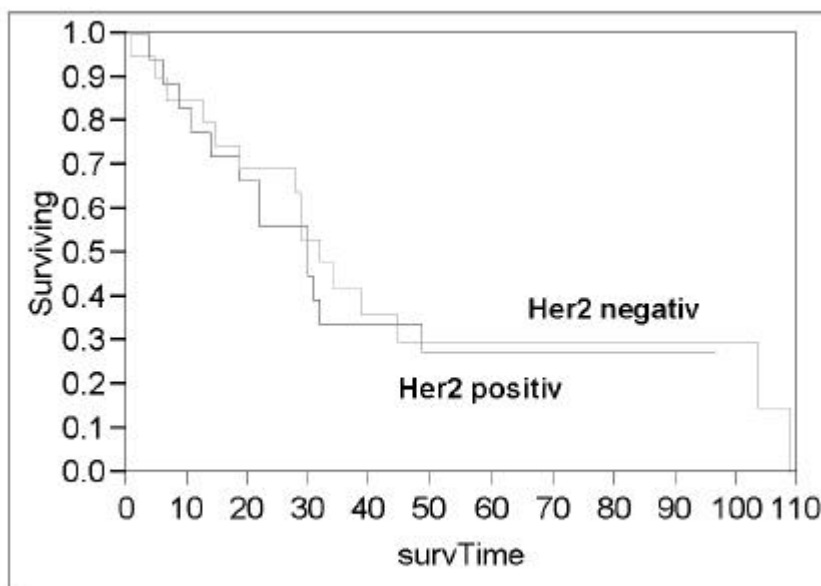
Die folgenden Abbildungen zeigen die Auswirkung der Ploidie bzw. des HER2-Status auf die Gesamtüberlebenszeit.



## Ergebnisse



**Abbildung 35** Ploidie vs. Überlebenszeit  
(log rank  $p=0,8$ )



**Abbildung 36** HER2/neu-Status vs. Überlebenszeit  
(log rank  $p=0,8$ )

Wie schon bei der rezidivfreien Zeit, lässt sich auch für die Gesamtüberlebenszeit keine statistische Signifikanz nachweisen.

#### 4.5.2.3 Multivariate Analysen

Zur Überprüfung der Unabhängigkeit einzelner Parameter wurde auch hier eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Es wurden sowohl die bereits etablierten Prognosefaktoren (TNM-Stadium, Grading und zurückbelassene Tumorgröße ( $\leq 1$  cm versus  $> 1$  cm)) sowie die Ploidie miteinander verglichen. (Der HER2-Status wurde aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs nicht untersucht.)

Die Annahme der „proportional-Hazard“ galt als erfüllt. Erneut zeigte nur der Tumorrest eine statistische Signifikanz ( $p=0,03$ ).

**Tabelle 4** Multivarianzanalyse (Gesamtüberlebenszeit)

##### Effect Likelihood Ratio Tests

Prognoseparameter	(Likelihood-Ratio) $\chi^2$	Probabilität
Ploidie	0.29493032	0.5871
TNM-Stadium	4.1554409	0.2452
Grading	0.05450609	0.9731
Tumor 1cm oder größer	4.70398711	0.0301

## 5 Diskussion

### 5.1 Ploidie

Die Durchflußzytometrie (FCM) hat sich in den letzten Jahrzehnten aus den Versuchen, Blutzellen automatisch zu zählen und charakterisieren zu können, entwickelt. Diese Methode fand zunächst Anwendung in der Hämatologie zur Untersuchung akuter Leukämien, da bei diesen Erkrankungen die notwendigen Einzelkernsuspensionen leicht zur Verfügung standen (19). Einzelkernsuspensionen sind eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine zuverlässige FCM DNA-Analyse.

Durch spezielle Aufbereitungsmethoden stand kurz darauf auch für solide Tumoren eine Möglichkeit der DNA-Bestimmung zur Verfügung (119, 137, 152). Die durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehaltes wurde als Methode zur Aufdeckung von Aneuploidien – darüber hinaus auch zur Schätzung des S-Phasenanteils am Zellzyklus – verwendet (111, 138). Damit erhoffte man sich, zusätzliche Informationen über die Proliferationskinetik von Tumorzellen zu erhalten.

Hedley entwickelte 1983 eine Methode zur Aufarbeitung von in Paraffin eingebettetem Gewebe (49, 50, 51, 52). Es stand somit eine Möglichkeit zur Verfügung, retrospektive Studien an archivierten Tumoren durchzuführen.

Die Ploidie erwies sich bei vielen Untersuchungen an unterschiedlichen Tumoren als prognostisch relevanter Parameter (31, 42, 63, 65, 92, 117, 136, 139, 140, 143). Früh wurden auch Untersuchungen an gynäkologischen Tumoren durchgeführt (71, 138, 154). Auch beim Ovarialkarzinom konnte ein Einfluss der Ploidie auf den klinischen Verlauf nachgewiesen werden (72, 106, 108, 115, 116, 125, 146, 159).

Die bisher veröffentlichten Studien über das Ovarialkarzinom untersuchten meist nur den prognostischen Wert der Ploidie hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit (47, 86, 127, 144, 149), nicht jedoch hinsichtlich weiterer klinischer Verlaufsparemeter, wie z. B. des rezidivfreien Intervalls.

## Diskussion

Hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit hat sich die Ploidie als Prognosefaktor etabliert (71, 100, 158).

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Einfluss der Ploidie auf die Gesamtüberlebenszeit als auch auf die rezidivfreie Zeit untersucht. 81 Tumoren konnten in die Untersuchung einbezogen werden. Von den 16 Karzinomen im Frühstadium (FIGO I und II) zeigten 8 eine Aneuploidie. Im Spätstadium (FIGO III und IV) wiesen 65 % eine aneuploide Stammlinie auf. Fortgeschrittene Stadien waren somit prozentual häufiger mit einer DNA-Aneuploidie verbunden als Frühstadien. Ähnliche Ergebnisse können auch in der Literatur gefunden wird:

**Tabelle 5** Aneuploidieraten verschiedener Untersuchungen beim Ovarialkarzinom

Autor, Jahr (Literaturverzeichnis)	Frühstadien ( FIGO I+II)		Spätstadien (FIGO III+IV)	
	Gesamtzahl	Aneuploider Anteil	Gesamtzahl	aneuploider Anteil
Friedlander, 1983 (36)	17	47 %	30	100 %
Blumenfeld, 1987 (14)			77	53 %
Iverson, 1987 (62)	20	15 %	30	77%
Kallionemi, 1988 (73)	89	47 %	68	72 %
Kühn, 1989 (86)			99	65 %
Brescia, 1990 (18)	27	37 %	72	52 %
Kaern, 1994 (67)			169	79 %
Eissa, 1998 * (29)	54		50 %	
Ozalp, 2001 * (105)	26		62 %	
vorliegende Arbeit	16	50 %	65	65 %

\* keine Unterteilung in verschiedene Stadien

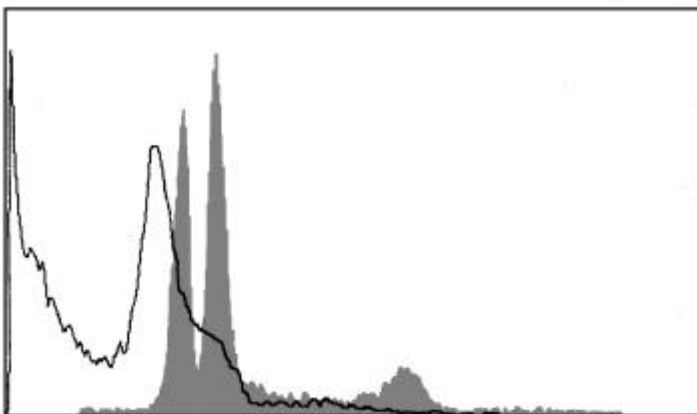
Wie die Tabelle zeigt, finden sich zum Teil erhebliche Unterschiede in der Häufigkeit des Nachweises einer Aneuploidie. Für die fortgeschritteneren Stadien (FIGO III+IV) fand man jedoch durchweg höhere Aneuploidieraten im Vergleich zu den Frühstadien (FIGO I+II). Trotz allem schwankt das Auftreten einer Aneuploidie in den Spätstadien zwischen 52 und 100 %.

## Diskussion

Diese Schwankungsbreite soll im Folgenden näher betrachtet werden. Die Probleme der Durchflußzytometrie im Allgemeinen und im Speziellen sollen diskutiert werden. Auf mögliche Fehlerquellen soll hingewiesen werden, die aus den Messungen erhobenen Befund und die daraus gezogenen Interpretationen sollen kritisch betrachtet werden:

Die beträchtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Studien können einerseits durch die zum Teil sehr kleinen Kollektive bedingt sein, andererseits spielt jedoch auch das der Durchflußzytometrie zur Verfügung stehende Gewebe eine entscheidende Rolle: Es wird prinzipiell zwischen „frischem“ und in Paraffin eingebettetem Gewebe unterschieden. Bei formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumoren findet man durchweg breitbasigere  $G_0/G_1$ -Peaks, als bei frischen Tumoren (70). Es besteht dadurch die Möglichkeit, dass zwei dicht beieinanderliegende  $G_0/G_1$ -Peaks miteinander „verschmelzen“ und nicht als getrennte Peaks – und damit auch nicht als aneuploide Zelllinien – unterschieden werden können (45). Durch die für die Archivierung notwendige Fixierung und der späteren Präparation zur Herstellung einer Zellkernsuspension können im Tumorgewebe erhebliche Veränderungen erzeugt werden. Es ist anzunehmen, dass durch die z.T. sehr aggressiven Präparationsschritte Zelltrümmer und Kernfragmente entstehen.

