

Vergleich der Immunhistochemischen Bestimmung des
Steroidrezeptorstatus im Paraffin- und Gefrierschnitt beim Mammakarzinom

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christian Philipp Spannagel
aus Hagen

Giessen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Universitätsklinikums Giessen

Leiter:
Prof. Dr. med. H.-R. Tinneberg

Gutachter: PD Dr. med. Münstedt

Gutachter: Prof. Dr. med. Schachenmayr

Tag der Disputation: 24. 07. 2003

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	Seite	6
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren		6
1.2 Ätiologie und Pathogenese		6
1.3 Histologie und Grading		7
1.4 Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren		9
1.5 Der Einfluss der Steroidhormone Östrogen und Progesteron auf das Mammakarzinom		12
1.6 Hormontherapie		14
1.7 Der Stellenwert der Steroidrezeptorbestimmung		15
1.8 Diagnostik		16
1.9 Therapie		17
2 Fragestellung		21
3 Patientenkollektiv, Materialien und Methoden		22
3.1 Das Gießener Mammakarzinom Gefrierschnitt Kollektiv		22
3.2 Methodik		27
3.3 Immunhistochemie		29
3.4 Statistik		36
4 Ergebnisse		38
4.1 Immunhistologisches Reaktionsmuster		38
4.2 Reaktionsmuster des Östrogenrezeptors		39
4.3 Reaktionsmuster des Progesteronrezeptors		44
4.4 Vergleich der Steroidrezeptorexpression mit dem klinischen Bild		49
4.5 Äussere Einflussgrößen auf die Steroidrezeptorexpression		54
5 Diskussion		57
5.1 Methodische Standortbestimmung		57
5.2 Vergleich der Immunreaktiven Score (IRS)- Werte		61
5.3 Intensität der Immunfärbung und Anteil der exprimierenden Zellen		64
5.4 Beziehungen zu klinisch-pathologischen Parametern		66
6 Bildanhang		69
7 Literaturverzeichnis		73

8 Danksagung	81
9 Lebenslauf	82
10 Zusammenfassung	84

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist mit 19-22 % aller Krebserkrankungen der häufigste maligne Tumor der Frau (Schmidt-Matthiesen, 1997). In der Bundesrepublik Deutschland erkranken ca. 8-9 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom, was etwa 45000 Fällen im Jahr entspricht (Kaufmann et al., 2000). Mit 18 % aller Krebstoten ist es hinter dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Ursache für den Krebstot der Frau (Boring et al., 1994). Beim Mann ist der Brustkrebs mit weniger als ein Prozent aller Fälle eine Rarität (Riede und Wittekind, 1993). Die Inzidenz und Mortalität variieren nach regionaler Herkunft unterschiedlich und schwanken hinsichtlich der Mortalität zwischen weniger als 6 in Japan und fast 30 in England und Wales (Aoki et al., 1992). Auch Unterschiede zwischen ethnischen Gruppen sind deutlich; weiße Amerikanerinnen erkranken deutlich häufiger am Brustkrebs als Amerikanerinnen schwarzer, lateinamerikanischer und indianischer Herkunft (Parkin et al., 1992).

Die meisten Mammakarzinome werden im 6. Lebensjahrzehnt entdeckt. Der Anteil der Frauen unter 40 Jahren beträgt ca. 35 %, mit wahrscheinlich zunehmender Tendenz (Schmidt-Matthiesen, 1997).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung des Mammakarzinom ist, wie die der meisten Tumorerkrankungen, multifaktoriell und in ihrem Ablauf immer noch ungeklärt. Man geht davon aus, dass ca. 5-10 % aller Erkrankungen auf genetische Prädisposition zurückzuführen sind. Eine besondere Rolle spielen dabei Trägerinnen einer Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA-1 und BRCA-2. Diese erkranken nach Schätzungen zu 70-90 % am Mamma- und/ oder Ovarialkarzinom (Easton et al., 1993).

Weitere Risikofaktoren sind die Mastopathie III. Grades, Adipositas, ein vorhergehendes Malignom (Ovar, Uterus, Colon), Nullparität oder fortgeschrittenes Alter bei der ersten Geburt, eine frühe Menarche, eine späte Menopause, sowie das Alter (besonders über 50 Jahre). Bei Vorliegen aller dieser Risikofaktoren (außer BRCA 1) liegt ein Erkrankungsrisiko von ca. 50 % vor (Nayfield et al., 1991).

Die Tatsache, dass Karzinome multizentrisch vorkommen können, lässt eine Erkrankung des gesamten laktierenden Systems vermuten.

Die häufigste Lokalisation des Mammakarzinoms ist der obere äußere Quadrant der Brust. Morphologisch imponiert es oft als unscharf begrenzter harter Knoten. Von den zahlreichen Varianten der histologischen Klassifikation sind invasive duktale mit 65-80 % und invasive lobuläre Karzinome mit 10-15 % am häufigsten. Als weitere histologische Typen seien das tubuläre, das papilläre, das mucinöse und das medulläre Karzinom genannt. Diese haben ihr Prädilektionsalter in der Postmenopause und es wird ihnen eine geringere Mortalität gegenüber den beiden häufigen Typen nachgesagt, mit 5-Jahresüberlebensraten von ca. 95 % (Bässler et al., 1997). Alle anderen Karzinomtypen (adenoid-zystisch, sekretorisch, apokrin, glykogenreich, kribriform, etc.) treten in einer Häufigkeit von weniger als ein Prozent auf.

Das Mammakarzinom kann in verschiedene Richtungen wachsen. Bei der vertikalen Ausbreitung wächst das Karzinom in die Tiefe und kann die Pectoralismuskulatur infiltrieren. Ulzerierende Karzinome brechen nach außen durch die Haut und zerfallen oberflächlich (Schmidt-Matthiesen, 1997).

Das Mammakarzinom metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen. Oft kommt es zumindest zur lymphogenen Metastasierung. Sie kann auch gleichzeitig mit der hämatogenen Metastasierung vonstatten gehen. Bei der lymphogenen Metastasierung siedeln sich Karzinome der oberen äußeren Quadranten in den axillären Lymphknoten ab. Bei den inneren Quadranten breiten sich die Tumorzellen durch die Thoraxwand hindurch in die retrosternalen und supraclaviculären Lymphknoten aus. Von dort aus metastasieren sie in die Pleura, das Mediastinum und die kontralaterale Mamma.

Die hämatogene Metastasierung ist abhängig vom Hormonrezeptorstatus. Am häufigsten (ca. 70 %) sind Skelettmetastasen im Becken, den Wirbelkörpern und der Schädelkalotte. Die Primärtumoren sind meist Östrogenrezeptor-positiv (ER+). Östrogenrezeptor-negative (ER-) Tumoren metastasieren meist in die Lunge (60 %), die Leber (50 %) und das Gehirn (Riede und Wittekind, 1993). Typisch für das Mammakarzinom sind die frühzeitige Metastasierung und die langen Laufzeiten. So können Fernmetastasen über Jahre und Jahrzehnte klinisch stumm bleiben.

1.3 Histologie und Grading

Grundlage für die histologische Einteilung der invasiven Mammakarzinome ist die WHO-Klassifikation von 1981, die 1992 nach Rosen und Oberman modifiziert wurde. Sie bezieht sich auf den histologischen Phänotyp des Karzinoms; die pathogenetischen Beziehungen

werden nicht berücksichtigt. Da innerhalb eines Tumor mehrere Komponenten vorkommen können, bezieht sich die diagnostische Nomenklatur auf den dominierenden Teil, gegebenenfalls können wichtige Komponenten gleichartig gewertet werden (z.B. tubulo-lobuläres Karzinom).

Das *invasiv duktales* Karzinom kann sich in verschiedenen histologischen Mustern wie z. B. von Tumorzellen nachgeahmten Drüsenschläuchen oder soliden Zellbalken ausbilden. Das duktales Mammakarzinom imponiert in der Regel durch eine ausgeprägte Kernpolymorphie und infiltrierte das umliegende Fettgewebe der Mamma (Wittekind et al, 1993).

Das *invasiv lobuläre* Karzinom charakterisiert sich im wesentlichen durch seine Kleinzelligkeit, sein diffuses infiltrierendes Wachstum und die begleitende Desmoplasie. Die Tumorzellreihen sind gänsemarschartig angeordnet und von reichlichem Stroma (sog. „szirrhöser Aspekt“) umgeben; des Weiteren umschließen sie häufig die Milchgänge und bilden ein Schießscheibenmuster aus (Wittekind et al., 1993).

Das *invasiv medulläre* Karzinom zeigt trotz eines hohen Kerngradings und einer hohen Mitoserate (zellreich und stromaarm) eine relativ günstige Prognose. Es fällt als gut abgegrenzter markiger Knoten auf. Das Stroma ist meist durch Lymphozyten und Plasmazellen durchsetzt, was mit einer guten Immunabwehr in Verbindung gebracht wird (Wittekind et al., 1993).

Das *muzinöse Karzinom* ist ein Tumor mit gallertartiger Schnittfläche. Die von den Tumorepithelien produzierten Schleimmengen werden größtenteils im Extrazellulärraum deponiert (Wittekind et al., 1993).

Das *papilläre Karzinom* imponiert durch mehrere Zellreihen breiter Epithelzapfen, die papilläre Formationen bilden (Wittekind et al., 1993).

Das *tubuläre Karzinom* besteht aus Gangwucherungen in schlauchförmigen Formationen. Diese Tubuli sind von einer einzigen Reihe uniformer Epithelien austapeziert. Sie sind massiv von sklerosierendem Stroma umgeben und infiltrieren in das umliegende Fettgewebe ein (Wittekind et al., 1993).

Die histologischen und zytologischen Kriterien zur Bestimmung des Malignitätsgrades (Grading) sind Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate. Sie werden nach der Methode von Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis (1991), semiquantitativ bestimmt. Das Grading korreliert eng mit dem Nodalstatus, dem Rezeptorstatus, der Frequenz an Rezidiven und der Mortalität.

Tabelle 1:

Kriterien des Gradings des Mammakarzinom (modifiziert nach Bässler et al., 1992).
Summenscorewerte von 3-5 entsprechen einem geringen Malignitätsgrad; 6 und 7 einem mäßigem, 8 und 9 einem hohen.

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
Tubulusausbildung	>75%	1
	10-75%	2
	< 10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	stark	3
Mitoserate	0-5/ 10 HPF	1
	6-11/ 10 HPF	2
	>/ 10 HPF	3

*HPF= high power field (400 fache Vergrößerung)

1.4 Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren

Aufgaben der Prognosefaktoren ist es, Vorhersagen über den Krankheitsverlauf, wie z.B. Rezidivrisiko, Fernmetastasierung und die Dauer des Überlebens zu ermöglichen. Es gibt über 180 bekannte Prognosefaktoren, wobei zum Teil noch ungeklärt ist, inwiefern sie geeignet sind Risikopatientinnen zu identifizieren und Therapieentscheidungen zu beeinflussen. Bei den sogenannten „klassischen“ Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz handelt es sich um den axillären Lymphknotenstatus, die Morphologie, den Steroidrezeptorstatus und das Menopausenalter. Von den sogenannten neueren Prognosefaktoren hat bislang noch keiner die klinische Behandlungsroutine erreicht.

Ein prädiktiver Faktor hat eine Aussagekraft über das wahrscheinliche Ansprechen einer bestimmten Therapie.

- Zur Bestimmung des Lymphknotenstatus gehört die Erfassung der Anzahl der befallenen Lymphknoten wie auch die Frage, ob der Tumor die Lymphknotenkapsel durchbrochen hat oder nicht. Zur Zeit ist in der Diskussion, ob die Beckenkammstanze mit dem cytologischen Nachweis von Mikrometastasen die Erfassung des axillären Lymphknotenstatus ablösen kann. Für nodal negative Karzinome ist daneben die

Tumorgröße ein wichtiger prognostischer Faktor. Auch morphologische Faktoren wie Grading, histologische Form, Lymphangiosis carcinomatosa und vaskuläre Invasion besitzen eindeutige Beziehungen zum rezidivfreien Überleben (Jänicke et al., 1997).

- Der Steroidrezeptorstatus korreliert mit Wachstumsgeschwindigkeit, dem Grading, der Metastasierung und somit mit der Überlebenszeit der Patientin. Er ist darüber hinaus ein prädiktiver Faktor, da er Aussagen über das Ansprechen einer bestimmten Therapie machen kann, nämlich der Hormontherapie. Bei fehlendem Rezeptornachweis ist eine Hormonrezeptortherapie in den meisten Fällen sinnlos. Es zeigen sich starke Korrelationen zwischen Rezeptorgehalt, Aneuploidie und dem Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Zellen (McGuire et al., 1986). ER-positive Tumoren sollen eher zu ossären Metastasen führen, während ER-negative Karzinome eher zu einer Filialisierung der inneren Organe führen (Clark et al., 1987). Zudem besteht zwischen dem Hormonrezeptorstatus und den ebenfalls als Prognosefaktoren genutzten neueren Proliferationsparametern wie TLI, S-Phase und KI-67/MIB 1 (siehe unten) eine inverse Korrelation. In der Vergangenheit ist viel über die unterschiedliche Gewichtung von Östrogen- und Progesteronrezeptor spekuliert worden. Ursprünglich ging man von einem höheren Stellenwert des Östrogenrezeptors bezüglich seines prognostischen und prädiktiven Wertes aus, da der Einfluss v. a. des Östrogens auf den Verlauf des Mammakarzinoms bekannt war. Nachfolgende Studien belegen jedoch eine ebenso wichtige Rolle des Progesteronrezeptors. McGuire et al. postulieren 1986 bei Karzinomen im Frühstadium den Östrogenrezeptor als wichtigsten Prognosefaktor für geringere Überlebenszeiten, während ihnen bei weiter fortgeschrittenen Tumoren der Progesteronrezeptor geeigneter erscheint. So werden auch die Ergebnisse der Hormontherapie durch Bestimmung des Progesteronrezeptors treffender vorausgesagt. Collett et al. (1996) beurteilten das Verhalten als Prognosefaktor im Verlauf der Erkrankung. So verstarben in den ersten fünf Jahren signifikant mehr Frauen mit zweifach rezeptornegativem Primärtumor. Auf den Gesamtbeobachtungsraum bezogen lebten jedoch nur PR-positive Frauen länger als PR-negative. Auf der St. Gallener Consensus Conference 1998 wurden beide Steroidrezeptoren als gleichwertig eingestuft (Zujewski et al., 1998). Dort wurde vorgeschlagen allen Frauen mit positivem Rezeptornachweis eine Tamoxifen Therapie zukommen zu lassen; unabhängig vom Menopausenstatus und dem TNM-Stadium (v. Minckwitz et al., 1998). Dennoch ist die prognostische Wertigkeit des Hormonrezeptorstatus weiter umstritten. Seit der ersten Publikation von Knight et al. (1977) wurden viele Studien mit z. T. widersprüchlichen Ergebnissen veröffentlicht. Bei

Kinsel et al. (1988) sowie McCarthy et al. (1990) steht das prognostische Ergebnis zu Abhängigkeit zu angewandten Nachweismethode. Im Gegensatz zur biochemischen Nachweismethode zeigten die immunhistochemischen Verfahren einen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit. Keshgegian und Cnaan (1996) beschrieben für die Konstellation ER-/ PR+ eine deutliche höhere Rezidivrate als bei zweifach positiver Expression.

- Zu den neueren Prognosefaktoren gehören sogenannte zellkinetische Parameter, die Informationen über die proliferative Aktivität liefern. Dazu gehören die Einbauraten an radioaktiv markiertem Thymidin (Thymidin Labeling Index = TLI). Der Nachteil besteht in der aufwendigen Inkubation von frischem Tumorgewebe mit radioaktiven Substanzen. Proliferierende Zellen können auch mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen Proliferations-assoziierte Antigene mit immunhistochemischen Techniken an Gefrierschnitten (KI-67) oder formalinfixierten Schnitten (MIB1) bestimmt werden (Jänicke et al., 1997).
- Zu den tumorbiologischen Faktoren gehört der Nachweis des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF, der mit Rezidiv, Tod und invers mit dem Östrogenrezeptorstatus korreliert ist. Durch die Bestimmung des EGF-R ist es möglich, ER-negative Karzinome in Subgruppen mit jeweils guter und schlechter Prognose zu unterteilen (Klijn et al., 1994).
- Auch das durch Mutationen des Suppressorgens p53 inaktivierte Suppressorprotein lässt sich immunhistochemisch nachweisen. Der prognostische Wert ist allerdings noch in der Debatte (Markis et al., 1995).
- Wenn Mammakarzinomzellen den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) bilden, kann über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin ein zelloberflächenlokalisiertes Proteasesystem entstehen, wodurch Proteine des Stromas und der Basalmembran angegriffen werden. Wegen der nun leichteren Invasion und Infiltration korrelieren erhöhte Werte von uPA mit dem Auftreten früher Rezidive. Auch der Nachweis erhöhter Werte des uPA-Inhibitors PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) zeigt eine schlechte Prognose an (Jänicke et al., 1993).
- Eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose lässt sich auch mit Auftreten des c-erbB2 oder synonym HER-2 Onkogens nachweisen. In der Multivarianzanalyse steht es bezüglich des prädiktiven Wertes hinter dem Lymphknotenstatus an zweiter Stelle. Um ein Mammakarzinom auszulösen, muss es mit verschiedenen anderen Onkogenen zusammenwirken (Têtu et al., 1994).

1.5 Der Einfluss der Steroidhormone Östrogen und Progesteron auf das Mammakarzinom

Der Einfluss von Sekretionsprodukten der Ovarien auf Entstehung und Verlauf von Mammakarzinomen wurde erstmals 1896 von Beatson beschrieben. Neben ihren physiologischen Wirkungen ist das Ausmaß der karzinogenen Auswirkungen auf den Organismus der Frau umstritten. Während es bei ausschließlicher Östrogen-Applikation zu einem signifikanten Anstieg der Inzidenz des Endometriumkarzinoms kommt, sind die Studienergebnisse über die Erkrankungswahrscheinlichkeit beim Ovarial- und Mammakarzinom widersprüchlich. Frauen mit Mammakarzinom haben höhere Östrogenspiegel als gesunde Frauen. Auch die niedrigere Inzidenz asiatischer Frauen im Vergleich zu US-amerikanischen kann durch einen niedrigeren Spiegel erklärt werden. Die Östrogen-Effekte, ob proliferativ, kokarzinogen oder direkt karzinogen, sind in ihrer Wirkungsweise und in ihrem Wirkungsausmaß größtenteils ungeklärt (Beckmann et al., 1997).

Östrogene stimulieren die Proliferation des Drüsenepithels der Mamma. Durch Östrogenbindung an Östrogenrezeptoren (ER), welche spezifische Proteine mit einer hohen Affinität für Steroide sind, entstehen E-ER Komplexe. Da bei der biochemischen Bestimmungsmethode eine cytosolische Rezeptorfraktion ermittelt wurde, ging man lange von einer Translokation des E-ER Komplexes in den Nukleus aus. Nach Entwicklung von Nachweisverfahren mit monoklonalen Antikörpern nimmt man an, dass ein Cytosolrezeptor nicht existent ist, sondern das Östradiol ungebunden in den Nukleus diffundiert. Durch die Aufbereitung des Gewebes in der DCC-Methode wird der Cytosolrezeptor als Präparationsartefakt angesehen. Möglicherweise wird ein cytosolischer Rezeptor durch die Waschschriffe der Technik rausgespült und kann dann nicht detektiert werden.

Der Östrogenrezeptor selbst ist ein Polypeptid mit 595 Aminosäuren und hat eine Größe von 66 kD. Wie alle Mitglieder der Steroidrezeptor-Superfamilie besitzt er drei hochkonservierte DNA Regionen. Region I enthält die DNA-Bindedomäne, die aus 66 Aminosäuren besteht und sich im Inneren des Moleküls befindet (Green, 1988). Die Hormonbindedomäne liegt im C-terminalen Ende der Rezeptoren in den Regionen II und III (O'Malley et al, 1990). Der E-ER Komplex interagiert dann mit als Transkriptionsaktivator mit hormonresponsiven Elementen in den Promotorregionen östrogenregulierter Gene. Die durch Östrogen vermittelte Funktion wird durch Effektorproteine durchgeführt. Dennoch sind auch Östrogenrezeptor-unabhängige Aktivierungsmechanismen beschrieben worden. Bei dem Modell der

Mehrschrittkarzinogenese steht eine Störung der Östrogen-vermittelten Zellproliferation im Vordergrund. Weitere genetische Defekte, z.B. der DNA-Repair oder der Replikationsgenauigkeit, können dann zum Auftreten einer Neoplasie führen. Eine simultane Applikation von Progesteron, vermittelt durch den Progesteronrezeptor (PR), reduziert die Effekte der Östrogen vermittelten Stimulation signifikant. Dieser Effekt wird durch eine Reduktion der Östrogenrezeptoren-Expression und durch eine Verstärkung der 17 β -Steroiddehydrogenase (Konversion von Östradiol zum schwächeren Östron) erreicht (Beckmann et al., 1997). Der Progesteron-Rezeptor selbst kommt als einziger Vertreter der Superfamilie in zwei Isoformen vor: PR-A (Größe 93 kD) und PR-B (Größe 119 kD). Der Progesteronrezeptor wird durch ein Gen kodiert, das auf dem Chromosom 11q22-23 lokalisiert ist. Die PR-Expression und Synthese werden durch Estradiol stimuliert, während Progesteron seinen eigenen Rezeptor reprimiert und inhibiert. Inwiefern Östradiol und die Expression von Östrogenrezeptoren überhaupt Voraussetzung für die Ausbildung von Progesteronrezeptoren sind, ist umstritten. Ebenso umstritten ist, wie es zur Ausbildung des Rezeptorphänotyps PR-/ER+ kommt, den es demnach nicht geben dürfte.

Der Steroidrezeptor-Nachweis in Tumorzellen impliziert, dass es sich möglicherweise um hormonabhängige Karzinome handelt (Mirashi et al., 1990), die teilweise auf Hormontherapie reagieren. Für die Hormonunabhängigkeit oder Antihormonresistenz (Tamoxifenresistenz) werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht: Zum einen ein Verlust der Rezeptor-Expression (Selektion negativer Zellpopulationen), zum anderen veränderte/verlorene Rezeptor-Funktionen durch Rezeptordefekte, wie z.B. durch Punktmutationen, durch ER Exon 5 Deletion, durch Verlust des ER-Locus (LOH von 6q25.1), des PgR-Locus (LOH von 11q22-q23) oder des 17 β -Steroiddehydrogenase-Locus (LOH von 17q21)(Beckmann et al., 1997).

Indirekte hormonelle Einflussfaktoren auf die Steroidrezeptorexpression spiegeln sich auch in täglichen Verhaltensweisen (orale Kontrazeptiva, Nikotin- und Alkoholabusus, Nahrungsfettanteil) sowie individuellen Charakteristika (Gewicht, Anzahl der Geburten, Alter bei der ersten Geburt etc.) wieder (Hislop et al., 1986). Diese Faktoren sind möglicherweise auch auf Inzidenzunterschiede der Rezeptorpositivität bei verschiedenen ethnischen Gruppen verantwortlich. So soll der Genuss von grünem Tee oder Soja bei asiatischen Frauen zu einer Absenkung der Östradiol- Konzentration führen (Nagata et al., 1997). Glass et al. (1990) berichten auch über eine Zunahme ER-positiver Karzinome („upward drift“) um 131 % in den Jahren 1960-1985, was auf veränderte sozioökonomische Begleitumstände zurückgeführt werden kann. Allerdings haben sich in diesem Zeitraum die Nachweismethoden erheblich

verändert, was eine Beurteilung schwierig macht. Dewailly et al. (1997) führen den „upward drift“ auf Umweltgifte, speziell das DDT zurück.

Über einen altersabhängigen Anstieg ER-positiver Karzinome berichten zahlreiche Autoren (z.B. Clark et al, 1984; Fischer et al. 1983). Ungeklärt ist worauf dieses zurückzuführen ist.

Diskutiert werden neben einer peripheren Regulierung durch Steroidhormone auch eine autonome Regulierung durch tumoreigene Synthesysteme, die unabhängig vom Menopausenstatus ihr tumoreigenes Hormonmilieu schaffen. Van Landegham et al. (1985) wiesen nach, dass die Östradiolkonzentration in malignem Gewebe höher ist als in gesundem. Allerdings widerspricht der Vorstellung, dass eine periphere Regulierung nicht in den Malignitätsprozess eingreift der erfolgreichen Anwendung der Hormontherapie. Bei Frauen mit primärer Ovarialinsuffizienz wurden auch nur in 1 % der Fälle ein Mammakarzinom gesehen.

