

**Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito**

**Methodischer und klinisch-prognostischer Vergleich der
Proliferationsfraktion in Mammakarzinomen
und ihren Lymphknotenmetastasen**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Shehab Saqib Awan

2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.3	Klassifikation	3
1.3.1.	Anatomische Grundlagen.....	3
1.3.2.	Histopathologische Klassifizierung	5
1.3.2.1	Nichtinvasive Neoplasien (Carcinomata in situ).....	5
1.3.2.2	Invasive Mammakarzinome	5
1.4	Diagnostik.....	7
1.4.1	Grundzüge der Diagnostik von Mammakarzinomen	7
1.4.2	Morphologische Diagnostik von Mammakarzinomen	8
1.5	Therapie	15
1.5.1.	Grundzüge operativer Therapieverfahren	16
1.5.2.	Grundzüge adjuvanter Therapieverfahren.....	17
1.6	Prognose	20
2.	<i>Ziel der Untersuchung und Ethikvotum</i>	23
3	<i>Material und Methoden</i>	24
3.1	Patientengut	24
3.2	Stadieneinteilung	25
3.3	Malignitätsgradierung	28
3.4	Bestimmung des Hormonrezeptorstatus	30
3.5	Quantifizierung der Mitosezahl	31
3.6	Immunhistochemische Bestimmung der Ki-67-Expression.....	31
3.6.1	Herstellung und Färbung der Präparate	31
3.6.2	Auswertung der Präparate	33
3.7	Statistik.....	35
4	<i>Ergebnisse</i>	36
4.1	Univariate Überlebensanalyse für alle 115 Patientinnen	36
4.1.1	Überlebensanalyse nach TNM-Klassifikation	36
4.1.1.1	Postoperative Tumorgröße (pT).....	37
4.1.1.2	Postoperativer Lymphknotenstatus (pN).....	38
4.1.1.3	Fernmetastasierung (M)	39
4.1.1.4	Postoperatives Tumorstadium (pTNM)	40

4.1.2	Überlebensanalyse nach Tumorgrading.....	41
4.1.3	Überlebensanalyse nach Quantifizierung der Mitosezahl.....	42
4.1.4	Überlebensanalyse nach Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR).....	43
4.1.4.1	Östrogenrezeptorstatus	43
4.1.4.2	Progesteronrezeptorstatus.....	44
4.1.5	Überlebensanalyse nach Ki-67 Proliferationsfraktion.....	45
4.1.5.1	Mittlere Ki-67-Expression (TV-bildanalytische Quantifizierung)	45
4.1.5.2	Maximale Ki-67-Expression (TV-bildanalytische Quantifizierung).....	46
4.1.5.3	Mittlere Ki-67-Expression bei manueller Auszählung.....	47
4.2	Univariate Überlebensanalyse für 39 Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen.....	48
4.2.1	Überlebensanalyse der N1-Fälle nach TNM-Klassifikation	48
4.2.1.1	Postoperative Tumorgröße (pT) der N1-Fälle	49
4.2.1.2	Fernmetastasierung (M) der N1-Fälle.....	50
4.2.1.3	Postoperatives Tumorstadium (pTNM) der N1-Fälle.....	51
4.2.2	Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Tumorgrading	52
4.2.3	Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Quantifizierung der Mitosezahl....	53
4.2.4	Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR).....	54
4.2.4.1	Östrogenrezeptorstatus der N1-Fälle.....	54
4.2.4.2	Progesteronrezeptorstatus der N1-Fälle.....	55
4.2.5	Überlebensanalyse nach Ki-67 Proliferationsfraktion der N1-Fälle	56
4.2.5.1	Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (TV-bildanalytische Quantifizierung am Primärtumor).....	56
4.2.5.2	Maximale Ki-67-Expression der N1-Fälle (TV-bildanalytische Quantifizierung am Primärtumor).....	57
4.2.5.3	Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung am Primärtumor mit den Quantilgrenzen aller 115 Fälle).....	58
4.2.5.4	Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung am Primärtumor mit den Quantilgrenzen der 39 N1-Fälle).....	59
4.2.5.5	Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung an der Lymphknotenmetastase mit der größten Tumorfläche).....	60
4.3	Multivariate Überlebensanalyse: Cox-Modell	61
4.3.1	Aufstellung eines Cox-Modells zur multivariaten Überlebensanalyse	61
4.3.2	Validierung des Cox-Modells	63
4.4	Methodische Aspekte der Ki-67-Expressionsbestimmung.....	65
4.4.1	Vergleich der Ki-67-Expression zwischen größter Lymphknotenmetastase und allen untersuchten Lymphknotenmetastasen.....	65

4.4.2	Vergleich der Ki-67-Expression in N0- bzw. N1-klassifizierten Primärtumoren sowie in der größten Lymphknotenmetastase	66
5	<i>Diskussion</i>	68
5.1	TNM-Klassifikation und histologisches Grading: Zwei Grundgrößen der morphologischen Tumordiagnostik	68
5.2	Ergänzende morphologische Standardgrößen am Primärtumor: Hormonrezeptoren und Her-2/neu.....	71
5.3	Hormonrezeptorbestimmung an Primärtumoren nodal metastasierter Fälle	72
5.4	Stellenwert von Ki-67 in der Diagnostik primärer Mammakarzinome im Kontext sich weiter entwickelnder S3-Leitlinien	73
5.5	Ki-67 in der Diagnostik von Rezidiven bzw. Fernmetastasen von Mammakarzinomen	76
5.6	Ki-67 in der Charakterisierung synchroner Lymphknotenmetastasen: Ein weißer Fleck auf der onkologischen Landkarte	77
5.6.1	Vergleich der Ki-67-Expression von Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen in der eigenen Studie	78
5.6.2	Vergleich der Ki-67-Expression von Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen in der Literatur.....	80
5.6.3	Exkurs: Andere Vergleiche der Ki-67-Expression beim Mammakarzinom	82
5.7	Beurteilung der Eignung von Ki-67 als Marker unter methodischen Gesichtspunkten.....	84
5.7.1	Anforderungen an die Bestimmung der Ki-67-Expression in der aktuellen S3-Leitlinie.....	85
5.7.2	Abschätzung von methodisch bedingten Schwankungsbreiten in der Bestimmung der Ki-67-Expression	86
5.8	Resumée	88
6	<i>Zusammenfassung</i>	93
7	<i>Conclusion</i>	95
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Atypische duktale Hyperplasie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA1/BRCA2	Breast Cancer-1 bzw. -2-Gen, Tumorsuppressorgene
ca.	Circa
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DCC	Dextran-Coated Charcoal Assay
DCIS	Duktale Carcinoma in situ
DF	Duktale Hyperplasie ohne Atypie
ER	Östrogenrezeptor
FEA	Flache epitheliale Atypie
FISH	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung
G1-Phase	Zellzyklus: Phase zwischen Kernteilung und DNA-Synthese
ggf.	gegebenenfalls
Her-2/neu	Menschlicher Epidermaler Wachstumsrezeptor Faktor 2
ICC	Intraclass-Korrelationskoeffizient
LCIS	Lobuläre carcinoma in situ
LN	Lobuläre Neoplasie
Mittl.	mittleres
mm	Millimeter
M-Phase	Zellzyklus: Mitose-Phase
MIB-1	Immunhistochemischer Antikörper „Molecular Immunology Bors- tel-1“
NST	Adenokarzinom no special type
PR	Progesteronrezeptor
RKI	Robert-Koch-Institut
SD	Standardabweichung

sog.	Sogenannte
SOP	Standard Operation Procedures
T	Beurteilung der Tumorgröße des Primärtumors
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue Microarray
TNM	Beurteilungssystem für maligne Tumoren nach Ausdehnung des Primärtumors (T), ggf. befallenen Lymphknoten (N) und eventuellen Fernmetastasen(M) gemäß den Vorgaben der UICC
u.a.	unter anderem
UICC	Union International contre le Cancer
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist bei Frauen die häufigste Krebserkrankung und steht in der Gesamtstatistik aller Tumoren über beide Geschlechter auf Rang 2. Mit ca. 2,25 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2018 stellt es 11,6 Prozent aller Krebserkrankungen weltweit. Die Inzidenz des Mammakarzinoms liegt in Nordamerika, Europa und Australien am höchsten (IARC 2020).

Auch in Deutschland tritt das Mammakarzinom mit 14,0% aller Krebsfälle häufiger auf als im Weltmittel. Es stellt mit 30,0% aller Krebserkrankungen die häufigste bösartige Neoplasie der Frau, basierend auf den 2021 vom Robert-Koch-Institut veröffentlichten Zahlen für 2017 und 2018 (alle Zahlen in diesem Abschnitt: RKI 2021), und ist bei Männern sehr selten. Im Jahr 2018 vermeldete das Robert-Koch-Institut fast genau 70.000 Neuerkrankungen bei Frauen und etwas mehr als 700 bei Männern, so dass zwischen den Geschlechtern eine Verteilung der Erkrankungshäufigkeit von 100:1 besteht. Das RKI rechnet auch weiterhin mit einer leichten Zunahme der Inzidenz sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Im Vergleich zur Inzidenz ist die Zunahme der Mortalität etwas geringer, was unter anderem auf die Früherkennungsprogramme zurückzuführen sein dürfte (RKI 2019, RKI 2021). Im Laufe des Lebens erkrankt etwa in Deutschland statistisch gesehen eine von acht Frauen am Mammakarzinom. Von diesen sind 30% jünger als 55 Jahre. Das Durchschnittsalter bei Frauen liegt aktuell bei 64 Jahren und bei Männern bei 72 Jahren.

Im Jahr 2018 starben in Deutschland 18.591 Frauen an einem Mammakarzinom. Dies entspricht 17,7% aller Todesfälle, die durch Krebs verursacht wurden, und ist damit bei ihnen die häufigste Ursache, gefolgt von Lungenkrebs, bei dem Frauen in den letzten

Jahrzehnten kräftig aufgeholt haben, und Darmkrebs. Das mittlere Sterbealter lag bei 76 Jahren (jeweils nach RKI 2021) (Abbildung 1).

Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C50

Inzidenz	2017		2018		Prognose für 2022	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	69.390	690	69.900	720	66.800	770
rohe Neuerkrankungsrate ¹	165,7	1,7	166,4	1,8	158,0	1,9
standardisierte Neuerkrankungsrate ^{1,2}	111,7	1,1	112,6	1,1	105,6	1,1
mittleres Erkrankungsalter ³	65	72	64	71		
Mortalität	2017		2018		2019	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Sterbefälle	18.401	192	18.591	195	18.519	193
rohe Sterberate ¹	43,9	0,5	44,3	0,5	44,0	0,5
standardisierte Sterberate ^{1,2}	22,9	0,3	22,8	0,3	22,3	0,3
mittleres Sterbealter ³	76	77	76	76	76	75
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre		25 Jahre	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Prävalenz	304.100	2.800	559.300	4.700	968.900	7.000
absolute Überlebensrate (2017–2018) ⁴	79 (77–81)	68	67 (63–69)	53		
relative Überlebensrate (2017–2018) ⁴	88 (86–89)	84	83 (79–85)	83		

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen zu Mammakarzinomen (Kodierung C50 nach ICD-10) in Deutschland 2017/2018 (RKI 2021)

Weltweit starben im Jahr 2018 684.996 Menschen an einem Mammakarzinom (IARC 2020), was 6,9% aller Krebstoten ausmacht. In Deutschland stellte es 8,2% aller Krebstoten, bezogen auf beide Geschlechter (Frauen: 17,7%, siehe oben; Männer: 0,15%). Dieser höhere Anteil trotz belegbar besserer Prognose als im Weltdurchschnitt ist der abweichenden Tumorverteilung in Deutschland bzw. Mitteleuropa und Nordamerika geschuldet, wo die im Weltdurchschnitt deutlich höheren Inzidenzen und Mortalitäten insbesondere von Leberzellkarzinomen weniger stark ins Gewicht fallen als beispielsweise in tropischen Ländern.

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen mehrere Faktoren eine Rolle.

Eine genetische Disposition weisen ca. 30% aller Frauen mit einem Mammakarzinom in Deutschland auf. So ist das Vorhandensein eines Mammakarzinoms bei weiblichen Verwandten 1. Grades mit einem zwei- bis neunfach erhöhtem Erkrankungsrisiko verbunden (Leitlinienprogramm Onkologie 2020; Knörr et. al. 1989). Als molekularbiologischer Risikofaktor gilt eine Mutation der sogenannten Breast Cancer Gene (BRCA) (Beckmann et al. 1996). Als Tumorsuppressorgene produzieren diese ein Protein, welches mutierte oder fehlerhafte Zellen erkennt. Bekannt ist ein bis zu 80% erhöhtes Risiko für Mammakarzinome bei einer Mutation der BRCA-1 und BRCA-2-Gene. Da diese Gene autosomal-dominant vererbt werden, besteht ein Risiko von 50% für eine Übertragung an das Kind, wenn ein Elternteil betroffen ist (Fischer und Baum 2014).

Als klinisch relevantester Risikofaktoren gilt ein erhöhtes Alter (Leitlinien Onkologie 2020). Weiterhin erhöht ein unilaterales Mammakarzinom auch die Wahrscheinlichkeit für ein synchrones oder metachrones bilaterales Auftreten. Ein erhöhter Bodymaßindex, Alkoholkonsum, eine erhöhte Strahlenbelastung und die Einnahme von Hormonen, wie z.B. hormonelle Antikonzeptiva, werden in aktuellen Literaturen als Risikofaktoren bezeichnet (McPherson et al. 2000). Ein hohes Alter bei der Menarche und ein niedriges Alter bei der Menopause sowie das Gebären und Stillen von Kindern hingegen senken das Risiko (Fischer und Baum 2014).

1.3 Klassifikation

1.3.1. Anatomische Grundlagen

Das Mammakarzinom ist eine bösartige Neoplasie ausgehend von den Duktuli, den Milchgängen der Brustdrüse, oder den Lobuli, den Drüsenläppchen, bestehend aus Drüsengang und Drüsenzellen der Brust (s. Abbildung 2).

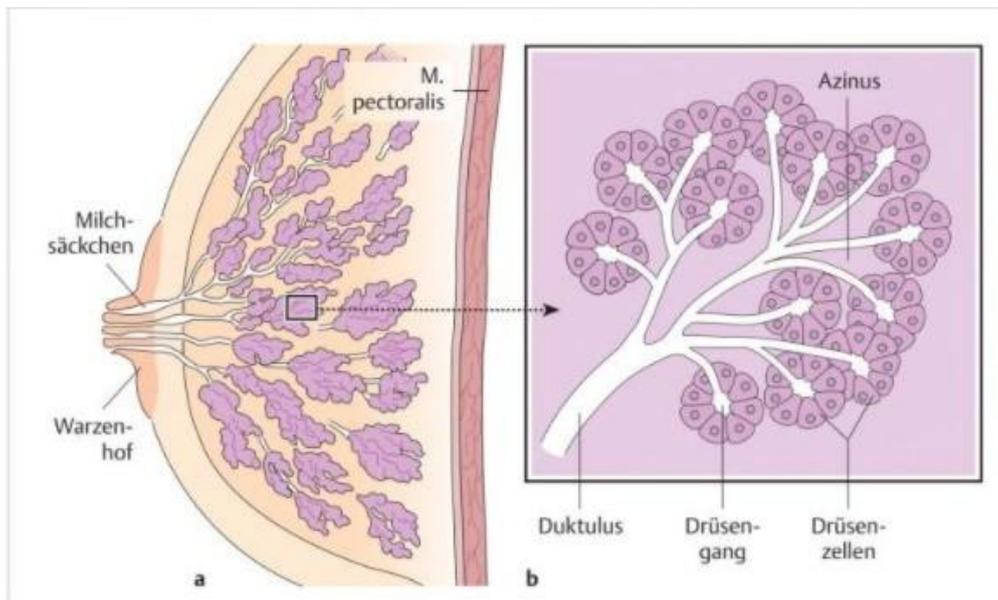


Abbildung 2: Anatomie der Brust: a. Brustdrüse mit ca. 15- 25 Einzeldrüsen b. Ausschnittsvergrößerung von a: Sekretorische Läppchen (Lobuli) münden über terminale Gänge (Duktuli) in Baum- artig verzweigte weitere Gänge (Fischer und Baum 2014)

Tumore, welche von den Milchgängen der Brustdrüse ausgehen, wurden entsprechend als „duktale Neoplasien“, wobei dieser Begriff bei invasiven Tumoren inzwischen aufgegeben worden ist. Tumore ausgehend von den Drüsenläppchen werden hingegen auch aktuell als „lobulären Neoplasien“ bezeichnet werden.

Weiterhin unterscheidet man grundsätzlich in invasive und nichtinvasive Karzinome. Unter einem invasiven Karzinom versteht man eine Neoplasie, welches ausgehend von seinem Ursprungsort ins angrenzende Gewebe eingewachsen ist. (Goerke 2008; Mayr und Högel 2013). Nicht invasive Karzinome („Carcinoma in situ“) hingegen sind Läsionen, die zwar einen neoplastischen Charakter aufweisen, aber noch nicht in das umgebende Gewebe vorwachsen und somit formal auch keine Fähigkeit zur lymphatischen oder hämatogenen Metastasierung besitzen.

1.3.2. Histopathologische Klassifizierung

1.3.2.1 Nichtinvasive Neoplasien (*Carcinomata in situ*)

Auf die nicht-invasiven Läsionen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, soll im Folgenden nicht detailliert eingegangen werden. Man unterscheidet das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und die lobuläre Neoplasien (LN). Das DCIS gilt dabei als Vorstufe eines Mammakarzinoms und somit als echte Präkanzerose, wohingegen die LN mit einer erhöhten Zellproliferation eine Indikatorläsion für ein erhöhtes Risiko einer Karzinomentstehung darstellt. Beide Läsionen können einseitig oder beidseitig auftreten und auch mit invasiven Tumoren vergesellschaftet sein.

1.3.2.2 Invasive Mammakarzinome

Eine epitheliale Neoplasie der Mamma, die über die Gewebestruktur der Drüsenläppchen oder Milchgänge hinaus proliferiert und diese dabei durch infiltratives Wachstum zerstört, bezeichnet man als invasives Mammakarzinom.

Wichtigster Haupttyp des Mammakarzinoms ist das Adenokarzinom (NST) („*no special type*“), das inhaltlich dem invasiv-duktalem Karzinom entspricht und dieses nomenklatorisch abgelöst hat; es stellt ca. 75% der Fälle. Die Rationale hinter dieser Umbenennung erscheint vor dem Hintergrund, dass das duktales Carcinoma in situ (DCIS) weiterhin nomenklatorisch existiert, nicht wirklich verständlich, hat sich aber inzwischen durchgesetzt. Der zweithäufigste Typ ist das invasiv-lobuläre Karzinom mit ca. 15% der Fälle.

Ferner ist eine Reihe eigener seltener Karzinomtypen definiert (WHO 2019). Manche von ihnen werden dabei als Sonderform des invasiven Adenokarzinoms (NST) geführt (onkozytäres Karzinom, Lipidreiches Karzinom, Glykogen-reiches Karzinom, sebaziöses Karzinom und weitere), andere gelten als in Abgrenzung vom NST-Typ als eigene Entitäten und zwar:

- Tubuläres Karzinom
- Kribriiformes Karzinom
- Muzinöses Adenokarzinom und muzinöses Zystadeokarzinom
- Mikropapilläres Karzinom
- Apokrines Karzinom
- Metaplastisches Karzinom

Außerdem sind noch Karzinome separat geführt, die von papillären Läsionen abstammen (gekapselte, solide oder aus intraduktalen Läsionen hervorgegangene papilläre Karzinome), epithelial-myoepithelialer Herkunft sind (Adenomyoepitheliom mit Karzinom sowie epithelial-myoepitheliales Karzinom) oder als vom Schweißdrüsentyp gerechnet werden (Azinuszellkarzinom, adenoidzystisches Karzinom, sekretorisches Karzinom, mukoepidermoides Karzinom, polymorphes Adenokarzinom). Auch neuroendokrine Karzinome kommen in der Mamma primär vor, sind dort allerdings extrem selten.

Die WHO-Klassifikation unterlag dabei immer wieder Änderungen, die aber vor allem die Sonderformen betrafen, während an der Grundordnung der invasiv-duktales (respektive Adenokarzinom NST) und der invasiv-lobulären Karzinome nicht gerüttelt wurde (siehe auch WHO 2003, WHO 2012, Lebeau et al. 2014). So wurde beispielsweise zuletzt das medulläre Karzinom wieder „abgeschafft“, indem seine Zuordnung zu einem eigenen Typ aufgehoben wurde und diese Wachstumsform jetzt als Variante des Adenokarzinoms NST geführt wird (WHO 2019).

1.4 Diagnostik

1.4.1 Grundzüge der Diagnostik von Mammakarzinomen

Die frühzeitige Diagnostik von Mammakarzinomen ist aufgrund der stadienabhängigen Prognose von großer Bedeutung für das Überleben des Patienten. Im frühen Tumorstadium ist eine weniger radikale und für den Patienten weniger belastende Therapie möglich. Nach Empfehlungen der Leitlinien für Onkologie sollte die Diagnose fachübergreifend aus klinischer Untersuchung, apparativer Diagnostik und histologischer Untersuchung von Stanzmaterial gestellt werden (Leitlinie Onkologie 2020).

Invasive Mammakarzinome sind häufig als scharf oder auch unscharf begrenzte, manchmal druckempfindliche Verhärtungen und Knoten tastbar. Oft sind diese Raumforderungen nicht verschieblich. Hauteinziehungen oder Ödeme, entzündliche Veränderungen und mögliche Mamillenretraktionen oder entzündliche Sekretionen sind mögliche klinische Zeichen, die aber nicht selten erst im fortgeschrittenen Stadium manifest werden. Auch eine Größenveränderung der Brust, sowohl uni- als auch bilateral, kann einen Hinweis auf eine Neoplasie geben (Leitlinie Onkologie 2020; DKG 2018). Zur weiteren klinischen Untersuchung wird nach Palpation eine Mammographie und/oder Sonographie durchgeführt und im Verdachtsfall eine Gewebeprobe entnommen.

Nach histologischer Bestätigung eines Mammakarzinoms erfolgt das klinisch-bildgebende und das auf Gewebsentnahme basierende Staging des Primärtumors und eventueller axillärer Lymphknotenmetastasen. Mithilfe der Bildgebung (Röntgen-Thorax, Computertomographie (CT), Oberbauchsonographie Skelettszintigraphie) wird nach Fernmetastasen gesucht, die sich vorzugsweise in Leber, Lunge, Knochen oder Gehirn manifestieren. Außerdem wird eine Mammographie der gegenseitigen Brust durchgeführt (Haag und Hanhart 2012).

Am Ende des diagnostischen Prozesses steht eine klinische und nach operativer Sicherung eine postoperative Einordnung des Stadiums gemäß der aktuellen Version der Union International Contre le Cancer (UICC) eingeführten TNM-Klassifikation (Gospodarowicz et al 2016); auf sie wird in Kapitel 3 („Material und Methoden“) näher eingegangen.

1.4.2 Morphologische Diagnostik von Mammakarzinomen

Die morphologische Diagnostik erfolgt heute in aller Regel an Stanzbiopsien. Die frühere Vorgehensweise offener Biopsien mit Tumorsicherung im intraoperativen Gefrierschnittverfahren („Schnellschnitt“) ist heute komplett verlassen worden. Dieses war durch die Entwicklung radiologisch kontrollierter stereotaktischer Stanzverfahren möglich, durch die ein oder mehrere Gewebezylinder gewonnen werden können, ohne dass die Raumforderung in der Brustdrüse verrutschen kann. Auf diese Weise werden falsch-negative Diagnosen, die bei älteren Stanzverfahren ein Problem darstellten, heute fast gänzlich vermieden.

Wird dabei ein invasives Mammakarzinom nachgewiesen, so sind folgende Angaben notwendig:

Tumortypisierung und Tumorgradierung

An konventionellen HE-Schnitten erfolgt an der Wachstumsform des Tumors und der Zellmorphologie die Typisierung des Tumorgewebes in die unter Kapitel 1.3.2 dargestellten Tumorentitäten (Adenokarzinom NST, lobuläres Karzinom etc.). Unter bestimmten Fragestellungen können immunhistochemische Untersuchungen ergänzend eingesetzt werden, z.B. zur Sicherung der lobulären Tumoreigenschaften (typisch: Verlust der E-Cadherin-Expression) oder einer apokrinen Differenzierung

(typisch: Expression des Androgenrezeptors). Außerdem wird die Gradierung des Tumors als gut, mäßig oder gering differenziert vorgenommen (Elston und Ellis 1991).

Bestimmung prädiktiver Marker

Das Gewebe eines Karzinoms unterscheidet sich in molekularen Mechanismen von gesundem Gewebe, die zur Tumorentstehung beitragen. (Müller und Wagener 2009). Durch Mutation entstandene genetische Veränderung sorgen für eine unterschiedliche Expression von Proteinen mit veränderter Funktion bei malignem Gewebe (Sauer et al. 2008). Im Tumorgewebe sind veränderte Eigenschaften und Konzentrationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen festzustellen, die zu wachstumsfördernden Veränderungen führen können. Unter anderem kann dabei die Regulierung der Apoptose betroffen sein, mit der Folge einer ungesteuerten Proliferation maligner Zellen. So geben einige Gensequenzen und Proteine einen möglichen Hinweis auf ein fortgeschrittenes Stadium mit einer schlechteren Prognose (Müller und Wagener 2009; Sauer und Kreienberg 2005).

Beim invasiven Mammakarzinom wird nach den Leitlinien der Onkologie in der Primär-diagnostik die Bestimmung des Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptorstatus (PR), der Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Status (Her-2/neu) und des Ki-67-Antigens als immunhistochemischer Nachweis für die Proliferationsrate empfohlen. Die Bestimmungen sollen nach Möglichkeit schon in der Stanzbiopsie erfolgen (Leitlinien Onkologie 2020).

