

Aus dem Institut für Pathologie, Funktionsbereich Cytopathologie
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Quantitative immunhistometrische Bestimmung
von Proliferation und Apoptose bei papillären
Schilddrüsenkarzinomen und deren klinische Bedeutung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Fürste

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan

Referent: Prof. Dr. Biesterfeld

Korreferent: Prof. Dr. Cupisti

1	EINLEITUNG	6
2	LITERATURDISKUSSION.....	8
2.1	Proliferationsmarker.....	8
2.1.1	Ki-67/MIB-1	8
2.1.2	Andere Proliferationsmarker.....	9
2.2	Apoptose	9
2.3	Quantifizierung immunhistochemischer Untersuchungen.....	10
2.4	Problemstellung	10
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Untersuchungsgut.....	12
3.2	Methoden.....	12
3.2.1	Immunhistochemische MIB-1-Darstellung	12
3.2.2	Anwendung der TUNEL-Methode zur Apoptosedarstellung	14
3.3	Bildanalytische Quantifizierung der Färbeergebnisse.....	15
3.3.1	Das TV-Bildzytometer CM-2.....	15
3.3.2	Durchführung der Messung	15
3.3.3	Messergebnisse	17
3.4	Statistische Untersuchungen	17
3.4.1	Ausgangsdaten.....	17
3.4.2	Statistische Analysen	18
4	ERGEBNISSE.....	20
4.1	Grundlegende statistische Betrachtungen	20
4.1.1	Allgemeine Kenngrößen	20
4.1.2	Verteilung der Messwerte.....	21
4.2	Proliferation beim papillären Schilddrüsenkarzinom	21

4.3	Apoptose beim papillären Schilddrüsenkarzinom.....	23
4.4	Proliferation und Apoptose	25
4.5	Proliferation und klinische Daten bzw. histomorphologische Daten.....	26
4.5.1	Patientenalter bei Diagnosestellung	27
4.5.2	T-Klassifikation	28
4.5.3	Tumorgröße.....	31
4.5.4	Lymphknotenstatus	32
4.5.5	Invasion von Lymphgefäßen	33
4.5.6	Invasion von Blutgefäßen	34
4.5.7	Tumorkapseleinbruch	35
4.5.8	Organkapseleinbruch	36
4.6	Apoptose und klinische Daten bzw. histomorphologische Daten	37
4.6.1	Patientenalter	37
4.6.2	Tumor-Klassifikation	38
4.6.3	Tumorgröße.....	40
4.6.4	Lymphknotenstatus	41
4.6.5	Invasion von Lymphgefäßen	42
4.6.6	Invasion von Blutgefäßen	43
4.6.7	Tumorkapseleinbruch	44
4.6.8	Organkapseleinbruch	45
4.7	Ratio Proliferation/Apoptose und klinische Daten	46
4.8	Überlebenswahrscheinlichkeiten	48
4.8.1	Gemessene Werte.....	49
4.8.2	Histomorphologische/Klinische Kategorien	52
4.9	Proliferation im papillären Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu anderen Entitäten	56
4.10	Follikuläre Variante des papillären Karzinoms (FVPC) versus follikuläres Karzinom (FC).....	57
4.11	Follikuläre Variante des papillären Karzinoms (FVPC) versus papilläres Karzinom (PC).....	59

5	DISKUSSION	62
5.1	Güte der Messungen	63
5.1.1	In sich	63
5.1.2	Frühere methodische Untersuchungen	64
5.1.3	Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren	64
5.2	Diagnostische Relevanz	67
5.2.1	Sensitivität und Spezifität	67
5.2.2	Differenzierung zu anderen Entitäten	70
5.3	Prognose	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	77
8	ANHANG: ROHDATEN KI-67 UND APOPTOSE	82
8.1	Papilläres Karzinom	82
8.2	Follikuläres Karzinom	83
8.3	Follikuläre Adenome	84
8.4	Normales Parenchym	85

1 Einleitung

Schilddrüsenkarzinome zeigen weltweit eine Inzidenz von etwa 2 bis 5 Fällen pro 100.000 Frauen und 1 bis 2 Fällen pro 100.000 Männern (1). In Deutschland liegt die Inzidenz mit ca. 7,3 für Frauen und 3,3 für Männer pro 100.000 darüber und bilden hier somit einen Anteil von 1,7% bzw. 0,7% aller Krebsneuerkrankungen. Gleichzeitig sind nur 0,45% bzw. 0,2% der Krebssterbefälle auf diese Erkrankung zurückzuführen (2). Darüber hinausgehende Schwankungen in Abhängigkeit der Zugehörigkeit zu ethnischen Gruppen, geographische Abhängigkeiten und der auffallend deutliche Einfluss ionisierender Strahlung sind bekannt (3). Unter den Schilddrüsenkarzinomen stellen die papillären Karzinome mit 70-80% den weitaus größten Anteil, gefolgt von den follikulären Karzinomen, den medullären Karzinomen der C-Zellen und den Formen der anaplastischen Karzinome.

Zentrale Bedeutung bei der Diagnostik von Schilddrüsenvergrößerungen haben der Ultraschall zur morphologischen Darstellung und die Szintigraphie zur funktionellen Darstellung von Veränderungen der Schilddrüse. Es gelingt hiermit, Knoten zu identifizieren und deren hormonelle Aktivität zu bestimmen. In vielen Fällen bietet sich die Punktionszytologie als wenig risikoreiche Methode an, um Zellen für eine zytologische Beurteilung zu gewinnen. Auf diese Weise lassen sich viele Diagnosen, die Gewinnung repräsentativen Materials vorausgesetzt, gut stellen, darunter die von Entzündungen und papillärer Karzinome. Allerdings ist in vielen Fällen, bei denen nach Ausschöpfung der genannten Maßnahmen eine sichere Einordnung des Tumors und seiner Dignität nicht möglich ist, eine chirurgische Entfernung sinnvoll.

Bei der histopathologischen Begutachtung gehen verschiedene Kriterien in das Gesamturteil mit ein. Auch können makroskopische Aspekte beim Zuschnitt bereits erste Hinweise geben. So können beispielsweise mit bloßem Auge erkennbare Kapseldurchbrüche oder die Infiltration von Lymphknoten vorliegen. Eine genaue Aufarbeitung des eingesandten Gewebes ist bei malignen Schilddrüsentumoren insbesondere notwendig, um eine exakte TNM-Klassifikation zu ermöglichen, aus der wiederum Rückschlüsse auf die Prognose und auf die Planung adjuvanter, insbesondere nuklearmedizinischer Therapien gezogen werden können.

Ergänzend kommt die Immunhistochemie zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Immunreaktionen (Antigen-Antikörper-Reaktionen) genutzt werden, um bestimmte Moleküle von Zellen zu identifizieren. Sie werden mit

einem sogenannten Primärantikörper markiert. Dieser wiederum wirkt als Antigen für weitere (Sekundär- oder Tertiär-) Antikörper. Letztere sind mit chemischen Gruppen konjugiert, welche unter geeigneten Bedingungen Farbreaktionen hervorrufen. Auf diese Weise können die entsprechenden Antigen-tragenden Strukturen im mikroskopischen Schnittpräparat sichtbar gemacht werden. Werden in der Routinediagnostik von Schilddrüsentumoren abhängig vom konkreten Fall vor allem Marker zur Bestimmung der Tumorigenese eingesetzt, d.h. Untersuchungen zur Abgrenzung von follikulären bzw. papillären (jeweils Thyreoglobulin-positiv) gegenüber medullären (Calcitonin-positiv) oder parathyroidealen Karzinomen (Parathormon-positiv), so kommen für spezielle Fragestellungen auch sehr viele, teils experimentelle, teils auch bereits in der Routine etablierte Marker in Betracht.

Neben der notwendigen Sicherheit bei der Diagnosestellung ergeben sich bei der pathologischen Gewebsuntersuchung jedoch auch Fragen bezüglich des potentiellen zukünftigen Wachstumsverhaltens des jeweiligen Tumors und damit der Prognose des individuellen Patienten. Auch wenn die papillären Karzinome mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von > 90% insgesamt eine sehr gute Prognose haben, können im Einzelfall Rezidive bzw. Metastasen auftreten (4,5). Der Metastasierungsweg ist beim papillären Karzinom in der Regel primär lymphogen. Diese Tatsache wiederum begründet die Notwendigkeit, zwischen papillären und follikulären Karzinomen überhaupt zu unterscheiden, da letztere vorwiegend hämatogen, hingegen kaum lymphogen metastasieren.

Wünschenswert wäre es daher, weitere diagnostische Kriterien zu gewinnen, mit deren Hilfe das Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung auch nach chirurgisch vollständiger Sanierung zu beziffern wäre. Bei entsprechendem Risikoprofil könnte beispielsweise durch entsprechend engmaschige Nachsorge zumindest das Ausmaß möglicher folgender Schäden limitiert werden. Neben den üblichen Kriterien, die das Maß der Ausbreitung histologisch beschreiben (Kapseldurchbruch, Lymph- oder Blutgefäßeinbruch, Organüberschreitung), wären weitere, quantifizierbare Eigenschaften der Tumoren bezüglich ihres Wachstumsverhaltens hierbei sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht inwieweit die Analyse des Proliferationsverhaltens und der Apoptose im Tumorgewebe eben diese Frage klären kann.

2 Literaturdiskussion

2.1 Proliferationsmarker

Zum Abschätzung des Anteiles von Zellen, die sich in der Proliferationsphase befinden, bieten sich mehrere Möglichkeiten. In der konventionellen Lichtmikroskopie bereits können beispielsweise Mitosefiguren dargestellt werden, deren Quantifizierung sich bei diversen Fragestellungen auch in der Tumorprognostik als sinnvoll erwiesen hat; ihr Vorkommen ist aber bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen so selten, dass dieses Verfahren hier kaum in Betracht kommt. Im Bereich der Immunhistochemie wurden eine Vielzahl von Antikörpern zum Nachweis von Proliferationseigenschaften erprobt. Durchgesetzt hat sich inzwischen der Marker Ki-67/MIB-1, der auch in dieser Studie angewandt wurde und im folgenden beschrieben werden soll.

2.1.1 Ki-67/MIB-1

Gerdes et al. beschrieben 1983 einen monoklonalen Antikörper, der durch Immunisierung von Mäusen mit Zellen eines Hodgkin-Lymphoms entstand. Das eigentliche Antigen wurde erst Jahre später charakterisiert und entschlüsselt. Das Ki-67-Antigen ist ein Protein ohne Histone mit einem Molekulargewicht von 345 und 395 kD (6). Das für die Ki-67-Expression verantwortliche Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 lokalisiert (7). Die eigentliche Funktion des Ki-67-Proteins im Zellzyklus ist noch nicht abschließend geklärt (8-10). Jedoch konnte gezeigt werden, dass das Antigen in ruhenden Zellen, also Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden, nicht exprimiert wird. Nachgewiesen wird das Ki-67-Protein nur in der G₁-, der S- und der G₂/M-Phase. Damit hat es sich als ein nur in proliferierenden Zellen nachweisbares Antigen gezeigt. Der Nachteil des „originalen“ Ki-67-Antikörpers, dass er nur auf Gefrierschnitte angewendet werden kann, wurde Anfang der 90er Jahre mit der Entwicklung eines gleichartigen paraffingängigen Antikörpers, des MIB-1, überwunden, mit dessen Hilfe es möglich ist, das Ki-67 Antigen auch in formalinfixiertem Gewebe nachzuweisen (11). Hierzu ist nach dem Entparaffinieren eine „Demaskierung“ des Antikörpers durch Mikrowellenbehandlung notwendig. Mittlerweile ist der Antikörper von verschiedenen gewerblichen Anbietern erhältlich.

2.1.2 Andere Proliferationsmarker

Andere Marker, wie z.B. das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), bcl2, wurden in vielen Studien ebenso zum Nachweis für Zellproliferation verwendet. Auch hierbei werden monoklonale Antikörper genutzt, um bestimmte, nur bei sich teilenden Zellen vorhandene Antigene nachzuweisen. Ein anderer Ansatz ist die DNA-Zytometrie, bei der sich aus der Ermittlung des DNA-Profiles ggf. Rückschlüsse über den Pool proliferierenden Zellen ziehen lassen. Für die Proliferationsanalyse ist hierbei bei einigermaßen einheitlichen Tumorzellpopulationen die DNA-Durchflußzytometrie in besonderem Maße geeignet und hier der DNA-Bildzytometrie in der Tumordiagnostik ausnahmsweise vorzuziehen.

2.2 Apoptose

Ebenso kann die Analyse von Apoptose-Eigenschaften von Tumorgewebe sinnvoll sein, um Aufschluß über das zukünftige biologische Verhalten zu gewinnen. In gewisser Weise ist Apoptose den Effekten der Proliferation entgegen gerichtet, so dass man ggf. von Tumoren mit hoher Proliferation und geringer Apoptoseleistung am ehesten eine schnelle Progression erwarten dürfte.

Die Basis des morphologisch visualisierbaren Nachweises des programmierten Zelltodes ist die damit einhergehende Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Am Ende dieses vielfach durchlaufenen Spaltungsprozesses finden sich DNA-Fragmente, die aus durchschnittlich 180 Basenpaaren bestehen. Damit entsteht eine große Anzahl von 3'-OH-Enden. Diese können durch die Färbung markiert werden, indem dort enzymatisch (durch die „terminal deoxynucleotidyl transferase“, TdT) spezielle Nukleotide (Digoxigenin-11-dUTP und Digoxigenin-11-dATP) angebunden werden.

In der Literatur wird dieses Vorgehen allgemein als TUNEL-Methode bezeichnet (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) bezeichnet; sie entspricht zwar formal einer in situ-Hybridisierung, ihr Ergebnis ist aber vom morphologischen Bild her dem einer kernbindenden immunhistochemischen Reaktion gleich. Die Auswahl des Digoxigenins als Ligand des Nukleotids beruht auf der Tatsache, dass eine Kreuzreaktivität des Digoxigenin-Antikörpers für tierisches Gewebe praktisch nicht besteht. Zudem werden vor der Inkubation mit Nukleotid und Transferase vorhande-

ne Proteine durch ein unspezifisches Enzym (Proteinase K) abgebaut. Damit ist eine hohe Spezifität der Färbung gewährleistet.

2.3 Quantifizierung immunhistochemischer Untersuchungen

Der Begriff Immunhistometrie wurde am Institut für Pathologie an der RWTH Aachen geprägt (Biesterfeld et al., 1995). Waren es im Bereich der Immunhistochemie zunächst nur qualitative und halbquantitative Verfahren, die ihren festen Platz im klinischen Alltag eroberten, so wird in zunehmendem Maße auch der vollständigen Quantifizierung von immunhistochemischen Reaktionen Bedeutung geschenkt. Neben der Möglichkeit der konventionellen Zählung im Lichtmikroskop bieten sich seit einigen Jahren EDV-gestützte Meßsysteme an, für deren Verwendung der Begriff Immunhistometrie eigentlich verwendet wird. Bei diesem Verfahren werden insbesondere kernbindende immunhistochemische Reaktionen TV-bildanalytisch erfasst und mittels einer geeigneten Software analysiert. Folgendes Prinzip liegt dieser Analyse zu Grunde: Ein erfasstes Bild wird dahingehend untersucht, wo sich Zellkerne befinden. Diese werden hinsichtlich ihrer Anzahl und Fläche quantifiziert. Durch die Anwendung optischer Filter, ausgewählt entsprechend den durchgeführten Färbungen, wird in einem zweiten Schritt zwischen den unterschiedlich gefärbten Kernen unterschieden. Es ist auf diese Weise möglich, den Anteil der positiv gefärbten Kerne zahlenmäßig und flächenmäßig zu erfassen. Durch die Anwendung der Immunhistometrie gelingt es, eine große Zahl von Zellen pro Präparat zu erfassen und damit eine hohe Datensicherheit zu erlangen.

Das Verfahren der Immunhistometrie ist prinzipiell auf alle Fragestellungen übertragbar, bei denen es um die Auswertung kernbindender Sonderfärbungen geht und ist insbesondere auch auf die TUNEL-Methode anwendbar.

2.4 Problemstellung

Die vorliegende Arbeit untersucht unter Zuhilfenahme des Messverfahrens der Immunhistometrie das Wachstumsverhalten papillärer Schilddrüsenkarzinome. Zu diesem Zweck werden sowohl die Proliferation als auch die Apoptose im Tumorgewebe untersucht. Die Ergebnisse werden mit denen für normales Schilddrüsengewebe

verglichen und mit klinischen Daten in Relation gesetzt. Des Weiteren erfolgt der Vergleich mit follikulären Adenomen und Karzinomen. Es wird versucht aufzuzeigen, ob und inwieweit sich Hinweise ergeben, die auf eine klinische Bedeutung der Ergebnisse schließen lassen.

Die Arbeit ist auch Teil eines Gesamtprojektes, in welchem mit den Methoden der MIB-1- Immunhistometrie und der TUNEL-basierten Apoptosequantifizierung im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe sowohl papilläre Karzinome, als auch, in anderen Teilprojekten, follikuläre Adenome und Karzinome sowie Fälle einer Hashimoto - bzw. de Quervain-Thyreoiditis untersucht werden (12)

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsgut

Der Untersuchung zugrunde lag das in den Jahren 1985 bis 1992 im Institut für Pathologie der RWTH Aachen eingegangene Material von Schilddrüsenresektionen, dessen Befundkodierung entweder papilläres Karzinom (ICD-O-Schlüssel M 8050/3), papilläres Adenokarzinom (M 8260/3), sklerosierendes, papilläres Adenokarzinom (M 8350/3) oder papillär-follikuläres Adenokarzinom (M 8340/3) lautete. Es handelte sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe.

Insgesamt fanden sich 105 Fälle, von denen zunächst jene aussortiert werden mussten, von denen keine Paraffinblöcke mehr auffindbar waren oder deren Blöcke bei Referenzpathologen verblieben waren. Ferner waren einige Fälle nicht dafür geeignet, mit dem Meßsystem quantifiziert zu werden. Die Gründe hierfür waren einerseits mangelnde Größe des Tumors bzw. andererseits, dass durch entsprechenden Verschnitt an den vorhandenen Paraffinblöcken (v. a. nach Anfertigung von Stufenschnitten im Rahmen der Primärdiagnostik) keine Präparate mehr zu erhalten waren, in denen sich der Tumor genügend groß darstellte. Die Untergrenze für die Größe des Tumoranschnittes, die sich aus der geforderten Anzahl von zu messenden Gesichtsfeldern ergab, betrug etwa 3 mm im Durchmesser (s.u.). Letztendlich verblieben zuletzt 40 Blöcke, die zur Untersuchung zur Verfügung standen. Aus technischen Gründen konnten zuletzt für 32 Fälle die Proliferation und für 36 Fälle die Apoptose gemessen werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische MIB-1-Darstellung

Der Nachweis des Antigens Ki-67 erfolgt durch den monoklonalen Antikörper MIB-1. Sein F_c-Fragment entspricht dem des IgG der Maus. Dieses wird in einer sekundären Antikörperreaktion durch einen mit Meerrettichperoxidase konjugierten Schaf-anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Als Chromogen dient Diaminobenzidin

(DAB), welches von der Peroxidase in einen braunen Farbstoff überführt wird, der nun lichtmikroskopisch die proliferierenden Zellen markiert.

Im Einzelnen verlief die Färbung folgendermaßen: Von den Paraffinblöcken wurden auf einem konventionellen Mikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf vorbehandelte Objektträger aufgebracht. Diese Vorbehandlung bestand in einer Beschichtung mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn). Darüber hinaus wurden die Objektträger mit Poly-L-Lysine Lösung (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) benetzt und getrocknet. Diese Vorbehandlung diente der besseren Haftung der Schnitte auf den Objektträgern, die wegen der späteren Weiterbehandlung im Mikrowellenofen nötig ist. Nach Trocknung der Schnitte im Brutschrank bei 37°C für mindestens 24 Stunden wurden diese in Xylol (2x 8 Min.) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 8 Min. 100% Alkohol, 2x 8 Min. 96%iger Alkohol und 2x 8 Min. 70%iger Alkohol) hydratisiert. Dabei wurde, nachdem die Präparate in 100%igem Alkohol eingestanden hatten, die in den Erythrozyten vorhandene endogene Peroxidase mittels eines 1%igen H₂O₂-Methanol Gemisches gehemmt, um nicht falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Anschließend wurden die Präparate in PBS Puffer-Lösung (PBS Dulbecco, 9,55 g/l, Biochrom KG, Berlin) gespült (3x 5 min). Danach wurden sie in Citratpuffer (hergestellt aus Citronensäure-Monohydrat z.A., 0,3782 g/l, und tri-Natriumcitrat-Dihydrat z.A., 2,412 g/l, beide E. Merck, Darmstadt) eingestellt und im Mikrowellenofen 3x 5 Min. behandelt. In den Pausen von jeweils 2 Min. wurde verdunstete und übergekochte Flüssigkeit wieder aufgefüllt. Das Kochen dient der Demaskierung des durch die Fixierung verdeckten Antigens. Nach Abkühlen der Schnitte und ausgiebigem Spülen mit PBS-Puffer wurden diese für 1 Stunde mit dem primären Antikörper (MIB-1, monoclonal antibody, 0,2 mg/ml, Dianova GmbH, Hamburg) inkubiert. Die ursprüngliche Antikörperlösung wurde dazu mit 1%igem BSA/PBS-Gemisch im Verhältnis 1:10 verdünnt. Wiederum erfolgte gründliches Spülen mit PBS-Lösung. Die Schnitte wurden nun mit dem Sekundärantikörper (Goat F_(ab)'₂ Fragment Mouse IgG (H+L) - Peroxidase, Immunotech, Hamburg) für 45 min inkubiert. Hierzu wurde die ursprüngliche Antikörperlösung im Verhältnis 1:100 mit 1%igem BSA/PBS-Gemisch verdünnt. Nachdem auch der Zweitantikörper abgespült wurde, erfolgte für 2 Min. die Färbung mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Hiervon waren 3 Tabletten in 50 ml Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan z.A., 6 g/l, E. Merck, Darmstadt, mit 1M HCl auf pH 7,6 eingestellt) aufgelöst und mit Wasserstoffperoxid (15 µl auf 50 ml) aktiviert worden. Danach erfolgte

die Gegenfärbung mit Methylgrün durch 15-minütiges Einstellen der Schnitte in den Farbstoff und anschließendes Spülen in Butanol (2x 5 min). Vor dem Eindecken (Vitro-Clud, R. Langenbrinck, Emmendingen) standen die Schnitte noch für mindestens 5 Min. in Xylol ein.

3.2.2 Anwendung der TUNEL-Methode zur Apoptosedarstellung

Die Basis des immunhistochemischen Nachweises des programmierten Zelltodes ist die damit einhergehende Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Am Ende dieses vielfach durchlaufenen Spaltungsprozesses finden sich DNA-Fragmente, die aus durchschnittlich 180 Basenpaaren bestehen. Damit entsteht eine große Anzahl von 3'-OH-Enden. Dort werden in der primären Reaktion spezielle Nukleotide angebunden (Digoxigenin-11-dUTP und Digoxigenin-11-dATP). Im nächsten Schritt werden mit Peroxidase konjugierte Digoxigenin-Antikörper zugegeben. Es folgt, wie bei der zuvor beschriebenen Färbung, der Auftrag des Chromogens DAB.

Im einzelnen wurde die Färbung mit dem „ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit“ der Fa. Oncor (Katalog-Nr.: S7100-KIT) durchgeführt. Die auch hier 2 µm dicken Schnitte konnten für die Apoptose-Färbung auf nicht vorbehandelte Objektträger aufgebracht werden, da eine Mikrowellenbehandlung nicht erforderlich war. Die dann folgenden Schritte Trocknung, Entparaffinierung und Hydratisierung fanden in der gleichen Weise statt wie bei der MIB 1-Färbung. Ebenso musste die endogene Peroxidase mit dem Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch gehemmt werden, da auch bei dieser Färbung die eigentliche chromogene Reaktion zwischen antikörpergekoppelter Peroxidase und DAB stattfand. Nach dem letzten Schritt der Hydratisierung wurden die Präparate in PBS-Puffer-Lösung gespült (5 Min.) und anschließend 15 Min. bei Raumtemperatur (RT) mit Proteinase K inkubiert. Nach zweimaligem Spülen für jeweils 5 min in PBS-Puffer folgte eine 10-minütige Inkubation mit dem „Equilibration Buffer“ bei RT. Daran schloss sich unmittelbar das Auftragen der „Working-Solution“ (bestehend aus 2 Tropfen „Reaction Buffer“ und 1 Tropfen „Tdt-Enzym“) an, die für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank auf die Schnitte einwirkte. Bei gleicher Temperatur beendete dann der „Stop Buffer“ die Reaktion nach 30 min Einwirkzeit. Nach PBS-Spülung (3x5 min) wurde für 30 Min. bei RT mit dem Sekundärantikörper (Anti-Digoxigenin-Peroxidase) inkubiert. Der PBS-Spülung (3x 5 Min.) folgend wurde die DAB-Färbung und die Gegenfärbung mit Methylgrün ebenso wie bei der MIB-1 Färbung durchgeführt und der Prozess mit dem Eindecken beendet.

3.3 Bildanalytische Quantifizierung der Färbeergebnisse

3.3.1 Das TV-Bildzytometer CM-2

Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein konventionelles Lichtmikroskop der Firma Hund, Wetzlar (Typ H500 LL) das mit fünf Objektiven (4fache Vergrößerung, numerische Apertur 0,12, 10x/0,25; 20x/0,40, 40x/0,65 und Öl 100x/1,25) sowie zwei zehnfach vergrößernden Okularen ausgestattet ist. Mittels eines Software-gesteuerten Filterrades kann zwischen der Darstellung mit weißem Licht und einem Rot- bzw. Grünfilter gewechselt werden. Die Transmissionen des DAB und des Methylgrün sind wellenlängenabhängig. Bei Betrachtung mit zwischengeschaltetem Rotfilter (Wellenlänge 623 nm +/- 5 nm) erscheinen DAB- und Methylgrün-gefärbte Objekte nahezu gleich stark gefärbt weil sich die Transmissionen im Bereich dieser Wellenlänge nur geringfügig unterscheiden. Mit zwischengeschaltetem Grünfilter (550 nm +/- 10 nm) sind die unterschiedlich gefärbten Objekte jedoch auf Grund der in diesem Bereich stark differierenden Transmissionen gut zu diskriminieren. Dem Betrachter erscheinen hier nur noch die DAB-positiven Zellen sichtbar.

Die Bildaufnahme erfolgt mit einer CCD-Schwarzweißkamera (Pulnix TM 765) deren Signal auf einen hochauflösenden VGA-Monitor (Sony Trinitron) übertragen wird. Die Verarbeitung der eingelesenen Bilder erfolgt in einem IBM-kompatiblen PC. Das Prinzip dieser Verarbeitung basiert darauf, dass mit Hilfe des Rotfilterbildes durch Anwendung eines Wasserscheidenalgorithmus die einzelnen Objekte im Präparat erkannt werden. Nach einer manuellen Zwischenbearbeitung (s.u.) wird durch Vergleich einer so erstellten Maske, welche die Umrisse aller zu untersuchenden Zellkerne wiedergibt, mit dem Grünfilterbild, dass nur die positiven Kerne darstellt, das Verhältnis positive/negative Kerne ermittelt. Dieses Verhältnis wird sowohl zahlenmäßig als auch flächenmäßig angegeben. Das an einem Bildausschnitt ermittelte Ergebnis kann abgespeichert werden und bildet mit den zuvor und danach ermittelten Werten eines Präparates einen Mittelwert. Auf Grund zuvor durchgeführter methodischer Untersuchungen wurde die zu messende Anzahl von Gesichtsfeldern auf zwanzig festgelegt (s.u.).

3.3.2 Durchführung der Messung

Die Durchführung der Messung erfolgte nach einem festen Schema um größtmögliche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Nach Laden des Programms wurden die

Daten eingegeben, die der späteren Identifizierung des Ergebnis-Files dienen (u.a. Eingangsnummer, Name, verwendeter Antikörper). Das Mikroskop wurde nach dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip justiert. Die Lichtquelle wurde manuell so eingestellt, dass sich durch eine Position „mittig“ zwischen der Grenze zur Über- und Unterbelichtung eine sowohl möglichst standardisierte Beleuchtungsintensität als auch ein großer Dynamikbereich ergab. Bei der dann folgenden Schwellenwertsetzung wurde durch den Untersucher anhand einiger Eich-Gesichtsfelder festgelegt, welcher Grauwert im Grünfilterbild als „positiv“ zu werten ist. Nach dieser Prozedur, die für jedes Präparat erneut durchzuführen war, durften an den Einstellungen keine Veränderungen mehr vorgenommen werden. Die sich anschließende eigentliche Messung erfasste für jedes Präparat 20 Gesichtsfelder aus deren Einzelwerten das Gesamtergebnis ermittelt wurde.

Es wurde der zu untersuchende Bereich mäanderförmig durchfahren, um eine möglichst zufällige und nicht vom Untersucher abhängige Auswahl der Gesichtsfelder zu erhalten. Dann folgte nach der Fokussierung die Anwendung des Wasserscheidernalgorithmus zur Identifizierung der Zellkerne. An dieser Stelle vollzog sich das korrigierende Eingreifen des Untersuchers. Es gilt, nur organspezifische Zellkerne zu erfassen. Dies gelingt mit Hilfe der im Programm enthaltenen Editierfunktionen. So können vom Programm als Objekt erkannte Bindegewebszellen, Lymphozyten, Endothelzellen oder Ähnliches vor dem weiteren Fortgang des Verfahrens gelöscht werden. Andere Funktionen, die der Optimierung der erstellten Maske dienen, sind „Erosion“ und „Dilatation“ (Verkleinerung und Vergrößerung eines Objektes um eine definierte Pixelanzahl), „Close Hole“ (Schließen aller nicht erfasster Innenflächen), „Opening“ und „Closing“ (Glättung der Masken mittels Durchführung von „Erosion“ und „Dilatation“ in dieser bzw. umgekehrter Reihenfolge) sowie zuletzt das „Cleaning“, wobei Objekte, deren Größe unterhalb einer definierten Pixelzahl liegen, entfernt werden. Am Ende dieses Bearbeitungsschrittes sollte eine Maske entstehen, die möglichst genau die Umrise der parenchymatösen Zellkerne beschreibt. Im nächsten Schritt wird diese Maske über das Grünfilterbild gelegt. Hier erfolgt die Erkennung der „positiven“ Zellkerne, da diese nun einen deutlich anderen Grauwert aufweisen als die „negativen“. Anhand des zuvor definierten Grenzwertes entscheidet das Programm, welche Zelle wie einzuordnen ist.

