

Aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
Chefarzt Professor Dr. W. Simon

Immunhistochemischer Nachweis der Prostacyclinsynthese
beim Mammacarcinom,
eine retrospektive follow-up Studie

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Suzanne Cathrin Luise Hindennach, geb. Steinel
aus
Aalen
2006

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Simon

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. D. Alscher

Meinem Mann und meinen Kindern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite
1.1. Epidemiologie des Mammacarcinoms	8
1.2. NSAID und Mammacarcinom	9
1.3. Prostaglandine und Mammacarcinom	11
1.4. Prostacyclinsynthese	13
1.5. Prostacyclin	15
1.6. Prostacyclin und PPAR	17
1.7. Prognosefaktoren des Mammacarcinoms	19
1.8. Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	
2.1. Patientenkollektiv	21
2.2. Histologische Bearbeitung	23
2.3. Histologische Befundung	23
2.4. Immunhistochemische Färbung	24
2.5. Semiquantitative Auswertung	26
2.6. Histoanalyser	27
2.7. Statistik und Datenerhebung	29
2.8. Materialien	30
2.9. Photographische Techniken	31

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten	
3.1.1. Gesamtstudienkollektiv	31
3.1.2. Vergleich der kategorischen Daten des Gesamtkollektivs	32
3.1.3. Vergleich der numerischen Daten des Gesamtkollektivs	34
3.1.4. Patientenkollektiv der Studie	35
3.1.5. Konventionelle Prognosefaktoren	39
3.1.6. Kaplan-Meier-Statistik für die Stadieneinteilung	41
3.1.7. Kaplan-Meier-Statistik für die Hormonrezeptoren	42
3.1.8. Kaplan-Meier-Statistik für das Grading	44
3.2. Klinisch histo-pathologische Daten	45
3.2.1. TNM-Klassifikation	45
3.2.2. Grading	46
3.3. Histologische Typen	47
3.4. Beschreibung der Immunhistochemie für die Prostacyclinsynthese	48
3.4.1. Prostacyclinfärbung im Normalgewebe	48
3.4.2. Prostacyclinfärbung im Tumorgewebe	48
3.5. Semiquantitative Auswertung	49
3.5.1. Vergleich beider Untersucher	49
3.6. Anfärbung der Tumorzellen	51
3.6.1. Anfärbung des Tumorcyploplasmas	51
3.6.2. Anfärbung der Tumorzellkerne	52

3.7. Anfärbung von Normalgewebe	53
3.8. Auswertung durch den Histoanalyser	54
3.8.1. Intraday Variabilität	55
3.8.2. Interday Variabilität	56
3.8.3. Mittelwerte der Kanäle	57
3.9. Prostacyclinsynthese als Prognosefaktor	
3.9.1. Semiquantitative Auswertung	58
3.9.2. Auswertung der Kanäle des Histoanalyzers	60
3.9.3. Beeinflussung der Kanäle des Histoanalyzers untereinander	62
4. Diskussion	
4.1. Gesamtkollektiv	64
4.2. Patientenkollektiv	65
4.3. Konventionelle Prognosefaktoren	67
4.4. Auswertung	
4.4.1. ABC-Methode	68
4.4.2. Immunreactiver Score	68
4.4.3. Vorkommen der Prostacyclinsynthese in Tumorgewebe	69
4.4.4. Nachweis der Prostacyclinsynthese in gesundem Gewebe	71
4.4.5. Nachweis der Prostacyclinsynthese durch den Histoanalyser	72
4.4.6. Vergleich des IRS mit dem Histoanalyser	74
4.5. Prostacyclinsynthese als möglicher Prognosefaktor	75

Zusammenfassung	76
Literaturverzeichnis	79
Anhang	101
Anhang A	102
Erhebungsbogen für die Mammacarcinomstudie zur Datenerfassung der Patientendaten im Archiv	
Anhang B	109
Katamnestischer Erhebungsbogen für die behandelnden Ärzte	
Anhang C	112
Photographische Aufnahmen	

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mamma-Carcinoms

Das Mammacarcinom ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, die Frauen fast jeder Altersstufe bekommen können.

Allein im Jahr 1998 wurden in Deutschland 178755 Neuerkrankungen an Krebs bei Frauen diagnostiziert. Davon entfallen 25,9% (46295 Fälle) auf das Mammacarcinom. Somit stellt Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar. Wird die Altersverteilung auf Frauen unter 50 Jahre begrenzt, sind 1998 zwar insgesamt nur 25857 Neuerkrankungen von allen Krebsarten aufgetreten, jedoch finden sich in dieser Gruppe sogar 34%, d.h. 8791 Fälle von neu diagnostizierten Mammacarcinome (Robert Koch Institut).

Beim Vergleich der Mortalitätszahlen verschiedener Länder dieser Erde stehen die USA (weiße Bevölkerung) an erster Stelle, wohingegen China und Japan die geringste Mortalität verzeichnen. Das Land an sich ist jedoch nicht nur ausschlaggebend, da japanische Frauen ihr Risiko an Mammacarcinom zu erkranken und zu sterben erhöhen, wenn sie ihr Land verlassen. Ihr persönliches Risiko nähert sich dem des Aufenthaltslandes an. Dies spricht für eine multifaktorielle Ursache.

Zu den bisher bekannten und möglichen Risikofaktoren mit unterschiedlicher Wirkungsstärke zählen das Alter, Leben in einem Industrieland, niedriges Alter bei der Menarche und hohes Menopausenalter, Alter über 30 Jahre bei der ersten Geburt, Nulliparität, familiäre Carcinomfälle, Carcinom der einen Mamma, Übergewicht, hoher Konsum an Fett oder Alkohol (McPher-

son et al. 2000) auch die längere Einnahme von Ovulationshemmern oder die Hormonsubstitution im Klimakterium stehen in der Diskussion.

1.2. NSAID und Mammacarcinom

Aufgrund der hohen Erkrankungszahlen an Mammacarcinom ist es notwendig, zusätzlich zu den Möglichkeiten der Primärtherapie, wie Operation, Chemotherapie, Radiatio und hormonelle Therapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmern neue Medikamente in der Chemoprävention von Krebserkrankungen zu entwickeln.

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) haben in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit im Hinblick auf die Möglichkeit die Entstehung von Krebs zu beeinflussen bekommen, da sie in die Prostaglandinsynthese eingreifen und zunächst in Colonicarcinomzellen erhöhte Prostaglandinwerte festgestellt worden sind.

In Studien wurde nachgewiesen, dass die Einnahme von NSAID, vor allem Aspirin, zu einer geringeren Inzidenz und geringerer Tumorgröße des Colonicarcinoms führt (Thun et al. 1991).

Der Wirkungsmechanismus ist bisher unbekannt, scheint jedoch in Zusammenhang mit der Hemmung der Cyclooxygenase, einem Enzym in der Prostaglandinsynthese, zu stehen (Thun 1996).

Welchen Einfluss NSAID bei Mammacarcinomen haben, da auch bei dieser Krebsart erhöhte Prostaglandinwerte (siehe 1.3.) festgestellt worden sind, wurde in mehreren Studien untersucht.

Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass Celecoxib, ein starker Hemmer der Cyclooxygenase-2, zu geringerer Inzidenz und Tumorgröße

(Harris et al. 2000), Ibuprofen zu reduziertem Tumorwachstum (Robertson et al. 1998), Indomethacin zu verzögerter Tumorentstehung, verlängerter Überlebensrate und weniger Lungenmetastasen (Lala et al. 1997) und Aspirin zu einer Reduktion der Anzahl der Mammatumore führt (Mori et al. 1999).

Anhand von in vitro-Versuchen an humanen Mammazellen konnte durch die Anwendung von Salicylaten eine geringere Tumorgröße des Mammacarcinoms erzielt werden (Sotiriou et al. 1999). Dies wurde auch mithilfe einer Fall-Kontrollstudie gezeigt (Sharpe et al. 2000).

Ein leicht reduziertes Erkrankungsrisiko bei regelmäßigem NSAID-Gebrauch konnte festgestellt werden (Coogan et al. 1999). Bei Untersuchungen der Dosis konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Stärke der Dosierung und reduzierter Inzidenz, geringerer Tumorgröße und weniger positiven Lymphknoten des Mammacarcinoms gezeigt werden (Harris et al. 1996, Schapira et al. 1999, Harris et al. 2003, Terry et al. 2004). Unter den verschiedenen NSAID's zeigte Ibuprofen eine stärkere Wirkung als Aspirin (Harris et al. 1999), hingegen konnte in einer neueren Studie Aspirin als die stärkste Substanz festgestellt werden. Dieser positive Effekt war jedoch nur bei Hormonrezeptor positiven Mammacarcinomen nachgewiesen (Terry et al. 2004).

1.3. Prostaglandine und Mammacarcinom

Schon in früheren Jahren wurden Studien publiziert, welche die Prostaglandinproduktion und die möglichen Auswirkungen bei Mamma-Carcinomen untersuchten.

So konnte festgestellt werden, dass in Mammacarcinomzellen mehr Prostaglandine produziert werden als in gutartigem Brustdrüsengewebe und höhere Prostaglandinwerte bei Tumore mit ossärer Metastasierung oder bei vorhandener Invasivität vorliegen (Bennett et al. 1977).

Kleiner Tumore der Stadien T1/T2 produzieren mehr Prostaglandine als Tumore der Stadien T3/T4. Der Nachweis von hohen Prostaglandinwerten steht in direktem Zusammenhang mit dem Nachweis von malignen Zellen in den Blut- und Lymphgefäßen. Weiterhin zeigen die axillären Lymphknotenmetastasen mehr Prostaglandinproduktion als der dazugehörige Primärtumor. Neben der Invasivität wurde auch der Einfluss des Hormonrezeptorstatus untersucht und festgestellt, dass Hormonrezeptor negative Tumore mehr Prostaglandine produzieren (Rolland et al. 1980).

Wird die Konzentration der Prostaglandine im Primärtumor des Mammacarcinoms in Zusammenhang gesetzt mit den Patientinnen, welche in den ersten drei postoperativen Jahren verstorben sind, zeigte sich ein früheres Versterben bei höheren Prostaglandinwerten (Bennet 1986). Werden jedoch die Überlebenskurven von allen Patienten einbezogen, lässt sich ein ähnlicher Verlauf feststellen und es besteht keine Korrelation zu der Prostaglandinkonzentration im Mammacarcinom. Bennet et al. postulierten das Vorhandensein von zusätzlichen Faktoren und untersuchten den Einfluss des Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Operation. Hierdurch lies sich zwar nicht die aufgefallene Diskrepanz erklären, jedoch zeigte sich eine Korrelation

zwischen dem Menopausenstatus, der 3-Jahresüberlebensrate und der Höhe der Prostaglandinproduktion des Primärtumors. Die zum Zeitpunkt der Operation postmenopausalen Patientinnen haben eine höhere 3-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit je geringer der Nachweis der Prostaglandine war. Prämenopausale Frauen haben dagegen bei höheren Prostaglandinwerten eine bessere 3-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit.

Eine Differenzierung der einzelnen Prostaglandine ist zu dem damaligen Zeitraum noch nicht erfolgt. Festgestellt werden kann jedoch, dass die vermehrte Prostaglandinproduktion der Mammacarcinomzellen mit einer schlechteren Prognose für die Patientinnen korreliert.

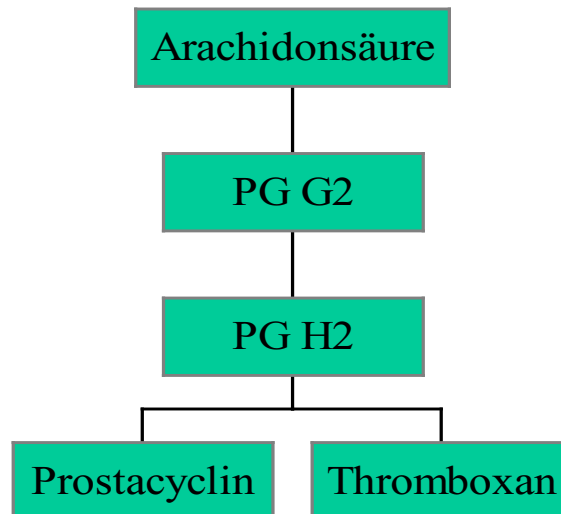
Somit stellt sich die Frage, ob andere Bausteine der Prostaglandinsynthese, wie zum Beispiel die Prostacyclinsynthese auch in Mammacarcinomzellen nachgewiesen werden kann. Weiterhin ist von Interesse, ob der Nachweis der Prostacyclinsynthese Rückschlüsse auf die Prognose des Mammacarcinoms ziehen lässt.

1.4. Prostacyclinsynthese

Aus der Arachidonsäure bildet die Cyclooxygenase, ein weit verbreitetes mikrosomales Enzym, die Endoperoxide PG G₂ und PG H₂.

Die membranständige Prostacyclinsynthese (PGIS) katalysiert die Bildung von Prostacyclin aus dem Prostaglandin Endoperoxid PGH₂ (s. Abb.1, entnommen aus Giertz 1983).

Abb.1: Prostacyclinsynthese



Entdeckt worden ist Prostacyclin erst 1976 (Moncada et al. 1976) als ein instabiles Enzym, welches die Thrombozytenaggregation hemmt. Die chemische Struktur konnte im gleichen Jahr von Whittaker (Whittaker et al. 1976) geklärt werden.

Der erstmalige eindeutige Nachweis der Primärstruktur der Prostacyclinsynthese gelang durch Sequenzierung der DNA viele Jahre später bei Rindern (Pereira et al. 1993, Hara et al. 1994) und bei Menschen (Miyata et al. 1994). Auch das molekulare Klonen der PGIS bei Rindern wurde erfolgreich durchgeführt (Pereira et al. 1994).

Aufgrund der Primärstruktur konnte eine Verwandtschaft zu der Familie der P450- Enzymen festgestellt werden (Nelson et al. 1996).

Im weiteren Verlauf konnte eine Genmutation der Prostacyclinsynthese beim Menschen innerhalb einer Familie (Nakayama et al. 1997) und 5 zusätzliche Veränderungen bei Franzosen kaukasischer Herkunft (Chevalier et al. 2001) nachgewiesen werden. Mögliche Auswirkungen der festgestellten Genmutationen bleiben bisher ungeklärt und benötigen weitere Untersuchungen.

Das Vorkommen der Prostacyclinsynthese wurde zunächst in Endothelzellen von Gefäßen, wie z.B. der Aorta von Rindern (De Witt et al. 1983a) und Ratten (Tone et al. 1997) nachgewiesen, weiterhin in kleinen und großen Gefäßen des menschlichen Gehirns (Siegle et al. 2000) und in der Nabelschnurvene des Menschen (Spisni et al. 1995).

Auch in Glattmuskelzellen, z.B. von Gefäßen gibt es reichlich Prostacyclinsynthese (De Witt et al. 1983b, Tone et al. 1997). Verschiede Organe, wie Magen, Lunge, Herz, Hoden, Leber oder Skelettmuskel enthalten reichlich Prostacyclinsynthese. Geringere Mengen, aber dennoch signifikant konnten in Nieren und Gehirn nachgewiesen werden (Tone et al. 1997). Im Gehirn von Menschen, Rindern und Ratten stellt sich vor allem in den Pyramidalzellen des Cortex und Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellum die PGIS dar (Mehl et al. 1999, Siegle et al. 2000). Zusätzlich ist der Nachweis der Prostacyclinsynthese in Adipozyten und Präadipozyten (Vassaux et al. 1992), Makrophagen des Peritoneum (Kuwamoto et al. 1997) und Fibroblasten des Herzmyocards, des Lungenparenchyms und der Medulla renalis erbracht worden (Tone et al. 1997).

Die genaue Lokalisation der Prostacyclinsynthese in der Zelle wurde als erstes bei der Untersuchung der Rinderaorta als membranständig postuliert (De Witt et al. 1983a). Bei Glattmuskelzellen konnte eine Bindung an die Membran von Zytoplasma und dem Zellkern festgestellt werden (Smith et al. 1983). In Endothelzellen wurde dagegen zunächst ein Zusammenhang mit dem Endoplasmatischen Retikulum vermutet (Smith 1986) und konnte bei weiteren Untersuchungen bestätigt werden (Spisni et al. 2001). Bei neueren Untersuchungen der humanen Prostacyclinsynthese wurde ein Modell entworfen und nachgewiesen, indem sich der größte Anteil der PGIS an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Öffnung des Substratzuganges in der Nähe und gegenüber des ER befindet (Deng et al. 2002, Ruan 2004).

1.5. Prostacyclin

Durch Isomerisierung des Prostaglandins Endoperoxid (PGH₂) katalysiert die Prostacyclinsynthese das instabile Prostacyclin.

Prostacyclin wurde die Ähnlichkeit eines zirkulierenden Hormons zugeschrieben, welches als stärkster natürlicher Inhibitor der Thrombozytenaggregation wirkt und ein starker Vasodilatator durch Beeinflussung der glatten Muskulatur in den Gefäßen ist (Moncada et al. 1976, Whittle et al. 1984). Bei Untersuchungen an Ratten konnte ein grösseres Vorkommen in den Arterien als in den Venen festgestellt werden (Skidgel et al. 1978).

In menschlichen Endothelzellen kann Prostacyclin intrazellulär synthetisiert werden (Marcus et al. 1978) oder mit aus Thrombozyten stammender Prostacyclinsynthese produziert werden (Marcus et al. 1980).

Die Wirkung von Prostacyclin ist Rezeptor-vermittelt durch Stimulierung der Adenylatzyklase und wurde bereits in Thrombozyten (Gorman et al. 1977), in den Myozyten der Aorta und Arteria mesenterica bei Hasen (Oliva et al. 1984) und in den Präadipozyten mit Einfluß auf den Fettstoffwechsel als hyperplastischer Faktor nachgewiesen (Vassaux et al. 1992).

Neben der starken thrombozytenaggregationshemmenden und vasodilatatorischen Wirkung von Prostacyclin wurden in den letzten Jahren viele Untersuchungen durchgeführt und noch weitere Wirkungsweisen festgestellt.

Von besonderem Interesse war die mögliche Beeinflussung von Tumorzellen. Schon 1982 wurde bei Mäusen mit amelanotischen Melanomen eine dosisabhängige Abnahme von Lungenmetastasen nach i.v.-Injektion von Prostacyclin nachgewiesen (Honn et al. 1982).

In neueren Studien wurde nach Implantation von Mammacarcinomzellen in Nagetieren und paralleler oraler Gabe von Cicaprost, einem stabilen Analog von Prostacyclin, weniger Lungen- und Lymphknotenmetastasen gefunden (Schneider et al. 1996). In einer anschließenden Untersuchung wurde den Tieren erst in einem fortgeschrittenen Stadium des Mammacarcinoms Cicaprost gegeben. Hierbei wurde kein Einfluß auf den Primärtumor jedoch eine starke Reduktion der Lungenmetastasen festgestellt (Schirner et al. 1997).

Bei genmanipulierten Mäusen, die eine Überexpression von Prostacyclinsynthase in der Lunge aufwiesen, konnte eine reduzierte Inzidenz und geringere Anzahl von Lungentumoren nachgewiesen werden (Keith et al. 2002).

Somit ergibt sich eine Hemmung der Metastasierung von Mammacarcinomzellen durch Prostacyclin im Tierversuch und Korrelation mit einer guten Prognose.

1.6. Prostacyclin und PPAR

1990 gelang die Entdeckung der peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) durch Issemann et al. Diese Kernrezeptoren gehören zu der Superfamilie der Hormonrezeptoren und werden in die Untertypen α , δ und γ unterteilt. Sie unterscheiden sich erheblich in ihrem Vorkommen in den unterschiedlichen Gewebearten und ihrer Wirkungsweise (Braissant et al. 1998, Vamecq et al. 1999).

In Mammacarcinomzellen konnten bisher alle drei Subtypen nachgewiesen werden (Yee et al. 1999), wobei jedoch PPAR γ das größte Vorkommen aufweist (Kilgore et al. 1997) und dessen Bedeutung bisher in mehreren Studien untersucht worden ist.

Durch Untersuchungen an humanen Mammacarcinomzellen konnte anhand der Aktivierung von PPAR γ die Apoptose der Carcinomzellen (Eltner et al. 1998, Clay et al. 1999, Michael et al. 2003) und die Verhinderung der Zellproliferation nachgewiesen werden (Eltner et al. 1998, Yee et al. 1999, Michael et al. 2003). Zusätzlich führt PPAR γ zu einer besseren Differenzierung und somit zu einer geringeren Malignität des Primärtumors und der Metastasen (Mueller et al. 1998). Der quantitative Nachweis von PPAR γ in humanen Mammacarcinomzellen korreliert mit einer guten Prognose (Badawi et al. 2003, Jiang et al. 2003).

Der peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) δ ist wichtig für die Größenentwicklung von Mäusen, die Myelinisierung des Corpus callosum, die Proliferation der Epidermis (Peters et al. 2000), den Fettmetabolismus (Peters et al. 2000, Barak et al. 2002) und spielt eine Schlüsselrolle in der Basisfunktion der Zellen wie Proliferation, Differenzierung und Überleben

der Zellen (Michalik et al. 2003). Durch die Aktivierung von PPAR δ kommt es zum Wachstum von Mammacarcinomzellen (Stephen et al. 2004).

In neueren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Prostacyclin bei der Aktivierung von PPAR eine nicht ganz unerhebliche Rolle spielt. Die Wirkung auf die Rezeptoren PPAR α und δ konnte als erstes festgestellt werden (Forman et al. 1997). Dann gelang der Nachweis, dass Prostacyclin durch die Aktivierung von PPAR δ die Implantation der Embryonen bei Mäusen ermöglicht (Lim et al. 1999, Barak et al. 2002) und intrazelluläres Prostacyclin zur Apoptose von Zellen führt (Hatae et al. 2001).

Die Überexpression von PPAR δ und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) bei Colon-Carcinomzellen konnte bisher nachgewiesen werden. Beide liegen in direkter Nachbarschaft. Durch COX-2 kommt es zur Bildung von Prostacyclin und somit zur Aktivierung von PPAR δ (Gupta et al. 2000).

Wird die direkte und dosisabhängige Supprimierung von PPAR δ durch die Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika durchgeführt, kann die Apoptose der Tumorzellen beim Colocarcinom hervorgerufen werden (He et al. 1999).

Hierdurch ergeben sich Hinweise, dass die Prostacyclinsynthese und somit ihr Produkt Prostacyclin bei Colocarcinom eine eher negative Auswirkung haben könnte. An Mammacarcinomzellen wurde bisher die direkte Wirkung von Prostacyclin nicht untersucht. Jedoch kann durch den Nachweis der Aktivierung von PPAR δ durch Prostacyclin (Forman et al. 1997) und dem Untersuchungsergebnis, dass es durch die Aktivierung von PPAR δ zum Wachstum von Mammacarcinomzellen kommt (Stephen et al. 2004), auch bei Mammacarcinomzellen von einer negativen Wirkung des Prostacyclins ausgegangen werden.

1.7. Prognosefaktoren des Mammacarcinoms

Nach der Diagnosestellung eines Mammacarcinoms ist es notwendig für jede Patientin eine individuelle Therapie festlegen zu können, welche ein Maximum an Nutzen, Lebensqualität und ein Minimum an Belastung, Einschränkung und operativem Eingriff für die Patientin bedeutet.

Hierfür ist es notwendig verlässliche Prognosefaktoren zu haben, die bei der Auswahl der Therapie richtungsweisend sind und Aussagen über die Überlebenschance der Patientin geben können.

Anhand der bisher international publizierten Studien wurde eine Einteilung der Tumormarker nach ihrer klinischen Einsatzmöglichkeit („level of evidence“) und klinischem Nutzen („Utility score, US“) durchgeführt (AGO-Gravenbruch-Konsens 2004) und somit wichtige Prognosefaktoren, die bei jeder Erkrankung bestimmt werden sollten, aufgelistet:

1. TNM
 - TumorgroÙe
 - axillärer Lymphknotenbefall
 - Fernmetastasierung
2. histologischer Typ
3. Grading
4. Hormonrezeptoren
 - Östrogenrezeptor
 - Progesteronrezeptor

In den letzten Jahren wurden viele Studien veröffentlicht, deren Ziel die Ermittlung neuer zellkinetischer und tumorbiologischer Prognosefaktoren des Mammacarcinoms ist. Hierzu zählen Cathepsin D, EGF-Rezeptoren, c-erb

B2, p53 und S-Phase / Ploidie. Die bisherigen Ergebnisse der Studien reichen noch nicht aus, um daraus klinische Konsequenzen zu ziehen. Der einzige neuere tumorbiologische Prognosefaktor, der klinisch Einsatz finden sollte ist laut den AGO-Richtlinien der Proteolysefaktor uPA / PAI-1 im Primärtumorgewebe bei nodal-negativen Frauen.

1.8. Ziel der Arbeit

Die Rolle der Prostacyclinsynthese und deren Produkt Prostacyclin bei humanem Mammacarcinom ist vollkommen unbekannt. Es soll daher untersucht werden:

- I. In welcher Häufigkeit und Verteilung die Prostacyclinsynthese im Mammacarcinom vorkommt.
- II. Kann die Prostacyclinsynthese in gesundem Gewebe nachgewiesen werden?
- III. Inwieweit eine quantitative Auswertung ihres Vorkommens einer rein qualitativen oder semiquantitativen überlegen ist.
- IV. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Prostacyclinsynthese und der Prognose der Erkrankung?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die Untersuchung umfasst ein Kollektiv von Mammacarcinompatienten. Hauptauswahlkriterium für die Aufnahme in das Patientenkollektiv war das Vorliegen eines primären Mammacarcinoms mit histologischer Sicherung der Diagnose und eine vollständige pathologisch-anatomische Aufarbeitung des Materials.