Inwieweit erneute Bestimmungen am primären Resektat erfolgen sollten, muss seitens der Pathologie vorgegeben bzw. angeregt werden. Wesentliche Gründe für eine solche Empfehlung wären nur kleinherdige, wenn auch zur Diagnosestellung ausreichende Tumoranteile, sehr heterogene Expressionsmuster oder Zweifel an einer ordnungsgemäßen Gewebsfixation.

Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptor (PR)

Die Expression von ER und / oder PR im Tumorgewebe korreliert bei Mammakarzinomen mit der Prognose. Bei einem Anteil von über 1% positiver Tumorzellen gilt dies anhand der Leitlinie Onkologie als positiv. Es zeigte sich bei positiven ER-Befunden ein um 5%-10% verbessertes rezidivfreies Gesamtüberleben. Die Prognose ist noch besser, wenn ER und PR positiv sind (Fisher et al 1988). Diese aus den späten 80er Jahren stammende Daten werden heute immer noch zitiert, z.B. im angesehenen „Manual Mammakarzinom“ des Tumorzentrums München (Degenhardt et al. 2017), und sind somit als immer noch gültig anzusehen.

Der Nachweis der Hormonrezeptoren ist aber nicht nur als reiner prognostischer Surrogatmarker wesentlich, sondern auch aus therapeutischen Gründen. An der Expression der Marker hängt, ob man bei der Patientin ein gutes Ansprechen auf eine endokrine Therapie mit einem selektiven Östrogenrezeptormodulator wie z.B. Tamoxifen oder einem GnRH-Analogen erwarten darf (Goldhirsch et al., 2005). Auf das Wechselspiel der Expressionen von ER und PR wird dabei in der Diskussion näher eingegangen.

Mögliche Lymphknotenmetastasen können auch auf das Vorhandensein der Hormonrezeptoren untersucht werden, was aber nicht routinemäßig erfolgt. Mehrere Studien konnten feststellen, dass Patienten, deren Lymphknotenmetastasen ER positiv waren, besser auf eine Behandlung mit Tamoxifen ansprechen (Falck et al 2010; Khasraw et al. 2011).

Die Bestimmung der Hormonrezeptor-Expression wird heute an fixiertem Tumorgewebe immunhistochemisch durchgeführt; alternativ wurde früher eine laborchemische Bestimmung vorgenommen, für die Frischgewebe notwendig ist.

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her-2/neu)

Her-2/neu gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und stimuliert die Zellproliferation bei gleichzeitiger Hemmung der Apoptose. Gemäß der aktuellen Literatur findet man bei Mammakarzinomen in ca. 15%-20% der Fälle einen positiven Her-2/neu-Status (Choritz et al. 2011, Wolff et al. 2014, Degenhardt et al. 2017). Durch die Überexpression der Rezeptoren ist die Prognose des Patienten verschlechtert, da dies zu einem schnelleren Tumorwachstum und Tumorausbreitung führt. Ursache hierfür ist, dass die Genamplifikation erhöhte Proliferation und Apoptosehemmung bedingt und die Neoangiogenese sowie die Tumorzellmigration und somit die Metastasierung fördert (Holbro et al. 2003).

Die Bestimmung kann sowohl immunhistochemisch als auch mit der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgen. In Deutschland ist die immunhistochemische Bestimmung Standard; nur in einer etwa 10% der Fälle betreffenden Konstellation, in der sich aus der Immunhistochemie auf das molekulare Geschehen ausreichend sicher rückschließen lässt (Score 2+ in der Immunhistochemie), wird bisher eine in-situ-Hybridisierung (FISH, CISH, SISH) angeschlossen. In anderen Ländern, beispielsweise der Schweiz, wird bevorzugt die FISH eingesetzt, da sie dort als zuverlässiger und besser reproduzierbar gilt. Heute lässt sich sagen, dass auch nach Modifikationen der Auswertungen eine sehr hohe Korrelation zwischen beiden Methoden besteht. Von immunhistochemisch negativen Fällen sind, der aktuellen Literatur folgend, < 1% amplifiziert; umgekehrt sind von immunhistochemisch positiven Fällen deutlich < 10% nicht amplifiziert (Gordian-Arroyo et al. 2019, Li et al. 2020, Farshid et al. 2020). Her-2/neu-positive Mammakarzinome sprechen nicht selten gut auf eine Therapie einer gegen den Rezeptor ausgerichteten Antikörpertherapie mit Trastuzumab, ggf. in Kombination mit Pertuzumab, aber auch Lapatinib oder T-DM1 an. Dabei wird der Rezeptor blockiert und seine Wirksamkeit in der Zellproliferation und Hemmung der Apoptose unterbrochen. (Untch et. al. 2006). Untersuchungen von Metastasen des Mammakarzinoms mit positiven Her-2/neu-Befund zeigten auch einen großen Anteil an Überex-

pression in den Metastasen. Allerdings kommen auch relativ seltene Fälle mit sogenannter Rezeptorkonversion vor, wo dann in Metastasen ein gegenläufiges Untersuchungsergebnis im Vergleich zum Primärtumor besteht. Eine Untersuchung von Metastasen auf ihre Her-2/neu-Expression ist für lokale oder lokoregionäre Rezidive obligatorisch vorgesehen (S3 2021) und setzt sich immer mehr auch für bioptisch gesicherte Fernmetastasen durch, offenbar um die Konstanz des Ergebnisses von Ereignis zu Ereignis im Tumorverlauf zu dokumentieren; hieraus leitet sich außerdem eine exaktere Prognosestellung und eine gezieltere Therapiewahl ab (Ieni et al 2014; Gong et al. 2005).

Proliferationsmarker Ki-67 (MIB-1)

Gerdes et al. entdeckten im Jahr 1983 erstmals den Biomarker Ki-67. Es ist ein nukleäres Antigen, welches ausschließlich im Rahmen der Proliferation der Zellen zwischen der G₁- und M-Phase produziert wird. In inaktiven Zellen wird das Antigen nicht exprimiert. Deshalb dient es als exzellenter Marker für die Proliferation, auch von malignen Tumoren (Scholzen et al. 2000; Gerdes et al. 1983).

Ein passender Antikörper zur Markierung des Ki-67-Antigens wurde durch Immunisierung von Mäusen gefunden. Dadurch war die Bestimmung des Ki-67-Antigens mit immunhistologischen Färbemethoden durchführbar und ermöglichte so die Einführung einer Quantifizierung der Ki-67-Expression (Gerdes et al. 1983). Die ersten immunhistochemischen Färbungen erfolgten mit Hilfe des „originalen“ monoklonalen Ki-67 Antikörpers. Nachteilig war hier, dass dies nur an gefrorenen Gewebeschnitten genutzt werden konnte. Die Entwicklung eines neuen monoklonalen Antikörpers MIB-1 (*Molecular Immunology Borstel*) ermöglichte ebenso den Nachweis von Teilen des Ki-67-Antigens an formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben. Auch eine retrospektive Analyse von Tumoren war nun nach einer Mikrowellenvorbehandlung möglich. Es zeigte sich sogar, dass MIB-1 die Gewebeproben sogar noch stärker anfärbte und somit als wohl zuverlässige und methodisch einfache Methode standardmäßig eingesetzt werden kann (Cattoretti, 1992).

Ein bisher ungelöstes Problem bei Ki-67 ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren, auf die schon früh hingewiesen wurde (Mengel et al. 2002, Varga et al. 2012) und die auch in verschachtelten Versuchsansätzen, die in der Diskussion weiter vertieft werden, bestätigt wurden (Polley et al. 2013; Chung et al. 2016). Diese eingeschränkte Reproduzierbarkeit zwischen den Laboren wird als Kritikpunkt gesehen, da ohne die Standardisierung der Bewertungsmethode die Ergebnisse nicht Laboratorien übertragen werden können und keine verbindlichen Grenzwerte für die Zuordnung von Patientinnen in verschiedene Gruppen angegeben werden können (Polley et al. 2013; Petrelli et al. 2015). Auch publizierte Grenzwerte für die Prognoseabschätzung oder die Therapieplanung unterscheiden sich stark und schwanken dabei von 20%-50% (Duffy et al. 2017; Falck et al. 2010; Ishihara et al. 2013; Nishimura et al. 2011). Die aktuelle S3-Leitlinie (S3 2021) mahnt für die Reproduzierbarkeit der Ki-67-Bestimmung einheitliche standardisierte Kriterien an, auf die ebenfalls in der Diskussion Bezug genommen wird.

Insgesamt kann man sagen, ohne hier auf Quellen detailliert einzugehen, dass sich die meisten Studien darüber einig sind, dass ein erhöhter Ki-67-Wert im Primärtumor mit einer Verschlechterung des Gesamtüberlebens der Patientinnen korreliert. Trotz einer schlechteren Gesamtprognose der betroffenen Patientinnen, die neoadjuvant behandelt werden, ist auch bei ihnen Ki-67 ein signifikanter prädiktiver Marker für das Therapieansprechen (Nogami et al. 2013; Denkert et al. 2013).

In mehreren Studien konnte auch einen Zusammenhang im Vorhandensein des Ki-67-Antigens im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen dargestellt werden (Falck et al. 2010; D'Andrea et al. 2007; Dikicoglu et al. 2005). So konnten Falck et al. 2010 ähnliche Werte des Primärtumors auch in 85% der Metastasen nachweisen, was zu einer ähnlichen 5-Jahres-Prognose bei Behandlungen mit Tamoxifen führte. Insgesamt zeigte sich eine reduzierte rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei hoher Ki-67 Expression (Falck et al. 2010; Ibrahim et al. 2013). Weiterhin ergab sich eine erhöhte Tendenz zur Metastasierung und Bildung von Rezidiven (Ishihara et al. 2013; DeCensi et al. 2010).

Klassifikation von Mammakarzinom anhand der Expression der prädiktiven Marker

Anhand der unterschiedlichen Biomarker lässt sich das Mammakarzinom in unterschiedliche Subtypen kategorisieren. 2013 wurde in St. Gallen eine Einteilung empfohlen, welche auch in Therapievorschläge münden sollte (Goldhirsch et al. 2013); in der heute üblichen Version sieht sie wie folgt aus (Tabelle 1):

Subtyp	ER/PR	Her-2/neu	Ki-67
Luminal A	+	-	niedrig
Luminal B (Her-2/neu negativ)	+	-	hoch
Luminal B (Her-2/neu positiv)	+	+	niedrig/hoch
Her-2/neu positiv (ER/PR negativ)	-	+	
Triple negativ	-	-	

Tabelle 1: Subtypisierung des Mammakarzinoms anhand des Expressionsmusters prädiktiver Marker (Goldhirsch et al. 2013)

Die fünf Kategorien bilden dabei im Grunde jede mögliche Konstellation ab. Am häufigsten ist dabei, den Zahlen des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg folgend (DKFZ 2021), mit Abstand die Gruppe „Luminal A“ (40-60%), gefolgt von „Luminal B“ (Her-2/neu negativ) (15-20%), so dass die Hormonrezeptor-positiven und zugleich Her-2/neu-negativen Mammakarzinome die große Mehrheit der Fälle stellen. Gefolgt werden sie von den prognostisch ungünstigen „Triple-negativen“ Fällen (15-20%). An vierter Stelle in der Häufigkeit liegen die Her-2/neu-positiven und Hormonrezeptor-negativen Fälle (10-20%). Die Konstellation „Luminal B“ (Her-2/neu positiv) ist sehr selten.

Problematisch ist bei dieser Klassifikation die Festlegung auf einen Ki-67-Schwellenwert, der im Kontext der gewissen Spannweite, die sich zwischen verschiedenen Laboren ergibt, widersinnig wirken könnte. Er lag üblicherweise bei 15%, so als ob ein Tumor mit 14% Proliferationsrate anders abschneiden würde als ein solcher mit 16%. Heute wird allgemein bei einem Ki-67-Wert von > 25% von einem erhöhten Risiko für

die Patientin ausgegangen, wohingegen bei $< 10\%$ kein erhöhtes Risiko vorliegt. Dazwischen liegt eine gewisse Grauzone (Leitlinie Onkologie 2020).

Letzten Endes hat sich die St. Gallen-Einteilung immerhin bedingt als algorithmisches Raster durchgesetzt, da sie Gruppen abgrenzt, die in der adjuvanten Therapie verschieden versorgt werden und auch unterschiedliche Prognosen aufweisen (s. Tabelle 2).

1.5 Therapie

Die Therapie der Mammakarzinome ist heute wie bei den übrigen Tumorentitäten auch evidenzbasiert und durch Leitlinien geregelt, die einer stetigen Aktualisierung unterliegen. Heutzutage werden Mammakarzinome, auch wenn sie bei den meisten Patientinnen primär als lokale Erkrankung auftreten, als Systemerkrankung gesehen, die nicht nur operative, sondern auch strahlentherapeutische und medikamentös-adjuvante Konzepte einschließt. Das konkrete therapeutische Vorgehen bei der individuellen Patientin wird nach stanzbiptischer Diagnostik des Primärtumors und den Ergebnissen der bildgebenden Diagnostik unter Berücksichtigung des Tumorstadiums und des Ausfalls der prädiktiven Marker ER, PR, Ki-67, Her-2/neu geplant. Hierzu dient, auch wenn sich bestimmte therapeutische Vorgehensweisen als Standard herauskristallisiert haben, die Vorstellung jedes individuellen Falles in einem Brustzentrum. In diesen multidisziplinären Einrichtungen arbeiten Gynäkologen, Radiologen, Strahlentherapeuten, Onkologen und Pathologen mit dem Ziel einer Therapieoptimierung zusammen.

Im Folgenden sollen die Grundzüge der Therapie von Primärtumoren dargestellt werden; auf Aspekte der Behandlung von Metastasen und der Nachsorgen wird dabei verzichtet.

1.5.1. Grundzüge operativer Therapieverfahren

Grundlage der Therapie nicht-fortgeschrittener Mammakarzinome ist die evidenzbasierte Empfehlung 4.41 der aktuellen S3-Leitlinie für Mammakarzinome (Leitlinien Onkologie 2021): „Basis der Therapie für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome ist die Tumorsektion in-sano (R0-Status)“, ggf. begleitet oder gefolgt von weiteren therapeutischen Schritten.

Der häufigste operative Ablauf besteht in einer brusterhaltenden operativen Therapie (BET) durch eine anatomische Mammasegmentresektion des Tumors mit entsprechendem Sicherheitsabstand sowie einer Mitnahme der Sentinel-Lymphknoten sowie ggf. intraoperativ auffälliger Non-Sentinel-Lymphknoten der Axilla. Diese Vorgehensweise wird nach der S3-Leitlinie als indiziert angesehen, wenn der Tumor als lokal begrenzt gilt, das Verhältnis Tumorgröße zu Brustvolumen eine solche Resektion sinnvoll ermöglicht und in Fällen, in denen ein tumorübergreifender DCIS vorliegt, auch dieses im Gesunden entfernt werden konnte. In Situationen, in denen primär keine R0-Resektion erreicht werden konnte, wird inzwischen häufig noch über eine Nachresektion versucht, einen R0-Status brusterhaltend zu erreichen. Die BET ist in Kombination mit einer späteren Strahlentherapie der Restbrust prognostisch gleichwertig zu einer Mastektomie (Fischer et al 2002).

Eine subkutane Mastektomie oder eine Ablatio kommen bei fortgeschritteneren Konstellationen oder, wenn eine lokale Beherrschung des Primärtumors für nicht wahrscheinlich gehalten wird, zur Anwendung. Dazu gehören gemäß S3-Leitlinie R1-Situationen trotz Nachresektion, inflammatorische Karzinome oder Fälle, bei denen Kontraindikationen für eine adjuvante Strahlentherapie bestehen.

Bei fortgeschritteneren Fällen werden als Standardbehandlung neoadjuvante Konzepte der Operation vorangestellt, die denen der unten vorgestellten adjuvanten Verfahren ähneln und hier nicht weiter erläutert werden sollen. Dabei wird präoperativ eine Chemotherapie vorgenommen, und die Tumorentfernung erfolgt entsprechend erst ca. fünf bis sieben Monate nach Diagnosestellung. Diese wiederum kann dann sowohl brusterhaltend sein, als auch in einer subkutane Mastektomie oder Ablatio bestehen. Typische klinische Konstellationen hierfür sind lokal fortgeschrittenere Tumoren oder primär inoperable Tumoren, häufiger jeweils mit Triple-Negativität und/oder stanzbiologisch gesicherter axillärer Tumorausdehnung, sowie ferner die sogenannten inflammatorischen Karzinome. Damit die Tumorregion für den besten Fall einer kompletten Regression wieder aufgefunden wird, muss der Tumor mit einem röntgendichten Markierungsclip versehen werden, der auch der Pathologie bei der Diagnostik des Operationspräparates hilft.

Weitere seltene therapeutische Primäroptionen bestehen in einer primären Ablatio (z.B. bei ulzeriertem Karzinom), einer einfachen Tumorektomie (z.B. bei internistisch inoperablen Patientinnen oder ausgiebig fernmetastasierten Patientinnen, deren „Problem“ nicht der Primärtumor ist) oder einem Belassen des Tumors mit ausschließlich endokriner Therapie wie Tamoxifen und / oder Aromatasehemmern (z.B. bei postmenopausalen Patientinnen, die nicht operativ oder chemotherapeutisch behandelt werden können und deren Tumor Rezeptor-positiv ist).

Im Rahmen der Entscheidung über das operative Vorgehen sollte ganz allgemein für den Fall einer Mastektomie mit der Patientin die Option einer ein- bzw. zweizeitigen Brustrekonstruktion thematisiert werden (Leitlinien Onkologie 2020).

1.5.2. Grundzüge adjuvanter Therapieverfahren

Die adjuvante Therapie nach operativem Eingriff umfasst lokale und systemische Elemente. Hierzu zählen sowohl die adjuvante Strahlentherapie der betroffenen Brust und

ggf. der Lymphknotenstationen, als auch eine adjuvante medikamentöse Therapie. Diese kann in Form einer endokrinen Therapie, Chemotherapie oder Antikörpertherapie erfolgen (Leitlinien Onkologie 2020). Bei der Therapieplanung kann man sich nach wie vor an der Empfehlung aus dem Jahr 2013 orientieren (Goldhirsch et al. 2013), die die Zuordnung der Subtypen der Mammakarzinome zu therapeutischen Empfehlungen wiedergibt (Tabelle 2):

Subtyp	Therapieempfehlung
Luminal A	Endokrine Therapie
Luminal B (Her-2/neu negativ)	Endokrine Therapie + Chemotherapie
Luminal B (Her-2/neu positiv)	Endokrine Therapie + Chemotherapie + Antikörpertherapie
Her-2/neu positiv (ER/PR negativ)	Chemotherapie + Antikörpertherapie
Triple negativ	Chemotherapie

Tabelle 2: Empfehlung zur systemischen Behandlung nach Subtypen (Goldhirsch et al. 2013)

Strahlentherapie

Bei Patientinnen mit brusterhaltender Therapie (BET) wird eine Strahlentherapie des Restdrüsenkörpers vorgenommen, die eine Senkung des Rezidivrisikos bedingt. Eine Bestrahlung der Lymphabflusswege ist hingegen sowohl nach BET, als auch bei ausgedehnteren Operationen nicht mehr üblich, kann aber bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen hinzugenommen werden und bringt den Patientinnen nach fünf Jahren einen statistisch belegbaren Überlebensvorteil (Budach et al. 2015). Ebenso gibt es die Möglichkeit einer ausgedehnteren Strahlentherapie in Form einer Post-Mastektomie-Bestrahlung der Brustwand (insbesondere bei fortgeschrittenen Fällen, z.B. bei pT4, pN2 oder nach R1- oder R2-Resektion). Bei Fällen in solchen hohen Stadien ist eine Verbesserung des Gesamtüberlebens festzustellen bei gleichzeitig verringertem Rezidivrisiko (McGale et al. 2014).

Medikamentöse Therapie

Die Auswahl einer ergänzenden medikamentösen Therapie richtet sich in erster Linie nach den Kriterien des Tumorstadiums, aber in besonderem Maße auch nach dem Ausfall der prädiktiven Marker. Außerdem werden das Alter und der Menopausenstatus herangezogen. Allgemein gilt, dass eine eventuelle Chemotherapie der erste adjuvante Schritt wäre; endokrine Therapieformen oder Strahlentherapie können prinzipiell parallel erfolgen, werden jedoch erst nach der Chemotherapie angewendet.

Indikationen für eine Chemotherapie liegen nach der S3-Leitlinie für Tumoren vor, die ER- und PR-negativ sind, außerdem für Her-2/neu-positive Tumoren, ferner bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, bei Tumoren mit geringer Differenzierung (G3) und für Tumorerkrankungen, die bei Frauen < 35 Jahre auftreten. Da Chemotherapien ein reichliches Nebenwirkungsprofil aufweisen, muss für ihren Einsatz eine klare Indikation bestehen. Dies wird auch in der S3-Leitlinie noch einmal explizit in Kapitel 4.7.1 wie folgt dargelegt: *„Eine Chemotherapieindikation ergibt sich immer dann, wenn der individuelle zu erwartende Nutzen höher ist als mögliche Nebenwirkungen und Spätschäden. Dies erfordert eine differenzierte Aufklärung der Patientinnen, v. a. falls der zu erwartende Nutzen nur gering ist“* (S3 2021). Bei Mammakarzinomen soll den Leitlinien folgend eine Kombination aus einem Taxan und einem Anthrazyklin verwendet werden; alternativ kommt bei nur mittlerem, aber nicht hohem klinischen Risiko auch eine Kombination aus Docetaxel und Cyclophosphamid in Betracht.

Endokrine Therapien sind gemäß den Leitlinien für Patientinnen mit ER- und PR-positiven Tumoren sinnvoll. Sie sollen den durch Östrogen bedingten Wachstumsstimulus der Tumorzellen und die lokale Östrogenbiosynthese hemmen. Bei prämenopausalen Frauen wird eine 5-10 Jahre andauernde Tamoxifentherapie empfohlen. Für postmenopausale Frauen ist ein Therapiezeitraum von 5 Jahren vorgesehen, wobei Tamoxifen bei ihnen mit einem Aromatasehemmer kombiniert werden soll. Die Gabe

von GnRH-Analoga oder die bilaterale Ovariectomie sind Hochrisikosituationen vorbehalten. Ziele der Therapie sind ein verringertes Rezidivrisiko und ein erhöhtes Gesamtüberleben (Leitlinien Onkologie 2020).

Als weitere Option besteht die Möglichkeit einer Antikörpertherapie. Sie wird bei Patienten mit einer gesicherten Her-2 Überexpression im Tumor empfohlen. Die Behandlung erfolgt mit dem Antikörper Trastuzumab. Hier konnte ein signifikanter Vorteil zum rezidivfreien Gesamtüberleben des Patienten festgestellt werden (Moja et al 2012). Die Antikörpertherapie soll dabei parallel mit einer Chemotherapie erfolgen und wenn nötig auch mit einer endokrinen Therapie bei ER- und PR-Positivität kombiniert werden. Die Dauer der Antikörpertherapie mit Trastuzumab sollte ein Jahr betragen.

1.6 Prognose

Heutzutage werden bei Mammakarzinomen anhand klinisch-bildgebender, histologischer und tumorbiologischer Eigenschaften bereits viele Möglichkeiten wahrgenommen, die therapeutischen Entscheidungen möglichst individuell auf die Patientin zuzuschneiden und ihr so den therapeutisch geeignetsten Weg zu eröffnen. Insofern hängen bei dieser Tumorentität, die therapeutisch viel mehr Abzweige aufweist als viele andere Tumoren, Therapiewahl und Prognose besonders eng zusammen.

Gemäß den S3-Leitlinien sind neben dem Alter der Patientin folgende Befunde aus Makroskopie und Histologie als „prognostische und prädiktive Faktoren“ anzusehen:

- pTNM-Status und seine Komponenten,
- Resektionsrandstatus R mit Sicherheitsabständen zu allen Seiten
- histologischer Typ WHO-Klassifikation
- histologisches Grading nach Elston und Ellis
- peritumoraler Lymphgefäßinvasionsstatus L

Ergänzend sind die Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu obligatorisch, weil sich aus ihnen eine prognostisch relevante therapeutische Stratifizierung ableitet.

Bezüglich Ki-67 wird im unter 4.75 als „evidenzbasiertes Statement“ ausgeführt: *„Die Hinzunahme von Ki67 zu den konventionellen Prognosefaktoren (Alter, pT, pN, Grad, ER, PR, Her-2/neu) verbessert die Prognoseabschätzung bei Frauen mit histologisch gesichertem ER-/PR-positivem und Her-2/neu-negativem invasivem Mammakarzinom für die Entscheidung, ob eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden soll.“* Als gewisser Schwellenwert für ein erhöhtes Risiko wird ergänzend unter 4.76 als „konsensbasierte Empfehlung“ ein Ki-67-Wert von $\geq 25\%$ angegeben. Diese Angabe bezieht sich, den allgemeinen Vorgehensweisen in der Pathologie folgend, auf eine semiquantitative Schätzung durch einen einzelnen Befunder. Insgesamt hat somit die Ki-67-Bestimmung gemäß den Leitlinien eine Bedeutung für eine bestimmte Patientinnengruppe bei der Abwägung einer bestimmten Therapie.