3.3.3 Messergebnisse

Als Ergebnis liefert das Programm sowohl Kernzahl- als auch kernflächenbezogene Mittelwerte des Anteils „positiver“ Zellkerne, daneben eine Vielzahl weiterer statistisch-deskriptiver Größen wie Maximal- und Minimalwert, Median, Modalwert, Standardabweichung und Varianz. Ebenso wird die Gesamtzahl und die Gesamtfläche der erfassten Kerne angegeben. Graphisch wird eine Häufigkeitsverteilung der in den Kernen gemessenen optischen Dichten dargestellt, ebenso die jeweilige Häufigkeit eines beobachteten prozentualen „positiven“ Kernanteils.

3.4 **Statistische Untersuchungen**

Die statistischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der RWTH Aachen geplant und mit dem Programm „STATISTICA for Windows“, Versionen 4.5 und 5.1 bzw. mit dem dort vorgehaltenen Programmpaket BMDP durchgeführt. Die Graphiken wurden entweder direkt aus STATISTICA übernommen oder mit EXCEL (Microsoft) gestaltet.

3.4.1 Ausgangsdaten

Der Übersichtlichkeit halber beschränken sich die Untersuchungen auf die Messgrößen KICT_TOT/APCT_TOT (Gesamtzahl der bei einem Präparat erfassten Kerne), KICTMEAN/APCTMEAN (durchschnittlicher kernzahlbezogener Anteil positiver Kerne), KICTMAX/APCTMAX (kernzahlbezogener Maximalwert innerhalb einer Messreihe), KIAR_TOT/APAR_TOT (Gesamtfläche aller erfassten Kerne in μm^2), KIARMEAN/APARMEAN (durchschnittlicher kernflächenbezogener Anteil positiver Kerne in μm^2) sowie KIARMAX/APARMAX (durchschnittlicher kernflächenbezogener Anteil positiver Kerne in μm^2), KICTMAX/APCTMAX (kernflächenbezogener Maximalwert innerhalb einer Messreihe in μm^2).

Ergänzend wurde für die Proliferation, wie in den Untersuchungen anderer Autoren, in einer Übersichtsmikroskopie der Tumoranteil mit den meisten positiv gefärbten Zellen aufgesucht und hier eine bildanalytische Messung wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Messgrößen werden als KICTMAX2 und KIARMAX2 bezeichnet.

Darüber hinaus stand dabei die Tumorklassifikation gemäß TNM-Klassifikation (13) zur Verfügung. Die für das Aufstellen von Überlebensstatistiken notwendigen Daten beziehen sich auf den Endpunkt der Studie im März 1999; zu diesem Zeitpunkt wurde durch Befragung der jeweils zuständigen Einwohnermeldeämter ermittelt, ob die Patienten zu diesem Zeitpunkt noch lebten bzw. wann sie verstorben waren.

Neben den ermittelten Werten für Proliferation und Apoptose bei papillären Schilddrüsenkarzinomen wurden zum Vergleich auch zuvor veröffentlichte Daten aus dem Institut für Pathologie der RWTH-Aachen verwendet (14). Hierbei handelt es sich um mit der gleichen Methode ermittelte Meßwerte zur Proliferation von normalem Schilddrüsen-gewebe, Schilddrüsenadenomen und follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Jeweils differenziert wurden die kernzahlbezogenen und die kernflächenbezogenen Daten.

3.4.2 Statistische Analysen

Im ersten Schritt erfolgte die Ermittlung allgemeiner deskriptiver statistischer Kenngrößen wie Mittelwert, Median, Standardabweichung, Varianz, Modalwert sowie Angaben zu allen benötigten Perzentilen (Rohdaten im Anhang).

Danach gliederte sich die Untersuchung zunächst in vier Abschnitte:

1. Die Betrachtung der Daten für Proliferation und Apoptose bei papillären Schilddrüsenkarzinomen und deren Bezug zu den o.g. klinischen Daten.
2. Den Vergleich der ermittelten Daten für die Proliferation in papillären Schilddrüsenkarzinomen mit denen der anderen Entitäten.
3. Analyse der Überlebensdaten in Abhängigkeit von den gemessenen Werten und in Relation zum den klinischen und histomorphologischen Daten.
4. Bedeutung der gemessenen Werte für die Diagnoseentscheidung.

Bei den in der ersten Gruppe durchgeführten Tests auf Lageunterschiede muss berücksichtigt werden, dass es sich um verbundene Stichproben handelt. Im Vordergrund stehen hier jedoch die Untersuchung auf Abhängigkeiten, um den Bezug der gemessenen Werte mit den klinischen Daten herzustellen. Darüber hinaus soll die Vali-

dität der vorliegenden Untersuchung und der Methode durch bestimmte statistische Analysen untermauert werden. Zur Anwendung kommen der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient sowie der Pearson Chi²-Test, wenn es um den Vergleich von kategorisierten oder sekundär gestuften Daten geht.

In der zweiten Gruppe handelt es sich um unverbundene Stichproben mit ungestuften Parametern. Entsprechend wurde zur Testung auf Lageunterschiede entweder der t-Test für unverbundene Stichproben (bei nachgewiesener Normalverteilung) oder der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon zur Untersuchung auf Signifikanzen angewendet.

Bei der Untersuchung der Überlebenskurven kommen beim Vergleich zweier Gruppen Gehans verallgemeinertem Wilcoxon-Test (15), beim Vergleich mehrerer Gruppen der Wilcoxon-Breslow-Test (16).

Falls im Einzelfall nicht anders angegeben, wurde statistische Signifikanz für ein p-Niveau von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Grundlegende statistische Betrachtungen

Wie in Kapitel 3.4.1 ausgeführt, werden jeweils sechs bei den Messungen ermittelte Werte betrachtet. Diese und die im Weiteren verwendeten Kürzel werden nochmals in Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-1: Proliferation (Ki-67)

	Kürzel
Kernanzahl insgesamt	KICT_TOT
Zahlenmäßig Ki-67-positiver Anteil	KICTMEAN
Maximalwert des zahlenmäßig Ki-67-positiven Anteils	KICTMAX
Gesamtfläche aller gemessener Kerne	KIAR_TOT
Flächenmäßiger Anteil der Ki-67-positiven Kerne	KIARMEAN
Maximalwert des Ki-67-positiven Flächenanteils	KIARMAX

In Einzelfällen wird noch die Größe KICTMAX2 verwendet. Dabei handelt es sich um die größte „gesuchte“ Dichte an positiv gefärbten Zellen, die bei der manuellen Durchmusterung im Präparat auffiel.

Tabelle 4-2: Apoptose

Beschreibung	Kürzel
Kernanzahl insgesamt	APCT_TOT
Zahlenmäßig Apoptose-positiver Anteil	APCTMEAN
Maximalwert des zahlenmäßig Apoptose-positiven Anteils	APCTMAX
Gesamtfläche aller gemessener Kerne	APAR_TOT
Flächenmäßiger Anteil der Apoptose-positiven Kerne	APARMEAN
Maximalwert des Apoptose-positiven Flächenanteils	APARMAX

4.1.1 Allgemeine Kenngrößen

Die allgemeinen Kenngrößen der deskriptiven Statistik (Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Standardabweichung und Quartilsgrenzen) werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst (zur besseren Übersichtlichkeit hier auf 2 Dezimalstellen gerundet, in die Berechnungen gehen die genaueren Werte ein).

Tabelle 4-3: Allgemeine Kenngrößen

	gültige N	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	untere Quartilsgrenze	obere Quartilsgrenze	Standardabweichung
KICTTOT	32	4076	4139	2140	5474	3635	4554	727
KICTMEAN	32	1,32	0,62	0	9,0	0,30	1,58	1,84
KICTMAX	32	3,48	2,25	0	16,2	1,31	5,42	3,31
KIARTOT	32	73467	73411	31148	125986	58999	82963	21673
KIARMEAN	32	1,43	0,63	0	9,97	0,29	1,64	2,08
KIARMAX	32	4,21	2,6	0	21,33	1,58	5,91	4,25
KIARMAX2	32	7,88	5,40	0	31,33	3,05	10,37	7,10
KICTMAX2	32	6,80	5,03	0	30,23	2,88	7,66	6,52
APCTTOT	36	5250	5209	3027	7019	4727	5742	956
APCTMEAN	36	0,37	0,09	0	2,53	0,04	0,46	0,60
APCTMAX	36	3,40	0,77	0	26,71	0,43	4,07	5,89
APAR_TOT	36	85881	86657	52073	121738	76575	94644	17100
APARMEAN	36	0,42	0,10	0	2,91	0,04	0,50	0,70
APARMAX	36	3,87	0,75	0	34,41	0,52	4,04	7,30

4.1.2 Verteilung der Messwerte

Für das weitere Vorgehen ist nun von Bedeutung, ob die Daten normalverteilt sind. Gängige Tests sind der Kolmogoroff-Smirnoff-Test für die Güte der Anpassung mit der Lilliefors-Modifikation sowie der Shapiro-Wilks W-Test (Lilliefors, 1976; Shapiro, Wilk & Chen, 1968). Lediglich die gemessene Gesamtanzahl und -fläche zeigen annähernd Normalverteilung. Graphisch zeigt sich dies in den Histogrammen der Abbildung 4.1.

Beim Vergleich der verschiedenen Diagnosegruppen (normales Schilddrüsengewebe, Adenome, follikuläre und papilläre Karzinome) sind also nicht-parametrische Verfahren zur Prüfung von Korrelationen und Signifikanzen anzuwenden. Dies sind der Pearsonsche Rangkorrelationskoeffizient, der Pearsonschen Chi²-Test für gestufte, bzw. kategorisierte Werte sowie der Mann-Whitney U-Test bei der Testung auf Signifikanzen.

4.2 Proliferation beim papillären Schilddrüsenkarzinom

Zunächst wurde geklärt, inwieweit zwischen den erhobenen Parametern Korrelationen bestehen oder nicht. Daraus resultiert im Verlauf, ob der Vergleich der klinischen

Daten mit allen ermittelten Daten überhaupt sinnvoll ist. Hierzu erfolgt zunächst die graphische Darstellung als Punktwolken sowie die Berechnung der Korrelationskoeffizienten.

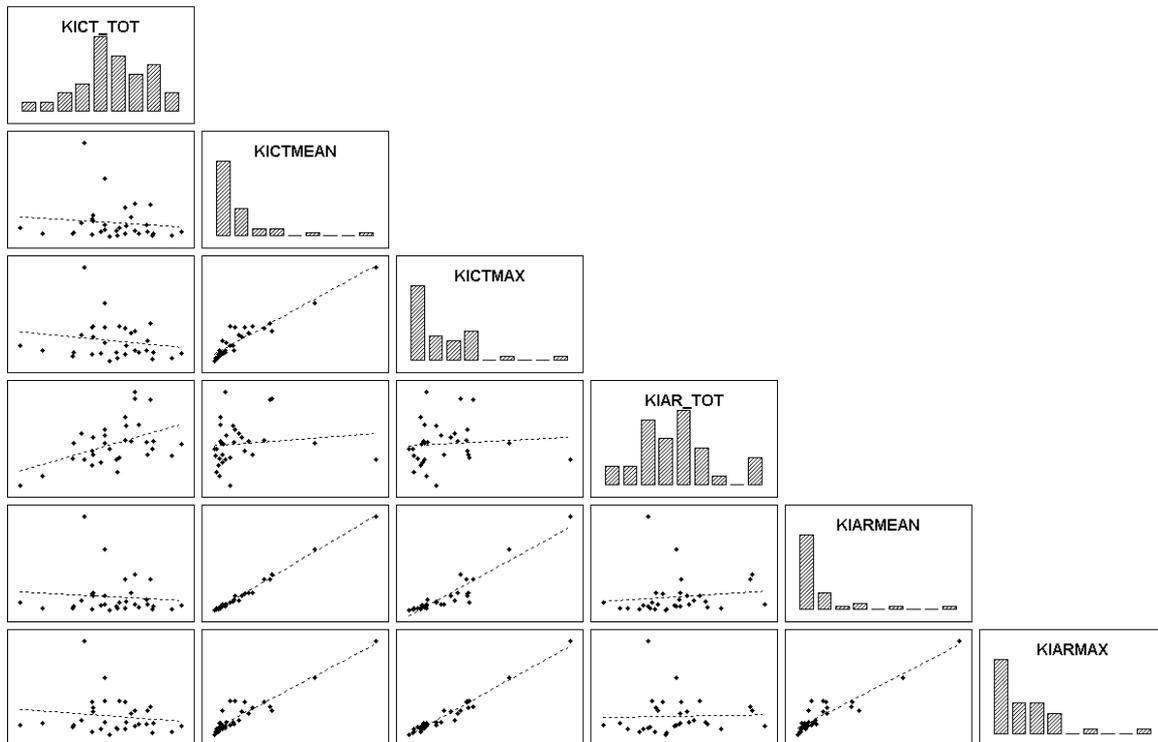


Abbildung 4.1: Korrelationen der Proliferationsparameter

Tabelle 4-4: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's R) der Proliferationsparameter

KICTMEAN	R	-0,11				
	p	0,56				
KICTMAX	R	-0,18	0,91			
	p	0,33	0,00			
KIAR_TOT	R	0,43	0,35	0,25		
	p	0,01	0,05	0,17		
KIARMEAN	R	-0,08	0,99	0,92	0,33	
	p	0,67	0,00	0,00	0,06	
KIARMAX	R	-0,13	0,84	0,96	0,27	0,87
	p	0,49	0,00	0,00	0,13	0,00
		KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX	KIAR_TOT	KIARMEAN

Der Abbildung 4.1 sowie der und Tabelle 4-4 ist zu entnehmen, dass insbesondere KICTMEAN und KIARMEAN in höchstem Maße korrelieren. Auch die Maximalwerte zeigen noch eine deutliche Korrelation. Des Weiteren wird deutlich, dass kein Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl der erfassten Kerne und den gemessenen Werten für die Proliferation besteht.

Um quasi eine semiquantitative Betrachtung zu „simulieren“, kann die Einteilung in Kategorien von Bedeutung sein, da nicht grundsätzlich von den Möglichkeiten der bildzytometrischen, und damit quantitativen Bestimmung, ausgegangen werden kann. Daher erfolgt die Zuordnung der Einzelwerte in drei nach 1:2:1-Quantilisierung gebildete Gruppen. Daraus lassen sich nun 9-Feldertafeln bilden, die mit dem Pearsonschen Chi²-Test untersucht werden. Tabelle 4-5 zeigt die statistischen Kenngrößen:

Tabelle 4-5: Chi²-Test für Proliferationsparameter

KICTMEAN	p	0,84				
KICTMAX	p	0,90	0,00			
KIAR_TOT	p	0,04	0,84	0,50		
KIARMEAN	p	0,84	0,00	0,00	0,84	
KIARMAX	p	0,98	0,00	0,00	0,28	0,00
		KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX	KIAR_TOT	KIARMEAN

Auch hier bestätigt sich das zuvor ermittelte Ergebnis: Der positive Flächenanteil und der zahlenmäßig positive Anteil korrelieren so stark, dass sich daraus einerseits Aussagen bezüglich der Reliabilität der Meßmethode ableiten lassen. Andererseits reicht es, bei den weiteren Betrachtungen lediglich eine der beiden Größen zu berücksichtigen. Außerdem zeigt sich die Unabhängigkeit von der absolut erfassten Zellzahl. Auch dies ist als Gütekriterium der Methode zu sehen, da sich in verschiedenen Tumoren die Zelldichten unterscheiden und dies sicherlich nicht zwangsläufig mit den Proliferationsraten korreliert.

4.3 Apoptose beim papillären Schilddrüsenkarzinom

Entsprechend den vorangegangenen Betrachtungen erfolgt die gleiche Bewertung der Apoptoseparameter.

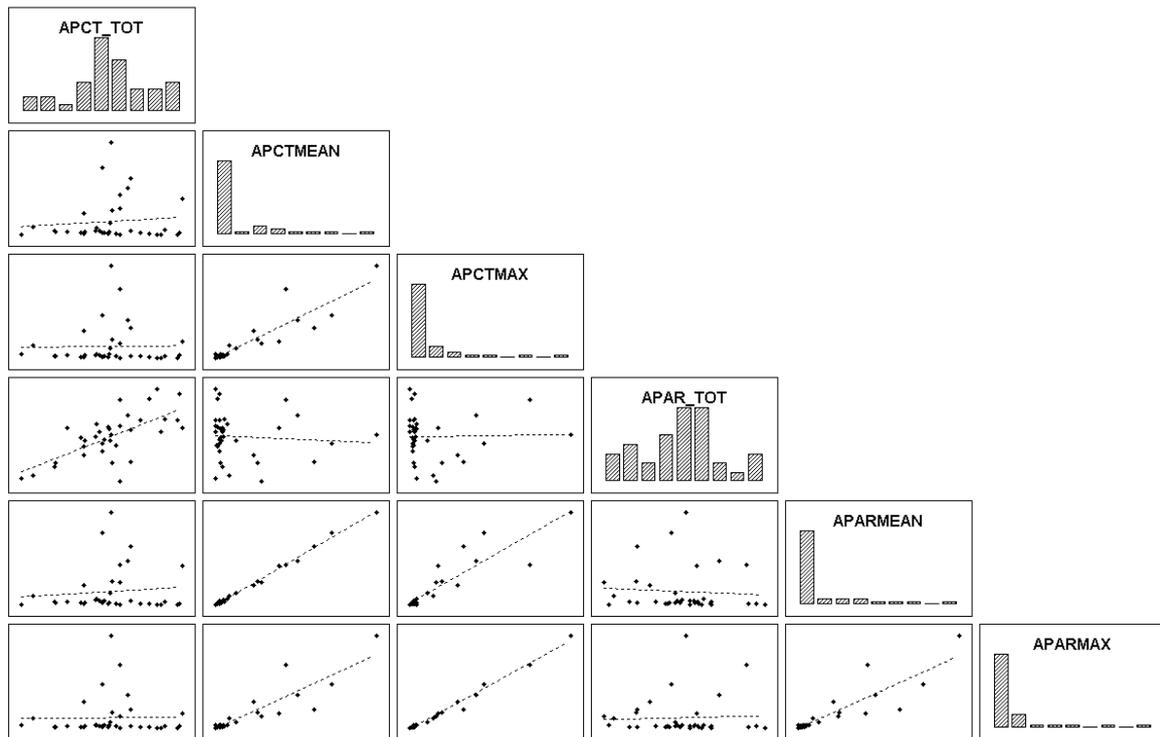


Abbildung 4.2: Korrelationen der Apoptoseparameter

Tabelle 4-6: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's R) der Apoptoseparameter

APCTMEAN	R	-0,05				
	p	0,76				
APCTMAX	R	-0,14	0,88			
	p	0,40	0,00			
APAR_TOT	R	0,62	-0,21	-0,25		
	p	0,00	0,23	0,14		
APARMEAN	R	-0,042	0,98	0,86	-0,21	
	p	0,809	0,00	0,00	0,22	
APARMAX	R	-0,111	0,83	0,97	-0,27	0,86
	p	0,521	0,00	0,00	0,12	0,00
		APCT_TOT	APCTMEAN	APCTMAX	APAR_TOT	APARMEAN

Tabelle 4-7: Chi²-Test für Apoptoseparameter

APCTMEAN	p	0,40				
APCTMAX	p	0,19	0,00			
APAR_TOT	p	0,01	0,67	0,57		
APARMEAN	p	0,40	0,00	0,00	0,67	
APARMAX	p	0,19	0,00	0,00	0,57	0,00
		APCT_TOT	APCTMEAN	APCTMAX	APAR_TOT	APARMEAN

Als Fazit bleibt die gleiche Schlussfolgerung wie bei der Proliferation: Zahlen- und flächenbezogene Daten korrelieren so stark, dass auf eine separate Betrachtung

verzichtet werden kann. Außerdem sind die Apoptosewerte weitestgehend unabhängig von der Gesamtzahl der erfassten Kerne.

4.4 Proliferation und Apoptose

Im Folgenden werden die Beziehungen von Proliferation und Apoptose zueinander untersucht. Zur Anwendung kommen die beschriebenen nicht-parametrischen Verfahren.

Zur Veranschaulichung zunächst die graphische Darstellung in Form von Punktwolken (Abbildung 4.3).

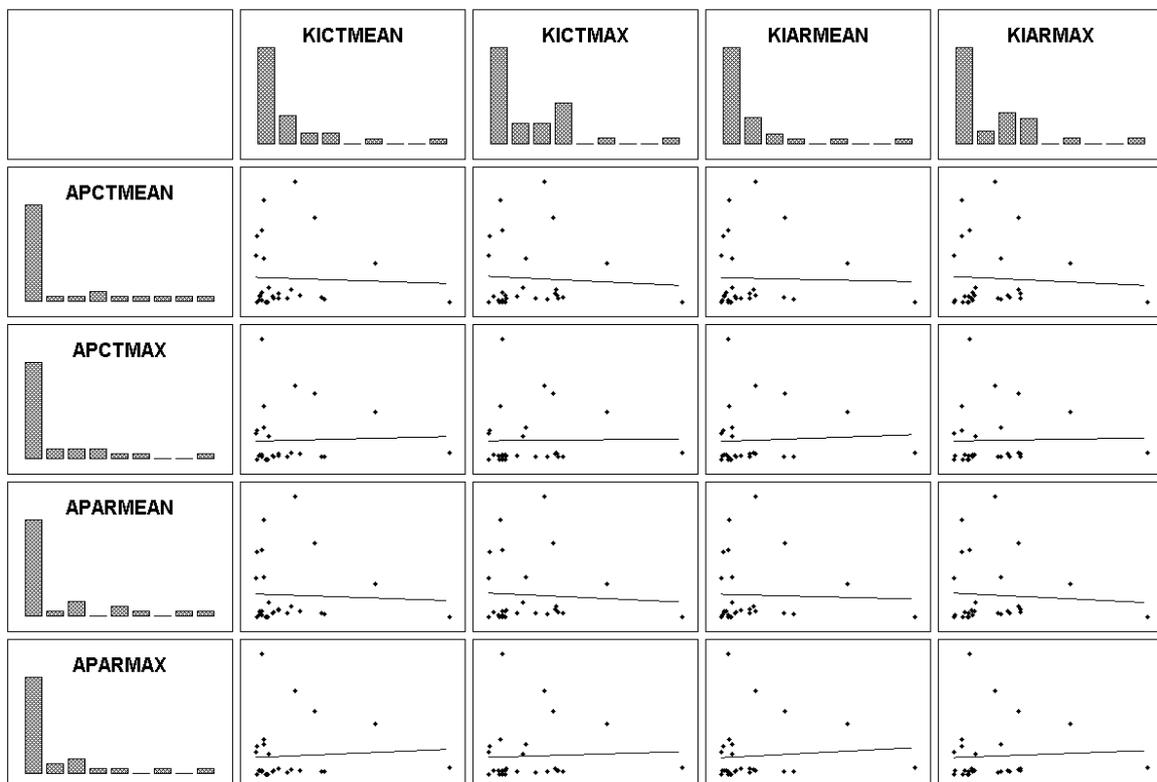


Abbildung 4.3: Beziehungen zwischen Proliferation und Apoptose

Tabelle 4-8: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's R)

KICTMEAN	R	-0,02	0,11	0,01	0,14
	p	0,93	0,59	0,95	0,48
KICTMAX	R	0,08	0,19	0,10	0,21
	p	0,70	0,34	0,60	0,29
KIARMEAN	R	0,04	0,16	0,07	0,19
	p	0,86	0,43	0,74	0,34
KIARMAX	R	0,12	0,23	0,15	0,25
	p	0,54	0,24	0,45	0,20
		APCTMEAN	APCTMAX	APARMEAN	APARMAX

Tabelle 4-9: Chi²-Test

KICTMEAN	p	0,95	0,49	0,95	0,49
KICTMAX	p	0,11	0,26	0,11	0,26
KIARMEAN	p	0,95	0,49	0,95	0,49
KIARMAX	p	0,27	0,49	0,27	0,49
		APCTMEAN	APCTMAX	APARMEAN	APARMAX

Bei der Ermittlung der Korrelationskoeffizienten zeigen sich keine Signifikanzen. Das gleiche Ergebnis findet sich auch bei der Anwendung des Spearmanschen Chi²-Tests auf die durch Quantilisierung entstandenen 9-Felder Tafeln. Es lässt sich statistisch kein direkter Zusammenhang zwischen Proliferation und Apoptose ableiten.

4.5 Proliferation und klinische Daten bzw. histomorphologische Daten

Folgende klinische bzw. histomorphologische Daten werden betrachtet (Wie zuvor dargestellt, korrelieren die flächenbezogenen und die kernzahlbezogenen Werte so stark, dass bei den weitergehenden Betrachtungen nur die Werte KICTMEAN, KICTMAX und teilweise KICTMAX2 in die Analyse eingehen):

- Das Alter bei Diagnosestellung (4.5.1)
- Das Tumor-Stadium entsprechend der TNM Klassifikation (4.5.1)
- Der Durchmesser des Primärtumors (4.5.3)
- Der Lymphknotenstatus (4.5.4)
- Der Nachweis der Invasion von Lymph- oder Blutgefäßen (4.5.5 und 4.5.5)
- Die Invasion der Tumor- bzw. der Organkapsel (4.5.7 und 4.5.8)

4.5.1 Patientenalter bei Diagnosestellung

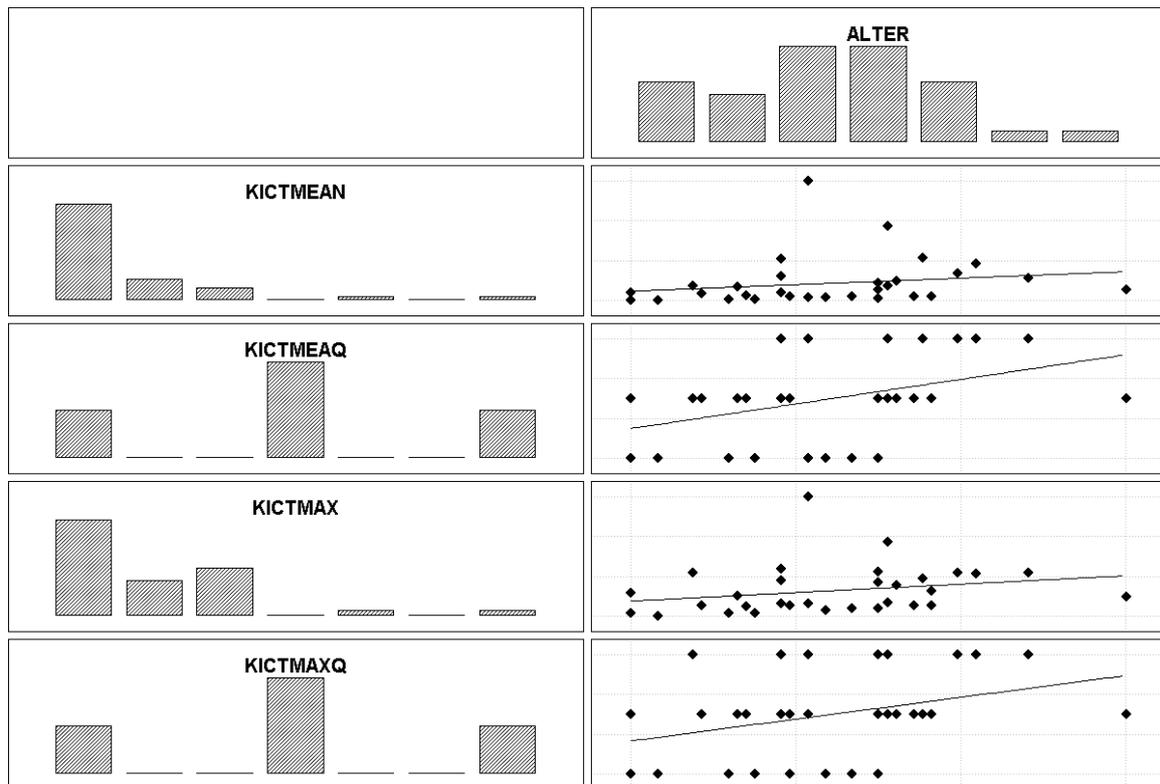


Abbildung 4.4: Proliferation und Patientenalter

Tabelle 4-10: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
ALTER & KICTMEAN	32	0,38	0,03
ALTER & KICTMEAQ	32	0,42	0,02
ALTER & KICTMAX	32	0,41	0,02
ALTER & KICTMAXQ	32	0,37	0,04

Tatsächlich zeigt sich bezüglich der Korrelation zwischen Patientenalter und Proliferationsrate eine Signifikanz auf niedrigem Niveau. Beim älteren Patienten finden sich höhere Proliferationsraten. Die Bedeutung, die diesem Umstand beikommt, wird im Kapitel 5.3 erläutert.