Alle mesenchymalen Tumore der Mamma wurden ausgeschlossen. Weiterhin wurden duktale oder lobuläre Carcinomata in situ (DCIS und CLIS) oder metastatische Tumore in der Mamma nicht berücksichtigt. Die genaue Zahl der in den Jahren 1986 - 1988 operierten primären Mammacarcinome kann nicht mehr sicher beziffert werden, die ungefähre Zahl der in diesem Zeitraum am Pathologischen Institut untersuchten Präparate kann auf 600-700 geschätzt werden. Nach Zufallskriterien erfolgte eine Auswahl der letztlich erfassten Fälle $n= 259$.

In früheren Promotionen von T. Kierschke (1999), J. Wachholz (2000) und M. Weißert (2000) wurden anhand der pathologischen Berichte der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses 259 Patientinnen herausgesucht, die in den Jahren 1986 - 1988 an einem Mamma-Carcinom im Robert-Bosch-Krankenhaus oder Marienhospital in Stuttgart operiert worden sind.

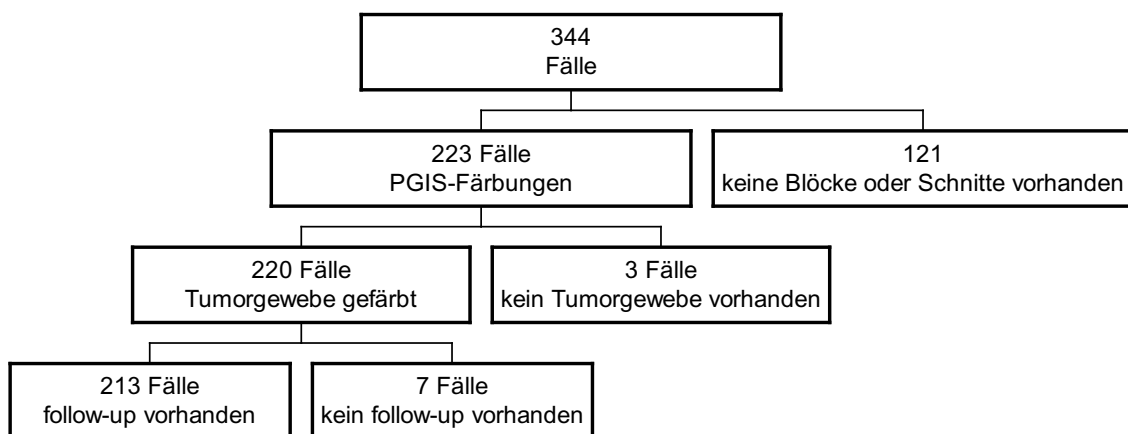
Dabei wurde mit Hilfe eines speziellen Erhebungsbogens aus den Krankenakten der betreffenden Krankenhäusern die wichtigsten persönlichen und klinischen Daten der Patientinnen ermittelt (s. Anhang A). Konnten nicht die vollständigen Daten ermittelt werden, wurde ein katamnestischer Erhebungsbogen an die betreuenden Ärztinnen und Ärzte versandt (s. Anhang B).

Zusätzlich wurden von J. Opalinska (Promotion bisher noch nicht veröffentlicht) zur Aufstockung des Patientenkollektivs auf n=344 noch weitere 85 Mammacarcinomfälle der Jahre 1993 - 1997 hinzugefügt. Das mittlere follow-up beträgt 67,39 Monate mit einer Standardabweichung von 43,25 Monaten.

Von den 344 Fällen konnten 223 nur bearbeitet werden, da bei 121 Patientinnen keine Paraffinblöcke mit Tumorgewebe mehr verfügbar waren. Somit wurden 223 immunhistochemische Färbungen angefertigt. Nach mikroskopischer Durchsicht mussten weitere 3 Fälle herausgenommen werden, da kein Tumorgewebe nachweisbar war. Daher konnte bei 220 Patientinnen die Prostacyclinsynthese ausgewertet werden (s. Abb. 1).

Bei 213 Fällen lag ein „follow-up“ vor, während bei 7 Fällen eine komplette Datenerfassung nicht zu erreichen war.

Abb. 1: Blockdiagramm des untersuchten Patientenkollektivs



2.2. Histologische Bearbeitung

In der Regel waren von jeder Patientin mehrere Paraffinblöcke vorhanden. Um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen, wurden zunächst die HE-Schnitte der jeweiligen Paraffinblöcke unter dem Mikroskop angesehen. So konnten die Paraffinblöcke, die viel Tumorgewebe enthielten und in qualitativ gutem Zustand waren, ausgewählt werden. Alle Präparate wurden in 3 µm mit einem Leica RM2055-Mikrotom geschnitten und im Anschluss auf ChemaMate-Objektträger (Fa. DAKO BioTek Solutions, USA) aufgezogen. Zunächst wurden die hergestellten Präparate 24 Stunden in einem Wärmeschrank mit +56°C getrocknet und anschließend in einem Kühllabor bei +8°C aufbewahrt. Weiterhin standen die ursprünglichen histologischen Schnittpräparate zur Verfügung sowie der ursprünglich histologische Befund.

2.3. Histologische Befundung

Anhand der pathologischen Berichte der Krankenakten von den jeweiligen Krankenhäusern wurde die histologische Befundung der einzelnen Mammacarcinome übernommen. Gemäß der international gültigen WHO-Klassifikation der Mammacarcinome (1981) war eine Einteilung in invasiv-dukta, invasiv-lobulär und verschiedene Sonderformen erfolgt. Zu den Sonderformen gehören medulläre, muzinöse, inflammatorische Carcinome und Comedo-Subtypen. Wegen der geringen Zahlen der einzelnen Sonderformen erfolgte keine gesonderte Analyse dieser Subgruppe. Das Grading der Mammacarcinome erfolgte nach dem verkürzten WHO-Schema, wobei Grading 3 und 4 zusammengefasst wurden.

2.4. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach der Avidin-Biotin-Methode von Hsu et al. (1981).

Das Prinzip der Färbung besteht aus der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin zu binden.

Die Methode setzt sich aus 3 Schritten zusammen.

Zunächst erfolgt die Inkubation des histologischen Schnittes mit dem Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen, in dieser Arbeit die Prostacyclin-Synthase, gerichtet ist. Der Primärantikörper wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Klein, Byk-Gulden zur Verfügung gestellt und in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Als nächstes wird ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper, der den Primärantikörper bindet, hinzugegeben. Der letzte Schritt besteht in dem Hinzufügen von einem mit Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex. Dieser bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers.

Anschließend erfolgt die Färbung mit DAB und H₂O₂, um die Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplexes sichtbar zu machen. Als positives Ergebnis gilt eine Braunfärbung. Zum besseren Erkennen der einzelnen Zellen wird mit Hämalun gegengefärbt.

In dieser Arbeit wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst erfolgte die Entparaffinisierung der Schnitte mit Microclear für 30 Minuten, um sie dann für je 5 Minuten mit einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96 und 70% EtOH) in eine wässrige Phase zu überführen. Anschließend wurden die Präparate zur Suppression der endogenen Peroxidase für 30 Minuten in H₂O₂ /Methanol gelegt und danach mit Spülpuffer der Firma DAKO gespült.

Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte für 3x5 Minuten in Citratpuffer bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht.

Die nun folgende immunhistochemische Färbung, einschließlich der Färbung mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalaun wurde mit dem DAKO TechMate 500/1000TM Gerät (Fa.Dako) hergestellt.

Die Präparate wurden danach in eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 96 und 100% EtOH) für je 5 Minuten gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Microclear für 10 Minuten, bevor die Präparate mit Gurr eingedeckt wurden.

Um die angewandte Färbemethode zu kontrollieren und zu beurteilen, wurden Auslasskontrollen des Primärantikörpers, Sekundärantikörpers und des Avidin-Biotin-Komplexes durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Positivkontrolle an Lungengewebe und eine Nonsensekontrolle :

- A1: ohne Primärantikörper
- A2: ohne Sekundärantikörper
- A3: ohne ABC-Komplex
- A4: ohne A1 + A2
- A5: ohne A1 + A2 + A3
- A6: Positivkontrolle an Lungengewebe
- A7: Negativkontrolle
- A8: Nonsensekontrolle

2.5. Semiquantitative Auswertung

Insgesamt wurden von 223 Präparaten immunhistochemische Färbungen hergestellt. Anschließend wurden alle Schnitte bei einer 40-fachen Vergrößerung sorgsamst durchgesehen. Dabei wurden wegen fehlendem Nachweis von Tumorzellen 3 Präparate ausgeschlossen. Zu Erkennen war die Prostacyclinsynthese an der bräunlichen Färbung.

Von zwei verschiedenen Untersuchern wurde unabhängig voneinander die Auswertung vorgenommen. Bewertet wurden die Intensität und die Menge der Färbung, zunächst nur von den Tumorzellen.

Die Intensität der Färbung wurde folgendermaßen eingeteilt:

0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	deutliche Färbung
3	starke Färbung

Die Menge der Färbung wurde prozentual nach folgender Einteilung vorgenommen:

0	keine Färbung
1	1 – 20%
2	21 – 40%
3	41 – 70%
4	71 – 100%

Durch Multiplizierung von Intensität und Menge konnte für jedes Präparat der immunreaktive Score-Index IRS ausgerechnet werden. Die möglichen Werte des immunreaktiven Scores betragen: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12.

Zusätzlich wurde von Untersucher 2 die Färbung der Tumorzellkerne und der gesunden Zellen wie Gefäße, Fibroblasten, Plasmazellen und Entzündungszellen ausgewertet. Eine Einteilung nach 0 = keine Färbung und 1 = Färbung

vorhanden, wurde vorgenommen. Die Intensität und die Menge fand dabei keine Berücksichtigung.

Folgende Untersucher haben dabei die immunhistochemischen Schnittauswertungen (unter nochmaliger Kontrolle eines Arztes für Pathologie) vorgenommen:

1. erfahrener Auswerter
2. Doktorand (nach kurzer Einarbeitung)
3. Doktorand (bei Wiederholung der Auswertung)

Bei dem ersten Vergleich der Immunreaktiven Scores des erfahreneren Untersuchers 1 mit den Werten des anfangs unerfahreneren Untersuchers 2, stellte sich heraus, dass bei 124 Präparaten eine Differenz des IRS von mehr als 2 vorhanden war. Daher erfolgte von Untersucher 2 eine zweite Auswertung dieser 124 Präparate. Hierbei hatte der Untersucher 2 weder Kenntnis von seiner eigenen früheren Auswertung noch von dem Ergebnis des immunreaktiven Scores von Untersucher 1. Diese zweite Beurteilung wurde für die weitere Auswertung der Arbeit herangezogen.

2.6. Histoanalyser

Zur Feststellung, ob eine objektive Messung der immunhistochemischen Färbung möglich ist, wurden alle 220 Präparate mit dem Histoanalyser (Fritz et al. 1992, 1995) ausgewertet. Berechnet wurde die optische Dichte der bräunlichen Färbung der Tumorzellen. Die Ergebnisse liegen als MOD= mean optical density im Blau-, Rot- und Grün-Kanal vor. Hierbei wird zum Beispiel

im Blaukanal die Farbe Blau zum größten Teil bei der Berechnung nicht berücksichtigt, so dass die bräunliche Färbung verstärkt gemessen werden kann. Ein äquivalentes Verfahren stellt sich beim Grün- und Rotkanal dar.

Der Histoanalyser stellt ein Bildanalysesystem dar, welches vom Institut für Physikalische Elektronik der Universität Stuttgart in Kooperation mit dem Pathologischen Institut des Robert-Bosch-Krankenhauses entwickelt wurde (Fritz et al. 1995, Fritz et al. 1996, Backmann et al. 1998, Siegle et al. 1998, Fritz et al. 1999, Fromm et al. 2000).

Zur Durchführung der quantitativen Messung wurden die Präparate unter einem Mikroskop (Leitz Aristoplan, Fa. Leica) vergrößert, welches mit einer TV-Farbkamera (3-Chip CCD-Kamera, bez. KYF30) direkt verbunden ist. Mittels eines RGB-Ausganges werden die rot/grün/blau-Videosignale von der TV-Farbkamera an ein Bildeinzugssystem (bez. TC/PIP, Fa. RasterOps) weitergegeben und im Computer (SPARC-IPC-Workstation, Fa. SUN Microsystems) gespeichert. Berechnet wurden die Messwerte IOD entsprechend der integrierten optischen Dichte und der $MOD = IOD / \text{Fläche}$.

Vor Beginn der Messung wurde zunächst ein Weißausgleich durchgeführt. Damit wird die Extinktion des Leerwertes bei der Berechnung der optischen Dichte abgezogen. Anschließend wurde eine Initialisierung durchgeführt, wodurch die Farbkanäle rot, blau und grün in jeweils 255 Graustufen vorlagen.

Alle Messungen wurden nach folgendem Schema standardisiert vorgenommen:

Zunächst wurde das gesamte Präparat durchgemustert. Die am stärksten gefärbte Stelle des Tumors wurde markiert und ausgemessen. Anschließend wurde das Präparat um 1-2 Gesichtsfelder verschoben und an 4 verschiede-

nen zufällig ausgewählten Stellen gemessen. Somit wurden 219 Präparate 5 x gemessen. Bei einem Präparat konnten wegen zu geringer Tumorzellzahl nur 3 Messungen vorgenommen werden. Alle Messpunkte wurden markiert, um eine spätere Überprüfung und Reproduzierbarkeit möglich zu machen.

2.7. Statistik und Datenerhebung

Alle erfassten Patientendaten, die Daten der semiquantitativen Beurteilung und die Ergebnisse des Histoanalyzers wurden mit dem Statistikprogramm „SPSS für Win95 V7.5“ ausgewertet.

Folgende statistische Verfahren sind zur Anwendung gekommen:

1. t-Test
2. chi2 – Test (Fisher´s Exact Test, Pearson Chi-Square)
3. Kaplan-Meier Statistik mit univarianter Analyse
4. Cox Regressionsanalyse
5. Kappa Statistik
6. Coefficient of variation

Die MOD-Werte des Blau-, Rot- und Grünkanals des Histoanalyzers wurden auf Normalverteilung durch Histogramm und Kolmogorow-Smirnow Test geprüft.

Das Testergebnis der durchgeführten Tests wurde als statistisch signifikant bezeichnet, wenn ein $p < 0,05$ vorlag.

Die errechneten Kaplan-Meier Kurven (s. Abb. 4, 5, 6, 7, 11 und 12) wurden in das Microsoft Programm Power Point umgewandelt und in die Arbeit eingefügt.

Alle Testreihen wurden für die Auswerterin A vom Institut für Biomathematik der Universität Tübingen (Herrn Prof. Meisner, Frau Dr. Engel) durchgerechnet. Da sich die Zahlen der Auswertung in den Fallzahlen geringfügig unterscheiden, ergeben sich geringfügige Abweichungen in beiden Analysen, die klinisch völlig unbedeutend sind.

2.8. Materialien

Für die immunhistochemische Färbung wurde der Primärantikörper als spezifisches IgG vom Kaninchen von Dr. Thomas Klein, Byk-Gulden zur Verfügung gestellt und in aufgereinigter Form von der Firma Bio Trend verwendet.

Die am DAKO-TechMate durchgeführten Färbungen wurden mit folgenden Chemikalien und Eichlösungen der Fa. Dako (nach Protokoll) vorgenommen:

- Peroxidase-Blockierungslösung
- Proteinase K
- Proteinase K-Verdünnungsmedium
- Puffer für Mikrowellenvorbehandlung
- Pufferkit
- Sekundärantikörper, multilink (rabbit und goat)

Zur Entparaffinisierung wurden Microclear Fa. Vogel, Wasserstoffperoxid Fa. Merck, Ethanol 100,96 und 70%ig und Methanol (im Hause destilliert) benutzt.

2.9. Photographische Techniken

Die Photographien wurden mit einem Leica DMRB Mikroskop bei 40facher Vergrößerung hergestellt. Die Bilder wurden mit einer Sony DCC Kamera aufgenommen, durch ein Bilderfassungssystem namens Diskus erfasst und ausgedruckt.

Sämtliche Aufnahmen sind im Anhang C dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

3.1.1. Gesamtstudienkollektiv

Aus den Jahren 1986 - 1988 und 1993 - 1997 wurden ursprünglich 344 Patienten, die an Mammacarcinom erkrankt sind, nach Zufallskriterien aus dem gesamten Patientenpool des pathologischen Institutes des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart ausgewählt. Von den 344 Patienten blieben aus verschiedenen Gründen (s. Abb. 1) letztendlich 213 Schnitte zur immunhistochemischen Färbung der Prostacyclinsynthase übrig. Es stellt sich nun die Frage, ob zwischen den 131 ausgeschlossenen und den 213 ausgewerteten Fällen ein grundlegender Unterschied vorliegt und somit ein Bias für die untersuchten Mammacarcinome ausgeschlossen werden kann.

Um diese Frage zu klären wurden die kategorischen Daten der erfassten Patienten mit dem Fisher's Exact Test oder Pearson Chi-Square Test (siehe Tab. 1) und die numerischen Daten mit Hilfe des t – Testes (siehe Tab. 4) verglichen.

3.1.2. Vergleich der kategorischen Daten des Gesamtkollektivs

Beim Vergleich der kategorischen Daten (siehe Tab. 1) konnten im Falle des Lymphknotenbefalls und der Bestrahlung signifikante Unterschiede zwischen den in die Studie eingeschlossenen mit den ausgeschlossenen Patienten nachgewiesen werden.

Tab. 1: Auflistung der kategorischen Daten

Charakteristikum	included	excluded	P
Histologie	213	130	0,379
Tumorgröße TNM	209	130	0,215
pT1 gegen pT2-4	209	130	0,138
pT1-2 gegen pT3-4	204	125	0,431
Stadium nach WHO	204	125	0,194
Lymphknotenbefall			
pN	210	128	0,026
pN0 gegen pN1 – 3	210	128	0,309
Metastasenstatus	208	125	0,455
Grading	209	129	0,740
- G1-G2 gegen G3	209	129	1,000
Östrogenrezeptoren	203	123	0,482
Progesteronrezeptoren	203	120	0,641
Menopausenstatus	145	102	0,479
Todesursachen			
- gestorben gegen lebend	213	52	0,326
Chemotherapie			
- CMF gegen kein CMF	213	91	0,674
- Antracyclinhaltige Chemotherapien gegen nichtantracyclinhaltige	213	91	0,217
Tamoxifen	213	131	0,219
Radiatio	213	76	0,017

Bei dem kategorischen Kriterium des Lymphknotenbefalls zeigt sich beim Vergleich der 210 eingeschlossenen mit den 128 ausgeschlossenen Patienten (s. Tab. 1) ein signifikanter Unterschied.

Werden jedoch der positive Lymphknotenbefall pN1-3 zusammengefasst, geht im Vergleich zu pN0 die Signifikanz verloren. Bei der Betrachtung der statistisch zu erwartenden Fälle mit den tatsächlich ein- bzw. ausgeschlossenen Patienten (siehe Tab. 2) fällt auf, dass ein besonders großer Anteil von Tumoren mit negativem Lymphknotenbefall ausgeschlossen wurde und dafür mehr Tumore mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen in die Studie aufgenommen worden sind.

Es liegt also kein Bias in der Studie vor, der die Annahme rechtfertigen könnte, dass in die Studie nur besonders leichte Fälle aufgenommen worden waren. Die Mehrzahl der Parameter sind zwischen den in der Studie ein- und ausgeschlossenen Patienten nicht verschieden.

Tab. 2: Lymphknotenbefall der Studienpatienten

	Studienpatienten	
	eingeschlossen	ausgeschlossen
pN0		
ausgewertet	41,4 %	47,7 %
statistisch erwartet	43 %	43,7 %
pN 1-3		
ausgewertet	58,6 %	52,3 %
statistisch erwartet	56,2 %	56,2 %

Ein zweiter signifikanter Unterschied zwischen den eingeschlossenen und den ausgeschlossenen Patienten der Studie, konnte im Bezug auf die adjuvante oder palliative Radiatio festgestellt werden (s. Tab. 1).

Werden die statistisch zu erwartenden Fälle berechnet, stellt sich heraus, dass mehr Patienten, die eine Radiatio erhalten haben in der Studie enthalten sind (s. Tab. 3). Somit wurden mehr Patienten, die keine Radiatio erhalten hatten in der Studie ausgeschlossen als statistisch erwartet.

Tab. 3: Radiatio des Patientenkollektivs

	Studienpatienten	
	eingeschlossen	ausgeschlossen
Radiatio durchgeführt		
ausgewertet	56,8 %	40,8 %
statistisch erwartet	52,6 %	52,6 %
Radiatio nicht durchgeführt		
ausgewertet	43,2 %	57,9 %
statistisch erwartet	47,0 %	47,1 %

3.1.3. Vergleich der numerischen Daten des Gesamtkollektivs

Beim Vergleich der numerischen Daten (s. Tab. 4) stellt sich kein signifikanter Unterschied heraus. Somit haben die in der Studie ausgewerteten Patienten kein Bias im Hinblick auf das Alter, Anzahl der Lymphknoten und Zeitraum bis zum Rezidiv oder Tod.

Tab. 4: Auflistung der numerischen Daten

Charakteristikum	included	excluded	P
Alter bei Diagnosestellung	55,7	57,8	0,1
Zahl der befallenen Lymphknoten	0,9	0,8	0,2
Zeitraum in Monaten bis zum			
- Rezidiv	32,1	22,2	0,2
- Tod oder Ausscheiden	66,3	59,9	0,3

3.1.4. Patientenkollektiv der Studie

In die Studie aufgenommen worden sind 213 Patienten. Das Durchschnittsalter liegt bei 55,7 Jahren mit einer Standardabweichung von 11,9 Jahren. Hierbei liegt eine Spannweite von 26 bis 86 Jahren vor. Einen postmenopausalen Status bei Diagnosestellung wiesen die Hälfte der Patienten auf, bei 1/3 war es nicht möglich den Menopausenstatus zu ermitteln (s. Tab. 5).

Der Hormonrezeptorstatus zeigt sowohl für den Östrogenrezeptor als auch für den Progesteronrezeptor bei über 50% der Patienten ein positives Ergebnis. Als adjuvante Therapie erhielten 40% der Patienten eine Chemotherapie und ebenfalls 40% eine Radiotherapie. Tamoxifen als adjuvante Hormontherapie bekamen 30% verabreicht.

In der palliativen Situation wurden 20% der Patienten einer Chemotherapie zugeführt und weitere 40% bestrahlt. Nur 3% erhielten eine Hormontherapie. Im Verlauf der Erkrankung konnte bei 20% ein Lokalrezidiv nachgewiesen werden. 72 Patienten zeigten eine Fernmetastasierung, wobei die ossäre und viscerale Form mit 38 bzw. 33 Patienten gleich häufig auftraten.

Am diagnostizierten Mammacarcinom verstorben sind 30%, andere Todesursachen oder unbekannt liegen bei 5%, während bei Ende des follow-up's 65% am Leben waren.

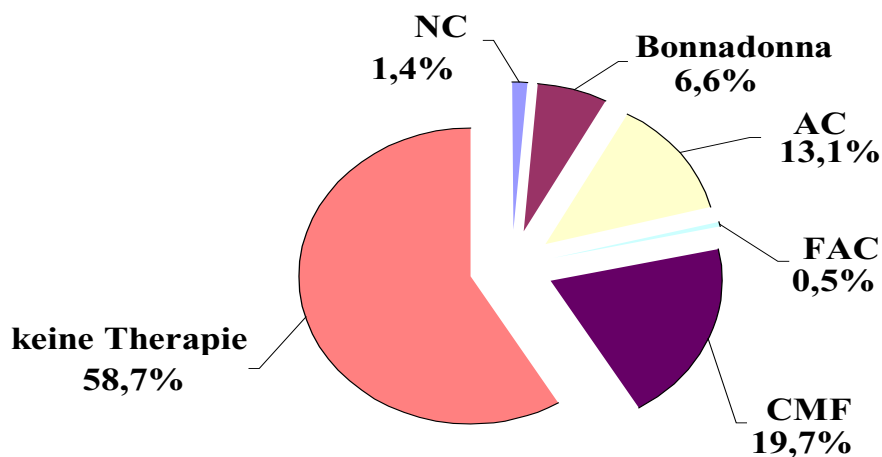
Tab. 5: Charakteristika des Patientenkollektivs

Charakteristikum		N = 213	Prozent
Menopausen- Status	praemenopausal	40	18,8 %
	postmenopausal	105	49,3 %
	unbekannt	68	31,9 %
Östrogen- Rezeptorstatus	positiv	122	57,3 %
	negativ	81	38,0 %
	unbekannt	10	4,7 %
Progesteron- Rezeptorstatus	positiv	120	56,3 %
	negativ	83	39,0 %
	unbekannt	10	4,7 %
Hormontherapie	adjuvant		
	- ja	62	29,1 %
	- nein	151	70,9 %
	palliativ		
- ja	7	3,3 %	
- nein	206	96,7 %	
Chemotherapie	adjuvant		
	- ja	88	41,3 %
	- nein	125	58,7 %
	palliativ		
- ja	45	21,1 %	
- nein	138	64,8 %	
Radiationstherapie	adjuvant		
	- ja	84	39,4 %
	- nein	127	59,6 %
	- unbekannt	2	0,9 %
	palliativ		
	- ja	53	24,9 %
- nein	148	69,5 %	
- unbekannt	12	5,6 %	
Lokalrezidive	ja	45	21,1 %
	nein	167	78,4 %
	unbekannt	1	0,5 %
Fernmetastasierung	visceral	38	17,8 %
	ossär	33	15,5 %
	ZNS	1	0,5 %
	keine	137	64,3 %
	unbekannt	4	1,9 %
Todesursache	durch Mammacarcinom	64	30,0 %
	andere Ursache	11	5,2 %
	lebt	138	64,8 %

Häufigkeitsverteilung der verschiedenen adjuvanten Chemotherapien

Insgesamt 41,3% aller Patienten wurden einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt. Davon erhielten fast 20% der Patienten CMF als adjuvante Chemotherapie, weiteren 21,6% wurde ein antracyclinhaltiges Schema gegeben. Der überwiegende Teil mit 58,7% bekam jedoch keine Chemotherapie.

Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der adjuvanten Chemotherapien



Erläuterung:

NC: Mitoxantron / Cyclophosphamid

AC: Adriamycin / Cyclophosphamid

FAC: 5- Fluorouracil / Adriamycin / Cyclophosphamid

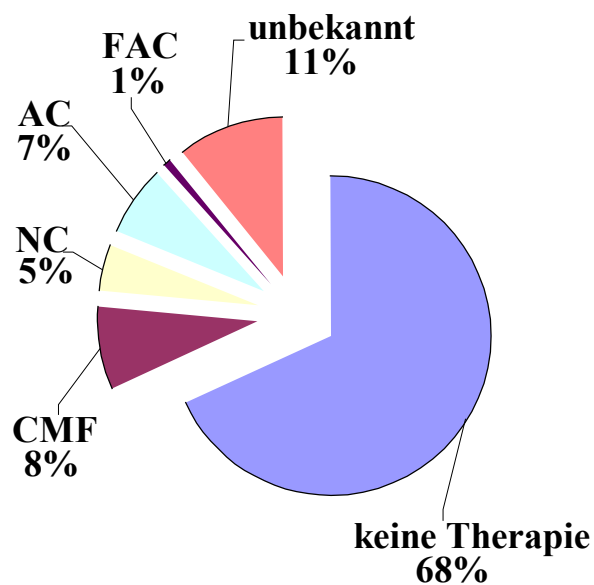
CMF: Cyclophosphamid / Methotrexat / 5-Fluorouracil

Bonnadonna: Kombination aus 8 x CMF und 4 x AC

Häufigkeitsverteilung der verschiedenen palliativen Chemotherapien

Von den 21,1% palliativen Chemotherapien entfallen 13% auf ein antracyclinhaltiges Schema und weitere 8% auf CMF. Bei dem überwiegenden Teil (68%) der Patienten wurde eine palliativen Chemotherapie nicht durchgeführt.

Abb. 3: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen palliativen Chemotherapien



Erläuterung:

NC: Mitoxantron / Cyclophosphamid

AC: Adriamycin / Cyclophosphamid

FAC: 5-Flourouracil / Adriamycin / Cyclophosphamid

CMF: Cyclophosphamid / Methotrexat / 5-Flourouracil

3.1.5. Konventionelle Prognosefaktoren

Zur Feststellung ob es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv um ein durchschnittliches Patientengut handelt, wurden die konventionellen Prognosefaktoren herangezogen und mit Hilfe des log-rank Testes auf ihre Signifikanz ($p < 0,05$) überprüft (s. Tab. 6).

Tab. 6: konventionelle Prognosefaktoren

Prognosefaktor	Signifikanz	Log rank
Stadium	0,0000	48,59
pN	0,0000	34,43
Stadium 1-2 / 3-4	0,0000	24,39
pN0 – pN1-3	0,0001	16,31
pT	0,0010	16,36
Östrogenrezeptor	0,0028	8,9
pT1 – pT2-4	0,0036	8,49
G1 – G2-3	0,0140	0,014
Grading	0,0188	7,95
Alter median	0,0302	4,70
Progesteronrezeptor	0,0355	4,42
Histologie	0,3006 n.s.	1,05
Menopause	0,8410 n.s.	0,04

n.s.: nicht signifikant

Somit konnte gezeigt werden, dass die meisten konventionellen Prognosefaktoren bis auf die Histologie und den Menopausenstatus signifikant sind.

Da jedoch die einzelnen Prognosefaktoren sich auch gegenseitig beeinflussen und nicht voneinander unabhängig sind, erfolgte eine zweite Auswertung mit dem COX Hazard Modell. Hiermit kann gezeigt werden, dass sowohl die Stadiumeinteilung nach WHO, als auch Tumorgröße, Lymphknotenbefall und der Östrogenrezeptorstatus ein signifikantes Ergebnis zeigen (s. Tab. 7).

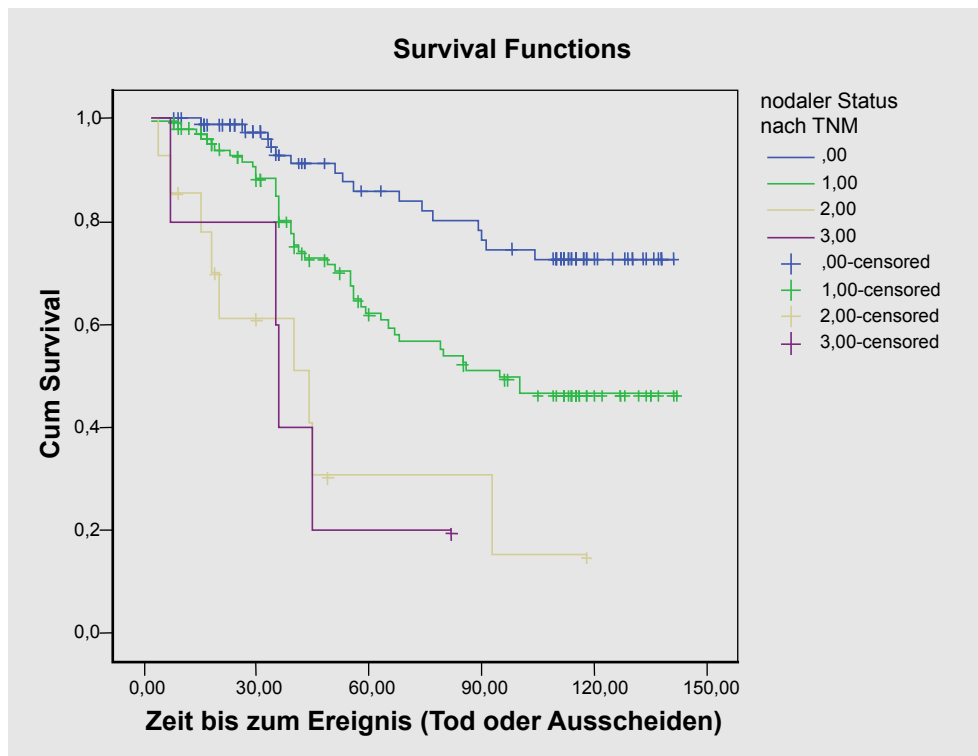
Tab. 7: Signifikanzprüfung nach dem COX Hazard Modell

Prognosefaktor	Signifikanz
PN0 – pN1-3	0,0003
Östrogenrezeptor	0,0014
Stadium	0,0017
PT1 / pT1-3	0,0300

3.1.6. Kaplan-Meier-Statistik für die Stadieneinteilung

Erfolgt die Unterteilung der Patienten (N = 210) nach dem Lymphknotenbefall gemäß den TNM-Stadien, finden sich die meisten Fälle mit N= 104 bei pN1, gefolgt von pN0 mit 87 Fällen. Nur 14 Patienten gehören zu pN2 und bei pN3 finden sich nur noch 5 Fälle. Der Nodalstatus lässt sich als ein hoch signifikanter Prognosefaktor mit $p < 0,00001$ darstellen. Patientinnen mit einem negativen Lymphknotenstatus haben die höchste 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 86 % und 72 % nach 10 Jahren (s. Abb. 4). Dies sinkt signifikant mit zunehmendem Lymphknotenbefall. Bei pN= 1 haben die Patienten nach 5 Jahren die Wahrscheinlichkeit von 62 % (46 %), bei pN= 2 nur noch 30 % (15 %) zu überleben. Alle 5 Patienten, welche zu pN=3 gehören sind nach 82 Monaten verstorben, so dass die 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei nur 20% liegt.

Abb. 4: Kaplan-Meier-Statistik des nodalen Status nach den TNM–Stadien
 $p < 0,0001$

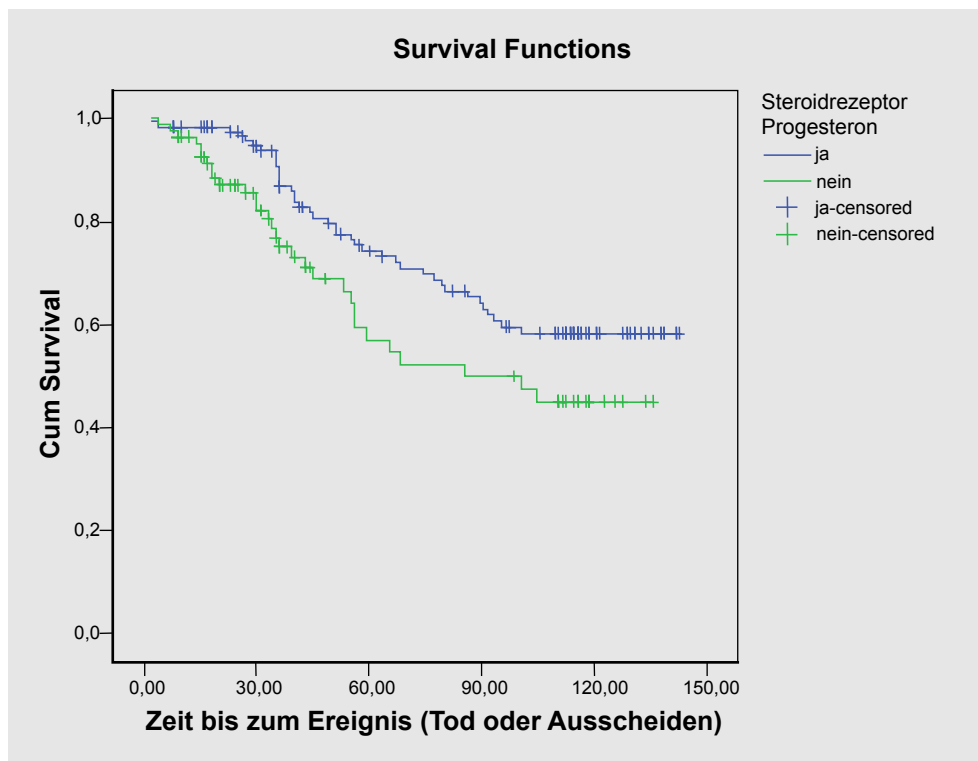


3.1.7. Kaplan-Meier-Statistik für die Hormonrezeptoren

Bei 203 Patienten war es möglich den Progesteronrezeptorstatus zu ermitteln, wobei 120 einen positiven Status aufwiesen. Der positive Nachweis des Progesteronrezeptor ist als signifikanter positiver Prognosefaktor zu sehen (s. Abb. 5), da die Überlebenswahrscheinlichkeit bei positivem Nachweis nach 5 Jahren bei 74 % (58 %) und im Gegensatz zu einem negativem Status nur bei 56 % (44 %) liegt.

Abb. 5: Kaplan-Meier-Statistik für den Progesteronrezeptor

p= 0,03

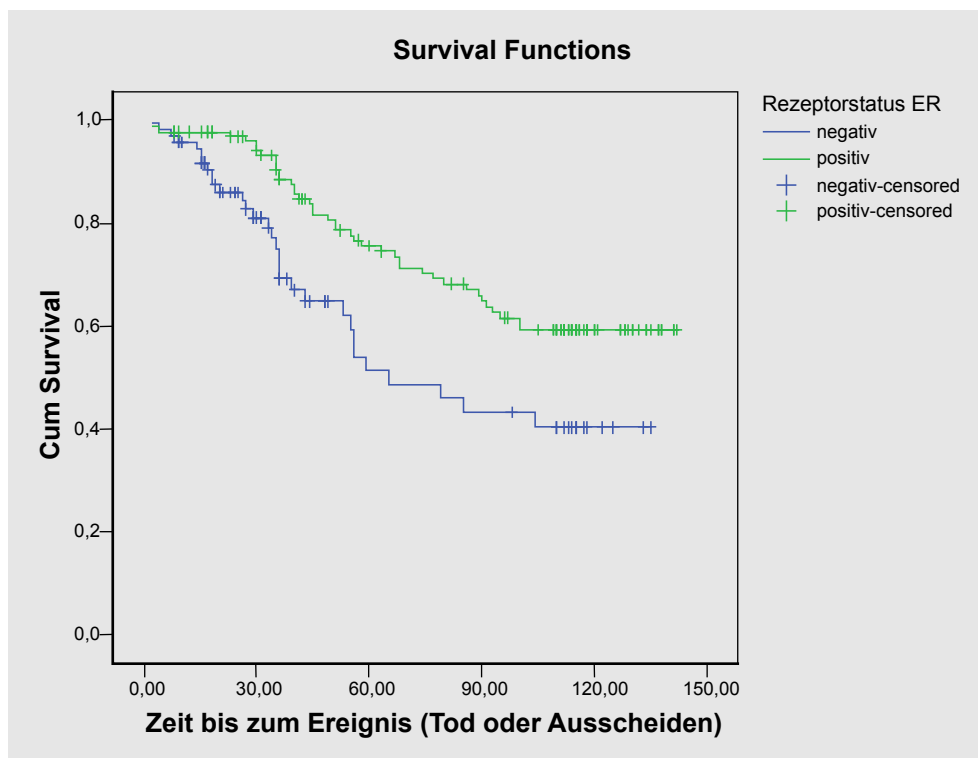


Der Nachweis des Östrogenrezeptorstatus gelang bei 203 Patienten. Einen positiven Status zeigten hiervon 122 Fälle. Auch der positive Nachweis des Östrogenrezeptorstatus ist als positiver Prognosefaktor mit einem p= 0,003

zu sehen (s. Abb. 6). Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei einem positiven Östrogenrezeptorstatus liegt bei 77 % (59%). Bei negativem Rezeptorstatus sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren auf 51 % (40 %).

Abb. 6: Kaplan-Meier-Statistik für den Östrogenrezeptor

$p = 0,003$

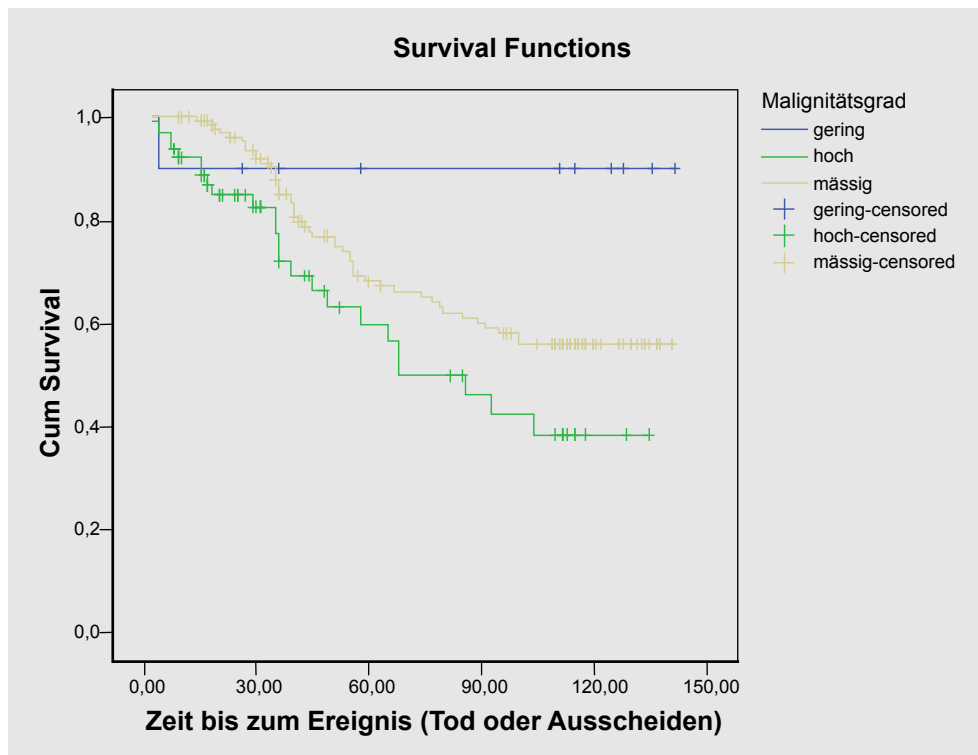


3.1.8. Kaplan-Meier-Statistik für das Grading

Das Grading des Mammacarcinoms konnte bei 209 Patienten nachgewiesen werden. Die Signifikanz als positiver Prognosefaktor liegt bei einem $p=0,02$ (s. Abb. 7). Die meisten Tumore zeigten einen mäßigen Malignitätsgrad (G2) mit insgesamt 135 Fälle. Bei weiteren 64 Tumoren ließ sich ein hoher Malignitätsgrad (G3) nachweisen. Nur 10 Fälle konnten bei einem Grading von 1 (niedriger Malignitätsgrad) eingestuft werden. Die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit mit 90% nach 5 und nach 10 Jahren zeigten die 10 Fälle mit G1-Tumore. Bei einem Nachweis von G2 sinkt die 5- Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit auf 68% (55 %) und bei hohem Malignitätsgrad nochmals auf 59% (38%).

Abb. 7: Kaplan-Meier-Statistik für das Grading

$p=0,02$



3.2. Klinisch histo-pathologische Daten

Es war möglich für fast alle Mammacarcinomfälle aus den pathologischen Berichten das TNM-Stadium und das Grading des Primärtumors bei Diagnosestellung zum Vergleich der einzelnen Carcinome zu erfassen.

3.2.1. TNM-Klassifikation

Die Hälfte der Mammacarcinome wurde in einem T2-Stadium operiert, ein weiteres $\frac{1}{4}$ konnte bereits in einem T1-Stadium behandelt werden. Die restlichen Fälle verteilen sich in gleicher Anzahl auf die Stadien T3 und T4 (s. Tab. 8).

Bei Diagnosestellung waren bereits fast die Hälfte der Carcinome in die axillären Lymphknoten metastasiert, während negative Lymphknoten bei 40,8% festgestellt wurden. Eine Fernmetastasierung lag bei der Primärbehandlung der Mammacarcinome bei der überwiegenden Mehrheit der Fälle nicht vor. Bei nur 3,8% konnten bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen nachgewiesen werden (s. Tab. 8).

Tab. 8: TNM-Klassifikation des Patientenkollektivs (n = 213)

TNM-Klassifikation	Anzahl	Prozent
T1	53	24,9 %
T2	108	50,7 %
T3	24	11,3 %
T4	24	11,3 %
T unbekannt	4	1,9 %
N0	87	40,8 %
N1	104	48,8 %
N2	14	6,6 %
N3	5	2,3 %
N unbekannt	3	1,4 %
M0	200	93,9 %
M1	8	3,8 %
M unbekannt	5	2,3 %

3.2.2. Grading

Anhand von Tabelle 9 ist ersichtlich, dass fast 2/3 der Mammacarcinome mäßig differenziert und ungefähr 1/3 undifferenziert sind. Hochdifferenzierte Mammacarcinome, die eine bessere Prognose aufweisen, sind mit 4,7% nur wenig vertreten. Dies ist im Vergleich zum internationalen Schrifttum relativ selten.

Tab. 9: Grading der ausgewerteten Mammacarcinome (n = 213)

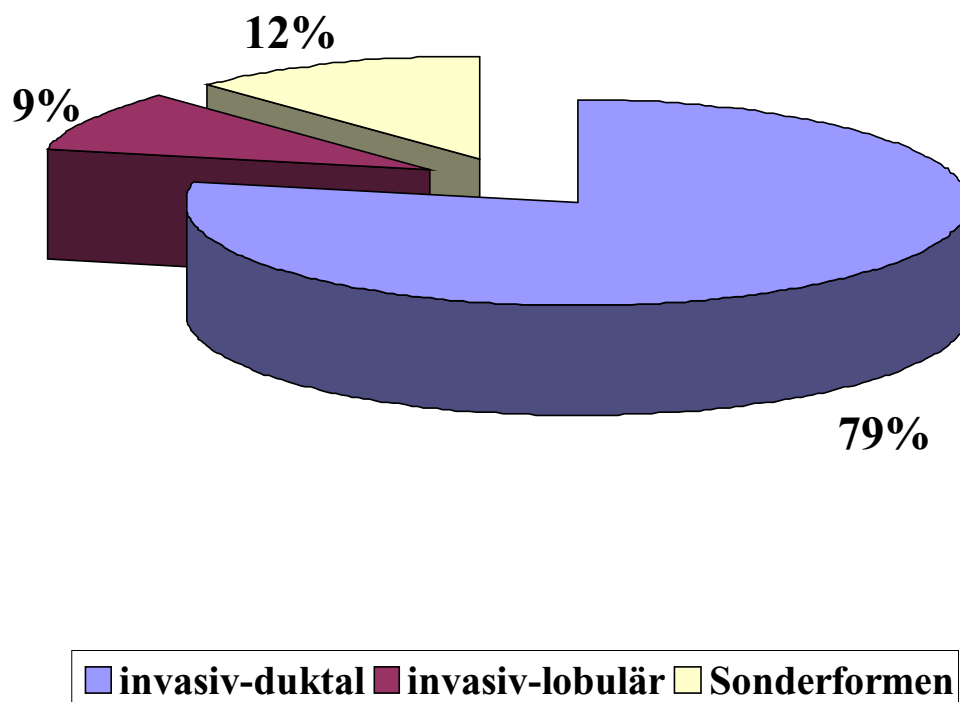
Grading	Anzahl	Prozent
G1	10	4,7 %
G2	135	63,4 %
G3	64	30,0 %
Unbekannt	4	1,9 %

3.3. Histologische Typen

Die histologische Einteilung der Mammacarcinome wurden aus den pathologischen Berichten übernommen. Der weit überwiegende Teil (79%) der Carcinome rekrutiert sich aus dem invasiv-duktalem Typ, während 20 Fälle (9,4%) dem invasiv-lobulären Typ angehören.

Die Sonderformen erscheinen mit 26 Fällen viel, zersplittern sich jedoch in verschiedene Subtypen und wurden zur Vereinfachung zusammengefasst (s. Abb. 8).

Abb. 8: Histologische Typen der Mammacarcinome



3.4. Beschreibung der Immunhistochemie für die Prostacyclinsynthese

Die Expression der Prostacyclinsynthese stellte sich als bräunliche Färbung dar. Ihre genaue Zuordnung zu einzelnen zellulären Strukturen (Tumorzellen, Normalgewebe, Gefäß- und Nervenstrukturen) wird durch die Haemalaungegenfärbung erleichtert.

3.4.1. Prostacyclin-färbung im Normalgewebe

Neben tumorösen Zellen konnte auch im Normalgewebe die Prostacyclinsynthese mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung als bräunlicher Niederschlag dargestellt werden. Gut zur erkennen war die Prostacyclinsynthese in Entzündungszellen (s. Abb. 18 – 22), Fibroblasten (s. Abb. 15-17), Gefäße (s. Abb. 13,14) und Plasmazellen (s. Abb. 19-22). Innerhalb eines Präparates stellten sich die einzelnen Strukturen sehr inhomogen dar. Die beste Färbung mit guter Intensität konnte bei den Plasmazellen erreicht werden. Im Gegensatz dazu war die Prostacyclinsynthese in den Fibroblasten nur mit schwächerer Färbung darstellbar. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Färbung des Tumorgewebes und dem Normalgewebe festgestellt werden.

3.4.2. Prostacyclin-färbung im Tumorgewebe

Kam es zu einer Anfärbung der Tumorzellen, so stellten sich diese innerhalb eines Tumors inhomogen dar. Neben stark gefärbten Tumorzellnestern fan-

den sich wenig oder gar nicht gefärbte Tumorzellen. Von der Tumorzelle an sich, wurden hauptsächlich das Cytoplasma und der Zellkern gefärbt. Auch innerhalb einer Tumorzelle kam es nicht zu einer gleichmäßigen Färbung. Ein Zusammenhang zwischen der Färbung des Cytoplasmas und des Zellkerns konnte bei Tumoren mit sehr intensiver Färbung festgestellt werden. Hier waren fast immer beide Strukturen gut gefärbt. Ansonsten kam es zu einer unterschiedlich intensiven und in der Häufigkeit unterschiedlichen Anfärbung. So gibt es Tumore, die eine Färbung fast nur im Cytoplasma aufweisen und andere hauptsächlich in den Zellkernen (s. Abb. 23-26).

3.5. Semiquantitative Auswertung

Durch die Bewertung von Menge und Intensität der Färbung wurde der immunreaktive Score (IRS) wie in 2.1. beschrieben ausgerechnet.

3.5.1. Vergleich beider Untersucher

Von den 220 immunhistochemischen Färbungen der Prostacyclinsynthese wurden bei 193 Präparate die Färbung der Tumorzellen von einem erfahrenen Auswerter beurteilt. Parallel dazu erfolgte die Auswertung von 220 Fälle durch den Doktorand erstmalig nach kurzer Einarbeitung und eine zweite wiederholte Auswertung. Beide Auswerter unterlagen der Kontrolle eines Arztes für Pathologie. Die Differenz der Auswertungszahl zwischen beiden Auswertern liegt bei technisch-organisatorischen Gründen.

Mit Hilfe der Kappa-Statistik (Siegel 1988) wurde die Übereinstimmung der IRS-Werte (immunreaktiver Score) beider Untersucher überprüft (siehe Tab.: 10). Die beste Übereinstimmung mit einem kappa-Wert von 0,613 liegt zwischen Auswerter 1 und der zweiten Beurteilung von Auswerter 2 bei der Einteilung der IRS in die Gruppen 0-2 und 3-12.