Ein Extremfall zeigt die Abbildung 37, die zwei unterschiedliche Histogramme einer Gewebeprobe zeigt. Bei der grau unterlegten Kurve handelt es sich um „Frischgewebe“, bei der anderen Kurve handelt es sich um Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe des gleichen Tumors.



**Abbildung 37** Histogramme eines Tumors ( mit / ohne Formalinfixierung etc.)

## Diskussion

(aus: Keren-D.F., Hanson-C.A. (American Society of Clinical Pathologists 1994): Flow Cytometry and Clinical Diagnosis. S. 434)

Wie bereits erwähnt (vgl.3.6), können die Fixierung und die Aufarbeitung der Gewebeproben die Breite der  $G_0/G_1$ -Peaks und damit das Auflösungsvermögen eines Dot-Plots bzw. Histogramms beeinflussen (2, 55).

Es soll daher an dieser Stelle kurz näher auf die zu beachtenden Besonderheiten bei der Präparation eingegangen werden:

Bei der durchflußzytometrischen DNA-Analyse von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe muss darauf geachtet werden, dass die Präparation der Kernsuspension äußerst sorgfältig durchgeführt wird, da ansonsten falsche Ergebnisse erzielt werden können (119, 126). Die in der Literatur beschriebenen Methoden wurden z.T. in etwas abgeänderter Form angewendet. Auf einige methodische Besonderheiten soll im folgenden kurz eingegangen werden:

Bei der Entparaffinisierung des Gewebes hat es sich bewährt die von Hedley angegebene Inkubationszeit in Xylol von zweimal 10 Minuten auf zweimal eine Stunde zu verlängern.

Damit der Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumjodid) vom Gewebe gut aufgenommen werden kann, muss es ausreichend hydratisiert werden (vgl 3.3).

Bei dem enzymatischen Andauungsprozeß war es wichtig, die geeignete Einwirkzeit der Protease zu ermitteln. Eine zu lange Exposition kann mit einer Zerstörung der proliferierenden Zellkerne einhergehen und eine Messung damit unmöglich machen. Als optimalen Zeitraum der Andauung erwies sich eine Inkubation zwischen ein und zwei Stunden. Bei optimaler Inkubationszeit zeigt sich eine wolkige Flockung der Gewebesuspension.

Um eine Aggregation einzelner Zellkerne zu verhindern wurde ein Detergens (Triton X-100) verwendet. Ansonsten kann es zu systematischen Fehlern kommen, wie z. B. ein breitbasiger  $G_0/G_1$ -Peak mit konsekutiv hohem CV-Wert (vgl. 3.6) oder der falsch positive Befund einer Aneuploidie, insbesondere einer Tetraploidie.

Um die Kopplung des Farbstoffes an die ebenfalls im Zellkern in den Nucleoli enthaltenen RNA zu verhindern, wurde RNase verwendet. Bei fehlender oder unzureichender Zerstörung der RNA durch o.g. Verfahren, würde sie sich ebenfalls anfärben und somit auch gemessen werden. Auch hier würde sich ein breitbasiger  $G_0/G_1$ -Peak ergeben. Vor der Ploidie-Messung mit dem Durchflußzytometer (FCM) ist die Zellkernkonzentration der Suspension zu berechnen und ggf. zu korrigieren. Die geeignete Konzentration liegt bei 1 – 2 Millionen Zellkernen / ml Suspension. Durch

## Diskussion

eine zu niedrige oder zu hohe Konzentration kann wiederum ein breitbasiger  $G_0/G_1$ -Peak erzeugt werden.

Ein Maß für die Breite des  $G_0/G_1$ -Peaks, und somit ein Maß für das Auflösungsvermögen und die Genauigkeit der Messungen stellt der Variationskoeffizient, der CV-Wert dar (vgl. 3.6). Häufig wird dieser Wert von Autoren nicht angegeben oder sehr groß gewählt, sodass auch ungenaue und damit schwer interpretierbare Meßkurven in den Untersuchungen enthalten sind. Es hat sich etabliert, Meßkurven mit einem CV-Werte  $> 7,0$  von der Interpretation auszuschließen (5, 71). Auch bei der Berücksichtigung o.g. Kriterien kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der als diploid geltenden  $G_0/G_1$ -Peaks eigentlich aus zwei eng benachbarten Peaks besteht, und somit als falsch diploid interpretiert wurde. Es lässt sich ebenfalls nicht verhindern, dass Kurven mit erhöhtem CV-Wert von der Interpretation ausgeschlossen wurden, bei denen es sich um aneuploide Tumoren handelt, deren Eigenheit jedoch darin besteht, nicht nur eine aneuploide Zelllinie, sondern mehrere aneuploide Zelllinien mit nur geringfügig verändertem DNA-Gehalt zu enthalten. Auch hier ist es dann nicht möglich eng beieinanderliegende Peaks zu unterscheiden.

Ganz entscheidend wird die Qualität der Messungen durch die Qualität des Tumorgewebes beeinflusst:

Wie bereits oben erwähnt, können Zelltrümmer oder Kernfragmente die Interpretation der Histogramme erschweren, eventuell sogar unmöglich machen.

Dieser „debris“ ist jedoch nicht nur präparationsbedingt. Es können auch primär im Tumorgewebe Zelltrümmer etc. enthalten sein, die die Messungen stören können. Häufig findet man dies bei Tumoren mit nekrotischen Arealen. Es sollte daher vermieden werden, dass die Kernsuspension aus Tumorgewebe mit einem hohen Anteil an nekrotisch zerfallenem Gewebe hergestellt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Ausschneiden des Gewebes unter mikroskopischer Kontrolle, Bezirke mit Nekrosen vom restlichen Tumorgewebe abzugrenzen. Dies war in der Mehrzahl der Fälle sehr gut durchzuführen, in einem geringen Anteil konnte jedoch auch durch dieses „Ausschälen“ keine Besserung der Auflösung des Histogramms erreicht werden, sodass diese Gewebeproben von einer Interpretation ausgeschlossen werden mussten. Es ist auch hier davon auszugehen, dass sich darunter eine nicht unerhebliche Anzahl an aneuploiden Tumoren befand, die durch ihr aggressives

## Diskussion

Wachstum und dem damit einhergehenden nekrotischen Zerfall der Interpretation „entgingen“.

Eine weitere Ursache für das unterschiedlich häufige Auftreten einer Aneuploidie liegt möglicherweise in der Definition des Begriffes der Aneuploidie:

In der Literatur sind über 30 (!) unterschiedliche Definitionen der Aneuploidie bei soliden Tumoren beschrieben. In der „Convention on nomenclature of DNA – Cytometry“ (1984) wurde folgendes festgelegt (57):

*“ The diagnosis of “DNA aneuploidie” should be reported only when at least two separate G0/G1 peaks are demonstrated. “*

Dies wurde von der “Society of Analytical Cytology Subcommittee” (1990) bestätigt (151):

*“ The presence of more than one definable peak is the only acceptable criteria for presence of DNA-aneuploid cell/nuclear suspension.”*

In dieser Arbeit wurde ein Tumor dann als aneuploid gewertet, wenn zusätzlich zum diploiden Peak mindestens ein weiterer deutlich abgrenzbarer Peak nachweisbar war – gemäß der „Convention on nomenclature of DNA – Cytometry“.

Die intratumorale Heterogenität spielt eine weitere wichtige Rolle bei der Entscheidung, wann ein Tumor als aneuploid oder diploid bezeichnet werden kann. Untersuchungen, bei denen mehrere Gewebeproben eines Tumors analysiert wurden, zeigten in beinahe der Hälfte aller Tumoren eine intratumorale DNA-Heterogenität (141). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Tatsache. Im hier untersuchten Patientenkollektiv zeigte sich in mind. 52 % der Fälle eine intratumorale Heterogenität. Daher wird zu Recht gefordert, mehrere Gewebeproben eines Tumors zu untersuchen, um eine eindeutige Aussage über den DNA-Gehalt des Tumors machen zu können (68). Eine Interpretation des Ploidiegehaltes sollte bei Analyse nur einer einzigen Gewebeprobe sehr zurückhaltend durchgeführt werden (160).



## Diskussion

Insgesamt muss in Anbetracht der o.g. Besonderheiten davon ausgegangen werden, dass der eigentliche Anteil der aneuploiden Tumoren höher liegt, als der tatsächlich gemessene. In der Tatsache, dass eine gewisse Rate an falsch diploiden Tumoren bestimmt wurde, liegt ein möglicher weiterer Grund, weshalb es oftmals schwierig ist, einen statistisch signifikanten Einfluss der Ploidie auf die Gesamtüberlebenszeit bzw. auf das rezidivfreie Intervall nachweisen zu können.