1.6 Hormontherapie

Etwa 80 % der postmenopausalen Karzinome wachsen zum Zeitpunkt der Diagnose hormonaktiv. Die Hormontherapie als adjuvante oder palliative Behandlung ist besonders beim steroidrezeptorpositivem Mammakarzinom indiziert. Ihr Sinn besteht darin, östrogenabhängig wachsende Tumoren von diesem Proliferationsreiz abzukoppeln.

Der bekannteste Vertreter endokriner Therapeutika ist das Antiöstrogen Tamoxifen, welches bei postmenopausalen Patientinnen, bei welchen der Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv (ER+/ PR+) befundet wird, Remissionsraten bis zu 60 % erreichen kann. Bei prämenopausalen Patientinnen ist es zu ca. 25 % erfolgreich, bei postmenopausalen zu ca. 40 %. Rezeptornegative Karzinome sprechen zu ca. 10 % an (Schmidt-Matthiesen, 1997). Tamoxifen bindet kompetitiv an den Östrogenrezeptor. Ob Tamoxifen prophylaktisch an Risikopatientinnen verabreicht werden sollte, wird momentan noch diskutiert. Das Antiöstrogen Toremifen hat im Vergleich zu Tamoxifen eine geringere Restöstrogenaktivität und dementsprechend weniger Nebenwirkungen, wie zum Beispiel das Risiko zur Ausbildung eines Endometriumkarzinoms (Eiermann et al. 1997).

Auch GnRH Analoga (Enantone) können in der endokrinen Therapie verwendet werden: Diese führen durch eine verminderte Gonadotropinausschüttung zur verminderten ovariellen Östrogensynthese. Sie gehören in der Prämenopause zu den Hormontherapeutika erster Wahl (medikamentöse Kastration). Sie werden auch als Depotpräparate gegeben. Die Ovariectomie, die dem gleichen Sinn dient, wird heute nur noch selten durchgeführt (Eiermann et al., 1997).

Des Weiteren können auch Gestagene (Medroxyprogesteronacetat) verabreicht werden. Die Remissionsraten liegen allgemein bei ca. 35 %, bei PR-positiven Karzinomen bei ca. 50-60 % (Schmidt-Matthiesen, 1997). Ein Nachteil sind die großen Nebenwirkungen.

Aromatasehemmer (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) hatten in klinischen Studien deutlich höhere Remissionsraten als das Tamoxifen (Mouridsen et al., 2001). Sie vermindern die Östrogenproduktion, indem sie die Umwandlung von Androstendion zu Östron blockieren. Wahlweise können Aromatasehemmer auch intramuskulär gegeben werden. In einigen Fällen wird nicht nur das Tumorstadium gestoppt, sondern auch eine Rückbildung des Karzinoms beobachtet. Exemestan soll auch bei Metastasen der Lunge und Leber wirksam sein und wird eher an postmenopausale Patientinnen verabreicht (Piccart et al, 1999).

Bei der palliativen Hormontherapie prämenopausaler Patientinnen wird eine Kombination verschiedener Präparate empfohlen: Zunächst Gabe von GnRH Analoga bis zur Progression des Tumors; dann folgt als zweiter Therapieschritt die Gabe eines Antiöstrogen. Bei erneuter Progression können dann als dritter Schritt Aromatasehemmer oder Gestagene gegeben werden. Die postmenopausale Therapie verzichtet auf die Gabe von GnRH Analoga (Eiermann et al., 1997).

1.7 Der Stellenwert der Steroidrezeptorbestimmung

Die Steroidrezeptorbestimmung beim Mammakarzinom hat also sowohl bei der Suche nach der passenden Therapie als auch bei Prognosestellung große Bedeutung. Da bei der Bestimmung des Steroidrezeptorstatus verschiedene Methoden zur Verfügung stehen, sollte man die in Bezug auf ihre Reliabilität und Validität am besten geeignete Methode auswählen. Methoden zur Bestimmung sind zum einen die biochemische Methode und zum anderen die verschiedenen immunhistologischen Methoden am Paraffinschnitt oder am Gefrierschnitt. Der bisher gängige biochemische Nachweis, die DDC-Methode (Dextrane-Coated-Charcoal-assay), wurde in letzter Zeit durch die Vorteile der immunhistochemischen Nachweismethoden verdrängt. So lässt eine heterogene Verteilung der Steroidrezeptoren innerhalb des Tumors sich mit dem biochemischen Nachweis nicht erfassen. Bei vergleichenden Studien zwischen biochemischer und immunhistochemischer Methode fanden sich im internationalen Schrifttum Korrelationen positiver Befunde beim Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor zwischen 65-93 % (Böhm et al., 1998). Die Diskrepanzen bei der quantitativen Beziehung beider Methoden waren noch größer. Den immunhistochemischen Bestimmungsmethoden wird in einigen Studien die größere prognostische/ prädiktive

Bedeutung zugemessen. Ein Grund dafür kann neben den Präparationsartefakten die Tatsache sein, dass nur die Konzentration der nicht mit endogenen Hormonen besetzten Rezeptoren, nicht aber die absolute Bindungskapazität mit der DDC-Methode gemessen wird. Damit können gerade bei prämenopausalen Frauen „maskierte“ Östrogenrezeptoren dem Nachweis entgehen (DiFronzo et al., 1990). Der Nachteil des möglichen Nachweises von Steroidrezeptoren, die durch einen Rezeptordefekt funktionell inaktiv sind, gilt für die biochemischen und immunologischen Nachweisverfahren gleichermaßen.

Die immunhistochemische Bestimmung der Steroidrezeptoren am Paraffinschnitt mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Färbung ist wohl die zur Zeit gängigste Bestimmungsmethode. Eine Bestimmung des Progesteron- und Östrogenrezeptors ist jedoch auch am Gefrierschnitt und Paraffinschnitt mit Hilfe der APAAP-Methode und anderer immunhistochemischer Methoden möglich. Welche Methode bezüglich ihres prädiktiven Wertes auf den Erfolg der Hormontherapie der anderen überlegen ist, ist bislang noch unklar.

1.8 Diagnostik

Die Diagnostik zur Ermittlung des Steroidrezeptorstatus als Arbeitsfeld der vorliegenden Studie wurde bereits beschrieben.

Generell ist beim Mammakarzinom zwischen der Diagnostik im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung und Früherkennung und der Diagnostik bei einem malignomverdächtigen Befund zu differenzieren. Bei ersterer steht die klinische Untersuchung der Brust und der regionären Lymphknoten durch die Patientin selbst oder durch den Arzt, sowie die Mammographie im Vordergrund (DeWaal et al., 1998).

Ein Mammographie-Screening sollte bei Frauen ab 40 in einjährigen Abständen durchgeführt werden (American Cancer Society, 1998). Man schätzt, dass bei 100 % Teilnahme an Reihenuntersuchungen die Mortalität bei Frauen über dem 50. Lebensjahr um ca. 25-30 % gesenkt werden könnte (Koch et al., 2000).

Bei bereits erhobenem, klinisch unklarem, malignomverdächtigem Befund stehen verschiedene Techniken zur Diagnosestellung zur Verfügung. Auch hier ist die Mammographie von Vorrang und durch eine Vergrößerungsmammographie ergänzt. Neben strahlig auslaufenden Verdichtungen gelten polymorphe Mikrokalzifikationen als Malignitätskriterien. Die Treffsicherheit der Mammographie soll in Zukunft durch Computer gestützte Verfahren verbessert werden (Heywang-Köbrunner et al., 1996).

Die Feinnadelpunktion zur Gewinnung der Zytologie kommt bei der Abklärung von unklaren

Verdichtungen zum Einsatz. Zusammen mit dem klinischen Befund, der Mammographie und der Sonographie gehört sie zu den vier diagnostischen Standardverfahren, der sogenannten Tetradiagnostik. Bei dringendem Malignomverdacht kann sie jedoch die histologische Abklärung nicht ersetzen, welche durch die Drill- oder Stanzbiopsie durchgeführt wird. Diese bieten bei ausreichend großen Tumoren einfache Möglichkeiten zur prätherapeutischen Diagnostik. Ihr Vorteil besteht darin, dass z. B. bei älteren Patientinnen durch die wegfallende Schnellschnittuntersuchung eine längere Operationsdauer vermieden werden kann. Bei pathologischer Mamillensekretion kann eine Sekretzytologie erfolgen. Auch wenn sie selten aufschlussreiche Ergebnisse bringt, lässt ein positiver Tumorzellnachweis mit hoher Treffsicherheit eine Aussage über die Dignität des Befundes zu (DeWaal et al., 1998).

Kann nach Durchführung anderer Diagnosetechniken kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, so ist die Extirpation des verdächtigen Bezirkes mit nachfolgender histologischer Aufarbeitung nötig. Falls ein suspekter Herd klinisch nicht palpabel ist, muss er präoperativ mit Methylenblau oder einer Drahtnadel markiert werden, so dass die zuverlässige Entfernung garantiert werden kann (DeWaal et al., 1998).

Nach histologischer Aufarbeitung eines Mammakarzinoms ist eine Diagnostik auf weitere Fernmetastasen erforderlich. Zur Beurteilung des Knochenapparates eignet sich neben der Skelettszintigraphie die Röntgenaufnahme. Die KM-Aspirationszytologie dient ebenfalls der Frühdiagnostik ossärer Metastasierung.

Die Metastasierung der Leber und der Ovarien wird mit Hilfe der Sonographie diagnostiziert. Die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie können unklare Befunde zu klären helfen; die Computertomographie vor allem bei Verdacht auf eine cerebrale Metastasierung. Pulmonale Metastasen können durch die Thorax-Röntgenaufnahme festgestellt werden. Die Bestimmung der Tumormarker CA 15-3 und CEA hat geringen diagnostischen Wert, kann jedoch bei der Verlaufsbeurteilung hilfreich sein. Ein postoperatives Ansteigen oder ein Anstieg unter Chemotherapie spricht für die Progredienz des Krankheitsgeschehens (DeWaal et al., 1998).

1.9 Therapie

1.9.1 Operative und radiologische Therapie

Die Primärtherapie des Mammakarzinoms wird einerseits durch die klinischen und histologischen Parameter, andererseits durch den Wunsch der Patientin bestimmt. Jede Therapie soll individuell auf die Bedürfnisse der Patientin abgestimmt sein.

Die operative Primärtherapie kann als brusterhaltende Therapie oder als modifizierte radikale Mastektomie nach Patey mit oder ohne Wiederaufbau der Brust erfolgen (Le Quesne et al., 1997). Sie erfolgt in Kombination mit einer Axilladissektion zur Erhebung des Lymphknotenstatus. Die brusterhaltende Therapie hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung zugenommen.

Jedoch sind an eine brusterhaltende Operation bestimmte Voraussetzungen gebunden, d. h., dass keine Kontraindikationen vorliegen. Absolute Kontraindikationen sind eine ausgedehnte Lymphangiosis carcinomatosa, besonders große Karzinome, ein inflammatorisches Karzinom und Multizentrität (Leopold et al., 1989). Relative Kontraindikationen sind ein zu erwartendes schlechtes kosmetisches Ergebnis sowie eine Weigerung der Patientin zur postoperativen Nachbestrahlung (Bohmert et al., 1998).

Am extirpierten Tumor sollte eine Seitenmarkierung vorliegen, um bei unvollständiger Exzision eine gezielte Nachresektion möglich zu machen. Die Entscheidung, ob brusterhaltend vorgegangen werden sollte, kann auch nach einem ersten Eingriff getroffen werden. Der Operateur entscheidet postoperativ, je nach Ergebnis der histopathologischen Untersuchung (DeWaal et al., 1998). Eine brusterhaltende Therapie besteht immer auch aus der adjuvanten Nachbestrahlung.

Die axilläre Lymphonodektomie liefert den zur Zeit noch aussagekräftigsten prognostischen Faktor. Sie stellt keinen kurativen Ansatz dar, sondern dient vielmehr als diagnostischer Eingriff, und ist ohne Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen. Da viele Nebenwirkungen auf die Axilladissektion zurückzuführen sind, wie z.B. Lymphstau und eine verlängerte Narkosezeit, gewinnen in jüngster Zeit alternative Methoden an Bedeutung, wie z.B. die Sentinel Node Untersuchung oder die endoskopische Lymphknotenextirpation (Kaufmann et al., 2000). Durch die Extirpation des Wächterlymphknotens (Sentinel Node) wird stellvertretend durch diesen ersten, die Tumorregion drainierenden Lymphknoten, eine Aussage zum allgemeinen Lymphknotenstatus möglich. Die vorhergehende Markierung des Lymphknotens erfolgt mit Hilfe von Technetium 99 markierten Albumin oder eines Farbstoffs (Albertini et al., 1996).

Die endoskopische Lymphknotenextirpation befindet sich noch im Erprobungsstadium. Sie könnte eine Alternative zur Axilladissektion vor allem in der Frühphase der Tumorerkrankung werden (DeWaal et al., 1998).

Eine Strahlentherapie des Mammakarzinoms wird bei brusterhaltender Therapie als Nachbestrahlung mit mindestens 50 Gy und im Bereich des Tumor mit zusätzlich 10 Gy durchgeführt. Bei ausgedehnter Multizentrität, bei High-risk-Tumoren und falls

Tumoranteile bis zum Absetzungsrand reichen, sollte auch trotz Mastektomie nachbestrahlt werden. Bei höhergradigem Befall der Axilla wird auch diese bestrahlt, wobei die Grenzen ab welcher Anzahl befallener Lymphknoten dieses erfolgen sollte, nicht einheitlich definiert ist (Auberger et al., 1997).

1.9.2 Adjuvante Therapie

Die adjuvante postoperative medikamentöse Therapie in Form einer Chemo- und Hormontherapie zielt auf die Behandlung makroskopisch nicht sichtbarer okkulten Streuherde ab. Die Indikation zur adjuvanten medikamentösen Therapie wird individuell gestellt.

Bei der St.Gallener Konsensus Konferenz 1998 wurden gemeinsame Richtlinien zur adjuvanten Hormon- und Chemotherapie verabschiedet. Welche Form der Therapie angewandt wird, richtet sich nach dem Hormonrezeptorstatus, dem Lymphknotenstatus, dem Menopausenstatus und der histologischen Beurteilung (low/ minimal, intermediate, high risk tumors). Der Konsensus beinhaltet eine gleichartige Gewichtung von Östrogen- und Progesteronrezeptor (Zujewski et al., 1998).

Tabelle 2: Behandlungsschema nach der St.Gallener Consensus Conference 1998 (Zujewski et al., 1998)

	Lymphknoten negativ, minimal/ Low risk	Lymphknoten negativ, intermediate risk	Lymphknoten negativ/positiv, high risk
Prämenopausal ER <i>oder</i> PR Positiv	Keine Gabe oder Tamoxifen	Tamoxifen +/- Chemotherapie	Chemotherapie + Tamoxifen
Postmenopausal ER <i>oder</i> PR Positiv	Keine Gabe oder Tamoxifen	Tamoxifen +/- Chemotherapie	Tamoxifen + Chemotherapie
Postmenopausal ER <i>und</i> PR Negativ	Keine Gabe	Keine Gabe	Chemotherapie
Senium ER und PR negativ	Keine Gabe oder Tamoxifen	Tamoxifen +/- Chemotherapie	Tamoxifen
	Keine Gabe	Keine Gabe	Chemotherapie

Die unterstützende Polychemotherapie sollte bei prämenopausalen Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom (Lymphknotenbefall, High-risk Tumor) durchgeführt werden. Ob diese bei positivem Steroidrezeptorstatus mit einer Hormontherapie kombiniert werden kann, ist zur Zeit noch in der Diskussion. Neuere Studien gehen von einer solchen Kombinierbarkeit aus. Bei postmenopausalen Patientinnen sollte eine Chemotherapie durchgeführt werden, falls bei diesen der Steroidrezeptorstatus negativ ist. Derzeit gängige Schemata sind die Polychemotherapien mit Cyclophosphamid + Methotrexat + 5-Flourouracil (CMF) und/ oder Epirubicin + Cyclophosphamid (EC) oder die Monotherapie mit Vinorelbin. Die Remissionsraten erreichen bis zu 55 % bei der adjuvanten Therapie (Schmidt-Matthiesen, 1997).

2 Fragestellung

Die Bestimmung des Steroidrezeptorstatus hat eine große prognostische und prädiktive, d.h. therapeutische Bedeutung. Es wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich zwei verschiedene immunhistochemische Bestimmungsverfahren, nämlich die APAAP-Technik am Gefrierschnitt und die Avidin-Biotin-Peroxidase Technik am Paraffinschnitt in ihren Ergebnissen voneinander unterscheiden.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Bestehen Unterschiede bezüglich der Expression (IRS) des Östrogen- und Progesteronrezeptors?
- Unterscheidet sich das Expressionsmuster bezüglich der Intensität der Färbung?
- Unterscheidet sich das Expressionsmuster bezüglich des Anteiles der exprimierenden Tumorzellen?
- Welche Beziehung besteht zwischen Ergebnissen der Bestimmungsverfahren und den erhobenen klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorgrading, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Überlebenszeit?
- Wie sind äußere Einflüsse auf das Expressionsergebnis, wie der subjektive Eindruck des Untersuchers und Lagerungszeiten, zu bewerten?

Das langfristige Ziel der Untersuchungen ist, ein in Bezug auf seine Reliabilität und Validität anspruchsvolles immunhistochemisches Bestimmungsverfahren aufzuzeigen. Es soll erörtert werden, ob eine Standardisierung der bisher gängigen immunhistochemischen Detektionsverfahren notwendig ist. Dabei soll auch der Zeitaufwand und der Kostenpunkt der Färbemethoden berücksichtigt werden.

3 Patientinnenkollektiv, Materialien und Methoden

3.1 Das Gießener Mammakarzinom Gefrierschnitt Kollektiv

3.1.1 Allgemeine Informationen zum Kollektiv

Das Patientinnenkollektiv als Grundlage der vorliegenden Studie setzt sich aus Patientinnen mit einem Tumor der Brustdrüse zusammen, deren Gewebeproben am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht und befundet worden sind. Die Patientinnen wurden in den umliegenden Krankenhäusern operiert. Von den 260 im Kollektiv erfassten Patientinnen wurden 164 in der chirurgischen Abteilung des St. Josephs-Krankenhauses Gießen, 67 im Kreiskrankenhaus Gießen in Lich, 13 im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Gießen, 12 in der Klinik für Chirurgie der Universität Gießen, zwei in der gynäkologischen Abteilung des St. Josephs-Krankenhauses Gießen und jeweils eine in den Städtischen Kliniken in Dillenburg und Bad Nauheim operiert. Der Zeitraum der Asservierung umfasst die Jahre 1991 (Beginn der immunhistochemischen Untersuchung der Steroidrezeptoren im Institut für Pathologie in Gießen) bis 1995.

3.1.2 Charakteristika des Kollektives

Nicht alle der 260 im Kollektiv erfassten Patientinnen wurden in die vergleichende Studie über immunhistochemische Detektionsverfahren für Steroidrezeptoren einbezogen, da die notwendigen Einschlusskriterien nicht erfüllt werden konnten. Diese Kriterien wurden wie folgt definiert:

- Erkennbar invasiver Tumor im Gefrierschnitt als auch im Paraffinschnitt, so dass ein paarweiser Vergleich desselben Tumors möglich ist.
- Ausreichende Tumorgöße auf den Objektträgern. Dieses Kriterium ist wegen des oft heterogenen Verteilungsmusters des immunreaktiven Steroidrezeptors zu berücksichtigen. Als cut-off line wurde eine makroskopische Tumorgöße von weniger als 3 mm im mittleren Durchmesser gewählt.

Die verbliebenen Patientinnen bilden das Gießener Mammakarzinom Gefrierschnitt Kollektiv (GMGK). Es besteht aus 246 Patientinnen mit histologisch nachgewiesenem Mammalignom und 14 Patientinnen mit einer benignen Mammaerkrankungen, wie fibrös-zystischen Mastopathien, Fibroadenomen, entzündlichen Hämatomen und einem benignen Schwannom. Die Berücksichtigung anderer Erkrankungen als dem Mammakarzinom dient

dazu das Reaktionsverhalten der Antikörper auch an nicht maligne erkranktem Mammagewebe zu testen und mit dem des Mammakarzinoms zu vergleichen. Bei bestimmten Fragestellungen (Prognose etc.) wurden diese Fälle nicht berücksichtigt. Bei drei Patientinnen konnten keine klinischen Daten erhoben werden.

Parallel zu der Immunhistochemie wurden folgende klinische und pathologischen Parameter retrospektiv erfasst:

- Tumorstaging: Tumorgröße in cm/ Tumorstadium nach TNM-Klassifikation.
- Lymphknotenstatus mit der Anzahl der extirpierten und befallenen Lymphknoten/ Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation.
- Durchbruch der Lymphknotenkapsel.
- Fernmetastasen/ Status nach TNM-Klassifikation.
- Metastasenlokalisation.

Histologie:

- Tumorhistologie/ klinische Diagnose nach Pathologiebefund.
- Malignität/ Grading G1-G3.
- Mitoseindex, falls vorhanden.
- Originalsteroidrezeptorstatus, aufgeschlüsselt in den Index für Färbeintensität und den Index für den Anteil der gefärbten Zellen.

Patientendaten:

- Alter der Patientinnen bei der Primäroperation.
- Menopausenstatus.
- Körpergröße (cm).
- Körpergewicht (kg).
- Bodymassindex.
- Nikotinabusus (ja/nein).
- Diabetes mellitus (ja/nein).

Das Gießener Mammakarzinom Gefrierschnitt Kollektiv weist folgende histologische Subtypen auf:

- Invasiv duktales Karzinom: 180 Patientinnen (69,2 %).
- Invasiv lobuläres Karzinom: 38 Patientinnen (14,6 %).
- Invasiv muzinöses Karzinom: 6 Patientinnen (2,3 %).
- Invasiv medulläres Karzinom: 2 Patientinnen (0,8 %).

- Invasiv tubuläres Karzinom: 8 Patientinnen (3,1 %).
- Invasiv papilläres Karzinom: 4 Patientinnen (1,5 %).
- Sonstige invasive Tumoren (Metastasen, Lymphome u. a): 8 Patientinnen (3,1 %).
- Nicht invasive Erkrankungen der Mamma: 14 Patientinnen (5,38 %).

Bei Tumoren mit Anteilen mehrerer histologischer Typen richtete sich die Zuordnung immer nach der vorherrschenden Komponente.

53 Mammakarzinome (21,3 %) wurden gemäß ihres histologischen Differenzierungsbildes als hoch differenziert und somit als niedrig maligne eingestuft (G 1), 96 Karzinome (38,6 %) waren mittelgradig differenziert und somit von mittlerer Malignität (G 2), während 54 (21,7 %) niedrig differenziert und von hoher Malignität waren (G 3). Bei 46 Patientinnen (18,5 %) mit invasivem Mammatumor fand sich im Pathologiebericht kein erhobener Malignitätsstatus.

Die Charakteristika des untersuchten Gießener Mammakarzinom Kollektives hinsichtlich der untersuchten klinischen Parameter sind den folgenden Abbildungen zu entnehmen.