Der intra-individuelle Unterschied kann anhand der Kappa-Werte beim Vergleich beider Auswertungen des zweiten Auswerters gesehen werden. Die schlechtere Übereinstimmung in der Gruppe 0-2 und 3-12 liegt darin, dass bei der zweiten Auswertung viele IRS niedriger beurteilt wurden.

Tab. 10: Kappa-Werte zur Überprüfung der Übereinstimmung beider Auswerter

Auswerter	IRS-Einteilung	Kappa-Wert
Ausw.1 / Ausw.2-1	0 / 1-12	0,271
	0-2 / 3-12	0,492
Ausw.1 / Ausw.2-2	0 / 1-12	0,382
	0-2 / 3-12	0,613
Ausw.2-1 / Ausw.2-2	0 / 1-12	0,766
	0-2 / 3-12	0,550

Legende:

Ausw.1: erfahrener Auswerter

Ausw.2-1: Doktorand, 1. Auswertung

Ausw.2-2: Doktorand, 2. Auswertung

3.6. Anfärbung der Tumorzellen

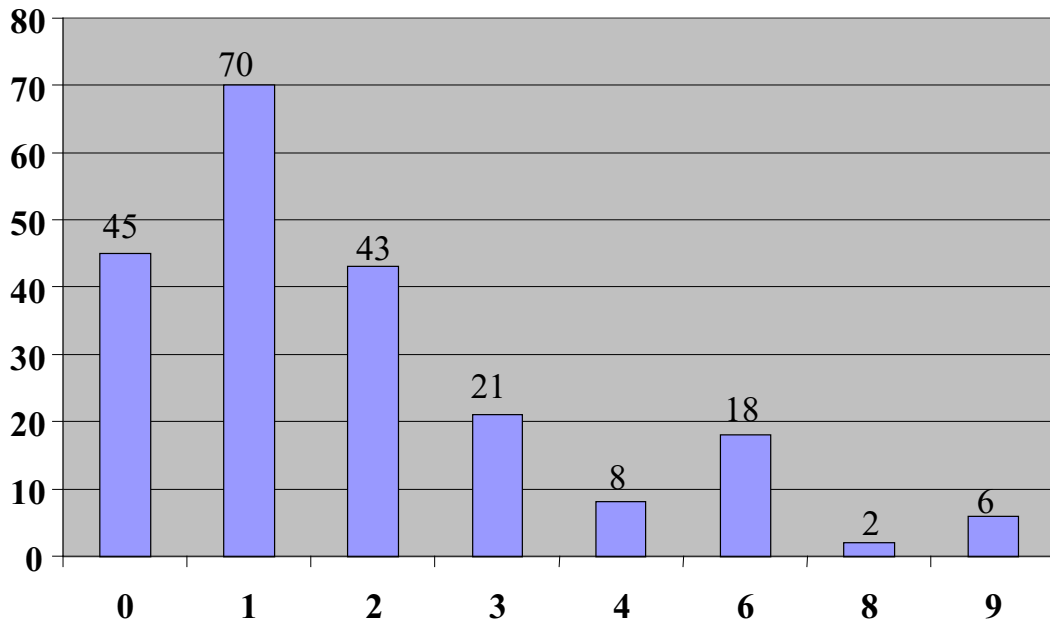
Mittels der immunhistochemischen Färbung konnte die Prostacyclinsynthese als bräunlicher Niederschlag sowohl im Cytoplasma als auch im Tumorzellkern dargestellt werden.

3.6.1. Anfärbung des Tumorcypotoplasmas

Die immunhistochemische Färbung des Tumorcypotoplasmas wurde getrennt nach der Intensität und der Menge ausgewertet. Durch Multiplizierung konnte für jedes Präparat der immunreaktive Score berechnet werden. Von den möglichen Werten 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12 konnten alle Scores bis auf die 12 vergeben werden. Somit war kein Präparat vorhanden, welches ausschließlich sehr stark gefärbte Tumorzellen aufwies.

Bei 21% (n= 45) der Fälle stellte sich überhaupt keine Färbung der Tumorzellen dar (s. Abb.: 9). Eine schwache Färbung mit einem IRS von 1 oder 2 zeigte der überwiegende Teil mit 113 Präparate (53%) (s. Abb. 26). Weitere 47 Fälle (22%) wurden einer mäßigen Färbung mit dem IRS 3, 4 oder 6 zugeordnet (s. Abb. 25, 27-29). Nur bei 3,7% (n=8) konnte eine starke Färbung mit einem IRS von 8 oder 9 festgestellt werden (s. Abb. 23, 24).

Abb. 9: Häufigkeitsverteilung des immunreaktiven Scores (n=213)



3.6.2. Anfärbung der Tumorzellkerne

Zusätzlich zu der Auswertung der Prostacyclinsynthese des gesamten Tumorcyploplasmas, erfolgte auch gezielt die Betrachtung der Anfärbung der Tumorzellkerne (s. Tab. 11). Hierbei fand die Stärke der Färbung keine Berücksichtigung. Von den 213 Präparaten zeigten 121 (56,8%) keine Anfärbung der Kerne, während bei 92 (43,2%) eindeutig eine Tumorkernfärbung zu erkennen war. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke des immunreaktiven Scores und der Kernfärbung konnte nicht festgestellt werden. In Abb. 25-28 sind invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Mammacarcinome mit vorhandener Kernfärbung dargestellt.

Tab. 11: Anfärbung der Tumorzellkerne

Tumorkerne	Anzahl	Prozent
Färbung	92	43,2%
Keine Färbung	121	56,8%

3.7. Anfärbung von Normalgewebe

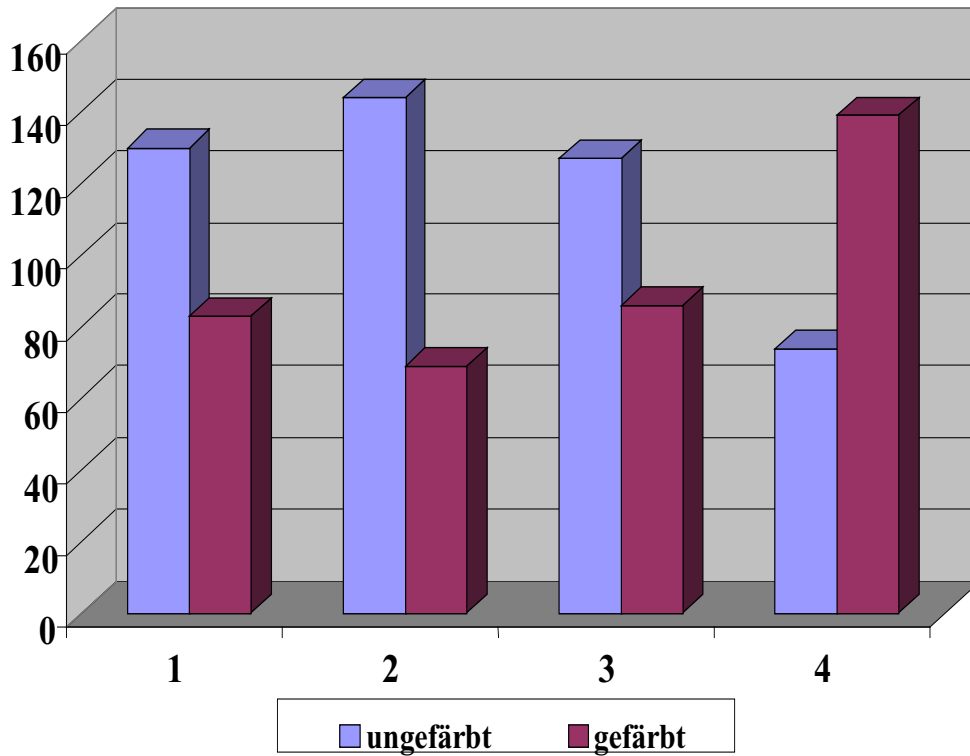
Zusätzlich zu den Tumorzellen wurden die Entzündungszellen, Fibroblasten, Gefäße und Plasmazellen betrachtet. Hierbei erfolgte die Betrachtung der Anfärbung, wobei die Stärke der Färbung nicht beurteilt wurde.

In Tab. 12 ist ersichtlich, dass bei ungefähr 60% der Entzündungszellen, Fibroblasten und Gefäße keine Färbung der Prostacyclinsynthese zu erkennen ist. Bei den Plasmazellen stellt sich das Verhältnis gefärbt zu ungefärbt genau umgekehrt dar. Hier sind 65% der Plasmazellen gefärbt (s. Abb. 10).

Tab. 12: Färbung von Normalgewebe

Zellart	Anzahl	Prozent
Entzündungszellen		
- gefärbt	83	39,0%
- keine Färbung	130	61,0%
Fibroblasten		
- gefärbt	69	32,4%
- keine Färbung	144	67,6%
Gefäße		
- gefärbt	86	40,4%
- keine Färbung	127	59,6%
Plasmazellen		
- gefärbt	139	65,3%
- keine Färbung	74	34,7%

Abb. 10: Häufigkeitsverteilung der gefärbten Zellen (n=213)



Erklärung der Zellen:

- 1: Entzündungszellen
- 2: Fibroblasten
- 3: Gefäße
- 4: Plasmazellen

3.8. Auswertung durch den Histoanalyser

Nach Einstellung und Initialisierung des Histoanalyzers wie in 2.6. beschrieben, erfolgte zunächst die Festlegung bei welcher Vergrößerung des Mikroskopes alle Messungen durchgeführt werden.

Hierfür wurden ein stark und ein weniger stark gefärbtes Präparat ausge-

wählt. Beide Schnitte wurden wie in 2.6. dargestelltem Schema bei den Vergrößerungen 10 / 25 und 40 gemessen. Aufgrund des höheren MOD / gemessenes Präparat (siehe Tab. 13) und der besseren Handhabung wurden alle weiteren Messungen bei 40-facher Vergrößerung vorgenommen. Der MOD-Wert stellt die integrierte optische Dichte / Fläche dar.

Tab. 13: MOD-Werte eines schwach und stark gefärbten Präparates der einzelnen Kanäle bei Vergrößerung 10 / 25 und 40.

Präparat	10	25	40
schwach gefärbt			
- Blaukanal	0,164	0,141	0,177
- Rotkanal	0,190	0,234	0,231
- Grünkanal	0,200	0,213	0,200
stark gefärbt			
- Blaukanal	0,269	0,217	0,373
- Rotkanal	0,248	0,248	0,342
- Grünkanal	0,293	0,273	0,363

3.8.1. Intraday Variabilität

Zur Überprüfung der Variabilität der Messungen am Histoanalyzer wurden ein stark und ein schwach gefärbtes Präparat ausgewählt und bei einer 40fachen mikroskopischen Vergrößerung 10 mal am gleichen Tag intraday Variabilität gemessen. Die 5 zu messenden Stellen waren, wie in 2.6. beschrieben, zur besseren Reproduzierbarkeit markiert worden.

Für die MOD-Werte des Blau-, Rot- und Grünkanals wurde der Coefficient of variation = CV bestimmt (siehe Tab. 14). Hierbei stellt sich der beste Variationskoeffizient bei dem schwach gefärbten Präparat dar.

Tab. 14: 10 Messungen eines stark und eines schwach gefärbten Präparates am gleichen Tag.

Präparat	Mittelwert	Standard Abweichung	CV %
schwach gefärbt			
- Blaukanal	0,31	0,02	7,50
- Rotkanal	0,30	0,02	7,75
- Grünkanal	0,32	0,02	7,16
stark gefärbt			
- Blaukanal	0,39	0,04	11,03
- Rotkanal	0,29	0,03	10,80
- Grünkanal	0,42	0,04	9,14

3.8.2. Interday Variabilität

Zur Feststellung, ob verschiedene Zeitpunkte, bzw. Tage einen Einfluss auf die Messungen haben, erfolgte die Überprüfung der Variabilität an 10 verschiedenen Tagen. Hierzu wurden ein stark und schwach gefärbtes Präparat ausgewählt. Bei 40facher Vergrößerung wurden die 5 markierten Stellen gemessen.

Für die MOD-Werte des Blau-, Rot und Grünkanals wurde der Coefficient of variation = CV bestimmt (siehe Tab. 15).

Dabei fällt auf, dass die Messungen des schwächer gefärbten Präparates einen größeren Variationskoeffizienten im Gegensatz zum stark gefärbten besitzen. Dies verhält sich genau gegensätzlich zu dem Variationskoeffizient der intraday Variation und hat auch höhere Werte.

Tab. 15: Messungen eines stark und eines schwach gefärbten Präparates an 10 verschiedenen Tagen

Präparat	Mittelwert	Standard Abweichung	CV
schwach gefärbt			
- Blaukanal	0,2058	0,0391	18,99
- Rotkanal	0,2578	0,0380	14,74
- Grünkanal	0,2416	0,0429	17,76
stark gefärbt			
- Blaukanal	0,3206	0,0396	12,35
- Rotkanal	0,3044	0,0391	12,84
- Grünkanal	0,3407	0,0416	12,21

3.8.3. Mittelwerte der Kanäle

Beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Kanäle für Blau, Grün und Rot fallen die niedrigsten Werte im Blaukanal und die höchsten im Grünkanal auf (s. Tab. 16).

Während der Blau- und Grünkanal ähnliche Standardabweichungen haben, fällt für den Rotkanal eine wesentlich höhere Standardabweichung auf.

Tab. 16: Werte der einzelnen Kanäle

	MOD Blaukanal	MOD Grünkanal	MOD Rotkanal
Mittelwert	0,30	0,32	0,31
S	0,12	0,10	0,30
Minimum	0,07	0,10	0,12
Maximum	0,85	0,77	0,72

Erläuterung:

S: Standardabweichung

3.9. Prostacyclinsynthese als Prognosefaktor

3.9.1. Semiquantitative Auswertung

Anhand der semiquantitativen Auswertung wurde untersucht, ob der Nachweis der Prostacyclinsynthese in den Tumorzellen als ein Prognosefaktor zu bewerten ist. Hierfür erfolgte die Einteilung der verschiedenen IRS (immunreaktiver Score) in negative und positive Fälle. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Statistik (Kaplan et al. 1958) konnte die 5- und 10-Jahres-Überlebensrate dargestellt werden.

Zusätzlich wurde untersucht, ob neben dem Nachweis der Prostacyclinsynthese auch die Höhe des IRS der Färbung, d.h. die Stärke der Färbung und die Anzahl der gefärbten Zellen einen Einfluss auf die 5- und 10-Jahresüberlebensrate hat. Es wurden mehrere cut-off-Werte (Tab. 17) gebildet und mit der Kaplan-Meier-Statistik überprüft. Da bei der Beurteilung des immunreaktiven Scores nur wenig Fälle (n= 26) die Werte 6,8 und 9 bekamen, wurde auf ein cut-off bei einem IRS höher als 4 verzichtet.

Parallel zu der Kaplan-Meier-Statistik wurde die statistisch auffällige Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem log rank-Test (Tab. 18) überprüft.

Tab. 17: Einteilung der einzelnen cut-off-Werte

Cut-off-Werte	IRS negativ	IRS positiv
c1	IRS = 0	IRS = 1-12
c2	IRS = 0-1	IRS = 2-12
c3	IRS = 0-2	IRS = 3-12
c4	IRS = 0-3	IRS = 4-12
c5	IRS = 0-4	IRS = 6-12

Tab. 18: log rank-Werte der einzelnen cut-off Punkte

Cut-off	Log rank /p	Corrected p	0		1	
			N	s	N	s
C1	0,65	0,42	45	105	168	97
C2	6,20	0,01	115	107	98	87
C3	4,39	0,04	158	103	55	82
C4	1,96	0,16	179	101	34	80
C5	1,26	0,26	187	100	26	81

Legende:

0: Prostacyclinsynthase negativ

1: Prostacyclinsynthase positiv

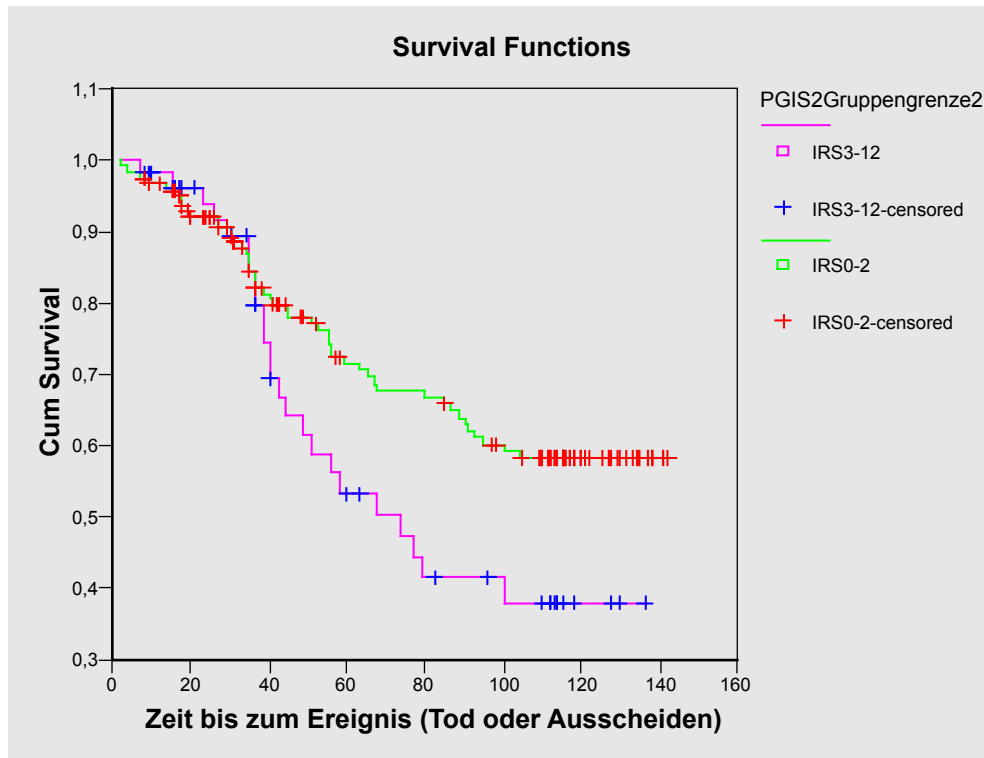
N: Anzahl der Fälle

s: durchschnittliche Überlebenszeit in Monaten

Anhand der Tabelle 18 ist ersichtlich, dass die Prostacyclinsynthase bei den cut-off- Werten c2 und c3 als statistisch signifikanter Prognosefaktor einzu-
stufen ist.

Stellvertretend für die verschiedenen cut-off -Werte wird im folgenden die Kaplan-Meier Kurve bei dem cut-off- Wert c3 dargestellt, da dieser stati-
stisch signifikant ist und die Prostacyclinsynthase als einen negativen Pro-
gnosefaktor darstellt (s. Abb. 11).

Abb. 11: Kaplan-Meier Kurve für den cut-off Wert c3, $p=0,04$



In Abb. 11 ist ersichtlich, dass der positive Nachweis der Prostacyclinsynthese eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit bedingt, als bei Patienten mit negativem Nachweis. Nach 5 Jahren haben die Patienten mit negativer Prostacyclinsynthese eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 71% (58 %), wohingegen bei den Fällen mit positivem Nachweis eine Wahrscheinlichkeit nach 5 Jahren auf nur 53% (38 %) sinkt.

3.9.2. Auswertung der Kanäle des Histoanalyzers

Alle 213 immunhistochemischen Färbungen wurden auch mit Hilfe des Histoanalyzers (siehe 3.8.) ausgewertet. Von Interesse ist, ob mit den objektiv gemessenen Werten des Histoanalyzers die Prostacyclinsynthese als Progno-

sefaktor zu bewerten ist. Ähnlich wie die cut-off-Werte der semiquantitativen Auswertung (siehe 3.10.1.) wurden die Ergebnisse des Histoanalyzers nach dem Mittelwert der einzelnen Kanäle für Blau, Grün und Rot in positive Fälle (Werte über dem Mittelwert) und negative Fälle (Werte unter dem Mittelwert) eingeteilt.

Zunächst wurde die statistisch auffällige Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem log rank-Test der einzelnen Kanäle berechnet (s. Tab.19).

Für alle 3 Kanäle konnte kein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden (s. Tab. 19). Einzig der Blaukanal zeigt eine knappe Signifikanz mit einem $p = 0,07$.

Tab. 19: log rank-Werte der einzelnen Kanäle

Kanal	Log rank/p	Corrected p	0		1	
			N	s	N	s
Blaukanal	3,38	0,07	119	104,5	94	90,9
Grünkanal	1,28	0,26	108	102,4	105	94,3
Rotkanal	1,66	0,20	110	100,6	103	94,4

Legende:

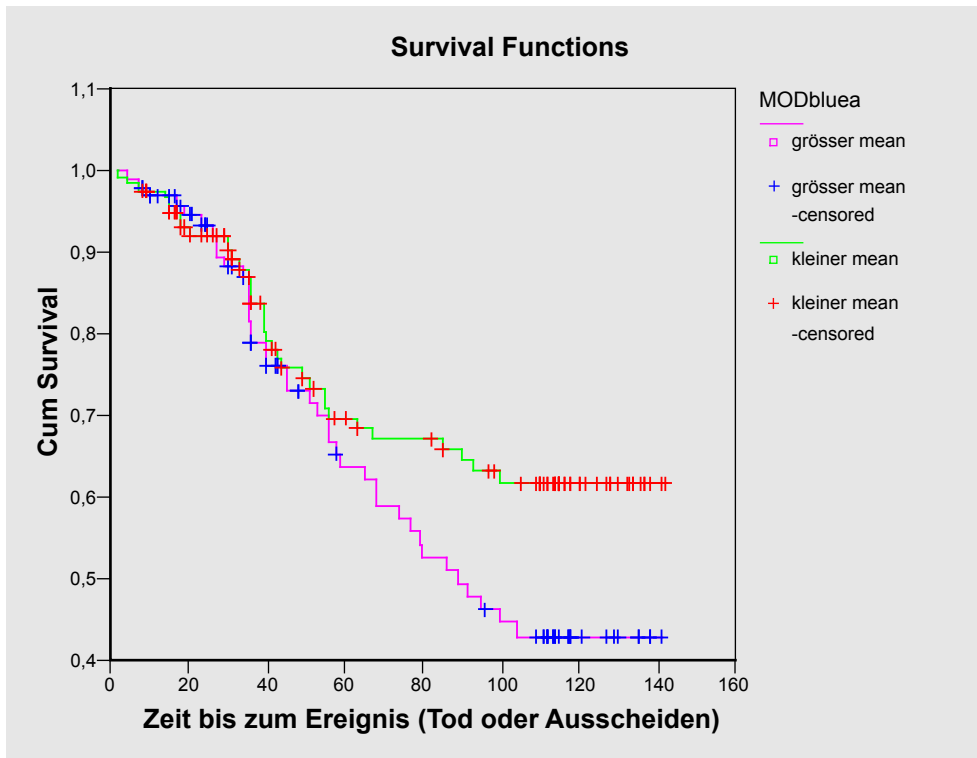
0: Prostacyclinsynthase negativ

1: Prostacyclinsynthase positiv

N: Anzahl der Fälle

s: durchschnittliche Überlebenszeit in Monaten

Abb. 12: Kaplan-Meier Kurve des Blaukanals, $p=0,07$



Anhand der Kaplan-Meier-Kurve für den Blaukanal (s. Abb. 12) ist ersichtlich, dass Patienten mit negativer Prostacyclinsynthese eine 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 69% (61%) im Vergleich zu Frauen mit positivem Nachweis der Prostacyclinsynthese haben, bei welchen nach 5 Jahren die Wahrscheinlichkeit zu leben auf nur 64% (43%) sinkt.

3.9.3. Beeinflussung der Kanäle des Histoanalyzers untereinander

Da sich die Prostacyclinsynthese als bräunliche Färbung darstellt, war es von Interesse herauszufinden, ob durch den mathematischen Vergleich der Kanäle untereinander eine bessere Messung der Prostacyclinsynthese möglich ist.

Dabei zeigt der Blaukanal minus den Grünkanal ein hochsignifikantes Ergebnis (s. Tab. 20). Wohingegen die Addition aller drei Kanäle mit einem $p=0,06$ nicht signifikant ist.

Tab. 20: Vergleich der Kanäle untereinander

Kanal	Log-rank/p	Corrected p	0		1	
			N	S	N	S
Blau - Grün	8,26	0,004	162	104,5	51	77,5
Blau - Rot	2,23	0,14	145	102,7	68	87,8
BGR	3,53	0,06	114	104,7	99	91

Legende:

0: Prostacyclinsynthase negativ

1: Prostacyclinsynthase positiv

N: Anzahl der Fälle

S: durchschnittliche Überlebenszeit in Monaten

BGR: Addition der Kanäle für Blau-, Grün- und Rotkanal

4. Diskussion

4.1. Gesamtkollektiv

Insgesamt 344 an Mammacarcinom erkrankte Patienten wurden in den Zeitraum von 1986-1988 und 1993-1997 nach Zufallskriterien ausgewählt. Aufgrund unterschiedlicher Kriterien (s. Abb. 1) erfolgte bei 213 Fällen die immunhistochemische Färbung und Auswertung der PGIS.

Es ist von großer Wichtigkeit darzustellen, ob durch die eher zufällige Auswahl der 213 Patienten ein Bias für die in der vorliegenden Studie ausgewerteten Fälle nachzuweisen ist.

Werden die numerischen und kategorischen Kriterien (s. Tab.1 und 4) der in die Studie eingeschlossenen mit den ausgeschlossenen Patienten verglichen, stellt sich ein signifikanter Unterschied im Lymphknotenbefall dar (s. Tab.1). Die Signifikanz geht jedoch verloren, wenn pN0 mit pN1-3 verglichen werden (s. Tab. 1). Auch bei der Anzahl der befallenen Lymphknoten stellt sich kein Unterschied dar (s. Tab. 4). Insgesamt wurden jedoch mehr Patienten mit positiven Lymphknoten in die Studie aufgenommen als statistisch erwartet (s. Tab. 2).