## 5.2 HER2-Status

Onkogene spielen bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren eine entscheidende Rolle. Durch Untersuchung dieser Gene ist es möglich, zusätzliche Informationen über die Tumorbilogie zu erhalten. Hieraus könnten sich prognostische Aussagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung ergeben.

Unter der großen Anzahl der Onkogene erlangt das HER2/neu-Gen zunehmend an Bedeutung. Beim Mammakarzinom hat sich der Nachweis einer HER2-Überexpression bereits als prädiktiver Faktor etabliert (133). Darüber hinaus besteht eine neue Therapiemöglichkeit, die direkt die Beeinflussung des HER2-Rezeptors als Ziel hat (147): Durch eine Aktivierung des Rezeptors werden eine Vielzahl an Reaktionen katalysiert, die insgesamt zu einem aggressiven Verhalten des Tumors und damit zu einer ausgesprochen schlechten Prognose für die Patientin führen. Mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®), der spezifisch an die HER2-positiven Tumorzellen bindet, kann das Wachstum dieser Tumorzellen gehemmt werden.

Beim Ovarialkarzinom findet man eine Überexpression des HER2-Rezeptors in 0 bis 25 % der Fälle.

**Tabelle 6** HER2-Überexpressionsraten verschiedener Untersuchungen beim Ovarialkarzinom

<b>Autor, Jahr (Literaturverzeichnis)</b>	<b>Gesamtzahl</b>	<b>HER2 positiv</b>
Slamon (1989) (134)	120	25 %
Berchuck (1990) (11)	73	3 %
Leary (1992) (89)		11 %
Meden (1994) (95)	275	19 %
Sasano (1990) (120)	16	0 %
vorliegende Arbeit	42	52 %

## Diskussion

Bei den in der Tabelle aufgeführten Untersuchungen ist die Verteilung der HER2-Überexpression auf die TNM-Stadien z.T. unbekannt. In dieser Arbeit wurden nur fortgeschrittene Stadien (FIGO-Stadien III und IV) untersucht. Darin könnte eine mögliche Erklärung für den überdurchschnittlichen Nachweis einer HER2-Überexpression im untersuchten Kollektiv liegen.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Verfahren zum Nachweis des HER2-Rezeptors zur Verfügung stehen: Es besteht die Möglichkeit des immunhistochemischen Nachweises mittels Antikörper oder FISH (Fluoreszenz-insitu-Hybridisierung). Zur Abschätzung der Signifikanz oder Spezifität dieser beiden Nachweismethoden liegen bislang keine Daten vor.

In der Literatur findet man unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die prognostische Aussagekraft einer HER2-Überexpression:

Neuere Untersuchungen können keinen statistisch signifikanten Unterschied einer HER2-Überexpression bei serösen Borderline-Tumoren im Vergleich zu serösen Tumoren im fortgeschritteneren Stadium nachweisen (45).

Andere Untersuchungen fanden heraus, dass Patientinnen, bei denen eine HER2-Überexpression bestand, statistisch signifikant schlechter auf die durchgeführte Chemotherapie ansprachen als HER2-negative Patientinnen (53).

Widersprüchliche Ergebnisse findet man in der Literatur bezüglich des HER2-Status und dessen Einfluss auf die Überlebenszeit: Manche Untersucher konnten eine statistisch signifikant verkürzte Überlebenszeit nachweisen, z.T. war dies jedoch nur auf fortgeschrittenere Stadien begrenzt (142). Andere Studien konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen (121).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein tendenziell verlängertes rezidivfreies Intervall bei HER2-Negativität, ein statistisch signifikantes Niveau wurde allerdings nicht erreicht. Bezüglich der Gesamtüberlebenszeit läßt sich noch kein Trend absehen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste Genitalneoplasma der Frau, prognostisch stellt es jedoch das ungünstigste dar. Da es wegen seiner initial überwiegenden Symptomlosigkeit oder –armut meist erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt wird, besteht in der Mehrzahl der Fälle nach einer radikalen operativen Tumorentfernung bzw. –reduktion nur die Option einer adjuvanten oder palliativen Chemotherapie, die nicht selten mit erheblichen Nebenwirkungen und mit deutlicher Beeinträchtigung der Lebensqualität der betroffenen Patientin erkauft werden müssen.

Die Wahl der postoperativen Chemotherapie ist dabei äußerst problematisch. Dies liegt u.a. an der ungewöhnlichen Heterogenität des Ovarialkarzinoms hinsichtlich der Ausbreitung sowie an der Vielfältigkeit der tumorösen Zellpopulationen hinsichtlich ihrer malignen Potenz.

Die heutigen Kriterien für die Therapiewahl sind die individuellen intra- und postoperativ ermittelten, objektiven Prognose- und Risikomerkmale:

- Karzinomtyp, Grading
- Histologisch gesicherte Ausbreitung, postoperativer Status (pTNM-Stadium)
- Tumorrestgröße
- Patientinnenalter

Trotz dieser detaillierten Unterteilung profitieren viele Patientinnen nicht von der unter Berücksichtigung o.g. Prognosefaktoren ausgewählten Therapie. Es ist daher notwendig weitere Parameter zu finden, die die Tumorerogenität des Ovarialkarzinoms beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss der Ploidie und des HER2-Status bei Ovarialkarzinomen auf den Krankheitsverlauf untersucht. Als Zielgröße wurde das rezidivfreie Intervall (die Zeit, bis sich klinisch der Hinweis auf ein erneutes Auftreten der Erkrankung ergab) und die absolute Überlebenszeit gewählt.

## Zusammenfassung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten folgende Ergebnisse:

### 1. Bedeutung der Ploidie:

Die DNA-Aneuploidie steht in einer bestimmten Beziehung mit vielen für das Ovarialkarzinom bekannten negativen Prognosefaktoren und spiegelt somit das aggressive Potential des Tumors wider. So konnte bei schlecht differenzierten Tumoren (Grading III), bei älteren Patientinnen, bei Nachweis von Aszites oder befallenen Lymphknoten ein höherer Anteil an aneuploiden Tumoren nachgewiesen werden.

Tendenziell zeigt sich bei aneuploiden Tumoren ein verlängertes medianes rezidivfreies Intervall. Die mediane Gesamtüberlebenszeit ist ebenfalls verlängert. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant, weder bezogen auf die absolute Überlebenszeit noch auf die rezidivfreien Zeit.

Die Ploidie konnte somit in diesem untersuchten Patientenkollektiv als unabhängiger Prognosefaktor nicht bestätigt werden.

Eine mögliche Ursache dieses scheinbar widersprüchlichen Ergebnisses könnte in der technisch schwierigen Aufarbeitung von archiviertem, Formalin fixiertem Gewebe liegen: Es ist davon auszugehen, dass anteilmäßig mehr aneuploide Tumoren, aufgrund der bei diesen Tumoren gehäuft auftretenden Nekrose, keine auswertbaren Ergebnisse erbrachten als diploide Tumoren, und somit in der endgültigen Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten (s. auch Diskussion).

Die intratumorale DNA-Heterogenität - die bei mehr als der Hälfte aller Ovarialkarzinome zu bestehen scheint - erschwert einerseits die Interpretation inwiefern ein Zusammenhang zwischen Ploidie und klinischem Verlauf besteht. Andererseits findet sich in dem Nachweis einer intratumoralen DNA-Heterogenität der Hinweis, dass ein Tumor während seines Wachstums Mechanismen entwickelt, die zu einer fortschreitenden Entartung führen können.

### 2. Bedeutung der HER2/neu-Rezeptor-Expression:

Der HER2/neu-Rezeptorstatus korreliert im untersuchten Kollektiv mit dem Lymphknotenstatus. Bei der deutlichen Mehrzahl der nodal positiven Patientinnen konnte eine HER2/neu-Überexpression nachgewiesen werden. Kein Zusammenhang fand sich zwischen den bereits etablierten Prognosefaktoren, wie z. B. FIGO-Stadium, Grading, Alter, größter zurückbelassener Tumorrest und Aszites und dem HER2-Status.

Ein positiver HER2-Status war signifikant häufiger mit dem Nachweis einer Aneuploidie vergesellschaftet.

Das Fehlen einer HER2-Überexpression war mit einer günstigeren Prognose verbunden: Das rezidivfreie Intervall war tendenziell verlängert, eine Auswirkung auf die Gesamtüberlebenszeit ließ sich im untersuchten Kollektiv - bei gegebener Fallzahl - jedoch nicht nachweisen.

Die Bestimmung der HER2-Überexpression scheint somit eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits etablierten Prognosefaktoren darzustellen. Aufgrund der HER2/neu-Bestimmung könnten zukünftig Patientinnen aufgrund der erhobenen tumorbiologischen Parameter einer individualisierteren Therapie zugeführt werden. Durch diese Optimierung des Behandlungskonzeptes könnte eventuell eine Reduktion der z.T. erheblichen therapiebedingten Nebenwirkungen erzielt werden.