4.5.2 T-Klassifikation

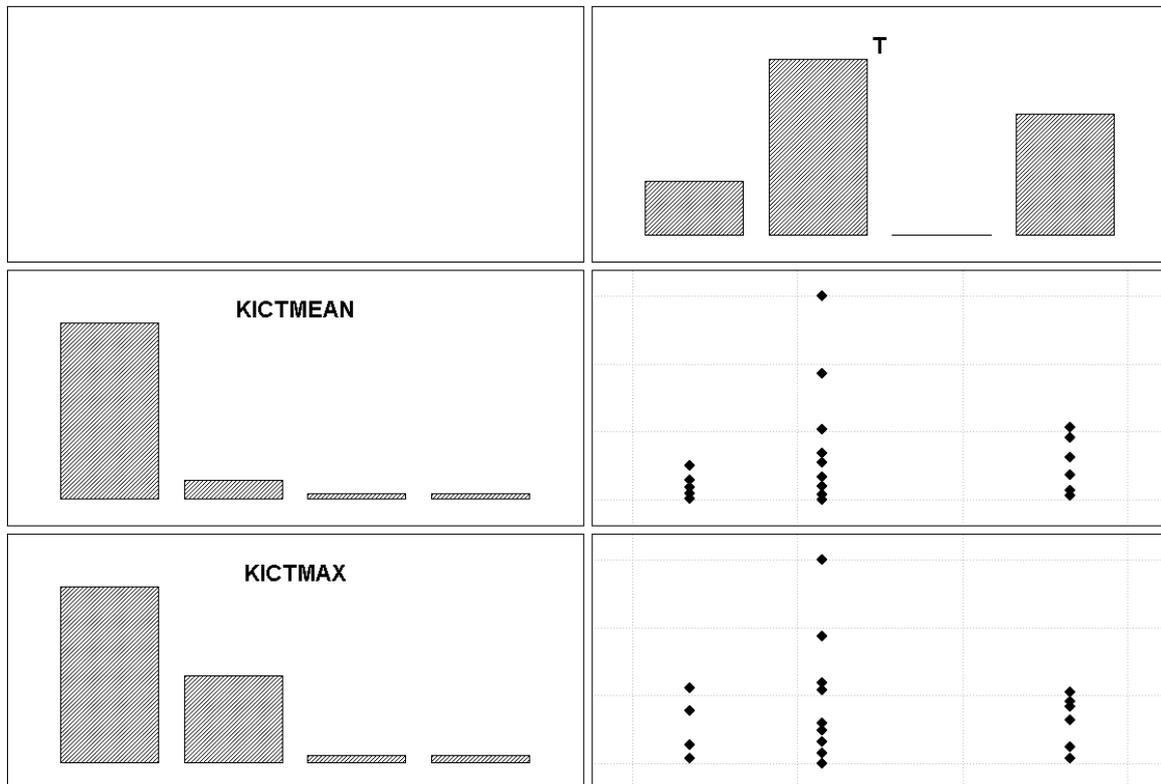


Abbildung 4.5: Proliferation und Tumorstadium

Tabelle 4-11

		T1	T2	T3	T4
KICTMEAQ	Q1	1	4	0	3
	Q2	4	7	0	5
	Q3	0	5	0	3
KICTMAXQ	Q1	1	4	0	3
	Q2	3	7	0	6
	Q3	1	5	0	2

Tabelle 4-12: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
T & KICTMEAN	32	0,02	0,90
T & KICTMEAQ	32	0,14	0,45
T & KICTMAX	32	-0,01	0,97
T & KICTMAXQ	32	-0,18	0,32

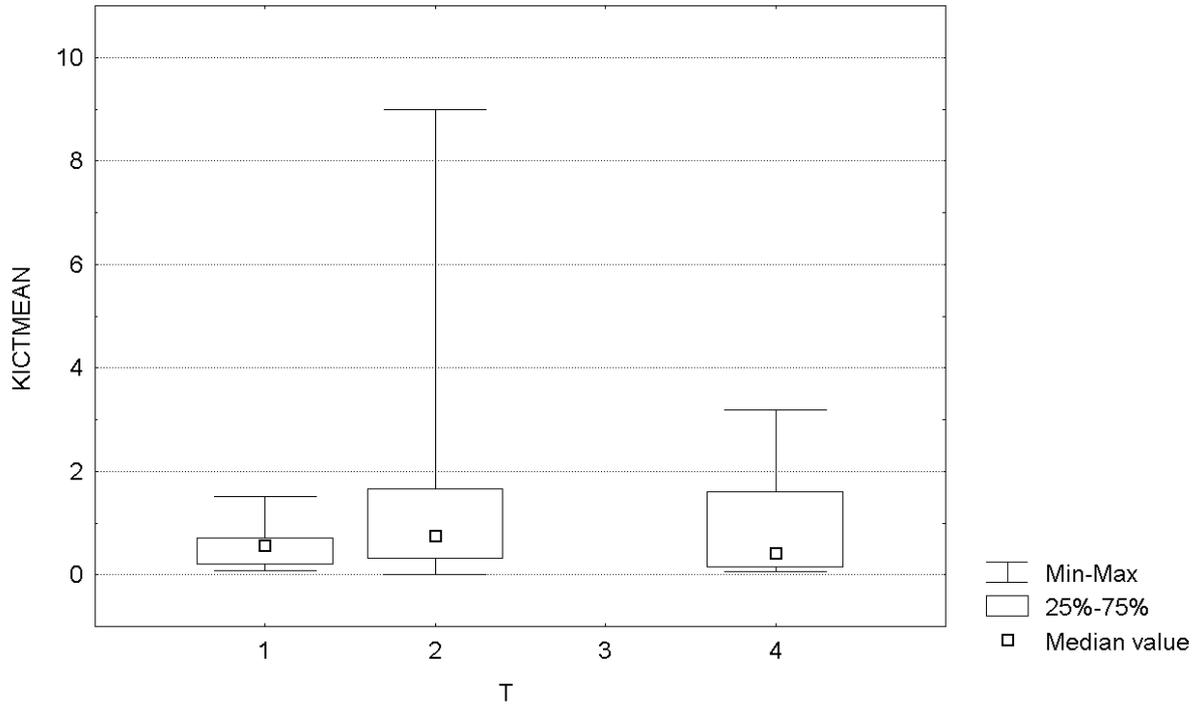


Abbildung 4.6: Mittlere Proliferation und Tumorstadium

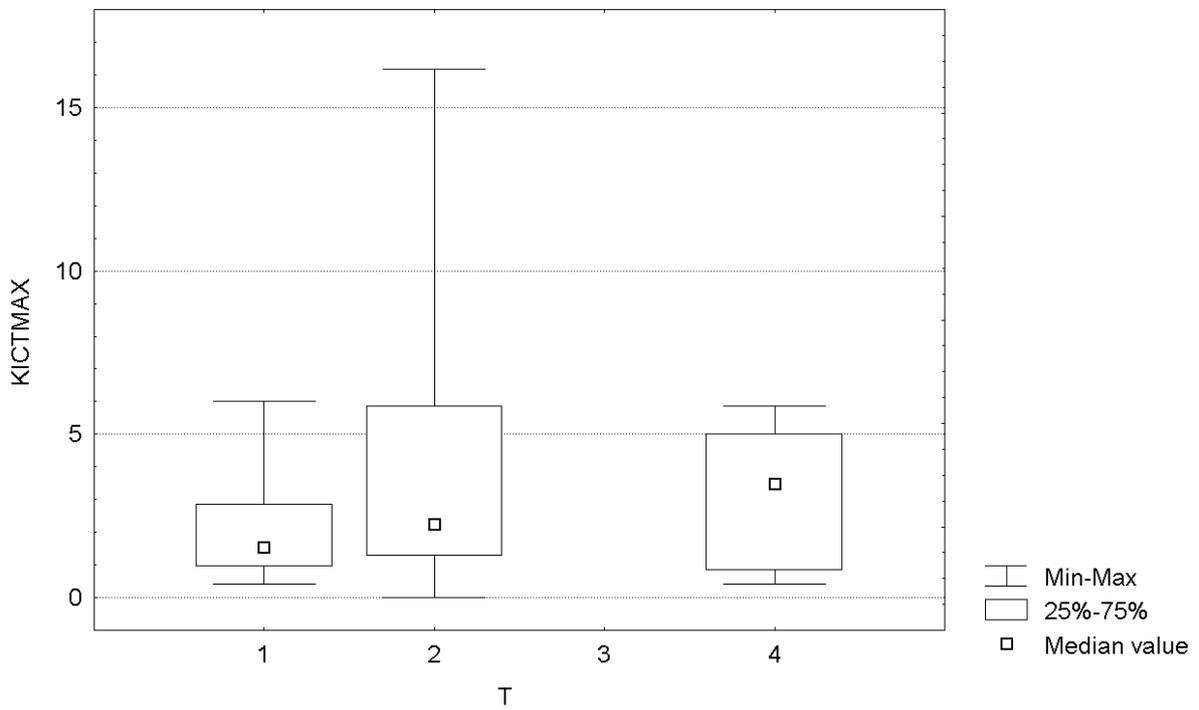


Abbildung 4.7: Maximale Proliferation und Tumorstadium

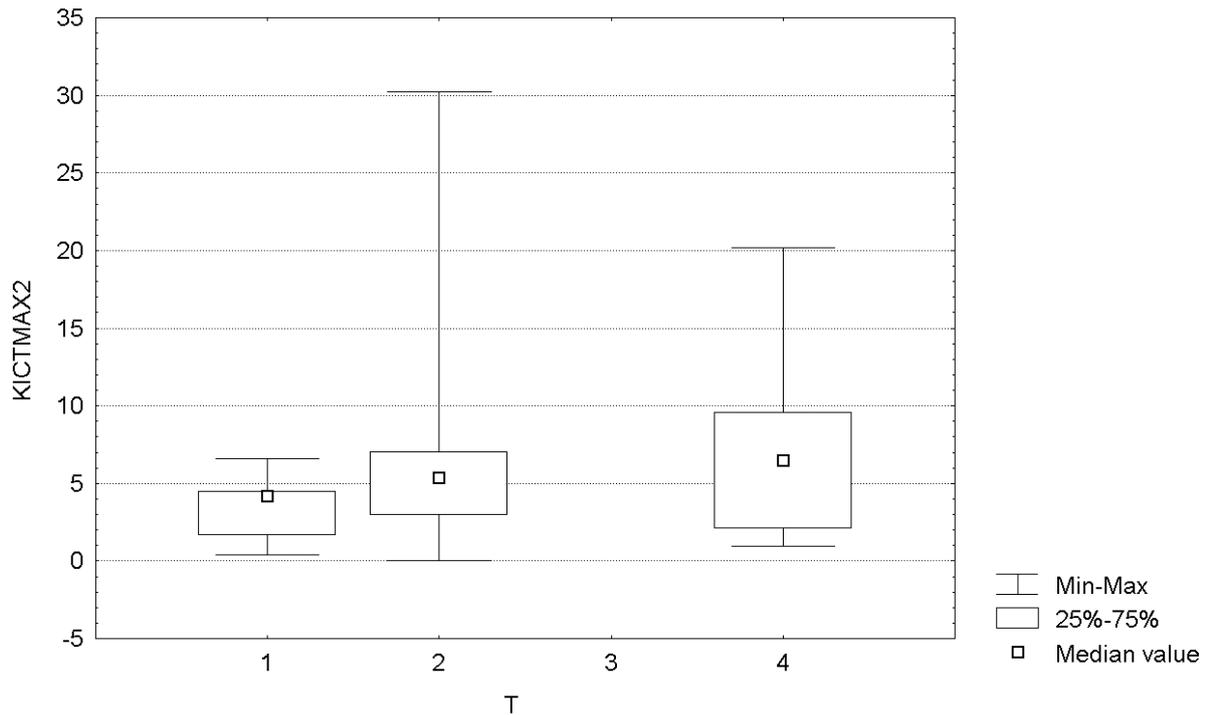


Abbildung 4.8: „Gesuchte“ maximale Proliferation und Tumorstadium

Tabelle 4-13: Signifikanzniveaus für T / KICTMEAN (U-Test)

Tumorstadium		2	3	4
1	p	0,46	0,46	0,69
2	p		0,69	0,66
3	p			0,66

Tabelle 4-14: Signifikanzniveaus für T / KICTMAX (U-Test)

Tumorstadium		2	3	4
1	p	0,68	0,68	0,87
2	p		0,87	0,69
3	p			0,69

Tabelle 4-15: Signifikanzniveaus für T / KICTMAX2 (U-Test)

Tumorstadium		2	3	4
1	p	0,32	0,32	0,40
2	p		0,40	0,81
3	p			0,81

Entsprechend Abbildung 4.6 , Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 lassen sich auch mit dem U-Test keine signifikanten Unterschiede feststellen.

4.5.3 Tumorgröße

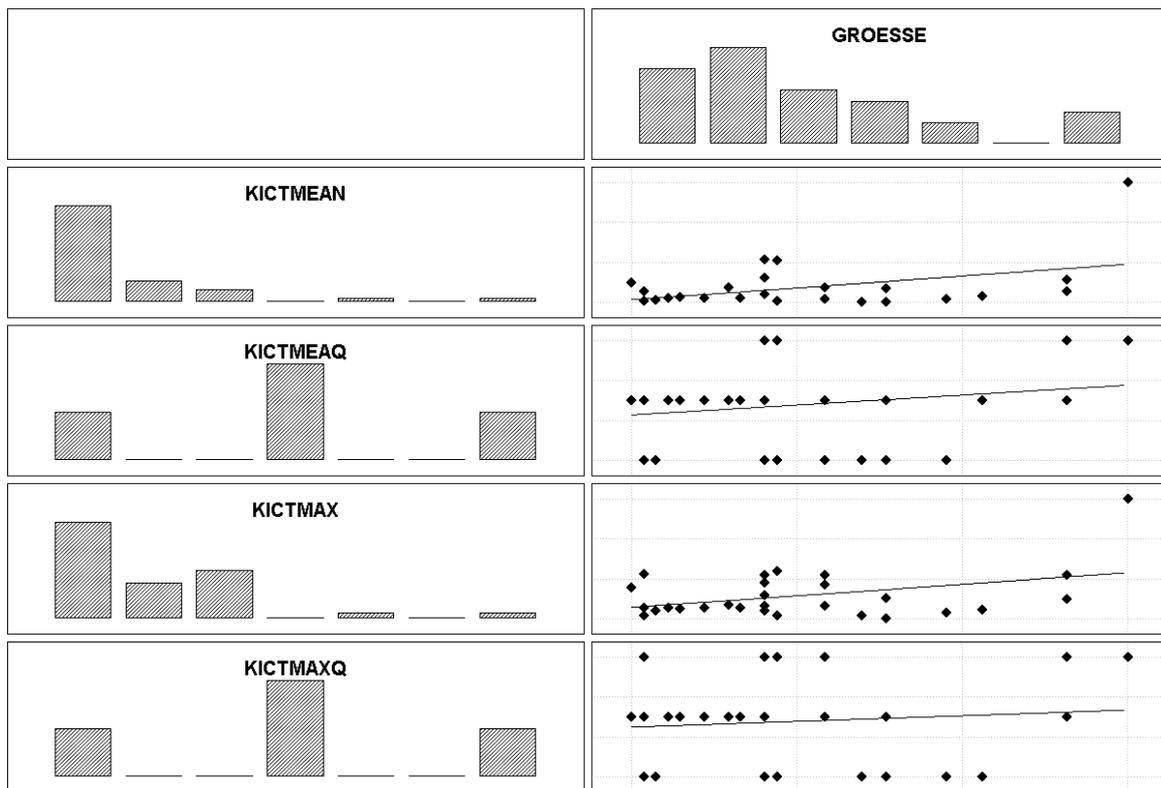


Abbildung 4.9: Proliferation und Tumorgröße

Tabelle 4-16: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
GRÖSSE & KICTMEAN	30	0,11	0,58
GRÖSSE & KICTMEAQ	30	0,07	0,71
GRÖSSE & KICTMAX	30	0,12	0,53
GRÖSSE & KICTMAXQ	30	0,07	0,72

Anders als eventuell zu erwarten, zeigen die größeren Tumore keine höheren Proliferationsraten. Bei der Gegenüberstellung der Tumorgröße mit der Gesamtzahl der erfassten Zellen (bei jeweils gleicher erfasster Fläche) zeigt sich, dass die Gesamtzahl in den größeren Tumoren kleiner war. Dies entspricht einer insgesamt geringeren Zelldichte. Hieraus ließe sich ableiten, dass die Tumorgröße nicht durch vermehrte Proliferation, sondern beispielsweise durch vermehrte Stromazell- oder Sekreteinlagerung bedingt ist. Dies wiederum kann den fehlenden Zusammenhang zwischen Größe und Proliferationsrate möglicherweise erklären.

4.5.4 Lymphknotenstatus

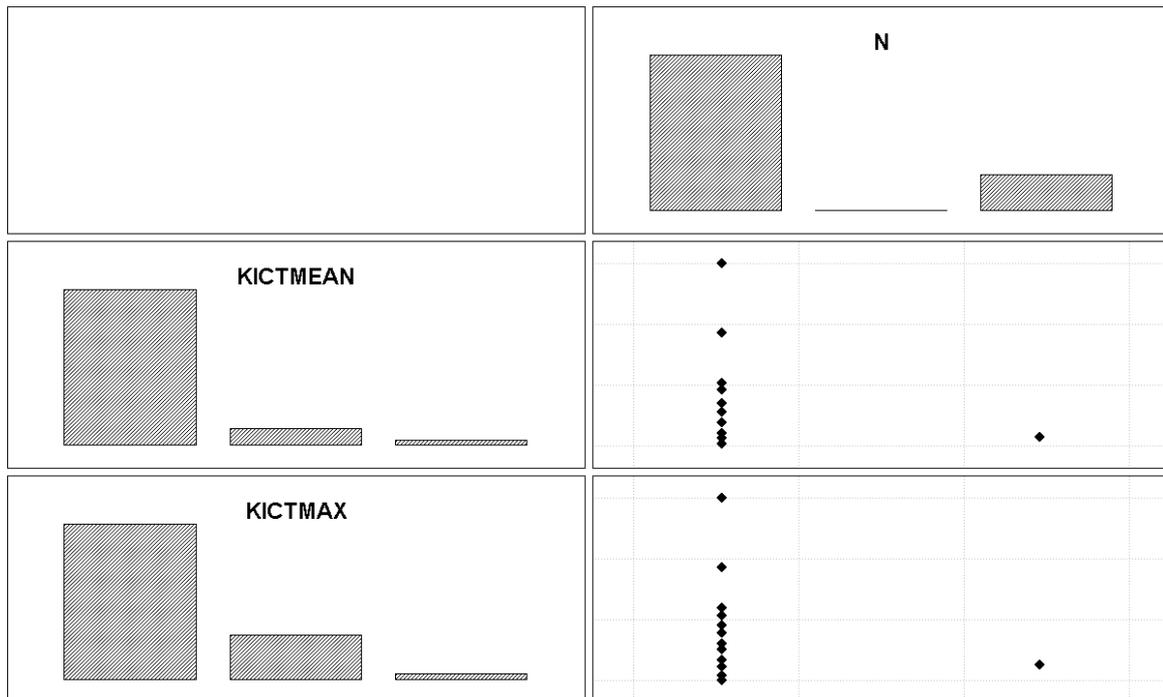


Abbildung 4.10: Proliferation und Lymphknotenbefall

Tabelle 4-17

		Lymphknotenstatus	
		nicht befallen	befallen
KICTMEAQ	Q1	7	1
	Q2	11	5
	Q3	8	0
KICTMAXQ	Q1	7	1
	Q2	12	4
	Q3	7	1

Tabelle 4-18: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
N & KICTMEAN	32	0,17	0,34
N & KICTMEAQ	32	0,06	0,74
N & KICTMAX	32	0,08	0,67
N & KICTMAXQ	32	0,07	0,70

Es fällt auf, dass der Befall von Lymphknoten, was ja bereits einer metastatischen Ausbreitung des Tumors entspricht, keinen Zusammenhang mit den Proliferationsraten zeigt. Dies ist bereits als Hinweis zu werten, dass die ermittelte Proliferationsrate kaum zur Prognoseabschätzung herangezogen werden kann.

4.5.5 Invasion von Lymphgefäßen

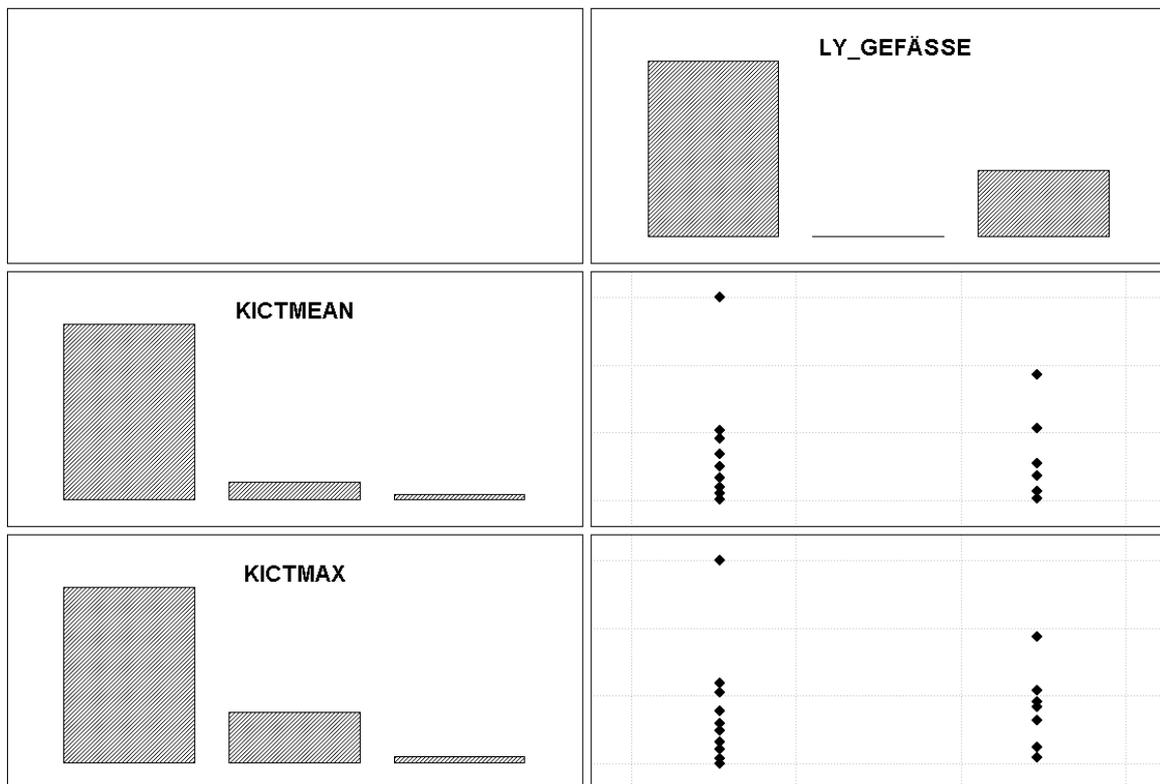


Abbildung 4.11: Proliferation und Lymphgefäßinvasion

Tabelle 4-19

		Lymphgefäßeinbruch	
		nein	ja
KICTMEAQ	Q1	7	1
	Q2	12	4
	Q3	4	4
KICTMAXQ	Q1	7	1
	Q2	11	5
	Q3	5	3

Tabelle 4-20: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
LY_GEFÄSSE & KICTMEAN	32	0,28	0,12
LY_GEFÄSSE & KICTMEAQ	32	0,29	0,10
LY_GEFÄSSE & KICTMAX	32	0,28	0,12
LY_GEFÄSSE & KICTMAXQ	32	0,20	0,28

Wie beim manifesten Lymphknotenbefall, zeigt sich auch bei der Invasion von Lymphspalten kein signifikanter Zusammenhang zur Proliferation.

4.5.6 Invasion von Blutgefäßen

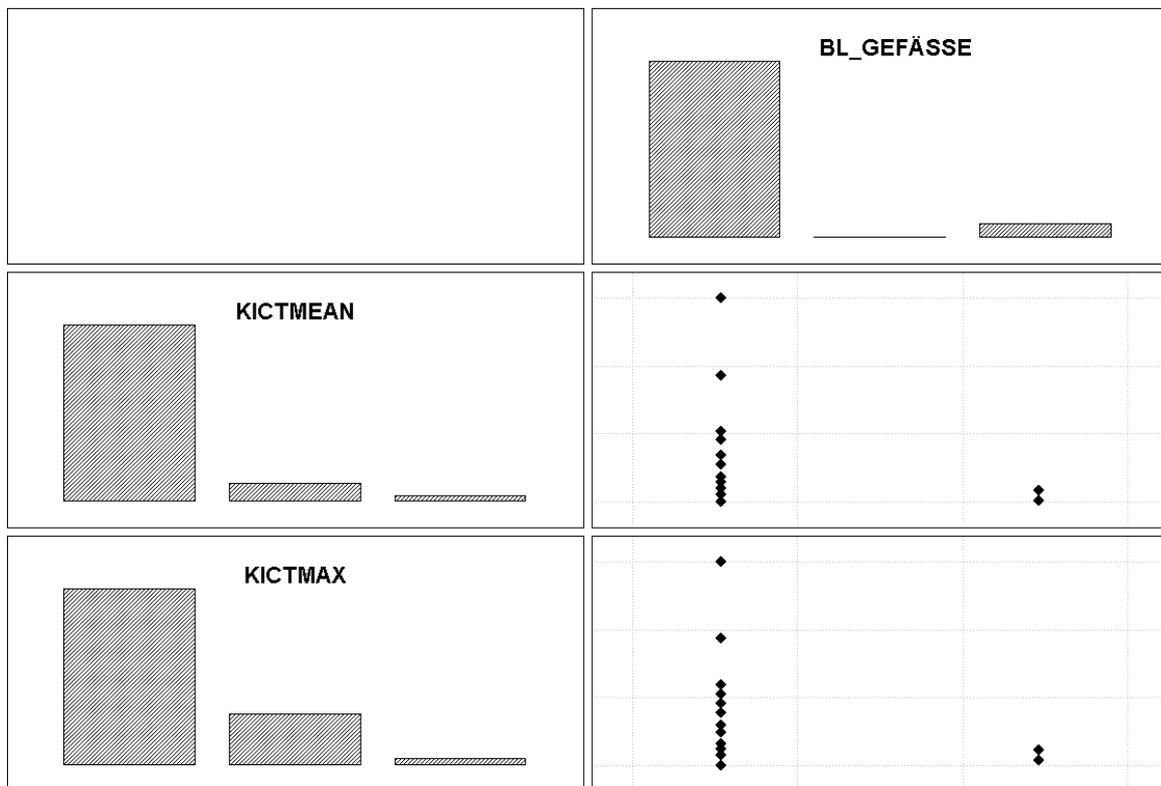


Abbildung 4.12: Proliferation und Blutgefäßinvasion

Tabelle 4-21

		Blutgefäßinvasion	
		nein	ja
KICTMEAQ	Q1	7	1
	Q2	15	1
	Q3	8	0
KICTMAXQ	Q1	6	2
	Q2	16	0
	Q3	8	0

Tabelle 4-22: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
BL_GEFÄSSE & KICTMEAN	32	-0,24	0,19
BL_GEFÄSSE & KICTMEAQ	32	-0,18	0,32
BL_GEFÄSSE & KICTMAX	32	-0,31	0,09
BL_GEFÄSSE & KICTMAXQ	32	-0,37	0,04

Hier zeigt sich unerwarteterweise, dass gerade die Tumore mit geringer Proliferationsrate besonders häufig einen Einbruch in Blutgefäße zeigen. Statistische Signifikanz zeigt sich aber nur bei der Betrachtung der semiquantitativ eingestufteten Werte

für die Maximalwerte der Proliferation. Auf Grund des niedrigen Signifikanzniveaus, lassen sich klinische Folgerungen nicht herleiten.

4.5.7 Tumorkapsleinbruch

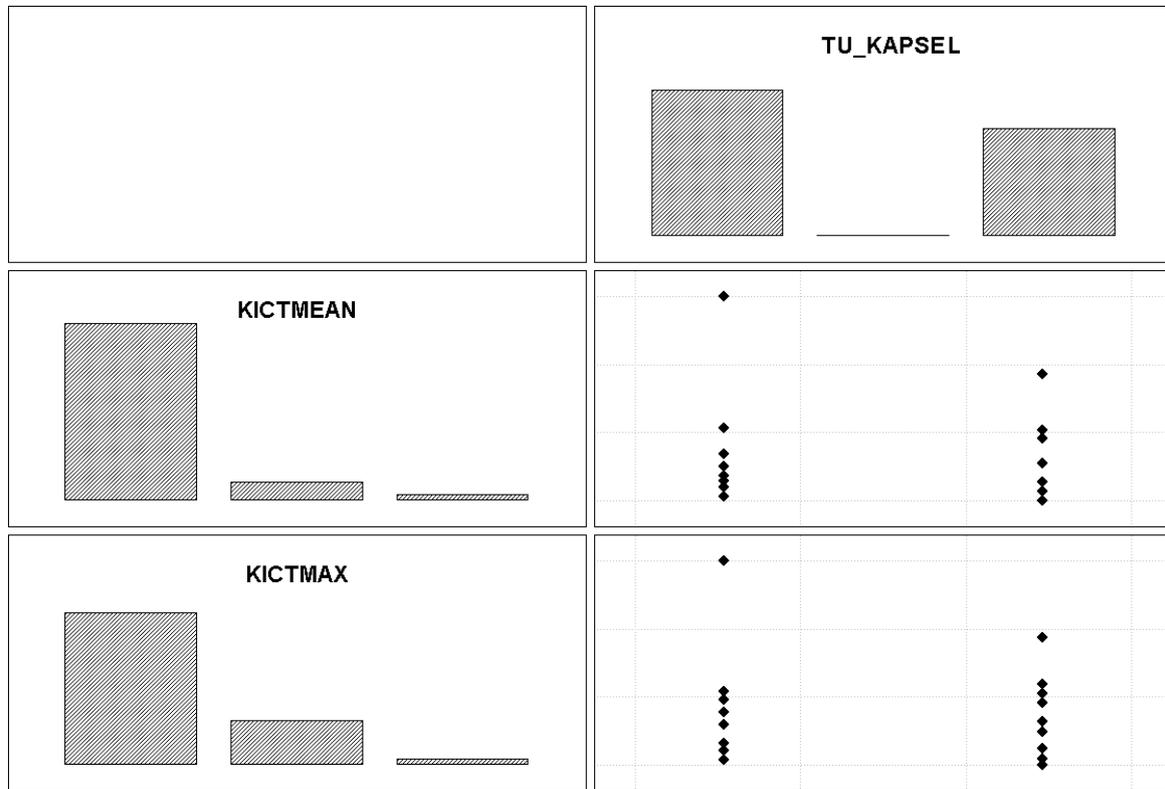


Abbildung 4.13: Proliferation und Tumorkapsleinvasion

Tabelle 4-23

		Tumorkapsleinvasion	
		nein	ja
KICTMEAQ	Q1	6	2
	Q2	9	7
	Q3	3	5
KICTMAXQ	Q1	5	3
	Q2	9	7
	Q3	4	4

Tabelle 4-24: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
TU_KAPSEL & KICTMEAN	32	0,11	0,55
TU_KAPSEL & KICTMEAQ	32	0,27	0,14
TU_KAPSEL & KICTMAX	32	0,03	0,85
TU_KAPSEL & KICTMAXQ	32	0,09	0,63

Der Einbruch in die Tumorkapsel als mögliches Dignitätskriterium zeigt keinen Zusammenhang zur Proliferation.