Als einziger weiterer prädiktiver Marker werden in der Leitlinie Multigentests genannt. Ihr Einsatz wird als sinnvoll für eine Untergruppe der oben genannten Patientinnen angesehen, nämlich für die Gruppe mit negativem Lymphknotenstatus (pN0). Wenn die Bestimmung der Ki-67-Expression nicht eine Entscheidung herbeiführt, indem man sich nicht darauf festlegen mag, ob man den Wert als niedrig oder hoch ansieht, soll einer der mehreren verfügbaren Multigentests durchgeführt werden. Dieses wäre also der Fall, wenn die Ki-67-Expression in der „Grauzone“ zwischen anerkannt niedrig ($\leq 10\%$ oder $\leq 15\%$) oder anerkannt hoch ($\geq 25\%$) liegt.

Viele weitere in der wissenschaftlichen Literatur erprobte immunhistochemische Marker haben durchaus in Studien sinnvolle Ergebnisse erzielt, haben sich aber in der Leitlinien-gerichteten klinischen Medizin nicht durchgesetzt. Dazu gehören PCNA, das Rb-Protein, p53, CD44, p27, ferner auch Apoptosemarker. Das prognostisch durchaus

anerkannte uPa/PAI-1 ist inzwischen verlassen, weil hierfür unfixiertes Tumormaterial unter Einhaltung der Kühlkette asserviert werden muss. Seit allgemein anerkannt ist, dass statt einer offenen Biopsie im Schnellschnittverfahren (wie es bis weit in die 90er Jahre noch üblich war) die Tumordiagnose in einer stereotaktischen stanziobiologischen Diagnostik erbracht werden soll, steht nur noch in Ausnahmefällen Frischmaterial zur Verfügung, so dass uPa/PAI-1 keine Zukunft mehr in der Prognostik von Mammakarzinomen hat.

2. Ziel der Untersuchung und Ethikvotum

Wie vorherige Studien gezeigt haben, sind für die Prognose eines Mammakarzinoms viele Faktoren wichtig. In der Pathologie von Mammakarzinomen spielt der Nachweis von Tumormarkern dabei eine große Rolle. So kann mit ihrer Bestimmung sowohl eine Aussage zur Prognose des Krankheitsverlaufs als auch zur Planung und Durchführung einer möglichst individualisierten Therapie getroffen werden.

Der größte Teil der publizierten Studien betrachtet hierbei nur die Prognosefaktoren anhand des Primärtumors. Ein Bezug zum Lymphknotenstatus ist häufig erwähnt, eine Untersuchung auf Tumormarker-Expression aber kaum vorhanden. Auch die Expression von Ki-67 wurde häufig als prognostisch relevant beim primären Brustkrebs bewertet. Lymphknotenmetastasen wurden jedoch selten untersucht, und die prognostische Bedeutung ihrer Ki-67 Expression ist unklar. Hier ist die aktuelle Datenlage sehr schmal und wenig aussagekräftig.

In der vorliegenden Arbeit wird der prognostische Einfluss des Tumormarkers Ki-67 in Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomen im Vergleich zum Primärtumor betrachtet. In der vorliegenden Studie präsentieren wir prognostische Daten zu 39 Brustkrebsfällen, die sowohl im Primärtumor, als auch in den Lymphknotenmetastasen auf ihre Ki-67-Expression untersucht wurden und über bis zu 11,5 Jahre nachbeobachtet werden konnten.

Diese Studie ist Teil einer großen prognostischen Studie an Mammakarzinomen, innerhalb derer diverse immunhistochemische Variable erprobt wurden und in Teilprojekte eingingen; sie ist in diesem Zusammenhang die erste Arbeit, die sich mit Markerexpressionen an Lymphknotenmetastasen befasst.

Zu der vorliegenden Studie wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Studennummer 4217 vom 08. April 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Patientengut

In diesen Studien wurden 115 Patientinnen mit einem primären unilateralen Mammakarzinom über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 11,5 Jahren eingeschlossen. Dabei handelte es sich um konsekutive Fälle unilateraler Mammakarzinome, die am Institut Pathologie des RWTH Aachen diagnostiziert worden waren. Die Patientinnen erhielten alle eine stadiengerechte Behandlung nach den seinerzeit geltenden Leitlinien. Eine brusterhaltende Therapie wurde in den meisten Fällen angestrebt, bei fortgeschrittenen Tumoren wurde eine Mastektomie durchgeführt. Eine Level-1-Axilladisektion erfolgte standardmäßig. Je nach Stadium erfolgte eine leitlinienkonforme adjuvante Therapie.

Die Studienkohorte wurde hinsichtlich ihrer Altersverteilung, bestimmter Tumorcharakteristika, der erfolgten Therapie sowie des Langzeitverlaufs ausgewertet. Dabei wurden auch folgende Tumordaten mit analysiert:

- die Lokalisation des Primärtumors
- Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen
- TNM-Staging und Stadieneinteilung nach UICC
- Tumortypisierung nach WHO
- Tumorgrading nach Elston und Ellis
- Erhebung des laborchemischen und des immunhistochemischen Hormonrezeptorstatus
- Her-2/neu-Status
- Langzeitverlauf und Erhebung der Überlebensdaten

Das Patientenkollektiv umfasste Frauen mit einem Durchschnittsalter von 60 +/- 14 (SD) Jahren. Die Analyse möglicher Lymphknotenmetastasen ergab dabei bei 56 Patientinnen einen N1-Status und bei 59 Patientinnen einen N0-Status.

Für die vorliegende Studie waren von 39 N1-Fällen noch nutzbare Blockmaterialien vorhanden, welche sich für eine immunhistochemische Untersuchung eigneten. Die weiteren siebzehn Fälle konnten nicht mehr verwendet werden. In einzelnen Fällen waren im Rahmen der Primärdiagnostik der oder die befallenen Lymphknoten komplett aufgestuft worden. In anderen Fällen standen nur Mikrometastasen (< 0,2 mm Metastasengröße) zur Verfügung, die nicht repräsentativ gewesen wären. Weitere Fälle wiederum waren im Archiv nicht mehr vollständig, so dass die Blöcke mit befallenen Lymphknoten nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

3.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung von Mammakarzinomen wurde gemäß den Vorgaben der TNM-Klassifikation vorgenommen, indem die Größe des Primärtumors, der Lymphknotenstatus und eine gegebenenfalls vorhandene Fernmetastasierung separat beurteilt und dann in einem Gesamtstadium ("TNM-Stadium") zusammengefasst wurden; für die hier vorgelegte Arbeit wurde die TNM-Klassifikation der 5. Ausgabe der UICC (Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 1997) angewandt. Dabei wird "T" als Kategorisierungsmaß für die Ausdehnung des Primärtumors (T1-T4) verwendet, "N" für eine etwaige Metastasierung in regionäre Lymphknoten (N0-N3) und "M" für Fernmetastasen in z.B. Gehirn, Leber, Knochen oder Lunge, aber auch in nicht-regionären Lymphknoten. Das Präfix "p" bezieht sich auf eine Einteilung der Stadien nach histopathologischer Untersuchung. Für die hier vorliegende Arbeit wurde die Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation etwas vereinfacht angewandt, um zu viele und nur von wenigen Patientinnen besetzte Subgruppen zu vermeiden (Achterfeld 2019).

Für die Tumorgröße (pT) wurde wie folgt verfahren (Tabelle 3):

pT nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
pT0	kein Tumor nachweisbar	---
pTis	Carcinoma in situ, kein invasiver Tumor	---
pT1	Tumorgröße ≤ 2 cm	pT1
pT1mi	Mikroinvasion bis 0,1cm Größe	---
pT1a	Tumorgröße 0,1 cm - 0,5 cm	---
pT1b	Tumorgröße 0,5 cm - 1 cm	pT1
pT1c	Tumorgröße 1 cm - 2 cm	pT1
pT2	Tumorgröße 2 cm - 5 cm	pT2
pT3	Tumorgröße > 5 cm	pT3
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	pT4
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand	---
pT4b	Ödem oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust	pT4
pT4c	Kriterien von pT4a und pT4b zusammen	pT4
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom	pT4

Tabelle 3: Stadieneinteilung gemäß der TNM-Klassifikation für die postoperative Tumorgröße pT; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Einteilung verwendet (nach Achterfeld 2019). --- = Unbesetzte Gruppe.

Bei der Zuordnung des Lymphknotenstatus (pN) wurde ebenfalls auf eine Vereinfachung zurückgegriffen, die in Tabelle 4 wiedergegeben ist; dabei wurden die Unterkategorien pN1mi, pN1a, pN1b, pN1c, pN2a, pN2b, pN3a, pN3b und pN3c nicht aufgenommen.

pN nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
pNx	keine Lymphknoten nachweisbar	---
pN0	keine Lymphknotenmetastasen	pN0
pN1	Mikroskopische Metastasierung nachgewiesen durch Untersuchung des Schildwächterlymph-knotens, aber nicht klinisch erkennbar	---
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und / oder ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, aber nicht klinisch erkennbar	pN1
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen	pN1
pN3	Alle übrigen Konstellationen regionärer Lymphknotenmetastasen	---

Tabelle 4: Stadieneinteilung gemäß der TNM-Klassifikation für den postoperativen Lymphknotenstatus pN; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Einteilung verwendet (nach Achterfeld 2019). --- = Unbesetzte Gruppe

Bezüglich Fernmetastasen (M) wird bei Mammakarzinomen nur zwischen Nachweis und fehlendem Nachweis, gegebenenfalls mit Angabe des betroffenen Organs, unterschieden (Tabelle 5):

M nach TNM	Definition	Kategorie in der Studie
M0	keine Fernmetastasen nachgewiesen	M0
M1	Fernmetastasen nachgewiesen	M1

Tabelle 5: Stadieneinteilung gemäß der TNM-Klassifikation für die Fernmetastasierung M, die ohne Modifikation in die Studie übernommen wurde (nach Achterfeld 2019).

Aus den drei Einzelkategorien pT, pN und M wird dann aus der TNM-Formel des jeweiligen Tumors (z.B. pT2, pN0, M0) das zusammenfassende Stadium nach der UICC formuliert (z.B. hier IIa) (Tab. 6):

Stadium nach UICC	TNM-Konstellationen	Kategorie in der Studie
0	pT0, pN0, M0 und pTis, pN0, M0	---
I	pT1, pN0, M0	I
IIa	pT1, pN1, M0 und pT2, pN0, M0	II
IIb	pT2, pN1, M0 und pT3, pN0, M0	II
IIIa	pT1-pT3, pN2, M0 und pT3, pN1, M0	III
IIIb	pT4, pN1/pN2, M0	III
IIIc	pN3, M0 (unabhängig von pT)	III
IV	M1 (unabhängig von pT und pN)	IV

Tabelle 6: Stadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation für das Gesamtstadium nach UICC; bei der Auswertung der Fälle wurde die in der rechten Spalte dargestellte vereinfachte Einteilung verwendet (nach Achterfeld 2019). --- = Kategorie unbesetzt.

3.3 Malignitätsgradierung

Die Tumorgradierung erfolgte nach der nach Elston und Ellis modifizierten und allgemein üblichen Version des Grading, das Original von Bloom und Richardson entwickelt worden war durchgeführt (Bloom und Richardson 1957; Elston und Ellis 1991). Hierzu wurden die drei Kriterien des Grading semiquantitativ einzeln mit einem bis drei Punkten bewertet. Hierbei handelt es sich um das Ausmaß der Tubulusbildung (histologische Wachstumsform), die Kernpleomorphie (Zytologie der Tumorzellen) und die Mitoserate.

Beim originalen Grading von 1957 wurde ausschließlich geschätzt; die Modifikation nach Elston und Ellis besteht in der Angabe von Normwerten bei der Einordnung von Tubulusbildung und Mitosen (Tabellen 7 - 8).

Bewertung der Komponenten	Tubuläre Differenzierung	Kernpolymorphie	Mitoserate
1	> 75%	gering	0-6
2	10% - 75%	mäßig	7-11
3	< 10%	stark	ab 12

Tabelle 7: Dreigliedriges Grading für Mammakarzinome nach Elston und Ellis (1991). Die Prozentangaben bei der tubulären Differenzierung gehen auf lumenbildende Wachstumsformen des Tumors zurück. Bei der Bestimmung der Mitoserate werden 10 Gesichtsfelder mit 400x-facher Endvergrößerung bei einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm (Sehfeldzahl 18) und einer Gesamtfläche von 1,59 mm² ausgezählt. Bei Verwendung eines Mikroskops mit einem kleineren oder einem größeren Gesichtsfeldern werden die Grenzwerte angepasst (Bieserfeld, 1997).

Als zusammenfassende Angabe zum Grading als gut (G1), mäßig (G2) oder gering differenziert (G3) werden die Werte der drei Komponenten addiert und wie folgt interpretiert (Tabelle 8):

Grading	Summe der Werte der Grading-Komponenten	Interpretation
G1	3 bis 5	gut differenziert
G2	6 und 7	mäßig differenziert
G3	8 und 9	gering differenziert

Tabelle 8: Modifiziertes Grading des Mammakarzinoms nach Elston und Ellis (1991)

Das Grading, das primär für die invasiv-duktaalen Karzinome (heute: Adenokarzinom NST) entwickelt worden war, wird heute auch für invasiv-lobuläre Karzinome sowie auch für einige der seltenen Sonderformen angewandt.

3.4 Bestimmung des Hormonrezeptorstatus

Biochemische Analyse

Die Bestimmung des biochemischen Hormonrezeptorstatus erfolgte im Rahmen der primären Krankenversorgung im Rezeptorlabor der Frauenklinik der RWTH Aachen an unfixiertem Tumormaterial aus dem Primärtumor. Voraussetzung war die Einhaltung des Transportes des Gewebes auf Eis (sogenannte Kühlkette) vom Operationssaal über die Pathologie in das Speziallabor.

Dort wurde aus einem Tumorphomogenisat mithilfe eines *Dextran-Coated Charcoal Assay* (DCC) die Rezeptorbestimmung durchgeführt. Im Zytosol wurden die Konzentration freier Rezeptoren für ³H-markiertes 17 β-Östradiol für den Östrogenrezeptor (ER) bzw. für ³H-markiertes R5020 für den Progesteronrezeptor (PR) bestimmt. Grenzwerte für Rezeptorpositivität waren 10 fmol/mg Protein für ER und 20 fmol/mg Protein für PR, entsprechend der allgemein üblichen Grenzziehung vergleichbarer Studien.

Immunhistochemische Analysen

Im Rahmen der Studie wurden nachträglich auch die allgemein gängigen immunhistochemischen ER- und PR-Bestimmungen des Östrogen- und Progesteronrezeptors vorgenommen, die aber Teil eines separaten Projektes zum Vergleich der semiquantitativen und der quantitativen Bestimmung waren, so dass deren Daten in der hier vorgelegten Arbeit nicht mit verwendet werden konnten. Gleiches gilt auch für die Daten zur Bestimmung von Her-2/neu. Auf technische Details dieser Untersuchungen kann daher an dieser Stelle verzichtet werden.

3.5 Quantifizierung der Mitosezahl

Die Zahl der Mitosen wurde im Rahmen der Routinediagnostik an HE-gefärbten Schnittpräparaten des Primärtumors an zehn Gesichtsfeldern eines Varilux-Mikroskops (Leica Wetzlar) in 40x Objektivvergrößerung und 10x Okularvergrößerung (*high power field*, HPF) mit einem Gesichtsfelddurchmesser von je 450 µm bzw. einer Gesichtsfeldfläche von je 0,159 µm² bestimmt. Für die Identifikation der Mitosen wurden die gut definierten Kriterien aus der niederländischen Arbeitsgruppe um Baak (Baak et al. 1985, van Diest et al. 1992) zugrunde gelegt. Die Angabe der Mitosezahl erfolgte als reines Zahlenmaß pro 10 HPF ohne Bezug auf die dabei erfassten Tumorzellen im Ganzen.

Für die klinische Auswertung, die (siehe unten) für die Ki-67-Expression im Wesentlichen nach einem 1:2:1-Quantilisierungsmodell erfolgte, wurden drei Gruppen gebildet, deren Datenverteilung einer 1:2:1-Verteilung möglichst nahekommen sollte. Nimmt man als Grenzwerte für „geringe Mitosezahl“ 4 Mitosen / 10 HPF, für eine „mittlere Mitosezahl“ 5-14 Mitosen / 10 HPF und für eine „hohe Mitosezahl“ 15 und mehr Mitosen / 10 HPF, so ergab sich eine 1:2:1-ähnliche Verteilung von 34:53:28, die der „Idealverteilung“ von 29:58:28 nahekam. Andere Grenzziehungen hätten zu stärker verschobenen Datenverteilungen geführt.

3.6 Immunhistochemische Bestimmung der Ki-67-Expression

3.6.1 Herstellung und Färbung der Präparate

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Untersuchung wurden alle Präparate der Fälle noch einmal fachärztlich durchgesehen entschieden, von welchen Paraffinblöcken für den Gesamttumor repräsentative Areale des Primärtumors und (in entsprechenden Fällen) von Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch mit Ki-67 untersucht werden sollten.

Von diesen Paraffinblöcken wurden dann mehrere 2-3 µm dicke Schnitte abgenommen und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Danach erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Ki-67 in einem Färbeautomaten gemäß den *Standard Operation Procedures* (SOP) des Institutes. Als Primärantikörper diente ein gewerblicher MIB-1-Antikörper (Dianova 505, Verdünnung 1:10), als Sekundärantikörper hierzu passender vorverdünnter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung 1:100). Die lichtoptische Umsetzung des Reaktionsproduktes erfolgte mit Diaminobenzidin (DAB), die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Nach Ende der automatisierten Reaktions-, Färbe- und Spülvorgänge wurden die Präparate mit einem Eindeckmedium beschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Eine für Ki-67 positive Zelle stellte sich durch ein spezifisches braunes Färbesignal im Zellkern dar.

Als *on-slide*-Positivkontrolle wurde pro Schnittpräparat ein Tonsillenfragment mitgeführt, als Negativkontrolle pro Charge ein Tonsillenschnitt, bei dem der Primärantikörper ausgelassen worden war. Tonsillen weisen insbesondere in den Keimzentren verlässlich Ki-67-positive Zellkerne lymphatischer Zellen auf, ferner auch sporadisch Ki-67-positive Plattenepithelien der aufliegenden Schleimhaut. Viele Primärtumorschnitte enthielten ferner als interne Positivkontrolle auch Normalgewebe der Mamma auf, das sporadisch in einzelnen Zellen Ki-67 exprimiert, viele Lymphknotenmetastasen noch residuelles Lymphknotengewebe, das ebenfalls Ki-67-positive Zellen in den Keimzentren aufwies.

Von jedem der 115 Primärtumoren wurden die Untersuchungen an einem Schnitt vom demjenigen Paraffinblock durchgeführt, der die größte Tumorfläche enthielt.

Von jedem der 39 Fälle, von denen noch Paraffinblöcke mit Lymphknotenmetastasen verwendet werden konnten, wurden bis zu drei Lymphknoten in der Reihenfolge der zweidimensional ausgemessenen Tumorfläche analysiert. Dabei wurde vor Beginn des Projektes festgelegt, dass in die Überlebensanalyse (analog zum Primärtumor) der Lymphknoten mit der größten Tumorfläche eingehen sollte, unabhängig

davon, ob diese den höchsten oder einen weniger hohen Ki-67-Wert im Vergleich zu den anderen Lymphknotenmetastasen aufwies.

Von 18 Fällen standen drei Lymphknotenmetastasen zur Verfügung, von zehn Fällen zwei und von elf Fällen einer, so dass insgesamt 85 Lymphknotenmetastasen untersucht wurden. Ihre Tumorfläche betrug zwischen 1,8:1,5 mm (2,7 mm²) und 23:18 mm (414 mm²).

3.6.2 Auswertung der Präparate

TV-bildanalytische Auswertung

Die an Schnitten von 115 Primärtumoren durchgeführten Ki-67-Bestimmungen wurden in einer früheren Studie, deren Ergebnisse übernommen werden konnten, von einem erfahrenen Untersucher TV-bildanalytisch mit einem Meßsystem CM-2 der Firma Hund (Wetzlar) ausgewertet. Dabei wurden 20 Gesichtsfelder mit einer 20x-Objektivvergrößerung in Form von Monitorbildern (Gesamtfläche: 0,968 mm²) mit im Durchschnitt 6387 +/- 2189 (SD) Tumorzellen pro Fall erfasst. Als Variable wurden die mittlere Ki-67-Expression über alle 20 Gesichtsfelder und der Wert des Gesichtsfeldes mit der maximalen Ki-67-Expression herangezogen. Die Präparate der 39 Fälle mit Lymphknotenmetastasen, die erst später angefertigt wurden, standen für eine Bildanalyse nicht mehr zur Verfügung.

Konventionelle Auswertung

Die Auswertung der 115 Präparate von Primärtumoren und der 85 Präparate von Lymphknotenmetastasen wurde an einem Orthoplan-Mikroskop (Leica, Wetzlar) durchgeführt. Die Zählung Ki-67-positiver Zellen wurde mithilfe eines 63x vergrößernden Öl-Objektivs bei 10x Okularvergrößerung an denjenigen Arealen des Tumorgewebes vorgenommen, die den größten Tumorzellgehalt aufwiesen. Der

Durchmesser des Gesichtsfeldes betrug 297 μm , die Gesichtsfeldfläche betrug entsprechend 0,069 mm^2 . Zum Erhalt einer repräsentativen Zahl an Messzellen pro Präparat wurden jeweils 8 Gesichtsfelder mit 0,552 mm^2 Gesamtfläche untersucht.

Hierbei wurden an den Primärtumoren im Durchschnitt 2132 \pm 474 (SD) Tumorzellen pro Präparat ausgewertet, an den Lymphknotenmetastasen 2059 \pm 233 (SD).

Die Werte für die Primärtumoren lagen bereits vor, für die Lymphknotenmetastasen wurden sie im Rahmen dieser Studie erhoben. Ziel der Untersuchung war, die Zahl immunreaktiver Tumorzellkerne zu quantifizieren und auf die Gesamtzahl der Tumorzellkerne prozentual zu beziehen. Daher wurde die Ki-67-Expression jeweils als Quotient der immunreaktiven Tumorzellen zu allen Tumorzellen berechnet und als prozentualer mittlerer Wert ausgedrückt. Auf die Erhebung eines Maximalwertes wurde verzichtet, weil dieser bei der häufig geringen Größe der Lymphknotenmetastasen nicht als sicher repräsentativ gelten kann.

Gruppierung der Messwerte für die statistische Auswertung

Für die Auswertung wurde ein 1:2:1-Quantilisierungsmodell ausgewählt, das dazu führt, dass das untere Viertel der Mess- bzw. Zählwerte als niedrig galt (Q1), die daran sich anschließende Hälfte der Werte als mittel (Q2) und das letzte Viertel der Werte als hoch (Q3) Die im Folgenden angegebenen Grenzwerte beziehen sich allesamt auf das größere Kollektiv der Primärtumoren und wurden für die Lymphknotenmetastasen übernommen (Tabelle 9). Die Vergleichswerte für die Lymphknotenmetastasen sind nachrichtlich für die Metastase mit der größten Tumorfläche mit angegeben. Für die Validierung der multivariaten Überlebensanalyse wurde auch mit dem Median als Grenzwert gearbeitet, wie in Kapitel 4.3 dargestellt.

Quantilgrenzen für die Ki-67-Expression	TV-Bildanalyse (Mittelwert)	TV-Bildanalyse (Maximalwert)	Zählung (Primärtumor)	Zählung (Lk-Metastase)
Q1 / Q2	2,5%	7,6%	2,4%	7,2%
Q2 / Q3	12,7%	30,9%	13,0%	22,4%

Tabelle 9: Grenzwerte der Ki-67-Expression für die Einteilung in drei statistisch auswertbare Gruppen für eine 1:2:1-Quantilisierung

3.7 Statistik

Alle statistischen Untersuchungen wurden mit dem am Institut für Pathologie in Koblenz etablierten Programmpaket BMDP des *Department of Biomathematics* der *University of California*, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA, vorgenommen (Dixon 1981). Das BMDP gliedert sich in verschiedene Unterprogramme, die im Folgenden in Klammern angegeben sind.

Die biometrischen Grunddaten (Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient) wurden mit den Unterprogrammen 1D bzw. 2D ausgewertet. Ferner standen bei speziellen Fragestellungen die Berechnung von Korrelationskoeffizienten (4M), von t-Tests (3D) sowie von Mehr-Felder-Tafeln (4F) zur Verfügung. Die Mehr-Felder-Tafeln wurden dabei mit dem Pearson Chi²-Test auf statistische Signifikanz (4F) untersucht. Die univariate Überlebensanalyse (1L) wurde nach Kaplan und Meier (1958) erstellt und mit dem Wilcoxon-Breslow-Test (Breslow 1970) auf statistische Signifikanz überprüft. Die multivariate Überlebensanalyse erfolgte mit dem *Cox Proportional Hazard Regression Model* (Cox 1972), im Folgenden als Cox-Modell bezeichnet (2L). Das Ergebnis des Cox-Modells wurde wiederum in einer univariaten Überlebensanalyse validiert (1L).

Statistische Signifikanz wurde definitionsgemäß jeweils für ein α -Niveau von $\leq 0,05$ (Cox-Modell: $\leq 0,10$) akzeptiert. Die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese H_0 irrtümlich abzulehnen, beträgt entsprechend $\leq 5\%$ ($\leq 10\%$).