Beim metastasierten Mammakarzinom hat sich bereits die Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab bei HER2/neu positiven Tumoren etabliert (123). Für das HER2/neu positive Ovarialkarzinom könnte dies eine Therapieoption für die Zukunft darstellen.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zu untermauern.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<a href="#">Abbildung 1 Das strömungsmechanische System des FACScan</a>	8
<a href="#">Abbildung 2 Das optische System des FACScan</a>	9
<a href="#">Abbildung 3 Dot-plot 1 (ohne gate)</a>	12
<a href="#">Abbildung 4 Histogramm zu Dot-Plot 1</a>	12
<a href="#">Abbildung 5 Dot-plot 2 (mit gate)</a>	12
<a href="#">Abbildung 6 Histogramm zu Dot-plot 2</a>	12
<a href="#">Abbildung 7 Dot-plot eines diploiden Tumors</a>	14
<a href="#">Abbildung 8 Histogramm eines diploiden Tumors</a>	14
<a href="#">Abbildung 9 Dot-plot eines aneuploiden Tumors</a>	14
<a href="#">Abbildung 10 Histogramm eines aneuploiden Tumors</a>	14
<a href="#">Abbildung 11 HER2/neu positives Tumorgewebe</a>	16
<a href="#">Abbildung 12 Grading des Gesamtkollektivs</a>	19
<a href="#">Abbildung 13 Ploidie und Stadienverteilung</a>	22
<a href="#">Abbildung 14 Ploidie und Grading</a>	22
<a href="#">Abbildung 15 Ploidie und Histologie</a>	23
<a href="#">Abbildung 16 Ploidie und Lymphknotenbefall</a>	23
<a href="#">Abbildung 17 Ploidie und zurückbelassener Tumorrest</a>	24
<a href="#">Abbildung 18 Ploidie und Alter</a>	24
<a href="#">Abbildung 19 Ploidie und Aszites</a>	25
<a href="#">Abbildung 20 Ploidie und Art der Chemotherapie</a>	25
<a href="#">Abbildung 21 HER2/neu-Status und Stadienverteilung</a>	28
<a href="#">Abbildung 22 HER2/neu-Status und Grading</a>	28
<a href="#">Abbildung 23 HER2/neu-Status und Histologie</a>	29
<a href="#">Abbildung 24 HER2/neu-Status und Ploidie</a>	29
<a href="#">Abbildung 25 TNM-Stadium (gruppiert) vs. rezidivfreie Zeit</a>	30
<a href="#">Abbildung 26 verbliebener Tumorrest vs. rezidivfreie Zeit</a>	31
<a href="#">Abbildung 27 Lymphknotenentfernung vs. rezidivfreie Zeit</a>	31
<a href="#">Abbildung 28 Lymphknotenstatus vs. rezidivfreie Zeit</a>	32
<a href="#">Abbildung 29 Ploidie vs. rezidivfreie Zeit</a>	33
<a href="#">Abbildung 30 HER2/neu-Status vs. rezidivfreie Zeit</a>	33
<a href="#">Abbildung 31 TNM-Stadium (gruppiert) vs. Überlebenszeit</a>	35
<a href="#">Abbildung 32 verbliebener Tumorrest vs. Überlebenszeit</a>	36
<a href="#">Abbildung 33 Lymphknotenentfernung vs. Überlebenszeit</a>	36
<a href="#">Abbildung 34 Lymphknotenstatus vs. Überlebenszeit</a>	37
<a href="#">Abbildung 35 Ploidie vs. Überlebenszeit</a>	38
<a href="#">Abbildung 36 HER2/neu-Status vs. Überlebenszeit</a>	38
<a href="#">Abbildung 37 Histogramme eines Tumors ( mit / ohne Formalinfixierung etc.)</a>	42

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<a href="#">Tabelle 1 Gesamtüberblick über untersuchtes Patientenkollektiv (Ploidie)</a> .....	21
<a href="#">Tabelle 2 Gesamtüberblick über untersuchtes Patientenkollektiv (Ploidie)</a> .....	27
<a href="#">Tabelle 3 Multivarianzanalyse (rezidivfreie Zeit)</a> .....	34
<a href="#">Tabelle 4 Multivarianzanalyse (Gesamtüberlebenszeit)</a> .....	39
<a href="#">Tabelle 5 Aneuploidieraten verschiedener Untersuchungen beim Ovarialkarzinom</a> ....	41
<a href="#">Tabelle 6 HER2-Überexpressionsraten verschiedener Untersuchungen beim Ovarialkarzinom</a> .....	47



### 7.3 Literaturverzeichnis

1. Agus-D.B., Bunn-P.A., Franklin-W., Garcia-M., Ozol-R.F (2000).  
Her-2/neu as a therapeutic target in non-small lung cancer, prostate cancer and ovarian cancer.  
*Semin-Oncol* 27 (6 Suppl 11):53-63
2. Akiyama-T., Sudo-C., Ogawara-H., Toyoshima-K., Yamamoto-T. (1986)  
The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity.  
*Science* 232
3. Alanen-K.A., Klemi-P.J., Joensuu-H., Kujari-H., Pekkala-E. (1989)  
Comparison of fresh, ethanol-preserved and paraffin-embedded samples in DNA flow cytometry.  
*Cytometry* 10: 81-85.
4. Barlogie-B., Raber-M.N., Schumann-J., Johnson-T.S., Drewinko-B., Swartzendruber-D.E., Göhde-W., Andreeff-M. and Freireich-E.J. (1983)  
Flow Cytometry in Clinical Cancer Research.  
*Cancer Research* 43: 3982-3997.
5. Barnabei-V.M., Miller-D.S., Bauer-K.D., Murad-T.M., Rademaker-A.W., Lurain-J.R. ( 1990 )  
Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer.  
*Am-J-Obstet-Gynecol* 162: 1584-92.
6. Bastert-G., Costa-S.D. (1994).  
Prä-maligne und maligne Tumoren der weiblichen Genitalorgane, 469- 487.  
in: Dudenhausen-J.W.; Schneider-H.P.W.: Frauenheilkunde und Geburtshilfe.  
de Gruyter, Berlin.
7. Bast-R.C., Klug-T.L., Lazarus-H., Nadler-L.M., Calvin-R.B., Knapp-R.C. (1981)  
Reactivity of monoclonal antibody with human ovarian cancer.  
*J-Clin-Invest.* 68: 1331-1337.
8. Bast-R.S., Klug-T.L., St.John-E., Jenison-E., Niloff-J.M., Lazarus-H., Berkowitz-R.S., Leavitt-T., Griffiths-C.T., Parker-L., Zurawski-V.R., Knapp-R.C. (1983)  
A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer.

- N-Engl-J-Med. 309: 883-887.
9. Bell-D.A.  
Flow cytometry of Ovarian Neoplasms.  
Curr-Top-Pathol. 85: 337-356.
  10. Bell-D.A. (1994)  
Flow Cytometry. 1161-1171.  
In: Kurman-R.J.: Blaustein's pathology of the female genital tract.  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
  11. Berchuck-A., Kamel-A., Whitaker-R. et al.(1990)  
Overexpression of Her-1/neu is associated with poor survival in advanced  
epithelial ovarian cancer.  
Cancer-Res 50: 4087-91.
  12. Berek-J.S.  
in: Practical Gynecologic Oncology. Sec. Edition; 334-335.
  13. Berek-J.S., Martinez-Maza-O., Hamilton-T., Tropé-C., Kaern-J., Baak-J.,  
Rustin-G.J.(1993)  
Molecular biological factors in the pathogenesis of ovarian cancer.  
Annals of Oncology: S3-S16.
  14. Blumenfeld-D., Braly-P.S., Ben-Ezra-J., Klevecz-R.R. (1987)  
Tumor DNA Content as a Prognostic Feature in Advance Epithelial Ovarian  
Carcinoma.  
Gynecologic Oncology. 27: 389-98.
  15. Braly-P.S.  
Flow cytometry in ovarian cancer.  
in:Sharp-F., Mason-W.P., Creasman W.: Ovarian cancer. Bd.2, Biology,  
diagnosis and management.  
Chapman and Hall Medical.
  16. Braly-P.S., Klevecz-R.R. (1993)  
Flow cytometric Evaluation of Ovarian Cancer.  
Cancer. 71: 1621-28.
  17. Brandt-B. (1995)  
Biochemische Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms.  
Zentralbl-Gynäkol 117: 243-246.
  18. Brescia-J., Barakat-R.A., Beller-U., Frederickson-G., Suhrland-M.J., Dubin-N.,  
Demopoulos-R.I. (1990)  
The Prognostic Significance of Nuclear DNA Content in Malignant Epithelial  
Tumors of the Ovary.  
Cancer. 65: 141-47.
  19. Büchner-T., Dittrich-W., Göhde-W (1972)  
Die Impulscytophotometrie in der hämatologischen Cytologie.  
Klin-Wschr 49: 1090-92.