4.5.8 Organkapseleinbruch

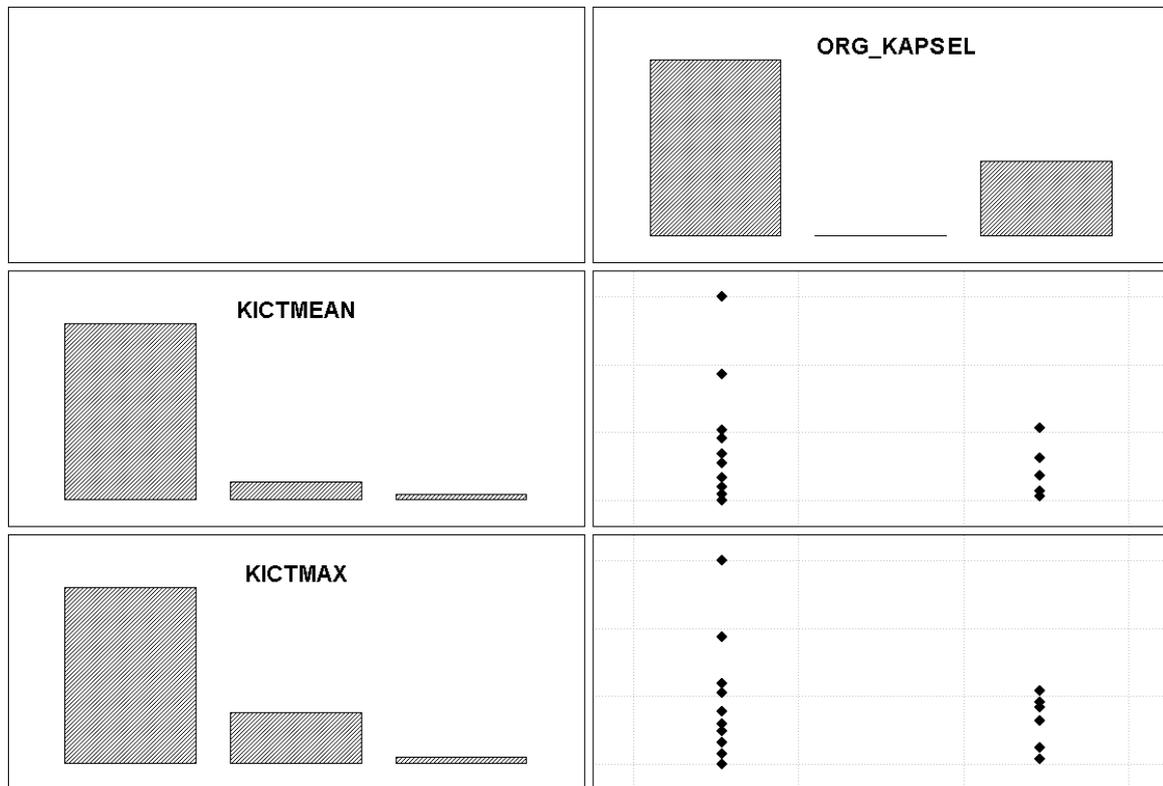


Abbildung 4.14: Proliferation und Organkapselinvasion

Tabelle 4-25

		Organkapselinvasion	
		nein	ja
KICTMEAQ	Q1	5	3
	Q2	11	5
	Q3	6	2
KICTMAXQ	Q1	5	3
	Q2	10	6
	Q3	7	1

Tabelle 4-26: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
ORG_KAPSEL & KICTMEAN	32	-0,12	0,50
ORG_KAPSEL & KICTMEAQ	32	-0,09	0,60
ORG_KAPSEL & KICTMAX	32	-0,11	0,55
ORG_KAPSEL & KICTMAXQ	32	-0,19	0,30

Auch das Eindringen in die Organkapsel (entspricht Tumorstadium 4) als möglicher Ausdruck des Maßes der Invasivität des Tumors korreliert nicht mit den Proliferationsparametern.

4.6 Apoptose und klinische Daten bzw. histomorphologische Daten

Entsprechend dem Vorgehen bei der Proliferation werden auch die Apoptoseparameter hinsichtlich ihrer Korrelation zu den klinischen Daten untersucht.

4.6.1 Patientenalter

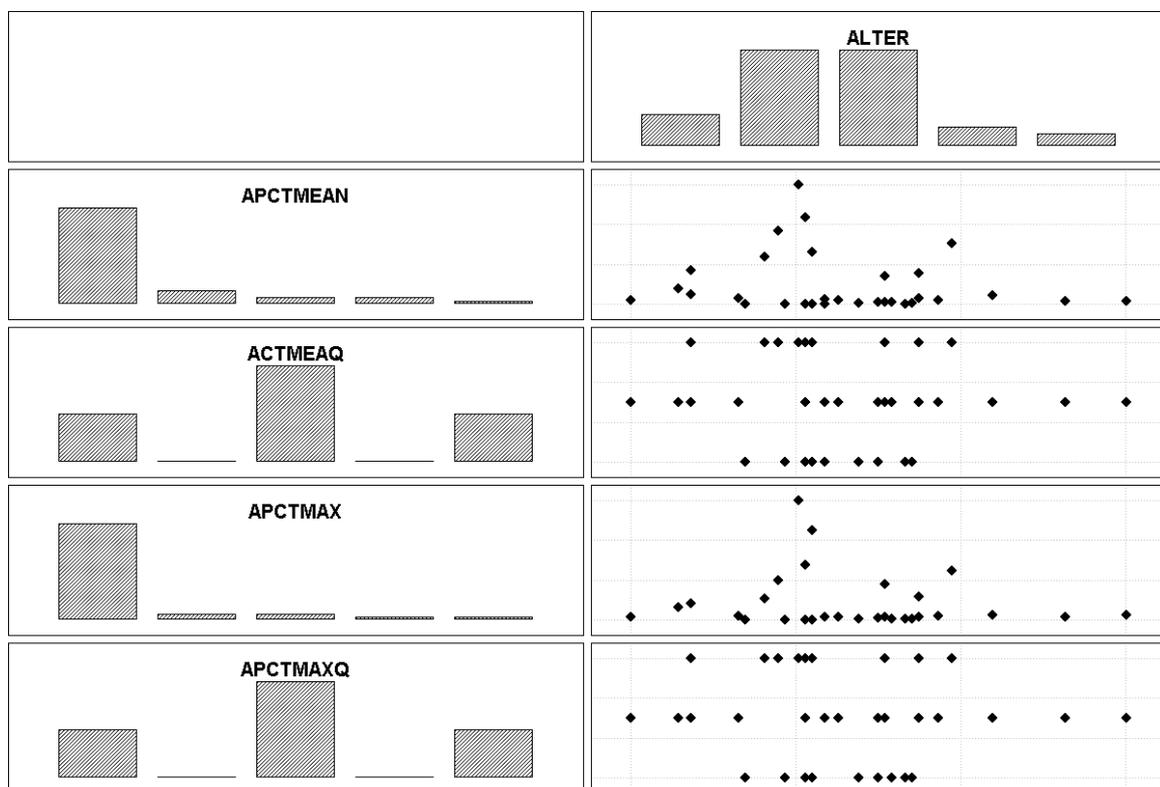


Abbildung 4.15: Apoptose und Patientenalter

Tabelle 4-27: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	t(N-2)	p-level
ALTER & APCTMEAN	36	-0,13	-0,76	0,45
ALTER & APCTMEAQ	36	-0,06	-0,34	0,73
ALTER & APCTMAX	36	-0,09	-0,55	0,59
ALTER & APCTMAXQ	36	-0,10	-0,57	0,58

Anders als bei der Proliferation ist kein Zusammenhang zwischen Patientenalter und Apoptose erkennbar.

4.6.2 Tumor-Klassifikation

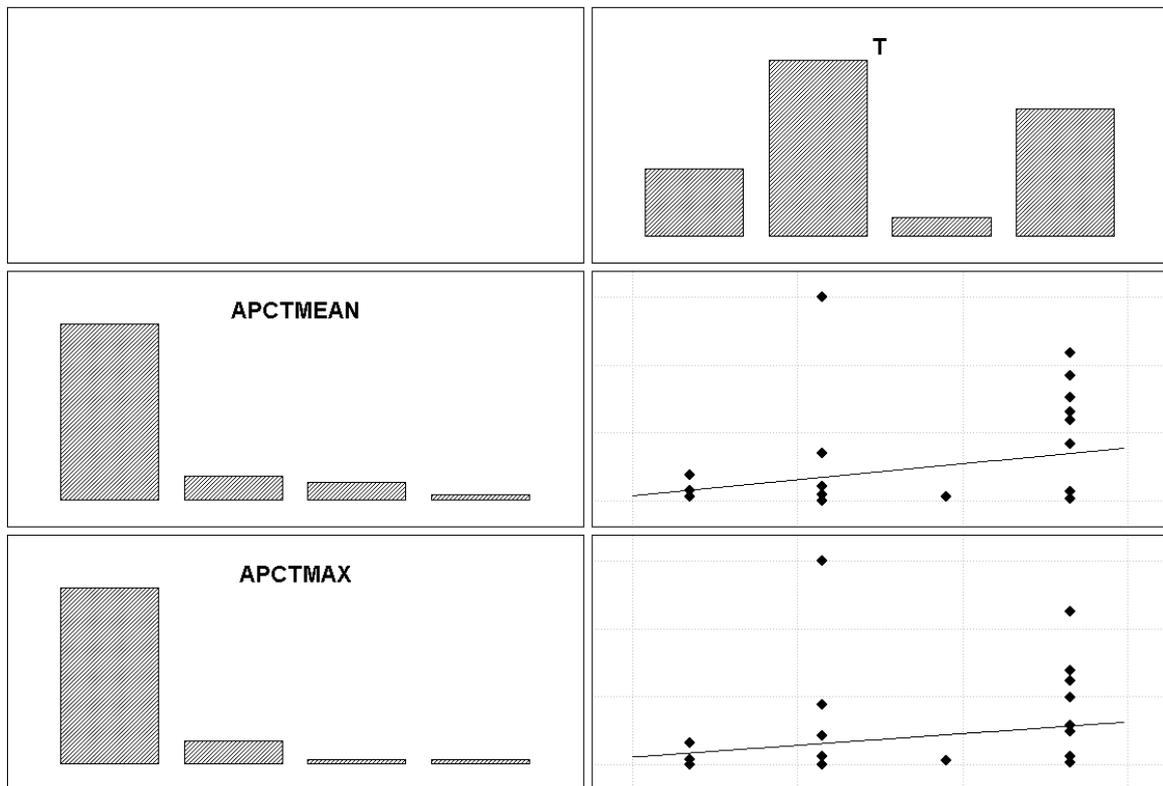


Abbildung 4.16: Apoptose und Tumorstadium

Tabelle 4-28

		Tumorstadium			
		1	2	3	4
APCTMEAQ	Q1	2	4	1	2
	Q2	5	9	1	3
	Q3	0	2	0	7
APCTMAXQ	Q1	4	3	1	1
	Q2	3	10	1	4
	Q3	0	2	0	7

Tabelle 4-29: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
T & APCTMEAN	36	0,35	0,04
T & APCTMEAQ	36	0,37	0,03
T & APCTMAX	36	0,46	0,00
T & APCTMAXQ	36	0,52	0,00

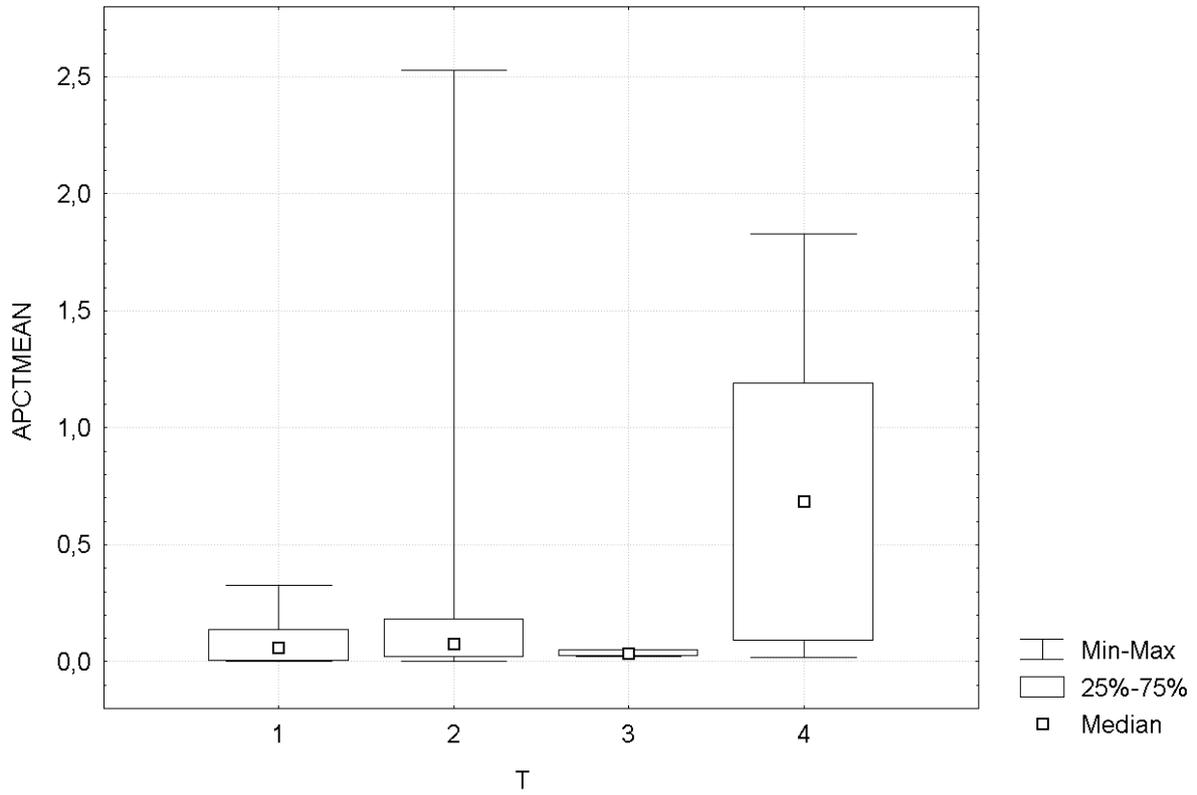


Abbildung 4.17: Mittlere Apoptoserate und Tumorstadium

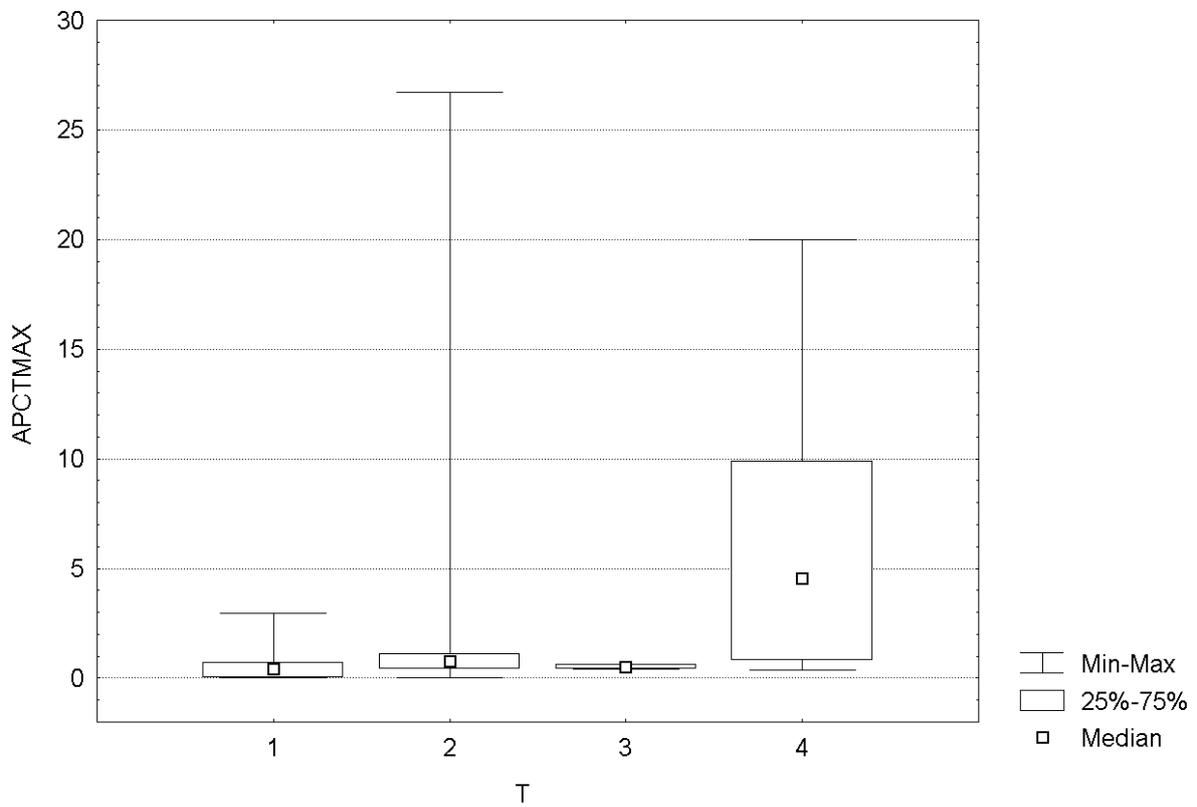


Abbildung 4.18: Maximale Apoptoserate und Tumorstadium

Tabelle 4-30: Signifikanzniveaus für T / APCTMEAN (U-Test)

Tumorstadium		2	3	4
1	p	0,86	0,38	0,04
2	p		0,30	0,04
3	p			0,10

Tabelle 4-31: Signifikanzniveaus für T / APCTMAX (U-Test)

Tumorstadium		2	3	4
1	p	0,13	0,66	0,01
2	p		0,23	0,06
3	p			0,10

Anders als bei den Proliferationsraten, zeigen sich zum Teil hochsignifikante Unterschiede bezüglich der Tumorstadien. Es fällt ein sprunghafter Anstieg der Apoptoseraten bei Erreichen des Stadiums 4 auf. Liegen die Medianwerte für die Stadien 1 bis 3 zwischen 0,036 und 0,078 für die mittlere und zwischen 0,52 und 0,77 für die maximale Apoptoserate, so liegen diese Werte für T4-Tumore bei 0,69 bzw. 4,54 und damit fast um den Faktor 10 höher.

4.6.3 Tumorgröße

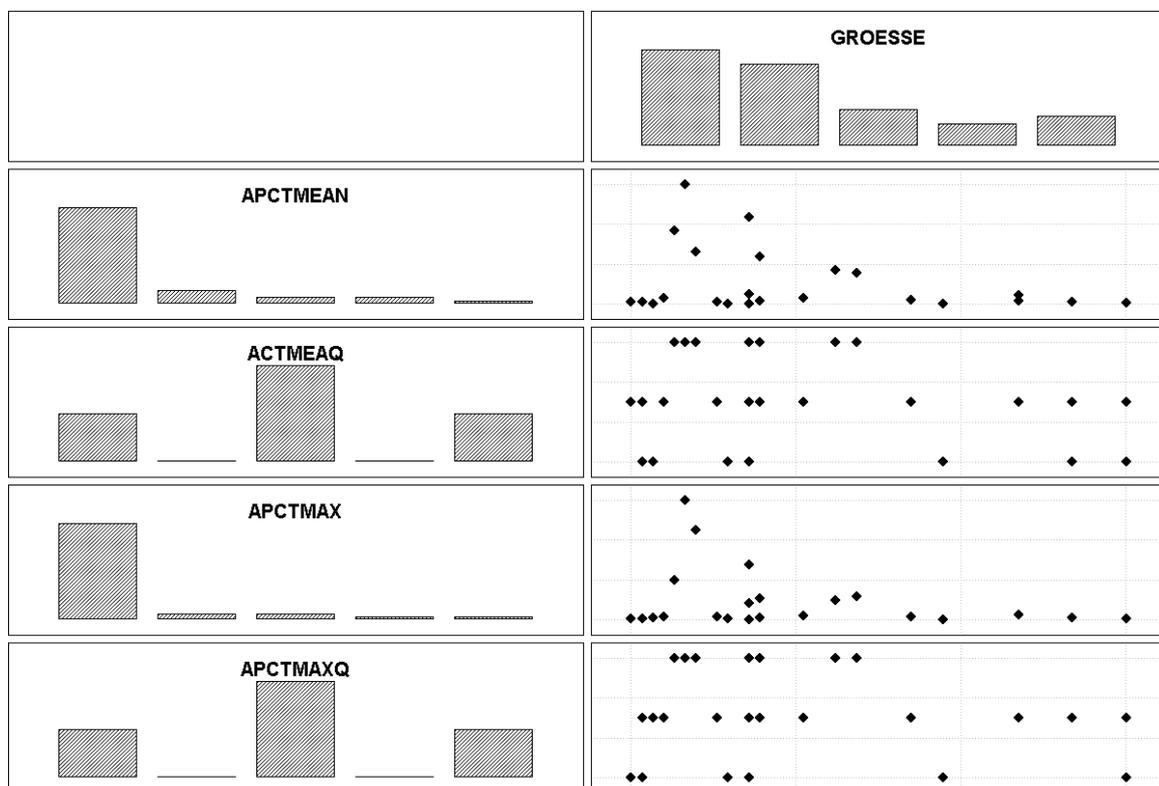


Abbildung 4.19: Apoptose und Tumorgröße

Tabelle 4-32: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
GRÖSSE & APCTMEAN	32	-0,01	0,98
GRÖSSE & APCTMEAQ	32	-0,01	0,96
GRÖSSE & APCTMAX	32	0,22	0,23
GRÖSSE & APCTMAXQ	32	0,15	0,43

Keinerlei Zusammenhang ist zwischen Apoptoseraten und Tumorgröße erkennbar. Auch die oben ausgeführte unterschiedliche Zelldichte in unterschiedlich großen Tumoren steht in keinem Zusammenhang.

4.6.4 Lymphknotenstatus

Abbildung 4.20

Tabelle 4-33

		Lymphknoteninvasion	
		nein	ja
APCTMEAQ	Q1	9	0
	Q2	14	4
	Q3	5	4
APCTMAXQ	Q1	9	0
	Q2	14	4
	Q3	5	4

Tabelle 4-34: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
N & APCTMEAN	36	0,41	0,01
N & APCTMEAQ	36	0,38	0,02
N & APCTMAX	36	0,44	0,01
N & APCTMAXQ	36	0,38	0,02

Es findet sich eine signifikante „positive“ Korrelation zwischen Apoptoserate und dem Auftreten von lokalen Lymphknotenmetastasen. Inwiefern sich hieraus ableiten lässt, dass die Apoptoserate als Prognosefaktor von Nutzen sein kann, wird später diskutiert (Kapitel 5.3).

4.6.5 Invasion von Lymphgefäßen

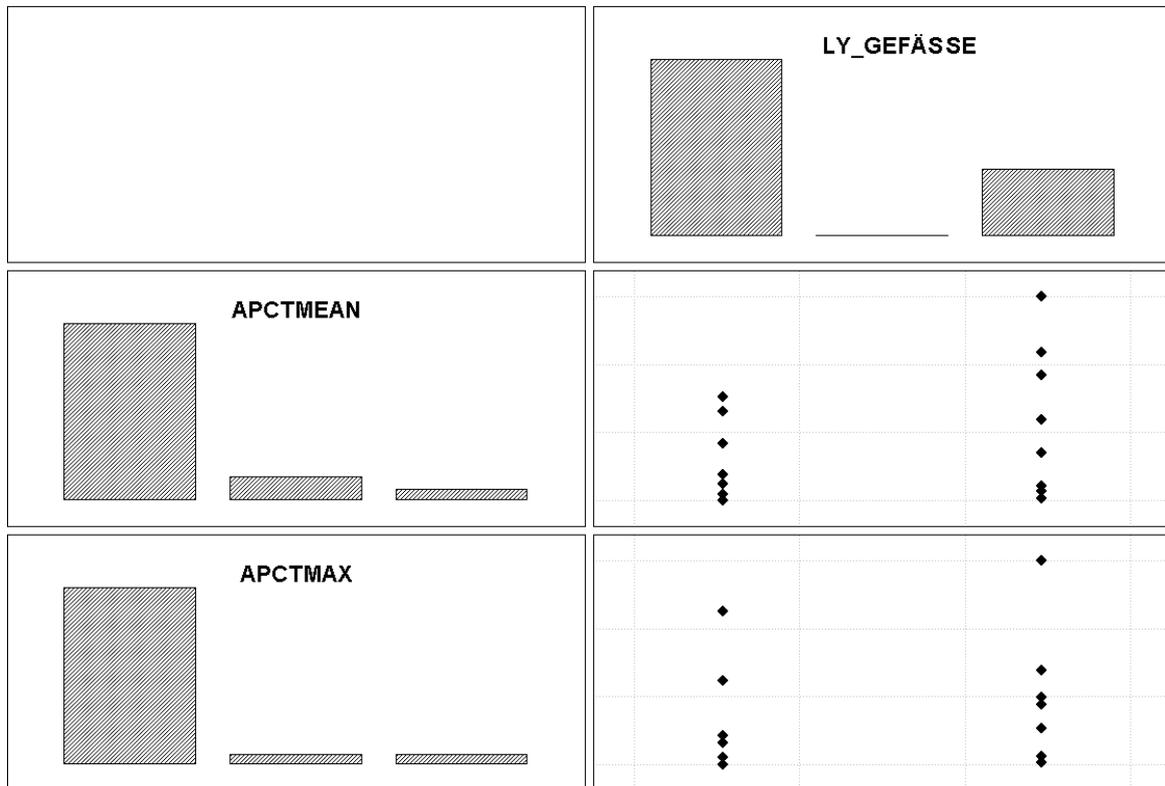


Abbildung 4.21

Tabelle 4-35

		Lymphgefäßinvasion	
		nein	ja
APCTMEAQ	Q1	8	1
	Q2	15	3
	Q3	3	6
APCTMAXQ	Q1	8	1
	Q2	15	3
	Q3	3	6

Tabelle 4-36: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
LY_GEFÄSSE & APCTMEAN	36	0,48	0,00
LY_GEFÄSSE & APCTMEAQ	36	0,44	0,01
LY_GEFÄSSE & APCTMAX	36	0,48	0,00
LY_GEFÄSSE & APCTMAXQ	36	0,44	0,01

Korrespondierend zum Lymphknotenbefall zeigen sich erwartungsgemäß auch beim histologisch nachgewiesenen Einbruch des Tumors in Lymphspalten deutliche Signifikanzen.

4.6.6 Invasion von Blutgefäßen

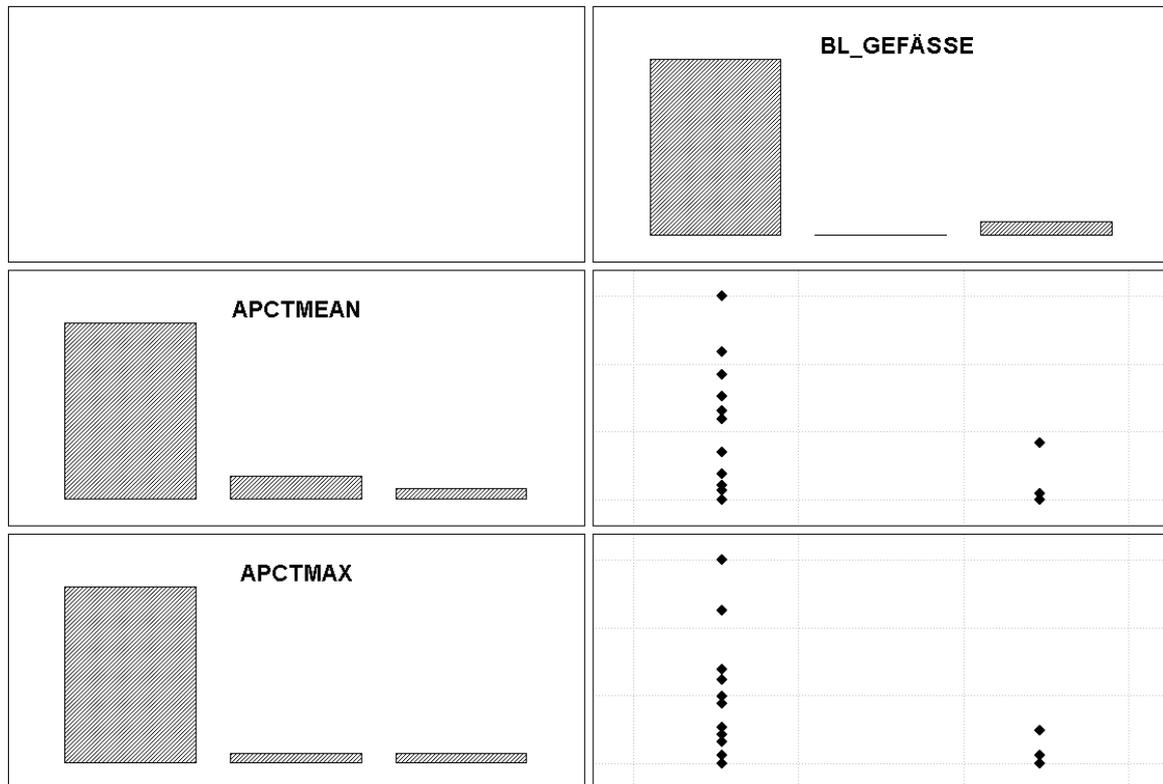


Abbildung 4.22

Tabelle 4-37

		Blutgefäßinvasion	
		nein	ja
APCTMEAQ	Q1	8	1
	Q2	17	1
	Q3	8	1
APCTMAXQ	Q1	8	1
	Q2	17	1
	Q3	8	1

Tabelle 4-38: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman's R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
BL_GEFÄSSE & APCTMEAN	36	-0,06	0,71
BL_GEFÄSSE & APCTMEAQ	36	0,00	1,00
BL_GEFÄSSE & APCTMAX	36	0,00	1,00
BL_GEFÄSSE & APCTMAXQ	36	0,00	1,00

Zwischen dem Nachweis des Tumoreinbruchs in das Blutgefäßsystem und den Apoptoseraten besteht statistisch kein Zusammenhang.