4 Ergebnisse

4.1 Univariate Überlebensanalyse für alle 115 Patientinnen

Der Beobachtungszeitraum aller Patientinnen lag im Durchschnitt bei 11,5 Jahren, bezogen auf die Gesamtzahl der Patientinnen ($n = 115$). Der Anteil überlebender Patientinnen betrug 46,1%. Die Analyse der 5 und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit ergab 66,1% und 47,1%. Nach Diagnosestellung überlebten die Patientinnen im Mittelwert 7,6 Jahre. Das mediane Überleben betrug 8,7 Jahre. Die Überlebenskurve aller Patientinnen ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

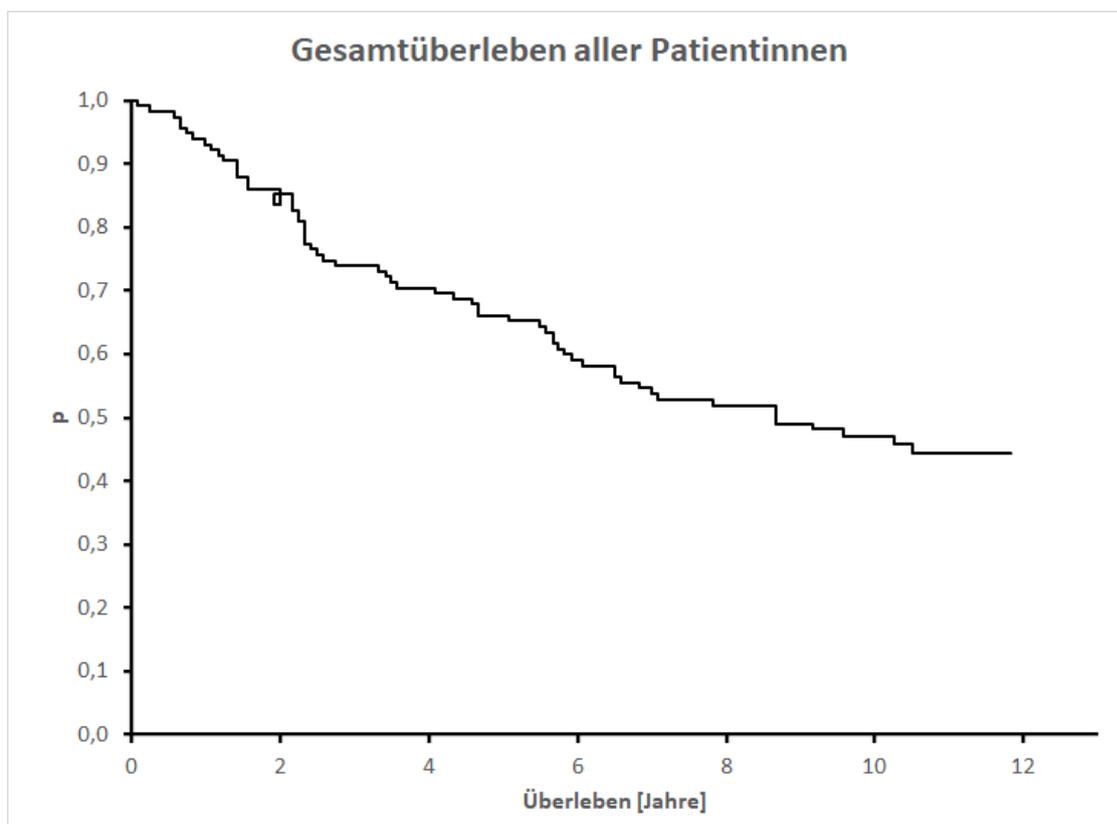


Abbildung 3: Überlebenskurve zum Gesamtüberleben aller 115 Patientinnen

4.1.1 Überlebensanalyse nach TNM-Klassifikation

Die Korrelation zwischen dem Überleben der Patientinnen und den Variablen der TNM-Klassifikation ist in den Tab. 10-13 und den Abb. 4-7 dargestellt. Ein fortgeschritteneres

Tumorstadium geht mit einer signifikant geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einher. Bei einer Patientin lagen keine Angaben zu pN und M vor.

4.1.1.1 Postoperative Tumorgröße (pT)

pT	1	2	3	4
Patientenanzahl (n=115)	20	68	18	9
Verstorbene Patienten	7	38	11	6
Mittl. Überleben (Jahre)	9,2	7,8	6,0	4,6
5-Jahres-ÜLW (%)	85,0	70,6	44,4	33,3
10-Jahres-ÜLW (%)	64,4	46,6	38,9	-

Tabelle 10: Überleben im Bezug zur Tumorgröße (pT) (p-Wert: 0,0268)

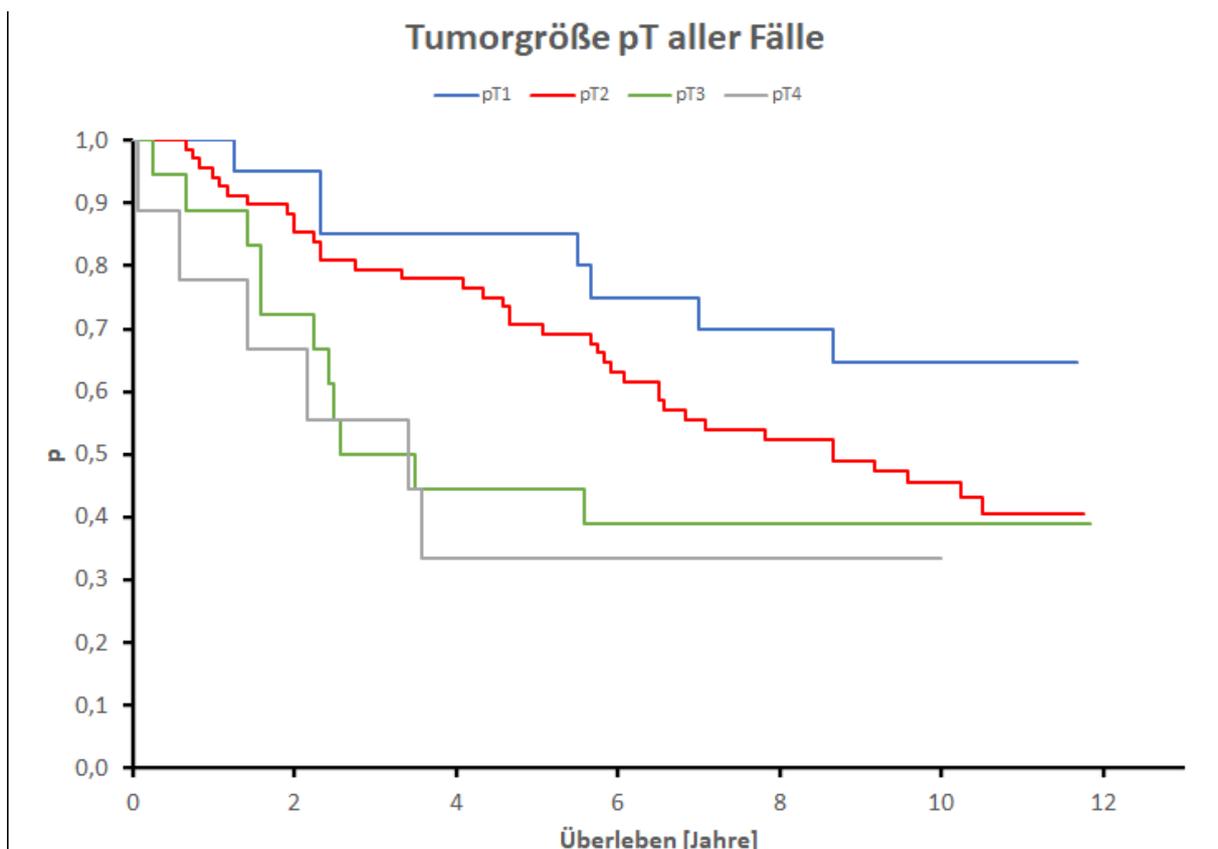


Abbildung 4: Überlebenskurven zur Tumorgröße (pT)

4.1.1.2 Postoperativer Lymphknotenstatus (pN)

pN	0	1
Patientenanzahl (n=114)	59	55
Verstorbene Patienten	23	38
Mittl. Überleben (Jahre)	9,0	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	79,7	50,1
10-Jahres-ÜLW (%)	63,8	30,0

Tabelle 11: Überleben im Bezug zum Lymphknotenstatus (pT) (p-Wert: 0,0003)

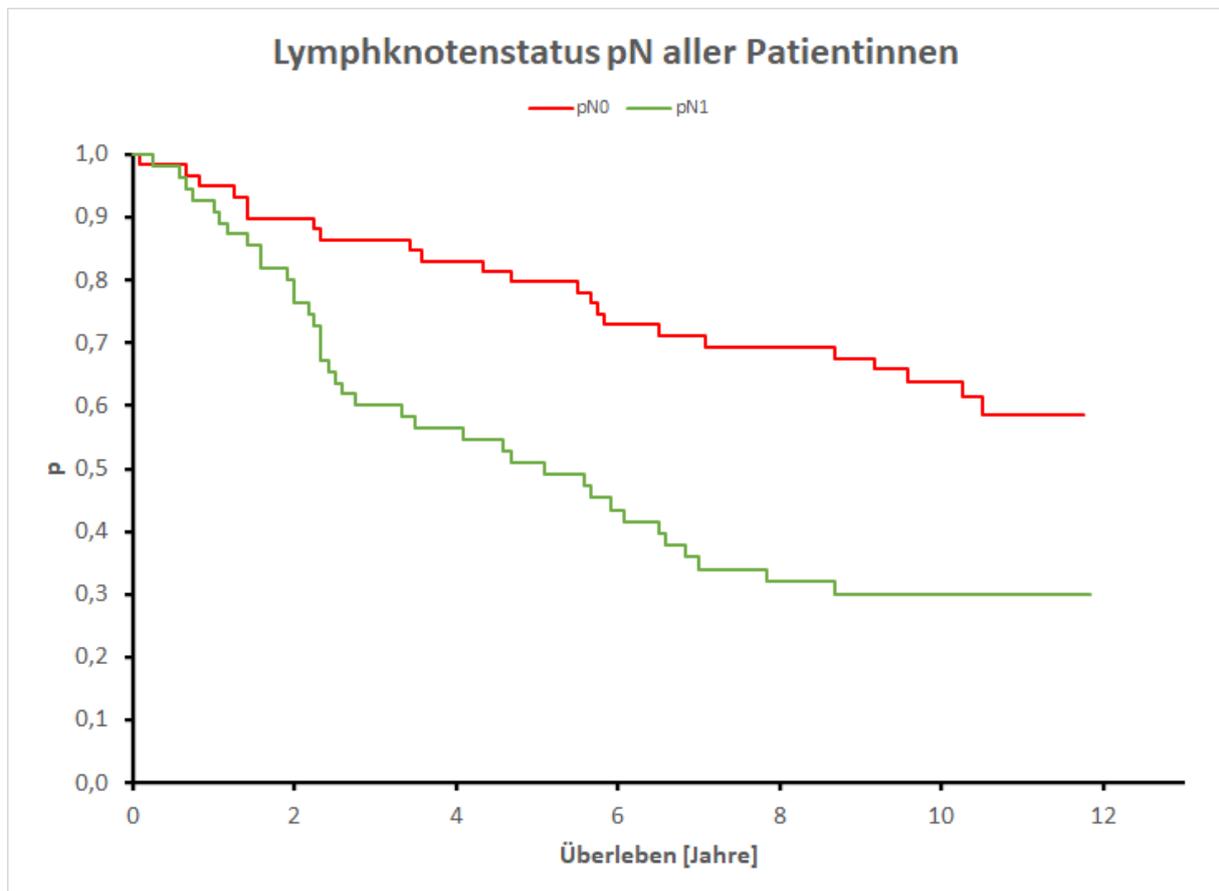


Abbildung 5: Überlebenskurven zum Lymphknotenstatus (pN)

4.1.1.3 Fernmetastasierung (M)

M	0	1
Patientenanzahl (n=114)	106	8
Verstorbene Patienten	54	8
Mittl. Überleben (Jahre)	7,8	3,6
5-Jahres-ÜLW (%)	68,9	25
10-Jahres-ÜLW (%)	50,3	-

Tabelle 12: Überleben im Bezug zu Fernmetastasen (M) (p-Wert: < 0,0001)

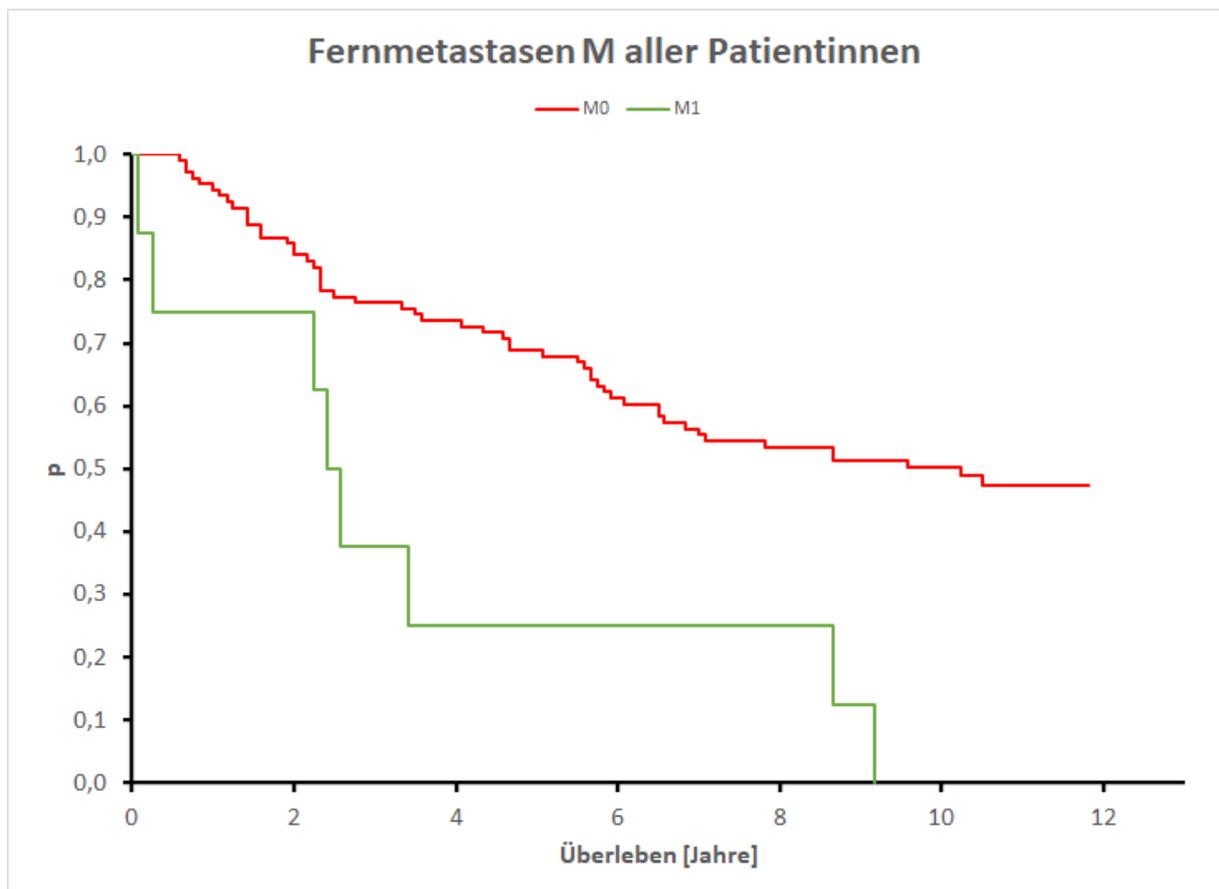


Abbildung 6: Überlebenskurven zur Fernmetastasierung (M)

4.1.1.4 Postoperatives Tumorstadium (pTNM)

pTNM	1	2	3	4
Patientenanzahl (n=114)	14	76	16	8
Verstorbene Patienten	3	40	11	8
Mittl. Überleben (Jahre)	10,0	7,9	5,2	3,6
5-Jahres-ÜLW (%)	92,9	71,0	37,5	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	78,6	48,9	31,3	12,5

Tabelle 13: Überleben im Bezug zum Tumorstadium (pTNM) (p-Wert: 0,0001)

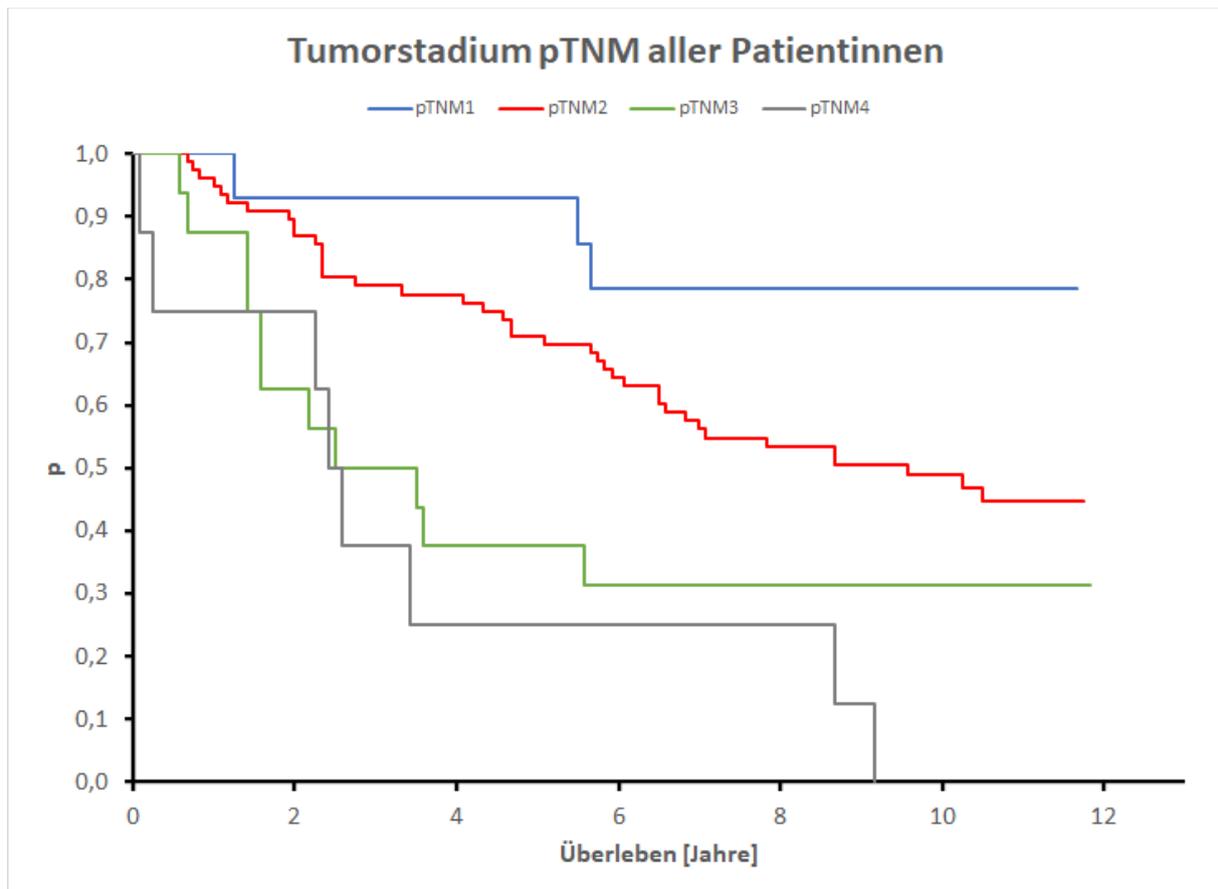


Abbildung 7: Überlebenskurven zum Tumorstadium (pTNM)

4.1.2 Überlebensanalyse nach Tumorgrading

Die Tumordifferenzierung hat einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patientinnen (Tab. 14, Abb. 8). Auf die einzelnen Komponenten (tubuläre Differenzierung, Kernpleomorphie, Mitoserate) wird hier nicht eingegangen.

Grading	1	2	3
Patientenanzahl (n=115)	19	58	37
Verstorbene Patienten	7	28	26
Mittl. Überleben (Jahre)	8,7	8,3	5,8
5-Jahres-ÜLW (%)	73,7	74,1	48,7
10-Jahres-ÜLW (%)	62,7	52,8	31,5

Tabelle 14: Überleben im Bezug zum Tumorgrading (p-Wert: 0,0061)

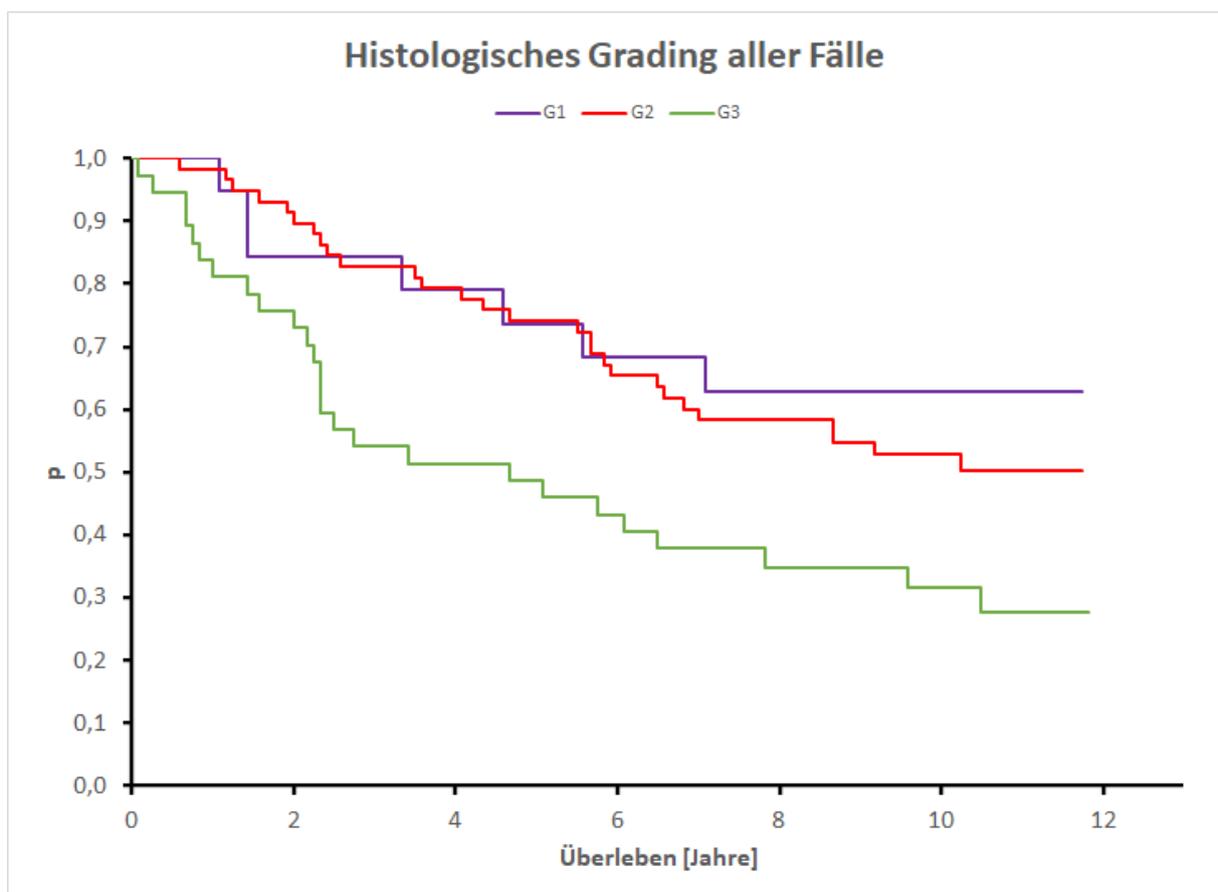


Abbildung 8: Überlebenskurven zum Tumorgrading

4.1.3 Überlebensanalyse nach Quantifizierung der Mitosezahl

Die Quantifizierung der Mitosezahl war hochsignifikant in der Prognostik der Patientinnen (Tab. 15, Abb. 9) und prognostisch im Vergleich der Überlebenskurven offenbar deutlich wichtiger als das Tumorigradung.