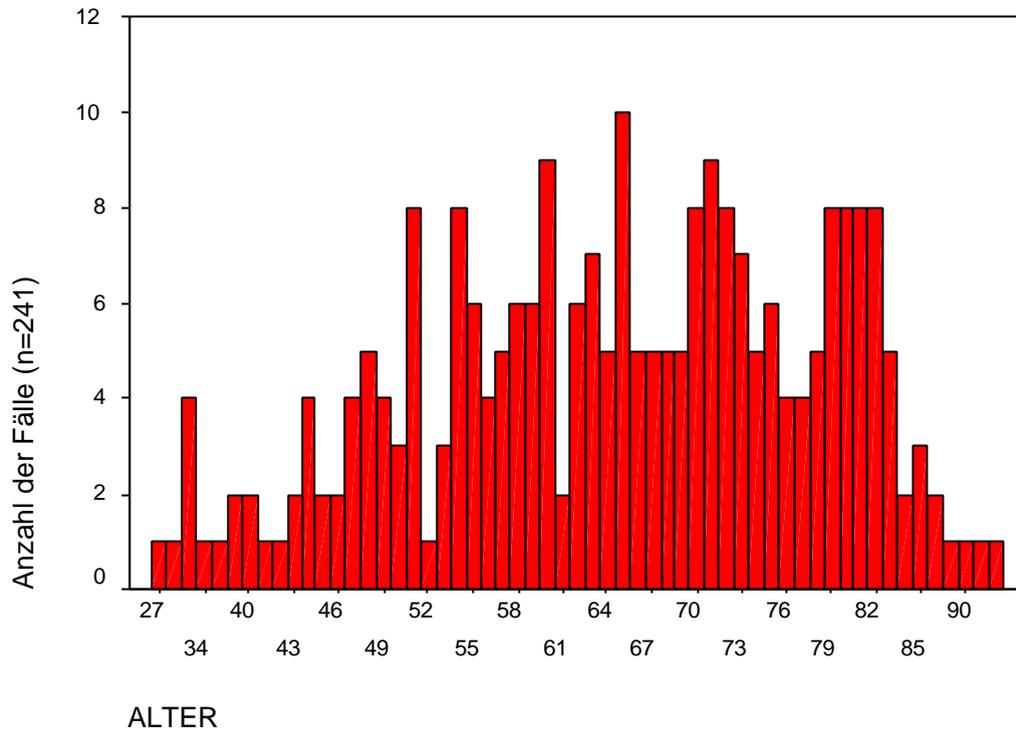


Abb. 1: Alter der Patientinnen bei Primäroperation (Jahren); n=241; Mittelwert 64,65 (SD=13,36)

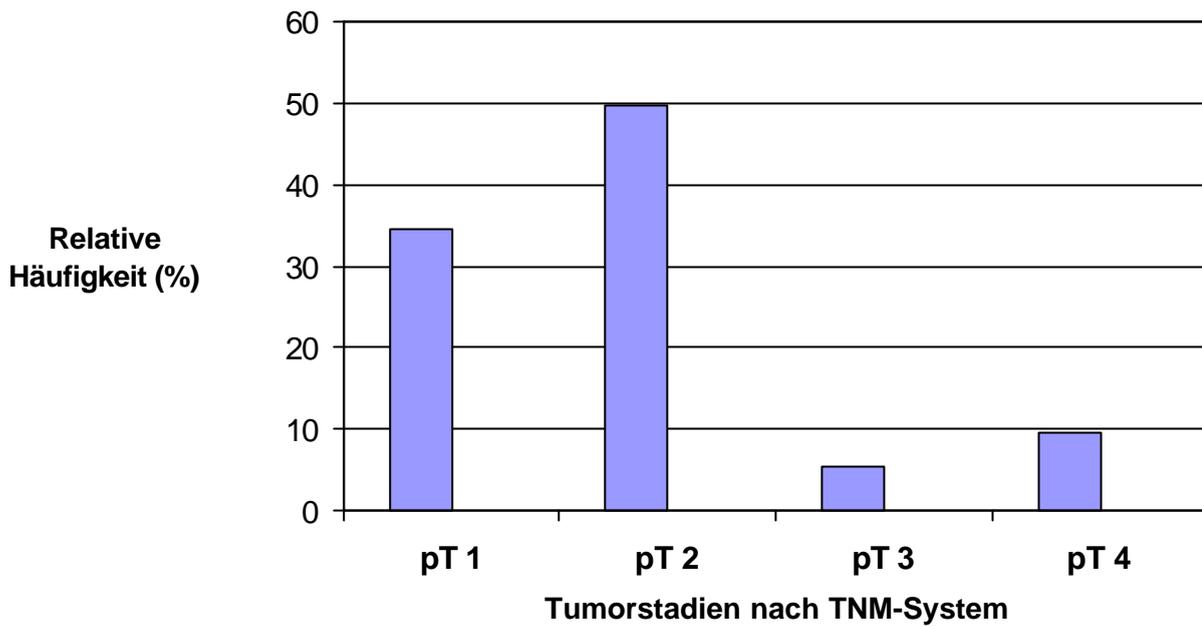


Abb. 2: Relative Häufigkeit der TNM Tumorstadien

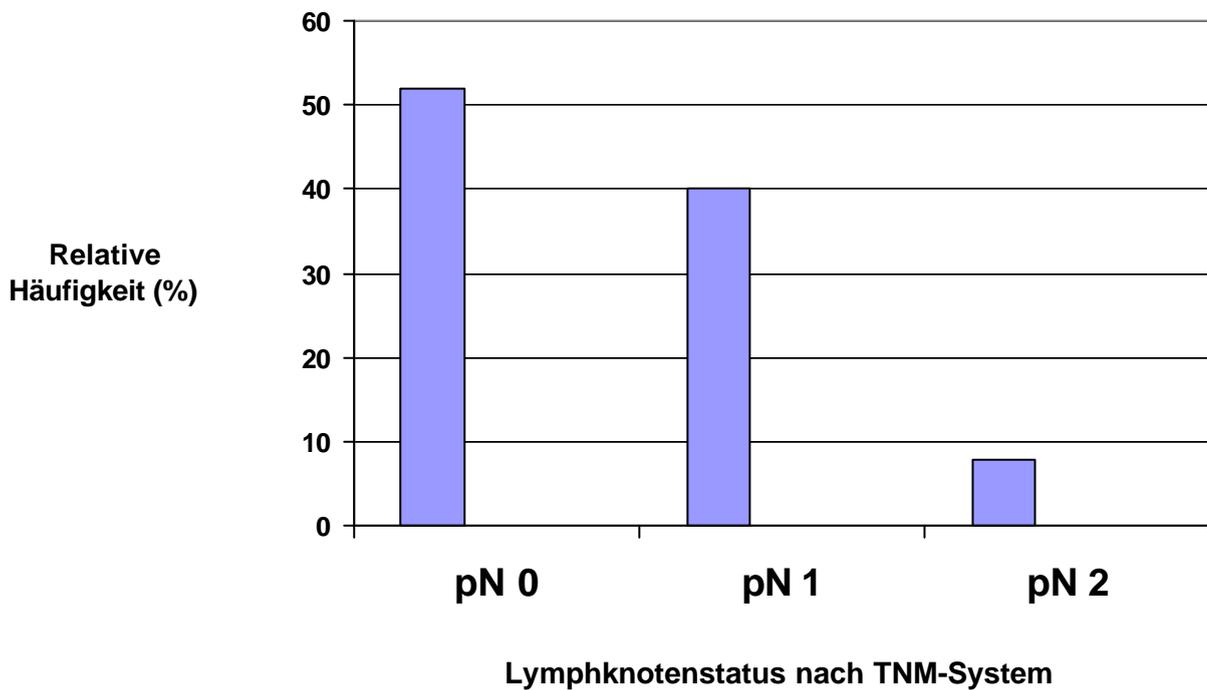


Abb. 3: Relative Häufigkeit des TNM Lymphknotenstatus

Von den 246 Patientinnen mit invasivem Mammatumor fielen 13 Patientinnen (5,3 %) bei Krankheitsbeginn in die Altersgruppe bis 40 Jahre, 135 Patientinnen (54,9 %) in die Altersgruppe von 41-70 Jahren, 94 Patientinnen (38,2 %) waren älter als 70 Jahre. Insgesamt betrug das Durchschnittsalter des Gießener Mammakarzinom Kollektives 64,4 Jahre.

Von den 246 Patientinnen mit nachgewiesenem Mammalignom waren 34 Patientinnen (13,9 %) prämenopausal und 179 (73,1 %) postmenopausal, von 32 Patientinnen (13 %) konnte der Menopausenstatus nicht eindeutig geklärt werden.

Bei 17 Patientinnen wurde ein beidseitiger Befall der Brüste festgestellt. 33 Patientinnen litten an einem Diabetes mellitus. Ein Nikotinabusus wurde bei 32 Patientinnen festgestellt.

3.1.3 Überlebenszeiten innerhalb des Kollektives

Die Überlebenszeiten der Patientinnen wurden erfasst, indem die betreuenden Hausärzte gebeten wurden über den aktuellen Gesundheitszustand zu berichten. Im einzelnen wurden folgende Parameter erfragt:

- Aktueller Allgemeinzustand.
- Überlebensstatus, ggf. Todesdatum und Todesursache.
- Letzter Beobachtungszeitpunkt.
- Bekannte Rezidive/ Metastasen.
- Zeitpunkt und Lokalisation der Rezidive/ Metastasen.
- Weitere Therapiemaßnahmen (Hormontherapie, Chemotherapie).

In ca. 75 % der Fälle erfolgte eine Rückmeldung, oftmals mit nicht vollständigen Daten, da nur wenige Hausärzte über Art und Umfang der Therapie berichteten.

Insgesamt konnten 43 Todesfälle erfasst werden, bei denen 37 sicher mit einem Mammakarzinomrezidiv assoziiert waren.

3.2 Methodik

3.2.1 Sammlung der Paraffinpräparate

Unmittelbar nach dem Eintreffen des frischen Resektates im Eingangslabor des Institutes für Pathologie wurde ein Teil des Tumormaterials in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um später der Anfertigung des Gefrierschnitts zu dienen, während der andere Teil des Tumormaterials

routinemäßig zum Anfertigen der Paraffinschnitte verwendet wurde. An diesen Paraffinschnitten wurde daraufhin die Bestimmung des Steroidrezeptorstatus mit Hilfe der Biotin-Avidin-Peroxidase Methode (diagnostische Erstbestimmung) durchgeführt. Der Paraffinschnitt wurde dann mit einer Identifikationsnummer versehen, im Archiv des Institutes für Pathologie abgelegt.

3.2.2 Gewinnung des Gefriermaterials

Durch die Lagerung des Tumorgewebes in speziellen kälteresistenten Kunststoffbehältern in flüssigem Stickstoff muss sich die Größe des Tumorpräparates der des Behälters anpassen. Aus diesem Grund ist die Durchschnittsgröße des Gefrierschnitts kleiner als die des Paraffinschnitts. Besonders ausgeprägt ist der Größenunterschied zwischen Paraffin- und Gefrierschnitt bei kleineren Primärtumoren (T1), da ersteres bei der Gewebeauswahl diagnostischen Vorrang haben musste.

Von den geprüften tumorrepräsentativen tiefgefrorenen Gewebeproben wurden jeweils je nach Größe der Tumorprobe 10-14 Schnitte von 5 µm Dicke mit einem Gefriermikrotom angefertigt. Diese wurden auf spezielle hochgereinigte Objektträger (Superfrost, Fa. Menzel-Gläser, USA) aufgezogen. Die Lagerung der nativen Schnitte erfolgt dann, bis zur spezifischen Immunfärbung, in einem Objektträger-Gefrierschrank bei einer Temperatur von -80° C.

3.2.3 Prüfung der Diagnose/ Histologie

Von einem Schnitt jeder Schnittserie wurde eine Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt, welche der Identifizierung von tatsächlich erfasstem Tumorgewebe diene.

Für den Fall, daß sich histologisch kein invasiver Tumoranteil im Gefrierschnitt fand, sondern normales Mammagewebe, Fettgewebe, benigne Mammatumoren u.ä., wurde das Gefrierpräparat erneut, diesmal von einer anderen Seite angeschnitten. Wenn sich nun wiederholt kein invasiver Tumoranteil fand, wurden die Kriterien zur Aufnahme in das Patientenkollektiv nicht erfüllt und der Fall nicht gewertet.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. F. E. Franke, Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, wurden sämtliche histologischen Diagnosen, sowohl der Paraffinschnitte als auch der Gefrierschnitte, auf Zusammengehörigkeit und Stimmigkeit der Präparate überprüft.

Die archivierten Paraffinschnitte wurden dann ohne Kenntnis der diagnostischen Erstbestimmung, nach der Methode von Remmele und Stegner (1987) ein weiteres Mal

evaluiert, um den subjektiven Einflusses des Bestimmers auf das Ergebnis zu bestimmen. Bei den folgenden Auswertungen wurde von der diagnostischen Erstbestimmung ausgegangen, da das Ziel des Vergleiches unterschiedlicher Methoden ist, Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in der klinischen Anwendung zu demonstrieren. Bei Diagnosestellung unterliegt die Bestimmung des Steroidrezeptorstatus in der Regel ebenfalls unterschiedlichen Personen.

Bei der Evaluation wurden nur invasive Tumorzellen bewertet. Ein Tumor mit innerhalb des Präparats befindlichen rezeptorpositiven Zellen eines gesunden Epithels, ansonsten aber nur rezeptornegativen Karzinomzellen, wurde als rezeptornegativ gewertet.

Vor der Gesamtauswertung wurde für jeden einzelnen gefärbten Primärantikörper geprüft, ob die Antigenität der Gefrierpräparate eventuell durch die Lagerzeit der tiefgefrorenen Gewebsblöcke beeinträchtigt wurde. Es konnte diesbezüglich keine Korrelation zwischen dem Alter des Gewebes und der Expression des IRS festgestellt werden, so dass die von den verwendeten Antikörpern markierten Epitope offenbar auch über längere Lagerzeiten (mindestens bis zu sieben Jahren) stabil detektierbar bleiben.

Verglichen wurde das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt in der Verdünnung des Primärantikörpers 1:100 und der APAAP-Methode mit dem Paraffinschnitt in der Biotin-Avidin-Peroxidase-Methode bei 215 Patientinnen; bei der Verdünnung des Primärantikörpers 1:250 bei 211 Patientinnen. Analog dazu wurde das Ergebnis der Progesteronrezeptorbestimmung bei 213 Patientinnen verglichen.

3.3 Immunhistochemie

Die Einführung der Immunfluoreszenztechnik durch Coons 1941 war grundlegend für die Entwicklung der diagnostischen Immunhistochemie und Immunpathologie. Aus der darauf basierenden Enzymbrückentechnik entwickelten sich die der Studie zugrunde liegenden immunhistochemischen Bestimmungsverfahren (ER-ICA, PR-ICA): Die APAAP-Methode und die Biotin-Avidin-Peroxidase-Methode.

Die immunhistochemischen Detektionsverfahren basieren auf dem folgenden Prinzip: Ein von einer Maus oder einem Kaninchen stammender Antikörper bindet sich an den humanen nukleär verankerten Steroidrezeptor. Ein weiterer Brückenantikörper (Kaninchen anti Maus bzw. Maus anti Kaninchen) bindet sich an diesen Komplex, der durch einen weiteren, mit einem bestimmten Molekül (APAAP bzw. Streptavidin) versehenen Antikörper (Detektionsantikörper) vervollständigt wird. Dieses Molekül setzt enzymatisch einen entsprechend ausgewählten Farbstoff an (Neofuchsinhaltige Entwicklungslösung bzw.

Diamino-Benzidin), der sich am Ort der Antikörperbindung im Gewebe niederschlägt. Durch die Verästelungen der Antikörperkette erreicht man eine größere Multiplikation der Bindungsstellen.

Präparation der Paraffinschnitte: Das frische Tumorgewebe wurde in möglichst kurzer Zeit nach Entnahme für 24 h in 4% phosphatgepuffertem Paraformaldehyd fixiert. Dann wurde das Gewebe in einem automatischem 10 Schritt Zyklus (70-100 % Alkohol, Xylol) dehydriert. Schließlich erfolgte die Einbettung des Gewebematerials in Paraffinwachs. Die vom Blockmaterial abgetragenen 3-5 µm großen Schnitte wurden auf hochgereinigte Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen.

Bei beiden immunhistochemischen Methoden erfolgte die Bestimmung nach dem semiquantitativen Verfahren von Remmele und Stegner (1987), genauer nach dem Verfahren A*. Dieses Verfahren wies im Interobserver-Test die beste Reproduzierbarkeit auf. Der „immunreaktive Score“ (IRS) als Ergebnis der Bestimmung ergibt sich aus der Multiplikation des Wertes der Färbeintensität (*Staining intensity=SI*) mit dem des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Zellen (*PP*). Die Färbeintensität kann die Werte 1= schwache Färbeintensität, 2= mäßige Färbeintensität, 3= starke Färbeintensität annehmen. Die Quantität der immunhistochemisch angefärbten steroidrezeptorpositiven Tumorzellen ergibt folgende Wertepaare:

- 1= Anteil der gefärbten Zellen < 10 %
- 2= Anteil der gefärbten Zellen > 10 %, < 50 %
- 3= Anteil der gefärbten Zellen > 50 %, < 80 %
- 4= Anteil der gefärbten Zellen > 80 %

Sowohl SI als auch PP werden subjektiv geschätzt. Für die Ermittlung von SI ist der vorherrschende SI-Grad ausschlaggebend.

Tabelle 3: Beispiele für die Ermittlung des IRS nach Methode A* (nach Remmele und Stegner (1987)).

Neg. Zellen (%)	Pos. Zellen ges. (%)	Schwach/mäßig Pos. Zellen (%)	Stark pos. Zellen	PP	SI	IRS
10	90	30	60	4	3	12
40	60	40	20	3	2	6
60	40	30	10	2	1	2
95	5	5	0	1	1	1

3.3.1 Die APAAP-Technik

Die Detektion der Primärantikörper am Gefrierschnitt erfolgte mit Hilfe der **alkalische Phosphatase- anti- alkalische Phosphatase (APAAP)** Methode nach Cordell et al. (1984), die u. a. bei der Zusammensetzung der Puffer modifiziert wurde. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung hängt von der Konzentration des Primärantikörpers in der Inkubationslösung ab. Ist diese zu hoch, wird dem Untersucher ein unverhältnismäßig großer Anteil hoch exprimierender Steroidrezeptoren vorgetäuscht; umgekehrt bei zu geringer Konzentration ein zu niedriger Anteil. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Intensitätsstufen zu erreichen, wurde im Vorfeld der Färbungen für beide Steroidrezeptoren eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Zunächst wurden Gefrierschnitte von 28 Patientinnen ausgewählt. Bei der Bestimmung der Färbeintensität am Paraffinschnitt waren von diesen jeweils sieben mit keiner Expression, geringer, mittlerer und hoher Intensität (Beurteilungskriterien nach Remmele und Stegner) gewertet worden. Bei diesen Patientinnen wurden nun jeweils fünf Gefrierschnitte mit einem Verdünnungsverhältnis Primärantikörper : RPMI von 1:10, 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000 durchgefärbt. Für den Progesteronrezeptor stellte sich die Verdünnung von 1:250 als am günstigsten, mit für den Untersucher klar unterscheidbaren Intensitätsstufen, heraus. Für den Östrogenrezeptor hingegen waren Verdünnungen im Bereich von 1:100 bis 1:250 geeignet. So wurde das komplette Patientinnenkollektiv mit beiden Verdünnungen jeweils einmal durchgefärbt.

Tabelle 4: Intensitätsstufen der Verdünnungsreihe/ Östrogenrezeptor

	Verdünnung 1:10	Verdünnung 1:100	Verdünnung 1:250	Verdünnung 1:500	Verdünnung 1:1000
Stufe 0	4	6	8	10	9
Stufe 1	3	8	6	7	11
Stufe 2	2	5	5	6	5
Stufe 3	19	9	8	4	3

Tabelle 5: Intensitätsstufen der Verdünnungsreihe/ Progesteronrezeptor

	Verdünnung 1:10	Verdünnung 1:100	Verdünnung 1:250	Verdünnung 1:500	Verdünnung 1:1000
Stufe 0	2	6	7	11	12
Stufe 1	3	3	7	9	10
Stufe 2	3	10	9	4	4
Stufe 3	21	9	5	4	1

(Stufe 0=keine Färbung, Stufe 1=geringe Färbeintensität, Stufe 2=mittlere Färbeintensität, Stufe 3=starke Färbeintensität).

Im Vorfeld wurde bei 30 Schnitten eine Negativ-Kontrolle durchgeführt, bei der die APAAP-Methode ohne Primärantikörper durchgeführt wurde. In keinem der Schnitte ließ sich eine Immunreaktion feststellen.

Das methodische Vorgehen der APAAP Färbung umfasste dann die im folgenden dargestellten Schritte:

Da es sich bei dem Progesteronrezeptor-Antikörper um einen Kaninchen anti Human Immunglobulin handelt, musste dort primär ein Maus anti Kaninchen-Brückenantikörper (MAK) in die Immunglobulinkette eingeschaltet werden.

- Re-Antigenisierung in der Mikrowelle (Behandlung der Objektträger 6 x 5 Minuten bei 600 Watt in Citratpuffer gefüllten Küvetten).
- 5 Minuten Abkühlen im Waschpuffer.
- Auftragen von ca. 140 µl Primärantikörper in der jeweils benötigten Endverdünnung-Einwirkzeit 30 min bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer.

- Mindestens 4 mal Spülung im Waschpuffer.
- Für Progesteronrezeptor: Auftragen eine Brückenantikörpers MAK mittels Human-RPMI-Gemisch (Verdünnung 1:100)- Einwirkzeit 30 Minuten.
- Auftragen des Brückenantikörpers (LINK) mittels Human-RPMI-Gemisch (Verdünnung 1: 40)- Einwirkzeit 30 Minuten.
- Mindestens 3 mal Spülen im Waschpuffer.
- Auftragen des Detektionsantikörpers (APAAP-Komplex) mit RPMI auf eine Endkonzentration von 1 : 50 verdünnt – Einwirkzeit 30 min.
- Mindestens 3 mal Spülen im Waschpuffer.
- Auftragen des Brückenantikörpers (Reaktionverstärkung) – Einwirkzeit 10 Minuten.
- 3 mal Spülen im Waschpuffer.
- Erneutes Auftragen des Detektionsantikörpers (APAAP-Komplex) – Einwirkzeit 10 Minuten.
- Anschließend 10 mal Spülung im Waschpuffer.
- Entwicklung der Reaktion mit Hilfe der Entwicklerlösung auf langsamen Schüttler-Entwicklungszeit 20 Minuten.
- Gegenfärbung mit Hämalalaun – 2 Minuten.
- Danach 2 mal Spülung mit Leitungswasser.
- Eindecken der fertig gefärbten Präparate mit 70-80 °C heißem Glycergel (Fa. DAKO Hamburg).

3.3.2 Die Biotin Avidin-Peroxidase Technik (LSAB- Färbung)

Die Detektion der Primärantikörper am Paraffinschnitt erfolgte mit Hilfe der Biotin-Avidin-Peroxidase Färbung (auch **L**abelled **S**trept**A**vidin **B**iotin Färbung), die 1981 von Hsu et al. als Biotin-Avidin-Complex-Methode beschrieben wurde. Das methodische Vorgehen umfasst die im folgenden dargestellten Schritte:

- Entparaffinisierung der Paraffinschnitte in der folgenden Reihenfolge: 10 min Xylol, 10 min Aceton, 10 min Aceton-Waschpuffer-Gemisch (Verhältnis 1:2).
- 10 minütige Inkubation der Paraffinschnitte in der Mikrowelle bei ca. 600 Watt in Mikrowellenküvetten mit Zitronensäure, nach 5 Minuten erneutes Auffüllen der Küvetten mit Zitronensäure.
- Nach der Inkubation anschließende Auffüllung der Küvetten mit Aqua destilata.
- 20 minütiges Auskühlen lassen der Küvetten.

- 3 mal Spülen mit Trispuffer.
- Blocken mit bovinem Rinderalbumin zur Absättigung der unspezifischen Bindungstellen. Dieses dient zur Abschwächung der Hintergrundfärbung.
- 30 minütige Inkubation in Methanol (90 ml) + H₂O (10 ml).
- 3 mal Spülen mit Trispuffer.
- 30 minütige Inkubation mit dem Primärantikörper mit ca. 100 µl/ Objektträger in einer feuchten Kammer.
- 8 mal Spülen in Trispuffer, nach Antikörpern getrennt.
- 30 minütige Inkubation mit einem Brückenantikörper (biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus Antikörper). Verdünnung 1: 200 mit Trispuffer.
- 3 mal Spülen mit Trispuffer.
- 30 minütige Inkubation mit Streptavidin- Peroxidase. Verdünnung 1:250 mit Trispuffer.
- 3 mal Spülen mit Trispuffer.
- 8 Minuten lang die Objektträger unter Abzug mit DAB (Diamino-Benzidin) beschichten und in Trispuffer sammeln. (Falls die Schnitte sich vor Ablauf der 8 Minuten braun färben, muss man diese vorzeitig in die Pufferlösung stellen).
- 45 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun. Danach 2 maliges Spülen (Bläuen) der Schnitte in Leitungswasser.
- Eindeckeln der fertig gefärbten Präparate mit 70-80 °C heißem Glycergel (Fa. DAKO Hamburg).

3.3.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

- Citratpuffer: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B + 450 ml Aqua destilata.
Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure (0,1 M) + 1000 ml Aqua destilata.
Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat (0,1 M) + 1000 ml Aqua destilata.
- Waschpuffer/Trispuffer für 5 Liter: 4,5 g Tris-Base (Fa.Sigma, Deisenhofen), 34,25 g Tris-HCl (Fa. Sigma, Deisenhofen), 43,9 g NaCl in 625 ml Aqua destilata auflösen, pH zwischen 7,4 und 7,6 einstellen und auf 5 Liter mit Aqua destilata auffüllen.
- RPMI- Ansatz: 50 ml RPMI (Fa. Biochrom, Berlin), 450 ml Aqua destilata, 50 ml inaktiviertes Rinderserum, 0,5 g Natriumacid, pH zwischen 7,4 und 7,6 einstellen.
- Entwicklungslösung:
Benötigte Ansätze:

- Entwicklungspuffer: 87 g NaCl, 15 g Tris HCl, 49 g Tris-Base, 1750 ml Aqua destilata.
- Propandiol- Ansatz: 21 g Propandiol, 1000 ml Aqua destilata.
- Neofuchsin- Ansatz: 5 g Neofuchsin, 100 ml 2 N HCl.