4.6.7 Tumorkapsleinbruch

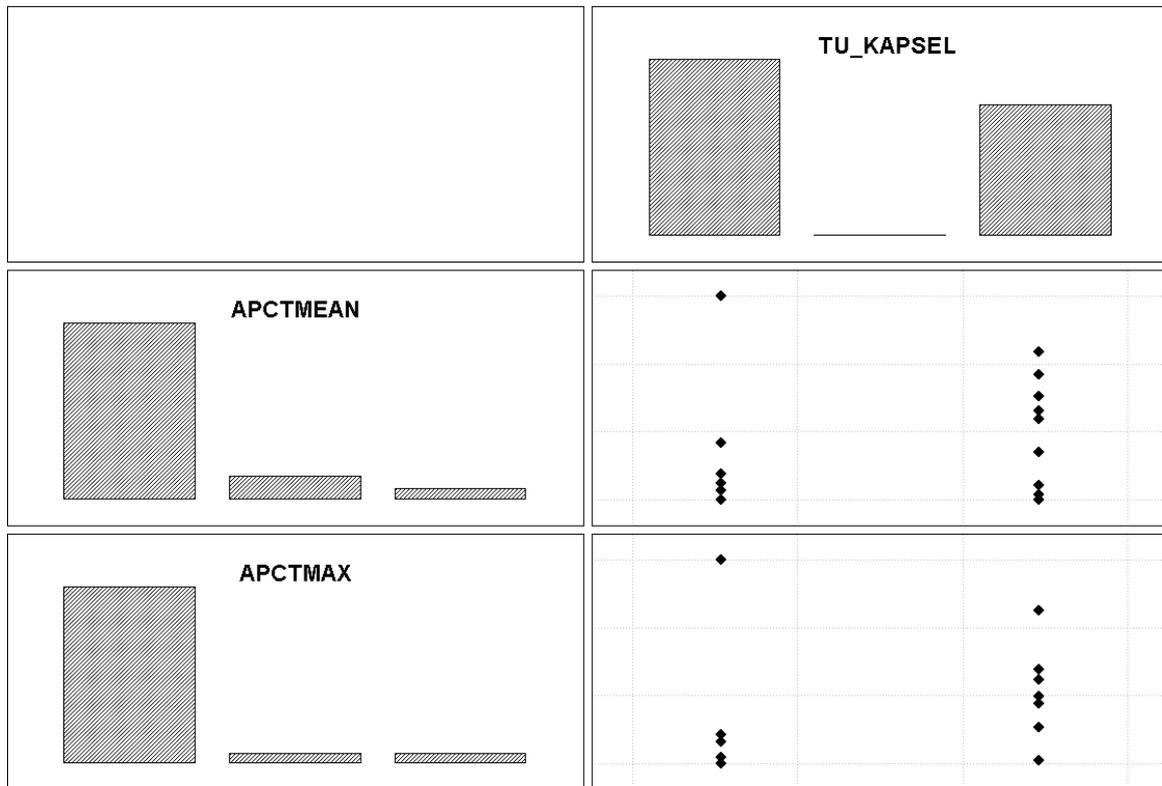


Abbildung 4.23

Tabelle 4-39

		Tumorkapselinvasion	
		nein	ja
APCTMEAQ	Q1	7	2
	Q2	12	6
	Q3	2	7
APCTMAXQ	Q1	7	2
	Q2	12	6
	Q3	2	7

Tabelle 4-40: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
TU_KAPSEL & APCTMEAN	32	0,19	0,31
TU_KAPSEL & APCTMEAQ	32	0,37	0,04
TU_KAPSEL & APCTMAX	32	0,28	0,12
TU_KAPSEL & APCTMAXQ	32	0,39	0,03

4.6.8 Organkapseleinbruch

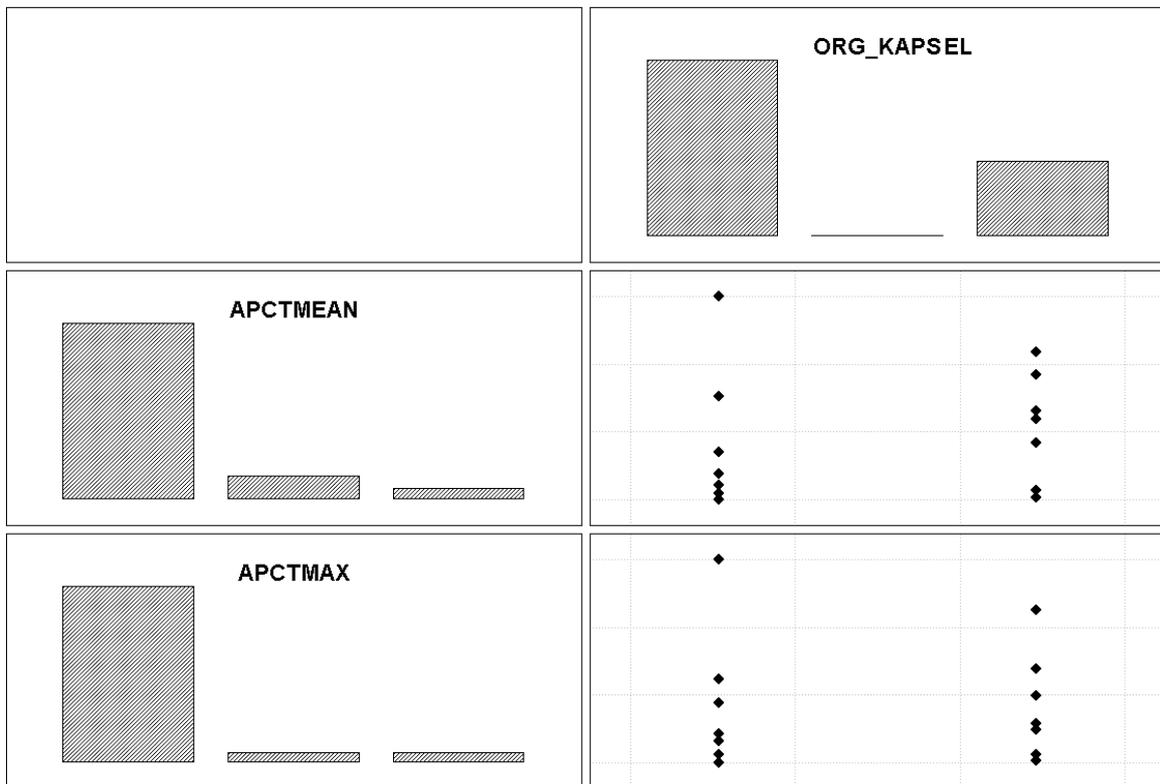


Abbildung 4.24

Tabelle 4-41

		Organkapselinvasion	
		nein	ja
APCTMEAQ	Q1	7	2
	Q2	15	3
	Q3	3	6
APCTMAXQ	Q1	8	1
	Q2	14	4
	Q3	3	6

Tabelle 4-42: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
ORG_KAPSEL & APCTMEAN	36	0,36	0,03
ORG_KAPSEL & APCTMEAQ	36	0,34	0,04
ORG_KAPSEL & APCTMAX	36	0,37	0,02
ORG_KAPSEL & APCTMAXQ	36	0,43	0,01

Sowohl für den Tumorkapsel- als auch für den Organkapsel einbruch bestehen hinsichtlich der Apoptoseraten z.T. recht deutliche Signifikanzen. Die Bedeutung dieser

Korrelationen hinsichtlich möglicher Prognoseabschätzungen wird später erläutert (Kapitel 5.3).

4.7 Ratio Proliferation/Apoptose und klinische Daten

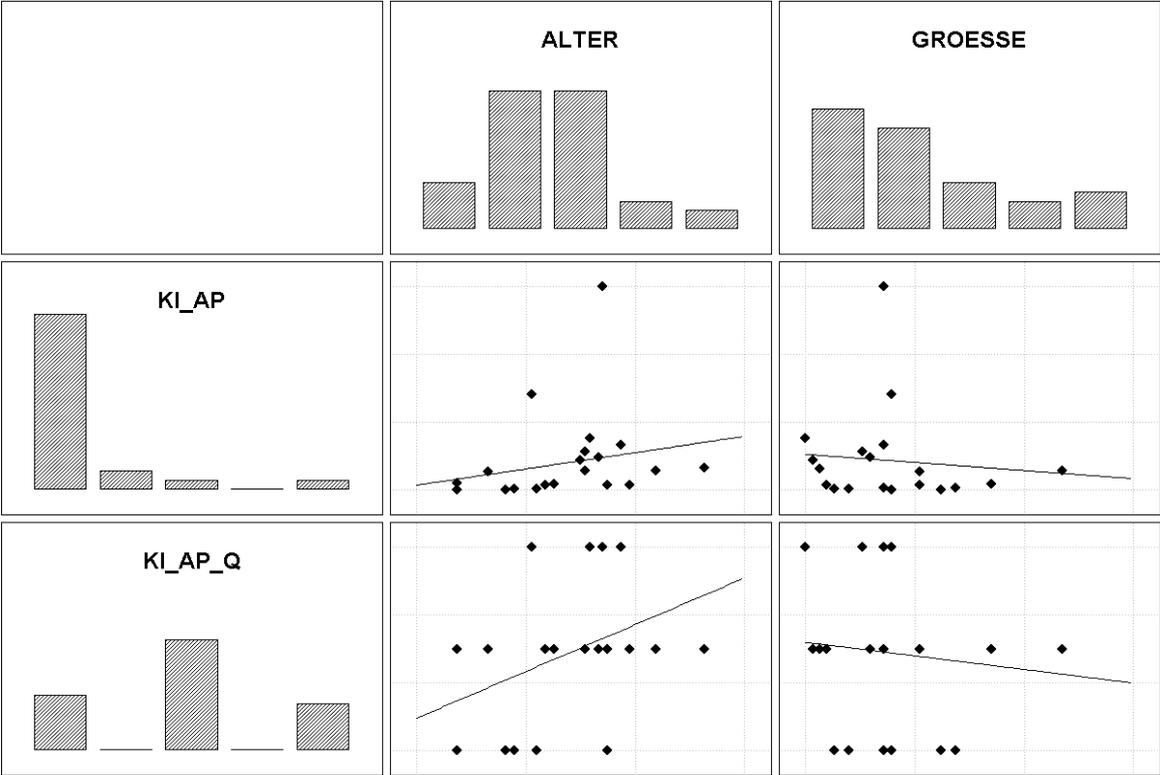


Abbildung 4.25: Alter und Größe

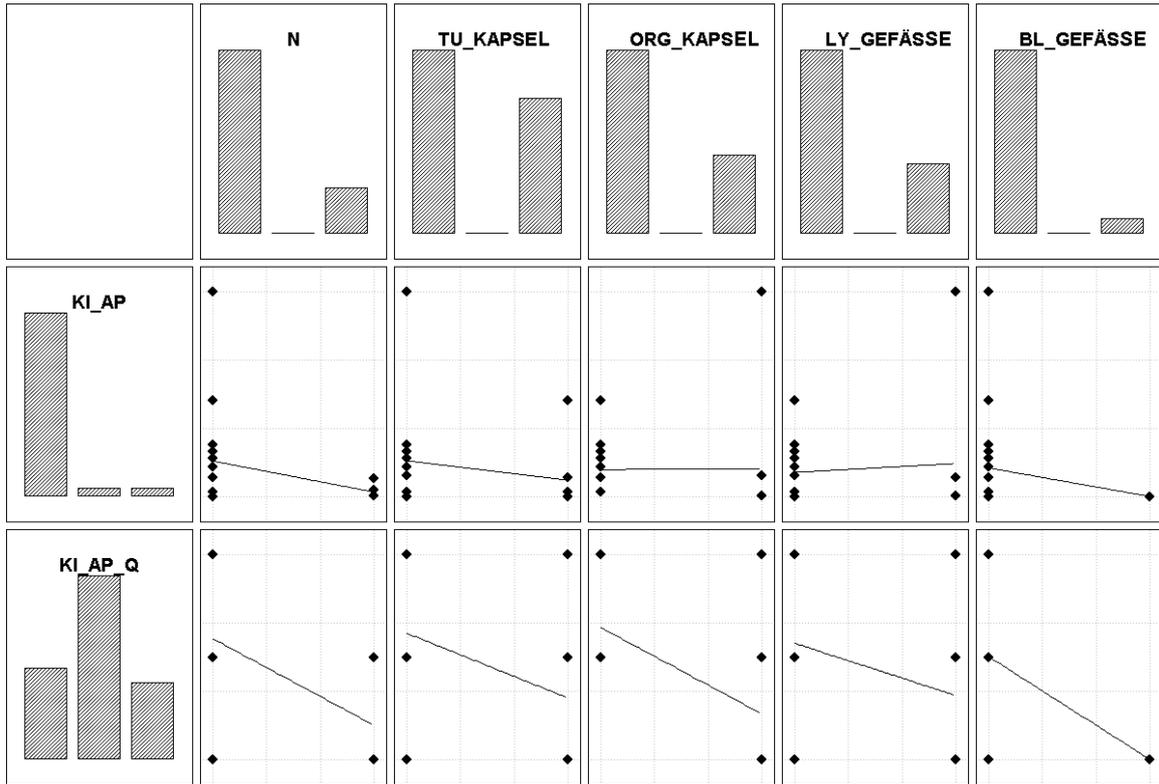


Abbildung 4.26: LK-Status, Tumor- und Organkapselinvasion, Lymph- und Blutgefäßeinbruch

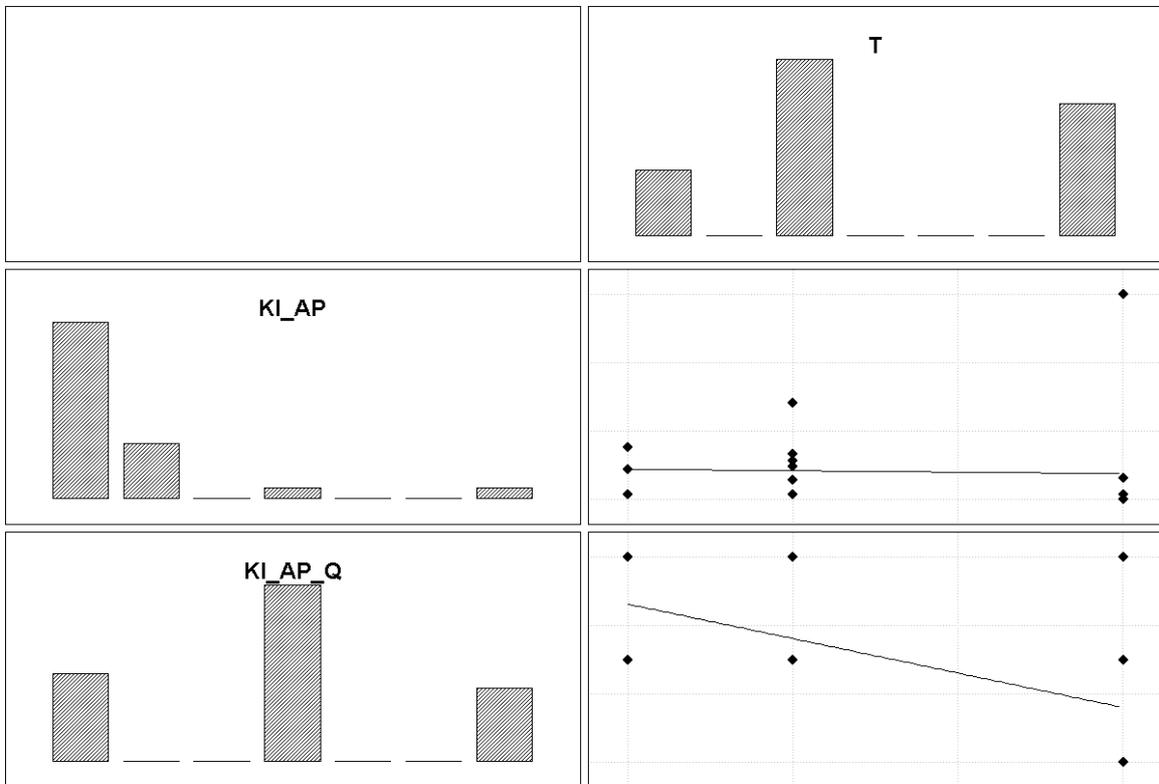


Abbildung 4.27: Tumorstadium

Tabelle 4-43: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman R)

Variablenpaar	gültige N	Spearman R	p-level
ALTER_E & KI_AP	23	0,40	0,06
ALTER_E & KI_AP_Q	23	0,36	0,09
GRÖSSE & KI_AP	21	-0,22	0,33
GRÖSSE & KI_AP_Q	21	-0,18	0,44
T & KI_AP	23	-0,53	0,01
T & KI_AP_Q	23	-0,56	0,01
N & KI_AP	23	-0,52	0,01
N & KI_AP_Q	23	-0,54	0,01
TU_KAPSE & KI_AP	23	-0,37	0,08
TU_KAPSE & KI_AP_Q	23	-0,46	0,03
ORG_KAPS & KI_AP	23	-0,50	0,02
ORG_KAPS & KI_AP_Q	23	-0,60	0,00
LY_GEFÄS & KI_AP	23	-0,25	0,25
LY_GEFÄS & KI_AP_Q	23	-0,35	0,10
BL_GEFÄS & KI_AP	23	-0,35	0,10
BL_GEFÄS & KI_AP_Q	23	-0,30	0,16

Die aus der Proliferations- und der Apoptoserate (jeweils mittlere und maximale) gebildete Ratio zeigt einige, zum Teil höher signifikante Korrelationen zu den klinisch-pathologischen Parametern. Unter der Annahme, dass eine hohe Ratio einem Zellzuwachs in der Summe entspricht, erscheint es jedoch unverständlich, dass bei hohem Tumorstadium und entsprechender Invasivität (Lymphknotenbefall, Kapseleinbruch in Tumor und Organ) eher eine niedrige Ratio gefunden wird. Auf den ersten Blick könnte dies andeuten, dass eine hohe Ratio mit einer guten Prognose korreliert und andersherum. Zu betonen ist auch hier, dass bezüglich Alter und Tumorgröße keine Signifikanz besteht.

4.8 Überlebenswahrscheinlichkeiten

Im Folgenden werden Kaplan-Meier Überlebenskurven gezeigt. Es wird untersucht, inwieweit für unterschiedliche Gruppen signifikant unterschiedliche Überlebenszeiten bestehen. Dabei ist zu beachten, dass es sich nicht um das sogenannte karzinom-spezifische Überleben handelt. Die Sterbedaten wurden nicht hinsichtlich der Todes-

ursachen aufgearbeitet. Insofern ist es nicht sinnvoll, Überlebenskurven in Abhängigkeit von einer Altersgruppierung zu untersuchen.

Zunächst werden die zuvor gebildeten Quantile der gemessenen Werte für eine Kategorisierung herangezogen. Des Weiteren werden die anderen, in Kategorien vorliegenden Parameter, hinsichtlich ihres Zusammenhanges zur Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht. Hierbei werden histomorphologische und klinische Kategorien gewählt.

Zur Anwendung kommen der Wilcoxon-Breslow Test für den Vergleich mehrerer Gruppen und Gehan's Wilcoxon Test für den Vergleich zweier Gruppen.

4.8.1 Gemessene Werte

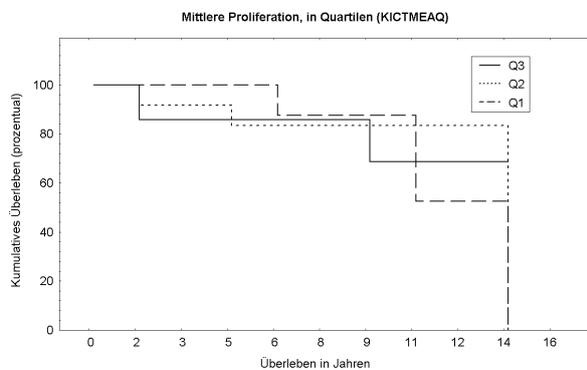


Abb. 4.28: Mittelwert der Proliferation

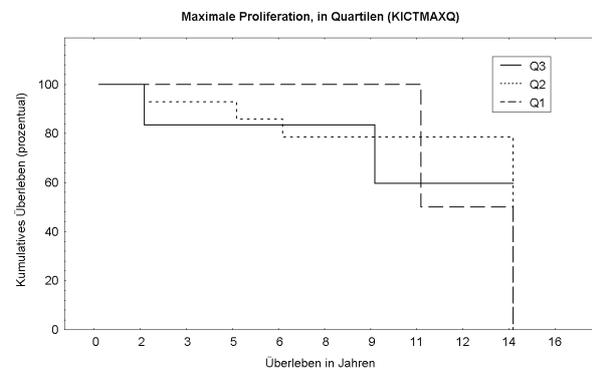


Abb. 4.29: Maximalwert der Proliferation

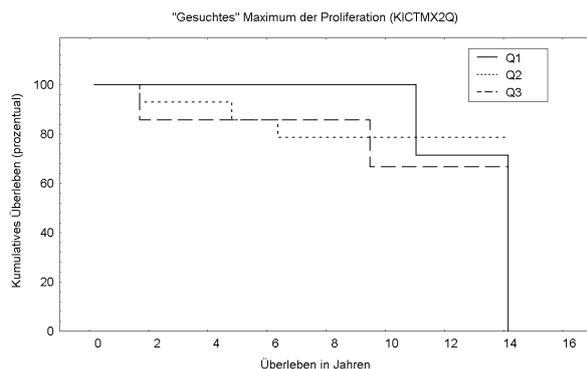


Abbildung 4.30: „Gesuchter“ Maximalwert der Proliferation

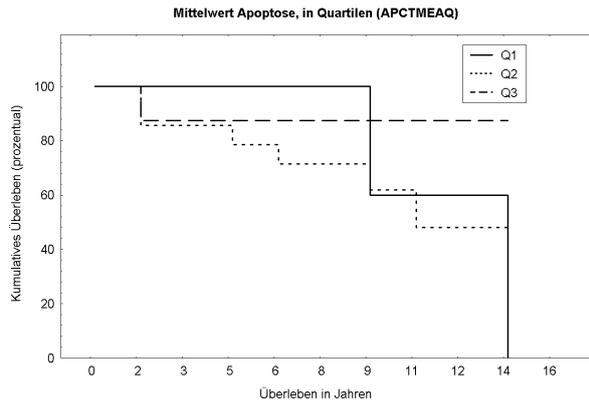


Abb. 4.31: Mittelwert der Apoptose

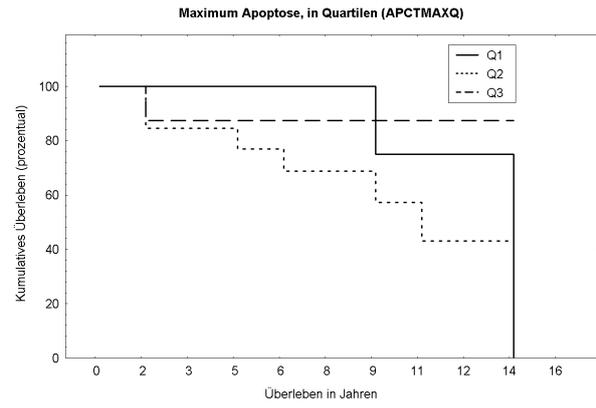


Abb. 4.32: Maximalwert der Apoptose

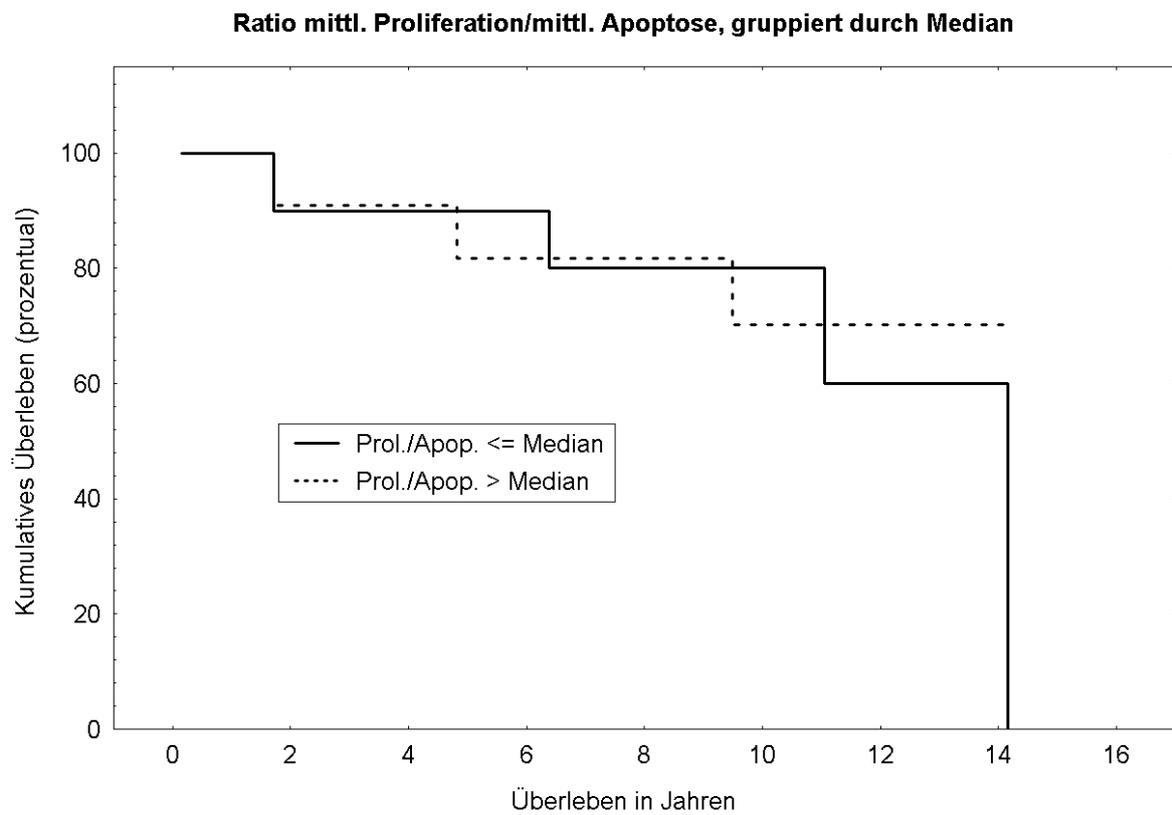


Abbildung 4.33: Ratio mittlere Proliferation/Apoptose, gruppiert durch Median

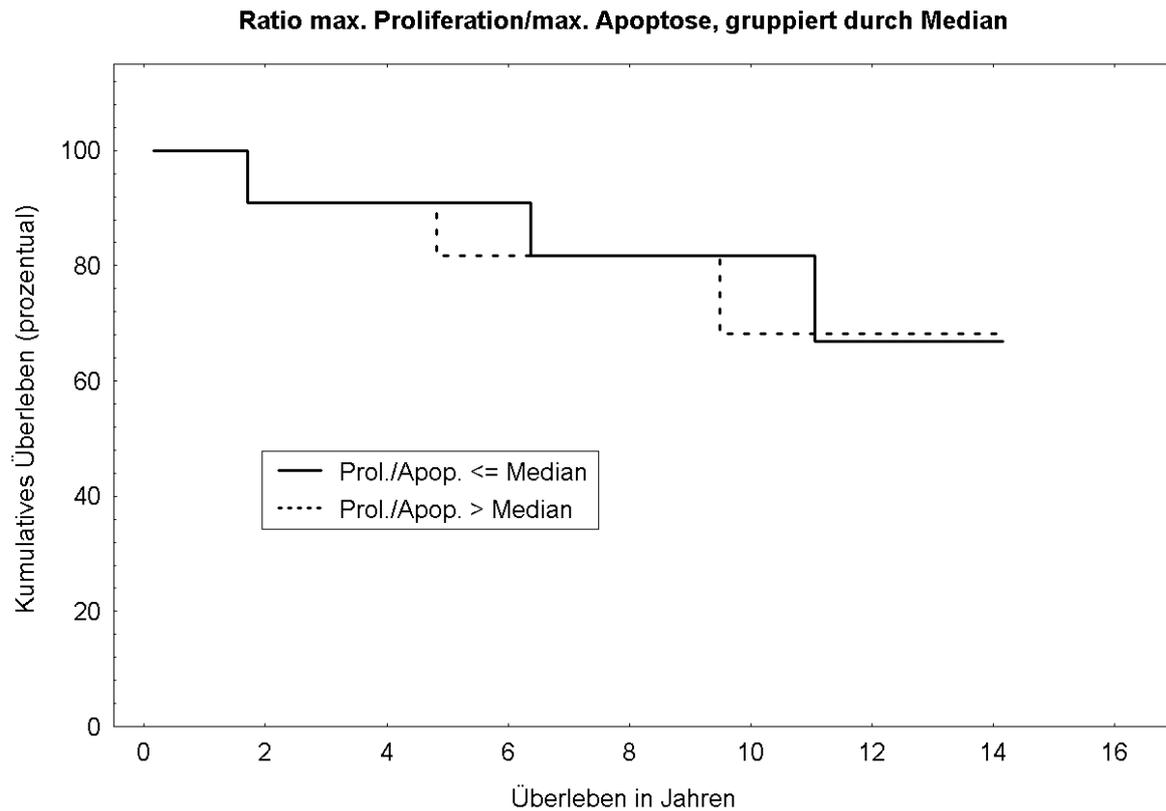


Abbildung 4.34: Ratio maximale Proliferation/Apoptose, gruppiert durch Median

Der optische Eindruck, dass es zwischen der Überlebenswahrscheinlichkeit und den gemessenen Parametern und der Ratio keine Korrelation gibt, bestätigt sich in der nachfolgend tabellarisch aufgeführten Teststatistik und den Signifikanzniveaus. Es lässt sich somit keine direkte prognostische Abschätzung aus den gemessenen Werten bzw. der Ratio ableiten. Auch eine Tendenz lässt sich nicht erkennen, so dass fraglich ist, ob größere Fallzahlen möglicherweise eine andere Aussage bedingen.

Tabelle 4-44

	p-level
KICTMEAQ	0,96
KICTMAXQ	0,56
KICTMX2Q	0,59
APCTMEAQ	0,24
APCTMAXQ	0,22
KI/APQ	0,48
KIMAX/APMAXQ	0,41

4.8.2 Histomorphologische/Klinische Kategorien

Im Folgenden werden die Fälle nach histomorphologischen oder klinischen Parametern kategorisiert. Den graphischen Darstellungen folgen die Teststatistiken. Für die statistisch signifikanten Parameter werden zusätzlich tabellarisch Überlebensraten aufgelistet.