Mitosezahl	≤ 4	5 - 14	> 14
Patientenanzahl (n=115)	34	53	28
Verstorbene Patienten	11	295	21
Mittl. Überleben (Jahre)	9,6	7,8	4,4
5-Jahres-ÜLW (%)	85,2	71,7	29,6
10-Jahres-ÜLW (%)	70,6	45,1	22,2

Tabelle 15: Überleben im Bezug zur Mitosezahl (p-Wert: < 0,0001)

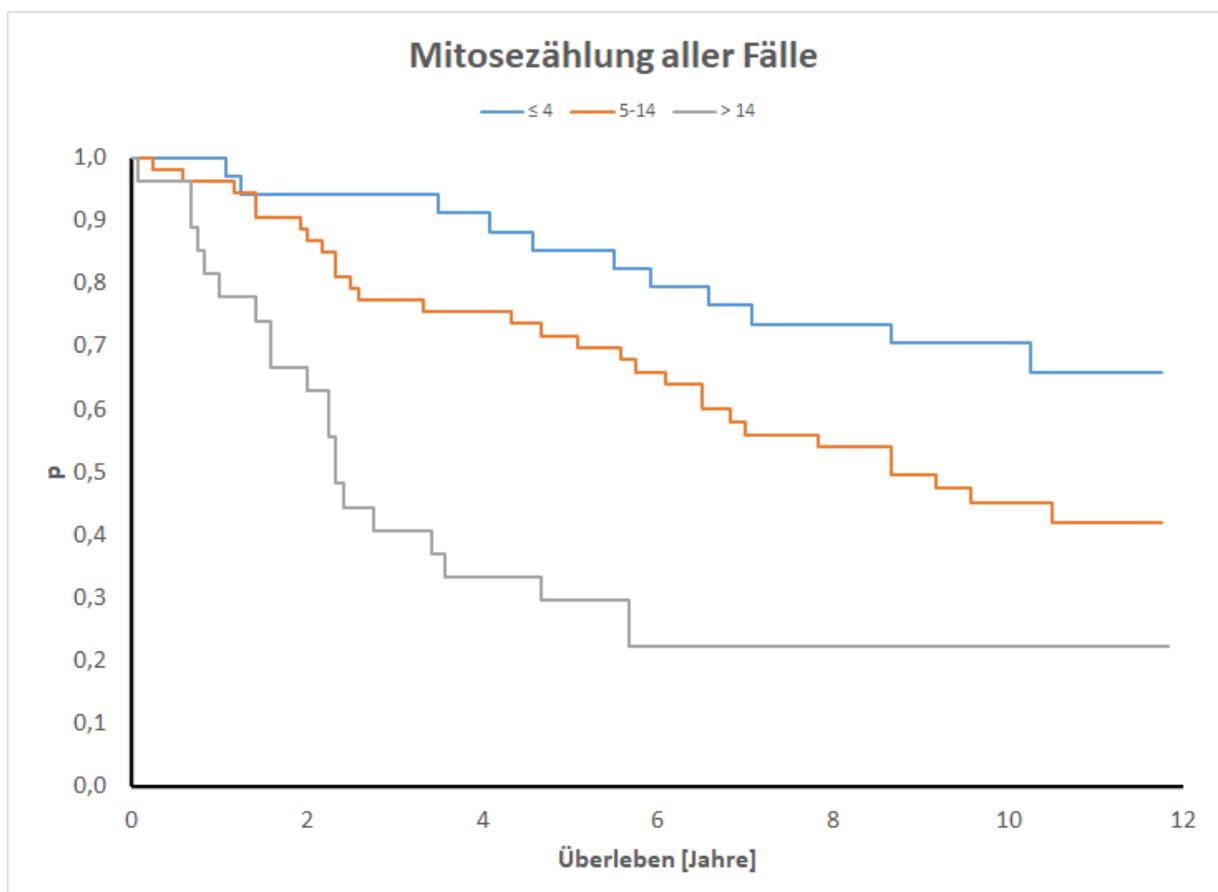


Abbildung 9: Überlebenskurven zur Mitosezahl

4.1.4 Überlebensanalyse nach Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR)

Ein positiver ER bzw. PR-Status ging mit einer besseren Überlebenschance einher, wobei diese aber nur für PR statistisch signifikant war (Tab. 16-17, Abb. 10-11).

4.1.4.1 Östrogenrezeptorstatus

Östrogenrezeptorstatus	Negativ	Positiv
Patientenanzahl (n=115)	30	85
Verstorbene Patienten	16	46
Mittl. Überleben (Jahre)	6,9	7,8
5-Jahres-ÜLW (%)	56,7	69,4
10-Jahres-ÜLW (%)	46,2	47,3

Tabelle 16: Überleben im Bezug zum Östrogenrezeptorstatus (p-Wert: 0,2693)

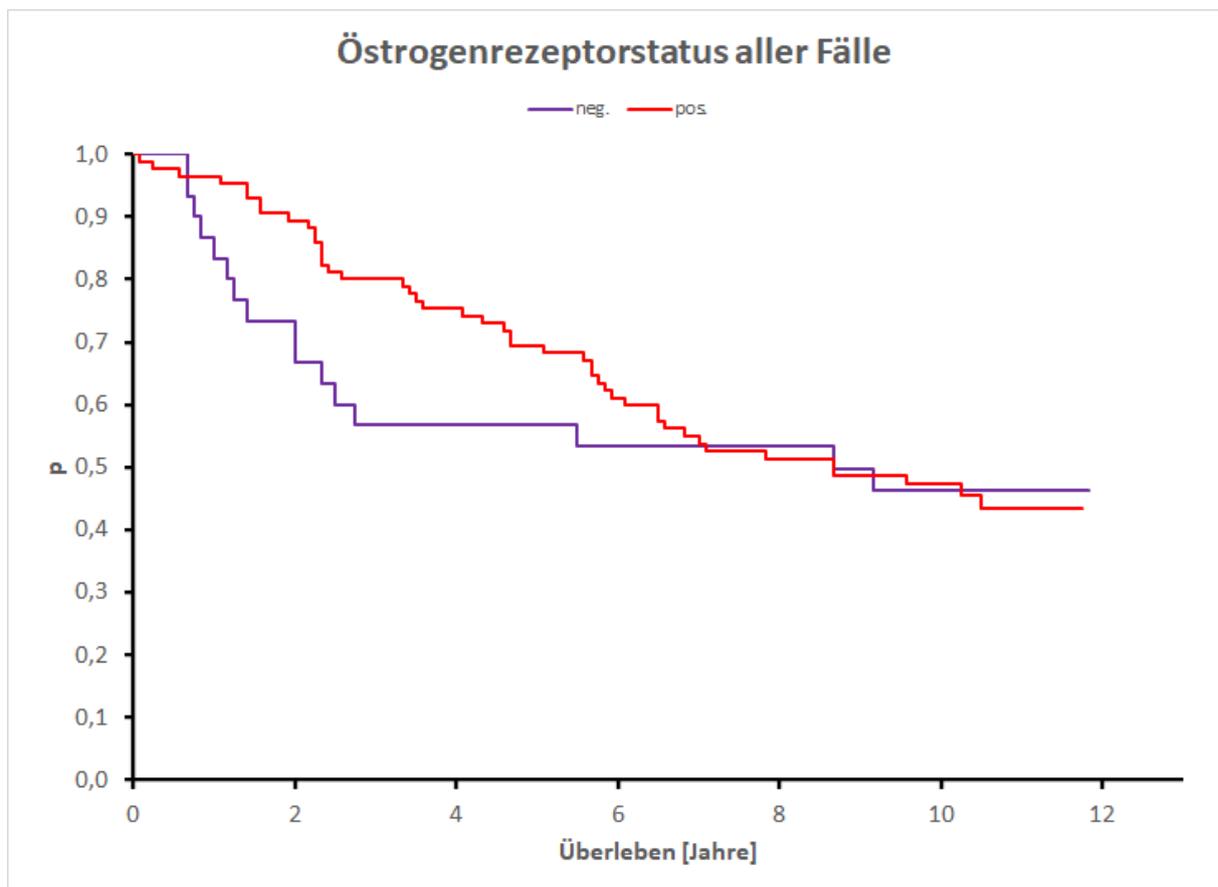


Abbildung 10: Überlebenskurven zum Östrogenrezeptorstatus

4.1.4.2 Progesteronrezeptorstatus

Progesteronrezeptorstatus	Negativ	Positiv
Patientenanzahl (n=115)	56	59
Verstorbene Patienten	35	27
Mittl. Überleben (Jahre)	6,6	8,4
5-Jahres-ÜLW (%)	55,4	76,3
10-Jahres-ÜLW (%)	40,6	53,1

Tabelle 17: Überleben im Bezug zum Progesteronrezeptorstatus (p-Wert: 0,0196)

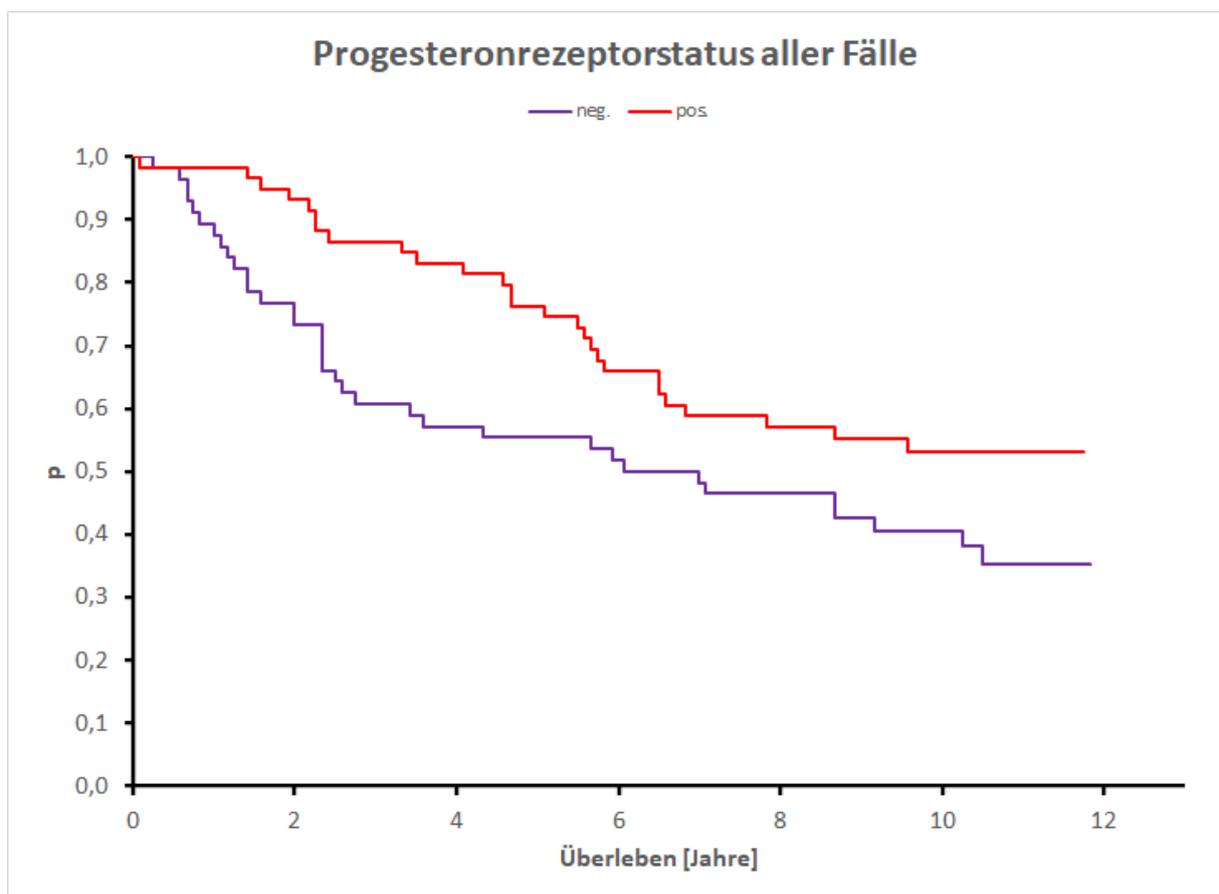


Abbildung 11: Überlebenskurven zum Progesteronrezeptorstatus

4.1.5 Überlebensanalyse nach Ki-67 Proliferationsfraktion

Die Ki-67-Expression wurde sowohl TV-bildanalytisch (Mittelwert, Maximalwert), als auch durch manuelle Auszählung (Mittelwert) vorgenommen. Jeweils konnte ein signifikanter Einfluss auf die Prognose dargestellt werden (Tab. 18-20, Abb. 12-14).

4.1.5.1 Mittlere Ki-67-Expression (TV-bildanalytische Quantifizierung)

Ki-67-Expression (%)	Q1 ($\leq 2,5$)	Q2 (2,5 - 12,7)	Q3 ($> 12,7$)
Patientenanzahl (n=115)	27	60	28
Verstorbene Patienten	9	35	18
Mittl. Überleben (Jahre)	9,8	7,0	6,3
5-Jahres-ÜLW (%)	92,6	60,0	53,6
10-Jahres-ÜLW (%)	66,7	41,8	39,3

Tabelle 18: Überleben im Bezug zur TV-bildanalytisch ermittelten mittleren Ki-67-Expression (p-Wert: 0,0108)

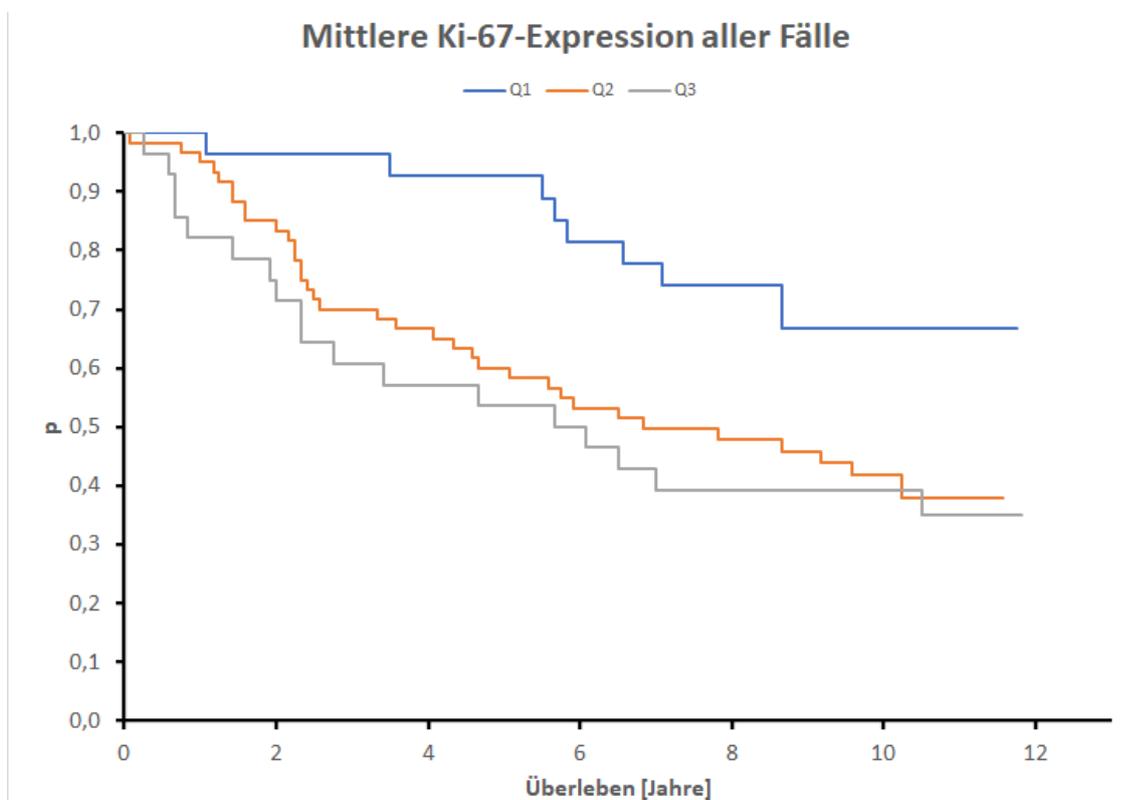


Abbildung 12: Überlebenskurven zur mittleren Ki-67-Expression (TV-Bildanalyse)

4.1.5.2 Maximale Ki-67-Expression (TV-bildanalytische Quantifizierung)

Ki-67-Expression (%)	Q1 (< 7,55)	Q2 (7,55 - 30,9)	Q3 (> 30,9)
Patientenanzahl (n=115)	26	61	28
Verstorbene Patienten	9	34	18
Mittl. Überleben (Jahre)	9,4	7,5	5,8
5-Jahres-ÜLW (%)	84,6	67,2	46,4
10-Jahres-ÜLW (%)	65,3	44,5	35,7

Tabelle 19: Überleben im Bezug zur TV-bildanalytisch ermittelten maximalen Ki-67-Expression (p-Wert: 0,0067)

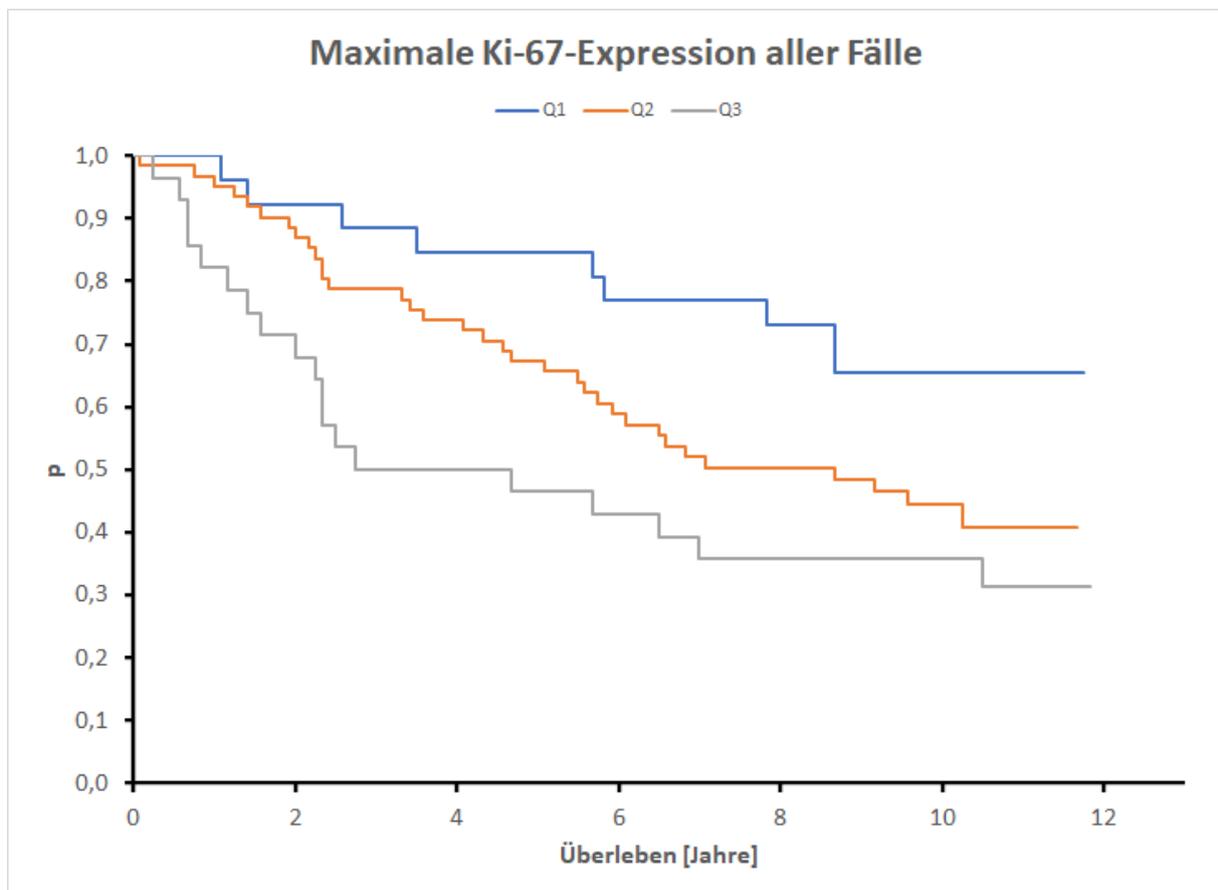


Abbildung 13: Überlebenskurven zur maximalen Ki-67-Expression (TV-Bildanalyse)

4.1.5.3 Mittlere Ki-67-Expression bei manueller Auszählung

Ki-67-Expression (%)	Q1 (< 2,4)	Q2 (2,4 - 13,0)	Q3 (> 13,0)
Patientenanzahl (n=115)	28	58	29
Verstorbene Patienten	8	34	20
Mittl. Überleben (Jahre)	10,0	7,2	5,9
5-Jahres-ÜLW (%)	89,3	63,8	48,3
10-Jahres-ÜLW (%)	71,4	41,6	34,5

Tabelle 20: Überleben im Bezug zur manuell ausgezählten mittleren Ki-67-Expression (p-Wert: 0,0020)

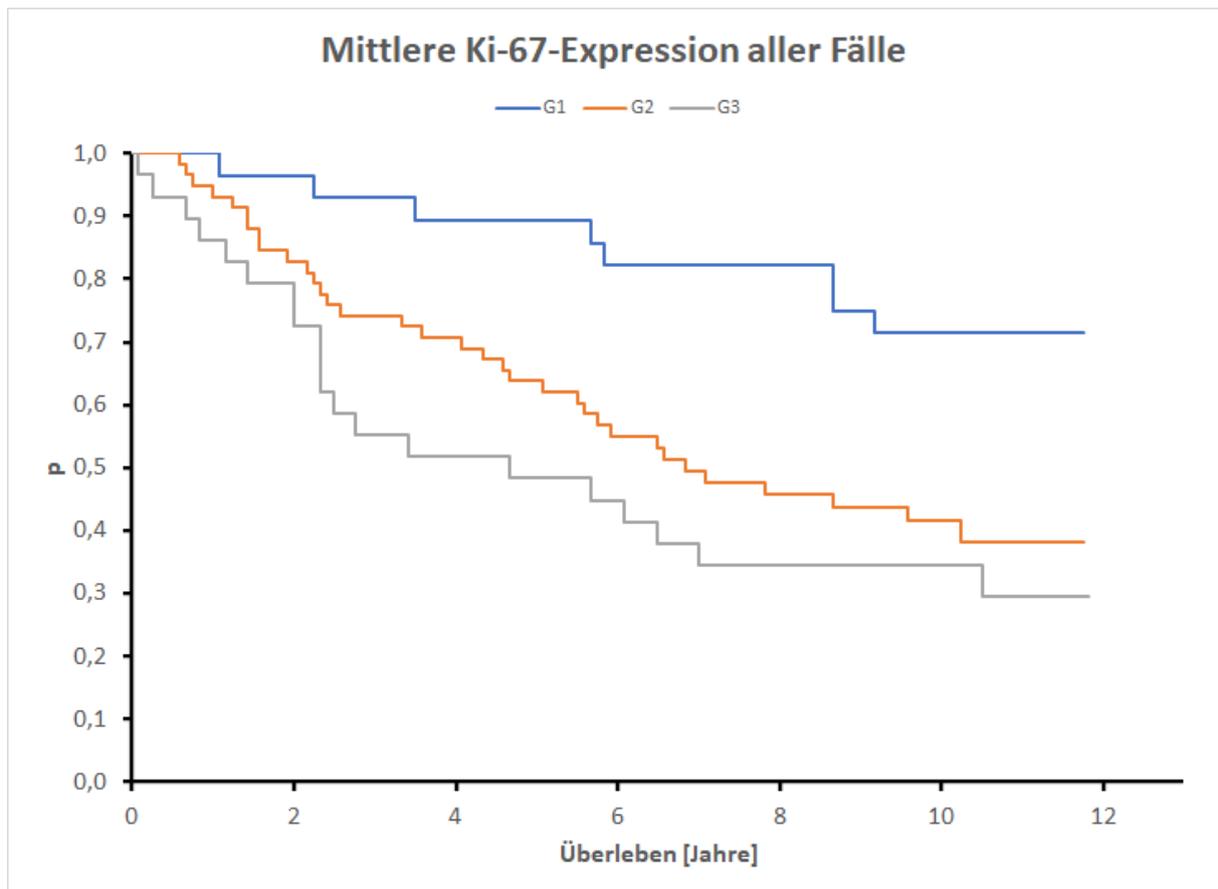


Abbildung 14: Überlebenskurven zur mittleren Ki-67-Expression (manuelle Auszählung)

4.2 Univariate Überlebensanalyse für 39 Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen

Im Folgenden werden die 39 axillär metastasierten Patientinnen (N1) berücksichtigt, bei denen an mindestens einer Lymphknotenmetastase Untersuchungen zur Ki-67-Expression erfolgen konnte. Der Anteil überlebender Patientinnen betrug 30,8%. Die 5 und 10- Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten ergaben 48,8% und 29,8%. Das mittlere und das mediane Überleben lagen bei 5,8 Jahre bzw. 4,1 Jahren (Abb. 15).

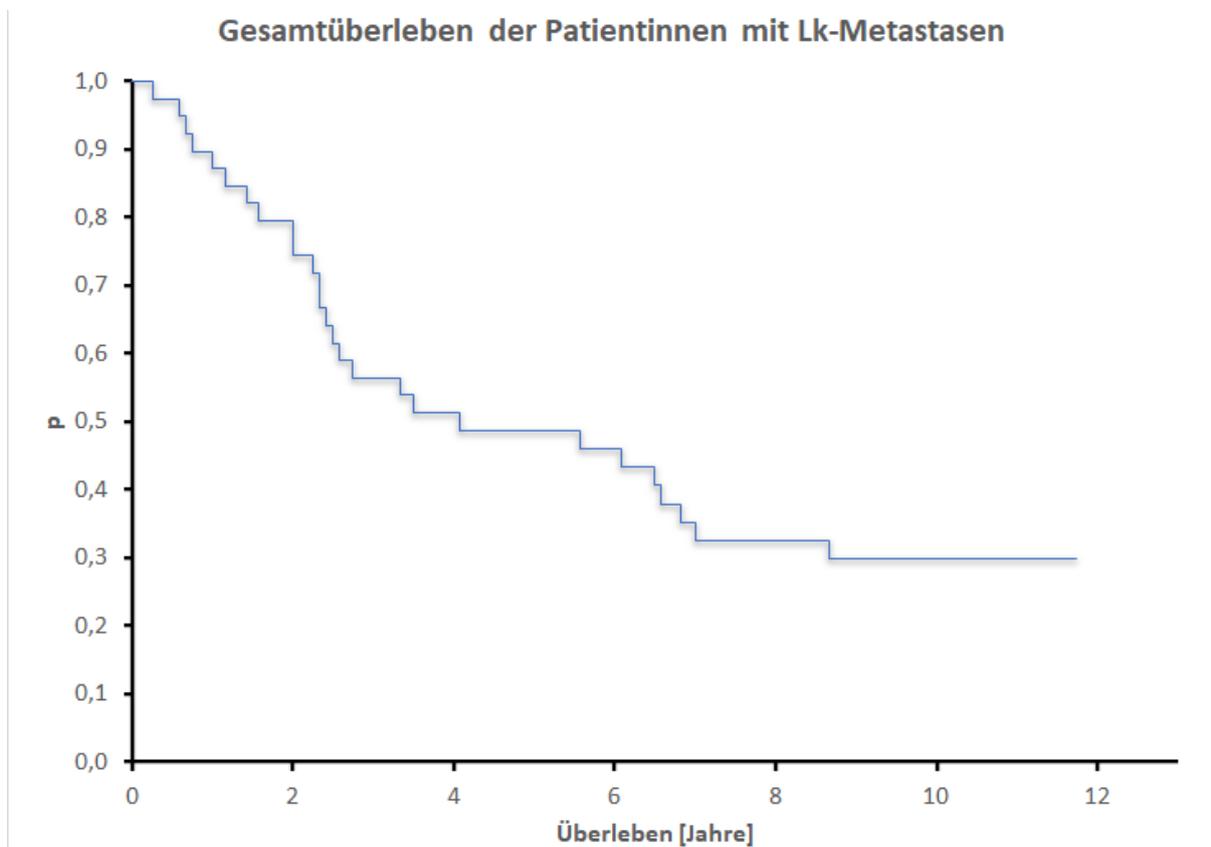


Abbildung 15: Überlebenskurve zum Gesamtüberleben der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen

4.2.1 Überlebensanalyse der N1-Fälle nach TNM-Klassifikation

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten mit N1-Status und dem Vorhandensein von Metastasen (pM). Weiterhin korreliert ein

fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer signifikant geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit. Die TumorgroÙe (pT) hatte bei N1-Patienten keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Bei einer Patientin lag kein Wert für M und entsprechend auch für pTNM vor (Tab. 21-23, Abb. 16-18).