Herstellung:

1. Entwicklungslösung und Propandiol- Ansatz zusammengießen, pH auf 9,75 einstellen.
 2. Laevamisol (20 mg/ Küvette) abwiegen und der oben genannten Lösung hinzufügen.
 3. Lösung I: Natriumnitrit (10 mg/ Küvette) abwiegen und in 250 µl Aqua destilata/ Küvette auflösen.
 4. Lösung 2: Naphtol (25 mg/ Küvette) abwiegen und in 300 µl Dimethylformamid auflösen.
 5. Neofuchsin: 5 g Neofuchsin, 100 ml HCl.
 6. Lösungen 1 und 2 für 1-2 Minuten stehenlassen.
 7. Lösung 1 der Entwicklungspuffer-Propandiol- Lösung zugeben.
 8. Lösung 2 der Entwicklungspuffer-Propandiol- Lösung zugeben.
 9. Den pH- Wert der Gesamtlösung auf 8,8 einstellen.
 10. Gesamtlösung durch einen feinporigen Filter filtrieren.
- Hämalaun (für die Gegenfärbung): 1 g Hämatoxylin + 0,2 g NaJO³ + 50 g Kalialaun + 1000 mg Aqua destilata + 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure.
 - DAB-Lösung: 1 Tablette DAB (Diamino-Benzidin) der Fa. Dako wird in 10 ml Trispuffer aufgelöst. Dann Hinzugabe von 7,25 µl 30% igem Wasserstoffperoxid.

3.3.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden als Primärantikörper zur Detektion verwendet:

- Maus anti Human Östrogenrezeptor Immunglobulin, monoklonal, IgG Kappa, Konzentration 0,18 mg/ml, Katalognummer M 7047,Chargennummer 035, Klon 1D5, Fa. DAKO Hamburg (LSAB-Technik).
- Maus anti Human Progesteronrezeptor Immunglobulin, monoklonal, IgG, Klon PGR 636, Fa. DAKO Hamburg (LSAB-Technik).
- Maus anti Human Östrogenrezeptor Immunglobulin, monoklonal, IgG Kappa, Konzentration 0,18 mg/ml, Katalognummer M 7047, Chargennummer 035, Klon 1D5, Fa. DAKO Hamburg (APAAP-Technik; Verdünnung 1:100, 1:250).

- Kaninchen anti Human Progesteronrezeptor, polyklonal, Katalognummer A 0098, Chargennummer 035, Fa. DAKO Hamburg, (APAAP-Technik; Verdünnung 1:250).

Folgende Antikörper wurden als Sekundär-, bzw. Tertiärantikörper zur Detektion verwendet:

- LINK Kaninchen anti-Maus Immunglobulin, polyklonal, überwiegend IgG, Chargennummer 065, Katalognummer Z 0259, DAKO Hamburg, Verdünnung 1: 40 (bei APAAP-Technik).
- APAAP Mouse Monoklonal (-Klon AP7/6/7), Typ IgG, Kappa, Konzentration 0,12 mg/ml, Chargennummer 025, Katalognummer D 651, DAKO Hamburg, Verdünnung 1: 50 (bei APAAP-Technik).
- Biotinylated Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins, polyklonal, überwiegend IgG, Katalognummer E 354, Chargennummer 013, Konzentration 1,2 g/l, DAKO Hamburg, Verdünnung 1: 200 (bei LSAB-Technik).
- Peroxidase-conjugated Streptavidin (with Swine anti rabbit Immunoglobulins, Katalognummer P 353), Katalognummer P 397, Chargennummer 074, DAKO Hamburg, Verdünnung 1: 250 (bei LSAB-Technik).

3.4 Statistik

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes SPSS for Windows®, Version 10.0. Grundlage der klinischen Daten waren die Befundakten im Archiv des Institutes für Pathologie der JLU, die Patientenunterlagen in den Archiven des Kreiskrankenhauses Gießen in Lich, des St.Josephs Krankenhauses Gießen, des Zentrums für Frauenheilkunde der JLU, der Klinik für Chirurgie der JLU und die Datenbank des Tumorzentrums Gießen (Leiter : Prof. Dr. H. von Lieven), wobei die Datensätze überprüft und um die immunhistochemischen Parameter erweitert wurden.

Die Erstellung der Graphiken und des Textes erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Corel Draw 6.0, Microsoft Word und Microsoft PowerPoint für Windows 98 und Windows XP.

Die Korrelationen erfolgten mit Anwendung des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten, da zwar die intervallskalierten Daten (z.B. Rezeptorstatus, Alter, Lymphknoten) in einer linearen Abhängigkeit voneinander stehen, aber die Variablen nicht aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen.

Die graphischen Darstellungen erfolgten als Säulendiagramme (SPSS, Word), Kreisdiagramme (Corel Draw) und Vierfeldertafeln (Word). Die Berechnung der klinischen Mittelwerte und deren Standardabweichung als deskriptive Statistik erfolgte durch SPSS.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistologisches Reaktionsmuster

Der APAAP-gefärbte Gefrierschnitt unterscheidet sich vom Biotin-Avidin-Peroxidase gefärbten Paraffinschnitt durch sein mikroskopisches Erscheinungsbild.

- Der Gefrierschnitt (siehe Bildanhang 1,2,5,6) imponiert durch seine durch die APAAP-Methode bedingte rötliche Färbung des Steroidrezeptors. Die rötliche Färbung des Hintergrundes ist allgemein schwächer als am Paraffinschnitt. Sie am Progesteronrezeptor jedoch im allgemeinen kräftiger als beim Östrogenrezeptornachweis. Bei einigen Progesteronrezeptormarkierungen findet sich eine diffuse inhomogene Färbung des Stromas. Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun erscheint der Hintergrund in einem blassen Blau. Der markierte Steroidrezeptor findet sich nukleär sowie perinukleär zytoplasmatisch.
- Im Paraffinschnitt (siehe Bildanhang 3,4,7,8) färbt sich der markierte Steroidrezeptor mit der Biotin-Avidin-Peroxidase braun bis ockerbraun. Die gelegentliche Färbung des Hintergrundes ist gelbbraunlich. Die Immunfärbung des Kernes ist homogen.

Wie bereits im Kapitel „Methodik“ dargestellt, kann der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner durch die Multiplikation des Wertes für Färbungsintensität mit dem des Anteils der gefärbten Tumorzellen die Werte 0;1;2;3;4;6;8;9;12 annehmen.

In der klinischen Bewertung ist es sinnvoll, diese Werte in übersichtlichere Bewertungsstufen (Expressionsstufen) einzuteilen. Am Institut für Pathologie der Universität Gießen ist diese Einteilung folgendermaßen:

- IRS 0: keine Expression
- IRS 1-3: geringe Expression
- IRS 4-8: mittlere Expression
- IRS 9-12: hohe Expression

Die Einteilung in Expressionsstufen kann, wie auch die generelle Einteilung in positive oder negative Expression, dem behandelnden Arzt Hilfestellung bei der Auswahl der Therapie geben.

4.2 Reaktionsmuster des Östrogenrezeptors

4.2.1 Verteilung und Vergleich der Expression nach dem Immunreaktiven Score (IRS)

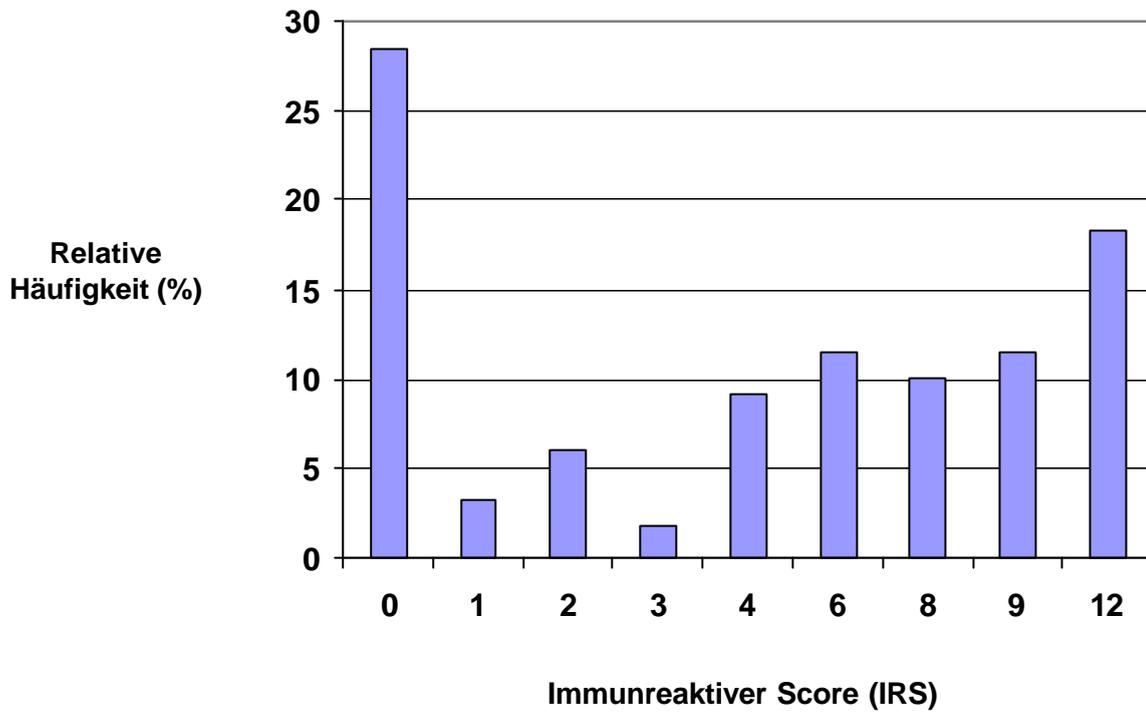


Abb. 4: Verteilung des Immunreaktiven Score (IRS) bei Markierung des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt mit der Biotin-Avidin Peroxidase-Färbung (n= 218)

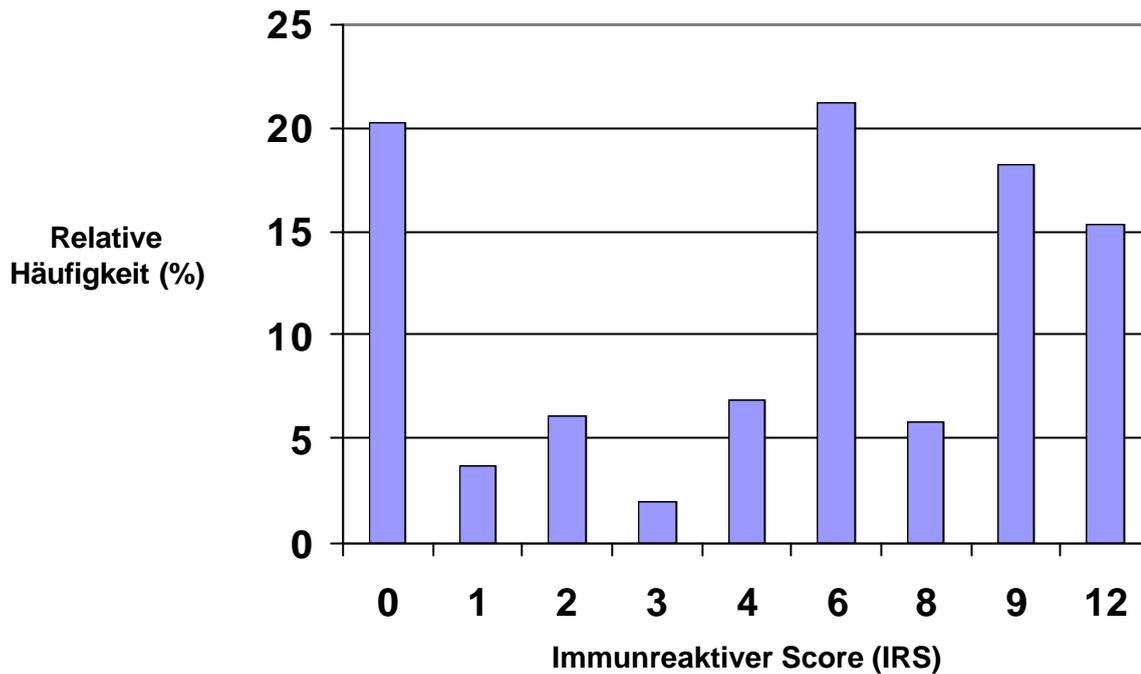


Abb. 5: Verteilung des Immunreaktiven Score (IRS) bei Markierung des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt mit der APAAP Methode (Verdünnung 1:100); (n=248)

Bei der Einteilung der IRS-Werte in positive und negative Expression (IRS 0-1= negativ; IRS 2-12= positiv), kam es zu folgenden Ergebnissen:

- Beim Östrogenrezeptor gab es bei 215 Patientinnen 176 Übereinstimmungen (135 positiv; 41 negativ); keine Übereinstimmung ergab sich bei 39 Patientinnen. Dieses entspricht einer Korrelation in Bezug auf ihre Wertigkeit (Positiv/ Negativ) von 0,819. Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 6: Wertigkeit des Östrogenrezeptors

Paraffinschnitt	Gefrierschnitt		
		Negativ (IRS<2)	Positiv (IRS>1)
Negativ (IRS<2)	41 (19,1 %)	11 (5,1 %)	52
Positiv (IRS>1)	28 (13,0 %)	135 (62,8 %)	163
Total	69	146	215

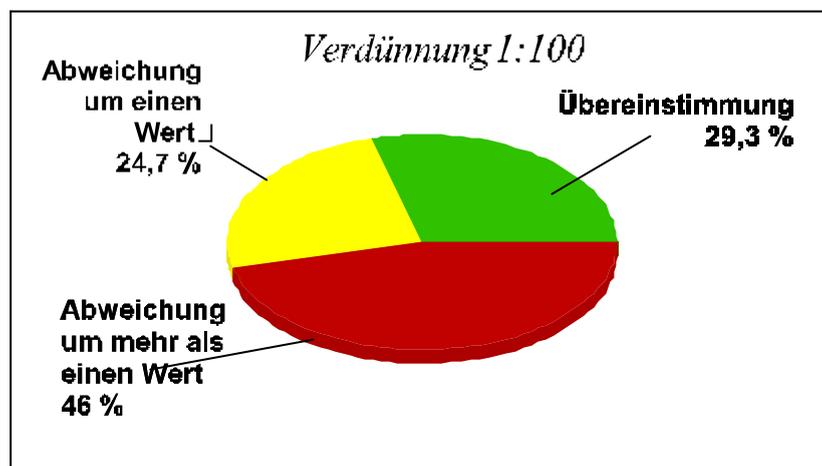


Abb. 6: Relative Übereinstimmung bzw. Abweichung der IRS der Östrogenrezeptorbestimmung am Gefrier- und Paraffinschnitt

Korrelationen der Immunreaktiven Scores (IRS)

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die einzelnen, einander zugehörigen Wertepaare (Gefrierschnitt und Paraffinschnitt) eines Patienten miteinander korreliert werden, betrug der Korrelationskoeffizient für alle Wertepaare:

- IRS des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt in Korrelation zum IRS des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt: 0,544 / Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.2.2 Verteilung und Vergleich der Intensitätsstufen

- Tabelle 7: Die relative Häufigkeit der Intensitätsstufen des Östrogenrezeptors (Verdünnung 1:100 und 1:250) am Gefrierschnitt und am Paraffinschnitt

	Gefrierschnitt	Paraffinschnitt
Verdünnung	1:100	1:250
Intensität 0	20,1 %	28,4 %
Intensität 1	8,0 %	11,5 %
Intensität 2	20,9 %	29,8 %
Intensität 3	51,0 %	30,3 %

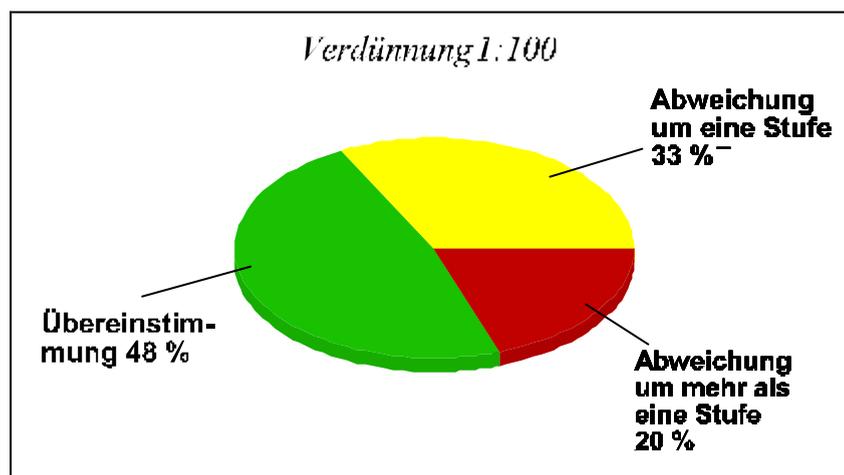


Abb. 7: Relative Übereinstimmung bzw. Abweichung der Intensitätsstufen der Östrogenrezeptorbestimmung am Gefrier- und Paraffinschnitt

Korrelation der Färbeintensitäten

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die Intensitätswerte des jeweiligen Patienten miteinander korreliert werden, ergab sich für das gesamte Kollektiv folgender Korrelationskoeffizient:

- Intensität der Färbung des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt in Korrelation zur Intensität der Färbung des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt: 0,5/ Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.2.3 Verteilung und Vergleich der Wertungsstufen für die Färbequantität

Die relative Häufigkeit (in %) der Wertungsstufen für die Färbequantität des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt und am Paraffinschnitt verteilte sich gemäß Tabelle 8:

	Gefrierschnitt	Paraffinschnitt
Verdünnung	1:100	1:250
Keine Färbung	20,2 %	29,2 %
<10% Färbung	7,4 %	3,3 %
10-50% Färbung	26,9 %	13,9 %
50-80% Färbung	24,4 %	23,9 %
50-80% Färbung	21,1 %	29,7 %

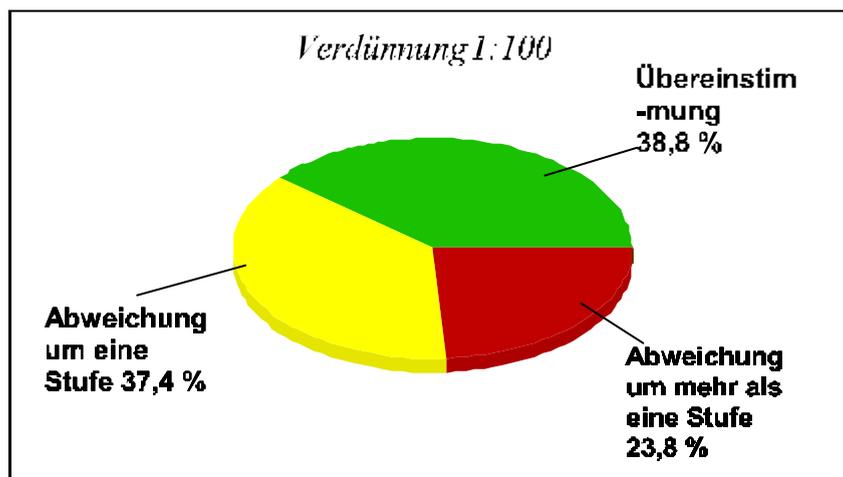


Abb. 8: Relative Übereinstimmung bzw. Abweichung der Quantitätsstufen der Östrogenrezeptorbestimmung

Korrelationen der Wertungsstufen für die Färbequantität

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die Anteilswerte der Färbung für den jeweiligen Patienten miteinander korreliert werden, ergab sich für das gesamte Kollektiv folgender Korrelationskoeffizient:

- Anteil der Färbung des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt (Verdünnung 1:100) in Korrelation zum Anteil der Färbung des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt: 0,545/ Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.3 Reaktionsmuster des Progesteronrezeptors

4.3.1 Verteilung und Vergleich der Expressionsmuster nach dem Immunreaktiven Score (IRS)

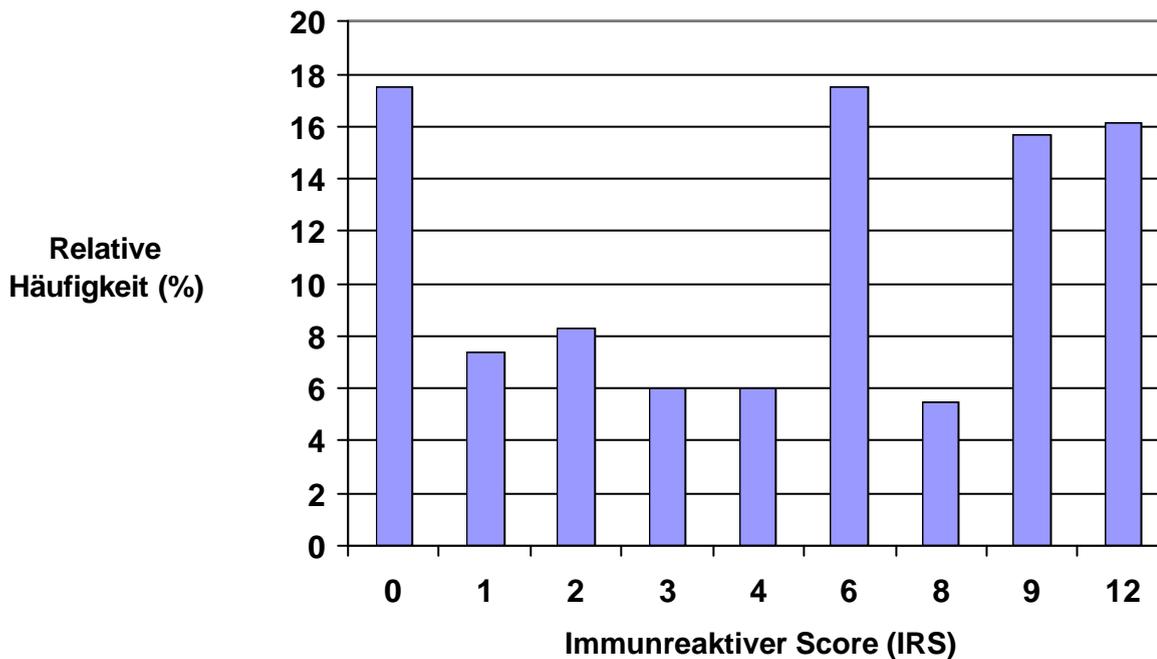


Abb. 9: Verteilung des Immunreaktiven Score (IRS) bei Markierung des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Färbung (n=217)

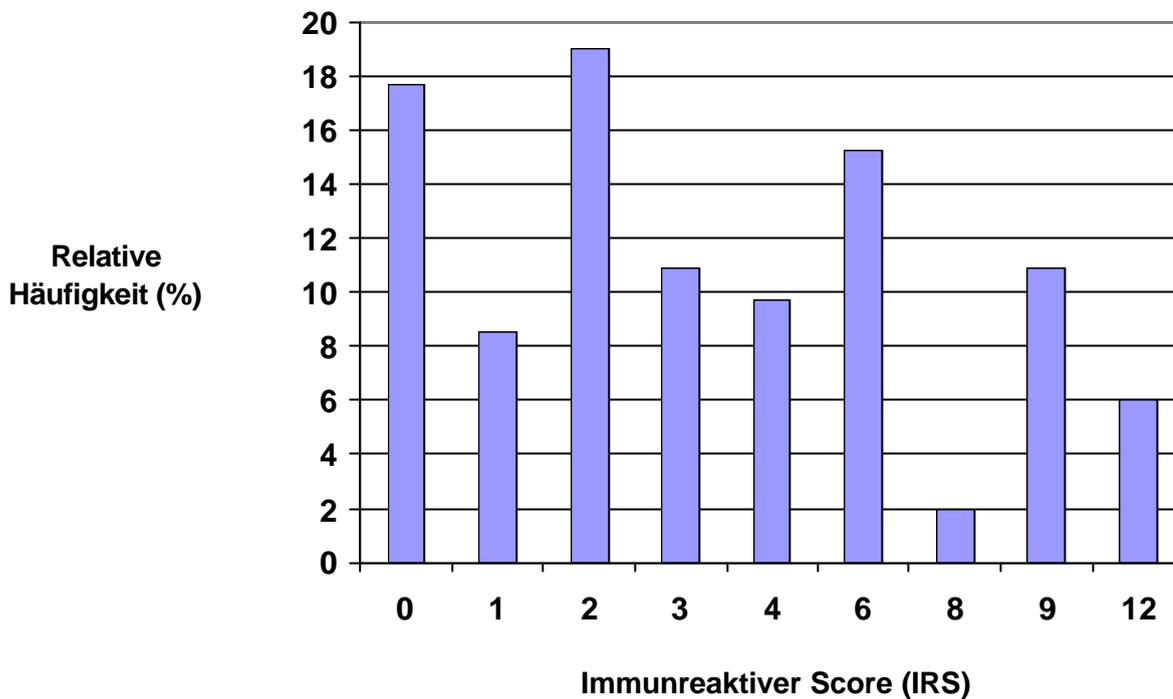


Abb. 10: Verteilung des Immunreaktiven Score (IRS) bei Markierung des Progesteronrezeptors am Gefrierschnitt mit der APAAP-Methode (n=248)