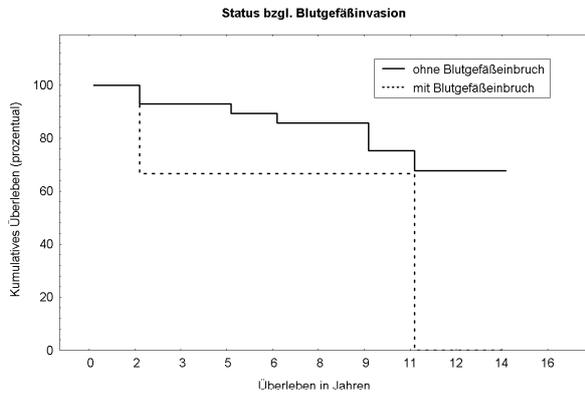


Abb.4.35: Blutgefäßinvasion

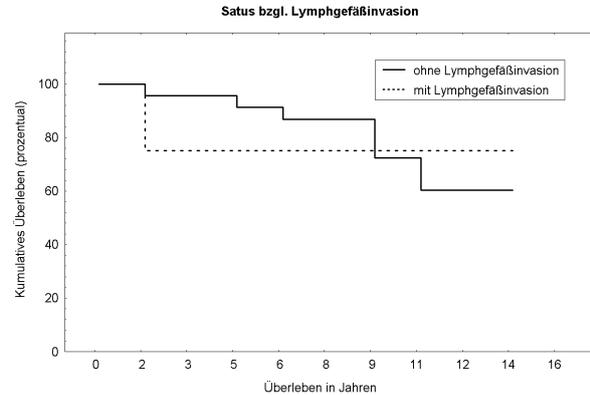


Abb. 4.36: Lymphgefäßinvasion

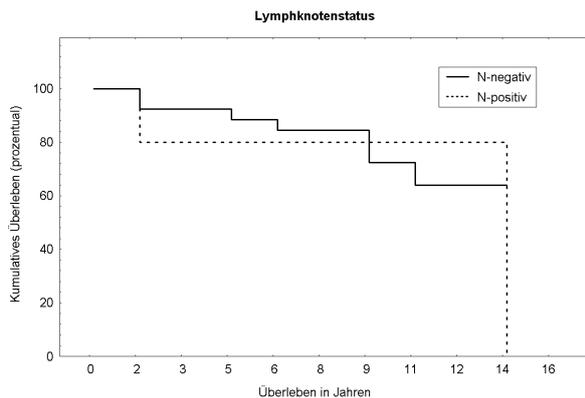


Abb. 4.37: Lymphknotenstatus

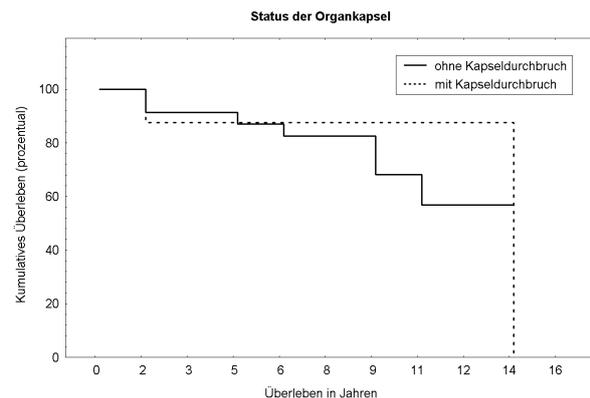


Abb. 4.38: Organkapselinvasion

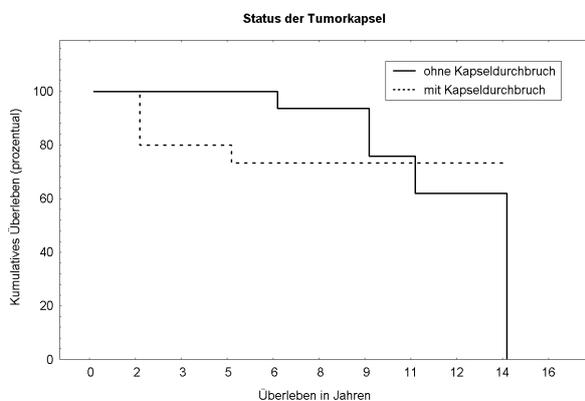


Abb. 4.39: Tumorkapselinvasion

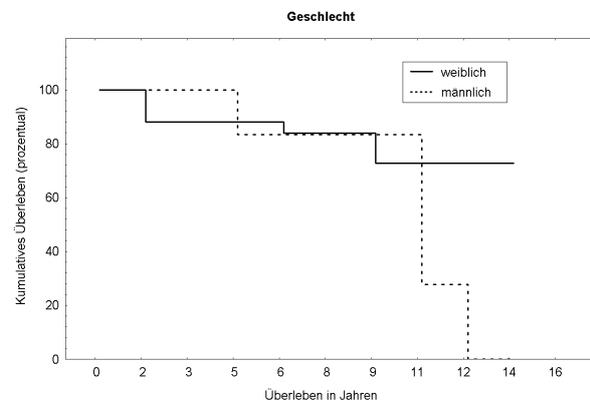


Abb. 4.40: Geschlecht

Tumorgröße durch Median (1,5 cm) kategorisiert

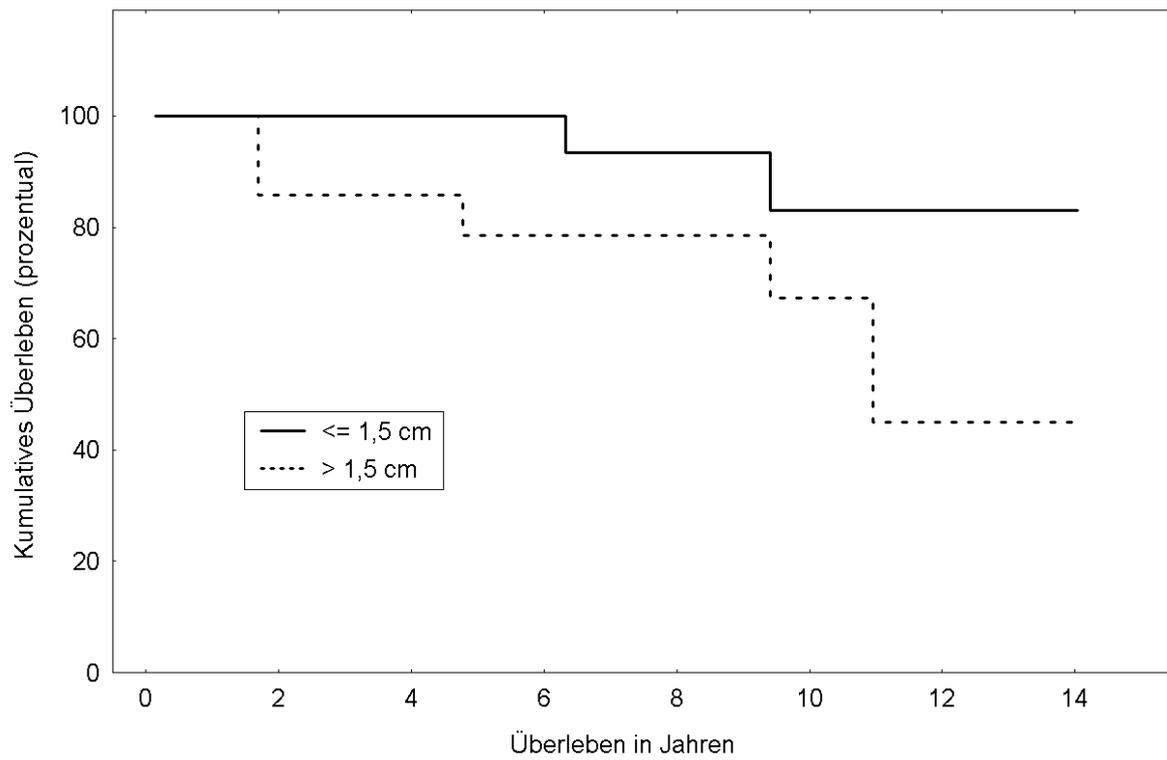


Abbildung 4.41: Tumorgröße, durch Median kategorisiert

Tabelle 4-45

Größe	≤1,5cm	>1,5cm
Anzahl der Patienten	15	14
verstorbene Patienten	2	5
5-Jahres-ÜLW (%)	100	78,6
10-Jahres-ÜLW (%)	83	67,3

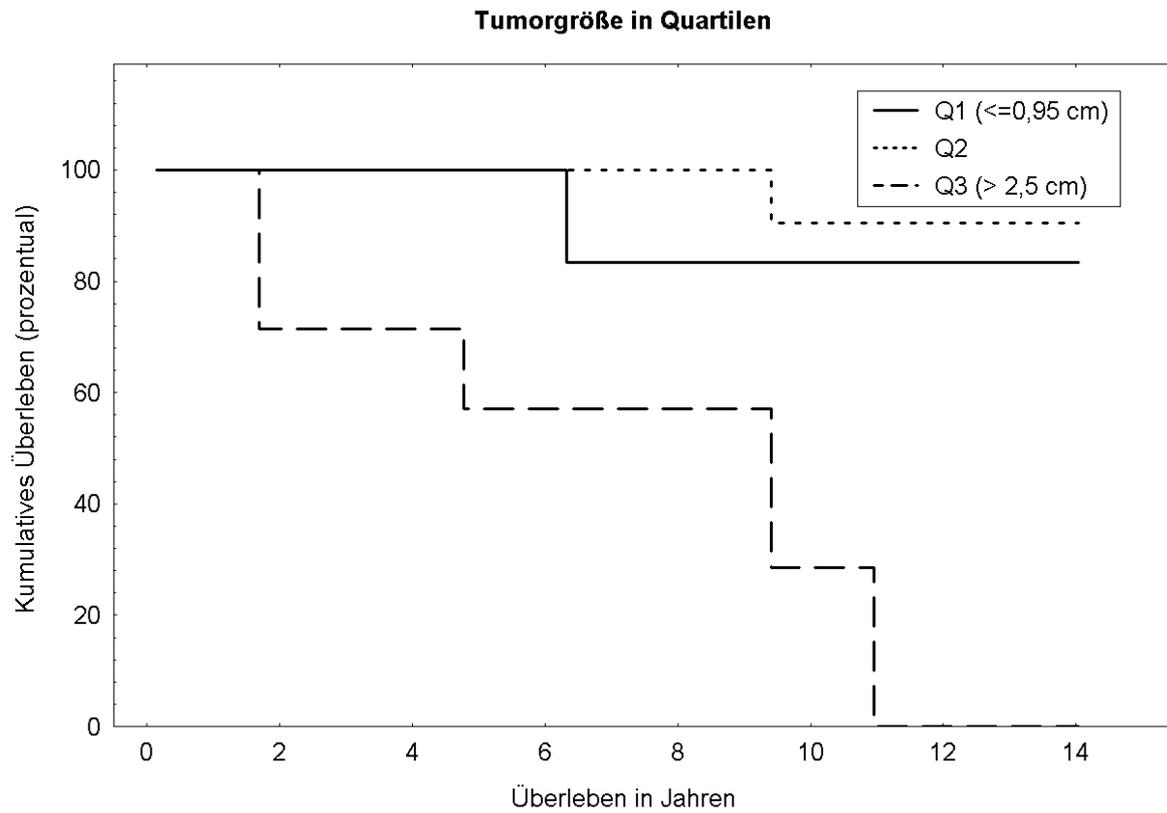


Abbildung 4.42: Tumorgröße, kategorisiert durch Quartile

Tabelle 4-46

Größe	≤0,95cm	>0,95cm; ≤2,5cm	>2,5cm
Anzahl der Patienten	6	16	7
verstorbene Patienten	1	1	5
5-Jahres-ÜLW (%)	100	100	57,1
10-Jahres-ÜLW (%)	83,3	90,5	28,6

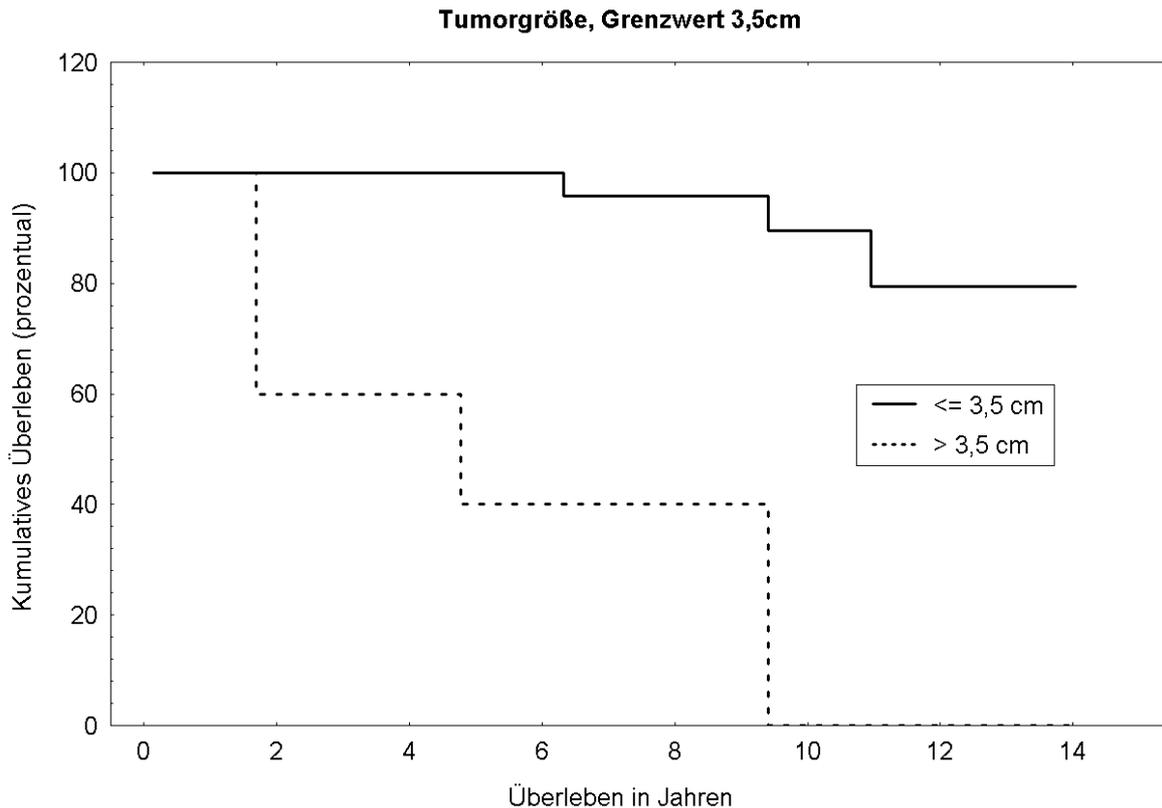


Abbildung 4.43: Tumorgröße, durch 3,5 cm („Literaturwert“) kategorisiert

Tabelle 4-47

Größe	≤3,5cm	>3,5cm
Anzahl der Patienten	24	5
verstorbene Patienten	3	4
5-Jahres-ÜLW (%)	100	40
10-Jahres-ÜLW (%)	89,4	0

Nur bei der Tumorgröße finden sich signifikante Differenzen im Überleben. Es wurde hierzu eine Kategorisierung in zwei Gruppen und drei Gruppen (1:2:1-Quartile) durchgeführt. Als Grenze wurde zum einen der Median und als weitere Grenze (die in der Diskussion erläutert wird) eine Größe von 3,5 cm gewählt.

Die Tabelle 4-48 bestätigt darüber hinaus den auch optisch vorherrschenden Eindruck fehlender signifikanter Unterschiede für die aufgeführten Gruppen. Dies verwundert, da man für diese zum Teil „typischen“ Malignitätskriterien einen Zusammenhang mit der Prognose erwarten würde. Erklärbar ist dies am ehesten dadurch, dass die Prognose des papillären Schilddrüsenkarzinoms insgesamt relativ gut ist

und sich eventuelle kleinere Unterschiede statistisch erst bei deutlich größeren Fallzahlen bemerkbar machen würden.

Tabelle 4-48

	p-Level
Blutgefäß-invasion	0,22
Lymphgefäß-invasion	0,32
Lymphknoten-Status	0,50
Organkapsel	0,23
Tumorkapsel	0,16
Geschlecht	0,44
Tumorgröße (Median)	0,07
Tumorgröße (3,5 cm)	0,00
Tumorgröße (1:2:1-Quartile)	0,00

4.9 Proliferation im papillären Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu anderen Entitäten

Nachfolgend werden die Werte für die Proliferation im papillären Karzinom mit denen in normalem Schilddrüsengewebe, follikulären Adenomen und follikulären Karzinomen verglichen. Die graphische Darstellung erfolgt in Box-Whisker-Plots. Die statistischen Parameter werden tabellarisch aufgeführt. Zur Anwendung kommt der Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben. Die Daten für die anderen Gewebearten wurden auf die gleiche Weise am Bild-Zytometer ermittelt.

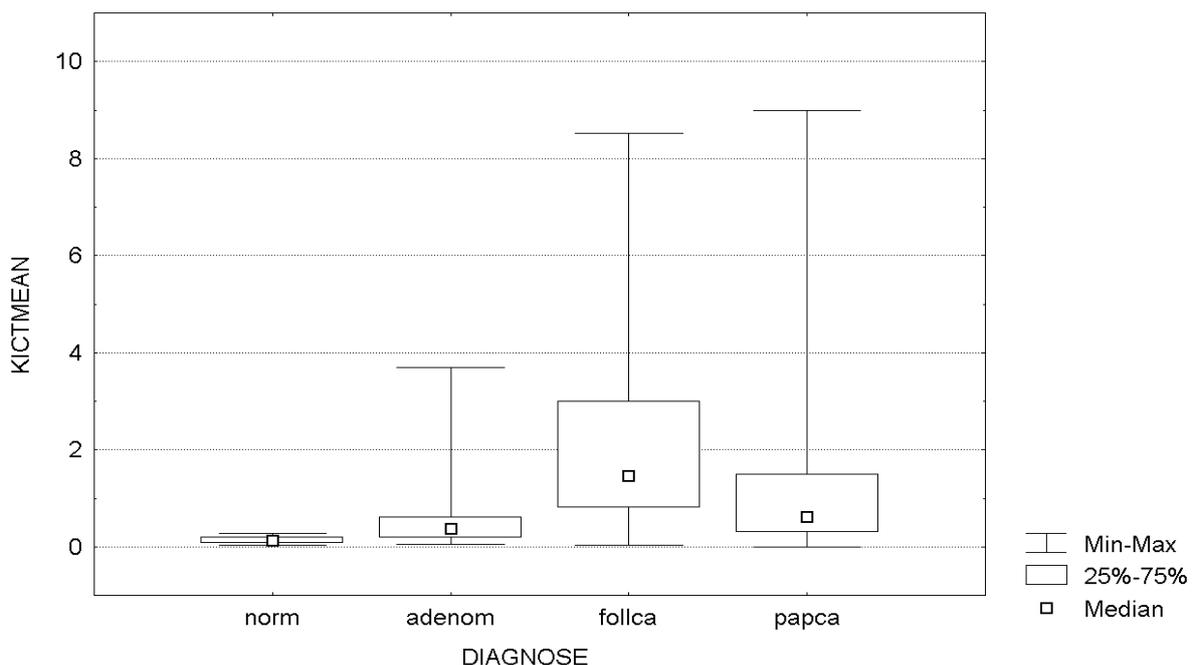


Abbildung 4.44: Mittlere Proliferationsrate

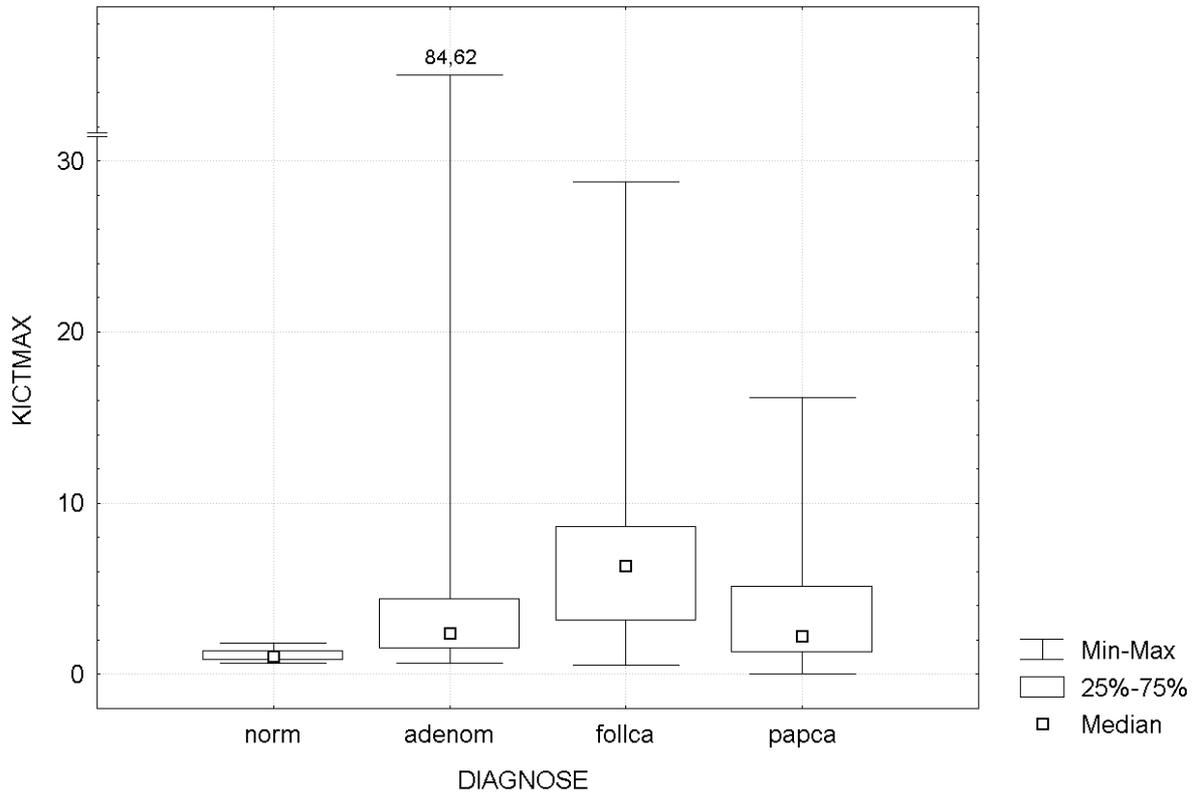


Abbildung4.45: Maximalwerte der Proliferation

Tabelle 4-49: Signifikanzniveau der Tests (U-Test)

Papca vs.	norm	adenom	follca
KICTMEAN	0,00	0,04	0,04
KICTMAX	0,00	0,43	0,00
KICT_TOT	0,00	0,00	0,00

Die Tabelle zeigt, dass sich die Proliferationswerte in papillären Karzinomen von denen in normalem Schilddrüsengewebe hochsignifikant unterscheiden. Bei den Maximalwerten gilt dies in besonderem Maße auch für die Abgrenzung zu den Adenomen. In Relation zum follikulären Karzinom findet sich statistisch zwar Signifikanz bei den Mittelwerten, die Abbildungen offenbaren jedoch die weite Überlappung der für den jeweiligen Tumor ermittelten Werte.

4.10 Follikuläre Variante des papillären Karzinoms (FVPC) versus follikuläres Karzinom (FC)

Die folgenden Untersuchungen sollen die Unterschiede zwischen follikulären Karzinomen (FC) und der follikulären Variante des papillären Karzinoms (FVPC) aufzeigen. Da für die FC nur die Parameter mittlere und maximale Proliferation und Gesamtkernzahl vorliegen, können nur diese für den Vergleich herangezogen werden.

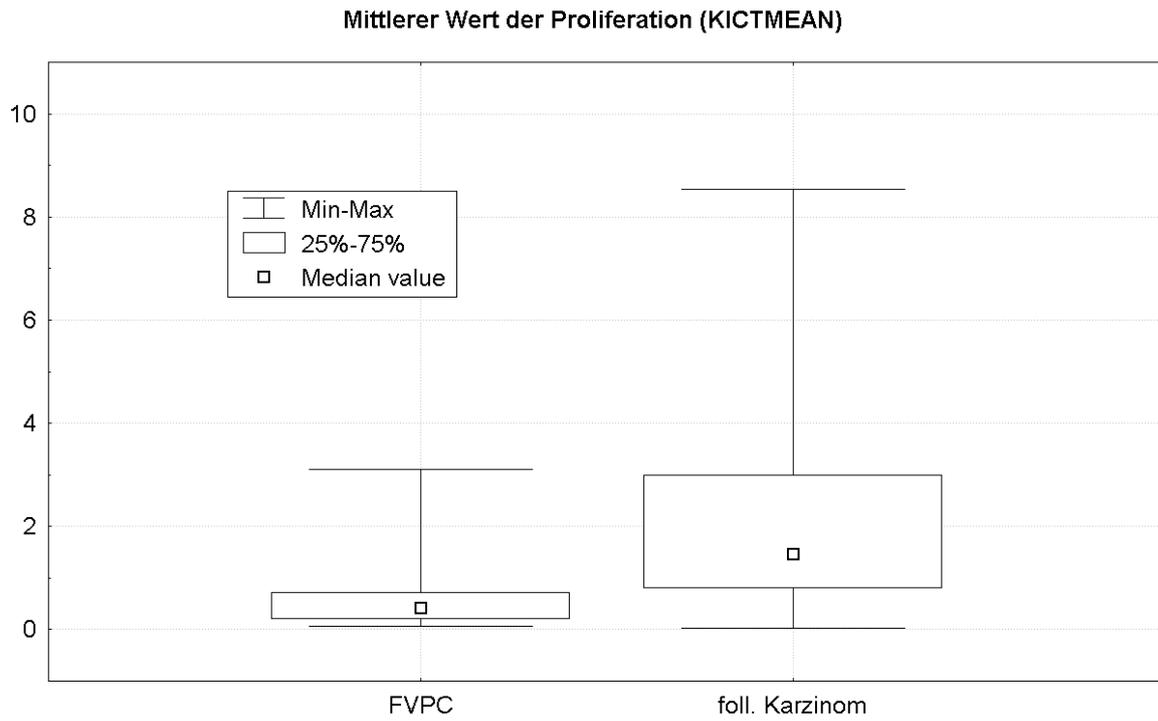


Abbildung 4.46: Mittelwert der Proliferation

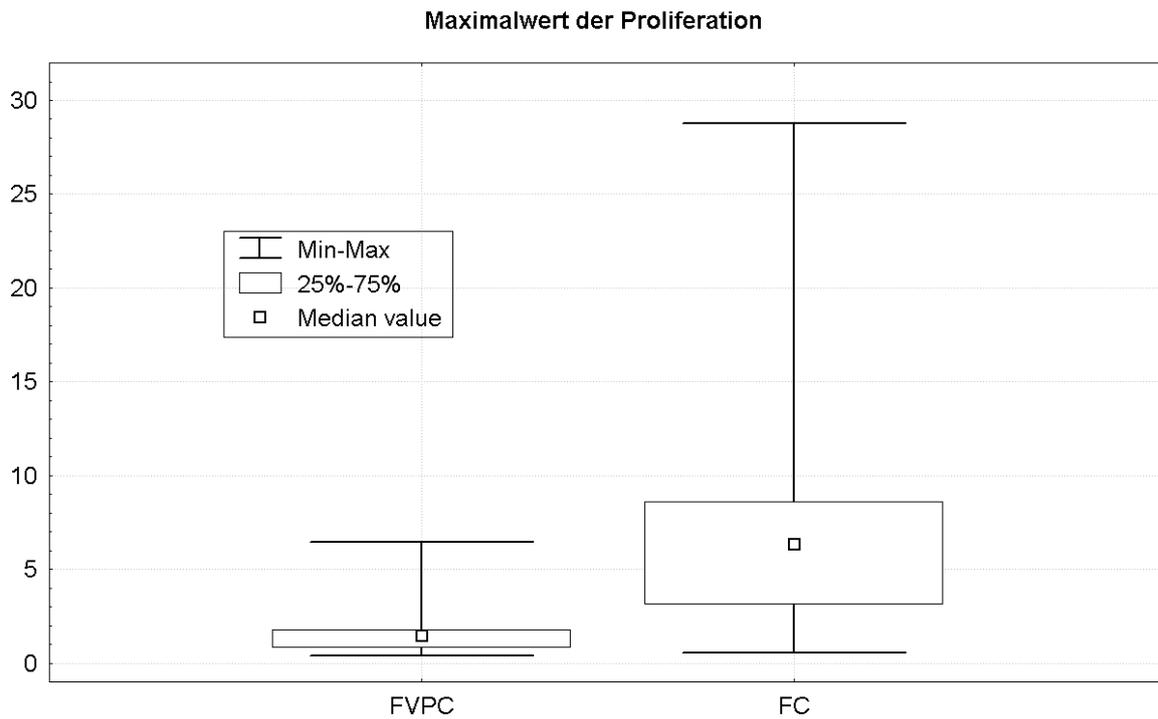


Abbildung 4.47: Maximalwert der Proliferation

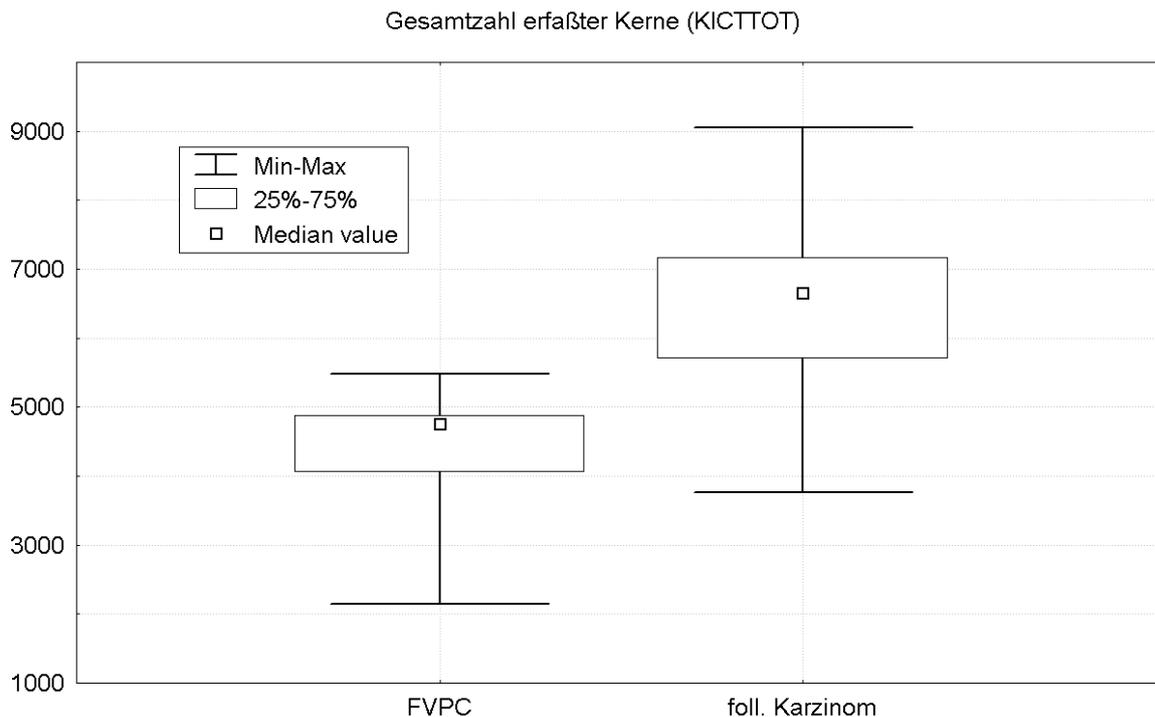


Abbildung 4.48: Gesamtzahl der Kerne

Tabelle 4-50: Teststatistik (U-Test)

	p
KICTMEAN	0,01
KICTMAX	0,00
KICT_TOT	0,00

Es zeigen sich zum Teil hohe statistische Signifikanzen bei der Betrachtung der Proliferationsparameter. Die Graphik verdeutlicht jedoch auch einen weiten Bereich der Überlappung, eine praktikable Möglichkeit zur Differenzierung ergibt sich hieraus nur bedingt (s.u.). Bezüglich der Gesamtzahl ist zu ergänzen, dass allein durch die Dicke der Schnitte die Gesamtzahl der Kerne bereits beeinflusst werden kann und daher diese Größe für einen Vergleich nicht herangezogen werden sollte.