4.2.1.1 Postoperative TumorgroÙe (pT) der N1-Fälle

pT	1	2	3	4
Patientenanzahl (n=39)	2	22	12	3
Verstorbene Patienten	2	14	10	1
Mittl. Überleben (Jahre)	4,7	6,6	3,8	6,9
5-Jahres-ÜLW (%)	50,0	59,1	25,0	66,7
10-Jahres-ÜLW (%)	-	34,5	16,7	-

Tabelle 21: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur TumorgroÙe (pT) (p-Wert: 0,2945)

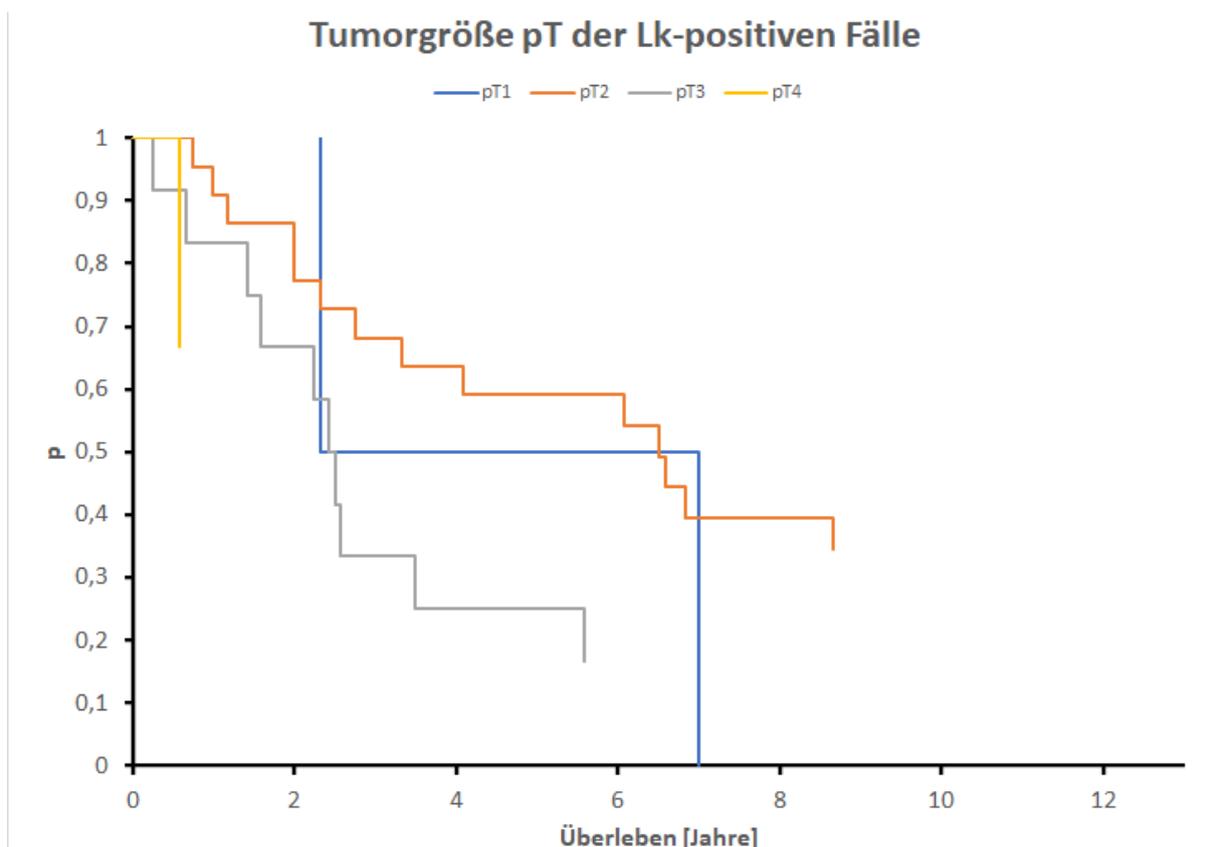


Abbildung 16: Überlebenskurven von N1-Fällen zur TumorgroÙe (pT)

4.2.1.2 Fernmetastasierung (M) der N1-Fälle

M	0	1
Patientenanzahl (n=38)	34	4
Verstorbene Patienten	23	4
Mittl. Überleben (Jahre)	6,1	1,9
5-Jahres-ÜLW (%)	52,9	-
10-Jahres-ÜLW (%)	31,1	-

Tabelle 22: Überleben von N1-Fällen im Bezug zu Fernmetastasen (M) (p-Wert: 0,0381)

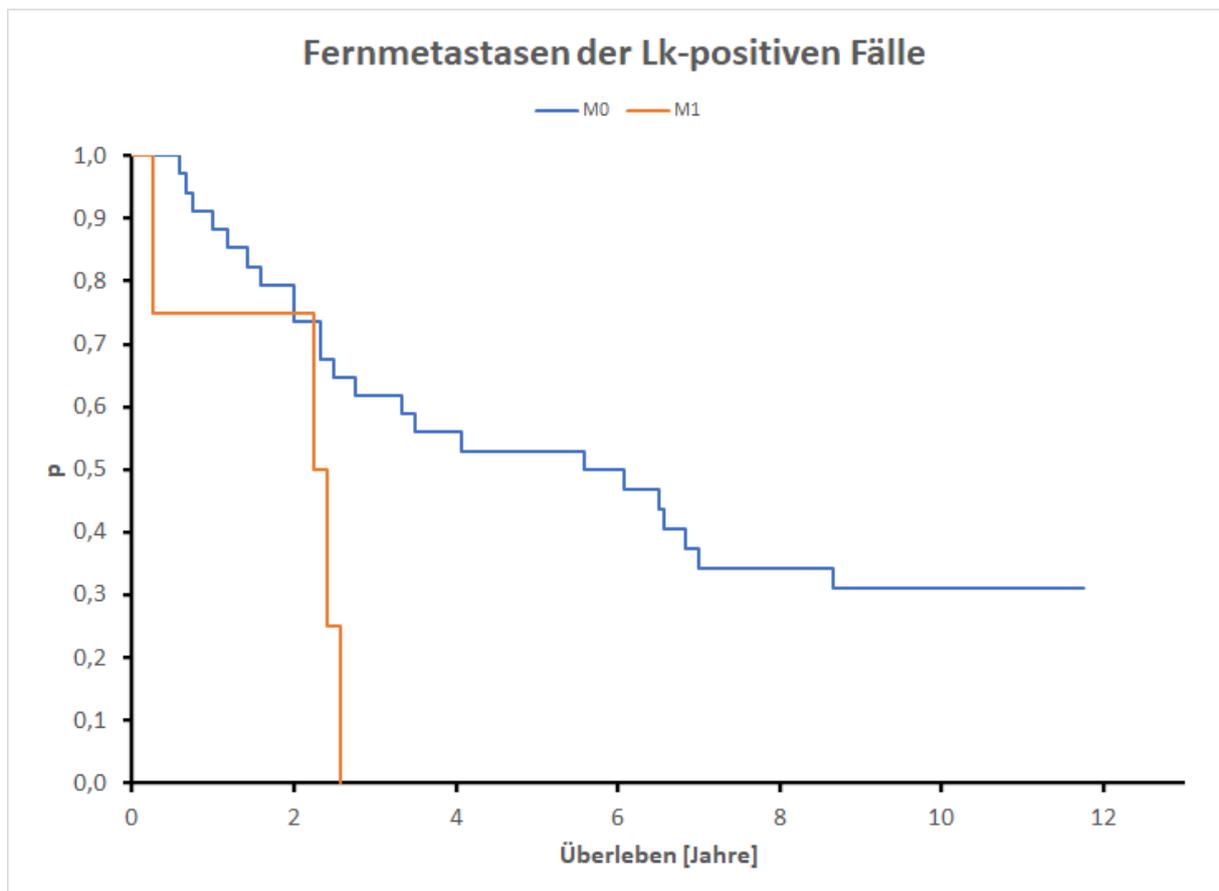


Abbildung 17: Überlebenskurven von N1-Fällen zur Fernmetastasierung (M)

4.2.1.3 Postoperatives Tumorstadium (pTNM) der N1-Fälle

pTNM	2	3	4
Patientenanzahl (n=38)	24	10	4
Verstorbene Patienten	16	7	4
Mittl. Überleben (Jahre)	6,5	5,1	1,9
5-Jahres-ÜLW (%)	58,3	40,0	-
10-Jahres-ÜLW (%)	31,4	30,0	-

Tabelle 23: Überleben von N1-Fällen im Bezug zum Tumorstadium (pTNM) (p-Wert: 0,0668)

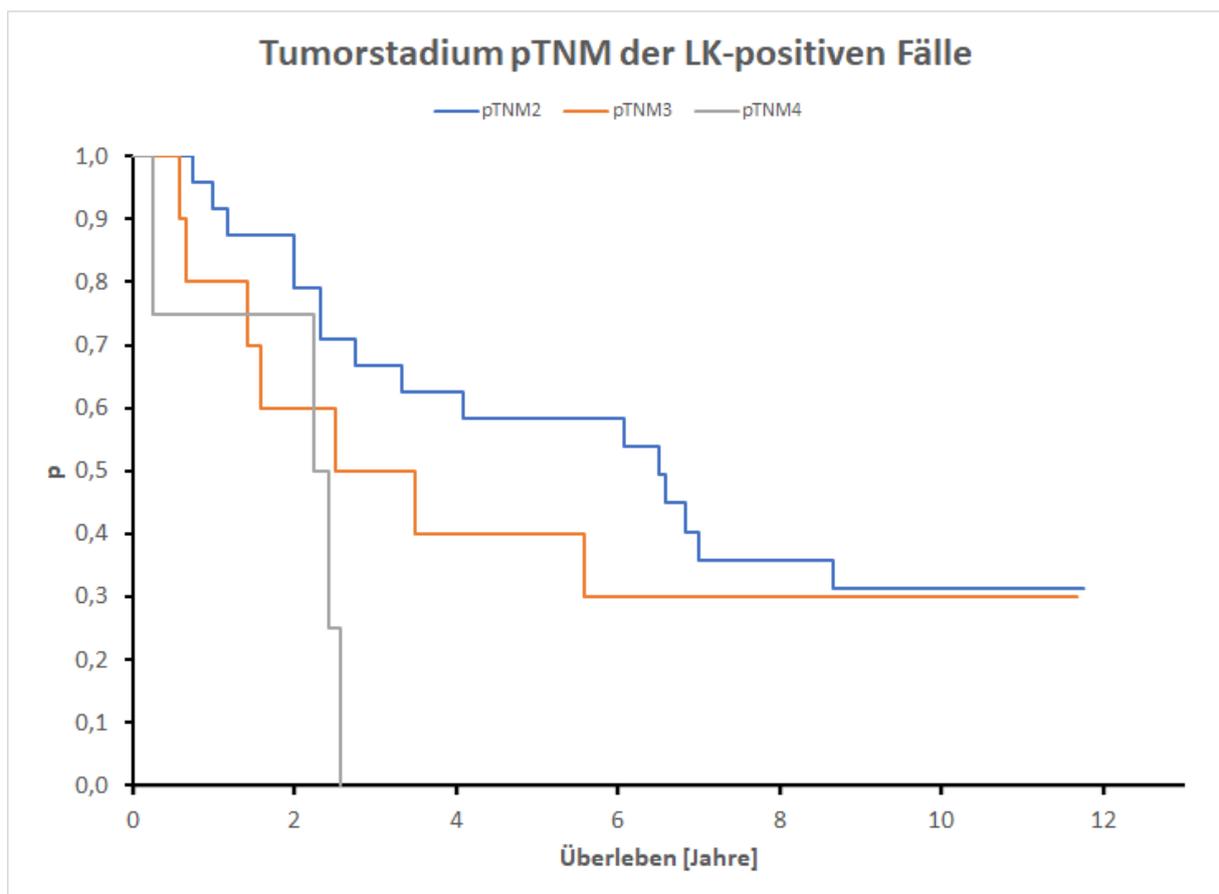


Abbildung 18: Überlebenskurven von N1-Fällen zum Tumorstadium (pTNM)

4.2.2 Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Tumorgrading

Die vorliegenden Daten zeigen zur Tumordifferenzierung bei N1-Fällen keinen eindeutigen Trend bzgl. der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen (Tab. 24, Abb. 19).

Grading	1	2	3
Patientenanzahl (n=39)	4	21	14
Verstorbene Patienten	3	13	11
Mittl. Überleben (Jahre)	5,5	6,5	4,4
5-Jahres-ÜLW (%)	50,0	57,1	35,7
10-Jahres-ÜLW (%)	25,0	36,4	21,4

Tabelle 24: Überleben von N1-Fällen im Bezug zum Tumorgrading (p-Wert: 0,2072)

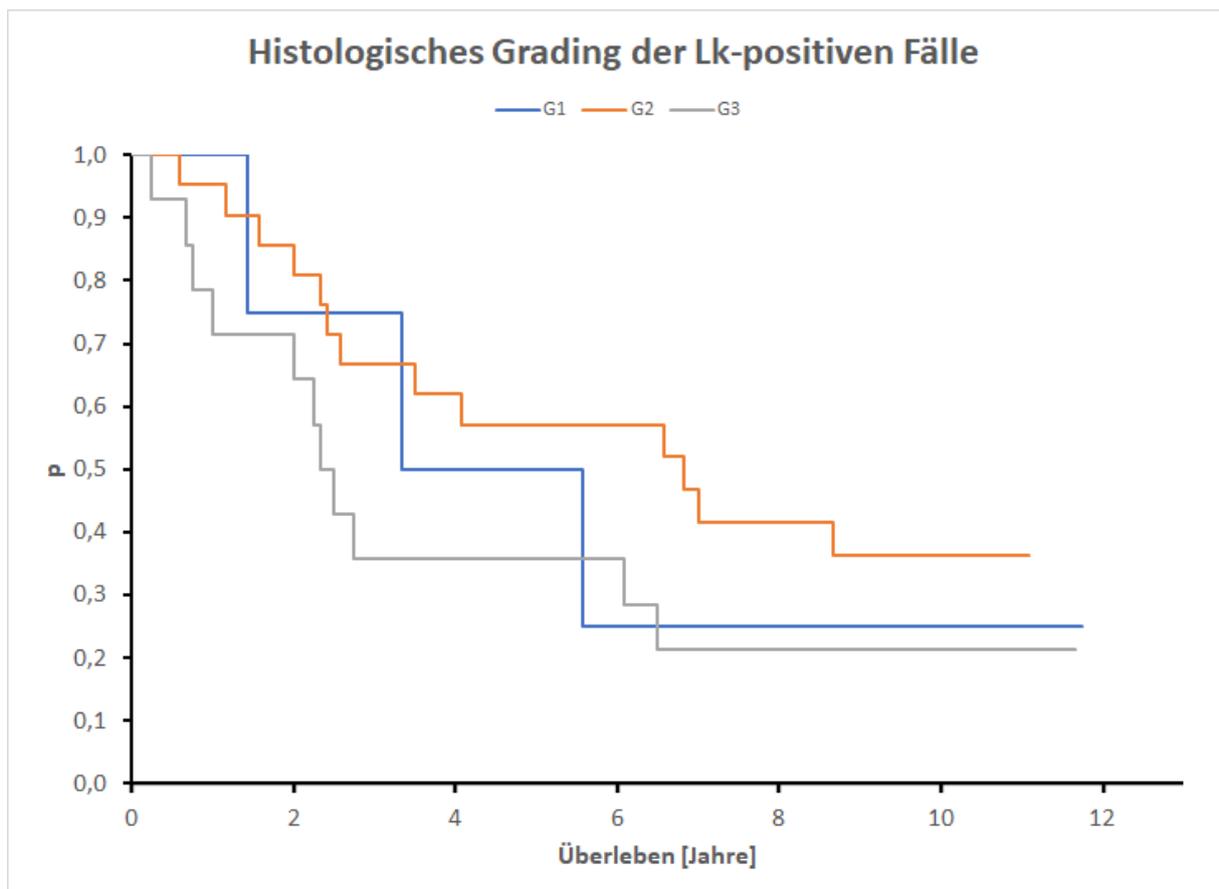


Abbildung 19: Überlebenskurven von N1-Fällen zur Tumorgrading

4.2.3 Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Quantifizierung der Mitosezahl

Die Quantifizierung der Mitosezahl war auch bei den N1-Fällen statistisch signifikant unterschiedlich in drei Gruppen (Tab. 25, Abb. 20) und prognostisch von Bedeutung.

Mitosezahl	≤ 4	5 - 14	>14
Patientenanzahl (n=39)	7	22	10
Verstorbene Patienten	3	15	9
Mittl. Überleben (Jahre)	8,7	6,2	2,7
5-Jahres-ÜLW (%)	71,4	59,1	10,0
10-Jahres-ÜLW (%)	57,1	29,6	10,0

Tabelle 25: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur Mitosezahl (p-Wert: 0,0036)

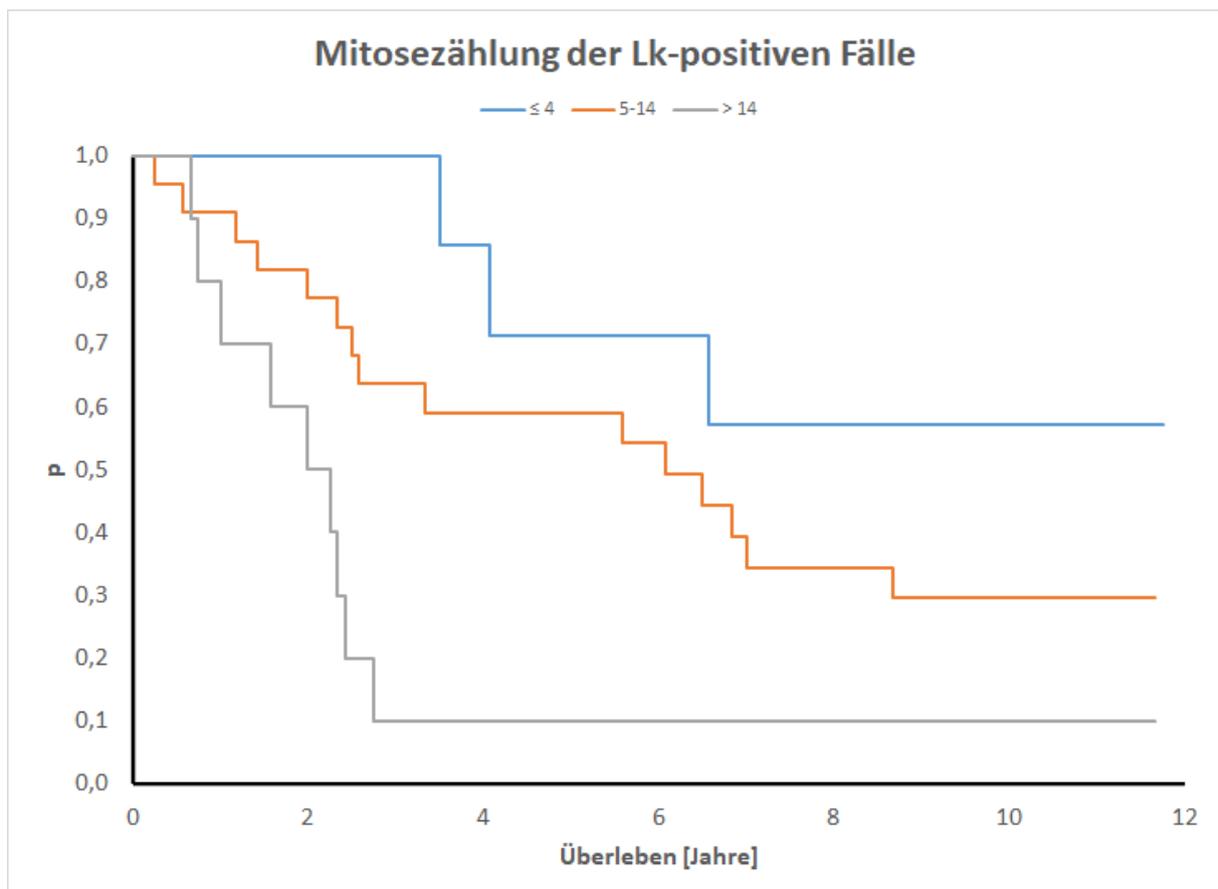


Abbildung 20: Überlebenskurven von N1-Fällen zur Mitosezahl

4.2.4 Überlebensanalyse der N1-Fälle nach Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus (ER, PR)

Ein positiver ER- oder PR-Status war bei den N1-Fällen jeweils statistisch signifikant mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden (Tab. 26-27, Abb. 21-22).

4.2.4.1 Östrogenrezeptorstatus der N1-Fälle

Östrogenrezeptorstatus	Negativ	Positiv
Patientenanzahl (n=39)	11	28
Verstorbene Patienten	10	17
Mittl. Überleben (Jahre)	3,1	6,8
5-Jahres-ÜLW (%)	18,2	60,7
10-Jahres-ÜLW (%)	9,1	38,0

Tabelle 26: Überleben von N1-Fällen im Bezug zum Östrogen-Status (p-Wert: 0,0029)

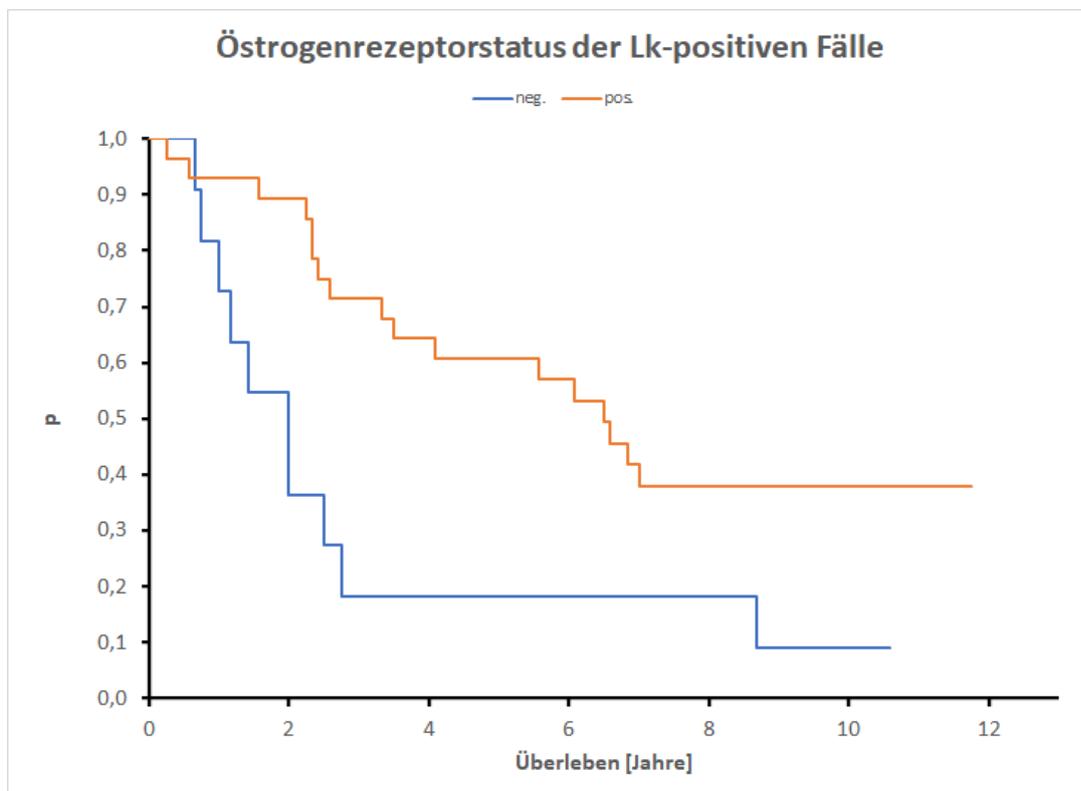


Abbildung 21: Überlebenskurven von N1-Fällen zur Östrogenrezeptorstatus

4.2.4.2 Progesteronrezeptorstatus der N1-Fälle

Progesteronrezeptorstatus	Negativ	Positiv
Patientenanzahl (n=39)	18	21
Verstorbene Patienten	17	10
Mittl. Überleben (Jahre)	3,0	8,1
5-Jahres-ÜLW (%)	22,2	71,4
10-Jahres-ÜLW (%)	5,6	51,0

Tabelle 27: Überleben von N1-Fällen im Bezug zum Progesteronrezeptorstatus (p-Wert: 0,0001)

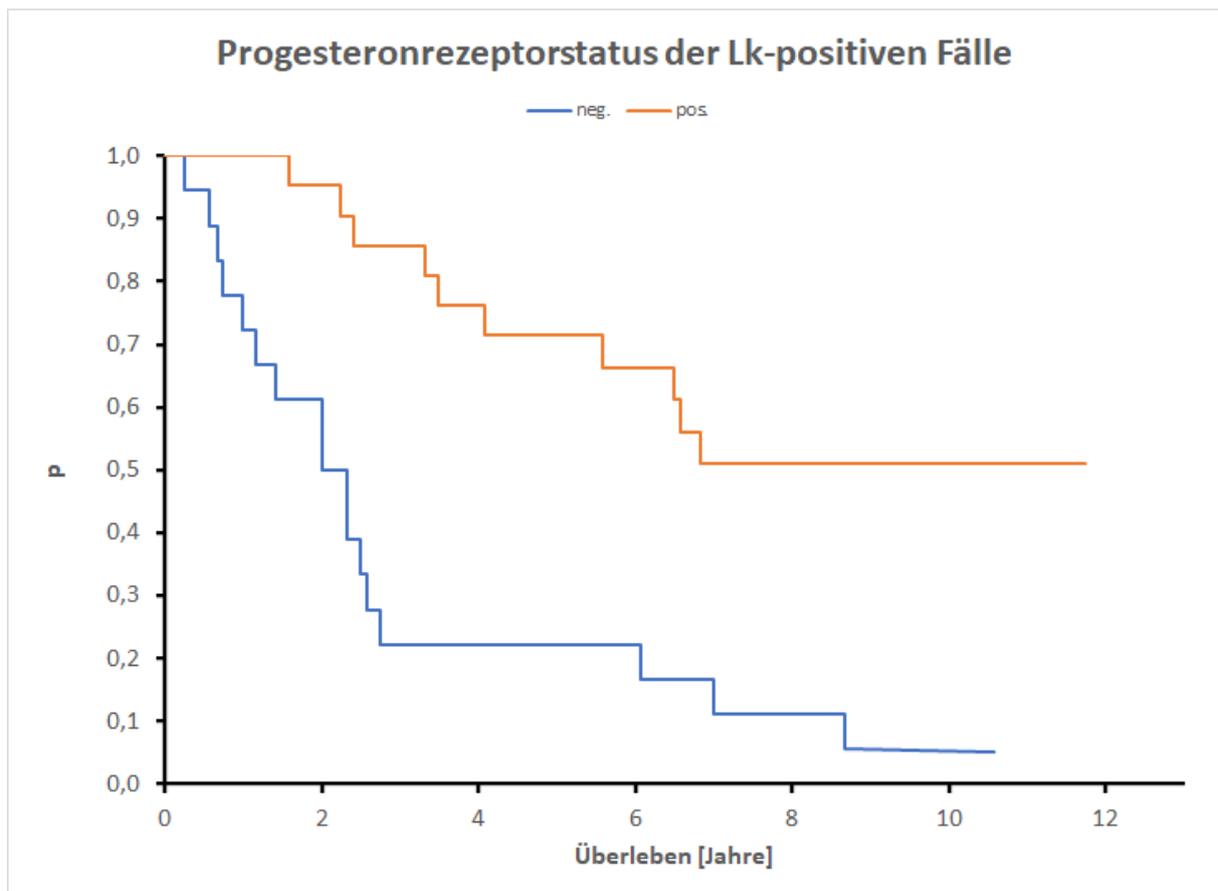


Abbildung 22: Überlebenskurven von N1-Fällen zum Progesteronrezeptorstatus

4.2.5 Überlebensanalyse nach Ki-67 Proliferationsfraktion der N1-Fälle

Die Ki-67-Expression des Primärtumors (Tab. 28-31, Abb. 23-26) wurde um diejenige der Lk-Metastasen ergänzt (Tab. 32, Abb. 27). Eine niedrige Ki-67-Expression ging jeweils mit einer (zumeist signifikant) erhöhten Überlebenschance einher.