Bei der Einteilung der IRS-Werte in positive und negative Expression (IRS 0-1= negativ; IRS 2-12= positiv), kam es zu folgenden Ergebnissen:

- Beim Progesteronrezeptor gab es bei 213 Patientinnen 162 Übereinstimmungen (130 positiv; 32 negativ); keine Übereinstimmung fand sich bei 51 Patientinnen. Dieses entspricht einer Korrelation in Bezug auf ihre Wertigkeit (Positiv/ Negativ) von 0,76. Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 9: Wertigkeit des Progesteronrezeptors

	Paraffinschnitt			
		Negativ (IRS<2)	Positiv (IRS>1)	Total
Gefrierschnitt	Negativ (IRS<2)	32 (15,0 %)	21 (9,8 %)	53
	Positiv (IRS>1)	30 (14,0 %)	130 (61,0 %)	160
	Total	62	151	213

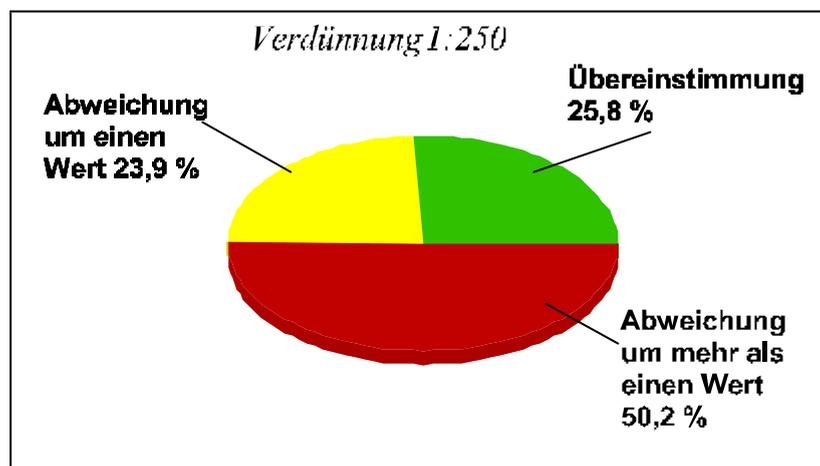


Abb. 11: Übereinstimmung bzw. Abweichung des IRS der Progesteronrezeptorbestimmung am Gefrier- und Paraffinschnitt

Korrelationen der Immunreaktiven Scores (IRS)

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die einzelnen, einander zugehörigen Wertepaare (Gefrierschnitt und Paraffinschnitt) eines Patienten miteinander korreliert werden, betrug der Korrelationskoeffizient für alle Wertepaare:

- IRS des Progesteronrezeptors am Gefrierschnitt in Korrelation zum IRS des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt: 0,58 / Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.3.2 Verteilung und Vergleich der Intensitätsstufen

- Die relative Häufigkeit der Intensitätsstufen des Progesteronrezeptors am Gefrierschnitt und am Paraffinschnitt verteilte sich gemäß Tabelle 10:

	Gefrierschnitt	Paraffinschnitt
Intensität 0	17,8 %	18 %
Intensität 1	18,6 %	17,5 %
Intensität 2	25,1 %	27,6 %
Intensität 3	38,5 %	36,9 %

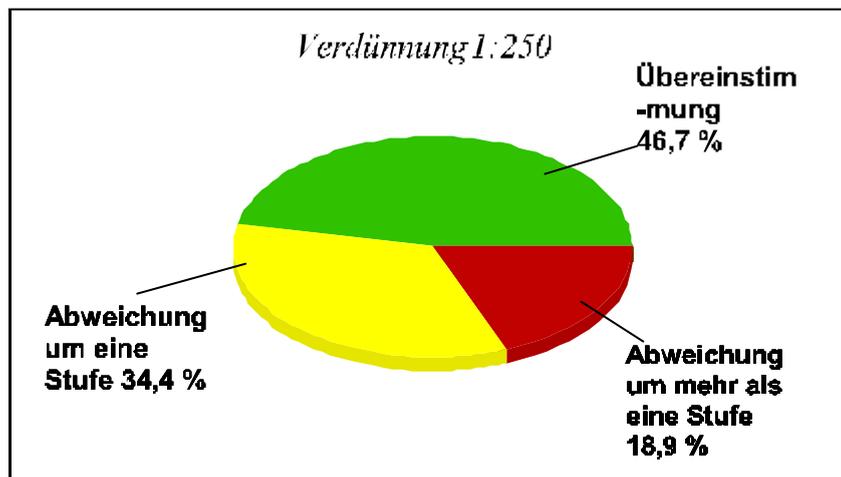


Abb. 12: Übereinstimmungen und Abweichungen der Intensitätsstufen der Progesteronrezeptorbestimmung am Gefrier- und Paraffinschnitt

Korrelation der Färbeintensitäten

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die Intensitätswerte des jeweiligen Patienten miteinander korreliert werden, ergab sich für das gesamte Kollektiv folgender Korrelationskoeffizient:

- Intensität der Färbung des Progesteronrezeptor am Gefrierschnitt in Korrelation zur Intensität der Färbung des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt: 0.476/ Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.3.3 Verteilung und Vergleich der Wertungsstufen für die Färbequantität

- Tabelle 11: Die relative Häufigkeit (in %) der Wertungsstufen für die Färbequantität des Progesteronrezeptors am Gefrierschnitt und am Paraffinschnitt

	Gefrierschnitt	Paraffinschnitt
Keine Färbung	18 %	18,3 %
<10% Färbung	27,6 %	11,1 %
10-50% Färbung	29,7 %	14,9 %
50-80% Färbung	15,9 %	32,7 %
>80% Färbung	8.8 %	23,8 %

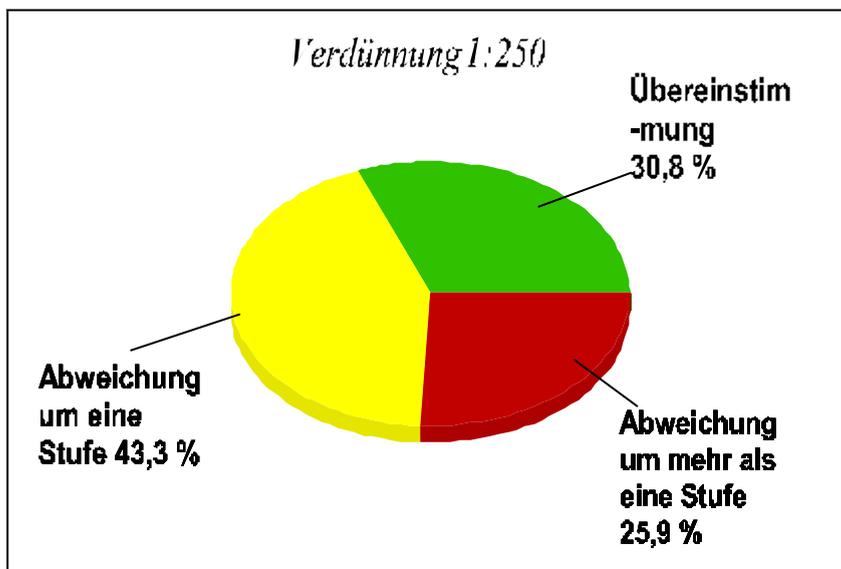


Abb. 13: Übereinstimmung bzw. Abweichung der Quantitätsstufen der Progesteronrezeptorbestimmung am Gefrier- und Paraffinschnitt

Korrelationen der Wertungsstufen für die Färbequantität

Bei der Korrelation nach Spearman, bei der die Anteilswerte der Färbung für den jeweiligen Patienten miteinander korreliert werden, ergab sich für das gesamte Kollektiv folgender Korrelationskoeffizient:

- Anteil der Färbung des Progesteronrezeptors am Gefrierschnitt in Korrelation zum Anteil der Färbung des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt: 0,49/ Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.4 Vergleich der Steroidrezeptorexpression mit dem klinischen Bild

4.4.1 Korrelationen mit dem klinischen Bild

Korreliert man die Expression (IRS) der Steroidrezeptoren mit den gemäss Pathologiebefund erhobenen klinischen Werten kommt man zu folgenden Ergebnissen (Korrelationskoeffizient nach Spearman):

Tabelle 12.: Steroidrezeptorexpression und Tumorgrading (Korrelation)

	Paraffinschnitt	Gefrierschnitt
Östrogen-Rezeptor	-0,341	-0,341
Progesteron Rezeptor	-0,328	-0,227

Die Korrelationen sind auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 13: Steroidrezeptorexpression und Mitoseindex (Korrelation)

	Paraffinschnitt	Gefrierschnitt
Östrogen-Rezeptor	-0,217*	-0,380**
Progesteron Rezeptor	-0,250*	-0,216*

* Die Korrelationen sind auf einem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 (2-seitig) signifikant.

** Die Korrelation ist auf einem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 14: Steroidrezeptorexpression und Tumorgroße (Korrelation)

	Paraffinschnitt	Gefrierschnitt
Östrogen-Rezeptor	-0,141*	-0,114 n.s.
Progesteron Rezeptor	-0,126 n.s.	-0,041 n.s.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 (2-seitig) signifikant.

n.s.: Die Korrelationen sind nicht signifikant.

Tabelle 15: Steroidrezeptorexpression und Anzahl befallener Lymphknoten (Korrelation)

	Paraffinschnitt	Gefrierschnitt
Östrogen-Rezeptor	0,041 n.s.	0,103 n.s.
Progesteron Rezeptor	0,188*	0,129 n.s.

*Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

n.s.: Die Korrelationen sind nicht signifikant.

4.4.2 Vergleich zwischen klinischen Daten (Mittelwerte) und der Steroidrezeptorexpression der Mammakarzinome

Tabelle 16: Klinische Mittelwerte am Gefrierschnitt; in Klammern die Standardabweichung

	n ER-/PR-	ER-/PR-	n ER+/PR+	ER+/PR+
Alter (Jahren)	44	59,7 (16,2)	157	64,4 (13,1)
Bef. Lkn. (Anzahl)	30	1,2 (1,8)	146	2,4 (5,3)
Tu.-Größe (cm)	35	2,3 (0,99)	146	2,5 (1,3)
Grading	28	2,21 (0,79)	122	1,86 (0,68)
Mitoseindex (Mitosen/Blickfeld)	14	3,0 (1,83)	61	1,63 (1,48)
Bodymass	38	27,1 (4,5)	133	26,3 (4,19)

	n ER-/PR+	ER-/PR+	n ER+/PR-	ER+/PR-
Alter (Jahren)	24	60,3 (15,0)	32	68,39 (11,9)
Bef. Lkn. (Anzahl)	22	5,2 (5,8)	29	3,9 (6,67)
Tu.-Größe (cm)	24	4,17 (2,34)	28	2,51 (1,15)
Grading	22	2,64 (0,58)	26	2,0 (0,65)
Mitoseindex (Mitosen/Blickfeld)	12	2,96 (2,47)	12	2,16 (1,23)
Bodymass	21	28,1 (4,1)	28	26,2 (4,0)

Tabelle 17: Klinische Mittelwerte am Paraffinschnitt; in Klammern die Standardabweichung

	n ER-/PR-	ER-/PR-	n ER+/PR+	ER+/PR+
Alter (Jahren)	39	61,4 (15,3)	136	65,6 (13,4)
Bef. Lkn. (Anzahl)	36	2,2 (3,2)	127	2,77 (6,83)
Tu.-Größe (cm)	37	2,76 (1,7)	128	2,5 (1,24)
Grading	36	2,53 (0,61)	99	1,83 (0,62)
Mitoseindex (Mitosen/Blickfeld)	17	3,0 (1,62)	55	1,65 (1,57)
Bodymass	36	26,8 (4,7)	114	26,8 (4,2)

	n ER-/PR+	ER-/PR+	n ER+/PR-	ER+/PR-
Alter (Jahren)	27	59,2 (13,3)	14	71,8 (9,29)
Bef. Lkn. (Anzahl)	25	3,08 (4,71)	14	1,93 (2,64)
Tu.-Größe (cm)	23	2,94 (1,47)	14	2,82 (1,52)
Grading	22	2,1 (0,81)	13	1,85 (0,69)
Mitoseindex (Mitosen/Blickfeld)	11	1,55 (0,65)	7	2,71 (0,95)
Bodymass	25	26,1 (3,7)	13	25,8 (4,3)

4.4.3 Steroidrezeptorexpression und Tumorhistologie

Tabelle 18: Steroidrezeptorexpression am Gefrierschnitt aufgeschlüsselt nach histologischen Tumoren

	ER-/PR-	ER+/PR+	ER-/PR+	ER+/PR-
Ductal inv.	24 (75 %)	110 (71,9 %)	19 (76 %)	23 (76,7 %)
Lobulär inv.	3 (9,4 %)	28 (18,3 %)	3 (12 %)	2 (6,7 %)
Mucinös inv.	1 (3,1 %)	4 (2,6 %)	0	1 (3,3 %)
Medullär inv.	1 (3,1 %)	0	1 (4 %)	0
Tubulär inv.	0	6 (3,9 %)	0	2 (6,7 %)
Papillär inv.	1 (3,1 %)	3 (2,0 %)	0	0
Sonstige Inv. Tumore	2 (6,3 %)	2 (1,3 %)	2 (8 %)	2 (6,7 %)

Tabelle 19: Steroidrezeptorexpression am Paraffinschnitt aufgeschlüsselt nach histologischen Tumoren

	ER-/PR-	ER+/PR+	ER-/PR+	ER+/PR-
Ductal inv.	30 (78,9 %)	91 (69,5 %)	20 (76,9 %)	10 (83,3 %)
Lobulär inv.	3 (7,9 %)	28 (21,4 %)	3 (11,5 %)	0
Mucinös inv.	1 (2,6 %)	4 (3,1 %)	0	0
Medullär inv.	2 (5,3 %)	0	0	0
Tubulär inv.	1 (2,6 %)	6 (4,6 %)	0	0
Papillär inv.	1 (2,6 %)	1 (0,8 %)	2 (7,7 %)	0
Sonstige Inv. Tumore	0	1 (0,8 %)	1 (3,8 %)	2 (16,7 %)

4.4.4 Steroidrezeptorexpression bei verstorbenen Patientinnen

Von den Patientinnen des Gießener Mammakarzinom Kollektives sind nachweislich 43 verstorben. Aufgrund der langen Laufzeiten des Mammakarzinoms und der relativ wenigen Todesfälle wurde auf eine Statistik mit Kaplan-Meier-Kurven verzichtet.

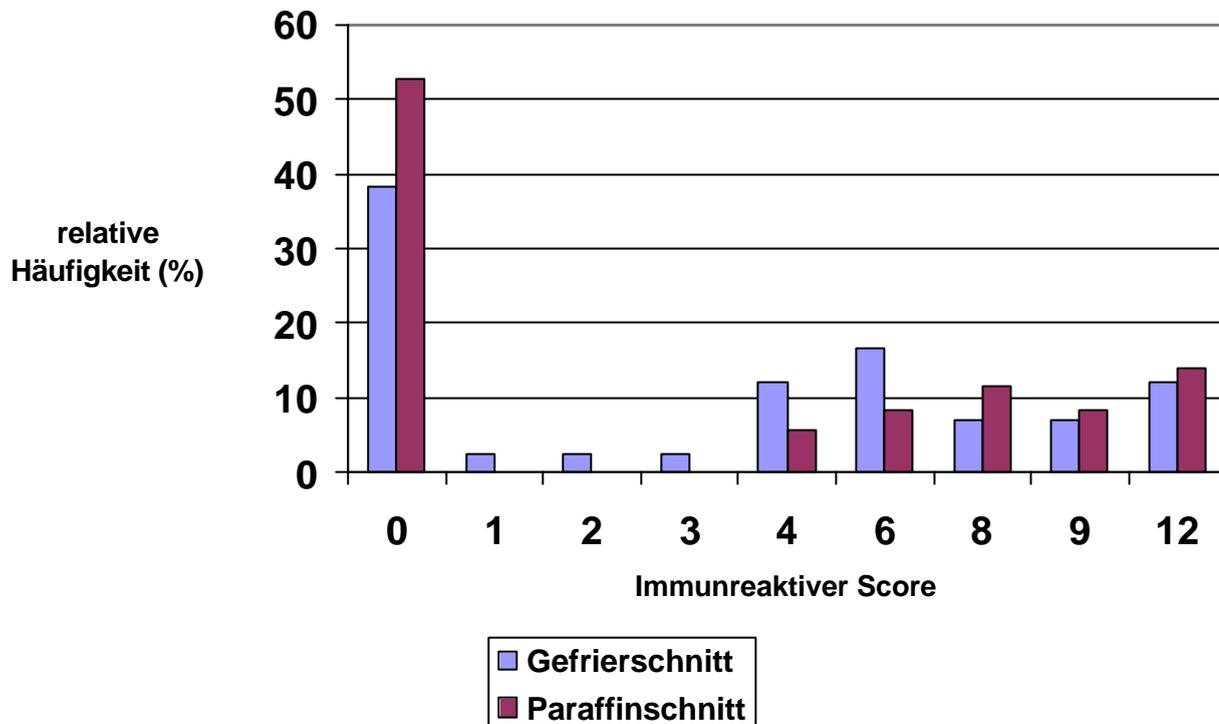


Abb. 14: Verteilung der IRS des Östrogenrezeptors der verstorbenen Patientinnen

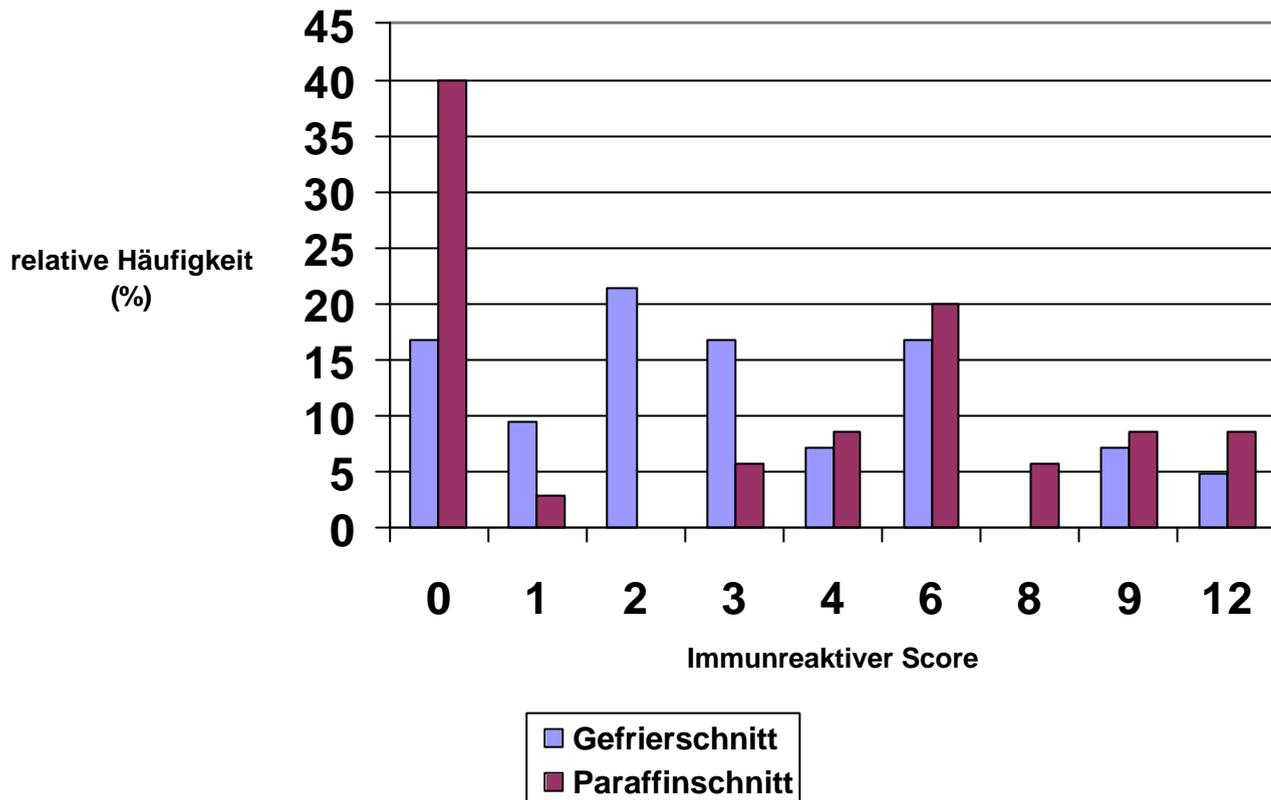


Abb. 15: Verteilung der IRS des Progesteronrezeptors der verstorbenen Patientinnen

4.5 Äußere Einflussgrößen auf die Steroidrezeptorexpression

4.5.1 Subjektiver Einfluss des Untersuchers auf die Steroidrezeptorexpression

- IRS des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt (diagnostische Erstbestimmung) in Korrelation zum IRS des Östrogenrezeptors am Paraffinschnitt (Eigenbestimmung): 0,822 / Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.
- IRS des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt (diagnostische Erstbestimmung) in Korrelation zum IRS des Progesteronrezeptors am Paraffinschnitt (Eigenbestimmung): 0,880 / Die Korrelation ist auf dem Niveau einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 (2-seitig) signifikant.