20. Buselmaier-W. (1998)  
Zellvermehrung und Keimzellbildung, 215-239  
in: Biologie  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
21. Coley-H.M., Sargent-J.M., Titley-J., Tayllor-C.G. (1999)  
Lack of prognostic significance of ploidy and S-phase measurment in advanced ovarian cancer.  
Anticancer-Res 19: 2111-16.
22. Coon-J.S., Landay-A.L., Weinstein-R.S. (1987)  
Biology of Disease. Advances in Flow Cytometry for Diagnostic Pathology.  
Laboratory Investigation 57: 453-479.
23. Cox-D.R. (1972)  
Regression models and life tables.  
J-Stat-Soc-B 34: 187-220.
24. Curtin-J.P., Malik-R., Venkatraman-E.S., Baradat-R.R., Hoskins-W.J. (1997)  
Stage IV Ovarian Cancer: Impact of Surgical Debulking.  
Gynecol-Oncol. 64: 9-12.
25. Dean-Ph.N., Gray-J.W., Dolbeare-F.A. (1982)  
The Analysis and Interpretation of DNA Distributions Measured by Flow Cytometry.  
Cytometry 3: 188-95.
26. Diebold-J., Suchy-B., Baretton-B.G., Blasenbren-S., Meier-W., Schmidt-M., Rabes-H., Löhns-U. (1996)  
DNA ploidy and MYC DNA amplification in ovarian cancer.  
Virchows-Arch 429: 221-227.
27. Dietl-J. (1991)  
Ovulation and ovarian cancer.  
Lancet 338: 445.
28. Dietl-J., Horny-H.P., Ruck-P., Kaiserling-E. (1993)  
Dysgerminoma of the Ovary.  
Cancer 71: 2562-8.
29. Eissa-S., Khalifa-A., Laban-M., Bolton-W.E. (1998)  
Comparison of flow cytometric DNA content analysis in fresh and paraffin-embedded ovarian neoplasms: a prospective study.  
Br-J-Cancer 77: 421-25.
30. Esteban-J.M., Sheibani-K., Owens-M., Joyce-J., Bailey-A., Battifora-H. (1991)  
Effects of Various Fixatives and Fixation Conditions on DNA Ploidy Analysis.  
Am-J-Clin-Pathol. 95: 460-466.
31. Forsslund-G., Nilsson-B., Zetterberg-A. (1996)  
Near Tetraploid Prostate Carcinoma (Methodologic and Prognostic Aspects).

- Cancer 78: 1748-55.
32. Fossa-S.D., Berner-A., Waehre-H., Heiden-T., Holm Juul-M.E., van den Ouden-D., Pettersen-E.O., Wang-N., Tribukait-B. (1992)  
DNA Ploidy in Cell Nuclei From Paraffin-Embedded Material. Comparison of Results From Two Laboratories.  
Cytometry 13: 395-403.
  33. Fossa-S.D., Thorud-E., Shoaib-M.C., Pettersen-E.O. (1986)  
DNA Flow Cytometry of Cells Obtained from Old Paraffin-Embedded Specimens. A Comparison with Results of Scanning Absorption Cytometry.  
Path-Res-Pract. 181: 200-205.
  34. Friedlander-M.L., Hedley-D.W., Swanson-C., Russell-P. (1988)  
Prediction of Long-Term Survival by Flow Cytometric Analysis of Cellular DNA Content in Patients With Advanced Ovarian Cancer.  
J-Clin-Oncol. 6: 282-290.
  35. Friedlander-M.L., Hedley-D.W., Taylor-I.W., Russell-P., Coates-A.S. (1984)  
Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer.  
Cancer-Res 44: 397-400.
  36. Friedlander-M.L., Taylor-I.W., Russell-P. (1983)  
Ploidy as a Prognostic Factor in Ovarian Cancer.  
Int-J-Gynecol-Pathol. 2: 55-63.
  37. Frierson-H.F. (1994)  
Ploidy and Proliferation Analysis of Cytologic Specimens, 569-613.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical Diagnosis.  
American Society of Clinical Pathologists.
  38. Frigerio-L., Agnello-A., Sassi-I., Mangili-F., Taccagni-G., Mariani-A., Ferrari-A. (1997)  
Adjuvant Role of MIB 1 Index in Differentiating Serous Ovarian Tumors - Preliminary Report.  
Anticancer-Res 17: 1287-1292.
  39. Gajewski-W.H., Fuller-A.F., Pastel-Ley-C., Flotte-T.J., Bell-D.A. (1994)  
Prognostic significance of DNA content in epithelial ovarian cancer.  
Gynecol-Oncol 53: 1-4.
  40. Geisler-J.P., Wiemann-M.C., Miller-G.A., Geisler-H.E. (1996)  
Estrogen and Progesterone Receptor Status as Prognostic Indicators in Patients with Optimally Cytoreduced Stage IIIc Serous Cystadenocarcinoma of the Ovary.  
Gynecol-Oncol 60: 424-427.
  41. Goff-B.A., Shy-K., Greer-B.E., Muntz-H.G., Skelly-M., Gown-A.M. (1996)  
Overexpression and Relationship of HER-2/neu, Epidermal Growth Factor Receptor, p53, Ki-67, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Epithelial Ovarian Cancer.

- Eur-J-Gynecol-Oncol 17: 487-492.
42. Goldsmith-M.M., Cresson-D.H., Arnold-L.A., Postma-D.S., Askin-F.B., Pillsbury-H.C. (1987)  
DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. Part I.  
Otolaryngol-Head-Neck-Surg. 96: 307-318.
  43. Gotlieb-W.H., Berek-J.S. (1994)  
Advances in the biology of gynecologic cancer.  
Current Opinion in Oncology 6: 513-518.
  44. Griffiths-A.P., Cross-D., Kingston-R., Harkin-P., Wells-M., Quirke-P. (1993)  
Flow Cytometry and AgNORs in Benign, Borderline, and Malignant Mucinous  
and Serous Tumors of the Ovary.  
Int-J-Gynecol-Pathol. 12: 307-314.
  45. Halperin-R., Zehavi-S., Dar-P., Habler-L., Hadas-E., Bukovsky-I., Schneider-D.  
(2001)  
Clinical and molekular comparison between borderline serous ovarian tumors  
and serous papillary ovarian carcinomas.  
Eur-J-Gynecol-Oncol 22: 292-296:
  46. Hanson-C.A. (1989)  
Application of Flow cytometry in Diagnostic Pathology.  
Am-J-Clin-Pathol. 91 ( Suppl 1): S27-S31.
  47. Harlow-B.L., Fuhr-J.E., McDonald-T.W., Schwartz-St.M., Beuerlein-F.J., Weiss-  
N.S. (1993)  
Flow Cytometry as a Prognostic Indicator in Women with Borderline Epithelial  
Ovarian Tumors.  
Gynecologic Oncology 50: 305-9.
  48. Harlozinska-A., Bar-J.K., Sedlaczek-P., Gerber-J. (1996)  
Expression of p53 Protein and Ki-67 Reactivity in Ovarian Neoplasms.  
Am-J-Clin-Pathol 105: 334-340.
  49. Hedley-D.W. (1989)  
Flow Cytometry Using Paraffin-Embedded Tissue: Five Years On.  
Cytometry 10: 229-241.
  50. Hedley-D.W., Friedlander-M.L., Taylor-I.W. (1990)  
Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for  
the study of aneuploidy and its clinical significance.  
Cytometry 6: 327-333.
  51. Hedley-D.W., Friedlander-M.L., Taylor-I.W., Rugg-C., Musgrove-E.A. (1983)  
Method for Analysis of Cellular DNA Content of Paraffin-embedded Pathological  
Material Using Flow Cytometry.  
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 31: 1333-1335.
  52. Hedley-D.W., Shankey-T.V., Wheelless-L.L. (1993)  
DNA Cytometry Consensus Conference.

- Cytometry 14: 471.
53. Hengstler-J.G., Lange-J., Kett-A., Dornhofer-N, Tanner-B. (1999)  
Contribution of c-erbB2 and topoisomerase II alpha to chemoresistance in ovarian cancer.  
Cancer-Res. 59: 3206-14.
54. Henriksen-R., Strang-P., Wilander-E., Bäckström-T., Tribukait- B., Öberg-K. (1994)  
p53 Expression in Epithelial Ovarian Neoplasms: Relationship to Clinical and Pathological Parameters, Ki-67 Expression and Flow Cytometry.  
Gynecol-Oncol 53: 301-306.
55. Herbert-D.J., Nishiyama-R.H., Bagwell-C.B., Munson-M.E., Hitchcox-S.A., Lovett-E.J. (1989)  
Effects of several commonly used fixatives on DNA and total nuclear protein analysis by flowcytometry.  
Am-J-Cin-Pathol 91: 535-541.
56. Herman-C.J. (1992)  
Cytometric DNA Analysis in the Management of Cancer.  
Cancer 69: 1553-1556.
57. Hiddemann-W., Schumann-J., Andreeff-M., Barlogie-B., Herman-C.J., Leif-R.C., Mayall-B.H., Murphy-R.F., Sandberg-A.A. (1984)  
Convention of nomenclature for DNA Cytometry.  
Cytometry 5: 445-446.
58. Hirsch-Kauffmann-M., Schweiger-M. (1992)  
Zellbiologie, 1-84  
in: Biologie für Mediziner.  
Thieme, Stuttgart, New York.
59. Huettner-P.C., Weinberg-D.S., Lage-J.M. (1992)  
Assessment of Proliferative Activity in Ovarian Neoplasms by Flow and Static Cytometry. (Correlation with Prognostic Features).  
Am-J-Pathol. 3: 699-706.
60. Ioakim-Liossi-A., Karakitsos-P., Aroni-K. (1997)  
P53 protein expression and DNA ploidy in common epithelial tumors of the ovary.  
Acta-Cytol 41: 1714-18.
61. Iverson-O.E. (1988)  
Prognostic Value of the Flow Cytometric DNA Index in Human Ovarian Carcinoma.  
Cancer 61: 971-975.
62. Iverson-O.E., Skaarland- E. (1987)  
Ploidy by flow cytometry, a clinicopathologic study.  
Cancer 60: 82-87.