4.2.5.1 Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (TV-bildanalytische Quantifizierung am Primärtumor)

Ki-67-Expression (%)	Q1 ($\leq 2,5$)	Q2 (2,5 - 12,7)	Q3 ($> 12,7$)
Patientenanzahl (n=39)	6	22	11
Verstorbene Patienten	2	16	9
Mittl. Überleben (Jahre)	9,5	5,2	4,7
5-Jahres-ÜLW (%)	83,3	40,9	45,6
10-Jahres-ÜLW (%)	66,7	25,6	18,2

Tabelle 28: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur TV-bildanalytisch ermittelten Ki-67-Expression am Primärtumor (p-Wert: 0,1014)

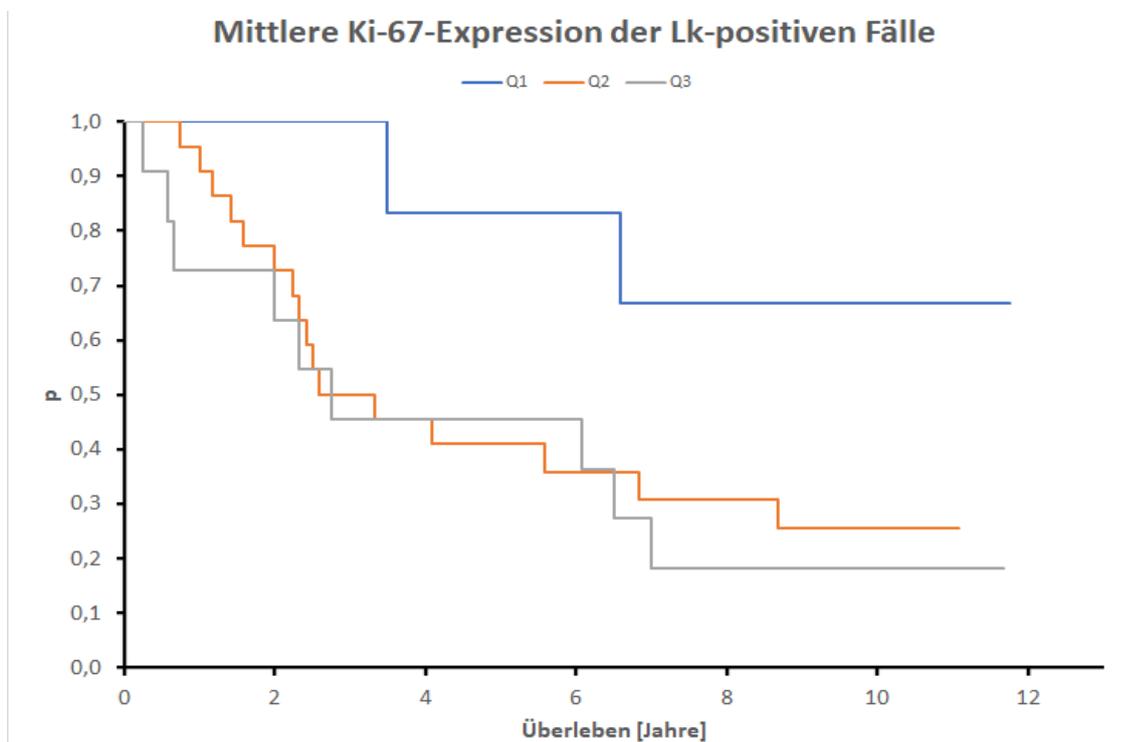


Abbildung 23: Überlebenskurven von N1-Fällen zur mittleren Ki-67-Expression am Primärtumor (TV-Bildanalyse)

4.2.5.2 Maximale Ki-67-Expression der N1-Fälle (TV-bildanalytische Quantifizierung am Primärtumor)

Ki-67-Expression	Q1 ($\leq 7,55$)	Q2 (7,55 - 30,9)	Q3 ($> 30,9$)
Patientenanzahl (n=39)	7	19	13
Verstorbene Patienten	3	12	12
Mittl. Überleben (Jahre)	7,8	6,8	3,2
5-Jahres-ÜLW (%)	57,1	63,2	23,1
10-Jahres-ÜLW (%)	57,1	34,5	7,7

Tabelle 29: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur TV-bildanalytisch ermittelten maximalen Ki-67-Expression am Primärtumor (p-Wert: 0,0089)

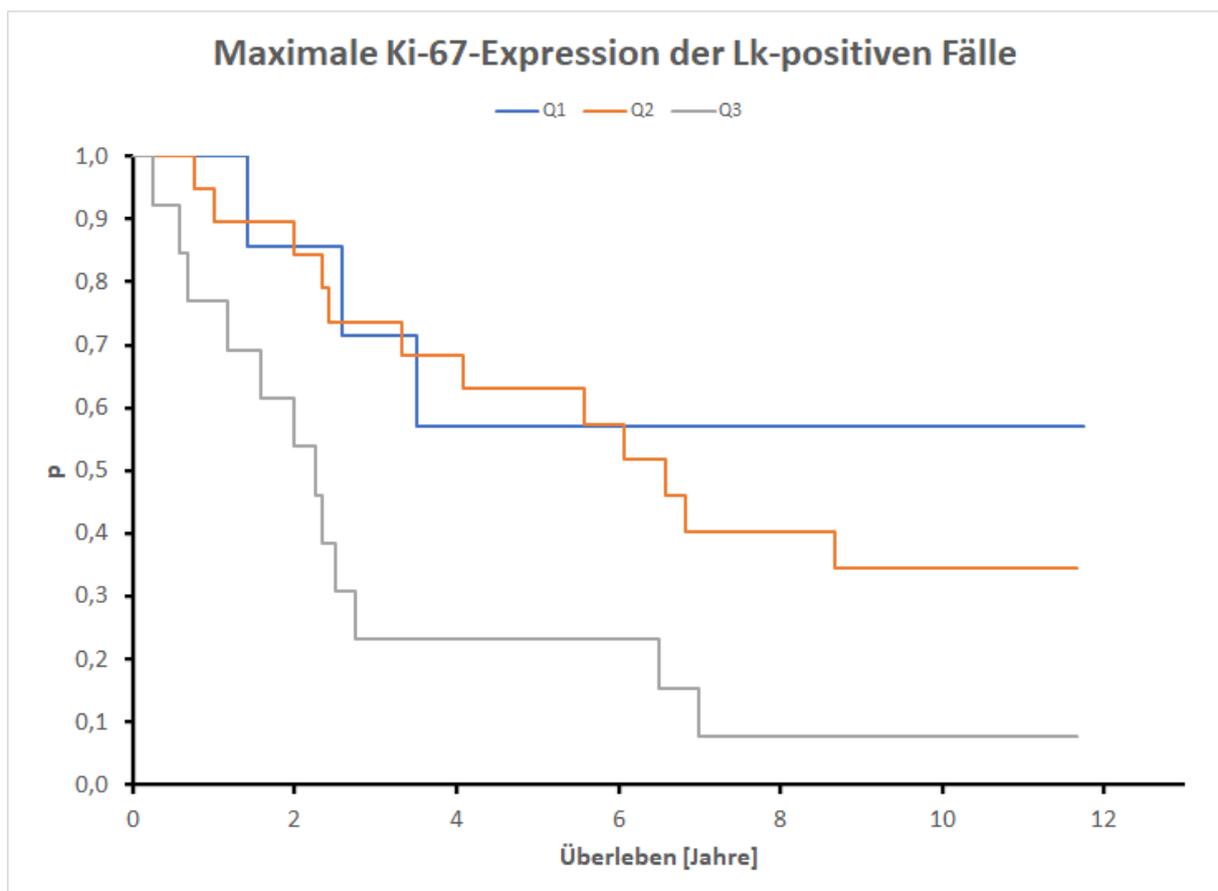


Abbildung 24: Überlebenskurven von N1-Fällen zur maximalen Ki-67-Expression (Bildanalyse am Primärtumor)

4.2.5.3 Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung am Primärtumor mit den Quantilgrenzen aller 115 Fälle)

Ki-67-Expression	Q1 ($\leq 2,4$)	Q2 (2,4 - 13,0)	Q3 ($> 13,0$)
Patientenanzahl (n=39)	5	22	12
Verstorbene Patienten	1	14	12
Mittl. Überleben (Jahre)	10,0	6,4	3,0
5-Jahres-ÜLW (%)	80,0	54,6	25,0
10-Jahres-ÜLW (%)	80,0	34,7	-

Tabelle 30: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur manuell ausgezählten mittleren Ki-67-Expression am Primärtumor mit Quantilgrenzen aller 115 Fälle (p-Wert: 0,0092)

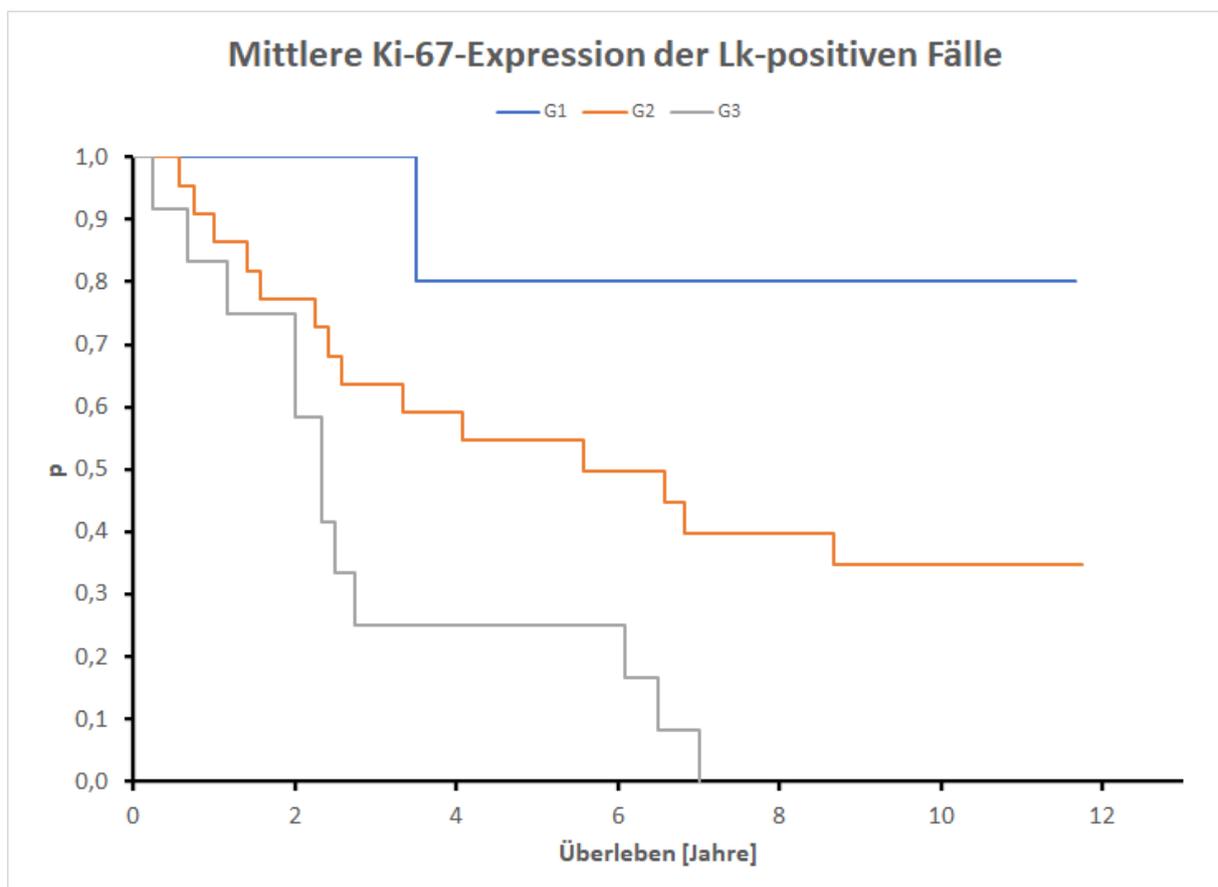


Abbildung 25: Überlebenskurven von N1-Fällen zur mittleren Ki-67-Expression (manuelle Auszählung am Primärtumor mit Quantilgrenzen aller 115 Fälle)

4.2.5.4 Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung am Primärtumor mit den Quantilgrenzen der 39 N1-Fälle)

Ki-67-Expression	Q1 ($\leq 4,7$)	Q2 (4,8 - 13,7)	Q3 ($> 13,7$)
Patientenanzahl (n=39)	11	19	9
Verstorbene Patienten	6	12	9
Mittl. Überleben (Jahre)	7,5	6,5	2,3
5-Jahres-ÜLW (%)	63,6	57,9	11,1
10-Jahres-ÜLW (%)	45,5	34,7	-

Tabelle 31: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur manuell ausgezählten mittleren Ki-67-Expression am Primärtumor (p-Wert: 0,0067)

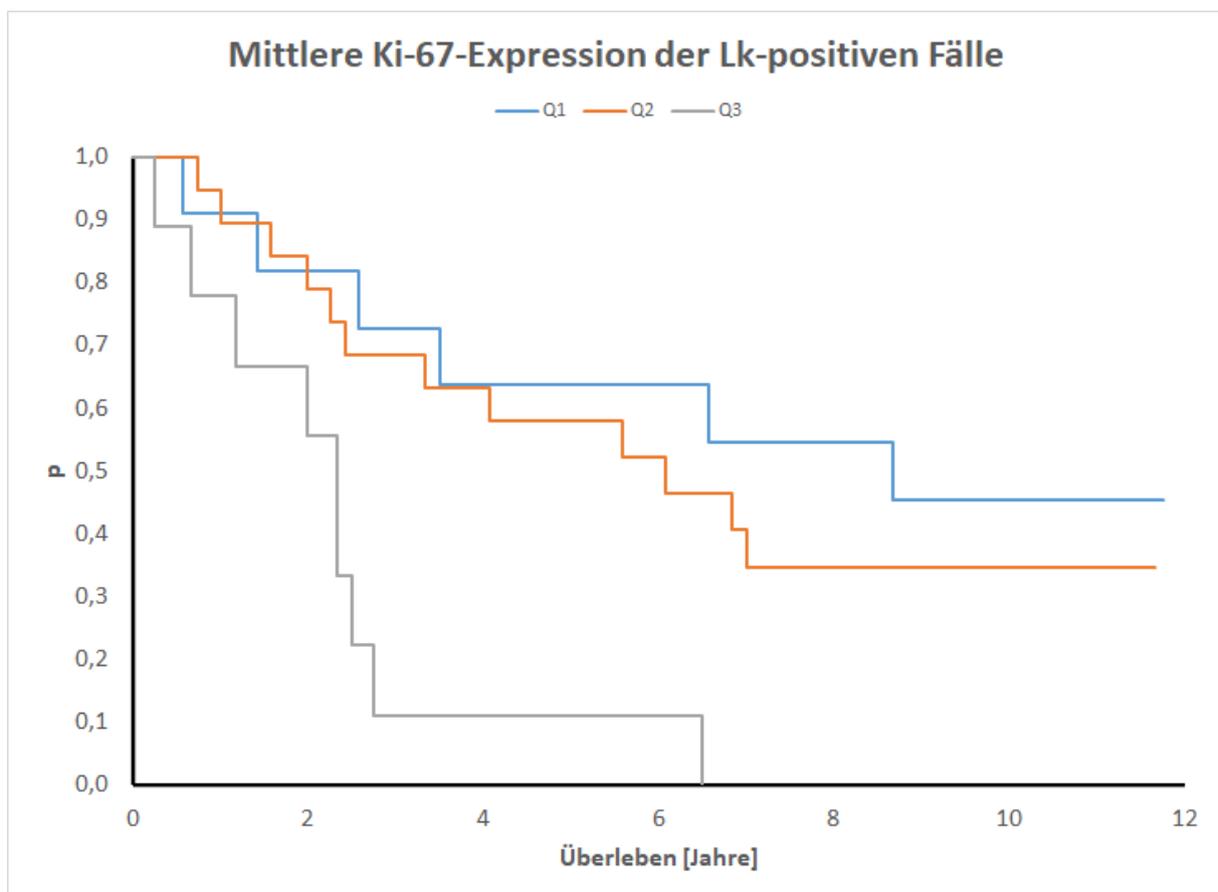


Abbildung 26: Überlebenskurven von N1-Fällen zur mittleren Ki-67-Expression (manuelle Auszählung am Primärtumor mit Quantilgrenzen der 39 N1-Fälle)

4.2.5.5 Mittlere Ki-67-Expression der N1-Fälle (manuelle Auszählung an der Lymphknotenmetastase mit der größten Tumorfläche)

Ki-67-Expression	Q1 ($\leq 7,2$)	Q2 (7,3 - 22,4)	Q3 ($> 22,4$)
Patientenanzahl (n=39)	10	20	9
Verstorbene Patienten	4	14	9
Mittl. Überleben (Jahre)	8,9	5,8	2,3
5-Jahres-ÜLW (%)	68,6	50,0	11,1
10-Jahres-ÜLW (%)	68,6	30,0	-

Tabelle 32: Überleben von N1-Fällen im Bezug zur manuell ausgezählten mittleren Ki-67-Expression an der flächengrößten Lymphknotenmetastase (p-Wert: 0,0002)

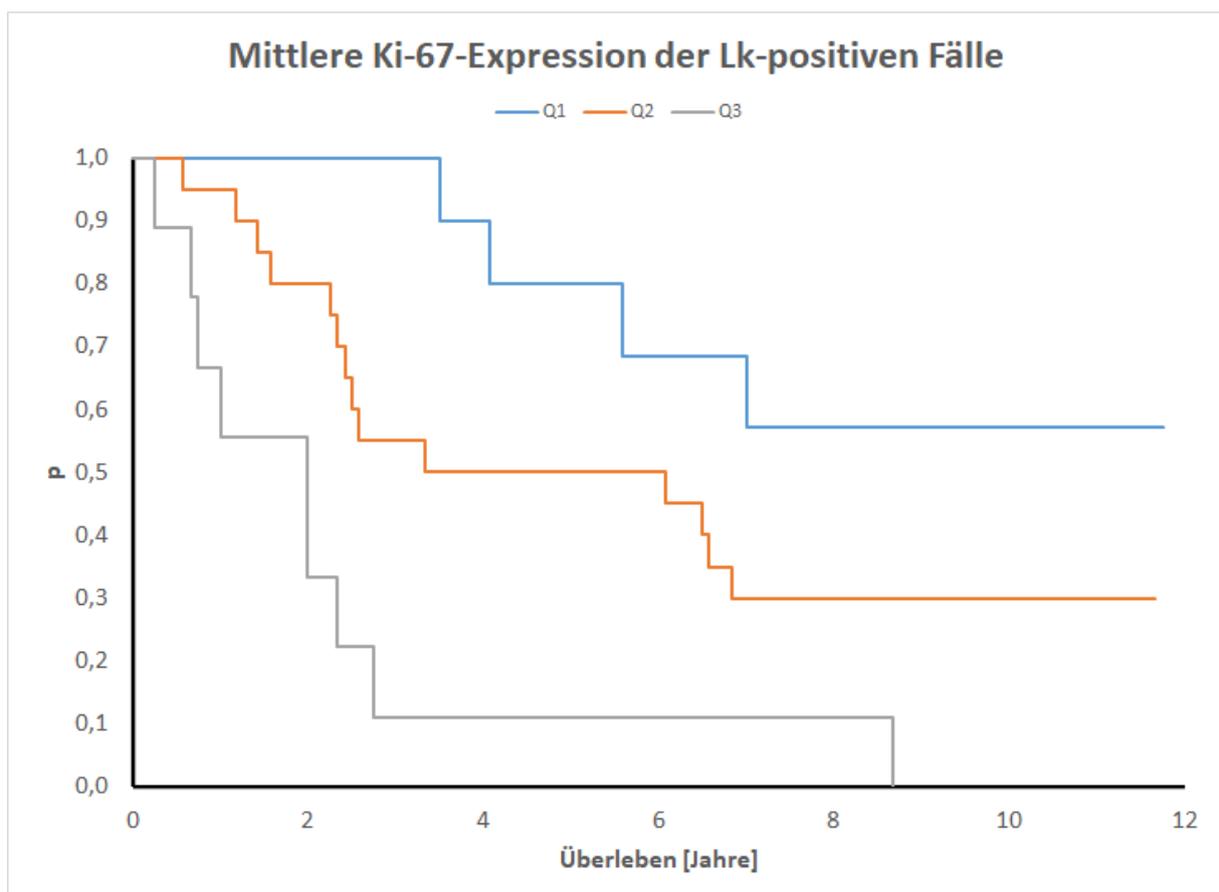


Abbildung 27: Überlebenskurven von N1-Fällen zur mittleren Ki-67-Expression (manuelle Auszählung an der Lymphknotenmetastase)

4.3 Multivariate Überlebensanalyse: Cox-Modell

Mit Hilfe des Cox-Modells wurden verschiedene univariat erprobte prognostische Parameter im Hinblick auf ihre multivariate Relevanz betrachtet. Vom Prinzip her werden dabei solche Variablen aufgenommen, die voneinander im Wesentlichen unabhängig sind und nicht zueinander redundante Informationen aufweisen.

4.3.1 Aufstellung eines Cox-Modells zur multivariaten Überlebensanalyse

Die per konventioneller Zählung erhobene Ki-67-Expression im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen wurde jeweils als stetige Größe in das Modell eingebracht, ebenso die Mitoserate. ER und PR wurden als positiv oder negativ angeboten, das Grading in seinen drei möglichen Ausprägungen, also als G1, G2 oder G3, also jeweils gestuft. Der Verlauf des Cox-Modells ist in den Tabellen 33-35 schrittweise dargestellt. Vor Schritt 1 (Tabelle 33) verfügten vor allem der Progesteronrezeptor PR ($p = 0,0002$) und der Ki-67-Wert in der Lymphknotenmetastase ($p = 0,0003$) über hohe univariate Bedeutung.