4.5.2 Einfluss der Verdünnung des Primärantikörpers auf den Steroidrezeptornachweis (am Beispiel des Östrogenrezeptor- Gefrierschnitts)

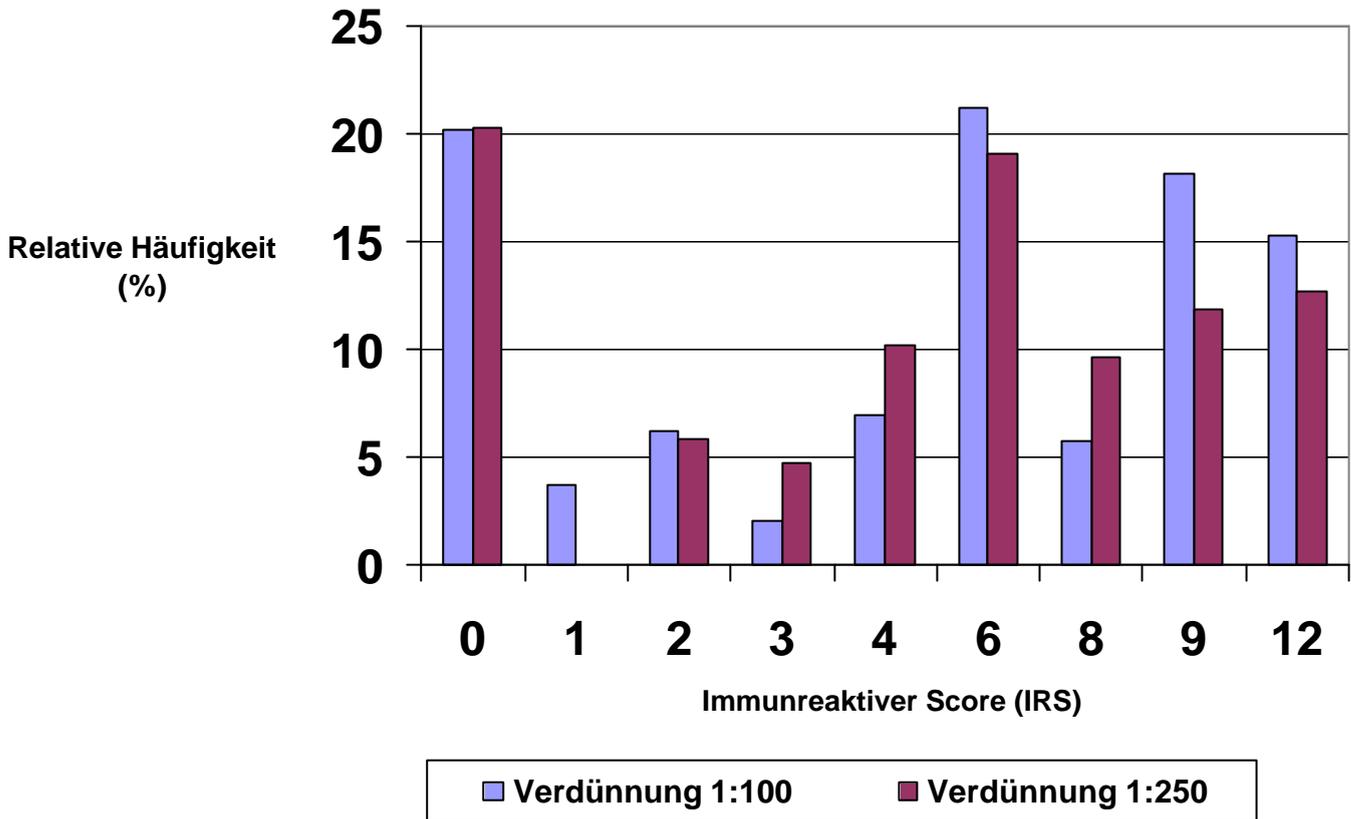


Abb. 16: Relative Häufigkeit (in %) des IRS des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:100/ 1:250)

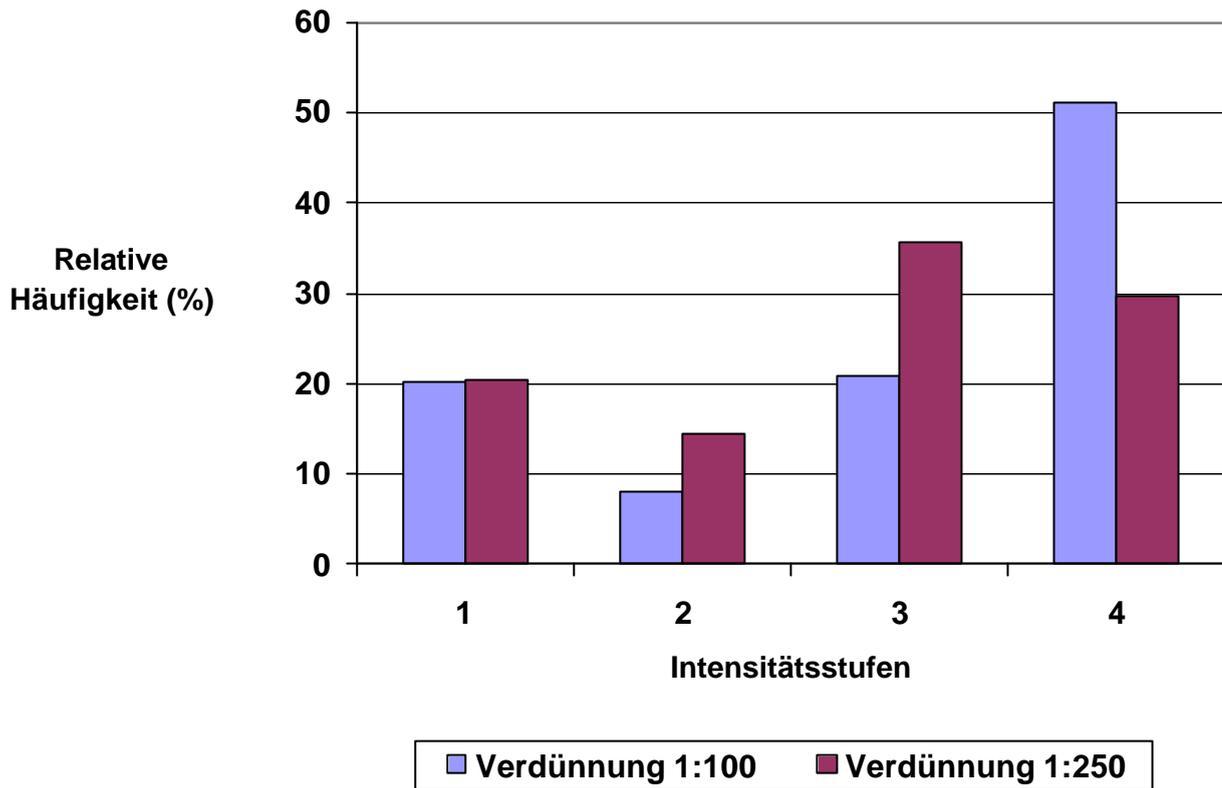


Abb. 17: Relative Häufigkeit (in %) der Intensitätsstufen des Östrogenrezeptors am Gefrierschnitt bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers (1:100/ 1:250)

5 Diskussion

5.1 Methodische Standortbestimmung

Bei der Östrogen- und Progesteronrezeptoranalyse gewann die immunhistochemische Bestimmung gegenüber der biochemischen immer mehr an Bedeutung. Zwar ist theoretisch die Immunmarkierung eines molekular defekten und weiterhin funktionell inaktiven Rezeptors möglich, aber Einwände bestehen auch gegen die biochemische Methode. Als Vorteile der immunhistochemischen Verfahren werden vor allem die bessere Konservierung der Tumorstruktur im Gewebeschnitt und somit die sichtbare heterogene Verteilung der Steroidrezeptoren genannt (Remmele und Stegner, 1987).

Weitere Vorzüge sind:

- Der immunhistochemische Rezeptornachweis, der auch ER-ICA (**E**strogen-**R**eceptor-**I**mmuno**C**ytochemical Assay) genannt wird, kann auch unterhalb der für den biochemischen Nachweis erforderlichen Gewebsmenge von 0,3-0,5g ausgeführt werden (Remmele und Stegner, 1987).
- Unabhängigkeit von der prämenopausalen endogenen Blockierung der Rezeptorbindungsstellen. Es können auch endogen besetzte Rezeptoren nachgewiesen werden (Pearl et al., 1988).
- Unabhängigkeit vom Umfang des Fett- und Bindegewebes und der Tumornekrosen, da die Tumorzelle und das Rezeptorprotein direkt sichtbar gemacht werden (Remmele und Stegner, 1987).
- Geringerer Zeitaufwand.
- Verzicht auf radioaktive Substanzen.
- Vermeidung von Fehlbestimmungen an Nicht-Tumorgewebe durch optische Kontrolle.
- Kein höhergradiger Konzentrationsverlust bindungsfähiger Liganden (Wilkens et al., 1995)

Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich mit dem Auftreten möglicher Diskrepanzen zwischen biochemischer und immunhistochemischer Rezeptorbestimmung. Dabei konnte eine relativ häufige Nicht-Übereinstimmung der Rezeptorbefunde festgestellt werden. Nach Pearl und Posey (1988) können bei der biochemischen Methode Rezeptoren blockiert werden, wenn hohe endogene Hormonwerte vorliegen oder wenn eine Tamoxifenbehandlung durchgeführt wird. Diese Rezeptoren sind der immunhistochemischen Bestimmung zugänglich.

Im internationalem Schrifttum schwanken die Werte für eine gesamtübereinstimmende Rezeptoranalyse beider Methoden zwischen 65 % und 93 % (Böhm und Dietrich, 1997).

Aber auch innerhalb der Gruppe der immunhistochemischen Bestimmungsverfahren gibt es verschiedene methodische Vorgehensweisen.

Es wurde der Frage nachgegangen, ob sich bei zwei verschiedenen möglichen immunhistochemischen Bestimmungsverfahren, nämlich der APAAP-Technik am Gefrierschnitt und der Avidin-Biotin-Peroxidase Technik am Paraffinschnitt, eine größere Übereinstimmung oder ähnlich divergierende Ergebnisse finden lassen würden.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist,

- die Reliabilität verschiedener immunhistochemische Bestimmungsverfahren zu prüfen
- die Validität verschiedener immunhistochemisches Bestimmungsverfahren zu prüfen
- eine Erörterung, ob eine weitere Standardisierung der bisher gängigen immunhistochemischen Detektionsverfahren notwendig ist.

Hierbei ist anzumerken, dass eine Vergleichsmöglichkeit zum „wahren“ Rezeptorstatus fehlt. Es sollte ein Verfahren aufgedeckt werden mit der bestmöglichen Korrelation zu klinischen Parametern und der Überlebenszeit. Bei der Immunrezeptorbestimmung interessiert vor allem die Güte als Verfahren zur Bestimmung prädiktiver Faktoren.

In diesem Rahmen stellte sich vor allem die Frage, wo die Unterschiede und Gemeinsamkeiten beider Methoden liegen. Diese wurden rein deskriptiv ermittelt, wobei insbesondere auf den Immunreaktiven Score, die Färbeintensität und die Anzahl gefärbter Zellen eingegangen wurde. Der Hormonrezeptorstatus wurde mit klinischen Parametern korreliert. Da vor allem die bei der Rezeptoranalyse am Paraffinschnitt angewandten Techniken zur Re-Antigenisierung, wie z.B. unterschiedliche Zusammensetzung des Fixierungsmittels, enzymatische Techniken, variierende Mikrowellentechniken, unterschiedliche Lagerungszeiten, u.a. nicht ohne Einfluss auf die immunhistochemische Antigendarstellung sind, muss ein Vergleichen zum Standard am Gefrierschnitt jeweils postuliert werden. Darüberhinaus kann eine unsachgemäße Verdünnung des Primärantikörpers, des Brücken- und des Detektionsantikörpers das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung verändern und ggf. verfälschen. Inwieweit eine Technik und deren richtige bzw. falsche Anwendung das Ergebnis der Steroidrezeptorbestimmung beeinflusst, zeigt sich am Beispiel der von Böhm und Dietrich

1997 durchgeführten Verteilungsänderung der Werte des Immunreaktiven Score (IRS) nach um 4 Stunden verzögertem Beginn der Formalinfixierung im Vergleich zu den IRS- Werten bei sofortiger Fixierung nach Gewebentnahme am Paraffinschnitt. So nahm bei verspäteter Fixierung der Korrelationskoeffizient ab, was insbesondere Proben mit einer hohen Expression der Steroidrezeptoren mit einem IRS von 9 und 12 betraf, bei Mammakarzinomen mit einem IRS von ≤ 4 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Unfixierte Gewebelagerung begünstigt die Autolyse mit zunehmender Proteolyse; ein unerwünschter Prozess, der insbesondere den cytosolische Steroidrezeptoranteil betrifft. Gerade bei einer retrospektiven Rezeptoranalyse am Paraffinschnitt, wie sie bei der Erstellung dieser Studie durchgeführt wurde, ist von unterschiedlichen und meist nicht mehr nachvollziehbaren Zeiten bis zur vollständigen Gewebefixierung auszugehen. Diese Fixierungsgeschwindigkeit ist vom Zeitintervall zwischen Gewebeentnahme und Ankunft und Bearbeitung im histologischen Eingangslabor (ganz überwiegend <30 Min.), aber auch von Größe und Beschaffenheit des Tumormaterials (variierend von der diagnostischen Probeexcision bis zum Ablatiopräparat) abhängig. Pertschuk et al. (1996) sehen aus logistischen Gründen dennoch einen Vorteil der Paraffinschnitttechnik. Eine Kühlkette muss nicht eingehalten werden, Proben für retrospektive Untersuchungen sind besser lagerbar und die Thermolabilität des Rezeptors soll nicht ins Gewicht fallen.

Von ähnlichem Gewicht ist die Frage nach dem unterschiedlichen Einfluss der Biotin-Avidin- Peroxidase-Methode auf der einen Seite und dem Einfluss der APAAP-.Methode auf der anderen Seite. Wie unterscheiden sich die Färbungen hinsichtlich der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil der gefärbten Zellen? Wie verhält es sich mit einer möglichen unterschiedlichen Verteilung der Intensitätsstufen und Quantitätsstufen? Welches Zellbild ist für den Untersucher, der ja subjektiv beurteilen muss, eindeutiger?

Die Bewertung der immunhistochemischen Steroidrezeptorbestimmung nach Remmele und Stegner ist, wie erwähnt, nur bedingt objektiv. Da jeder Untersucher seine eigene Interpretation dieses Bewertungsschemas vor Augen hat, ist zwangsläufig mit individuellen Abweichungen zu rechnen. Diesen Einfluss in repräsentative Größen oder Daten zu fassen ist schwerlich möglich, dennoch sollte er dem Kliniker bei der Interpretation des Steroidrezeptorbefundes stets bewusst sein. Eine immunhistochemische Bestimmungsmethode sollte demnach zumindest eindeutig formuliert sein. Es ist z. B. hilfreich, wenn die Intensität der Färbung das gesamte Spektrum von „keiner Farbreaktion“ bis „starker Farbreaktion“ in möglichst weiten, unterscheidbaren „Stufen“ erfasst. Das Wort „Stufen“ in diesem Sinne ist schlecht gewählt, da es sich ja um fließende Übergänge handelt,

lehnt sich aber an die Stufeneinteilung nach Remmele und Stegner an. Beck et al. (1986) setzen die intra- und interindividuellen Bewertungsunterschiede als gering an, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie tatsächlich bestätigt wird. Die Reproduzierbarkeit der Score-Bewertung wird zudem als relativ gut erachtet. Möglicherweise lassen sich subjektive Einflussgrößen künftig durch den Einsatz computergesteuerter Bildanalyzesysteme noch weiter minimieren (Tuczek et al., 1990).

Ein generelles Problem der Bewertung der Rezeptorexpression ist ihre international unterschiedliche Handhabung. Während sich im deutschsprachigen Raum die Methode nach Remmele und Stegner durchgesetzt hat, sind im Ausland unterschiedliche Bewertungsverfahren üblich. So wird z. B. bei Pertschuk et al. die Färbintensität zugunsten der Färbequantität weniger stark gewichtet. Das macht Vergleiche zu anderen Studien schwieriger. Ein internationaler Konsens wäre hier wünschenswert.

Eine weitere Einflussgröße, unabhängig von Fixierung, Färbemethode und Untersucher, stellt das unterschiedliche Material des Paraffin- und Gefrierschnitts dar. Durch die heterogene Verteilung der Steroidrezeptoren innerhalb des Tumors besteht die Gefahr, dass bei geringer Schnittgröße positive und negative Areale in falscher Relation repräsentiert werden. Durch den morphologischen Nachteil einer kleinen Schnittgröße mit dem geschätzten Minimum von ca. 500-1000 analytischen Tumorzellen, ist das Risiko das Mammakarzinom als „falsch negativ“ zu befunden erhöht. Zu berücksichtigen ist, dass das Gewebematerial für die Fixierung in Paraffin einerseits und im flüssigem Stickstoff andererseits bei demselben Tumor aus verschiedenen Tumorarealen kommt. Fazit: Je größer also die Differenz der Schnittgröße zwischen Paraffinschnitt (mit in der Regel zwischen 5000-50000 analysierten Tumorzellen) und Kryostatschnitt, mit desto größeren Diskrepanzen ist bei der Bewertung des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen (Färbequantität) zu rechnen.

Bei dieser Studie sollten ganz bewusst zwei häufig benutzte Methoden gegenüber gestellt werden, die sich sowohl in der Wahl des Materials (Gefriermaterial/ Paraffinmaterial) als auch in der Wahl der Färbemethodik (Biotin- Avidin- Peroxidase- Färbung/ APAAP-Färbung) voneinander unterscheiden. Auf diese Weise wurde das Spektrum der gängigen Techniken in ihren größten Unterschieden erfasst. Selbstverständlich lässt sich keine Aussage darüber machen, welchen Anteil jeweils die Materialwahl und die Färbetechniken an den festgestellten Diskrepanzen haben. Das Ausmaß der Diskrepanzen, mit einer Abweichung im Positiven/ Negativen von 18,1 % am Östrogenrezeptor von 23,7 % am Progesteronrezeptor lässt aber eine weitere Standardisierung der immunhistochemischen Bestimmungsverfahren der Steroidrezeptorexpression nötig erscheinen.

Aufgrund der klinischen Relevanz dieser Studie wurden die beiden zur Zeit gängigsten Färbemethoden, nämlich die Biotin- Avidin- Peroxidase- Methode und die APAAP- Methode, ausgewählt. Neuere immunhistochemische Bestimmungsverfahren, wie z. B. die EnVision- Methode oder die ImmunoMax- Methode konnten noch nicht geprüft werden. Da in näherer Zukunft aber mit einer größeren Verbreitung dieser Detektionsmethoden, v. a. der preisgünstigen und wenig zeitaufwendigen EnVision- Methode, zu rechnen ist, muss auch hier mit der Möglichkeit einer direkten Auswirkung auf die Detektion der Steroidrezeptoren und die entsprechend veränderte Befundmitteilung an den Kliniken gerechnet werden.

Belling et al. verglichen 1999 verschiedene immunhistochemische Standardverfahren (APAAP-, Avidin-Biotin-, EnVision und ImmunoMax-Methode) hinsichtlich ihrer entstehenden Kosten und der für ihre Durchführung benötigten Zeit. Alle Methoden wurden so aufeinander abgestimmt, dass sie in bezug auf ihre Sensitivität und Spezifität vergleichbar waren und zu guten reproduzierbaren Ergebnissen führen sollten. Die weit verbreitete und etablierte APAAP-Methode stellte sich mit den durchschnittlichen Gesamtkosten ohne Primärantikörper pro Schnitt von 3.62 € als die teuerste und mit durchschnittlich 3,2 h Färbezeit als die zeitaufwendigste Methode dar. Die vergleichbaren Kosten für die Avidin-Biotin-Methode lagen bei 0.49 € bei einem durchschnittlichen Zeitaufwand von 2 h. Die vergleichbaren Kosten für die EnVision-Methode lagen bei 0.41 € und für die ImmunoMax-Methode bei 0.79 €. Da man bei der ImmunoMax-Methode mit kleineren Mengen an Antikörpern auskommt, ist diese vor allem bei der Verwendung sog. „teurerer“ Antikörper von Vorteil. Die Rezeptorbestimmung am Gefrierschnitt soll mit den handelsüblichen Kits ca. 3mal soviel kosten wie die am Paraffinmaterial (Wilkens et al., 1995).

5.2 Vergleich der Immunreaktiven Score (IRS)- Werte

In der Ergebnisanalyse der vorgelegten Arbeit fällt auf, dass beide Methoden in der klinisch essentiellen Information „ja oder nein“ beim Östrogenrezeptor in 82,5 % und beim Progesteronrezeptor in 76 % übereinstimmen. Noch deutlicher fallen die Diskrepanzen aus, wenn man die Korrelationen der jeweils ermittelten Immunreaktiven Score-Werte betrachtet. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman liegt für den Östrogenrezeptor bei nur 0,536 und für den Progesteronrezeptor bei nur 0,580.

In einer ähnlichen Studie von Böhm und Dietrich (1998) wurde das immunhistologische Färbeverhalten zwischen Kryostat- und Paraffinschnitt ebenfalls getestet mit jedoch anderen Primärantikörpern. Die Gesamtübereinstimmung wurde beim Östrogenrezeptor mit 89 % und beim Progesteronrezeptor mit 92 % beziffert. Bei einer Einteilung in fünf verschiedene

Bewertungsstufen wurden allerdings auch Abweichungen von einer Bewertungsstufe als Übereinstimmung interpretiert. Über eine Unterscheidung nach richtig positiven und negativen Befunden berichten diese Autoren nicht. Die Korrelation zwischen den immunhistochemischen Verfahren war allerdings größer als die zwischen Immunhistochemie (Paraffinschnitt) und biochemischer Rezeptoranalyse.

Wilkens et al. (1995) berichten über eine Übereinstimmung im positiver/ negativer Befunde des Östrogenrezeptors von 97,8 % und des Progesteronrezeptors von 85,7 %. Es wurde hier für den Paraffinschnitt und Gefrierschnitt jeweils der gleiche Primärantikörper genommen.

Bei Pertschuk et al. (1996) liegen vergleichbare Werte für den Östrogenrezeptor bei 72,9 %. Ob diese, doch deutlich niedrigere Übereinstimmung daran liegt, dass Pertschuk et. Al für den Gefrier- und Paraffinschnitt jeweils unterschiedliche Primärantikörper verwendet haben (wie in der vorliegenden Studie), ist zu vermuten.

Auffälligkeiten zeigt auch die Häufigkeitsverteilung der in der eigenen Arbeit ermittelten IRS und Expressionsstufen beim Östrogenrezeptor:

Am Paraffinschnitt zeigten sich deutlich häufiger ER-negative Karzinome (31,6 %) als am Gefrierschnitt (24 %). In 28 Fällen (13 %) war der Paraffinschnitt ER-positiv bei ER-negativem Gefrierschnitt. Aber auch Karzinome mit hoher Expressionsstufe (IRS 12) fanden sich am Paraffinschnitt mit 18 % häufiger als am Gefrierschnitt mit 15,1 %. Wilkens et al. (1995) und Pertschuk et al. (1996) berichten jeweils über einen höheren Anteil ER-negativer Tumoren am Gefrierschnitt. Dieses wird von Wilkens et al. mit einer höheren Paraffingängigkeit des verwendeten Antikörpers begründet (1D5.26 , Fa. Immunotech, Hamburg), also des gleichen Antikörpers in der Chargen-Applikation eines anderen Anbieters.

Bei der Häufigkeitsverteilung der IRS und Expressionsstufen des Progesteronrezeptors fand sich beim Paraffinschnitt wesentlich häufiger eine hohe Expression (IRS 9;12) als beim Gefrierschnitt. Progesteronrezeptornegative Mammakarzinome waren beim Paraffinschnitt (17,5 %) und beim Gefrierschnitt (17,7 %) in etwa gleich häufig.

In der Studie von Wilkens et al. (1995) waren im Gefrierschnitt 60,1 % und im Paraffinschnitt 64,4 % der Tumoren PR-positiv. 21 von 223 Karzinomen sind nur am Paraffinmaterial als positiv erkannt worden, 11 nur am Gefriermaterial.

Neumann et al. (1989) untersuchte 100 Mammakarzinome mit der APAAP-Methode im Gefrierschnitt und im Bezug zu einer biochemischen Bestimmung. Die Autoren beschreiben dabei einen relativ hohen Anteil (55 %) an PR-negativen oder schwach PR-positiven

Tumoren; bezogen auf die biochemischen Werte wird der Anteil falsch negativer Tumoren hier auf 17 % beziffert.

Um den Rezeptorgehalt genauer zu eruieren, empfiehlt sich, alle diese Tumoren auch biochemisch nochmals gezielt auf ihren Rezeptorgehalt zu untersuchen. Zur genaueren Aufklärung kann auch der klinische Verlauf des Mammakarzinoms und die Überlebensdaten dieser Patientinnen dienen. Die Ansprechraten auf eine endokrine Therapie dienen z.B. bei Pertschuk als Referenzgröße für den vermutlich „wahren“ Rezeptorgehalt.

Für den klinisch tätigen Arzt als Entscheidungsträger, ob als Ergebnis der Rezeptoranalyse eine Hormontherapie durchgeführt werden soll oder nicht, ist eine Einteilung in zu viele Bewertungsstufen verwirrend. So nützlich die Bestimmungsmethode nach Remmele und Stegner für den Untersucher ist, desto weniger interessant ist sie für den Therapeuten. Hier sollte klar unterschieden werden zwischen rezeptorpositiv und rezeptornegativ. Je mehr „falsch positive“ oder „falsch negative“ Befunde eine Bestimmungsmethode zulässt, desto ungeeigneter ist sie. Ein Nichtübereinstimmen zwischen rezeptorpositiv und rezeptornegativ des Östrogenrezeptors von 17,5 % und des Progesteronrezeptors von 24 % ist als zu hoch zu bewerten, da im Einzelfall ernste Konsequenzen für die Durchführung einer suffizienten Therapie entstehen können. Die zu erwartende relativ hohe Zahl „falsch negativer“ Befunde kann andererseits zu einer eher großzügigen Indikationsstellung zur Hormontherapie führen. Immerhin sprechen 10 % aller biochemisch als rezeptornegativ getesteten Karzinome auf eine Tamoxifentherapie an (Pertschuk et al., 1996). In der Studie von Neumann et al. (1989), in der der Progesteronrezeptor biochemisch und immunhistochemisch bestimmt wurde, wurde bereits ein hoher Anteil (17 %) falsch negativer Ergebnisse in der Immunhistochemie beschrieben. Solche falsch negativen Tumoren finden sich auch in den von Perrot-Applanat et al. (1987) publizierten Fällen. Pertschuk et al. (1996) beschreiben eine mögliche Ursache in der Temperaturlabilität des Rezeptors. Anders als bei den vorliegenden Fällen fanden sich jedoch bei der Östrogenrezeptorbestimmung mehr ER-negative Fälle im Gefriermaterial als im Paraffinmaterial.