63. Jeanfaivre-T., Chassevent-A., Larra-F., Tuchais-E. (1994)  
Contribution of flow cytometry in prognostic evaluation of non-small-cell lung cancers.  
Bull-Cancer. 81 (7): 605-9.
64. Joensuu-H., Kallioniemi-O.P. (1989)  
Different Opinions on Classification of DNA Histograms Produced From Paraffin-Embedded Tissue.  
Cytometry 10: 711-717.
65. Jung-W.H., Jung-S.H., Yoo-C.J., Kim-Y.J., Park.-C., Kim-B.S. (1994)  
Flow cytometric analysis of DNA ploidy in children rhabdomyosarcoma.  
Yonsei-Med-J. 35 (1): 34-42.
66. Kacinski-B.M., Chambers-S.K. (1991)  
Molecular biology of ovarian cancer.  
Current Opinion in Oncology 3: 889-900.
67. Kaern-J., Tropé-C.G., Kristensen-G.B., Pettersen-E.O. (1994)  
Evaluation of deoxyribonucleic acid an S-phase fraction as prognostic parameter in advanced epithelial ovarian carcinoma: a prospective study.  
Am-J-Obstet-Gynecol 170: 479-87.
68. Kaern-J., Tropé-C.G., Kristensen-G.B., Pettersen-E.O. (1994)  
Flow Cytometric DNA Ploidy and S-Phase Heterogeneity in Advanced Ovarian Carcinoma.  
Cancer 73: 1870-77.
69. Kalbfleisch-J.D., Prentice-R.L. (1980)  
The statistical analysis of failure time data.  
Wiley: New York.
70. Kallioniemi-O.P. (1988)  
Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry of intratumor heterogeneity.  
Cytometry 9: 164-169.
71. Kallioniemi-O.P. (1988)  
DNA flow cytometry in oncology-methodology and prognostic value in breast and ovarian cancer.  
Acta Universitatis Tamperensis. (ser A vol 249).
72. Kallioniemi-O.P., Mattila-J., Punnonen-R., Auvinen-O., Koivula-T., Hakama-M. (1988)  
DNA ploidy level and cell cycle distribution in ovarian cancer: relation to histopathological features of the tumor.  
Int-J Gynecol-Pathol. 7: 1-11.
73. Kallioniemi-O.P., Punnonen-R., Mattila-J., Lehtinen-M., Koivula-T. (1988)  
Prognostic Significance of DNA Index, Multiploidy and S-Phase Fraction in Ovarian Cancer.

- Cancer 61: 334-339.
74. Kaplan-E.L., Meier-P. (1958)  
Nonparametric estimation from incomplete observation.  
J-Am-Stat-Assoc 53: 457-481.
75. Kerns-B.J.M., Jordan-P.A., Faerman-L.L., Berchuck-A., Bast-R.C., Layfield-L.J. (1994)  
Determination of Proliferation Index With MIB-1 in Advanced Ovarian Cancer Using Quantitative Image Analysis.  
Am-J-Clin-Pathol 101: 192-197.
76. Khoo-S.K., Battistutta-D., Hurst-T., Sanderson-B., Ward-B., Free-K. (1993)  
The Prognostic Value of Clinical, Pathologic, and Biologic Parameters in Ovarian Cancer.  
Cancer 72: 531-7.
77. Khoo-S.K., Hurst-T., Kearsley-J., Dickie-G., Free-K., Parsons-P.G., Whitaker-S., Ward-B. (1990)  
Prognostic Significance of Tumor Ploidy in Patients with Advanced Ovarian Carcinoma.  
Gyn-Oncol. 39: 284-288.
78. Kigawa-J., Minagawa-Y., Ishihara-H., Kanamori-Y., Terakawa-N. (1993)  
Tumor DNA Ploidy and Prognosis of Patients with Serous Cystadenocarcinoma of the Ovary.  
Cancer 3: 804-808.
79. Kimmig-R., Wimberger-P., Hillemanns-P., Kapsner-T., Caspari-C., Hepp-H. (2002)  
Multivariate analysis of the prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells.  
Gynecol-Oncol 84: 21-31.
80. Kiyokawa-T. (1994)  
Alteration of p53 in Ovarian Cancer: Its Occurrence and Maintenance in Tumor Progression.  
Int-J- Gynecol-Pathol 13: 31-318.
81. Knüchel-R. (1994)  
Durchflußzytometrische Analytik und Zellsortierung.  
Pathologe 15: 85-95.
82. Kohler-M.F., Kerns-B.-J.M., Humphrey-P.A., Marks-J.R., Bast-R.C., Berchuck-A. (1993)  
Mutation and Overexpression of p53 in Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer.  
Obstetrics and Gynecology 81: 643-650.
83. Konecny-G., Pegram-M., Untch-M., Thomssen-C., Jänicke-F., Hepp-H., Slamon-D.J. (2000)  
HER-2/neu als prädiktiver Faktor beim Mammakarzinom.



- Geburtsh-Frauenheilk 60: 609-619.
84. Kotylo-P.K., Michael-H., Fineberg-N., Sutton-G., Roth-L.M. (1992)  
Flow Cytometric Analysis of DNA Content and RAS P21 Oncoprotein  
Expression in Ovarian Neoplasms.  
Int-J-Gyn-Pathol. 11: 30-37.
85. Kristensen-G.B., Tropé-C. (1997)  
Epithelial ovarian carcinoma.  
Lancet 349: 113-117.
86. Kühn-W., Kaufmann-M., Feichter-G.E., Rummel-H.H., Schmid-H., Heberling-D.  
(1987)  
DNA Flow Cytometry, Clinical and Morphological Parameters as Prognostic  
Factors for Advanced Malignant and Borderline Ovarian Tumors.  
Gyn-Oncol. 33: 360-367.
87. Lage-J.M., Weinberg-D.S., Huettner-P.C., Mark-S.D. (1992)  
Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in Ovarian Tumors.  
Cancer 69: 2668-2675.
88. Larsen-J.K., Munch-Petersen-B., Christiansen-J., Jorgensen-K. (1986)  
Flow Cytometric Discrimination of Mitotic Cells: Resolution of M, as well as G<sub>1</sub>,  
S, and G<sub>2</sub> Phase Nuclei With Mithramycin, Propidium Iodid and Ethidium  
Bromid After Fixation With Formaldehyde.  
Cytometry 7: 54-63.
89. Leary-J.A., Edwards-B.G., Houghton-C.R.S., Kefford-R.F., Friedlander-M.L.  
(1992)  
Amplification of HER-2/neu oncogene in human ovarian cancer.  
Int-J-Gynecol-Cancer 2: 291-294.
90. Makar-A.Ph., Baekelandt-M., Tropé-C.G., Kristensen-G.B. (1995)  
The Prognostic Significance of Residual Disease, FIGO Substage, Tumor  
Histology, and Grade in Patients with FIGO Stage III Ovarian Cancer.  
Gynecologic Oncology 56: 175-180.
91. Makar-P.H., Tropé-C.G. (1992)  
Endometrial and ovarian malignancies: Epidemiology, etiology and prognostic  
factors.  
Acta-Obstet-Gynecol-Scand 71: 331-336.
92. Martin-G., Halwani-F., Shibata-H., Meterissian-S. (2000)  
Value of DNA ploidy and S-phase fraction as prognostic factors in stage III  
cutaneous melanoma.  
Can-J-Surg. 2000 Feb; 43 (1) : 29-34.
93. McCoy-J.Ph. (1994)  
Basic Principles in Clinical Flow Cytometry, 26-55.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical  
Diagnosis.