Ein positiver Lymphknotenbefall gilt als negativer Prognosefaktor im Hinblick auf die Rezidivrate, Risiko der Fernmetastasierung, erniedrigte 5- und 10-Jahresüberlebensrate (Nemoto et al. 1983, Carter et al. 1989, Merson et al. 1992, Clayton et al. 1993, Fisher et al. 1993A, Fisher et al. 1993B, Veronesi et al. 1995, Pichon et al. 1996, Gago et al. 1998, Thor et al. 1999).

Die Radiatio zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den in die Studie eingeschlossenen mit den ausgeschlossenen Patienten (s. Tab. 1). Es wurden

statistisch gesehen mehr Patienten mit durchgeführter Radiatio aufgenommen (s. Tab. 3). Da 39,4% eine adjuvante Radiatio erhielten, im Gegensatz zu 24,9% mit einer palliativen Radiatio (s. Tab. 5), zeigt sich der Trend des zunehmend operativ brusterhaltenden Vorgehens mit adjuvanter Radiatio. Insgesamt zeigten sich somit keine gravierenden Unterschiede zwischen den ein- und ausgeschlossenen Studienpatienten. Wenn überhaupt ein Bias abzuleiten ist aus unseren Daten, so wurden eher Fälle mit potentiell schlechter Prognose (hoher Zahl N1 Fälle) in die Studie eingeschlossen.

4.2. Patientenkollektiv

Für jede Studie ist es von großer Wichtigkeit, ob die ausgewählten und untersuchten Patienten repräsentativ für alle an Mammacarcinom erkrankten Frauen sind und somit Rückschlüsse gezogen werden dürfen.

Die in dieser Arbeit untersuchten 213 Fälle stimmen in der Größe des ausgewählten Patientengutes mit anderen internationalen Untersuchungen überein. Gago verglich bei 205 Patienten die Aussagekraft der Hormonrezeptoren auf die Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung (Gago et al. 1998). Bei 281 Patienten konnte von Yildirim gezeigt werden, dass Alter unter 35 Jahre bei der Diagnosestellung und die Anzahl der befallenen Lymphknoten unabhängige Prognosefaktoren für ein Rezidiv sind (Yildirim et al. 2000). Leitner zeigte anhand von 218 Patienten mit T1a,b N0 M0 Tumoren, dass 10% der Patienten wegen schlechtem Grading und nachgewiesener lymphatischer Invasion ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen und eine adjuvante Chemotherapie in Betracht gezogen werden sollte (Leitner et al. 1995).

An 387 Patienten wurden verschiedene Faktoren auf ihre Aussagekraft über das Rezidivrisiko bei Mammacarcinom untersucht (Lumachi et al. 2001) und bei 399 Patienten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der befallenen Lymphknoten einen Einfluss auf die Überlebensrate hat (Clayton et al. 1993).

Auch bei der Länge des vorhandenen follow-up's finden sich parallele Untersuchungsbedingungen in der internationalen Literatur. Ein in dieser Studie untersuchtes mittleres follow-up von 67 Monaten ist durchaus vergleichbar mit folgenden Untersuchungen: 45 Monate (Yildirim et al. 2000), 53 Monate (Lumachi et al. 2001), 60 Monate (Gago et al. 1998, Carter et al. 1989, Nemoto et al. 1983), 61 Monate (Thor et al. 1999) und 74 Monate (Saimura et al. 1999).

Mirza et al. (2002) hat Studien über Prognosefaktoren bei nodal-negativem Mammacarcinom überprüft und als Einschlusskriterium die Mindestgrenze von 200 Patienten und einem minimalen follow-up von 60 Monaten gewählt. Die hier durchgeführte Studie befindet sich im Rahmen dieser Bedingungen.

Die in dieser Studie untersuchten histologischen Typen (s. Abb.8) rekrutieren sich zum größten Teil aus invasiv-duktalem Carcinomen mit 79%, wohingegen invasiv-lobuläre Carcinome nur in 12% nachweisbar waren. Werden diese Daten mit der Literatur verglichen ist eine normale Aufteilung der verschiedenen Carcinomtypen vorhanden (Meuret et al. 1995). Somit stellt sich auch hier ein repräsentatives Kollektiv dar.

Ähnliche Übereinstimmung zwischen der in dieser Studie untersuchten Patienten und der veröffentlichten Daten zeigen sich auch im Hinblick auf das Grading der Mammacarcinome (s. Tab. 9). Im Tumorregister München (Engel et al. 2001) werden Mammacarcinome mit Grading 2 an erster Stelle

(56,3%), gefolgt von Grading 3 (36%) aufgelistet.

Einzig bei den Tumoren mit Grading 1 und somit den Tumoren mit besserer Prognose finden sich in der vorliegenden Studie nur 4,7% (im Tumorregister München 7,7% zum Vergleich).

Somit sind die untersuchten Patienten durchaus als repräsentativ zu bewerten.

4.3. Konventionelle Prognosefaktoren

Die in dieser Studie festgestellten hochsignifikanten Prognosefaktoren (s. Tab. 6 und 7) stimmen mit den nationalen und internationalen Richtlinien und Untersuchungen größtenteils überein.

So werden das Tumorstaging nach Stadiumeinteilung der WHO oder dem TNM-Stadium, das Grading des Tumors und der Hormonrezeptorstatus im Konsens der AGO-Organcommission 2001 (von Minckwitz et al. 2001), in den Empfehlungen des Tumorzentrums München (Harbeck et al. 2001), im Konsens der amerikanischen Pathologen (Fitzgibbons et al. 2000), der Gesellschaft der Deutschen Pathologen (Sinn et al. 2001) auch als primäre Prognosefaktoren beschrieben.

4.4. Auswertung

4.4.1. ABC-Methode

Die immunhistochemische Färbung mit dem Avidin-Biotin-Komplex wurde von Hsu et al. (1981) entwickelt. Hierbei wird die zu untersuchende Prostacyclinsynthese mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und dem Avidin-Biotin-Komplex dargestellt.

Schon 1985 hat Fritz et al. neun verschiedene immunhistochemische Verfahren untersucht und die ABC-Methode von Hsu als bevorzugte immunhistochemische Färbung beschrieben, da sie eine hohe Spezifität und Sensitivität besitzt. In der heutigen Zeit gehört die ABC-Methode in der pathologischen Routinediagnostik zu den weit verbreiteten und akzeptierten Verfahren und gilt im Vergleich zu neueren Verfahren immer noch als empfehlenswert (Belling et al. 1999).

4.4.2. Immunreaktiver Score

Mit der immunhistochemischen Färbung ist es möglich die Prostacyclinsynthese als bräunliche Färbung der Zellen darzustellen.

Bei der Auswertung erfolgt nicht nur die Unterscheidung in gefärbt oder ungefärbt, sondern es wird auch die Stärke der Färbung in wenig, mäßig und stark differenziert. Daneben findet auch die Quantität der gefärbten Zellen Berücksichtigung.

Durch die Multiplikation von Menge und Stärke wird der immunreaktive Score berechnet. Hiermit wird eine differenziertere Auswertung erreicht und versucht

das doch meist inhomogene Färbungsverhalten der Tumorzellen zu bewerten. Diese Methode wird seit längerem im Routinelabor zur Bestimmung der Hormonrezeptoren beim Mammacarcinom verwendet (Remmele 1986).

Zu beachten ist jedoch, dass die Methode subjektiv ist und somit vom Betrachter und dessen Erfahrung in der Auswertung abhängig ist.

In dieser Arbeit wurden 193 von einem erfahrenen Auswerter und 213 von dem Doktorand nach kurzer Einarbeitung ausgewertet. Die Überprüfung der Übereinstimmung mittels der kappa-Statistik (Siegel et al. 1988) ergab keine gute Übereinstimmung (s. Tab. 10). Nach weiterer Einarbeitung erfolgte eine zweite Auswertung durch den Doktorand. Bei dieser Auswertung wurden immunreaktive Scores mit geringerem Wert vergeben.

Werden die immunreaktiven Scores in 0-2 / 3-12 aufgeteilt, erhält man einen kappa-Wert von 0,613 zwischen den beiden Auswertern. Dieser Wert zeigt eine akzeptable Übereinstimmung. Den weiteren Auswertungen wurden somit diese Daten zugrunde gelegt.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, anhand des immunreaktiven Scores die Prostacyclinsynthase semiquantitativ zu bestimmen. Allerdings benötigt diese Methode ausreichend Einarbeitung und Erfahrung des Auswerterns, um reproduzierbare und valide Ergebnisse zu erhalten.

4.4.3. Vorkommen der Prostacyclinsynthase in Tumorgewebe

Bisher konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die gentechnisch hervorgerufene Überexpression der Prostacyclinsynthase bei Mäusen die Inzidenz von Lungentumoren reduziert (Keith et al. 2002). In weiteren Tierstu-

dien wurde festgestellt, dass durch Prostacyclin, dem Produkt der Prostacyclinsynthese eine Reduktion der Lungen- oder Lymphknotenmetastasierung (Schneider et al. 1996, Schirner et al. 1997) beim Mammacarcinom möglich ist (s. 1.5.).

In dieser Arbeit war das Ziel herauszufinden, ob die Prostacyclinsynthese in humanen Mammacarcinomzellen nachweisbar ist, ob es Unterschiede in der Stärke der Expression gibt und inwieweit ein Vorkommen in den Tumorzellkernen vorliegt.

Bei einem überwiegenden Teil von 79% der Mammacarcinome konnte die Prostacyclinsynthese mit der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 9). Bei der Stärke der Färbung fällt auf, dass die Hälfte aller Tumoren nur schwach gefärbt ist und somit nur wenig Prostacyclinsynthese enthalten. Weitere 22% der Tumorzellen zeigen eine mässige Anfärbung.

Somit ist die Prostacyclinsynthese in der überwiegendem Zahl der Mammacarcinome exprimiert, aber offensichtlich nur in geringer Konzentration.

Dazu vergleichende Studien gibt es bisher nicht. Auch die Frage warum die Prostacyclinsynthese nur in geringen Mengen in Mammacarcinomzellen vorhanden ist, bedarf noch der Klärung in weiteren Studien.

Die topographische Zuordnung der Prostacyclinsynthese (s. 3.4. und 3.6.) ergab eine :

- bevorzugte zytoplasmatische Darstellung
- in fast 43% auch eine nukleare Expression der Prostacyclinsynthese
- keine bevorzugte Lokalisation der Prostacyclinsynthese in der Zellmembran
- keine extrazelluläre Lokalisation der Prostacyclinsynthese

Erstmalig konnte nachgewiesen werden, dass die Prostacyclinsynthese in 43% der Tumorzellkerne vorhanden ist. Bisher konnte die Prostacyclinsynthese einzig in den Zellkernen von Glattmuskelzellen festgestellt werden (Smith et al. 1983).

Da Prostacyclin, das Produkt der Prostacyclinsynthese auf die peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α und δ wirkt (s. 1.6.) könnte der Nachweis der Prostacyclinsynthese in den Tumorzellkernen eventuell damit in Zusammenhang stehen und größere Auswirkungen haben. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.4.4. Nachweis der Prostacyclinsynthese in gesundem Gewebe

Neben dem Nachweis der Prostacyclinsynthese im Tumorgewebe des Mammacarcinoms wurde in dieser Arbeit auch gesundes Gewebe wie Gefäße, Fibroblasten, Entzündungszellen und Plasmazellen auf das Vorkommen der Prostacyclinsynthese hin untersucht (s. 3.7.). Bei der Auswertung wurden die einzelnen Präparate nur nach dem Nachweis der Färbung betrachtet. Hierbei fand weder die Stärke noch die Menge der Färbung Berücksichtigung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Prostacyclinsynthese in allen vier Zellarten vorhanden ist, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung (s. Tab. 12).

Erstmalig gelang der Nachweis der Prostacyclinsynthese in 39% der Entzündungszellen. Dies wurde bisher in anderen Studien nicht beschrieben.

Die Plasmazellen enthalten mit 65,3% den größten Anteil der Prostacyclinsynthese. Auch dieser Nachweis findet sich bisher nicht in der Literatur.

Die geringste Anfärbung zeigt sich in den Fibroblasten. In der Literatur beschrieben ist bisher die Prostacyclinsynthese in den Fibroblasten des Herz-

myocards, des Lungenparenchyms und der Medulla renalis (Tone et al. 1997), jedoch wurde bisher kein Mammagewebe daraufhin untersucht.

Eine etwas häufigere Anfärbung der Prostacyclinsynthese stellt sich bei den Entzündungszellen und den Gefäßen dar. Der Nachweis der Prostacyclinsynthese ist bisher in den Endothelzellen von Gefäßen (De Witt et al. 1983a, Spisni et al. 1995, Tone et al. 1997, Siegle et al. 2000) und den Glattmuskelzellen der Gefäße (De Witt et al. 1983b, Tone et al. 1997) gelungen. Dies kann gut mit der starken thrombozytenaggregationshemmenden und vasodilatatorischen Wirkung des Prostacyclins, dem Produkt der Prostacyclinsynthese erklärt werden.

4.4.5. Nachweis der Prostacyclinsynthese durch den Histoanalyser

In dieser Arbeit erfolgte neben der Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Hilfe des immunreaktiven Scores eine zweite durch den Histoanalyser (s. 3.8.). Jedes Präparat wurde an fünf verschiedenen Stellen unter einem Mikroskop gemessen und mit Hilfe eines Computerprogramms in MOD-Wert (integrierte optische Dichte) umgerechnet. Die erste Messung wurde an der Stelle der stärksten Färbung durchgeführt, die nächsten Messungen erfolgten durch das Zufallsprinzip. Somit kann diese Art der Messung durchaus als objektiv und weniger vom Auswerter abhängig bezeichnet werden.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Variabilität der Messungen an einem stark und einem schwach gefärbten Präparat. Es wurde sowohl die intraday als auch die interday Variabilität durch die Berechnung des Coefficient of variation ausgewertet. Hierbei zeigten die CV-Werte der intraday Variabilität

(s. Tab. 15) erwartungsgemäß niedrigere Werte als die interday Variabilität. Insgesamt konnte für die interday Variabilität nicht eine befriedigende Reproduzierbarkeit erzielt werden.

Bei der immunhistochemischen Färbung stellt sich die Prostacyclinsynthese durch Färbung mit DAB als bräunlichen Niederschlag dar. Da mit dem Histoanalyzer in drei verschiedenen Kanälen mit den Farben Rot, Grün und Blau gemessen wurde, sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, mit welchem Kanal die beste Auswertung möglich ist und ob die quantitative Auswertung der qualitativen überlegen ist. Bei der Betrachtung der Messungen der drei Kanäle zeigt einzig der Blaukanal ein Ergebnis knapp oberhalb der Signifikanzgrenze (s. Tab. 19). Der Rot- und der Grünkanal sind nicht signifikant. Somit kann festgestellt werden, dass keiner der drei Kanäle ein ausreichend signifikantes Ergebnis zeigt, welches belegen würde, dass eine quantitative Auswertung grundsätzlich überlegen ist. Es ist mit dem Histoanalyzer schwierig, die bräunliche immunhistochemische Färbung der Prostacyclinsynthese zu messen, wobei in einer früheren Studie der Blaukanal als der beste zum Messen des Diaminobenzidin (DAB) bei der ABC-Methode postuliert worden ist (Fritz et al. 1995). In vergleichbaren Studien, welche mit der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode und Auswertung mit dem Histoanalyzer die Cyclooxygenase 1 und 2 (Siegle et al. 1998) oder die intestinale Expression des humanen MRP Transporters (Fromm et al. 2000) nachgewiesen haben, wurden alle Werte mit dem Blaukanal bestimmt. Ein Vergleich sowohl mit dem Grünkanal als auch mit dem Rotkanal ist nicht erfolgt.

Versuche, durch Subtraktion oder Addition der drei Kanäle, ein besseres Ergebnis in der Messung der bräunlichen Färbung zu erreichen, erscheinen nicht als sinnvoll (s. Tab. 20).

4.4.6. Vergleich des IRS mit dem Histoanalyzer

Nach immunhistochemischer Anfärbung der Prostacyclinsynthase durch Anwendung der ABC-Methode bei 213 Präparaten von Mammacarcinomen erfolgte die Auswertung parallel mit zwei verschiedenen Methoden. Neben der Berechnung des immunreaktiven Scores wurden alle Präparate mit dem Histoanalyzer ausgewertet (s.2.6.).

Ein Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob eine der beiden Auswertungen ein besseres Ergebnis zeigt oder in der Ausführung der anderen überlegen ist.

Bei der Auswertung des immunreaktiven Scores durch zwei verschiedene Auswerter konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer vollkommenen Übereinstimmung aufgrund der Subjektivität der Methode kommen kann. Dagegen zeigt die Methode mit dem Histoanalyzer durch die computergestützte Auswertung einen objektiveren Weg, der durch die Berechnung der intraday und interday Variabilität dargestellt werden kann (s. Tab.14 und 15).

Die Durchführung der Auswertung mit dem immunreaktiven Score stellt eine einfachere Methode dar, welche außerdem schneller in der Durchführung ist. Vor allem wird das gesamte Präparat visuell ausgewertet, wohingegen beim Histoanalyzer nur bestimmte Bezirke (s. 2.6.) gemessen werden. Zudem ist die Handhabung des Histoanalyzers komplizierter und die Auswertung zeitaufwendiger.

Werden die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen, kann festgestellt werden, dass keine Auswertung derzeit als optimal bezeichnet werden kann, jedoch ist die visuelle Methode dem Histoanalyzer eher überlegen. Die vorliegenden Messserien sprechen derzeit aufgrund ihres hohen Messaufwandes gegen den Routineeinsatz bildanalytischer Verfahren in der morphologischen Diagnostik.

4.5. Prostacyclinsynthese als möglicher Prognosefaktor

Da das Mammacarcinom eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit steigender Inzidenz ist, besteht ein großer Bedarf neben den schon bekannten konventionellen Prognosefaktoren weitere Parameter zu finden, die zusätzlich zur Bestimmung des Operationsverfahrens und der adjuvanten Weiterbehandlung genutzt werden können und weiteren Aufschluss über die Prognose des Mammacarcinoms und die zu wählenden Therapieoptionen geben können.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Prostracyclinsynthese im Mammacarcinom nachzuweisen ist und ob das Vorhandensein als ein prognostischer Parameter zu werten ist.

So konnte gezeigt werden, dass bei 79% aller untersuchten Mammacarcinome die Prostacyclinsynthese mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung nachzuweisen war. Davon war bei 53% jedoch nur eine schwache Färbung vorhanden, wohingegen 22% eine mäßige und nur 3% eine starke Färbung aufzeigten (s. 3.6.1.).

Erfolgt die Einteilung in verschiedene cut-off Werte, stellte sich eine eindeutig negative Korrelation zwischen dem Nachweis der Prostacyclinsynthese und der Überlebenswahrscheinlichkeit dar. Hierbei sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei nachgewiesener Prostacyclinsynthese 5 Jahre nach Diagnosestellung um 18% als bei Tumore mit negativer Prostacyclinsynthese, 10 Jahre nach Diagnosestellung liegt der Unterschied bei 20%.

Somit kann die Prostacyclinsynthese als negativer Prognosefaktor bezeichnet werden.

Die negative Korrelation der Expression der Prostacyclinsynthase mit der Überlebenswahrscheinlichkeit ist allerdings nicht unabhängig von den cut-off Werten. Eine signifikante Korrelation liegt bereits bei einem niedrigen cut-off Wert (ab IRS 2) vor. Bereits eine geringe Expression verschlechtert die Prognose.

Die Rolle der Prostacyclinsynthase im Zellkern, neben multivarianten Analysen der Prognosefaktoren mit größeren Zahlen zur Validierung, bleibt zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis, die Lokalisation und Quantifizierung der Prostacyclinsynthase und die Korrelation zur Prognose beim Mammacarcinom.

Ausgehend von einem ursprünglichen Gesamtkollektiv von 344 Fällen, konnten aus technisch-organisatorischen Gründen 213 Präparate untersucht werden. Durch Vergleich der kategorischen und numerischen Prognosefaktoren konnte nachgewiesen werden, dass mehr Patienten mit positivem Lymphknotenbefall und durchgeführter Radiatio als statistisch erwartet in das Patientenkollektiv aufgenommen worden sind. Werden jedoch beim Lymphknotenbefall die negativen Fällen mit den positiven verglichen, geht die Signifikanz verloren.

Somit zeigt die eher zufällige Auswahl der 213 Patienten aus dem Gesamtkollektiv keine Bias für die ausgewerteten Fälle.

Die Auswertung erfolgte durch Anwendung des t-Testes für die numerischen Daten, sowie Kreuztabellen und dem damit verbundenen Pearson Chi-Square oder Fisher's Exact Test für die kategorischen Daten.

Die Normalverteilung des ausgewerteten Patientenkollektivs wurde anhand der konventionellen Prognosefaktoren mit der Kaplan-Meier Statistik und dem log rank Test überprüft und festgestellt.

Der Nachweis der Prostacyclinsynthese erfolgte mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung durch die ABC-Methode.

Zum einen erfolgte eine semiquantitative und subjektive Auswertung von zwei verschiedenen Personen durch die Anwendung des immunreaktiven Scores unabhängig voneinander, hierbei errechnet sich der immunreaktive Score durch die Multiplikation von Intensität und Menge der gefärbten Zellen.

Als zweite, objektivere Methode wurde die Expression der Prostacyclinsynthese mit dem Histoanalyzer, einem Mikroskop mit computergestützter Auswertung nachgewiesen.

Die Daten des immunreaktiven Scores und des Histoanalyzers wurden mit der Kaplan-Meier Statistik (und dem damit verbundenen log rank) ausgewertet. Neben der Expression der Prostacyclinsynthese im Cytoplasma der Tumorzellen der Mammacarcinome wurde die Anfärbung der Zellkerne untersucht. In 79% der Mammacarcinome konnte die Prostacyclinsynthese nachgewiesen werden, wobei 53% nur eine schwache Anfärbung zeigten. Weitere 22% eine mäßige und 3,7% eine starke Färbung.

Die Expression der Prostacyclinsynthese zeigte sich in 43% der Tumorzellkerne.

Zusätzlich erfolgte der Nachweis der Prostacyclinsynthese in Normalgeweben, wie Gefäßendothel, Entzündungszellen, Fibroblasten und Plasmazellen.

Die Untersuchung der gesunden Zellen ergab bei 65% der Plasmazellen einen positiven Nachweis der Prostacyclinsynthese, wohingegen in nur 39% der Entzündungszellen, 32% der Fibroblasten und 40% der Gefäße eine Expression vorlag.

Die Messungen des Histoanalyzers wurden zunächst durch Messung der intraday und interday Variabilität mit dem Coefficient of variation auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft und zeigten akzeptable Werte.

Bei der Überprüfung, ob die Prostacyclinsynthese als Prognosefaktor zu werten ist, konnte bei der Auswertung des immunreaktiven Scores bei zwei verschiedenen cut-off Werten ein signifikantes Ergebnis als negativer Prognosefaktor erzielt werden. Hierbei war das Optimum bei einer Einteilung in $IRS > 2$ als positiv und $IRS < 2$ als negativ.

Bei der Untersuchung des Prognosefaktors zeigte in der Auswertung des Histoanalyzers lediglich der Blaukanal ein Ergebnis knapp oberhalb der Signifikanzgrenze als negativer Prognosefaktor. Der Grün- und Rotkanal stellten sich als nicht signifikant dar. Die Ergebnisse des Histanalyzers zeigen dessen Problematik, wenn ein Marker untersucht wird, der sowohl im Tumor als auch in Nichttumorgewebe exprimiert wird.

6. Literaturverzeichnis

AGO-Richtlinien

<http://www.ago-online.de>

Backmann J.F., Siegle I., Fritz P. (1998)

Immunohistochemical localization of methallothionein in synovial tissue of patients with chronic inflammatory and degenerative joint disease.

Virchow Arch. Aug; 433 (2): 153 - 60

Badawi A.F., Badr M.Z. (2003)

Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and level of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis.

Int J Cancer Jan 1; 103(1): 84-90

Barak Y., Liao D., He W., Ong E.S., Nelson M.C., Olefsky J.M.,

Boland R., Evans R.M. (2002)

Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer.

Proc Natl Acad Sci U S A Jan 8; 99(1): 303-8

Belling O., Ottesen K., Meyer W., Feller A.C., Merz H. (1999)

Comparative analysis of various standard immunohistochemical procedures.

Pathologie Jul; 20(4): 242-50

Bennett A., Charlier E.M., McDonald A.M., Simpson J.S., Stamford I.F., Zebro T. (1977)

Prostaglandins and breast cancer.

Lancet Sep 24; 2(8039): 624-6

Bennett A. (1986)

The production of prostanoids in human cancers, and their implications for tumor progression.

Prog Lipid Res; 25(1-4): 539-42

Braissant O., Wahli W. (1998)

Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor -alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development.

Endocrinology Jun; 139(6): 2748-54

Carter C.L., Allen C., Henson D.E. (1989)

Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases.

Cancer Jan 1; 63(1): 181-7

Chevalier D., Cauffiez C., Bernerd C., Lo-Guidice J.M., Allorge D., Fazio F., Ferrari N., Libersa C., Lhermitte M., D'Halluin J.C., Broly F. (2001)

Characterization of new mutations in the coding sequence and 5'-untranslated region of the human prostacyclin synthase gene (CYP8A1).