Daraus lässt sich schließen, dass die Übereinstimmung zwischen der APAAP-Methode am Gefrierschnitt und der Biotin-Avidin-Peroxidase Methode am Paraffinschnitt um so mehr zunimmt, je größer das Einteilungsschema der Bewertung ist. Die Frage nach Übereinstimmung ist somit zu einem Großteil eine Frage der Definition. Dieses macht einen Vergleich zu anderen vorliegenden Arbeiten, die ebenfalls immunhistochemische und/ oder

biochemische Detektionsverfahren miteinander vergleichen, schwierig. Die Ergebnisse der vergleichenden Studie zwischen der APAAP-Färbung am Gefrierschnitt und der LSAB-Färbung am Paraffinschnitt weisen allerdings deutliche Unterschiede in der diagnostischen Bewertung des Steroidrezeptorstatus beim Mammakarzinom auf.

5.3 Intensität der Immunfärbung und Anteil der exprimierenden Zellen

Es stellt sich die Frage, ob die Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Gefrier- und Paraffinschnitt eher auf Diskrepanzen bei der Färbungsintensität oder dem Anteil der gefärbten Zellen zurückzuführen sind.

Die Korrelationskoeffizienten nach Spearman für die Färbeintensität (ER: 0,5; PR: 0,48) waren auf einem signifikanten, aber nicht optimalen Niveau, ähnlich wie beim Immunreaktiven Score. Dabei korreliert der Anteil der gefärbten Zellen an beiden Steroidrezeptoren nur etwas besser (ER:0,55; PR:0,49).

Die Kreisdiagramme (Abb. 7,8,11,12,13) vermitteln den Eindruck, dass aufgrund der höheren völligen Übereinstimmungen der Färbepaare die Färbeintensität besser korreliert als der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen. Dieses ist jedoch nicht der Fall, da die Färbequantität in fünf Stufen skaliert ist und die Färbeintensität nur in vier. Bei einer feineren Erfassung einzelner Merkmale werden auch Unterschiede eher aufgenommen. Für die Diskrepanzen bei der diagnostischen Bewertung der Steroidrezeptoren sind daher sowohl die Unterschiede in der Färbungsintensität als auch in der Färbequantität anzuführen, wobei die ersteren deutlicher ausfallen als die letzteren.

Der Östrogenrezeptor zeigt am Gefrierschnitt deutlich häufiger eine hohe Intensität der Färbung als am Paraffinschnitt. Bei der Färbequantität fand sich dagegen im Paraffinschnitt häufiger ein hoher Anteil mit mehr als 80 % gefärbter Zellen. Möglicherweise erscheinen am Paraffinschnitt wegen der stärkeren Hintergrundfärbung und dem ohnehin schwächeren Intensitätsniveau einige negative Zellen als falsch positiv. Eine andere Erklärung wäre, dass einige Zellen des Gefrierpräparates durch Lagerungs- und Antau-Artefakte ihre Antigenität verlieren und so als falsch negativ imponieren. Für beide Theorien spricht, dass der Paraffinschnitt im Mittel bei stattgefundener Immunfärbung in sich homogener wirkt. Über eine kräftiger wirkende Färbeintensität am Gefrierschnitt berichten auch Briscoe et al. (1992).

Für den Progesteronrezeptor war die Häufigkeitsverteilung der Intensitätsstufen am Gefrier- und Paraffinschnitt sehr ähnlich; bei keiner Stufe wurden Differenzen von mehr als 2,5 %

beobachtet. Bei der Färbequantität fand sich dagegen beim Paraffinschnitt wesentlich häufiger ein hoher Anteil mit mehr als 80 % gefärbter Zellen als am Gefrierschnitt. Bei in etwa gleicher Intensität lag beim Paraffinschnitt ein höherer Anteil gefärbter Zellen vor. Bei beiden Methoden wurden Hintergrundfärbungen gesehen, die für die Detektion falsch positiver Zellen verantwortlich sein könnten. Auch ein Antigenitätsverlust in den Gefrierschnitten, ähnlich wie beim Östrogenrezeptor ist zu diskutieren, da auch hier der Paraffinschnitt im Mittel homogener als der Gefrierschnitt reagierte.

Für die Differenzen bei dem Anteil der gefärbten Zellen am Östrogenrezeptor und am Progesteronrezeptor kann auch die im Durchschnitt wesentlich kleinere Schnittfläche des Gefrierschnitts verantwortlich gemacht werden. Kleinere Tumorauschnitte sind weniger repräsentativ als größere. Gerade durch die Immunhistochemie ist klar belegt, dass die Verteilung rezeptorpositiver/ negativer Areale innerhalb eines Tumors sehr heterogen sein kann. In diesem Fall ist der Paraffinschnitt dem Gefrierschnitt wegen der größeren Schnittfläche klar überlegen. Bei Kenntnis der Proliferationsaktivität der ER-negativen Zellen ließe sich möglicherweise unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils ER-positiver Zellen die Zeitspanne abschätzen, während der die Anti-Östrogen-Therapie auf ER-positive Targetzellen trifft (Tuczek et al., 1990). Ob die Proliferationsbestimmung jedoch bei jedem Tumor zur Standarddiagnostik wird, ist aus Kostengründen fraglich.

Für die Durchführung einer endokrinen Therapie fordern Beck et al. (1986), dass der Tumor zum überwiegenden Teil aus ER-positiven Zellen mit mittlerer Färbeintensität bestehen müsse. Er räumt dabei ein, dass dieses nicht durch eine klinische Studie zur Ansprechrate und Prognose gestützt wird. Dieses ist insofern in Frage zu ziehen, da beide Steroidrezeptoren gleich gewichtet berücksichtigt werden sollten und zumindest für den Progesteronrezeptor in der Literatur über falsch negative Fälle recht häufig berichtet wird (Neumann et al., 1989). Je nach Bestimmungsmethode trifft dieses auch auf den Östrogenrezeptor zu.

Für die limitierte Schnittfläche des Gefrierschnittes sind im wesentlichen zwei Faktoren verantwortlich: Die schwierigere Schnittführung mit dem Gefriermikrotom und die durch die Aufbewahrungsbehälter vorgegebene Maximalgröße des Präparates. Selbst bei einer verbesserten Schnitttechnik würden erweiterte Lagerungskapazitäten größere (laufende) Kosten erzeugen. Obwohl die Übereinstimmungen der Färbeintensität und Färbequantität des Östrogenrezeptors bei einer Verdünnung des Primärantikörpers auf 1:250 am Gefrierschnitt höher sind als bei einer Verdünnung auf 1:100, ist die Korrelation der Immunreaktiven Scores, wie oben beschrieben, bei einer Verdünnung von 1:250 geringfügig kleiner.

5.4 Beziehungen zu klinisch-pathologischen Parametern

Die Immunreaktiven Scores (IRS) der Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorfärbungen wurden mit den klinischen Parametern Tumorgrading, Mitoseindex, Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Bodymassindex korreliert. Diese sind bekanntermaßen Parameter, die direkt oder indirekt in Bezug zum Steroidrezeptorstatus und zur Überlebenszeit der Patientinnen stehen. Aus den Korrelationskoeffizienten können Aussagen zum prognostischem bzw. prädiktivem Wert eines Detektionsverfahrens zur Steroidrezeptorbestimmung getroffen werden.

Am Östrogenrezeptor korrelierten beide Bestimmungsverfahren signifikant negativ mit dem Tumorgrading und dem Mitoseindex, was auch aus anderen Studien bekannt ist (Tuczek et al., 1990). Während die Korrelationskoeffizienten für das Tumorgrading am Gefrier- und Paraffinschnitt in etwa gleich waren, lag der Korrelationskoeffizient für den Mitoseindex bei der Gefrierschnittfärbung mit $-0,380$ deutlich höher als der des Paraffinschnittes mit $-0,217$. Die Korrelation zum Lymphknotenbefall und zum Bodymaßindex war ebenfalls bei der APAAP-Methode am Gefrierschnitt höher als bei der LSAB-Methode am Paraffinschnitt, jedoch in beiden Fällen nicht signifikant. Nach Tuczek et al. (1990) besteht keine Beziehung zwischen dem ER-Gehalt der Tumoren und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Eine signifikante Korrelation zur Tumorgröße fand sich in der vorliegenden Studie am Paraffinschnitt, nicht jedoch am Gefrierschnitt. Zur Tumorgröße bei Operation muss allerdings angemerkt werden, dass sie in erster Linie vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängt, und diese wieder von der Tumorgröße, da die meisten Patientinnen den Tumor ab einer gewissen Größe selbst tasten, unabhängig vom Rezeptorstatus.

Wirft man einen Blick auf die IRS-Verteilung der verstorbenen Patientinnen, so fällt auf, dass 40,6 % am Gefrierschnitt und 52,8 % am Paraffinschnitt für Steroidrezeptoren negativ waren. Allerdings kann diese Aussage nur für ein relativ kleines Kollektiv von 40 (Gefrierschnitt) bzw. 36 (Paraffinschnitt) Patientinnen gelten.

Bei dem Vergleich der APAAP-Methode am Gefrierschnitt mit der LSAB-Methode am Paraffinschnitt zeigen beide Methoden bei der Bestimmung des Östrogenrezeptors eine in etwa gleiche Beziehung zu klinischen Parametern. Hierbei sprechen etwas höhere Korrelationskoeffizienten beim Mitoseindex, beim Lymphknotenbefall und beim Bodymassindex für leichte Vorteile der APAAP-Methode am Gefrierschnitt, der Steroidrezeptorstatus der verstorbenen Patientinnen jedoch für einen leichten Vorteil der LSAB-Methode am Paraffinschnitt bezogen auf ihren prognostischen Wert. Histologisch ist bekannt, dass intraduktale Karzinome eine kräftige ER-positive Reaktion aufweisen. Bei

infiltrierendem Tumor weist die stromainvasive Komponente häufig weniger Rezeptoren auf (Köhler et al., 1986). Der direkte Zusammenhang zwischen Grading und Östrogenrezeptorgehalt konnte für beide immunhistologische Methoden bestätigt werden.

Die IRS für den Progesteronrezeptor korrelierten bei beiden Bestimmungsverfahren signifikant invers mit dem Tumorgrading und dem Mitoseindex, wobei der Korrelationskoeffizient der LSAB-Färbung am Paraffinschnitt in beiden Fällen höher lag. Ebenso fand sich am Paraffinschnitt eine signifikant inverse Korrelation mit dem Lymphknotenstatus, am Gefrierschnitt jedoch nicht. Keine Korrelation bestand für beide Bestimmungsverfahren hinsichtlich der Tumorgröße und des Mitoseindex. Der Korrelationskoeffizient für die Tumorgröße war jedoch am Paraffinschnitt höher, wohingegen der Korrelationskoeffizient für den Mitoseindex am Gefrierschnitt höher ausfiel. Neumann et al. (1989) beschrieben eine hochsignifikante Korrelation zwischen den immunhistochemisch bestimmten PR-Gehalten (Gefrierschnitt und Paraffinschnitt) und dem Differenzierungsgrad und der Proliferationsrate (Ki-67). Ebenso wurde ein, jedoch nicht signifikanter, Zusammenhang zur Tumorgröße beobachtet.

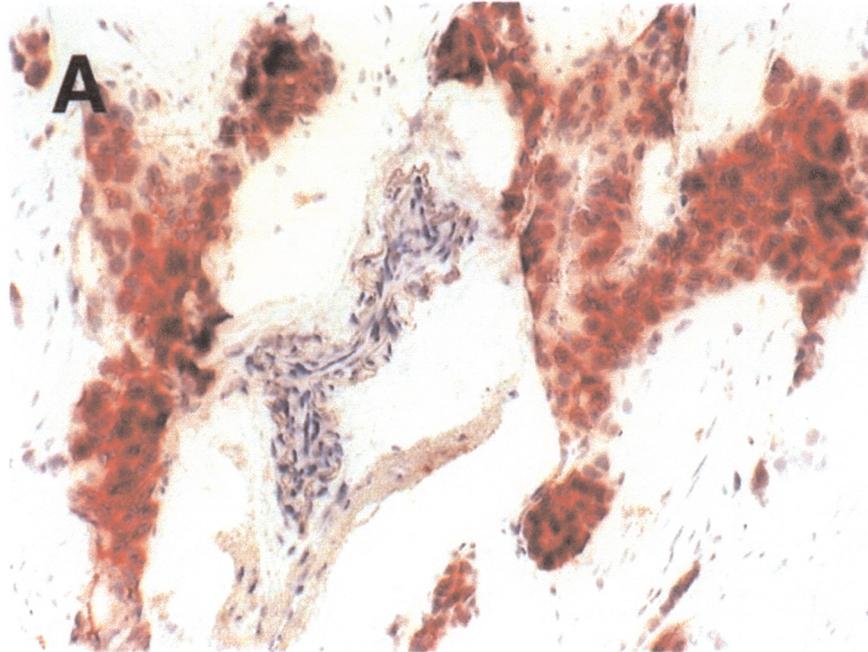
An der Verteilung der IRS-Werte der verstorbenen Patientinnen ist zu erkennen, dass bei der APAAP-Färbung am Gefrierschnitt 26,2 % der Patientinnen den Progesteronrezeptor nicht exprimierten, im Gegensatz 42,9 % bei der LSAB-Färbung am Paraffinschnitt. Analog zur Östrogenrezeptorbestimmung ist auch hier das Kollektiv der verstorbenen Patientinnen allerdings relativ klein. Pertschuk et al. (1995) verglichen in ihrer Studie das Ansprechen auf eine endokrine Therapie bei 74 Patientinnen. Zuvor wurde eine Östrogenrezeptorbestimmung (Antikörper 1D5) an Paraffinschnitten und an Gefrierschnitten (Antikörper H222Sp) durchgeführt. Dabei stellte sich der durch 1D5 am Paraffinschnitt bestimmte Rezeptorgehalt als der bessere prädiktive Faktor heraus (Kendall's tau (r)=0,57; p =0,001; am Gefrierschnitt Kendall'tau (r)=0,34; p =0,001). Bei der Bestimmung der Progesteronrezeptorexpression scheint die LSAB-Methode am Paraffinschnitt der APAAP-Methode am Gefrierschnitt überlegen zu sein. Sowohl die Korrelationen zu den klinischen Parametern als auch die Steroidrezeptorexpression der verstorbenen Patientinnen lassen einen höheren prognostischen bzw. prädiktiven Wert der IRS-Werte bei der Bestimmung am Paraffinschnitt erkennen. Dieses ist vermutlich auf die durch den polyklonalen Primärantikörper (Kaninchenantikörper) bedingte Hintergrundfärbung der Gefrierschnitte zurückzuführen sein, die in dieser Form bei der Östrogenrezeptorfärbung (monoklonaler Mausantikörper) nicht auftritt.

Bei dem Vergleich zwischen der Steroidrezeptorexpression und den klinischen Daten (Mittelwerte) fällt bei der Konstellation ER-/ PR+ ein durchschnittlich niedrigeres

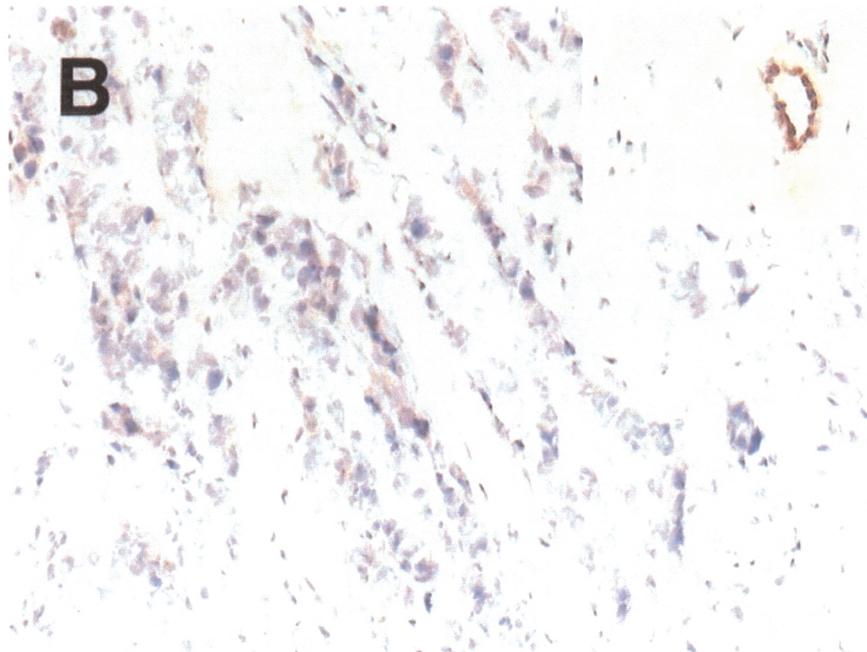
Erkrankungsalter bei einem deutlich höherem Grading auf als bei der Konstellation ER+/ PR+. Auch die anderen klinischen Parameter wie Tumorgröße, Mitoseindex sowie die durchschnittliche Anzahl befallener Lymphknoten waren im Vergleich deutlich schlechter. Auch Keshgegian und Cnaan (1996) beschrieben für die gleiche Konstellation eine signifikant höhere Rezidivrate. Untersucht wurde dieses an einem Kollektiv von 17 Patientinnen. Dieses Phänomen wurde in der Literatur wenig beschrieben und verdient sicherlich eine weitere Ausleuchtung.

Fasst man die Östrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung zusammen, verstarben Patientinnen, deren Tumoren die Rezeptoren am Gefrier- und Paraffinschnitt nicht exprimierten zu 21 % bzw. zu 50 %. Im Umkehrschluss waren bei positiver Rezeptorexpression an beiden Steroidrezeptoren bei der APAAP-Methode am Gefrierschnitt 16 % der Patientinnen gestorben, bei der Avidin-Biotin-Peroxidase Methode 12 %. Im Ganzen betrachtet erscheint die Avidin-Biotin Peroxidase Färbung am Paraffinschnitt der APAAP-Färbung am Gefrierschnitt überlegen, was hauptsächlich auf die Überlegenheit der LSAB-Methode am Paraffinschnitt bei der Bestimmung des Progesteronrezeptors zurückzuführen ist.

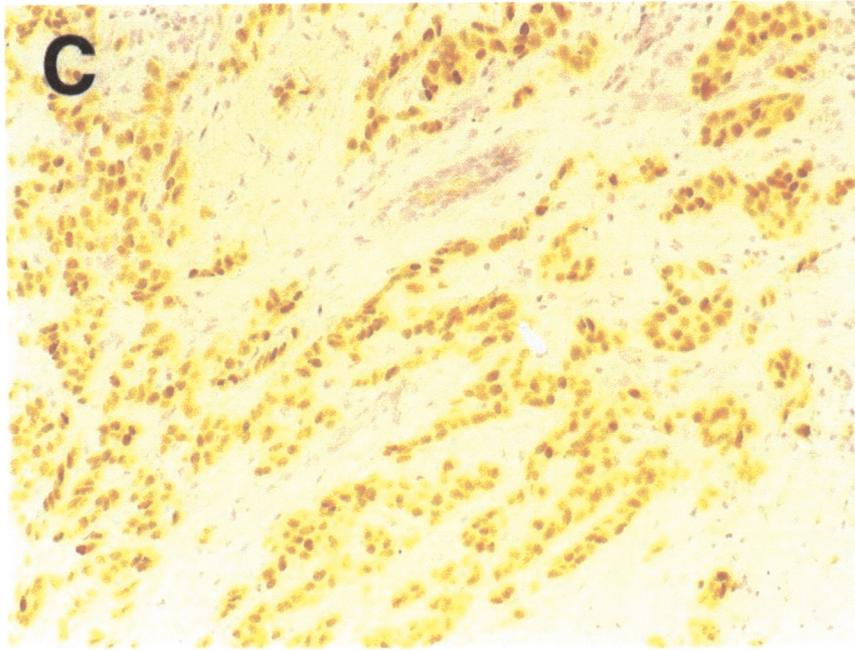
6. Bildanhang



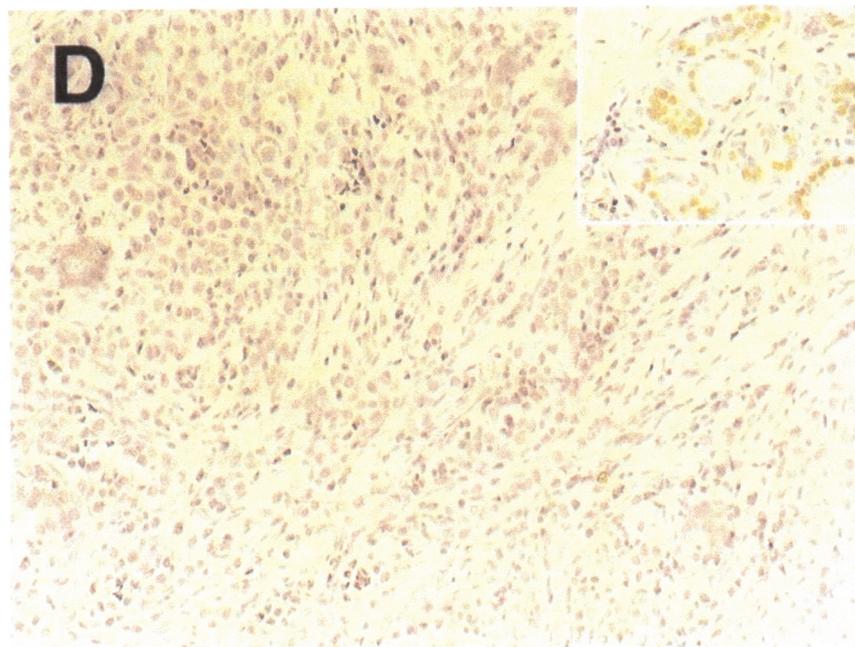
Bildanhang 1: Östrogenrezeptor/ APAAP am Gefrierschnitt, IRS=12



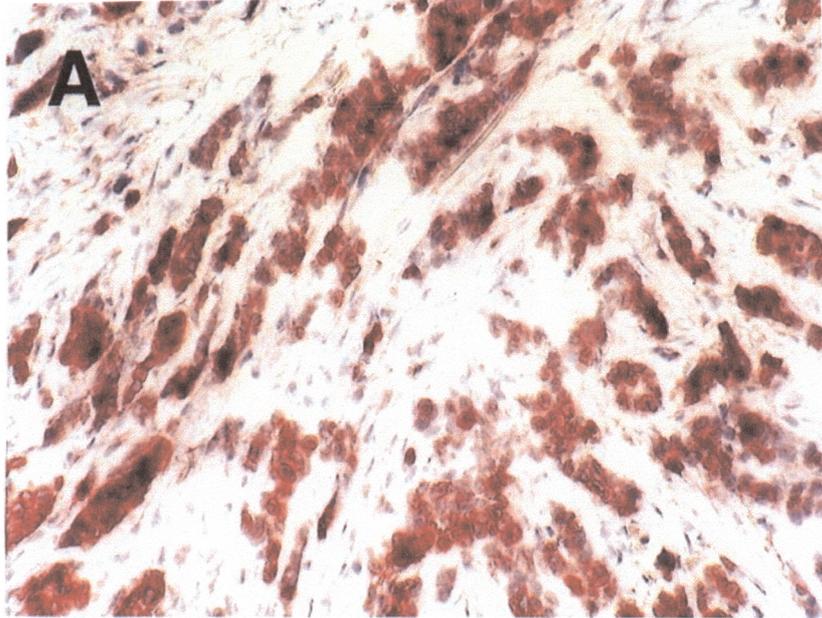
Bildanhang 2: Östrogenrezeptor/ APAAP am Gefrierschnitt, IRS=0



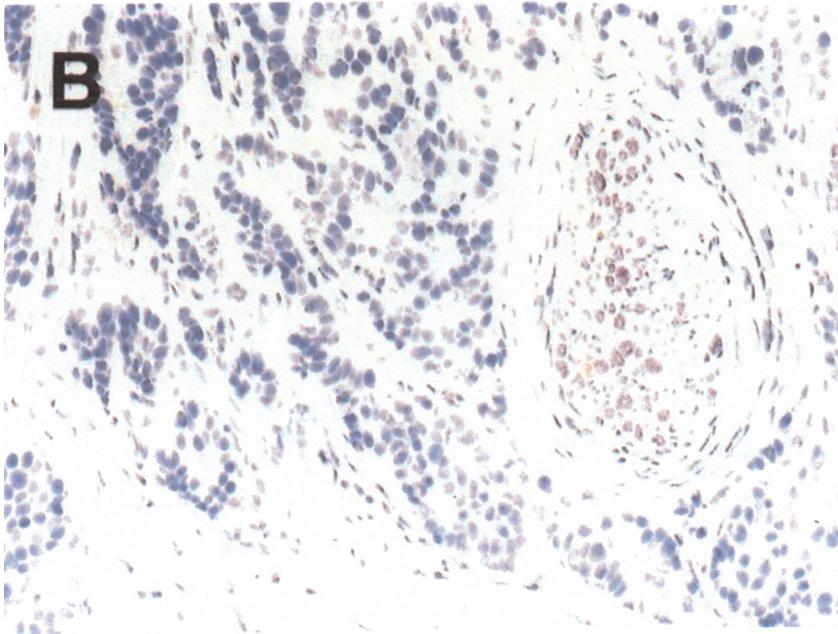
Bildanhang 3: Östrogenrezeptor/ LSAB am Paraffinschnitt, IRS=12