- American Society of Clinical Pathologists.
94. McCoy-J.Ph. (1994)  
Clinical molecular Cytometry: Merging Flow Cytometry With Molecular Biology in Laboratory Medicine, 614-634.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical Diagnosis.  
American Society of Clinical Pathologists.
  95. Meden-H., Marx-D., Fattahi-A., Rath-W., Kron-M., Wuttke-W., Schauer-A., Kuhn-W. (1994)  
Elevated serum levels of a c-erbB2 oncogene product in ovarian cancer patients and pregnancy.  
Cancer-Res-Clin-Oncol 120: 378-381:
  96. Meden-K., Kuhn-W. (1997)  
Overexpression of the oncogene c-erbB-2 ( HER2 / neu ) in ovarian cancer: a new prognostic factor.  
Eur-J-Obstet-Gynecol-Reprod-Biol 71: 173-179.
  97. Merkel-D.E., McGuire-W. (1990)  
Ploidy, Proliferative Activity and Prognosis.  
Cancer 65: 1194-1205.
  98. Mileo-A.M., Fanuele-M., Battaglia, Scambia-G., Benedetti-Panici-C. (1992)  
Preliminary evaluation of HER-2/neu oncogene and epidermal growth receptor expression in normal and neoplastic human ovaries.  
Int-J-Biol-Markers 7:114-8.
  99. Minckwitz, von-G., Kaufmann-M. (1993)  
Stellenwert der Steroidhormonrezeptoren unter den Prognosefaktoren beim Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom.  
Gynäkologe 26: 100-106.
  100. Murray-K., Hopwood-L., Volk-D., Wilson-F. (1989)  
Cytofluorometric Analysis of the DNA Content in Ovarian Carcinoma and its Relationship to Patient Survival.  
Cancer 63: 2456-2460.
  101. Keren-D.F.(1994)  
DNA Analysis of Gastrointestinal and Genitourinary Tract Neoplasms, 512-515.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical Diagnosis.  
American Society of Clinical Pathologists.
  102. Nijman-H.W., Kenemans-P., Poort-Keesom-R.J., Verstraeten-R.A., Meijer-C.J. (1999)  
Influence of chemotherapy on the expression of p53, HER-2/neu and proliferation markers in ovarian cancers.  
Eur-J-Ostet-Gynecol-Reprod-Biol 83: 201-6.

103. Ormerod-M.G. (1990)  
Analysis of DNA, 69 - 87.  
in: Flow cytometry: a practical approach  
IRL Press, Oxford.
104. Overton-W.R. (1994)  
Software Programs, 92-111.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical  
Diagnosis.  
American Society of Clinical Pathologists.
105. Ozalp-S., Yalcin-O.T., Gulbas-Z., Tanir-H.M., Minsin-T. (2001)  
Effect of cellular DNA content on the prognosis of epithelial ovarian cancers.  
Gynecol-Obstet- Invest 52: 93-97.
106. Padberg-B.Ch., Arps-H., Franke-U., Thiedemann-C., Rehpenning-W.,  
Stegner-H.E., Lietz-H., Schröder-S., Dietel-M. (1992)  
DNA Cytophotometry and Prognosis in Ovarian Tumors of Borderline  
Malignancy.  
Cancer 69: 2510-2514.
107. Padberg-B.Ch., Garbe-E., Achilles-E., Dralle-H., Bressel-M., Schröder-  
S. (1990)  
Adrenomedullary hyperplasia and pheochromocytoma.  
Virchows-Archiv-A-Pathol-Anat. 416: 443-446.
108. Pfisterer-J., Kommos-F., Sauerbrei-W., Renz-H., du Bois-A., Kiechle-  
Schwarz-M., Pfeiderer-A. (1994)  
Cellular DNA Content and Survival in Advanced Ovarian Carcinoma.  
Cancer 74: 2509-2519.
109. Pfeiderer-A. (1994).  
Tumorartige Läsionen und Tumoren der Fortpflanzungsorgane und der  
Brustdrüse, 526-534.  
in: Martius-G.; Breckwoldt-M.; Pfeiderer-A.: Lehrbuch der Gynäkologie und  
Geburtshilfe.  
Thieme, Stuttgart.
110. Quenel-N., Wafflard-J., Bonichon-F., de Mascarel-I., Trojani-M., Durand-  
M., Avril-A., Coindre-J.M. (1995)  
The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942  
cases.  
Breast-Cancer-Res-Treat 35: 283-291.
111. Renz-H. (1992)  
Durchflusszytometrische DNS- und Zellzyklusanalysen maligner epithelialer  
Tumoren der Ovarien.  
Med. Dissertation, Universität Freiburg
112. Resnik-E., Trujillo-Y.P., Taxy-J.B. (1997)  
Long-term survival and DNA ploidy in advanced epithelial ovarian cancer.

- J-Surg-Oncol 64: 299-303.
113. Rice-L.W., Mark-S.D., Berkowitz-R.S., Goff-B.A., Lage-J.M. (1995)  
Clinicopathologic variables, operative characteristics, and DNA ploidy in predicting outcome in ovarian epithelial carcinomas.  
Obstet Gynecol 86: 379-385.
114. Robey-S.S., Silva-E.G., Gershenson-D.M., McLemore-D., El-Naggar-A., Ordonez-N.G. (1989)  
Transitional Cell Carcinoma in High-Grade High-Stage Ovarian Carcinoma.  
Cancer 63: 839-847.
115. Rodenburg-C.J., Cornelisse-C.J., Heintz-P.A., Hermans-J., Fleuren-G.J. (1987)  
Tumor Ploidy as a Major Prognostic Factor in Advanced Ovarian Cancer.  
Cancer 59: 317-323.
116. Rodenburg-C.J., Cornelisse-C.J., Hermans-J., Fleuren-G.J. (1988)  
DNA Flow Cytometry and Morphometry as Prognostic Indicators in Advanced Ovarian Cancer: A Step Forward in Predicting the Clinical Outcome.  
Gyn-Oncol. 29: 176-187.
117. Ross-J.S (1996)  
DNA ploidy and cell cycle analysis in cancer diagnosis and prognosis.  
Oncology-Huntingt. 10 (6) : 867-82.
118. Saksela-E. (1989)  
Advances in Immunohistochemistry of Ovarian Tumors, 135-156.  
in: Nogales-F., Berry-C.L., Grundmann-E.  
Springer, Berlin, Heidelberg.
119. Sasaki-K., Murakami-T. (1992)  
Clinical Application of Flow Cytometry for DNA Analysis of Solid Tumors.  
Acta-Pathol-Jpn. 42: 1-14.
120. Sasano-H., Garrett-C.T., Wilkinson-D.S., Silverberg-S., Comerford-J., Hyde-J. (1990)  
Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasms.  
Hum-Pathol 21: 382-391:
121. Scambia-G., Benedetti-Panici-P., Ferrandina-G. et al. (1993)  
Expression of HER-2/neu oncoprotein, DNA-ploidy and S-phase fraction in advanced ovarian cancer.  
Int-J-Gynecol-Cancer 3: 271-278.
122. Scambia-G., Catozzi-L., Panici-P.B., Ferrandina-G., Coronetta-F., Barozzi-R., Baiocchi-G., Uccelli-L., Piffanelli-A., Mancuso-S. (1993)  
Expression of ras oncogene p21 in normal and neoplastic ovarian tissue: Correlation with histopathologic features and receptors for estrogen, progesterone, and epidermal growth factor.  
Am-J-Obstet-Gynecol. 168: 71-78.

123. Schaller-G., Bangemann-N. (2001)  
Metastasiertes Mamma-Ca.: Therapie mit humanisierten Antikörpern  
Frauenarzt 42 (2001) Nr.6
124. Schmidt-Matthiesen-H., Bastert-G., Wallwiener-D. (2000)  
Gynäkologische Onkologie.  
6. Auflage, Schattauer, Stuttgart
125. Schueler-J.A., Cornelisse-C.J., Hermans-J., Trimbos-J.B., van der Burg-M.E.L., Fleuren-G.J. (1993)  
Prognostic Factors in Well-Differentiated Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer.  
Cancer 71: 787-795.
126. Schultz-D.S., Zarbo-R.J. (1992)  
Comparison of eight modifications of Hedley´s method for flow cytometric DNA analysis of paraffin-embedded tissue.  
Am-J-Path 98: 291-95:
127. Seidman-J.D.; Norris-H.J.; Griffin-J.L.; Hitchcock-C.L. (1993)  
DNA Flow Cytometric Analysis of Serous Ovarian Tumors of Low Malignant Potential.  
Cancer 71: 3947-51.
128. Shankey-T.V., Rabinovich-P.S., Bagwell-B., Bauer-K.D., Duque-R.E., Hedley-D.W., Mayall-B.H., Cox-C., Wheelless-L. (1993)  
Guideline for Implementation of Clinical DNA.  
Cytometry 14: 472-477.
129. Silverberg-S.G.(1989).  
Prognostic Significance of Pathologic Features of Ovarian Carcinoma, 85-109.  
in: Nogales-F.; Berry-C.L.; Grundmann-E.: Ovarian Pathology (Current Topics in Pathology).  
Springer, Berlin.
130. Sinn-H.P, Haag-D., Ehemann-V., Magener-A., Goertteler-K., Bastert-G., Otto-H.F (1997)  
DNA cytometry in breast carcinoma. Review or method and value in assessing prognosis.  
Pathologe. 18 (1): 19-26
131. Sjogren-S., Inganas-M., Lindgren-A., Holmberg-L., Bergh-J. (1998)  
Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers.  
J-Clin-Oncol 16: 462-469.
132. Skirnisdottir-I., Sorbe-B., Seidal-T. (2001)  
The growth factor receptor Her2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian cancer.  
Int-J-Gynecol-Cancer 11 (2): 119-29.