Hum Genet Feb; 108 (2): 148-55

Clay C.E., Namen A.M., Atsumi G., Willingham M.C., High K.P., Kute T.E., Trimboli A.J., Fonteh A.N., Dawson P.A., Chilton F.H. (1999)
Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells.
Carcinogenesis Oct; 20 (10): 1905-11

Clayton F., Hopkins C.L. (1993)
Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas.
Cancer Mar 1; 71(5): 1780-90

Coogan P.F., Rao S.R., Rosenberg L., Palmer J.R., Strom B.L., Zauber A.G., Stolley P.D., Shapiro S. (1999)
The relationship of nonsteroidal anti-inflammatory drug use to the risk of breast cancer.
Prev Med Aug; 29(2): 72-6

Deng H., Huang A., So S.P., Lin Y.Z., Ruan K.H. (2002)
Substrate access channel topology in membrane-bound prostacyclin synthase.
Biochem J Mar 15; 362 (Pt 3): 545-51

De Witt D.L., Smith W.L. (1983a)
Purification of prostacyclin synthases from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is a hemoprotein.
J Biol Chem Mar 10; 258 (5): 3285-93

De Witt D.L., Day J.S., Sonnenburg W.K., Smith W.L. (1983b)
Concentration of prostacyclin endoperoxide synthase and prostaglandin I₂ synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta.
J Clin Invest Dec; 72 (6): 1882-8

Elstner E., Muller C., Koshizuka K., Williamson E.A., Park D., Asou H., Shintaku P., Said J.W., Heber D., Koeffler H.P. (1998)
Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice.
Proc Natl Acad Sci U S A Jul 21; 95(15): 8806-11

Engel J., Schubert-Fritschle G., Hölzel D. (2001)
Epidemiologie, 1-8
In: Sauer H., N: Manual Tumorzentrum München; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammacarcinome.
8. Aufl., W. Zuckerschwerdt Verlag München

Fisher E.R., Anderson S., Redmond C., Fisher B. (1993A)
Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants.
Cancer Apr 15; 71(8): 2507-14

Fisher E.R., Costantino J., Fisher B., Redmont C. (1993B)
Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators.
Cancer Mar 15; 71(6 Suppl): 2141-50

Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver D., Thor A.D., Allred D.C., Clark G.M., Ruby S.G., O'Malley F., Simpson J.F., Connolly J.L., Hayes D.F., Edge S.B., Lichter A., Schnitt S.J. (2000)

Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999.

Arch Pathol Lab Med Jul; 124 (7): 966-78

Forman B.M., Chen J., Evans R.M. (1997)

Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.

Proc Natl Acad Sci U S A Apr 29; 94(9): 4312-7

Fritz P., Müller J., Wegner G., Braun U., Grau A., Tucek H.V., Moessner E., Schenk R. (1985)

Immunhistochemie: Theoretische Möglichkeiten, praktische Anwendung.

Zbl allg Pathol u pathol Anat 130, 187-203

Fritz P., Mulhaupt H., Hoenes J., Lutz D., Doerrer R., Schwarzmans P., Tucek H.V. (1992)

Quantitative Immunhistochemistry.

Volume 24 No 3

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Fritz P., Wu X., Tucek H., Mulhaupt H., Schwarzmans P. (1995)

Quantitation in immunhistochemistry. A research method or a diagnostic tool in surgical pathology?

Pathologica Jun; 87 (3): 300-9

Fritz P., Saal J.G., Wicherek C., König A., Laschner W., Rautenstrauch H.
(1996)

Quantitative photometrical assessment of iron deposits in synovial membranes in different joint diseases.

Rheumatol Int ; 15 (5): 211-6

Fritz P., Sperker B., Murdter T. E., Spath M., Schwarzmann P., Kroemer H. K., Eichelbaum M. Kivisto K. T. (1999)

Quantitative immunohistochemical analysis of the the glutathione s-transferase GSTM1: in situ phenotyping in archival material.

Xenobiotika Jul; 29 (7): 693-702

Fromm MF., Kauffmann H.M., Fritz P., Burk O., Kroemer H.K., Warzok R.W., Eichelbaum M., Siegmund W., Schrenk D. (2000)

The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters.

Am J Pathol. Nov; 157 (5): 1575-80

Gago F.E., Tello O.M., Diblasi A.M., Ciocca D.R. (1998)

Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients.

J Steroid Biochem Mol Biol Dec; 67(5-6): 431-7

Giertz H. (1983)

Mediatoren der Entzündung und Allergie. Pharmakotherapie der Allergie; Arzneimittelallergie, S. 179.

In: Forth W., Henschler D., Rummel W., N: Pharmakologie und Toxikologie 4. Auflage, Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut

Gorman R.R., Bunting S., Miller O.V. (1977)

Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX).

Prostaglandins Mar; 13 (3): 377-88

Gupta R.A., Tan J., Krause W.F., Geraci M.W., Willson T.M., Dey S.K., Du Bois R.N. (2000)

Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer.

Proc Natl Acad Sci U S A Nov 21; 97(24): 13275-80

Hara S., Miyata A., Yokoyama C., Inoue H., Brugger R., Lottspeich F., Ullrich V., Tanabe T. (1994)

Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells.

J Biol Chem Aug 5; 269(31): 19897-903

Harbeck N., Eiermann W., Engel J., Funke I., Lebeau A., Permanetter W., Untch M. (2001)

Prognosefaktoren beim primären Mammacarcinom S. 39-43

In: Sauer H., N: Manual Tumorzentrum München, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammacarcinome.

8. Aufl., W. Zuckerschwerdt Verlag München

Harris R.E., Chlebowski R.T., Jackson R.D., Frid D.J., Ascenseo J.I.,

Anderson G., Loar A., Rodabough R.J., White E., McTiernan A. (2003)

Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative.

Cancer Res Sep 15; 63(18): 6096-101

- Harris R.E., Alshafie G.A., Abou-Issa H., Seibert K. (2000)
Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor.
Cancer Res Apr 15; 60(8): 2101-3
- Harris R.E., Kasbari S., Farrar W.B. (1999)
Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer.
Oncol Rep Jan-Feb; 6(1): 71-3
- Harris R.E., Namboodiri K.K., Farrar W.B. (1996)
Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer.
Epidemiology Mar; 7(2): 203-5
- Hatae T., Wada M., Yokoyama C., Shimonishi M., Tanabe T. (2001)
Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta.
J Biol Chem Dec 7; 276 (49): 46260-7
- He T.C., Chan T.A., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1999)
PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.
Cell Oct 29; 99(3): 335-45
- Honn K.V., Meyer J., Neagos G., Henderson T., Westley C., Ratanatharathorn V. (1982)
Control of tumor growth and metastasis with prostacyclin and thromboxane synthetase inhibitors: evidence for a new antitumor and antimetastatic agent (BAY g 6575).
Prog Clin Biol Res 89: 295-331

Hsu SM., Raine L., Fanger H. (1981)

The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques.

Am J Clin Pathol 75: 816-821

Issemann I., Green S. (1990)

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.

Nature Oct 18; 347(6294): 645-50

Jiang W.G., Douglas-Jones A., Mansel R.E. (2003)

Expression of peroxisome-proliferated receptor-gamma (PPARgamma) and the PPARgamma co-activator, PGC-1, in human breast cancer correlates with clinical outcomes.

Int J Cancer Sep 20; 106(5): 752-7

Kaplan E.L., Meier P. (1958)

Nonparametric estimation from incomplete observations.

J Am Stat Assoc 53;457-81

Keith R.L., Miller Y.E., Hoshikawa Y., Moore M.D., Gesell T.L., Gao B.,

Malkinson A.M., Golpon H.A., Nemenoff R.A., Geraci M.W. (2002)

Manipulation of pulmonary prostacyclin synthase expression prevents murine lung cancer.

Cancer Res Feb 1; 62 (3): 734-40

Kierschke T. (1999)

Immunhistochemischer Nachweis von Mistellektin I-Bindungsstellen bei Mammakarzinom und deren Bedeutung als Prognosefaktor.

Medizinische Dissertation, Universität Tübingen

Kilgore M.W., Tate P.L., Rai S., Sengoku E., Price T.M. (1997)

MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisomal response.

Mol Cell Endocrinol May 16; 129(2): 229-35

KuwaMoto S., Inoue H., Tone Y., Izumi Y., Tanabe T. (1997)

Inverse gene expression of prostacyclin and thromboxane synthases in resident and activated peritoneal macrophages

FEBS Lett Jun 9; 409 (2): 242-6

Lala P.K., Al-Mutter N., Orucevic A. (1997)

Effects of chronic indomethacin therapy on the development and progression of spontaneous mammary tumors in C3H/HEJ mice.

Int J Cancer Nov 4; 73(3): 371-80

Leitner S.P., Swern A.S., Weinberger D., Duncan L.J., Hutter R.V. (1995)

Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 Mo).

Cancer Dec 1; 76(11): 2266-74

Lim H., Gupta R.A., Ma W.G., Paria B.C., Moller D.E., Morrow J.D.,
Du Bois R.N., Trzaskos J.M., Dey S.K. (1999)
Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in
the mouse via PPARdelta.
Genes Dev Jun 15; 13(12): 1561-9369

Lumachi F., Ermani M., Brandes A.A., Basso S., Basso U., Boccagli P.
(2001)
Predictive value of different prognostic factors in breast cancer recurrences:
multivariate analysis using a logistic regression model.
Anticancer Res Nov-Dec; 21(6A): 4105-8

Marcus A.J., Weksler B.B., Jaffe E.A. (1978)
Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H₂ and arachidonic
acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells.
J Biol Chem Oct 25; 253 (20): 7138-41

Marcus A.J., Weksler B.B., Jaffe E.A., Broekman M.J. (1980)
Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxide by cultured
human endothelial cells.
J Clin Invest Nov; 66 (5): 979-86

McPherson K., Steel C.M., Dixon J.M. 2000
ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.
BMJ Sep 9; 321(7261): 624-8

Mehl M., Bidmon H.J., Hilbig H., Zilles K., Dringen R., Ullrich V. (1999)
Prostacyclin synthase is localized in rat, bovine and human neuronal brain cells.

Neurosci Lett Aug 27; 271(3): 187-90

Merson M., Andreola S., Galimberti V., Bufalino R., Marchini S., Veronesi U. (1992)

Breast carcinoma presenting as axillary metastases without evidence of a primary tumor.

Cancer Jul 15; 70(2): 504-8

Meuret G (1995)

Pathologische Anatomie der malignen Mammtumoren, S. 5

In: Obrecht J.P., Wetserhausen M., Meuret G., Frommhold H., Westerhausen I., Laffer U.,

N.: Mammacarcinom: Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Nachsorge; 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart

Michael M.S., Badr M.Z., Badawi A.F. (2003)

Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells.

Int J Mol Med Jun; 11(6): 733-6

Michalik L., Desvergne B., Wahli W. (2003)

Peroxisome proliferator-activated receptors beta/delta: emerging roles for a previously neglected third family member.

Curr Opin Lipidol Apr; 14(2): 129-35

Mirza A.N., Mirza N.Q., Vlastos G., Singletary S.E. (2002)
Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years.
Ann Surg Jyn; 235 (1): 10-26

Minckwitz von G., Brunnert K., Costa S.D., Friedrichs K., Jackisch Ch., Gerber B., Harbeck N., Junkermann H., Möbus V., Nitz U., Schaller G., Scharl A., Thomssen Ch., Untch M. (2001)
Evidenz-basierte Empfehlungen zur Primärbehandlung von Mammakarzinomen. Der Konsens der AGO-Organisationskommission 2001.
[www. ago-online.de](http://www.ago-online.de)

Miyata A., Hara S., Yokoyama C., Inoue H., Ullrich V., Tanabe T. (1994)
Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase.
Biochem biophys Res Commun May 16; 200(3): 1728-34

Moncada S., Gryglewski R., Bunting S., Vane J.R. (1976)
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.
Nature Oct 21; 263 (5579): 663-5

Mori H., Sugie S., Rahman W., Suzui N. (1999)
Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats.
Cancer Lett Sep 1; 143(2): 195-8

Mueller E. Sarraf P., Tontonoz P., Evans R.M., Martin K.J., Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B.M. (1998)

Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma.
Mol Cell Feb; 1(3): 465-70

Nakayama T., Soma M., Rahmutula D., Izumi Y., Kanmatsuse K. (1997)

Nonsense mutation of prostacyclin synthase gene in a family.
Lancet Jun 28; 349 (9069): 1887-8

Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996)

P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.
Pharmacogenetics Feb; 6 (1): 1-42

Nemoto T., Natarajan N., Bedwani R., Vana J., Murphy G.P. (1983)

Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons.
Cancer Apr 15; 51(8): 1333-8

Oliva D., Noe A., Nicosia S., Bernini F., Fumagalli R., Whittle B.J., Moncada S., Vane J.R. (1984)

Prostacyclin-sensitive adenylate cyclase in cultured myocytes: differences between rabbit aorta and mesenteric artery.
Eur J Pharmacol Oct 15; 105 (3-4): 207-13

Pereira B., Wu K.K., Wang L.H. (1993)
Bovine prostacyclin synthase: purification and isolation of partial cDNA.
Biochem Biophys Res Commun Dec 30; 197 (3): 1041-1048

Pereira B., Wu K.K., Wang L.H. (1994)
Molecular cloning and characterization of bovine prostacyclin synthase.
Biochem Biophys Res Commun Aug 30; 203 (1): 59-66

Peters J.M., Lee S.S., Li W., Ward J.M., Gavrilova O., Everett C.,
Reitman M.L., Hudson L.D., Gonzalez F.J. (2000)
Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption
of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta).
Mol Cell Biol Jul; 20(14): 5119-28

Pichon M.F., Broet P., Magdelenat H., Dalarue J.C., Spyrtos F., Basuyau
J.P., Saez S., Rallet A., Courriere P., Millon R., Asselain B. (1996)
Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 oper-
able breast cancers.
Br J Cancer Jun; 73(12): 1545-51

Remmele W. (1986)
Mammacarcinom: Prognostisch wichtige Rezeptorbestimmungen.
Dtsch Arztlbl 83: 3359-3362

Robert Koch Institut
[http:// www.rki.de](http://www.rki.de)

- Robertson F.M., Parrett M.L., Joarder F.S., Ross M., Abou-Issa H.M.,
Alshafie G., Harris R.E. (1998)
Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression
and regression of rat mammary carcinomas.
Cancer Lett Jan 9; 122(1-2): 165-75
- Rolland P.H., Martin P.M., Jacquemier J., Rolland A.M., Toga M. (1980)
Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated
prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplas-
tic cells.
J Natl Cancer Inst May; 64(5): 1061-70
- Ruan K.H. (2004)
Advance in understanding the biosynthesis of prostacyclin and thromboxane
A2 in the endoplasmic reticulum membrane via the cyclooxygenase pathway.
Mini Rev Med Chem Aug; 4(6): 639-47
- Saimura M., Fukutomi T., Tsuda H., Sato H., Miyamoto K., Akashi-Tanaka
S., Nanasawa T. (1999)
Prognosis of a series of 763 consecutive node-negative invasive breast can-
cer patients without adjuvant therapy: analysis of clinicopathological pro-
gnostic factor.
J Surg Oncol Jun; 71(2): 101-5

Schapira D.V., Theodossiou C., Lyman G.H. (1999)

The effects of NSAIDs on breast cancer prognostic factors.

Oncol Rep Mar-Apr; 6(2): 433-5

Schirner M., Lichtner R.B., Graf H., Schneider M.R. (1997)

Efficacy of cicaprost on metastasis in advanced tumor disease.

Adv Exp Med Biol; 400B: 751-6

Schneider M.R., Schirner M., Lichtner R.B., Graf H. (1996)

Antimetastatic action of the prostacyclin analogue cicaprost in experimental mammary tumors.

Breast Cancer Res Treat; 38(1): 133-41

Sharpe C.R., Collet J.P., McNutt M., Belzile E., Boivin J.F., Hanley J.A. (2000)

Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage.

Br J Cancer Jul; 83(1): 112-20

Siegel S., Castellan's J.N. (1988)

Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences.

2nd ed: 284–291

McGraw-Hill

Siegle I., Klein T., Backman J.T., Saal J.G., Nusing R.M., Fritz P. (1998)

Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases.

Arthritis Rheum Jan; 41(1): 122-9

Siegle I., Klein T., Zou M.H., Fritz P., Komhoff M. (2000)
Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain.
J Histochem Cytochem May; 48(5): 631-41

Sinn H.P., Magener A., Durr F., Harcos A., von Minckwitz G. (2001)
Predictive and prognostic factors in breast cancer evaluated by immunohistological methods.
Verh Dtsch Ges Pathol; 85: 200-5

Skidgel R.A., Printz M.P. (1978)
PGIS production by rat blood vessels: diminished prostacyclin formation in veins compared to arteries.
Prostaglandins Jul; 16 (1): 1-16

Smith W.L., De Witt D.L., Allen M.L. (1983)
Bimodal distribution of the prostaglandin I₂ synthase antigen in smooth muscle cells.
J Biol Chem May 10; 258(9): 5922-6

Smith D.L. (1986)
Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells.
Annu Rev Physiol; 48: 251-62

Sotiriou C., Lacroix M., Lagneaux L., Berchem G., Body J.J. (1999)
The aspirin metabolite salicylate inhibits breast cancer cells growth and their synthesis of the osteolytic cytokines interleukins-6 and -11.
Anticancer Res Jul-Aug ; 19(4B): 2997-3006

Spisni E., Bartolini G., Orlandi M., Belletti B., Santi S., Tomasi V. (1995)
Prostacyclin (PGIS) synthase is a constitutively expressed enzyme in human
endothelial cells.

Exp Cell Res Aug; 219(2): 507-13

Spisni E., Griffoni C., Santi S., Riccio M., Marulli R., Bartolini G.,
Toni M., Ullrich V., Tomasi V. (2001)
Colocalization prostacyclin (PGI₂) synthase—caveolin-1 in endothelial cells
and new roles for PGI₂ in angiogenesis.

Exp Cell Res May 15; 266(1): 31-43

Stephen R.L., Gustafsson M.C., Jarvis M., Tatoud R., Marshall B.R.,
Knight D., Ehrenborg E., Harris A.L., Wolf C.R., Palmer C.N. (2004)
Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates
the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines.

Cancer Res May 1; 64(9): 3162-70

Terry M.B., Gammon M.D., Zhang F.F., Tawfik H., Teitelbaum S.L.,
Britton J.A., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J., Neugut A.I. (2004)
Association of frequencies and duration of aspirin use and hormone receptor
status with breast cancer risk.

JAMA May 26; 291(20): 2433-40

Thor A.D., Liu S., Moore D.H., Edgerton S.M. (1999)
Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-
1 assays to quantitate proliferation in breast cancer.

J Clin Oncol Feb; 17(2): 470-7

Thun M.J., Namboodiri M.M., Heath C.W. (1991)
Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.
N Eng J Med Dec 5; 325(23): 1593-6

Thun M.J. (1996)
NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers.
Gastroenterol Clin North Am Jun; 25(2): 333-48

Tone Y., Inoue H., Hara S., Yokoyama C., Hatae T., Oida H., Narumiya S.,
Shigemoto R., Yukawa S., Tanabe T. (1997)
The regional distribution and cellular localization of mRNA encoding rat
prostacyclin synthase.
Eur J Cell Biol Mar; 72(3): 268-77

Vamecq J, Latruffe N. (1999)
Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors.
Lancet Jul 10; 354(9173): 141-8

Vassaux G., Gaillard D., Darimont C., Ailhaud G., Negrel R. (1992)
Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and
prostaglandin E2: physiological implications.
Endocrinology Nov; 131(5): 2393-8

Veronesi U., Marubini E., Del Vecchio M., Mannari A., Andreola S., Greco
M., Luini A., Merson M., Saccozzi R., Rilke F; et al (1995)
Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer
treatments: partly independent events.
J Natl Cancer Inst Jan 4; 87(1): 19-27

Wachholz J. (2000)

Quantitative immunohistochemische Angiogenesebestimmung beim Mammacarcinom.

Medizinische Dissertation, Universität Tübingen

Weißert M.O. (2000)

Quantitative immunohistochemische Bestimmung von Epoxidhydrolase als Prognosefaktor beim Mammacarcinom.

Medizinische Dissertation, Universität Tübingen

Whittle B.J., Moncada S. (1984)

Prostacyclin and its analogues for the therapy of thromboembolic disorders.

Adv Exp Med Biol; 164: 193-209

Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S., Vane J.R., Johnson R.A., Morton D.R., Kinner J.H., Gorman R.R., McGuire J.C., Sun F.F. (1976)

The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin)

Prostaglandins Dec; 12(6): 915-28

WHO (1981)

Histological typing of breast tumours. 2 nd. Ed. International Histological Classification of Tumours, No. 2.

World Health Organization, Geneva

Yee L.D., Sabourin C.L., Liu L., Li H.M., Smith P.J., Seewaldt V., Kniss D.A. (1999)

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human breast cancer.

Int J Oncol Nov; 15(5): 967-73

Yildirim E., Dalgic T., Berberoglu U. (2000)

Prognostic significance of young age in breast cancer.

J Surg Oncol Aug; 74(4): 267-72

7. Anhang

Anhang A = Erhebungsbogen für die Mammacarcinomstudie
zur Datenerfassung der Patientendaten im Archiv

Anhang B = Katamnestischer Erhebungsbogen für die behandelnden Ärzte

Anhang C = Photographische Aufnahmen

Anhang A

Robert-Bosch-Krankenhaus

Abteilung für Gynäkologie u. Geburtshilfe / Prof. Dr. Simon

Zentrum für Diagnostische Pathologie / Dr. Fritz

Abteilung für Chirurgie / Prof. Dr. Thon

Abteilung für Hämatologie / Prof. Dr. Aulitzky

Marienhospital

Abteilung für Gynäkologie u. Geburtshilfe / Prof. Dr. Herschlein

Abteilung für Chirurgie / Prof. Dr. Bittner

Erhebungsbogen für Mammakarzinomstudie

Thema: Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

HV 97 / 02

Thomas Kierschke, Jörg Wachholz, Matthias Weißert

Lfd. Nummer:

Krankenhaus		
Behandelndes Krankenhaus:	RBK <input type="checkbox"/>	MH <input type="checkbox"/>
Behandelnder Arzt:		

Persönliche Daten		
Nachname:		
Vorname:		
Straße:		
Wohnort:		
Telefon:		
Geburtsdatum:		
Staatsangehörigkeit:		
Journalnummer:		Präparat-Nr. <input type="checkbox"/>

Hausarzt	
Name:	
Vorname:	
Straße:	
Wohnort:	
Telefon:	

Frauenarzt	
Name:	
Vorname:	
Straße:	
Wohnort:	
Telefon:	

Klinische Daten				
Familienstand:	ledig <input type="checkbox"/>	verheiratet <input type="checkbox"/>	verwitwet <input type="checkbox"/>	geschieden <input type="checkbox"/>
Zahl der Kinder:				nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Zahl der Schwangerschaften:				nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Alter beim 1. Kind:				nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Stillzeiten:	ja <input type="checkbox"/> Anzahl der Monate: _____	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Menarche:	_____ Lebensjahr			nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Menopause:	_____ Lebensjahr			nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Frühere Mastopathie:	ja <input type="checkbox"/> Datum :	nein <input type="checkbox"/>		nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Hormonelle Antikonzeptiva:	ja <input type="checkbox"/> Dauer :	nein <input type="checkbox"/>		nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Familiäre Karzinom-Belastung:	ja <input type="checkbox"/> Art :	nein <input type="checkbox"/>		nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Alter bei Auftreten des Tumors bzw. der Operation:	_____ Lebensjahr	praemenopausal <input type="checkbox"/>	postmenopausal <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Diabetikerin:	ja <input type="checkbox"/>		nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Gewicht:	_____ kg			nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Größe:	_____ cm			nicht bekannt <input type="checkbox"/>

Histologischer Befund				
Lokalisation des Tumors:				
Histologischer Typ:				
<input type="checkbox"/> invasiv-duktral <input type="checkbox"/> invasiv-lobulär <input type="checkbox"/> inflammatorisch <input type="checkbox"/> sonstige :				
Tumorgroße:				
Gesamtzahl der entfernten Lymphknoten:		nicht bekannt <input type="checkbox"/>		Davon mikroskop. befallen :
TNM:	pT:	pN:	pM:	G:
Fernmetastasen:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
ICD-0-DAM:				

Laborwerte zum Zeitpunkt der Primärtumor-Operation				
Hb:	_____ g/l			
Erythrozyten:	_____ Mio/mm ³			
BSG:	_____ 1h-Wert			
Leukozyten:	_____ 1/mm ³			
Calcium:	_____ mmol/l			
LDH:	_____ U/l			
AP:	_____ U/l			
Östrogenrezeptoren:	__ fmol/mg	positiv <input type="checkbox"/>	negativ <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>
Progesteronrezeptoren:	__ fmol/mg	positiv <input type="checkbox"/>	negativ <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>
CEA:	_____ µg/l	CA-15-3:	_____ µg/l	CA-125 : _____ µg/l

Art der Therapie			
	Datum		Art/Dosis
Operative Therapie:		ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>	Mastektomie, Ablatio mammae:
		ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>	Brusterhaltende OP:
		ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>	Axilladissektion:
andere:			
Radiotherapie:			

Adjuvante Therapie			
Chemotherapie :			
	<i>Substanz I:</i>	<i>Substanz II:</i>	<i>Substanz III:</i>
Dosis:			
Zahl der Zyklen:			
Datum:	Beginn :	Ende :	
Hormontherapie :			
Präparat:	<input type="checkbox"/> Tamoxifen <input type="checkbox"/> andere:		
Datum:	Beginn :	Ende:	