4.11 Follikuläre Variante des papillären Karzinoms (FVPC) versus papilläres Karzinom (PC)

Zwar spielt diese Unterscheidung für den weiteren therapeutischen Verlauf keine unmittelbare Rolle, jedoch erfolgt die Untersuchung, um gegebenenfalls Aufschluss darüber zu gewinnen, ob sich follikuläre und (überwiegend) papilläre Wachstumsmuster auch in der Proliferation und der Apoptose widerspiegeln.

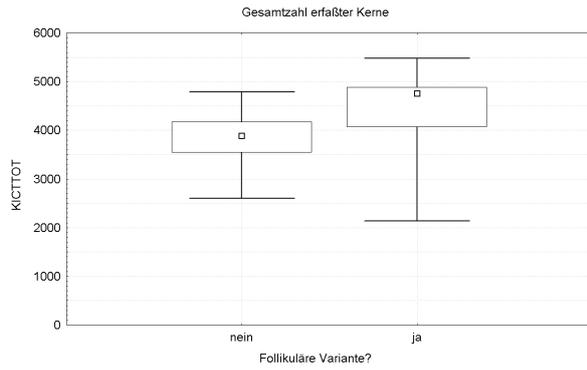


Abbildung 4.49: Gesamtzahl der Kerne (Ki-67)

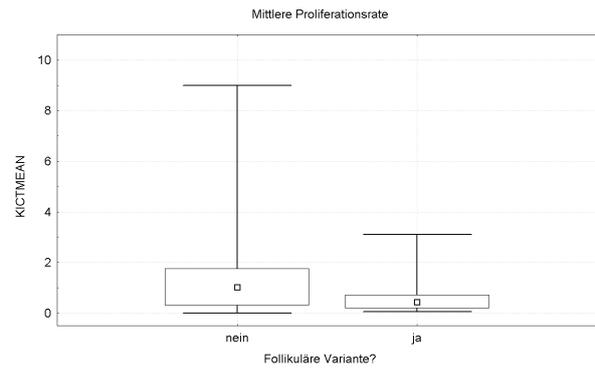


Abbildung 4.50: mittlere Proliferationsrate

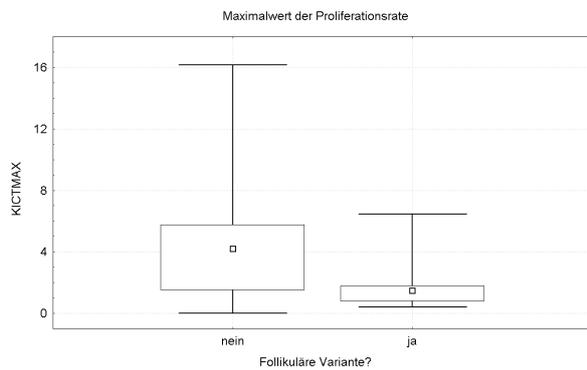


Abbildung 4.51: maximale Proliferationsrate

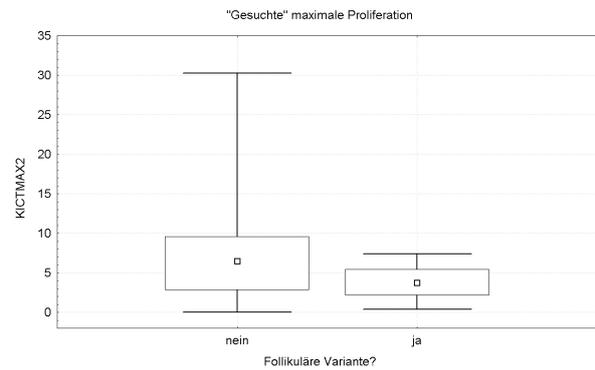


Abbildung 4.52: „gesuchte“ maximale Proliferationsrate

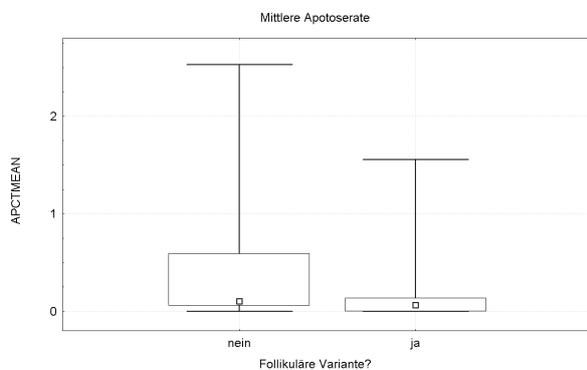


Abbildung 4.53: mittlere Apptoserate

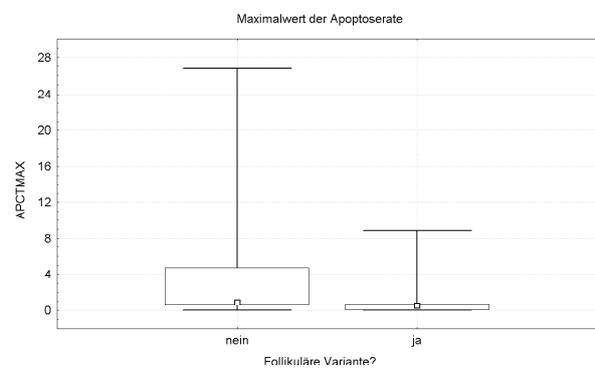


Abbildung 4.54: maximale Apptoserate

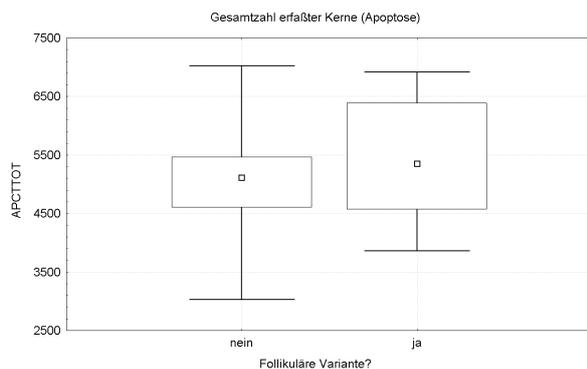


Abbildung 4.55: Gesamtzahl der Kerne (Apoptose)

Tabelle 4-51: Signifikanzniveaus (U-Test)

	p
KICT_TOT	0,00
KICTMEAN	0,13
KICTMAX	0,03
KICTMAX2	0,15
APCT_TOT	0,33
APCTMEAN	0,19
APCTMAX	0,05

Zwar finden sich nur für die Gesamtkernzahl und den Maximalwert der Proliferation in der Teststatistik eine Signifikanz, jedoch fällt graphisch auf, dass sowohl für die Apoptose als auch für die Proliferation bei der folliculären Variante kleinere Werte ermittelt wurden. Bei der Zelldichte wiederum finden sich hier die etwas größeren Werte.

5 Diskussion

Das Ki-67-Antigen ist im Kern aller proliferierenden Gewebe nachweisbar. Nach der Mitose wird das Antigen mit einer Halbwertszeit von 60 bis 90 Minuten rasch abgebaut, so dass es in Zellen, die sich nicht teilen, praktisch nicht nachweisbar ist (17,18). Nach der Erstbeschreibung des Antigens durch Gerdes 1983 war es zunächst nur in Gefrierschnitten nachweisbar. Durch die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers MIB-1 wurde es später möglich, ein formalinresistentes Epitop des Antigens auch in routinemäßig fixiertem Gewebe nachzuweisen. Mittlerweile hat die quantitative Bestimmung des Ki-67-Antigens mittels MIB-1-Antikörper zum Nachweis proliferierender Zellen einen festen Stellenwert in der klinisch-pathologischen Forschung sowie in bestimmten Fragestellungen auch in der Routinediagnostik. Mehrere tausend Publikationen existieren, die sich vornehmlich mit der Beziehung zwischen immunhistologischen Eigenschaften und klinischen Daten beschäftigen. In deutlich geringerem Ausmaß ist auch heute noch die nicht geklärte biologische Bedeutung des Antigens Gegenstand der Forschung.

Die Rolle der Apoptose in der Bewertung maligner Gewebeveränderungen hat bisher in der Diagnostik einen weniger hohen Stellenwert. Insbesondere bezüglich differenzierter Schilddrüsenkarzinome liegen bis heute nur wenige Veröffentlichungen vor. Die im Kapitel 2.2 näher erläuterte Methode ist heute ebenso wie der Nachweis des Ki-67-Antigens aber gut etabliert und standardisiert (19,20).

Die Methoden der Quantifizierung unterscheiden sich in der Vielzahl der Veröffentlichungen jedoch erheblich. Meist wird manuell gezählt, häufig auch nur semiquantitativ gruppiert. In der vorliegenden Arbeit wird ein an der RWTH Aachen mit entwickeltes, TV-Bild analysierendes Computersystem genutzt, mit dessen Hilfe es gelingt, eine sehr hohe Anzahl von Kernen zu erfassen, um damit größtmögliche Reproduzierbarkeit und Aussagekraft zu erzielen.

Im Bereich der Schilddrüsenpathologie, speziell des dort häufigsten malignen Tumors, dem papillären Schilddrüsenkarzinom, wäre es wünschenswert, mittels der genannten Methoden die diagnostische Sicherheit erhöhen zu können. Andererseits wären Aussagen bezüglich der Prognose des einzelnen Tumors für die weitere Behandlung hilfreich und darüber hinaus von Interesse für den Patienten.

5.1 Güte der Messungen

5.1.1 In sich

Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, zeigen die Messwerte einige Eigenschaften, welche die Güte der Methode unterstreichen. Dies ist zum einen die Unabhängigkeit des Färbe-Index von der Gesamtzahl der erfassten Zellkerne (KI-67: $r=-0,1123$, $p=0,540$; Apoptose: $r=0,102$, $p=0,555$). Demgegenüber steht die Tatsache, dass die Gesamtzahl und –fläche der gemessenen Zellkerne sich in den voneinander unabhängigen Messreihen für die Proliferation und die Apoptose zum Teil recht erheblich unterscheiden. Da es sich jeweils um „angrenzende“ Schnitte aus gleichen Blöcken handelt, sollte man zumindest ähnliche Werte erwarten. Die Graphiken für das Verhältnis der Werte und die Differenzen zeigen jedoch erhebliche Abweichungen von dieser Erwartung. Die entsprechende Teststatistik zeigt zwar eine deutliche Signifikanz, der Korrelationskoeffizient von 0,56 bzw. 0,59 liegt dagegen doch recht deutlich unterhalb einer im Prinzip bei Folgeschnitten zu erwartenden Korrelation von etwa $> 0,9$.

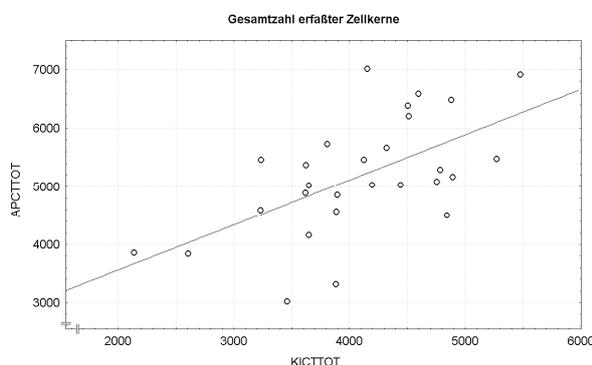


Abbildung 5.1: Kernzahl

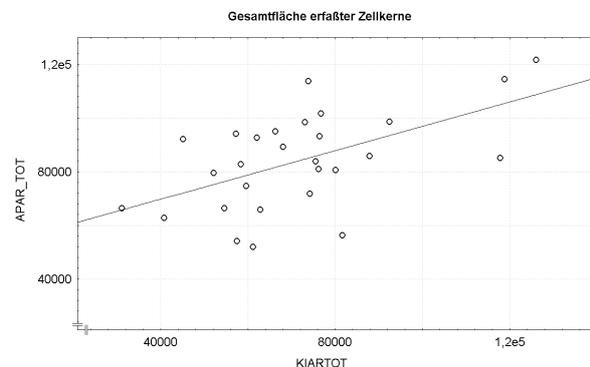


Abbildung 5.2: Kernfläche

Tabelle 5-1: Relation der erfassten Kernzahlen bzw. Kernflächen bei Proliferation und Apoptose

	Pearsons r	p-Niveau
KICTTOT vs. APCTTOT	0,59	0,00
KIARTOT vs. APARTTOT	0,55	0,00

Eine plausible Erklärung erschließt sich nicht auf Anhieb. Ursächlich könnte sein, dass die Zelldichte innerhalb der Tumore nicht in sich homogen ist, sondern deutlich wechselt und bei der Wahl der 20 Gesichtsfelder innerhalb des Tumors unterschiedlich dichte Areale erfasst wurden.

5.1.2 Frühere methodische Untersuchungen

Weitere Aussagen über die Güte der Meßmethode lassen sich aus einer am Institut für Pathologie der RWTH Aachen erstellten Habilitationsschrift von S. Biesterfeld (1998) ableiten. Hier wird ausführlich auf die Reliabilität der Methode eingegangen. Unter anderem wurde herausgearbeitet, dass sich für den Vergleich der Messergebnisse nach 20 und nach 40 Gesichtsfeldern eine so deutliche Korrelation ($r=0,999$, $p<0,001$) ergibt, dass eine weitere Erhöhung der gemessenen Gesichtsfelder in keiner Relation zu einem Zugewinn an Aussagekraft führt.

Auch wurden immunhistometrisch ermittelte Daten mit denen aus manueller Auszählung entsprechend großer Proben verglichen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Mittelwerten nach Immunhistometrie und manueller Zählung betrug, basierend auf 231 Paarvergleiche an Mammakarzinomen für die Proliferation (MIB-1 bzw. PCNA) $0,881$ ($p<0,001$).

5.1.3 Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren

In vielen mittlerweile veröffentlichten Untersuchungen bezüglich differenzierter Schilddrüsenkarzinome werden ebenfalls die Färbe-Indices für die Proliferation (MIB-1), weniger häufig auch für die Apoptoserate nach der TUNEL-Methode angegeben. In der nachfolgenden Tabelle werden diese aufgeführt. Dabei finden sich nur Ergebnisse manueller Auszählung. Nur zum Teil wurden in den jeweiligen Artikeln zur Methodik konkrete Hinweise über die Anzahl der erfassten Gesichtsfelder gegeben. Auch wird teilweise nicht angegeben, ob zum Beispiel nur die Regionen höchster Dichte an positiv gefärbten Kernen gezählt wurden. Soweit ersichtlich wurden diese Einschränkungen mit in die Tabelle eingearbeitet.

Tabelle 5-2: Mittlerer Färbeindex MIB-1 in papillären Schilddrüsenkarzinomen (in Prozent)

Autor	N	Mittelwert Standardabweichung	+/-	Spannweite	Bemerkung
Eigene (1999)	32	1,32	+/- 1,84	0,00-8,98	Histometrie
(21)	11	1,91	+/- 1,45	1,00-6,00	manuelle Zählung (MZ)
(22)	30	Median 1,9		k.A.	MZ
(23)	39	1,1	+/- 0,7	0,1 – 3,5	MZ, inkl. 2 follikulärer Karz.

(24)	94	1,83	0,00 – 9,92	MZ
(25)	42	3,1 +/- 2,9	k.A.	MZ
(26)	56	2,50	k.A.	MZ
(27)	7	1,6 +/- 0,92	0,2 – 2,8	MZ

Tabelle 5-3: Maximaler Färbeindex im Präparat, MIB-1 in papillären Schilddrüsenkarzinomen („gesucht“; in Prozent)

Autor	N	Mittelwert Standardabweichung	+/-	Median	Spannweite	Bemerkung
Eigene (1999)	32	6,80	+/- 6,52	5,03	0,00 – 30,23	Histometrie, Region mit maximaler positiver Färbung
(28)	22	8,6	+/- 1,0	k.A.	k.A.	MZ, Region mit maximaler positiver Färbung
(29)	38	k.A.		5,2	0,17 – 24,56	MZ, Region mit maximaler positiver Färbung
(30)	34	29,36	+/- 4,93	k.A.	11,7 – 35,3	MZ
(31)	19	n=7	1-10%	k.A.	k.A.	MZ, Ergebnisse nur in Kategorien
		n=9	11-25			
		n=3	26-50			

Insgesamt sind im Vergleich zu vielen anderen Karzinomen, bei denen sich mittlere Proliferationsraten von z.T. deutlich über 10%, bei Magenkarzinomen sogar von > 50% zeigen (Mihalcea, 2001), bei papillären Schilddrüsenkarzinomen im Grunde unisono sehr geringe Werte angegeben; auch bei den Maximalwerten werden offenbar nur selten Werte von bis zu 30% erreicht. Die Ergebnisse von Dzieciol (30) weichen hier etwas ab; offenbar lag in der dort vorgelegten Studie in vielen Fällen ein hochproliferativer Tumorfokus vor, was sich aus unserer Sicht nicht gleichartig darstellte.

Für die Apoptoseraten in papillären Schilddrüsenkarzinomen lassen sich nur wenige Vergleichszahlen finden. Lediglich Basolo und Yoshida veröffentlichten 1997 und 1999 Zahlen für den entsprechenden Färbeindex. Diese gleichen im Mittelwert bei Yoshida in etwa den vorliegenden Daten, jedoch streuen sie deutlich weniger. Die

Ergebnisse von Basolo liegen um den Faktor 1,85 niedriger und streuen auch weniger.

Tabelle 5-4: Mittlerer Färbeindex Apoptose in papillären Schilddrüsenkarzinomen (in Prozent)

Autor	N	Mittelwert +/- Standardabweichung	Spannweite	Bemerkung
Eigene (1999)	36	0,37 +/- 0,6	0 – 2,53	Histometrie, TUNEL
(23)	39	0,4 +/- 0,3	0,1 – 1,2	MZ, TUNEL
(25)	42	0,2 +/- 0,2	0 – 0,8	MZ. TUNEL

Die in der Literatur gefundenen Angaben zur Ratio Proliferation/Apoptose beim papillären Karzinom sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die von Biesterfeld et al. 2003 veröffentlichten Werte basieren dabei auf den Daten der vorliegenden Arbeit. Aus dieser Arbeit wurden die Werte für das follikuläre Karzinom angegeben, um zu verdeutlichen, dass Yoshidas (23) trotz der Vereinigung der Subgruppen deutlich unterhalb der eigenen Ergebnisse liegt.

Tabelle 5-5: Ratio Proliferation/Apoptose

Autor	N	Mittelwert +/- Standardabweichung	
Eigene (1999)	36	13,26 +/- 21,71	nur pap. Karzinom
(23)	39	4,4 +/- 4,0	pap. und foll. Karz..
(25)	42	15,2	nur pap. Karzinom
(32)	32	14,7 +/- 21,9	nur foll. Karz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Werte der vorliegenden Arbeit mit denen aus den meisten anderen Untersuchungen ähnlichen Ansatzes gut in Einklang zu bringen sind, jedoch deutet die recht deutliche Streuung darauf hin, dass biologische und ggf. auch methodische Varianten zu berücksichtigen sind. Allerdings kann diesem Umstand auf dem Sektor des Methodischen dadurch begegnet werden, dass innerhalb eines Institutes eine präzise Festlegung der methodischen Vorgehensweise definiert wird und darüber hinaus eine Eichung mittels Vergleichen mit manueller Auszählung erfolgt. Mit diesem Vorgehen lässt sich eine entsprechende Genauigkeit in der Quantifizierung mittels TV-Bild-Analyse erreichen.

Andere Autoren verglichen den Quotienten Proliferation/Apoptose mit den klinischen Daten (23). Ihnen gelang es ebenso wenig, wie in der vorliegenden Arbeit, signifikan-

te Korrelationen darzustellen. Die von Yoshida festgestellte Tendenz eines Zusammenhangs zum Alter und zur Größe kann anhand der eigenen Daten nicht bestätigt werden (Alter: $r=0,397$, $p=0,061$ und Größe: $r=-0,222$, $p=0,333$). Das Ergebnis von Kjellmann (2003) lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht bestätigen (s.u.).

5.2 Diagnostische Relevanz

5.2.1 Sensitivität und Spezifität

Die Identifizierung von differenzierten Karzinomen in Schilddrüsenresektaten gelingt nicht in allen Fällen. Dabei scheint die Differenzierung zwischen follikulärem Adenom und mikroinvasivem follikulärem Karzinom weiterhin ein führendes Problem zu sein (33), ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die nur begrenzten Möglichkeiten der immunhistometrischen Bestimmung der Proliferationsrate (und zum Teil der Apoptoseraten) für diese Abgrenzung wurde in mehreren Arbeiten dargestellt (21,23,34-38). So stellen diese Parameter zwar eine Hilfestellung dar, jedoch ist die Abgrenzung nicht soweit möglich, dass sich eine Implementierung dieses Verfahrens in die Routine bisher gelohnt hätte.

Papilläre Karzinome stellen in ihrer Erkennung in vielen Fällen sicherlich kein Problem dar, man könnte jedoch die diagnostische Sicherheit erhöhen. So konnte gezeigt werden, dass der immunhistochemische Nachweis von HBME-1 nahezu beweisend für das Vorliegen einer Malignität ist (39). Weder noduläre Hyperplasien noch follikuläre Adenome zeigten hierfür eine positive Reaktion. Jedoch wurden differenzierte Karzinome dabei nur mit einer Sensitivität von 55% (78/142) erfasst .

In Kapitel 4.9 konnte gezeigt werden, dass eine Abgrenzung zu allen nicht malignen Veränderungen (KICTMEAN: → Normalgewebe $p=0,000004$; → follikuläres Adenom $p=0,044$) statistisch mit zum Teil hoher Signifikanz möglich erscheint. Doch zeigen die Graphiken auch einen großen Überlappungsbereich, so dass eine weitergehende Betrachtung notwendig ist, um Aussagen bezüglich der Sensitivität und Spezifität der Methode machen zu können.

Aus der unten gezeigten Tabelle und Abbildung ist zu entnehmen, dass mittlere Proliferationswerte oberhalb eines Schwellenwertes von 0,27% bei normalem Schilddrüsengewebe nicht vorkamen. Die Werte für die Karzinome, und eingeschränkt auch für die Adenome, lagen größtenteils deutlich darüber. Liegt also die Spezifität zur Detektion von Normalgewebe oberhalb dieser Grenze bei 100%, erreicht die Sensiti-

vität für die Erkennung eines Tumors (Karzinoms oder Adenom) noch ein Niveau von etwa 72%, die zur Erkennung eines Karzinoms knapp 80%.

Eine Sensitivität von 100% lässt sich auf der Basis der erhobenen Daten nicht erreichen, da bei einzelnen Karzinomen die Färbung vollständig negativ ausfiel.

So lässt sich für verschiedene „Grenzwerte“ der mittleren Proliferationsrate jeweils die Sensitivität und Spezifität berechnen mit der entweder Tumore von normalem Parenchym, oder aber auch Karzinome von benignem Gewebe zu differenzieren sind.

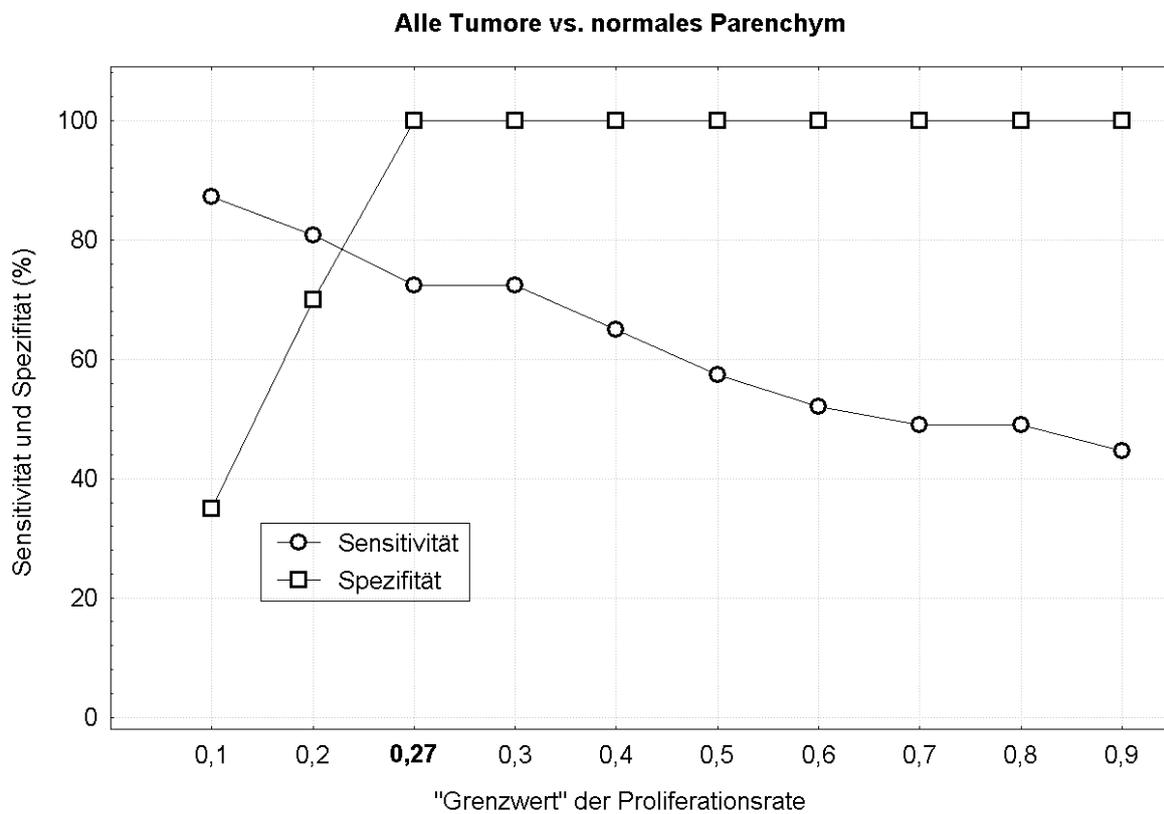


Abbildung 5.3

Maligne Tumore vs. benignes Gewebe

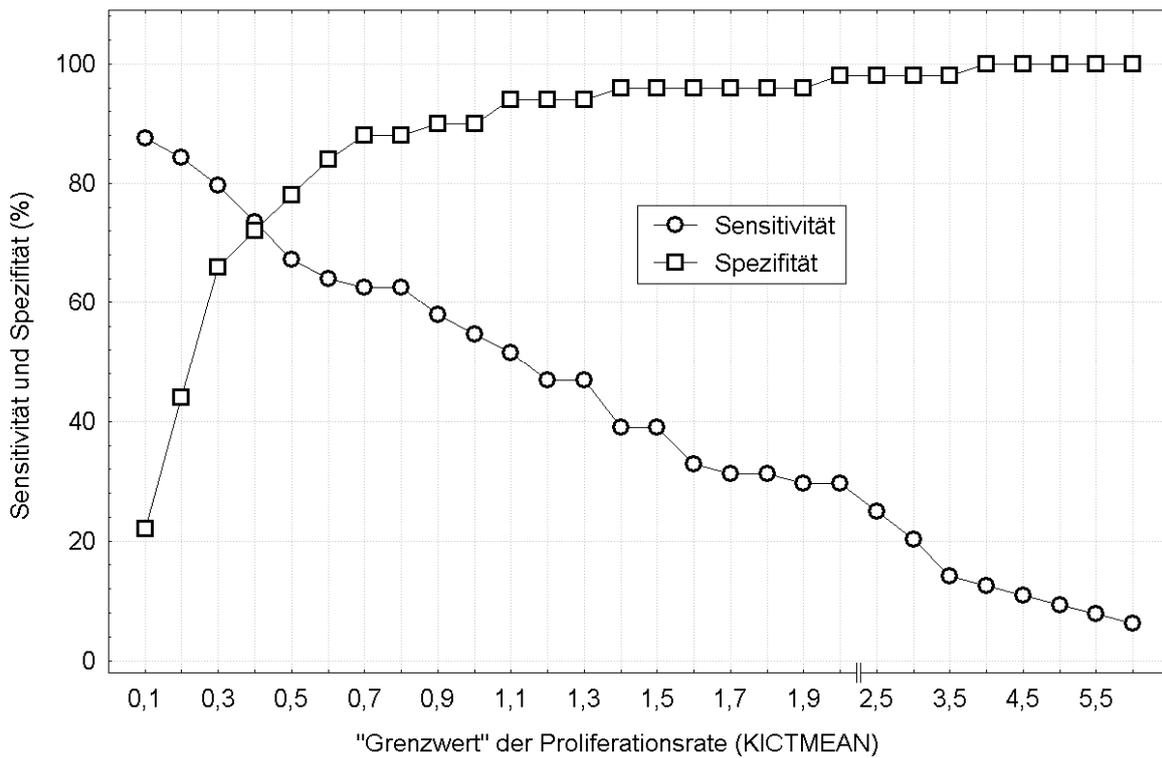


Abbildung 5.4

Tabelle 5-6:

"Grenzwert" der Proliferationsrate (%)	Tumore vs. normales Parenchym		Karzinome vs. benignes Gewebe	
	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0,1	87,23	35	87,50	22,00
0,2	80,85	70	84,38	44,00
0,27	72,34	100	79,69	66,00
0,3	72,34	100	79,69	66,00
0,4	64,89	100	73,44	72,00
0,5	57,45	100	67,19	78,00
0,6	52,13	100	64,06	84,00
0,7	48,94	100	62,50	88,00
0,8	48,94	100	62,50	88,00
0,9	44,68	100	57,81	90,00
1	42,55	100	54,69	90,00
1,1	38,30	100	51,56	94,00
1,2	35,11	100	46,88	94,00
1,3	35,11	100	46,88	94,00
1,4	28,72	100	39,06	96,00
1,5	28,72	100	39,06	96,00

1,6	24,47	100	32,81	96,00
1,7	23,40	100	31,25	96,00
1,8	23,40	100	31,25	96,00
1,9	22,34	100	29,69	96,00
2	21,28	100	29,69	98,00
2,5	18,09	100	25,00	98,00
3	14,89	100	20,31	98,00
3,5	10,64	100	14,06	98,00
4	8,51	100	12,50	100,00
4,5	7,45	100	10,94	100,00
5	6,38	100	9,38	100,00
5,5	5,32	100	7,81	100,00
6	4,26	100	6,25	100,00

Hieraus lässt sich ableiten, dass beispielsweise für eine Grenze von 0,2% für die mittlere Proliferationsrate zwar ca. 84% der Karzinome erkannt werden, in dieser Gruppe jedoch auch 56% der nicht malignen Gewebe verblieben. Umgekehrt könnten bei einem Grenzwert von 0,9% schon 90% der gutartigen Proben herausgefiltert werden, dies aber mit der Folge, dass auch 42,2% der Karzinome unentdeckt bleiben. Die Forderung nach einer Spezifität von 100% würde bedeuten, 87,5% der Karzinome zu „übersehen“. Für die Praxis lässt sich angesichts dieser Verhältnisse kein relevanter Nutzen ableiten. Zu fordern wären deutlich höhere Schnittpunkte der Kurven für Sensitivität und Spezifität.