133. Slamon-D.J., Clark-G.M., Wong-S.G., Levin-W.J., Ullrich-A., McGuire-W.L. (1987)  
Human breast cancer: correlation of relapse-and survival with amplification of HER-2/neu oncogen.  
Science 235: 177-182.
134. Slamon-D.J., Godolphin-W., Jones-L.A. et al.(1989)  
Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.  
Science 244: 707-712:
135. Sliutz-G. (1996)  
Prognostic factors in ovarian carcinomas.  
Wien-Med-Wochenschr 146: 14-17.
136. Smets-L.A., Slater-R., van.Wering-E.R., Van-der-Does-van-den-Berg-A., Hart-A.A., DNA Veerman-A.J.,Kamps-W.A (1995)  
DNA index and % S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children.  
Med-Pediatr-Oncol. 25 (6): 437-44.
137. Stenfert-Kroese-M.C., Rutgers-D.H., Wils-I.S., van Unnik-J.A.M., Roholl-P.J.M. (1990)  
The Relevance of the DNA Index and Proliferation Rate in the Grading of Benign and Malignant Soft Tissue Tumors.  
Cancer 65: 1782-1788.
138. Strang-P., Stendahl-U., Tribukait-B.  
Prognostic Significance of S-Phase Fraction as Measured by DNA Flow Cytometry in Gynecologic Malignancies.  
Annals New York Academy of Sciences. 354-363.
139. Svendsen-L.B., Bredesen-J., Bulow-S., Danes-B.S. (1988)  
Prognostic significance of hereditary predisposition on the outcome of colorectal cancer as expressed by increased in vitro tetraploidy.  
Scandinavian Journal of Gastroenterology 23: 1195-1199.
140. Tachibana-M (1996)  
Clinical application of flow cytometry to urological malignancies.  
Keio-J-Med. 45 (2) : 73-80.
141. Takahashi-Y., Takenaka-A., Ishiguro-T., Noda-Y. (1994)  
Intratumoral DNA Heterogeneity Correlated with Lymph Node Involvement and Surgical Staging in Epithel Ovarian Cancer by Flow Cytometry.  
Cancer 73: 3011-14.
142. Tanner-B., Kreutz-E., Weikel-W., Meinert-R., Ösch-F., Knapstein-P.G., Becker-R. (1996)  
Prognostic significance of c-erbB-2 mRNA in ovarian cancer.  
Gynecol-Oncol 62: 268-277.

143. Tribukait-B. (1991)  
DNA flow cytometry in carcinoma of the prostate for diagnosis, prognosis and study of tumor biology.  
*Acta oncology* 30: 187-92.
144. Tropé-C. Kaern-J (1994)  
DNA Ploidy in Epithelial Ovarian Cancer: a new Independent Prognostic Factor ?  
*Gynecol-Oncol* 53: 1-4.
145. Tsuruchi-N., Kamura-T., Tsukamoto-N., Akazawa-K., Saito-T., Kaku-T., To-N., Nakano-H. (1993)  
Relationship between Paraaortic Lymph Node Involvement and Intraperitoneal Spread in Patients with Ovarian Cancer - A Multivariate Analysis.  
*Gyn-Oncol.* 49: 51-55.
146. Vergote-I.B., Kaern-J., Abeler-V.M., Pettersen-E.O., de Vos-L.N., Tropé-C.G. (1993)  
Analysis of prognostic factors in stage I epithelial ovarian carcinoma: Importance of degree of differentiation and deoxyribonucleic acid ploidy in predicting relaps.  
*Am-J-Obstet-Gynecol.* 169: 40-52.
147. Vogel-C., Cobleigh-M.A., Tripathy-D. et al. (2001)  
First-line, single agent Herceptin<sup>®</sup> (Trastuzumab) in metastatic breast cancer: a preliminary report.  
*Eur-J-Cancer* 37: S25-S29.
148. Volm-M., Brüggemann-A., Günther-M., Kleine-W., Pfeleiderer-A., Vogt-Schaden-M. (1985)  
Prognostic relevance of ploidy, proliferation and resistance-predictive tests in ovarian cancer.  
*Cancer-Res* 45: 5180-85.
149. Volm-M., Kleine-W., Pfeleiderer-A. (1989)  
Flow-Cytometric Prognostic Factors for the Survival of Patients with Ovarian Carcinoma: A 5 Year Follow-Up Study.  
*Gynecologic Oncology.* 35: 84-89.
150. Wells-M.  
New techniques in the pathological assessment of ovarian cancer, 207-221.  
in:Sharp-F., Mason-W.P., Creasman-W.: Ovarian cancer. Bd.2, Biology, diagnosis and management.  
Chapman and Hall Medical.
151. Wersto-R.P., Liblit-R.L., Koss-L.G. (1991)  
Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms.  
*Hum-Pathol* 22: 1085-98.

152. Williams-N.N., Daly-J.M. (1990)  
Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors.  
*Surgery of Gynecology and obstetrics* 171: 257-266.
153. Wils-J., van Guens-H., Baak-J. (1988)  
Proposal for Therapeutic Approach Based on Prognostic Factors Including  
Morphometric and Flow-Cytometric Features in Stage III-IV Ovarian Cancer.  
*Cancer* 61: 1920-25.
154. Wolfson-A.H., Wolfson-D.J., Sittler-S.Y., Breton-L., Markoe-A.M.,  
Schwade-J.G., Houdek-P.V., Averette-H.E., Sevin-B.U., Penalver-M., et-al  
(1994).  
A multivariate analysis of clinicopathologic factors for predicting outcome in  
uterine sarcomas.  
*Gynecol-Oncol.* 52 (1): 52-62.
155. Wong-W.S.F., Tattersall-M.H.N. (1989)  
Immunohistochemical determination of tumor growth fraction in human ovarian  
carcinoma.  
*J-Obstet-Gynaecol.* 96: 720-724.
156. Xiao, J.C. (1994)  
Elektronenmikroskopische, immunhistochemische und durchflußzytometrische  
Untersuchungen beim Hepatoblastom.  
Med. Dissertation, Universität Tübingen
157. Zalupski-M.M., Maciorowski-Z., Ryan-J.R., Ensley-J.F., Hussein-M.E.,  
Sundareson-A.S., Baker-L.H. (1993)  
DNA Content Parameters of Paraffin-Embedded Soft Tissue Sarcomas:  
Optimization of Retrieval Technique and Comparison to fresh Tissue.  
*Cytometry* 14: 327-333.
158. Zanetta-G.M., Keeney-G.L., Cha-S.S., Farr-G.H., Katzmann-J.A.,  
Wieand-H.S., Edmonson-J.H., Podratz-K.C. (1996)  
Flow-cytometric analysis of deoxyribonucleic acid content in advanced ovarian  
carcinoma: Its importance in long-term survival.  
*Am-J-Obstet-Gynecol.* 175: 1217-1225.
159. Zanetta-G.M., Keeney-G.L., Kimlinger-T.K., Katzmann-J.A., Podratz-  
K.C. (1996)  
Concordance of DNA Ploidy Pattern as Measured by Flow Cytometry in  
Primary, Metastatic, and Persistent Ovarian Carcinoma.  
*Gynecologic Oncology* 60: 213-216.
160. Zangwill-B.C., Balsara-G., Dunton-C., Varello-M., Rebane-B.A.,  
Hernandez-E., Atkinson-B.F. (1993)  
Ovarian Carcinoma Heterogeneity as Demonstrated by DNA Ploidy.  
*Cancer* 71: 2261-7.



161. Zarbo-J.R. (1994)  
Quality control Issue and Technical Consideration in Flow Cytometric DNA and Cell Cycle Analysis of Solid Tumors, 425-469.  
in: Keren-D.F., Hanson-C.A., Hurtubise-P.E.: Flow Cytometry and Clinical Diagnosis.  
American Society of Clinical Pathologists.

## Danksagung

Bei allen, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit fertiggestellt werden konnte, möchte ich mich herzlich bedanken.

Für die Überlassung des Themas danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. H. Franz, Neukölln, sowie Herrn Prof. D. Wallwiener, Leiter der Univ.-Frauenklinik, Tübingen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des pathologischen Instituts, Tübingen danke ich für die Unterstützung während meiner experimentellen Arbeit, insbesondere Herrn Dr. Stefan Kröber, Frau Anne Adam, Herrn Dr. Jia-Cheng Xiao und Herrn PD Dr. Peter Ruck.

Für die unkomplizierte, kompetente Beratung und Durchführung der statistischen Auswertung danke ich Herrn Dr. H.-P. Dürr, Institut für Med. Datenverarbeitung Tübingen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen mit deren Informationen, Ratschlägen, Zeit und Hilfe diese Arbeit zustande kam u.a. bei Herrn Dr. Thomas Kiefer, insbesondere aber bei Herrn Dr. Klaus Baumann für seine konstruktive Kritik, unendliche Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Ein Dankeschön an alle Freunde, die mich während des Studiums und darüber hinaus beim Erstellen der Arbeit durch Zuspruch und Ablenkung begleitet haben; herzlichen Dank an Olsen, Markus, die „Lerngruppe“, Philipp, Lutz und Madeleine.

Danke an meine Familie, meine Eltern, meine Schwester Corinna für ihre unermüdlichen Aufmunterungen und Unterstützung auf unterschiedlichste Art und Weise, ihre Geduld und Verständnis und ihren Rückhalt.