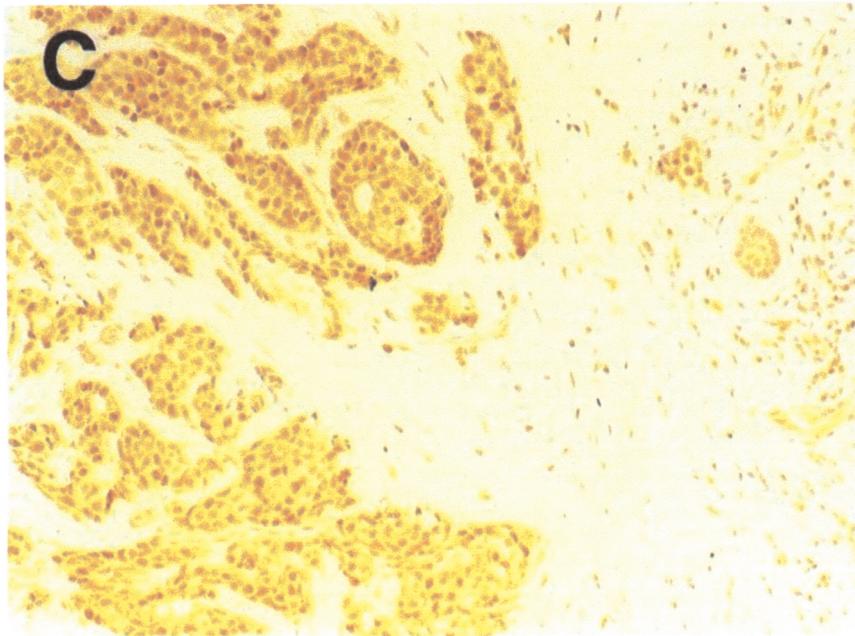
Bildanhang 4: Östrogenrezeptor/ LSAB am Paraffinschnitt, IRS=0



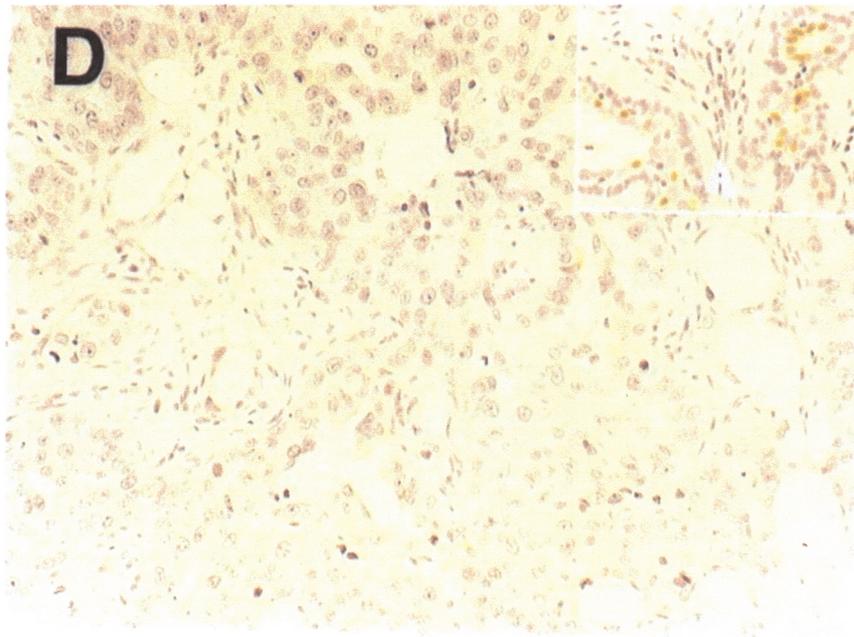
Bildanhang 5: Progesteronrezeptor/ APAAP am Gefrierschnitt, IRS=12



Bildanhang 6: Progesteronrezeptor/ APAAP am Gefrierschnitt, IRS=0



Bildanhang 7: Progesteronrezeptor/ LSAB am Paraffinschnitt, IRS=12



Bildanhang 8: Progesteronrezeptor/ LSAB am Paraffinschnitt, IRS=0

Literatur

1. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman R, Balducci L, Ku N, Shivers S, Berman C, Well K, Rapaport D, Shons A, Horton J, Greenberg H, Nikosia S, Clark R, Lantor A, Reintgen DS: Lymphatic mapping and sentinel biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 276 (1996): 1818-1822
2. American Cancer Society: Breast cancer screening: Guidelines to be reviewed; <http://www.pslgroup.com/dg/lee9c.htm>, 1999
3. Anderson J: Determination of estrogen receptors in paraffin embedded tissue: Techniques and the value in breast cancer treatment. *Acta Oncol* 31 (1992): 611-627
4. Anderson J, Poulsen HS: Immunohistochemical analysis of estrogen receptors using formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue. Correlation with endocrine response. *J Steroid Biochem* 30 (1988): 337-339
5. Aoki K, Kurihara M, Hayakawa N: Death rates for malignant neoplasms for selected sites by sex and five-year age group in 33 countries, 1953-57 to 1983-87. Nagoya, University of Nagoya, 1992
6. Auberger T, Bayerl A, Lindner H, Lukas P, Molls, von Rottkay P: Strahlentherapie. In Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Hrsg.) 7te Aufl., 1998
7. Bässler R, Böcker W, Hermanek P: Die gegenwärtige Situation des Grading beim Mammakarzinom. *Pathologe* 13 (1992): 130-134
8. Bässler R. Mamma. In Remmele W (Hrsg.) *Pathologie* Bd. 4. 2te Neubearb. Aufl. Springer-Verlag 1997
9. Beatson GT: On the treatment of inoperable carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* II (1896): 104-162
10. Beck T, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Pollow K, Knapstein PG: Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA) prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding-assay (DCC). *Gynecol Oncol* 53 (1994): 220-227
11. Beckmann MW, Mohrmann T, Niederacher D: Wirkungsmechanismen von Steroidhormonen und Steroidhormonantagonisten und ihre Bedeutung für die Tumorkarzinogenese. *Gynäkologe* 30 (1997): 617-623
12. Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG: Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *J Mol Med* 75 (6) (1997): 429-439

13. Belling O, Ottesen K, Meyer W, Feller AC, Merz H: Vergleichende Analyse verschiedener immunhistochemischer Standardverfahren: *Pathologie* 20(4) (1999): 242-250
14. Böhm W, Dietrich R: Östrogen und Progesteronrezeptorbestimmung beim Mammakarzinom- Methodische Standortbestimmung. *Geburtsh u Frauenheilk* 58 (1998): 13-18
15. Bohmert H, Bubb B, Drzezga W, Eiermann W, Gabka C, Jänicke F, Jauch KW, Thommsen A, Untch M: Interdisziplinäres Vorgehen in der Primärtherapie des Mammakarzinoms. In *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Hrsg.) 7. Aufl., 1998*
16. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S: Cancer statistics 1994. *CA Cancer J Clin* 44 (1994): 7-26
17. Briscoe D, Ni K, Wied GI, Montag A, Miller RT, Dytch HE, Bibbo M: Comparison of estrogen receptor immunocytochemical assay in frozen and paraffin sections. *Anal Quant Cytol Histol* 14 (1992): 105-112
18. Cheng L, Binder SW, Fu JS, Lewin KL: Demonstration of estrogen receptors by monoklonal antibody in formalin fixed breast tumors. *Lab Invest* 58 (1988): 346-353
19. Clark GM, Sledge GW, Osborne CK, McGuire WL: Survival from first recurrence: Relative importance of prognostic factors in 1015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 5 (1987): 55
20. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL: Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patients characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol*, Vol 2, 10 (1984)
21. Cohen C, Unger ER, Sgoutas D, Bradley N, Chenggis M: Automated immunohistochemical estrogen receptor in fixed embedded breast carcinomas. Comparison with manual immunohistochemistry in frozen tissues. *Am J Clin Pathol* 92 (1989): 669-672
22. Collett K, Hartveit F, Skjarven R, Mahle BO: Prognostic role of oestrogen and progesterone receptor in breast cancer: in relation to age and lymph node status. *J Clin Pathol* 49 (1996): 920-925
23. Coons AH, Creech HJ, Jones RN: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Experim Biol Med* 47 (1941): 200-202

24. Cordell JL, Falini, Erber, Ghosh, Abdulziz, MacDonald, Pulford, Stein, Mason: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-Complex), *J Histochem Cytochem* 32 (1984), 219-229
25. DeWaal JC, Eiermann W, Gauwerky H, Hölzel D, Kessler M, Mahl G, Sittek H, Strigl R, Untch M: Diagnostik des Mammakarzinoms. In Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Hrsg.) 7te Aufl., 1998
26. Dewailly E, Ayotte P, Dodin S: Could the rising levels of estrogen receptors in breast cancer be due to estrogenic pollutants? *Journal of the national cancer institute* 89 (1997)
27. Dose J, Avril N, Ziegler S, Bense S, Römer W, Weber W, Schaiger M, Jänicke F, Graeff H: Stellenwert der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit F-18 Fluordeoxy-Glucose (FDG) in der Diagnostik von Mammatumoren. *Geburtsh und Frauenheilk* 57 (1997): 315-320
28. Easton DF, Ford D, Bishop DT: Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 56 (1995): 265-271
29. Eiermann W, Jänicke F, Konecny G, Possinger, Sauer H, Thomssen C, Tigges FJ, Untch M: Systemische Therapie metastasierter Mammakarzinome. In Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Hrsg.) 7te Aufl., 1998
30. Elias JM, Margiotta M, Sexton TR, Heimann A: Immunohistochemical detection of sex steroid receptors in breast cancer using routine paraffin sections: comparison with frozen sections and enzyme immunoassay. *J Cell Biochem Suppl* 19 (1994): 126-133
31. Gaskell D, Sangster K, Tesdale AL, Carson D, Hawkins RA: Change in estrogen receptor status of breast cancer with age- comparison of two types of assay. *Br J Cancer* 66 (1992): 610-613
32. Green S, Kumar, Theulaz, Whali, Chambon: The N-terminal DANN binding zinc finger of the estrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J* (1988): 3037-3044
33. Green G, Sobel N, King W, Jensen E: Immunochemical studies of estrogen receptors. *J Steroid Biochem* 20 (1984): 51-56
34. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S (Eds.): Diseases of the breast. Philadelphia, New York (1996)
35. Heywang-Köbrunner SH, Scheer I: Bildgebende Mammadiagnostik. 1. Aufl. Georg Thieme Verlag 1996

36. Hiot O, Paul W, Kwan L, Ronald A, DeLellis MD: Immunohistochemistry of estrogen receptor protein in paraffin sections. Effects of enzymatic pretreatment and cobalt chloride intensification. *Am J Clin Pathol* 90 (1988): 559-563
37. Hislop GT, Coldman AG, Elwood JM, Skippen DH, Kann L: Relationship between risk factors for breast cancer and hormonal status. *International journal of epidemiology* 4 (1986): 469-476
38. Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; a comparison between ABC and unlabeled antibody procedures (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 (1981), 577-580
39. Iwase H, Greenman JM, Barnes DM, Bobrow L, Hodgson S, Mathew CG: Loss of heterozygosity of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Br J Cancer* 71 (1995): 448-450
40. Jänicke F, Jehn U, Thomssen C, Untch M: Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. In *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (Hrsg.) 7te Aufl., 1998*
41. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 22 (1993): 195-208
42. Jordan VC: Estrogen receptor mediated direct and indirect antitumor effects of tamoxifen. *J Natl Cancer Inst* 82 (1990): 1662-1663
43. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270 (1995): 1491-1494
44. Kaufmann M: Operative Therapie des Mammakarzinoms. <http://www.mammakarzinom.de>, 2000
45. Kawakami S, Kojima O, Uehara Y, Takahashi T: Immunocytochemical staining of estrogen receptor in conventional formalin-fixed paraffin sections in human breast cancer (abstract). *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 90 (1989): 102-107
46. Keshgegian AA, Cnaan A: Estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma: poor clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 120 (10) (1996): 970-973
47. Kiang DT, Kollander R: Breast cancers negative for estrogen but positive for progesterone receptor, a true entity? *J Clin Oncol* 5 (1987): 662-666

48. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Leight GS, McCarthy KS: Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: Comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res* 49 (1989): 1052-1056
49. Klijn JGM, Look MP, Portengen H, Alexievafigusch J, Vanputten WLJ, Foekens JA: The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res* 29 (1994): 73-83
50. Knight WA, Livingstone RB, Gregory EJ, McGuire WL: Estrogen receptors as an independent prognostic factor of early recurrence in breast cancer: *Cancer Res* 37 (12) (1977): 4669-4671
51. Koch K: Ist Reihenmammographie sinnvoll? *Dt Ärztebl* 42 (2000): 2085-2088
52. Köhler G, Bässler R: Östrogenrezeptorstatus in Mammakarzinomen: Ergebnisse vergleichender immunhistochemischer und biochemischer Untersuchungen. *Dtsch Med Wochenschr.* 111 (1986): 1954-1960
53. Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W. Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Tumorzentrum München (Hrsg.) 7. Aufl., 1998
54. Leopold KA, Recht A, Schmitt SJ, Connolly JL, Rose MA, Silver B, Harris JR: Results conservative surgery and radiation therapy for multiple synchronous cancer of one breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16(1) (1989): 11-16
55. Le Quesne LP: David Patey's contributions to surgical oncology. *Eur J Surg Oncol* 23(2) (1997): 161-162
56. Markis A: p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. *Lancet* 345 (1995): 1181-1182
57. McCarthy K Jr, Miller L, Cox E, Konrath J, McCarthy K Sr: Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab. Med.* 109 (1985): 716-721
58. McCarthy K Jr, McCarthy K Sr: Histochemical approaches to steroid receptor analysis. *Semin. Diagn. Pathol* 2 (1984): 297-308
59. McCarty KS, Kinsel LB, Georgiade G, Leight G: Longterm prognostic implications of sex-steroid receptors in human breast cancer. *Molecular endocrinology* (1990): 279-293
60. McGuire WL, Clark GM, Dressler LG, Owens MA: Role of steroid hormone receptors as prognostic factors in primary breast cancer. *NCI Monogr* 1 (1986): 19-23
61. McGuire WL: Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surv* 5 (1986): 527-536

62. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A: Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 39 (6 Suppl) (1977): 2934-2947
63. Miller RT, Hapke MR, Greene GL: Immunocytochemical assay for estrogen receptor with monoclonal antibody D753P gamma in routinely processed formaldehyd-fixed breast tissue. Comparison with frozen section assay and with monoklonal antibody H222. *Cancer* 71 (11) (1993): 3541-3546
64. Minckwitz v G, Costa SD: Empfehlungen zur adjuvanten Therapie des Mammacarcinoms. *GynSpectrum* 2 (1998): 3-6
65. Mirashi M: Structure of the human progesterone gene. *Biochem Biophys Acta* 1216 (1993): 289-292
66. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Apfellstaedt J: Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced cancer: Results of a phase II study of the international breast cancer group. *J Clin Oncol* 19 (2001): 2596-2606
67. Nagata C, Kabuto M, Shimizu H: Associations of coffee, green tea and caffeine intakes with serum concentrations of estradiol and sex hormone binding globulin in premenopausal Japanese women. *Nutrition and cancer* 30 (1998): 21-24
68. Nayfield SG, Karp JE, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS: Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 83 (1991): 1450-1458
69. Nedergaard L, Christensen L, Rasmussen BB, Jacobsen GK: Comparison of two monoclonal antibodies for the detection of estrogen receptors in primary breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 192 (10) (1996): 983-988
70. Neumann K, Rusehoff J, Horstmann A, Kalbfleisch H, Zwioerek L: Correlation between immunohistochemically and biochemically determined progesterone receptor content as well as grading, staging proliferation rate and chromatic content in breast cancer. *Tumordiagnostik und Therapie* 10 (1989): 109-114
71. O'Malley B: The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinology* 4 (1990): 363-369
72. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL: Cancer incidence in five continents, vol 6 IARC scientific publ no. 120. Lyon, IARC (1987)
73. Paterson D, Reid CP, Anderson TJ, Honokins RA: Assessment of estrogen receptor content of breast carcinoma by immunohistological techniques on fixed and frozen tissue and by biological liquid binding assay. *J Clin Pathol* 43 (1990): 46-51

74. Pearl F, Posey Y: Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen assays in breast cancer. *Hum Pathol* 19 (1988): 960-966
75. Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Vu Hai MT, Pallud C, Spyrtos F, Milgrom E: Immunocytochemical staining of progesterone receptor in paraffin sections of human breast cancer. *Am J Pathol* 135 (3) (1989):457-468
76. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, Axiotis C: Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand binding assays. *Cancer* 77 (12) (1996): 2514-2519
77. Pileri SA, Piccioli M, Ceccarelli C, Poggi S: EnVision Plus: A new powerful tool for diagnostic and research. *EnVision Broschüre* (Best. Nr. 00093G), Referenz (8)
78. Poutanen M, Isomaa V, Peltoketo H, Vikho R: Role of β -Hydroxysteroid-dehydrogenase type 1 in endocrine and intracrine estradiol biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 55 (1995): 525-532
79. Reiner A, Spona G: Estrogen receptor analysis on biopsies and fine needle aspirates from human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 51 (1986): 495-503
80. Remmele W, Stegner HE: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8 (1987), 138-140
81. Ridwelski K, Fahlke J: Recommendations for adjuvant chemo- and hormone therapy of breast carcinoma. *Zentralbl Chir* 123 Suppl 5 (1998): 142-146
82. Rosen P, Oberman HA: Tumors of the mammary gland. *Atlas of tumor pathology*, 3^d ser., Fasc. 7. AFPI 1993
83. Sabbatini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA: The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostic and research. Crizical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 51 (1998): 506-11
84. Sarrif A, Durant J: Evidence that estrogen receptor negativ, progesterone positive breast and ovarian carcinomas contain estrogen receptor. *Cancer* 48 (1981): 1215-1220
85. Schmidt-Matthiesen H, von Fournier D. Geburtshilfe und Gynäkologie. In Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (Hrsg.) 9te Aufl. Schattauer Verlag 1997

86. Shimada A, Kimura S, Abe K, Nagasaki K, Adachi I, Yamaguchi K, Suzuki M, Nakajima T, Miller SL: Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin section of human breast cancer by use of monoclonal antibody: comparison to that in frozen sections. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (14) (1985): 4803-4807
87. Smith DC, Prentice R, Thompson DC: Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 293 (1975): 1164-1167
88. Stylianidou A, Papadimitriou CS: Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors on routine paraffin sections of breast carcinomas: a comparison with frozen sections and an enzyme immunoassay. *Oncology* 49 (1) (1992): 15-21
89. Têtu B, Brisson J: Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node positive breast cancer. *Cancer* 73 (1994): 2359-2365
90. Tuzek HV, Fritz P, Öffinger B, Limbach HJ, Mischlinski A, Klein C, Wegner G: Zur Interpretation des Östrogenrezeptorgehaltes in Mammakarzinomen. *Geburtsh Frauenheilk* 40 (1990): 314-318
91. Van Landegham AAJ, Portman J, Nabuurs M, Thijssen JJH: Endogenous concentration and subcellar distribution of estrogen in normal and malignant human breast tissue. *Cancer res* 45 (1985): 2900-2906
92. Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Lemarchand-Berand T, Gomez F: The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentration on the clinical behavior of breast cancer in women. *Cancer* 57 (1986): 1171-1180
93. Wedad H, Mobbs BG: Compara evaluation of ER-ICA and enzyme immunoassay for the quantitation of estrogen receptors in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 91 (1989): 182-186
94. Weikel W, Rosenthal H, Beck T, Mitze M: Immunohistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren am Mammakarzinom: Vergleich zwischen Antikörpern m PR1 und PgR-ICA. *Pathologie* 11 (1990): 85-88
95. Wilkens C, Beck T, Weikel W, Brumm C, Pollow K: Vergleich neuer immunhistochemischer Techniken mit der biochemischen Rezeptortestung. *Pathologe* 16 (1995): 256-261
96. Wittekind C, Riede UN: Allgemeine und spezielle Pathologie. In Riede UN, Schäfer HE (Hrsg.) 3te Aufl. Georg Thieme Verlag 1993
97. Zujewski J, Liu ET: The 1998 St.Gallen's Consensus Conference: an assessment. *J Natl Cancer Inst* 90 (1998): 1587-1589

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Karsten Münstedt und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Folker Ernst Franke für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Schulz für die Möglichkeit im Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen den praktischen Teil der Arbeit durchführen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Hanusch, Herrn Hoffmann und Herrn Dr. med. Roman Metzger für ihr Engagement im Labor.

Besonderer Dank gilt auch meiner Frau Carla, die Höhen und Tiefen der Arbeit mitgetragen hat.

9 Lebenslauf

Allgemeines:

Name: Spannagel

Vorname: Christian Philipp

Geburtsdatum: 31.08.1971

Geburtsort: Hagen/ Westfalen

Konfession: evangelisch

Familienstand: verheiratet mit Carla Spannagel geb. Richardt

Schulbildung:

1978- 1982: Besuch der Grundschule Ennepetal-Voerde

1982- 1991: Besuch des Reichenbach-Gymnasiums Ennepetal

12.6.1991: Abitur am Reichenbach-Gymnasium Ennepetal

Wehrdienst:

1991-1992: Stabsdienstsoldat bei der 7. Panzer Division in
Ahlen und Unna-Königsborn

Hochschulausbildung:

1993: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig
Universität Gießen

3/1996: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

9/1998: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

11/1999: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Ausbildung:

1.3.2000: Arzt im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin im
Marienkrankenhaus in Soest

1.8.2001: Arzt im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin im
Stadtkrankenhaus Soest

Ab 1.9.2001: Approbation als Arzt/ Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin im
Marienkrankenhaus Soest

10 Zusammenfassung

Einleitung: Die Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors erlaubt eine Einschätzung des Erfolgs der adjuvanten und palliativen Hormontherapie und ist somit von großer klinischer Bedeutung. Es gibt jedoch verschiedene Methoden den Steroidrezeptorstatus zu bestimmen. Das biochemische Assay und immunhistochemische Verfahren am Paraffin- oder am Gefrierschnitt.

Fragestellung: Inwieweit sind die Ergebnisse der Bestimmung des Steroidrezeptorstatus am Paraffinschnitt mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Färbung mit dem Nachweis am Gefrierschnitt mit der APAAP-Färbung vergleichbar?

Materialien und Methode: Natives (tiefgefrorenes) und paraffinfixiertes Tumorgewebe von 215 Patientinnen mit Mammakarzinom wurde immunhistochemisch auf die Expression der Steroidrezeptoren verglichen. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte beim Paraffinschnitt mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Technik und am Gefrierschnitt mit Hilfe der APAAP-Technik. Die Schnitte wurden semiquantitativ nach den Richtlinien von Remmele und Stegner (1987) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit klinisch-pathologischen Parametern des Kollektives verglichen.

Ergebnisse: Es zeigten sich häufiger östrogenrezeptornegative Karzinome am Paraffinschnitt. Dieser Unterschied zeigte sich am Progesteronrezeptor weniger ausgeprägt. Die Korrelation nach Spearman ergab einen Koeffizienten von 0,544 ($p < 0,001$) beim Östrogenrezeptor und von 0,580 ($p < 0,001$) beim Progesteronrezeptor. Die Übereinstimmung (positiver/ negativer Rezeptorstatus) betrug 81,9 % beim Östrogenrezeptor und 76 % beim Progesteronrezeptor. Die Intensität der Färbung war am Gefrierschnitt höher. Der Vergleich zu den klinisch-pathologischen Parametern ergab insgesamt eine bessere Übereinstimmung zum Steroidrezeptorstatus am Paraffinschnitt, was in erster Linie auf die limitierten Korrelationen zur Progesteronrezeptorbestimmung am Gefrierschnitt zurückzuführen ist.

Schlussfolgerung: Die APAAP-Methode am Gefrierschnitt verspricht eine genauere Differenzierung der Färbeintensität, während Paraffinschnitte aufgrund morphologischer Vorteile (Schnittgröße) eine genauere Einschätzung der Quantität gefärbter Tumorteile zulassen. Aufgrund der Abweichungen im Positiven/ Negativen erscheint eine Standardisierung der Detektionsmethoden sinnvoll. Grundlage der Entscheidung hinsichtlich des Standard sollte eine Untersuchung sein, bei der der Erfolg der endokrinen Therapie bekannt ist. Die Methode mit dem höchsten prädiktiven Wert sollte zum Standard erklärt werden. Eventuell kann es auch sinnvoll sein, mehrere Methoden zu kombinieren.