5.2.2 Differenzierung zu anderen Entitäten

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beim papillären Schilddrüsenkarzinom eine nicht unerhebliche Zahl der Fälle bei der Diagnosestellung zu Schwierigkeiten führt. Insbesondere die follikuläre Variante des papillären Karzinoms scheint auch nach kernmorphologischen Kriterien nicht immer sicher als solches identifizierbar zu sein, mehrere Autoren haben dies nachdrücklich dargestellt (40-43). Da sich hieraus unmittelbare Auswirkungen auf das Behandlungsvorgehen ergeben, wäre ein weiteres Kriterium wünschenswert, um im „histomorphologischen Zweifelsfall“ eine eindeutige Zuordnung durchführen zu können. So wird durch jüngste Untersuchungen bestätigt, dass sich follikuläre Karzinome in ihrem Verhalten sehr deutlich von dem der follikulären Variante der papillären unterscheidet (44). Kamoshida konnte zeigen, dass ein Marker existiert, der mit hoher Signifikanz diese Differenzierung ermöglicht. Demnach scheint für DU-PAN-2 (ein Typ 1 Blutgruppenantigen) eine ho-

he Spezifität für papilläre Karzinome einschließlich deren follikulärer Variante zu bestehen, wohingegen follikuläre Tumore (Adenome und Karzinome) nur in Ausnahmen positiv reagieren. Signifikanzniveaus werden in der Arbeit jedoch nicht angegeben (45).

Wie im Ergebnisteil aufgeführt, ist diese Differenzierung zwischen follikulärem Karzinom und der follikulären Variante des papillären Karzinoms mit KI-67 als Marker mit $p=0,001023$ im U-Test für die maximale Proliferationsrate statistisch hochsignifikant nachweisbar. Die Konsequenz für die Praxis wäre demnach, dass bei Vorliegen eines invasiven Karzinoms mit follikulärer Struktur beim Nachweis einer maximalen Proliferationsrate unterhalb eines Schwellenwertes der Verdacht formuliert werden müsste, es handele sich um die follikuläre Variante eines papillären Karzinoms.

Da die Grafiken in Kapitel 4.11 aber auch hierbei eine deutliche Überlappung der Ergebnisse zeigen, muss, wie im vorherigen Unterkapitel, auch hier eine weiterführende Betrachtung in analoger Weise erfolgen.

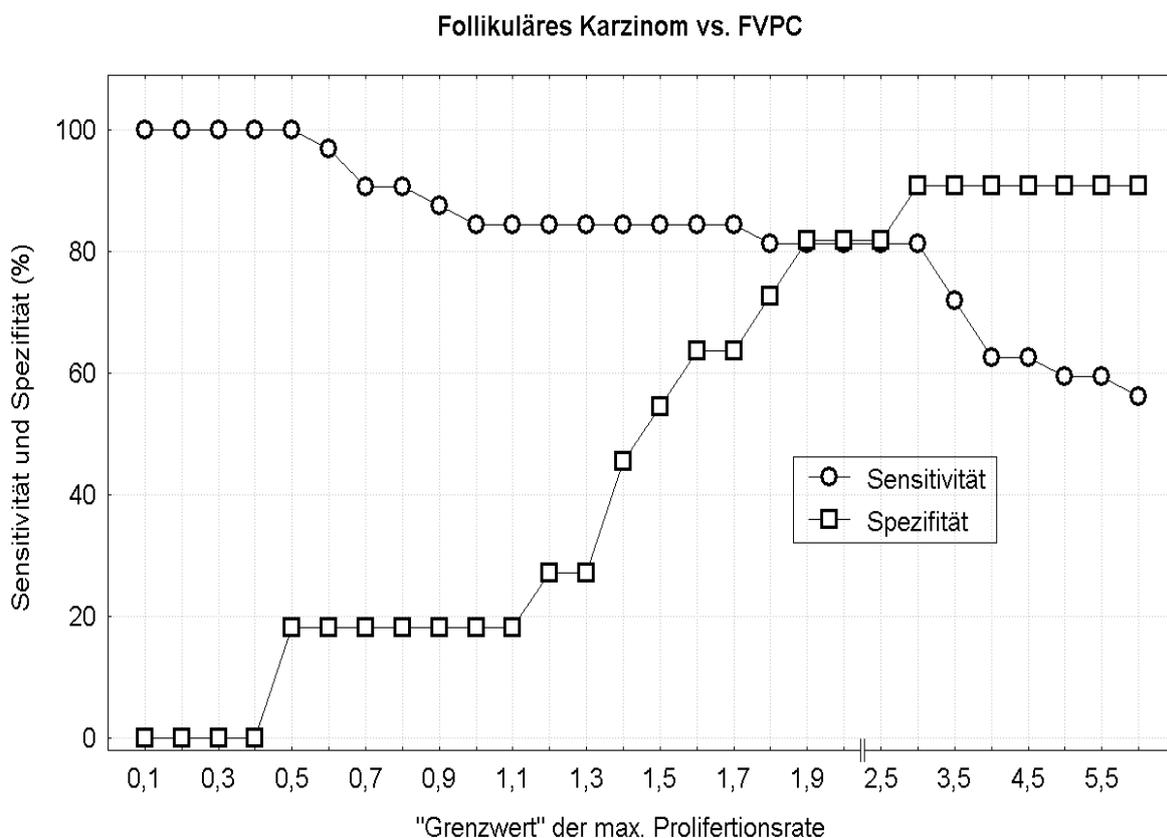


Abbildung 5.5

Tabelle 5-7

	Follikuläre Variante des papillären Karzinoms vs. foll. Karzinom	
"Grenzwert" der Proliferationsrate (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0,1	100,00	0,00
0,2	100,00	0,00
0,3	100,00	0,00
0,4	100,00	0,00
0,5	100,00	18,18
0,6	96,88	18,18
0,7	90,63	18,18
0,8	90,63	18,18
0,9	87,50	18,18
1	84,38	18,18
1,1	84,38	18,18
1,2	84,38	27,27
1,3	84,38	27,27
1,4	84,38	45,45
1,5	84,38	54,55
1,6	84,38	63,64
1,7	84,38	63,64
1,8	81,25	72,73
1,9	81,25	81,82
2	81,25	81,82
2,5	81,25	81,82
3	81,25	90,91
3,5	71,88	90,91
4	62,50	90,91
4,5	62,50	90,91
5	59,38	90,91
5,5	59,38	90,91
6	56,25	90,91

Bezüglich der Differenzierung zwischen FVPC und FC sind die Werte folgendermaßen zu interpretieren: für niedrige Grenzwerte, z.B. 0,5% werden zwar alle follikulären Karzinome erfasst, jedoch auch fast 82% der FVPC-Gruppe als positiv gewertet. Ab einer Grenze von 3% und darüber werden mehr als 90% der FVPC „herausgefiltert“, aber es werden auch über 20% der FC nicht erkannt. Im Bereich um 2% ist die Treffsicherheit am größten: hier betragen Sensitivität und Spezifität etwa 80%.

Der Aufwand erscheint angesichts der wenig verlässlichen Aussagekraft jedoch nur bedingt gerechtfertigt. Bezüglich der Apoptose und der Ratio lässt sich hierzu keine Aussage machen, da entsprechende Werte für die follikulären Karzinome nicht vorlagen.

5.3 Prognose

Die klinische Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde für verschiedene Krankheitsbilder gezeigt (46). Für Mammakarzinome liegt diese beispielsweise in der Möglichkeit, die Entscheidung bezüglich einer adjuvanten Therapie zu unterstützen oder auch in der Überprüfung der Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie. Darüber hinaus erlaubt KI-67 beim Brustkrebs prognostische Abschätzungen (47-52). Eine ähnliche Bedeutung wurde auch für nichtkleinzellige Bronchialkarzinome entdeckt (53-55). Prognostische Aussagekraft wurde auch für hepatozelluläre Karzinome gefunden (56,57), hier wurde zum Teil auch die Apoptoserate als prädiktiver Faktor identifiziert. Keine oder nur schwache Wertigkeit konnte Ki-67 als Prognosefaktor für kleinzellige Bronchialkarzinome (58) und kolorektale Karzinome (59-61) aufweisen.

Die im Ergebnisteil aufgeführten umfangreichen Untersuchungen zu den Überlebensstatistiken zeigen, dass aus den ermittelten Parametern prognostische Aussagen nur bedingt möglich sind.

Sowohl die Proliferations- als auch Apoptoserate, und auch die Ratio Proliferation/Apoptose zeigte keinen unmittelbaren Einfluss. Zu ähnlichen, weniger optimistischen Ergebnissen kommen auch andere Autoren (62).

Die Ergebnisse von Kjellmann scheinen dem Marker eine höhere prognostische Kraft zuzuschreiben (63), mit den vorliegenden Daten ist dies jedoch nicht reproduzierbar. Den Autoren gelang es, durch eine entsprechende Eingruppierung der verschiedenen papillären Karzinome nach pathologisch-klinischen Gesichtspunkten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen klinischem Verlauf und den Proliferationsraten nachzuweisen. Jedoch liegen die für eine entsprechende Einteilung in aggressive und nicht-aggressive Tumore notwendigen Daten in dieser Form nicht vor. Im untersuchten Patientenkollektiv fand sich in keinem Fall eine Fernmetastase. Das Follow-up bezog sich lediglich auf die Ermittlung der Sterbedaten.

Etwas anders stellt sich die Situation unter gleichzeitiger Betrachtung der klinischen und histopathologischen Parameter dar. Statistisch zeigt sich eine hoch signifikante Abhängigkeit der Überlebensraten von der Tumorgröße. Dies deckt sich mit den Er-

gebnissen der Literatur (64,65). So wurden für das papilläre Karzinom das Patientenalter (beta-Koeffizient=2,53 in einer multivariaten Analyse) und die Tumorgroße (beta=,93) zusammen mit der Beteiligung extrathyreoidalen Gewebes(=0,86) und die Vollständigkeit der Resektion (=0,91) als wesentliche unabhängige prädiktive Faktoren bezüglich des karzinom-spezifischen Überlebens gefunden. Eine fehlende Abhängigkeit der Tumorgroße vom Alter ($R=0,12$; $p=0,48$) auch im vorliegenden Untersuchungsgut unterstreicht dies.

Das Alter als prädiktive Größe lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilen, da die Sterbedaten nicht hinsichtlich der Todesursachen aufgearbeitet wurden. Bezüglich der Beteiligung extrathyreoidalen Gewebes (also Organkapselüberschreitung, Lymphknotenbefall und Metastasierung) lässt sich anhand meiner Daten allerdings kein direkter Zusammenhang herleiten. Auch bezüglich der Tumorkapselinvasion zeigt sich keine Signifikanz. Dies wiederum wird auch von anderen Autoren bestätigt (66).

Trotz des fehlenden direkten Zusammenhangs der gemessenen Werte zum Überleben, lässt sich wegen des signifikanten Zusammenhangs zwischen Proliferationsrate und Alter ($R=0,373$ mit $p=0,035$ bzw. $R=0,403$ mit $p=0,022$) eine Beziehung postulieren, deren direkter statistischer Nachweis anhand unserer Daten nicht gelingt. Dies mag wiederum der zu geringen Fallzahl zuzuschreiben sein.

Unter der Annahme, dass das Tumorstadium, die Invasion von Lymphgefäßen bzw. der Befall von Lymphknoten sowie der Einbruch in die Organkapsel Ausdruck der Beteiligung extrathyreoidalen Gewebes ist, und diese Parameter signifikante Zusammenhänge bzgl. der Apoptoseraten zeigen (T1/T4: $p=0,009$ bei den Maximalwerten; LK-Befall: $p=0,007$; Lymphgefäßinvasion: $p=0,003$; Organkapsleinbruch: $p=0,02$), kann in analoger Weise ein indirekter Zusammenhang zum karzinom-spezifischen Überleben hergeleitet werden. Der Beweis dieser Hypothese gelingt mit den vorliegenden Daten jedoch nicht.

Die Signifikanzniveaus der Ratio Proliferation/Apoptose hinsichtlich der vorgenannten Größen sind fast identisch, so dass die Gegenüberstellung von Proliferation und Apoptose als Ausdruck eines Netto-Gewinns oder –Verlustes von Zellen keinen Informationsgewinn liefert.

Die Aussagekraft bisheriger klinisch-pathologischer Klassifizierungen hinsichtlich der Prognose hat ein hohes Niveau. Um hier die Vorhersagekraft erhöhen zu können, ist zu fordern, dass größere Fallzahlen und weitergehende Untersuchungen durchge-

führt werden, um den Stellenwert sowohl der Proliferation (quantifiziert mit Ki-67) als auch der Apoptose (TUNEL-Methode) bei der Beurteilung papillärer Schilddrüsenkarzinome zu präzisieren. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch sehr dafür, dass diesen Parametern für diese Tumorentität niemals die Bedeutung zukommen wird, wie beispielsweise für Mammakarzinome.

Unabhängig von der klinischen Bedeutung ist es darüber hinaus für das biologische Verständnis des „Tumorverhaltens“ in jedem Fall von Interesse, die Zellvermehrung und den programmierten Zelltod bestmöglich zu evaluieren.

Die vorliegende Arbeit muss somit als Teil einer Gesamtstrategie zur Klärung des Wachstumsverhaltens von Malignomen, insbesondere papillärer Schilddrüsenkarzinome, verstanden werden. Darüber hinaus liefern die ermittelten Daten einen Beitrag zur Evaluierung der Methode der TV-Bild-analytischen, computergestützten Quantifizierung großer Zellzahlen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der quantitativen immunhistochemischen Bestimmung von Proliferation und Apoptose in papillären Schilddrüsenkarzinomen. Zur Anwendung kommt dabei ein TV-bildanalytisches Messsystem, das an der Universitätsklinik Aachen entwickelt wurde. Vergleiche mit bisher publizierten Werten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den hier ermittelten Daten. Im Rahmen einer Habilitationsschrift, der diese und andere Arbeiten zu Grunde liegen, konnte die Aussagekräftigkeit dieser Methode belegt werden.

Leider sind nur eingeschränkte Rückschlüsse von den immunhistometrisch ermittelten Proliferations- und Apoptoseraten auf das klinische Verhalten der Tumore zulässig. So ist neben den schon bekannten prognostisch relevanten TNM-Kriterien eine bessere Prognoseabschätzung nicht sicher zu erzielen gewesen. Dies mag angesichts der relativ guten Prognose des papillären Schilddrüsenkarzinoms erst bei deutlich größeren Fallzahlen und bei längeren Beobachtungszeiträumen zu erreichen sein. Darüberhinaus zeigt sich jedoch das Potenzial, mit Hilfe dieser Parameter in differentialdiagnostisch schwierigen Fällen ein zusätzliches Diagnosekriterium zu gewinnen. Insbesondere zeigt sich, dass die mitunter schwierige Differenzierung zwischen follikulärem Karzinom und der follikulären Variante des papillären Karzinoms durch die quantitative Erfassung der Proliferation unterstützt werden kann. Bei der prognostischen Einschätzung hingegen können die Proliferationsparameter die Erwartungen nicht erfüllen. Für die Apoptose zeigen sich hohe Korrelationen zu den klassischen Kriterien für Invasivität. Diesen wurde an anderer Stelle ein hoher prädiktiver Wert hinsichtlich des Überlebens bescheinigt. Zwar gelingt dies anhand der vorliegenden Daten für die Apoptose nicht unmittelbar. Jedoch scheint dies der geringen Fallzahl und dem insgesamt guten Überleben für diese Tumorentität geschuldet. Größere Fallzahlen und längere Nachbeobachtung könnten zu diesem Ziel führen. Somit ist für die immunhistometrische Bestimmung der Apoptoserate zukünftig ein höherer Stellenwert zu erwarten.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008. 2009. International Agency for Research on Cancer. Ref Type: Report
- (2) Giersiepen, Batzler. Krebs in Deutschland 2003 - 2004 Häufigkeiten und Trends,6. überarbeitete Auflage. 2009. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008. Ref Type: Report
- (3) Nagataki S, Nystrom E. Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer. *Thyroid* 2002; 12(10):889-896.
- (4) DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(2):414-424.
- (5) Jensen MH, Davis RK, Derrick L. Thyroid cancer: a computer-assisted review of 5287 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102(1):51-65.
- (6) Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138(4):867-873.
- (7) Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 1991; 11(2):476-477.
- (8) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3):311-322.
- (9) Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006; 206(3):624-635.
- (10) Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40(1):2-11.
- (11) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168(4):357-363.
- (12) Biesterfeld S, Rickert D, Eichler S, Furste K, Mrusek S, Alfer J. TV-image analysis based quantification of the proliferative activity and the apoptotic rate in thyroid tumors and thyroiditis. *Anticancer Res* 2003; 23(5b):4269-4275.
- (13) Wittekind C, Klimpfing M, Hermanek P, Tannapfel A. Multiple simultaneous gastric carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 76(12):1604-1609.

- (14) Rickert D, Mittermayer C, Lindenfelser R, Biesterfeld S. MIB-1 immunohistochemistry of follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid gland. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22(3):229-234.
- (15) Gehan EA. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily single-censored samples. *Biometrika* 1965; 52:203-223.
- (16) Breslow N. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika* 1970; 57(3):579-594.
- (17) Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25(1):31-40.
- (18) Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 1996; 29(7):413-425.
- (19) Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007; 139(1):143-156.
- (20) Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003; 38(3):275-339.
- (21) Lewy-Trenda I, Bienkiewicz M. Evaluation of MIB-1 immunoreactivity and nucleolar organizer regions in nonneoplastic and neoplastic thyroid lesions. *Pol J Pathol* 1999; 50(3):129-138.
- (22) Kjellman P, Wallin G, Hoog A, Auer G, Larsson C, Zedenius J. MIB-1 index in thyroid tumors: a predictor of the clinical course in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2003; 13(4):371-380.
- (23) Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M. Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Surg Today* 1999; 29(3):204-208.
- (24) Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, Hemmi A, Kawaoi A et al. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Hum Pathol* 1995; 26(2):139-146.
- (25) Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer* 1997; 75(4):537-541.
- (26) Almudevar E, Puras A, De Miguel C, Urbiola E, Lopez-Cousillas A, Menendez E et al. Value of the expression of p21RAS, P53, Bcl-2 oncoproteins and Ki-67(MIB-1) antigen of cellular proliferation in the diagnosis and prognosis of thyroid tumors. *An Sist Sanit Navar* 2000; 23(2):247-255.
- (27) Wallin G, Backdahl M, Christensson B, Grimelius L, Auer G. Nuclear protein content and Ki-67 immunoreactivity in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Anal Quant Cytol Histol* 1992; 14(4):296-303.

- (28) Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998; 11(2):169-174.
- (29) Mehrotra P, Gonzalez MA, Johnson SJ, Coleman N, Wilson JA, Davies BR et al. Mcm-2 and Ki-67 have limited potential in preoperative diagnosis of thyroid malignancy. *Laryngoscope* 2006; 116(8):1434-1438.
- (30) Dzieciol J, Lemancewicz D, Lebkowska U, Augustynowicz A, Dadan J, Klim B et al. Proliferative activity of papillary carcinoma and benign papillary hyperplasia of thyroid follicular cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40(2):201-202.
- (31) Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A, Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198(2):157-162.
- (32) Biesterfeld S, Rickert D, Eichler S, Furste K, Mrusek S, Alfer J. TV-image analysis based quantification of the proliferative activity and the apoptotic rate in thyroid tumors and thyroiditis. *Anticancer Res* 2003; 23(5b):4269-4275.
- (33) Franc B, de la SP, Lange F, Hoang C, Louvel A, de Roquancourt A et al. Interobserver and intraobserver reproducibility in the histopathology of follicular thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2003; 34(11):1092-1100.
- (34) Rickert D, Mittermayer C, Lindenfelser R, Biesterfeld S. MIB-1 immunohistochemistry of follicular adenoma and follicular carcinoma of the thyroid gland. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22(3):229-234.
- (35) Almudevar E, Puras A, De Miguel C, Urbiola E, Lopez-Cousillas A, Menendez E et al. Value of the expression of p21RAS, P53, Bcl-2 oncoproteins and Ki-67(MIB-1) antigen of cellular proliferation in the diagnosis and prognosis of thyroid tumors. *An Sist Sanit Navar* 2000; 23(2):247-255.
- (36) Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998; 11(2):169-174.
- (37) Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, Hemmi A, Kawaoi A et al. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Hum Pathol* 1995; 26(2):139-146.
- (38) Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11(8):735-739.
- (39) Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14(4):338-342.
- (40) Lange D, Sporny S, Sygut J, Kulig A, Jarzab M, Kula D et al. Histopathological diagnosis of thyroid cancer in a multicenter trial. *Endokrynol Pol* 2006; 57(4):336-342.

- (41) Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL et al. Observer Variation in the Diagnosis of Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28(10):1336-1340.
- (42) Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer* 2006; 107(6):1255-1264.
- (43) Saxen E, Franssila K, Bjarnason O, Normann T, Ringertz N. Observer variation in histologic classification of thyroid cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1978; 86A(6):483-486.
- (44) Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer* 2006; 107(6):1255-1264.
- (45) Kamoshida S, Ogane N, Yasuda M, Muramatsu T, Bessho T, Kajiwara H et al. Immunohistochemical study of type-1 blood antigen expressions in thyroid tumors: the significance for papillary carcinomas. *Mod Pathol* 2000; 13(7):736-741.
- (46) Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40(1):2-11.
- (47) Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 2006; 8(6):216.
- (48) Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005; 16(11):1723-1739.
- (49) Gaglia P, Bernardi A, Venesio T, Caldarola B, Lauro D, Cappa AP et al. Cell proliferation of breast cancer evaluated by anti-BrdU and anti-Ki-67 antibodies: its prognostic value on short-term recurrences. *Eur J Cancer* 1993; 29A(11):1509-1513.
- (50) Goodson WH, III, Moore DH, Ljung BM, Chew K, Mayall B, Smith HS et al. The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59(2):113-123.
- (51) Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37(1):57-64.
- (52) Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer.pdf Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(28):7212-7220.
- (53) Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2004; 91(12):2018-2025.

- (54) Pugsley JM, Schmidt RA, Vesselle H. The Ki-67 index and survival in non-small cell lung cancer: a review and relevance to positron emission tomography. *Cancer J* 2002; 8(3):222-233.
- (55) Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006; 59(8):790-800.
- (56) Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Takeda T, Umeshita K, Nagano H et al. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81(4):747-751.
- (57) Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3):385-392.
- (58) Paik KH, Park YH, Ryou BY, Yang SH, Lee JC, Kim CH et al. Prognostic value of immunohistochemical staining of p53, bcl-2, and Ki-67 in small cell lung cancer. *J Korean Med Sci* 2006; 21(1):35-39.
- (59) Funaioli C, Pinto C, Mutri V, Di Fabio F, Ceccarelli C, Martoni AA. Does biomolecular characterization of stage II/III colorectal cancer have any prognostic value? *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6(1):38-45.
- (60) Pawlik TM, Choti MA. Shifting from clinical to biologic indicators of prognosis after resection of hepatic colorectal metastases. *Curr Oncol Rep* 2007; 9(3):193-201.
- (61) Graziano F, Cascinu S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann Oncol* 2003; 14(7):1026-1038.
- (62) Duntas L, Grab-Duntas BM. Risk and prognostic factors for differentiated thyroid cancer. *Hell J Nucl Med* 2006; 9(3):156-162.
- (63) Kjellman P, Wallin G, Hoog A, Auer G, Larsson C, Zedenius J. MIB-1 index in thyroid tumors: a predictor of the clinical course in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2003; 13(4):371-380.
- (64) Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma: their implications for cancer staging. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(2):730-738.
- (65) Passler C, Scheuba C, Asari R, Kaczirek K, Kaserer K, Niederle B. Importance of tumour size in papillary and follicular thyroid cancer. *Br J Surg* 2005; 92(2):184-189.
- (66) Furlan JC, Bedard YC, Rosen IB. Significance of tumor capsular invasion in well-differentiated thyroid carcinomas. *Am Surg* 2007; 73(5):484-491.

8 Anhang: Rohdaten Ki-67 und Apoptose

8.1 Papilläres Karzinom

	KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX	KICTMAX2	APCT_TOT	APCTMEAN	APCTMAX
1	3885	5,56	10,05	30,23	4575	0,59	7,95
2	4505	0,60	1,75	3,18	6386	0,00	0,00
3	4842	3,10	6,44	6,44	4509	0,07	0,44
4	4318	2,76	5,70	7,91	5668	1,29	10,96
5					5992	0,05	0,63
6	3806	0,42	1,33	1,33	5732	1,55	8,86
7					5221	0,33	2,95
8					5263	2,53	26,71
9	3618	1,66	5,86	7,06	4891	0,18	1,07
10	3233	0,34	1,53	2,86	5465	1,10	20,00
11	4440	1,87	4,90	11,11	5032	1,83	12,34
12	4512	3,19	5,14	20,17	6211	0,03	0,36
13	3623	0,19	1,16	2,78	5376	0,02	0,59
14	3893	1,10	5,85	8,06	4856	0,12	0,86
15	2140	0,84	2,68	7,41	3862	0,08	0,65
16					4564	0,02	0,41
17	4596	0,30	1,53	2,91	6590	0,14	0,73
18	2604	0,23	1,76	2,17	3841	0,10	0,69
19	3229	0,25	0,83	2,60	4598	0,09	0,78
20					5196	0,08	1,17
21	3648	1,51	4,21	4,21	5025	0,06	0,37
22	3882	0,64	3,21	3,21	3320	0,21	3,80
23	4335	1,01	2,74	5,33			
24	4196	0,86	6,02	6,60	5026	0,06	0,41
25					4962	0,10	0,77
26	3400	1,32	4,55	6,45			
27	5272	0,06	0,41	3,73	5476	0,71	4,35
28	3981	0,00	0,00	0,00			

29	3650	2,08	5,95	13,28	4166	0,10	0,98
30	4154	0,10	0,50	0,98	7019	1,00	4,74
31	4782	0,42	3,47	16,58	5289	0,66	5,24
32	4890	0,31	1,48	4,41	5171	0,02	0,36
33					5751	0,12	0,63
34					6965	0,06	0,77
35	4754	1,09	1,81	5,41	5090	0,06	0,65
36	4879	0,08	0,40	0,40	6486	0,00	0,00
37	4312	0,30	1,15	5,44			
38	4123	0,56	1,49	4,74	5467	0,00	0,00
39	5474	0,49	1,28	2,93	6917	0,00	0,00
40	3462	8,98	16,16	17,77	3027	0,00	0,00

8.2 Follikuläres Karzinom

	KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX
1	4882	0,04	0,85
2	5140	2,33	8,13
3	7173	0,03	0,62
4	6597	1,39	8,33
5	6672	1,23	3,17
6	7494	0,91	3,32
7	7057	1,37	5,68
8	8017	3,92	6,53
9	7463	0,19	1,75
10	5925	4,42	10,91
11	3940	1,57	6,25
12	6028	2,67	6,98
13	6589	5,3	10,95
14	3761	1,38	3,7
15	5195	1,52	4,67
16	5625	0,21	0,95
17	6632	0,03	0,56

18	6858	0,03	0,63
19	6322	0,47	7,47
20	6778	8,5	28,78
21	7463	1,17	9,01
22	6865	1,53	6,45
23	6217	0,8	3,55
24	5697	2,4	7,02
25	7169	6	20,93
26	5708	1,17	3,7
27	7628	2,56	8,73
28	9054	8,53	15,81
29	7670	3	13,86
30	6201	0,98	3,1
31	6902	4,68	7,43
32	8184	3,37	8,61

8.3 Follikuläre Adenome

	KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX
1	4105	0,05	1,9
2	7328	0,4	2,03
3	4785	0,25	1,59
4	5252	0,08	2,13
5	4851	0,08	1,35
6	5192	0,06	0,88
7	6492	0,17	4,1
8	7768	0,19	1,29
9	6067	0,69	4,96
10	8348	0,13	1,22
11	5436	0,2	1,04
12	4444	0,47	5,13
13	3935	0,51	4,26
14	5914	0,56	1,87

15	3980	1,98	10,88
16	4982	0,24	2,13
17	4227	1,09	3,57
18	6611	0,44	2,11
19	4833	0,37	2,63
20	5983	0,55	4
21	4343	1,01	5,26
22	4518	0,86	3,51
23	5117	0,27	1,8
24	8010	1,24	3,46
25	6528	0,15	1,32
26	4898	0,27	4,55
27	5343	0,32	10,28
28	4398	0,75	84,62
29	3348	3,7	39,24
30	3938	0,36	1,87

8.4 Normales Parenchym

	KICT_TOT	KICTMEAN	KICTMAX
1	2986	0,07	0,71
2	3374	0,18	1
3	2405	0,08	0,79
4	2841	0,14	1,24
5	2367	0,13	0,96
6	1624	0,25	1,68
7	1654	0,12	1,03
8	1410	0,21	1,45
9	1812	0,11	1,83
10	1743	0,06	1,1
11	2727	0,22	0,76
12	2419	0,21	1,35
13	2972	0,07	0,79

14	2055	0,24	1,79
15	2793	0,04	0,69
16	2205	0,27	1,55
17	2536	0,08	1,01
18	2556	0,12	0,95
19	1719	0,17	1,39
20	2224	0,04	0,64

LEBENS LAUF

Name: Klaus Fürste

Geburtstag und -ort: 04.10.1965, Köln

Schulbildung: 1971-1975 Grundschule Köln-Ehrenfeld
1975-1985 Montessori-Gymnasium in Köln

Studium: 1985 Beginn eines Maschinenbaustudiums an der RWTH Aachen
Maschinenbau-Vordiplom im Frühjahr 1990
Seit 1990 „externes“ Medizinstudium in Aachen
Sommer 1992 regulärer Studienplatz Medizin in Aachen
November 1998 Drittes Staatsexamen im Luisenhospital Aachen

Facharzttitle: 2004 Chirurgie
2009 Gefäßchirurgie

Aachen, Dezember 2011