Palliative Therapie			
Chemotherapie :			
	<i>Schema/Therapie I:</i>	<i>Schema/Therapie II:</i>	<i>Schema/Therapie III:</i>
Substanz:			
Zahl der Zyklen:			
Datum:	Beginn: Ende:	Beginn: Ende:	Beginn: Ende:
Response:	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression
	<input type="checkbox"/> keine Angaben	<input type="checkbox"/> keine Angaben	<input type="checkbox"/> keine Angaben

Hormontherapie:			
Präparat:			
Datum:	Beginn: Ende:	Beginn: Ende:	Beginn: Ende:
Response:	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression	<input type="checkbox"/> komplette Remission <input type="checkbox"/> partielle Remission <input type="checkbox"/> keine Veränderung <input type="checkbox"/> Progression
	<input type="checkbox"/> keine Angaben	<input type="checkbox"/> keine Angaben	<input type="checkbox"/> keine Angaben

Entwicklung der Krankheit				
Tumorzeichen:				
Lokales Rezidiv:		ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	
		Datum:		
Fernmetastasen:				
<i>Ort:</i>				<i>Datum:</i>
Lunge:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Leber:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Knochen:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
ZNS:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Haut:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Weichteile:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Abdomen:	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	nicht bekannt <input type="checkbox"/>	
Andere:				
Falls Patientin verstorben:				
<input type="checkbox"/> Todesursache nicht bekannt				
<input type="checkbox"/> an Tumorleiden				
<input type="checkbox"/> an Lungenembolie				
<input type="checkbox"/> an sonstiger Erkrankung				
Todesdatum:				

Anhang B

Katamnestische Erhebung zu nachfolgendem Mammakarzinomfall:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

OP-Datum:

J-Nr.:

Die Patientin:

lebt *ohne* Rezidiv

lebt *mit* Rezidiv

ist verstorben

Bei Auftreten eines Rezidivs:

Lokalrezidiv: nein ja

Datum: _____

Fernmetastasen: nein ja

Datum: _____

Ort: _____

Kommentar: _____

Falls die Patientin verstorben ist:

Zeitpunkt des Todes: _____

Der Tod steht

in *direkter* Beziehung zum Mammakarzinom

in *indirekter* Beziehung zum Mammakarzinom

in *keiner* Beziehung zum Mammakarzinom

Kommentar: _____

Therapie außer der uns bekannten hier aufgeführten:

Hormontherapie:

Chemotherapie:

Radiotherapie:

Hormontherapie: nein ja

Zeitraum: _____

Präparat(e): _____

Chemotherapie: nein ja

Zeitraum: _____

Schema: _____

Radiotherapie: nein ja

Zeitraum: _____

Dosis: _____

Sonstige Therapien oder Medikationen: _____

Ansprechverhalten auf die Therapie: _____

Kommentar: _____

Anhang C: photographische Aufnahmen

Abb. 13: Nachweis der Prostacyclinsynthese in Gefäßen

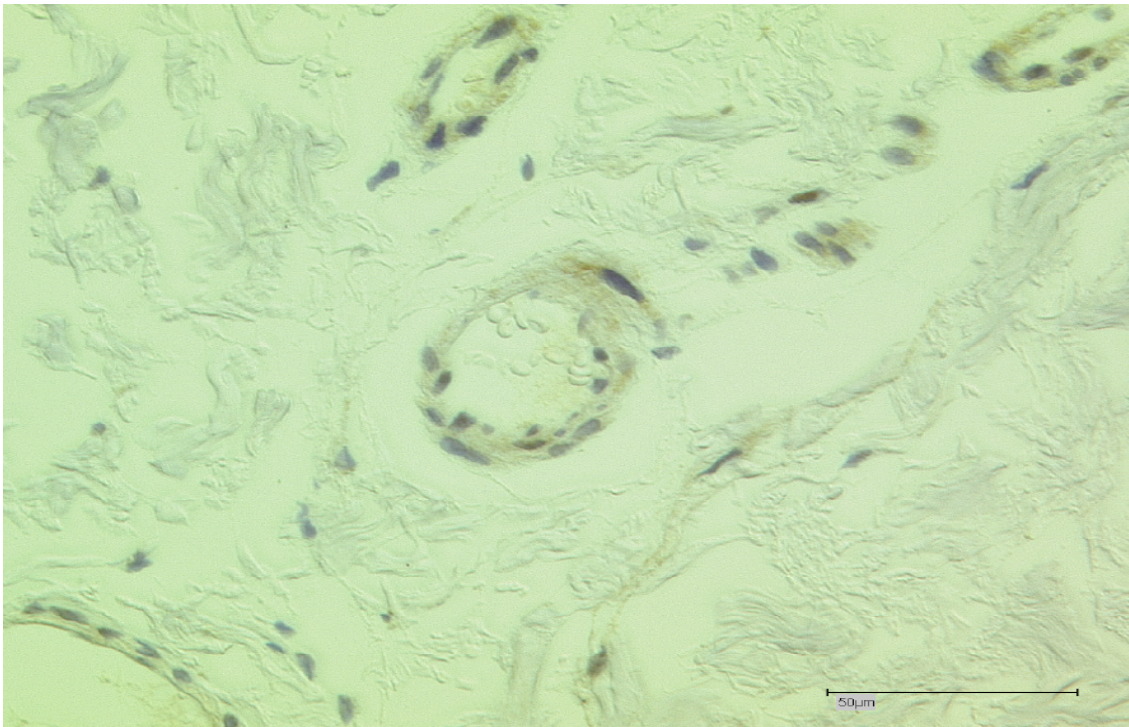


Abb. 14: Nachweis der Prostacyclinsynthese in einem Gefäß

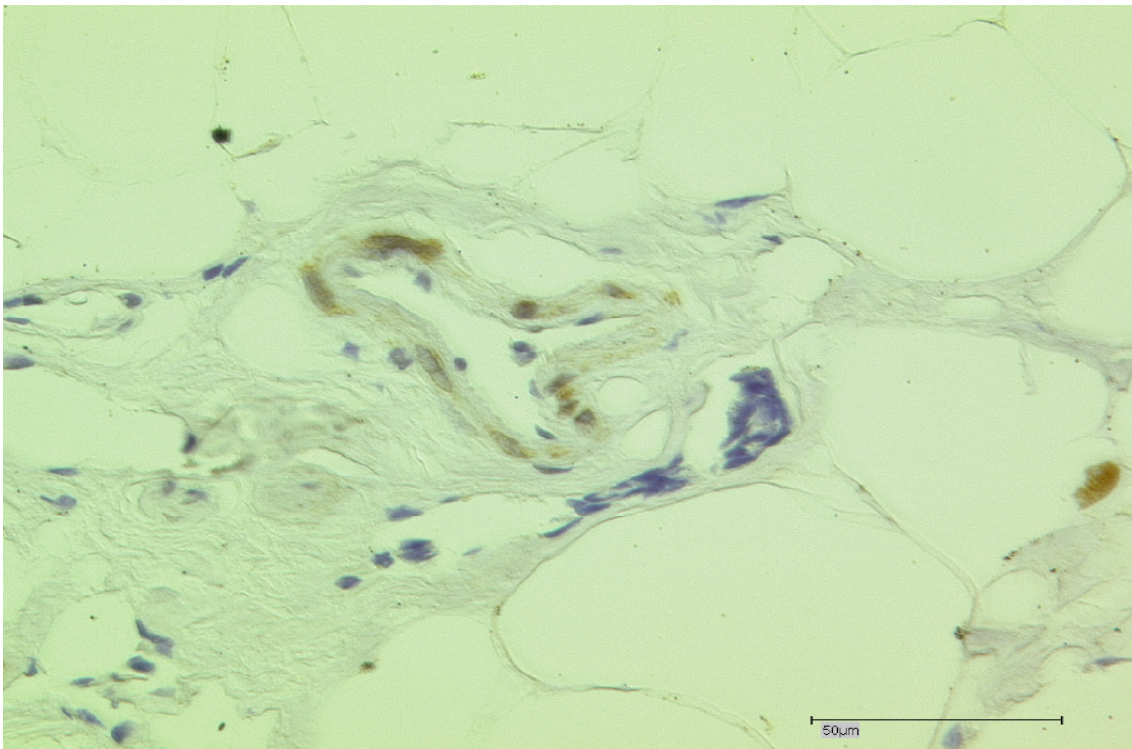


Abb. 15: Nachweis der Prostacyclinsynthese in Fibroblasten

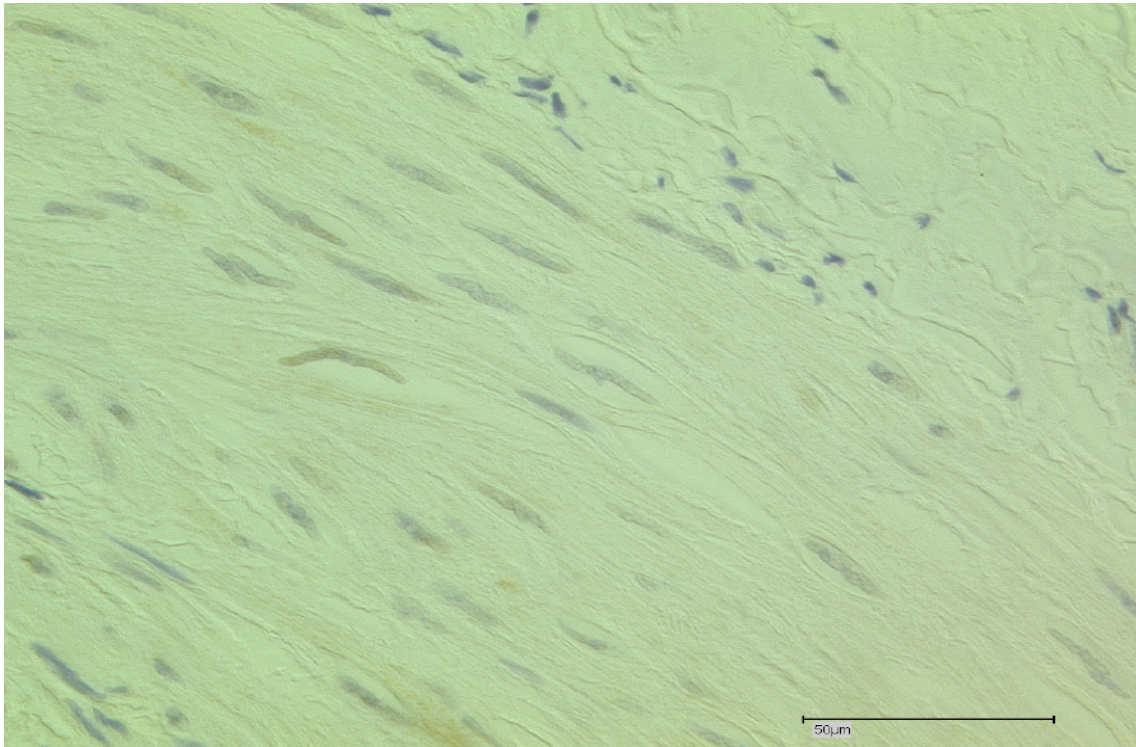


Abb. 16: Nachweis der Prostacyclinsynthese in Fibroblasten

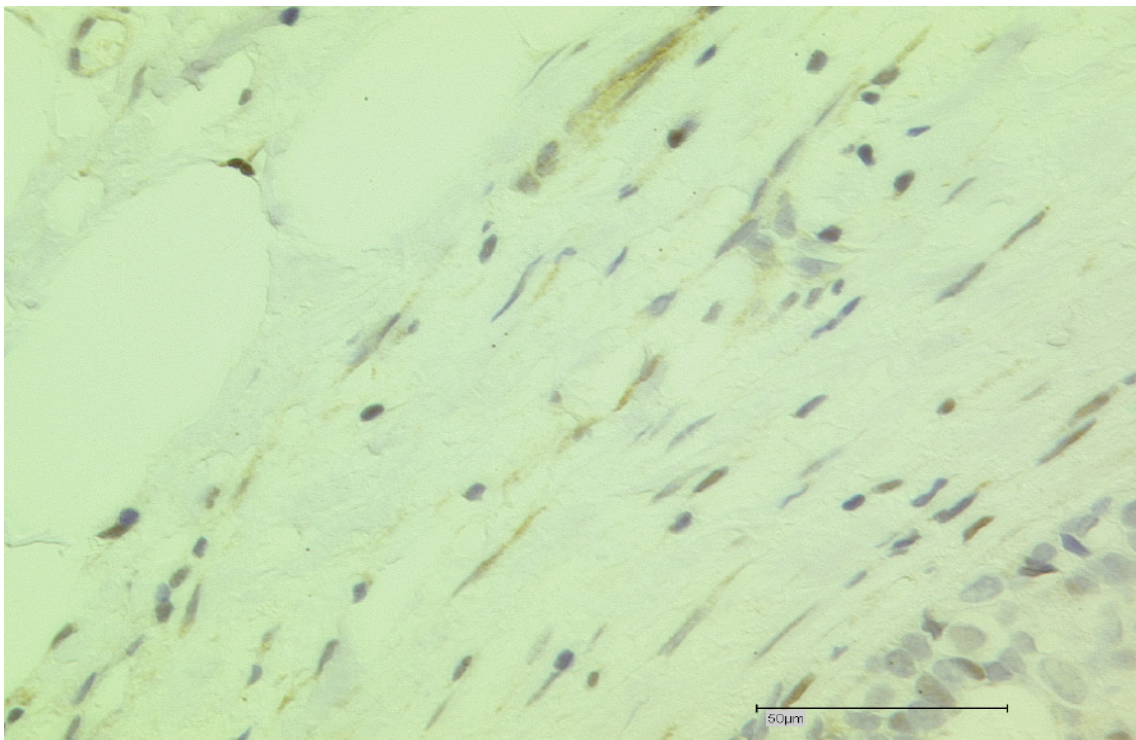


Abb. 17: Nachweis der Prostacyclinsynthese in Fibroblasten

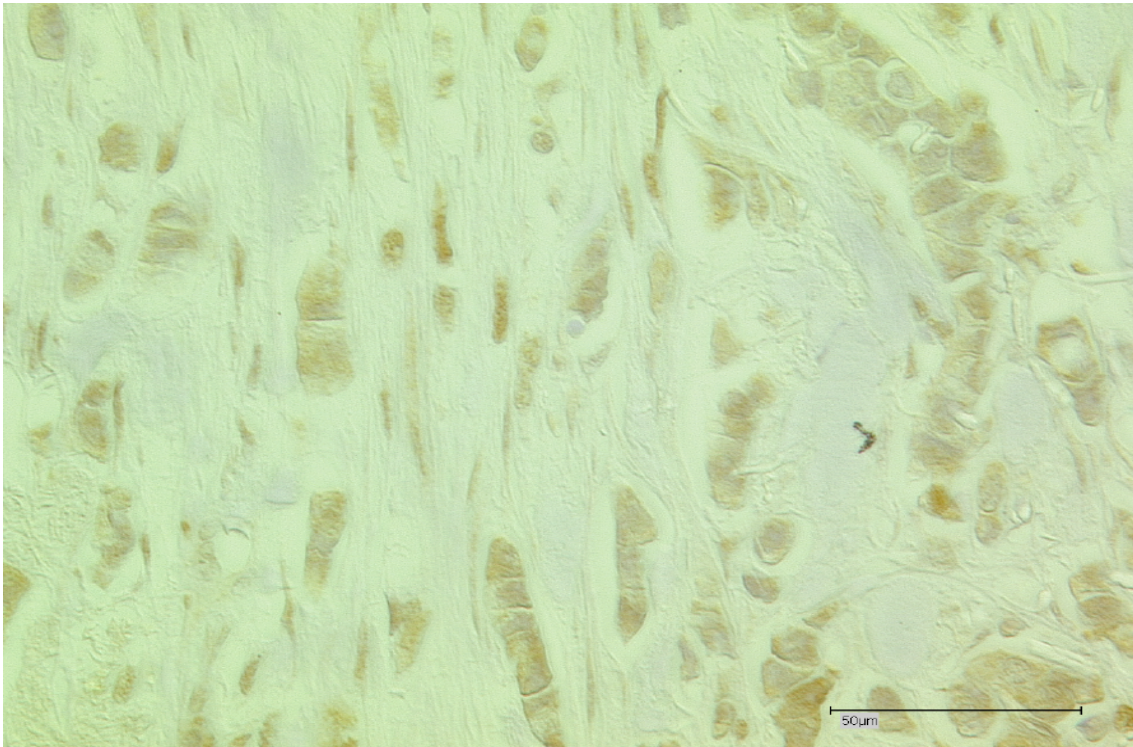


Abb. 18: mäßiger Nachweis der PGIS in Entzündungszellen

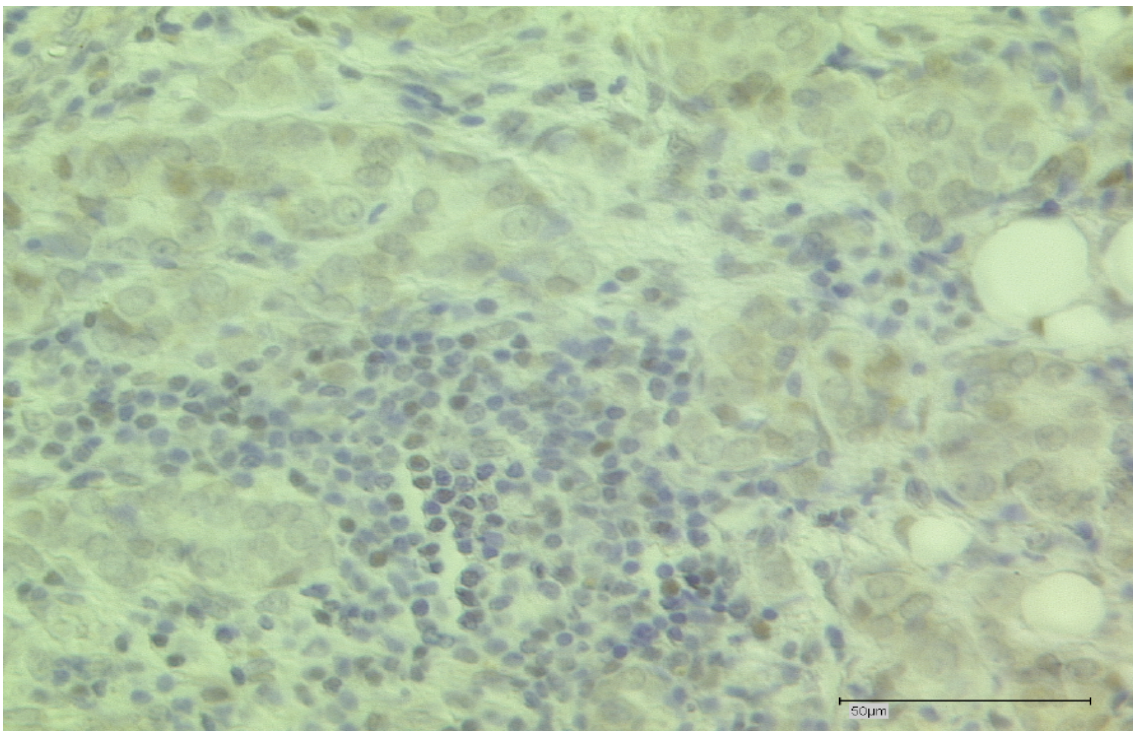


Abb. 19: Nachweis der PGIS in Entzündungs- und Plasmazellen

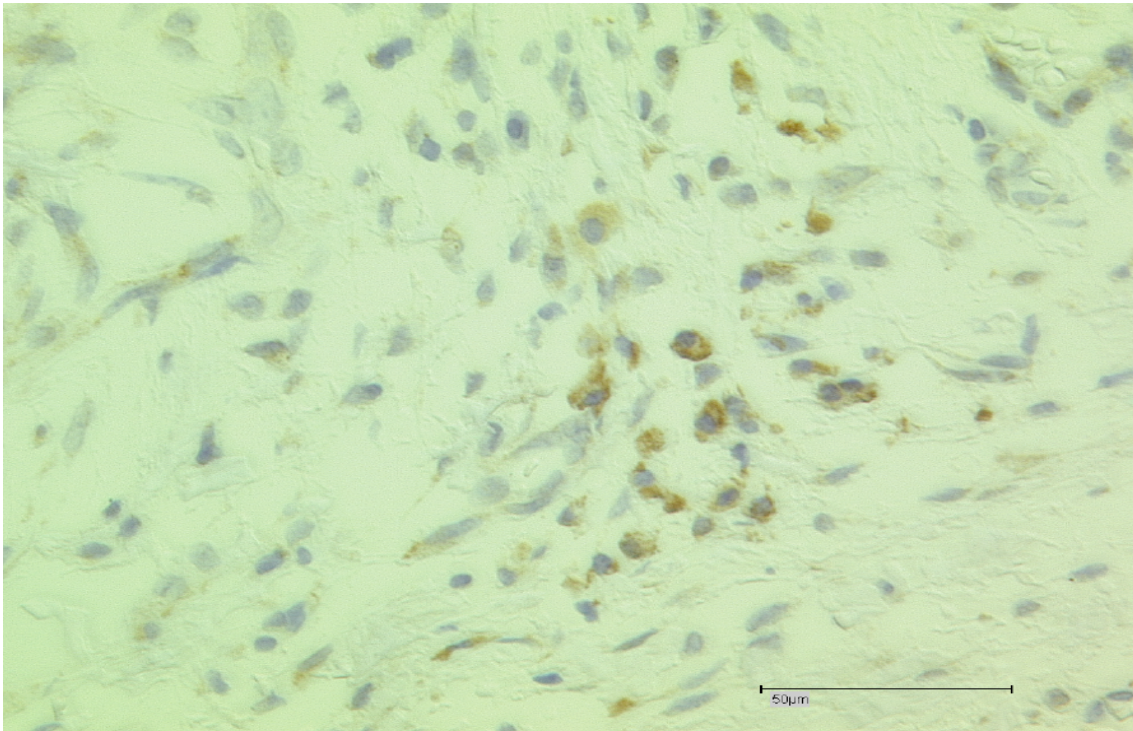


Abb. 20: Nachweis der PGIS in Entzündungs- und Plasmazellen

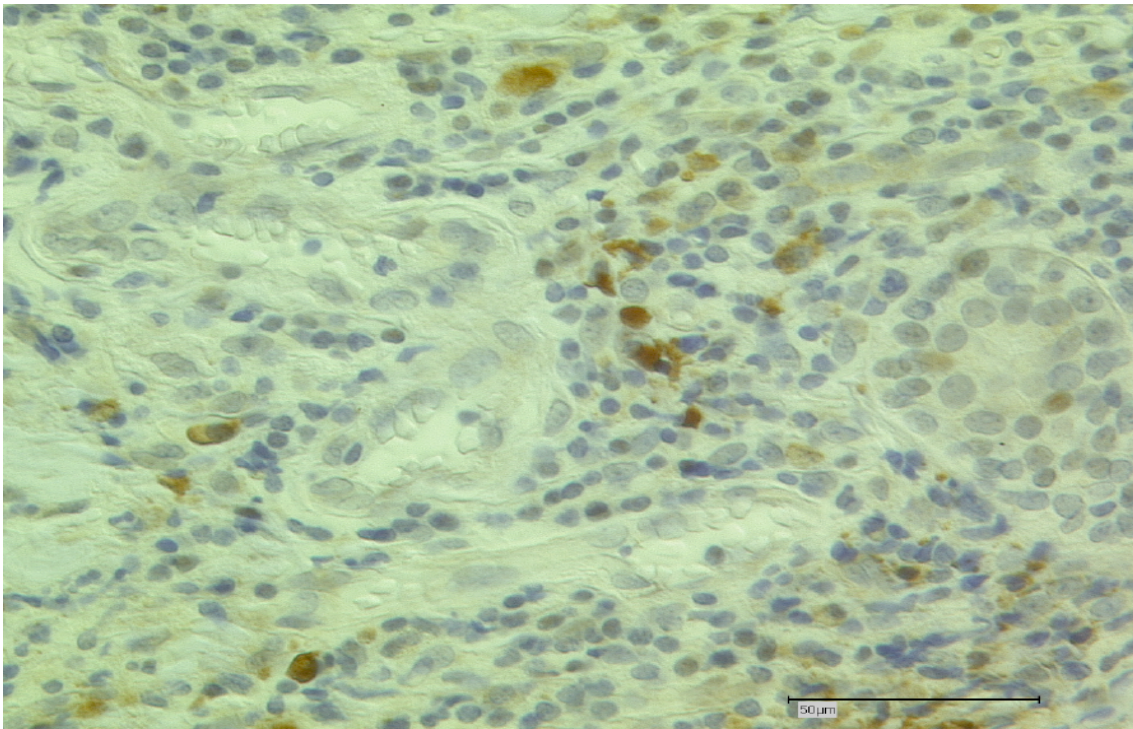


Abb. 21: starker Nachweis der PGIS in Entzündungs- und Plasmazellen

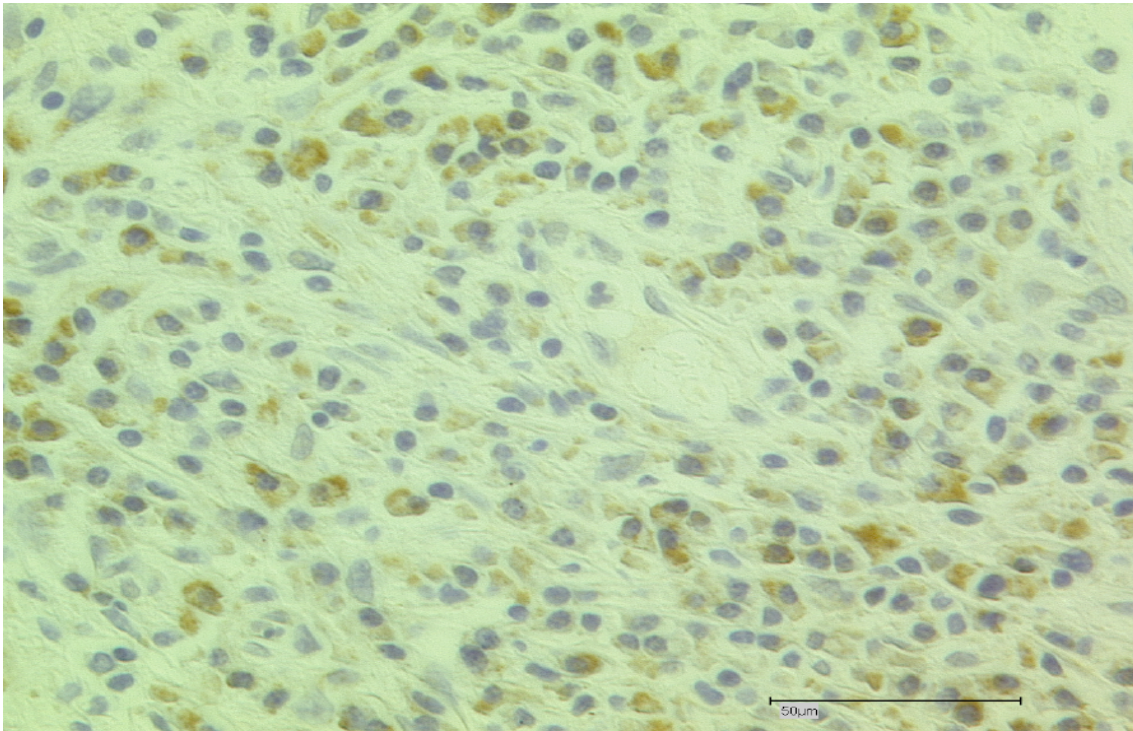


Abb. 22: starker Nachweis der PGIS in Entzündungs- und Plasmazellen

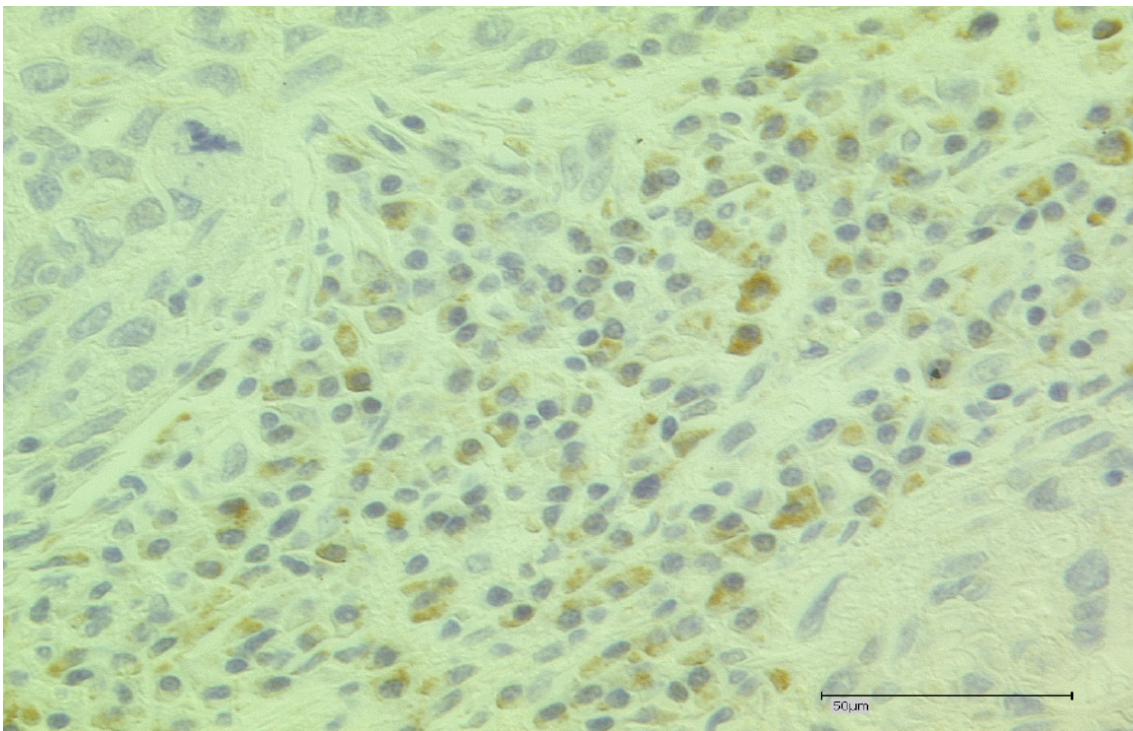


Abb. 23: invasiv-duktales Mammacarcinom, IRS 9, keine Kernfärbung

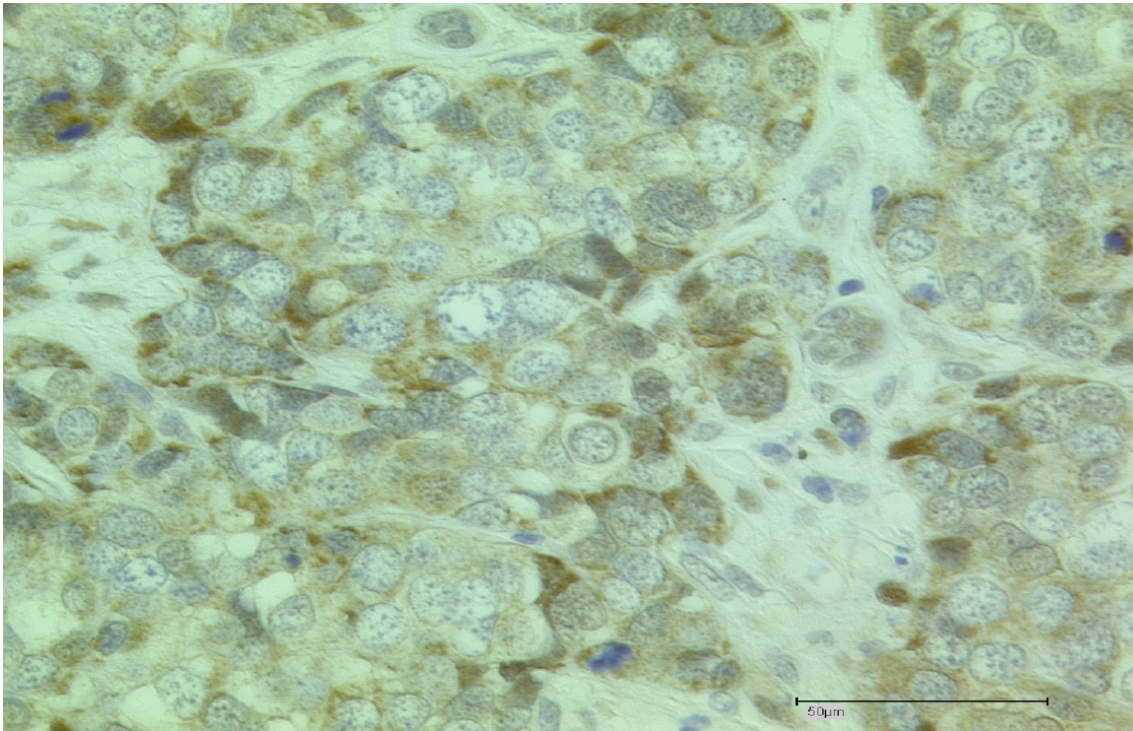


Abb. 24: invasiv-duktales Mammacarcinom, IRS 9, keine Kernfärbung

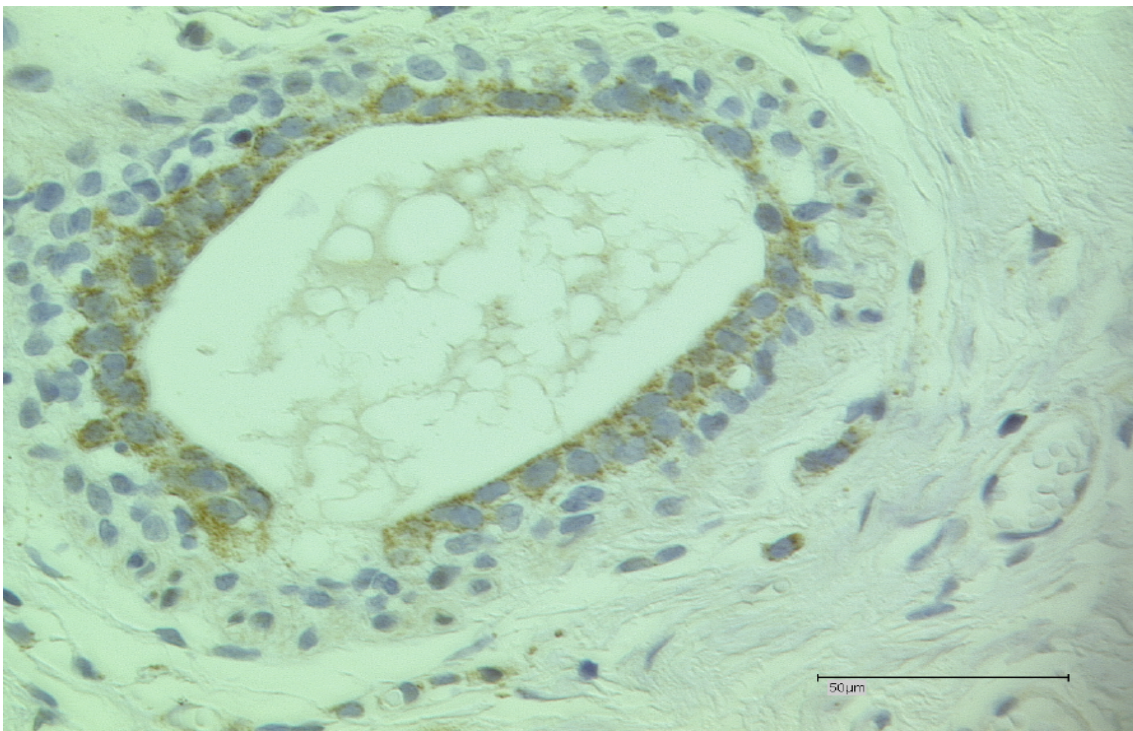


Abb. 25: invasiv-duktales Mammacarcinom, IRS 6, Kernfärbung vorhanden

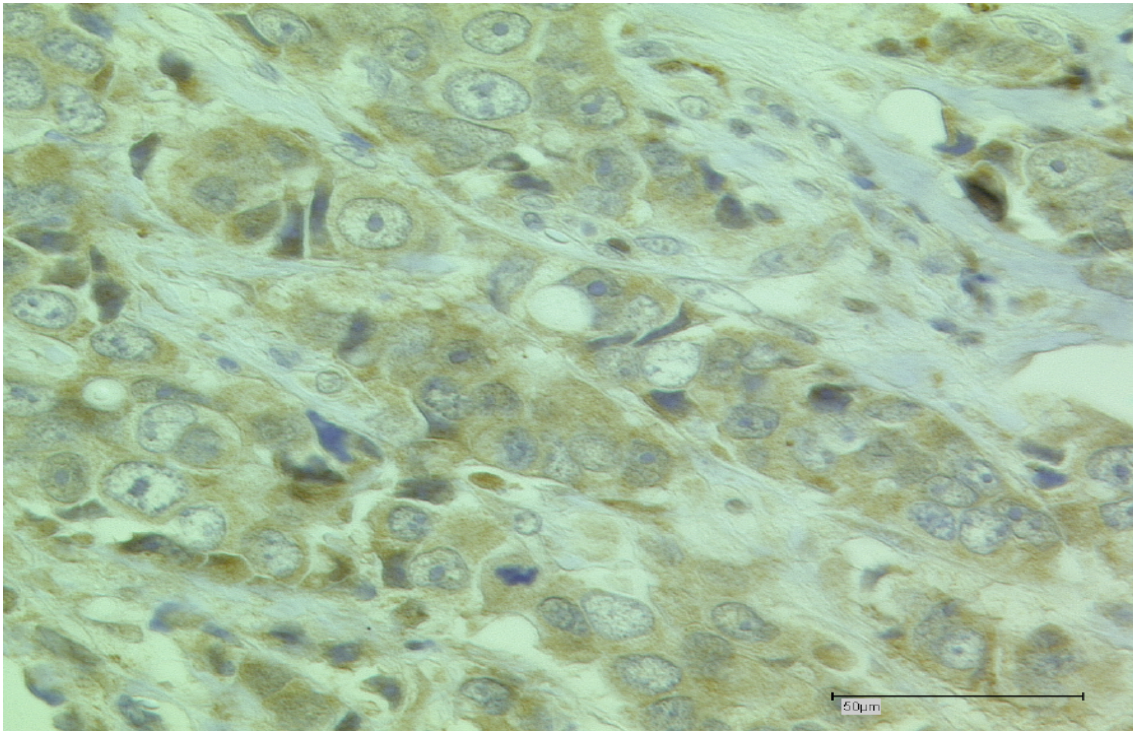


Abb. 26: invasiv-duktales Mammacarcinom, IRS 2, Kernfärbung vorhanden

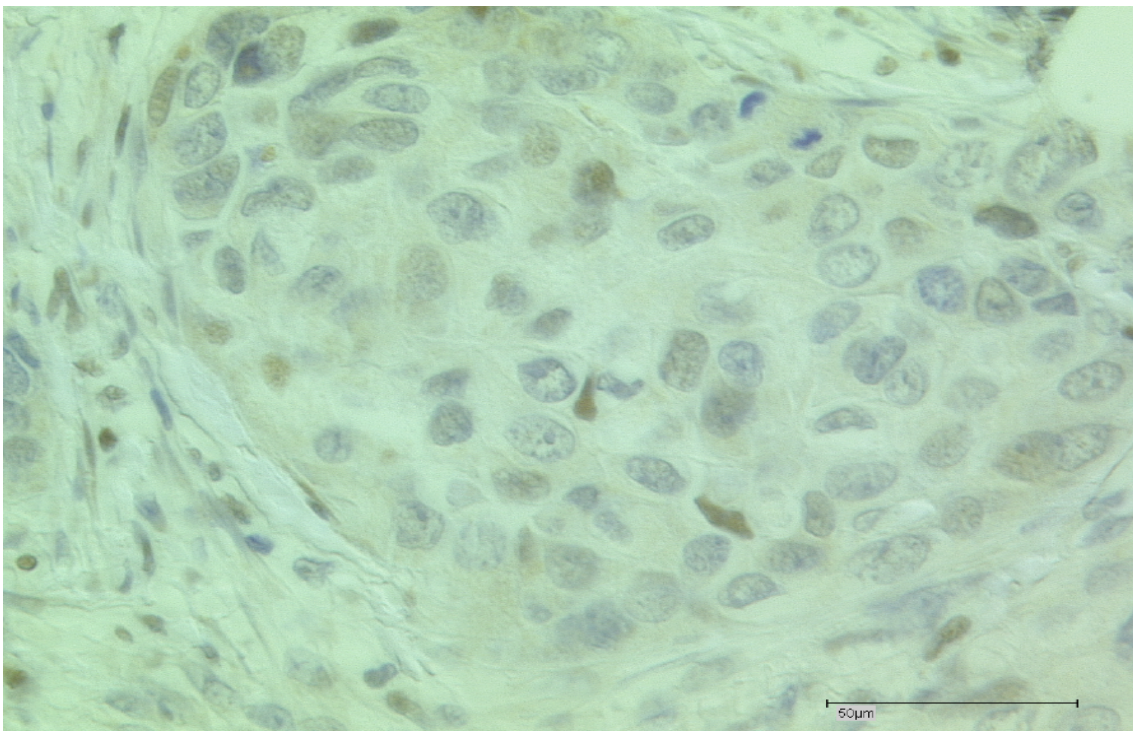


Abb. 27: invasiv-lobuläres Mammacarcinom, IRS6, mit Kernfärbung

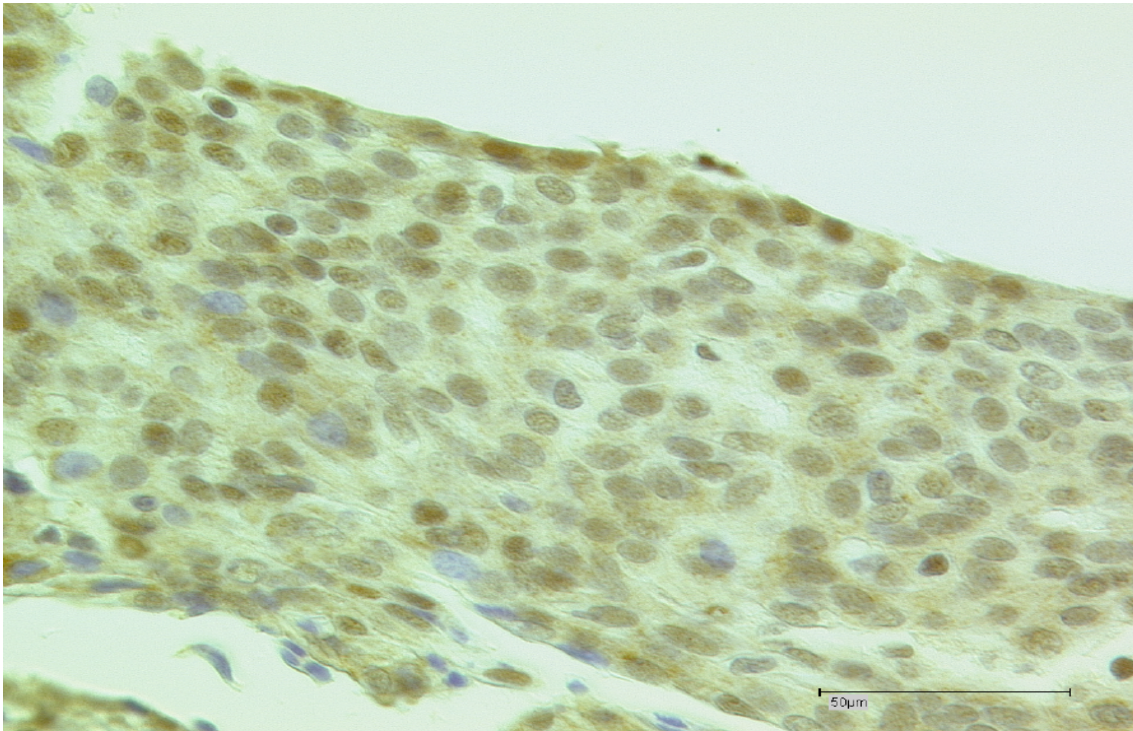


Abb. 28: invasiv-lobuläres Mammacarcinom, IRS6, mit Kernfärbung

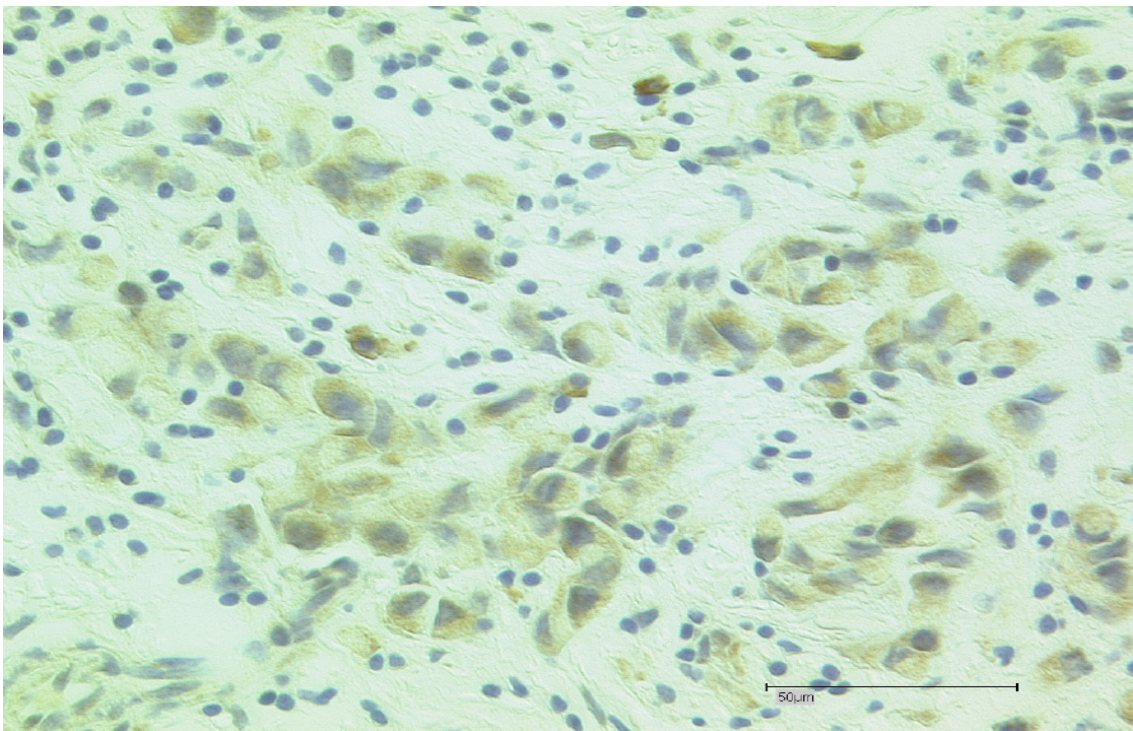
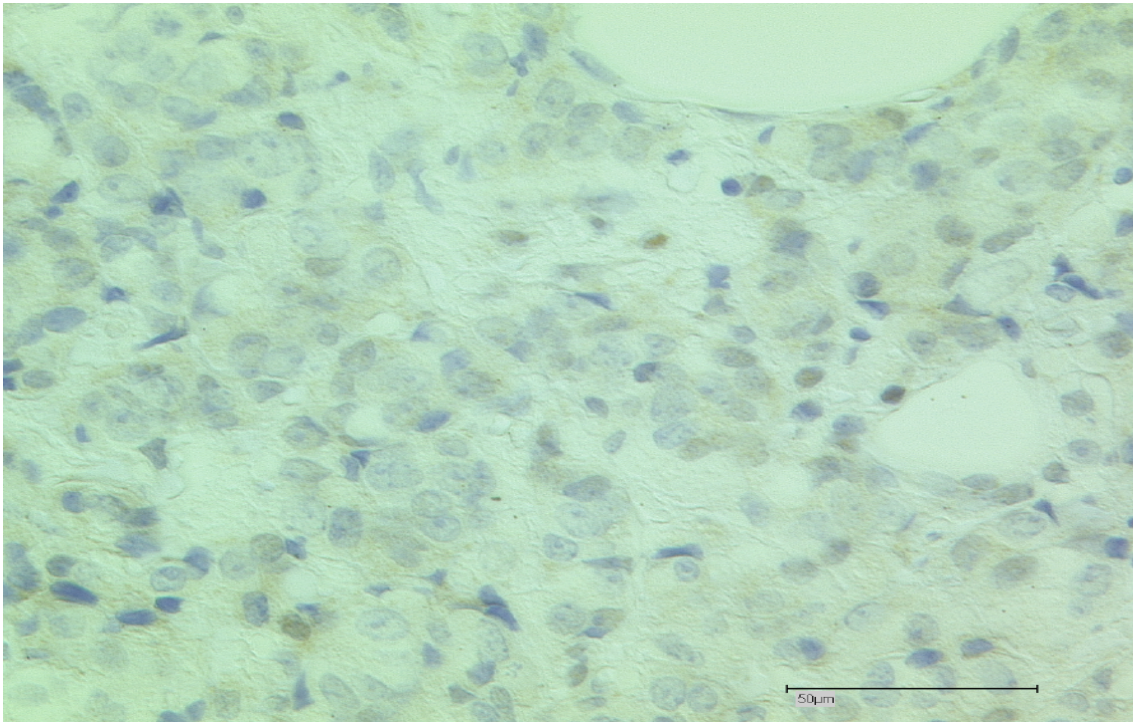


Abb. 29: invasiv-lobuläres Mammacarcinom, IRS3, keine Kernfärbung



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Simon für die Überlassung und Betreuung des Themas danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. P. Fritz für die Unterstützung und intensive Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch Krankenhaus Stuttgart, vor allem bei Frau McClellan, Frau Gutzeit und Frau Dr. I. Siegle für die Unterstützung bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei all den hier nicht erwähnten Menschen bedanken, welche es mir ermöglicht haben, neben Beruf und Familie diese Arbeit durchzuführen.

curriculum vitae

Suzanne Cathrin Luise Hindennach, geb. Steinel

geboren am 05. Juli 1963 in Aalen / Baden-Württemberg

Familienstand:

verheiratet, 2 Kinder

Vater: Herbert Steinel, Dipl. Ing., 2002 verstorben

Mutter: Marie-Therese Steinel

Schulbildung und Studium:

1970 - 1974	Besuch der Grundschule
1974 – 1983	Besuch des Gymnasiums
1983	Abitur

Studium:

<u>1984 – 1991</u>	<u>Studium an der Universität Tübingen</u>
1986	Physikum
1987	1. Staatsexamen
1990	2. Staatsexamen
14.05.1991	3. Staatsexamen

Beruf

<u>1992 – 2001</u>	<u>Ärztin an der Gyn. Abteilung des Robert-Bosch Krankenhauses / Stuttgart</u>
1992 – 1993	Ärztin im Praktikum
1993 – 1996	Assistenzärztin
1996 – 1997	Erziehungsurlaub
1998	Assistenzärztin
12 / 1998	Facharztprüfung
1998 – 1999	Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe
1999 – 2001	Erziehungsurlaub
2001 – 2003	Praxisvertretungen
2003 – 2004	Jobsharing
seit 4 / 2004	eigene KV-Zulassung in Gemeinschaftspraxis für Gynäkologie und Geburtshilfe