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
PR	13,51		0,0002
Ki-67-Zählung Metastase	12,96		0,0003
Ki-67-Zählung Primärtumor	7,78		0,0053
Mitoserate	6,82		0,0090
ER	6,20		0,0128
Grading	1,03		0,3097

Tabelle 33: Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung des Hormonrezeptorstatus, der Ki-67-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastase, der Mitoserate und des Gradings; n = 39, Ausgangssituation vor Schritt 1

Als relevanteste Größe wurde zunächst in Schritt 1 der Progesteronrezeptor ($p = 0,0002$) im Cox-Modell berücksichtigt (Tabelle 33). Danach verfügte die Ki-67-Expression in der Lymphknotenmetastase über die höchste verbliebene multivariate Bedeu-

tung ($p = 0,0231$, Tabelle 32). Nach Schritt 2 verfügte keine Variable mehr über einen Chi²-enter-Wert, der ein p-Wert von unterhalb des Aufnahmelevels von $p < 0,10$ geboten hätte. Nach Schritt 2 liegt somit die Endform des Cox-Modells vor, das somit auf eine sich ergänzende prognostische Relevanz des Progesteronrezeptorstatus und der Ki-67-Expression im Lymphknoten hinweist.

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
PR		13,51	0,0002
Ki-67-Zählung Metastase	5,16		0,0231
Mitoserate	4,67		0,0306
Ki-67-Zählung Primärtumor	4,13		0,0421
Grading	0,22		0,6409
ER	< 0,01		0,9746

Tabelle 34: Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung des Hormonrezeptorstatus, der Ki-67-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastase, der Mitoserate und des Gradings; $n = 39$, Situation nach Schritt 1

Variable	Chi ² enter	Chi ² remove	p-Wert
PR		5,71	0,0168
Ki-67 Metastase		5,16	0,0231
Ki-67 Primärtumor	1,26		0,2617
Mitoserate	1,05		0,3057
ER	0,44		0,5065
Grading	0,20		0,6572

Tabelle 35: Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung des Hormonrezeptorstatus, der Ki-67-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastase, der Mitoserate und des Gradings; $n = 39$, Situation nach Schritt 2

Tabelle 36 gibt die statistischen Werte wieder, die bei der Entwicklung des Cox-Modells aufgetreten sind. Sie zeigen über den Anstieg der Chi²-Werte für das global Chi² von 15,16 auf 23,85 die Relevanz der Modell-Ergebnisse ($p < 0,001$).

Schritt	Improvement Chi ²	p-Wert	Global Chi ²	p-Wert
1 PR	13,52	< 0,001	15,16	< 0,001
2 Ki-67-Zählung Metastase	5,16	0,023	23,85	< 0,001

Tabelle 36: Multivariates Cox-Modell unter Einbeziehung des Hormonrezeptorstatus, der Ki-67-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastase, der Mitoserate und des Gradings; n = 39. Übersicht über die Entwicklung der statistischen Kenngrößen von Schritt zu Schritt

4.3.2 Validierung des Cox-Modells

Zur Validierung des Cox-Modells am konkret zugrundeliegenden Datensatz kommen zwei Methoden in Betracht, zum einen bei stetigen Variablen die Aufstellung einer „Multivariaten Funktion“ mit späterer Gruppenbildung, z.B. nach 1:2:1-Quantilisierung, zum anderen bei dichotomisierten Variablen über die Definition von Untergruppen. Da der PR-Status dichotomisiert vorlag („PR +“ / „PR -“), die Ki-67-Zählung an den Lymphknotenmetastasen aber ungestuft, wurden beide Ansätze kombiniert. Die Werte der Ki-67-Zählung wurden durch einen Cut-Off am Median (12,4%) in zwei Gruppen („Ki-67 niedrig“ / „Ki-67 hoch“) geteilt, so dass vier Patientengruppen der Kategorien „PR+ / Ki-67 niedrig“, „PR- / Ki-67 hoch“, „PR+ / Ki-67 hoch“ und „PR- / Ki-67 niedrig“) entstanden. Insgesamt fielen vier Fälle in die Kategorie „PR+ / Ki-67 hoch“ und drei Fälle in die Kategorie „PR- / Ki-67 niedrig“.

Die visuelle und statistische Validierung erfolgte durch die Darstellung der neugebildeten Gruppen gemeinsam mit dem PR-Status in Kaplan-Meier-Kurven. Dabei zeigte sich, dass die sieben Fälle der beiden schwach besetzten Gruppen „PR+ / Ki-67 hoch“ und „PR- / Ki-67 niedrig“ eine gleichartige Prognose aufwiesen, so dass sie inhaltlich begründet zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst werden konnten. Die Verteilung der Daten in drei Gruppen und im Vergleich zum PR-Status ist in Tabelle 37 dargestellt, wobei die besagten sieben Fälle unter „Übrige Konstellationen“ zusammengefasst sind. Es zeigt sich für die neu gebildeten Gruppen ein höherer Testwert und entsprechend ein niedrigerer p-Wert als für den PR-Status, was bereits auf eine höhere prognostische Relevanz hindeutet. In Abbildung 28 sind ferner die Kaplan-Meier-Überlebenskurven wiedergegeben.

Variable	PR positiv	PR negativ	PR positiv, niedriges Ki-67	„Übrige Konstellationen“	PR negativ, hohes Ki-67
Patientenanzahl (n=39)	21	18	17	7	15
Verstorbene Patienten	10	17	7	5	15
Mittl. Überleben (Jahre)	8,1	3,0	8,7	6,3	2,3
5-Jahres-ÜLW (%)	71,4	22,2	76,5	57,1	13,3
10-Jahres-ÜLW (%)	51,0	5,6	57,4	28,6	-
Testwert im Breslow-Test	15,7		25,2		
p-Wert im Breslow-Test	0,0001		< 0,0001		

Tabelle 37: Überleben von N1-Fällen im Vergleich von PR-Status und einer Kombination aus PR-Status und Ki-67-Expression der Lymphknotenmetastase. „Übrige Konstellationen“: a) PR-positiv und Ki-67 über dem Median, b) PR-negativ und Ki-67 unter dem Median.

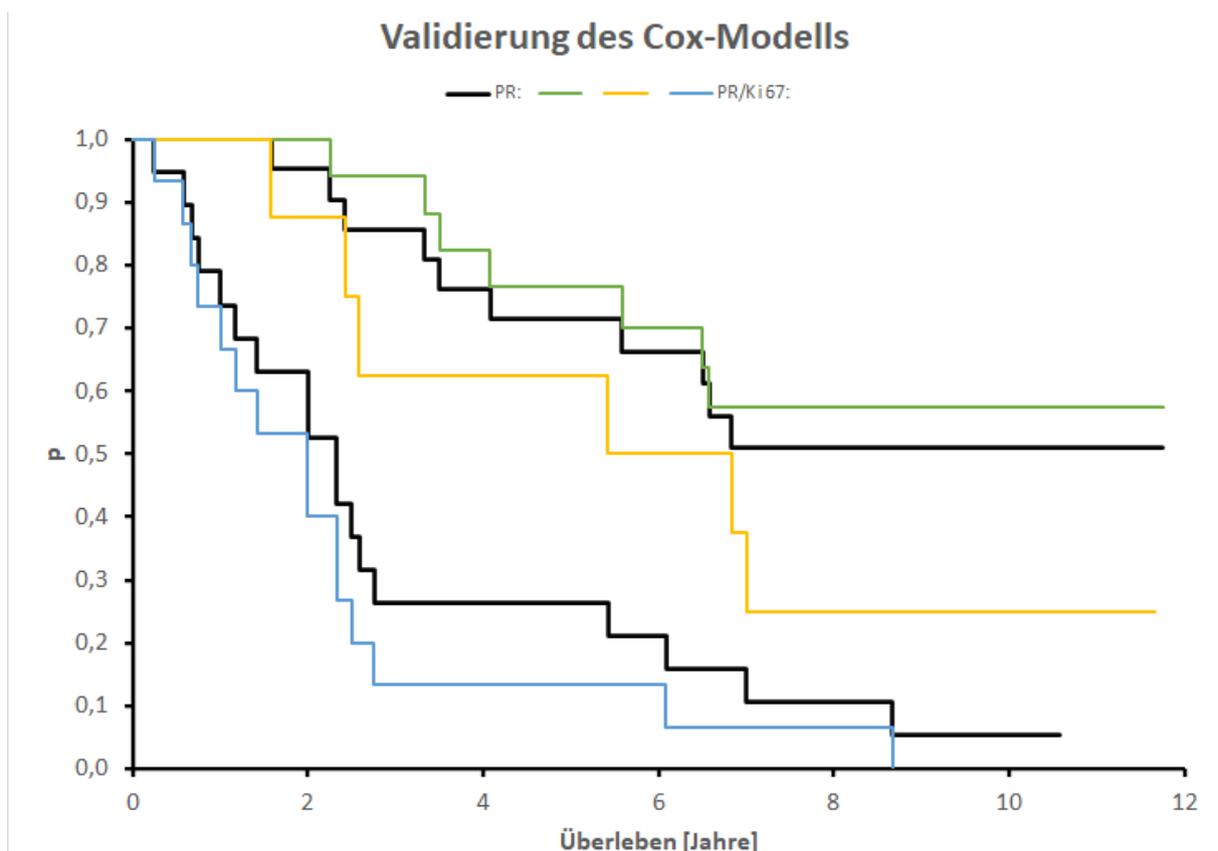


Abbildung 28: Überlebenskurven von N1-Fällen in Kombination der mittleren Ki-67-Expression (manuelle Auszählung an der Lymphknotenmetastase) und des PR-Status im Vergleich zum PR-Status allein. Schwarz: PR+ (oben) und PR- (unten). Gelb: PR+/Ki-67 niedrig, blau: PR-/Ki-67 hoch, grün: übrige Fälle

Aus den Überlebenskurven wird deutlich, dass sich nicht nur in der biometrischen Theorie, sondern auch an der konkreten Realität des Datensatzes eine Gruppe von sieben Patientinnen (17,9%) abgrenzen lässt, die über eine intermediäre Prognose verfügen. Die Abgrenzbarkeit dieser intermediären Gruppe und das hierdurch bedingte weitere Aufspreizen der Überlebenskurven stellt insgesamt den wirklichen Wert der Bestimmung der Ki-67-Expression an den Lymphknotenmetastasen dar.

4.4 Methodische Aspekte der Ki-67-Expressionsbestimmung

4.4.1 Vergleich der Ki-67-Expression zwischen größter Lymphknotenmetastase und allen untersuchten Lymphknotenmetastasen

Für die klinische Auswertung war, sofern zwei oder drei Lymphknotenmetastasen untersucht werden konnten, vereinbarungsgemäß der Ki-67-Wert der größten Tumorfläche von ihnen zugrunde gelegt worden. Gleichmaßen wurde aber auch ein Höchstwert über alle untersuchten Lymphknotenmetastasen aus dem Datensatz extrahiert. Die entsprechenden statistischen Kennwerte sind in Tabelle 38 wiedergegeben. Teilt man über den jeweiligen Median beide Datensätze in zwei Gruppen, so beträgt die Übereinstimmung in einer Vier-Felder-Tafel 97,4% (38 von 39, Pearson Chi²-Test: $p < 0,0001$.)

Art der untersuchten Lymphknotenmetastase	Median	Mittelwert \pm SD	niedrigster Wert	höchster Wert
größte Tumorfläche	12,4%	16,5% \pm 14,1%	0,7%	81,6%
höchste Ki-67-Expression	18,4%	20,7% \pm 15,6%	1,1%	81,6%

Tabelle 38: Statistische Kennwerte der Ki-67-Expression im Vergleich des Lymphknotens mit der größten Tumorfläche und dem Lymphknoten mit dem höchsten Tumorwert (39 Fälle, 28 davon mit mehreren Lymphknotenmetastasen)

Bei den 18 Fällen, von denen drei Lymphknotenmetastasen untersucht wurden, stellte diejenige mit der größten Tumorfläche sechsmal den höchsten, fünfmal den mittleren

und siebenmal den niedrigsten Ki-67-Wert, was im Grunde einer Zufallsverteilung entspricht. Der geringste Abstand der Werte betrug 2,2 Prozentpunkte (6,6% vs. 8,8%), der größte 32,7 Prozentpunkte (48,9% vs. 81,6%).

In den 10 Fällen mit zwei Lymphknotenmetastasen ergab sich ebenfalls eine Zufallsverteilung im Idealverhältnis 5:5; der geringste Abstand der beiden Ki-67-Werte lag bei 0,3 Prozentpunkten (10,8% vs. 11,1%), der höchste bei 17,8 Prozentpunkten (15,5% vs. 33,2%).

Die hier wiedergegebenen Datenverteilungen belegen, dass die bei der Versuchsplannung vorgenommene Festlegung, die flächengrößte Lymphknotenmetastase zur Prognoseabschätzung heranzuziehen, auch aus der Retrospektive als gerechtfertigt angesehen werden kann. Ihre Datenverteilung nach Stufung der Daten am als neutral anzusehenden Median lässt keinen Trend erkennen, der auf eine Verzerrung der zu treffenden Aussagen hindeutet.

4.4.2 Vergleich der Ki-67-Expression in N0- bzw. N1-klassifizierten Primärtumoren sowie in der größten Lymphknotenmetastase

Ergänzend werden im Folgenden die Ki-67-Expressionswerte aus den manuellen Zählungen für verschiedene Konstellationen dargestellt (Tabelle 39):

Durch manuelle Auszählung ermittelte Ki-67 Expression	Median	Mittelwert ± SD	niedrigster Wert	höchster Wert
Primärtumoren (pN0)	5,4%	8,9% ± 12,5%	0,5%	73,8%
Primärtumoren (pN1)	7,9%	11,0% ± 10,1%	0,5%	38,4%
LK-Metastase mit der größten Tumorfläche	12,4%	16,5% ± 14,1%	0,7%	81,6%

Tabelle 39: Statistische Kennwerte der manuell ermittelten Ki-67-Expression im Vergleich von pN0- und pN1-Fällen sowie des Lymphknotens mit der größten Tumorfläche.

Es zeigte sich, dass innerhalb der beiden Gruppen von Primärtumoren (pN0, pN1) bei den Fällen mit Lymphknotenmetastasen höhere Werte vorlagen; bei vergleichbarer Streuung lag der Median beim 1,46-fachen und der Mittelwert beim 1,24-fachen; in den Lymphknotenmetastasen wurden dann noch einmal signifikant höhere Werte ermittelt (t-Test: $p < 0,01$). Die Mediane und Mittelwerte der TV-bildanalytisch ermittelten Ki-67-Expression waren mit denen der Zählung annähernd identisch.

5 *Diskussion*

5.1 *TNM-Klassifikation und histologisches Grading: Zwei Grundgrößen der morphologischen Tumordiagnostik*

TNM-Klassifikation

Die Diagnostik eines Mammakarzinoms schließt obligatorisch die Klassifikation des Tumortyps und die Einordnung der Tumorausdehnung in die TNM-Klassifikation nach Größe des Primärtumors (pT), Lymphknotenstatus (pN) und eventuellen Fernmetastasen (M, ggf. auch pM) ein. Diese drei Grundgrößen sind schon seit etwa 100 Jahren (siehe hierzu zu den Anfängen vor allem Greenough 1925, Haagensen 1933) als relevant angesehen worden, schon lange bevor es die eigentliche TNM-Klassifikation gab, und haben sich jenseits aller therapeutischen Entwicklungen als relevant erwiesen. Dies gilt sowohl für die Zeiten, als Mammakarzinome fast ausschließlich durch Ablatio und axilläre Lymphadenektomie der Level I und II (ggf. auch III) operativ sowie mit anschließenden historischen Formen der Strahlentherapie behandelt werden konnten, als auch in der heutigen Zeit, in der sehr gezielt einsetzbare Therapieformen zur Verfügung stehen, darunter abgestufte operative Verfahren sowie moderne strahlentherapeutische, chemotherapeutische, antihormonelle sowie auch immunologische Ansätze. Natürlich wurden nach und nach Modifikationen an der TNM-Klassifikation vorgenommen, die im Wesentlichen zur Schaffung von Untergruppen (wie z.B. pT1a, pT1b und pT1c) innerhalb der pT1-Kategorie und in der pN-Kategorie geführt haben.

Dass die TNM-Klassifikation ohne Zweifel die Prognose der Patientinnen abschätzen lässt, belegen Studien, die große Datenbanken ausgewertet haben. Eine besonders bedeutende Basis ist dabei die *surveillance, epidemiology, and end results database* (SEER), die sechsstellige Fallzahlen beinhaltet. Für die Validierung des derzeit gültigen TNM-Stagings standen 209.304 Fälle zur Verfügung (Abdel-Rahman 2017). Die Analyse zeigte, dass sich selbst jeweils benachbarte Untergruppen (also z.B. Stadium Ia und Stadium Ib) in ihrer Prognose mit nur einer Ausnahme (nämlich Stadium IIIb und Stadium IIIc) signifikant unterschieden. Daher kann man davon ausgehen, dass

die Stadieneinteilung zum derzeitigen Stand von Diagnostik und Therapie sinnvoll gewählt ist. Allerdings bleibt es dabei, dass immer auch Patientinnen mit guter Prognose (z.B. T1b, pN0) sterben, während Patientinnen mit formal schlechter Prognose (z.B. T3, pN2) individuell auch gut abschneiden können. Nach wie vor bleiben prognostische Aussagen Statistik, an die sich die konkrete Tumorbiologie nicht immer hält.

Für den klinischen Alltag haben alle drei Grundgrößen des TNM-Systems ihre prognostische Berechtigung. Bezogen auf die Gesamtprognose ist dabei sicher das Vorliegen von Fernmetastasen (M1) am ungünstigsten. So wurde in einer groß angelegten Studie aus Schweden in der M1-Situation aktuell ein mittleres Überleben von ca. 2,5 Jahren bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 30% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von 14% (Valachis et al. 2022) ermittelt. Insgesamt aber gilt in der aktuellen Literatur der Lymphknotenstatus pN als prognostisch am relevantesten (Phung et al. 2019), da er am stärksten die Patientinnen in Gruppen unterschiedlichen Überlebens stratifiziert, insbesondere wenn nur zwischen N0 und „N+“, also einem positivem Lymphknotenstatus von „> pN0“ unterschieden wird. Meistens ist in Studien diese Vereinfachung zum einen der begrenzten Patientenzahl geschuldet, aber auch der Tatsache, dass erfreulicherweise heute pN2- oder gar pN3-Konstellationen selten sind. So befinden sich bei der Primärdiagnostik in Deutschland nur noch 11% der Patientinnen im Stadium III, in das auch alle M0-Fälle mit der Konstellation pN2 oder pN3 fallen, und 7% im Stadium IV (M1) (RKI 2021). Einflüsse der pT-Kategorie werden vor dem Hintergrund der separaten Betrachtung von pN0 oder pN+ abgeschwächt, bleiben aber vorhanden. Selbst in unserer kleinen Studie von nur 39 Fällen, die von einem gut definierten Patientinnenkollektiv von 115 Fällen noch zur Verfügung standen, unterschieden sich durchaus noch in der pN+-Situation Fälle im Stadium pT2 von denen im Stadium pT3 signifikant. Dass der p-Wert im Bezug auf alle vier pT-Kategorien bei > 0,05 lag, hat damit zu tun, dass die nur fünf Fälle von pT1 bzw. pT4 im Grunde als Einzelbeobachtungen das statistische Ergebnis verfälschen; die 22 pT2-Fälle und die 12 pT3-Fälle unterscheiden sich durchaus im mittleren Überleben und im der 5-Jahres- bzw. 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich (Tabelle 21). Für die pT2 betragen die drei Werte 6,6 Jahre, 59,1% und 34,5%, für pT3 3,8 Jahre, 25,0% und 16,7% ($p < 0,05$).

Grading

Das morphologische Grading gehört ebenfalls zum Standard bei der primären Diagnostik von Mammakarzinomen und verfügt nach wie vor über klinische Relevanz. Es kann sowohl an den diagnostischen Stanzbiopsien, als auch am Resektat erhoben werden. Die Ergebnisse beider Bestimmungen müssen dabei nicht zwangsläufig identisch ausfallen. So werden in der Literatur Effekte eines „Up-Gradings“ zwischen der Stanzbiopsie und dem Resektat in bis zu 30%-40% der Fälle angegeben (Denley et al. 2001, Rakha und Ellis 2007). In den gleichen Arbeiten wurde ein „Down-Grading“ von der Stanze zum Resektat mit 5%-8% angegeben. Starke Diskrepanzen (von G1 nach G3 oder umgekehrt) gelten allgemein mit 0%-1% als selten. Die unerwartet hohen Zahlen für die Upgrade-Raten stammen aus den Arbeitsgruppen in Nottingham um Elston und Ellis, die offenbar „schärfer“ gradieren als andere: Ein Review von 15 Arbeiten über mehr als 40.000 Fälle von Mammakarzinomen zeigte eine Zuordnung von 11%-38% als G1, von 36%-62% als G2 und von 19%-46% als G3 (Rakha et al. 2010, van Doonijeweert et al. 2022); Studien aus Nottingham wiesen dabei G3-Quoten von 30% bzw. zweimal von 46% auf, also im Trend zum oberen Ende der Skala hin.

Eine große in Deutschland vorgenommene prospektive Studie, die als Hauptthema den Oncotype-Test hatte, verglich an 2.287 Fällen das Primärgrading der morphologischen Erstdiagnostik, an dem viele Institute für Pathologie beteiligt waren, mit dem einer verblindet durchgeführten Neu-Gradiierung im Studienreferenzzentrum in Hannover (Gluz et al. 2016). Das primäre Grading bei Diagnosestellung ergab in 7% der Fälle G1, in 70% G2 und in 23% G3; im Referenzzentrum wurden 5% der Fälle als G1, 62% als G2 und 33% als G3 gradiert. Die Übereinstimmung betrug insgesamt 66,3%, also fast genau zwei Drittel der Fälle. 32,9% der Fälle wichen um +/- einen Grad in den Beurteilungen voneinander ab, 0,7% um +/- zwei Grade, so dass sie einmal als G1, einmal als G3 eingestuft wurden. Im Vergleich zum vorigen Abschnitt wurde auch hier von den Experten im Referenzzentrum schärfer gradiert.

In unserer Studie waren die 115 Fälle im Verhältnis 19:58:37 verteilt, was auf volle Prozentzahlen gerundet 17%:50%:32% entspricht und somit im Rahmen der üblichen

Verteilung liegt. Bei den 39 Fällen mit Lymphknotenmetastasen ergab sich ein Verhältnis von 4:21:14 bzw. von 10%:54%:36%. Es lag somit ein gewisser erwarteter Trend zu einem höheren Grading bei den pN1-Fällen vor.

Die prognostische Relevanz des Gradings ist heute allgemein anerkannt, beispielhaft noch einmal belegt und auch graphisch gut aufbereitet durch die Daten aus der SEER-Datenbank mit 161.708 Fällen (Schwartz et al. 2014), und konnte auch in unserer Studie dargestellt werden, und zwar sowohl für das ganze Kollektiv, als auch für das pN1-Teilkollektiv. Die oben genannten sehr unterschiedlichen Verteilungen von G1-, G2- und G3-Fällen in verschiedenen Studien verdeutlichen gleichzeitig aber auch die Subjektivität des Gradings und seine eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Vor der Modifikation durch Elston und Ellis lag die interspezifische Reproduzierbarkeit zwischen zwei Untersuchern in einer vielzitierten grundlegenden Studie bei 69%, also bei gut zwei Drittel (Champion und Wallace 1971); andere Arbeiten ergaben dann Werte zwischen 51% und 79% (Stenkvist et al. 1979, Delides et al. 1982, Stenkvist et al. 1983). Durch die besseren Definitionen ließen sich die Werte für die interspezifische Reproduzierbarkeit etwas steigern. In Studien nach der Reform des Gradings wurden Werte für die Übereinstimmung zwischen verschiedenen Untersuchern von 72,3% - 83,3% angegeben. Andere Arbeiten, die mit Cohens Kappa (κ) arbeiteten, ermittelten κ -Werte von 0,43 - 0,83 (jeweils zusammengefasst bei Rakha et al. 2010). Dabei wiesen Arbeiten, in denen niedrige κ -Werte auftraten, Übereinstimmungsraten auf, die nicht höher waren als vor der Reform des Gradings.

5.2 Ergänzende morphologische Standardgrößen am Primärtumor: Hormonrezeptoren und Her-2/neu

Alle Variablen, die ergänzend zur TNM-Klassifikation und zum Grading erhoben wurden, dienen dem Zweck, zusätzliche Informationen zu erhalten, die zur weiteren Verfeinerung der Therapieplanung und / oder der Prognoseabschätzung dienen. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass nur dann eine Variable einen inhaltlichen Sinn hat, wenn sie Informationen erlaubt, die nicht oder möglichst wenig mit denen von TNM-Klassifikation und Grading redundant sind.

Dazu gehören insbesondere die Hormonrezeptoren ER und PR sowie Her-2/neu. In therapeutischer Hinsicht geht es bei ihnen darum, ein Ansprechen auf Hormontherapie bzw. Trastuzumab-Therapie vorherzusagen, in prognostischer Hinsicht darum, dass insbesondere eine Hormonrezeptor-Positivität prognostisch günstig ist. Die Bestimmung der drei Marker erfolgt heute in Deutschland immunhistochemisch; die laborchemische Methode der Hormonrezeptor-Bestimmung ist heute weitgehend verlassen, und eine regelhafte Bestimmung des Her-2/neu-Status mit den Methoden der in-situ-Hybridisierung, wie in der Schweiz praktiziert wird, ist bei uns aus Kostengründen nicht umgesetzt. Alle drei Marker sind nach Bestimmung am Primärtumor heute praktisch als ergänzende Größen in der Mammakarzinom-Diagnostik gesetzt.

Da die hier vorgelegte Arbeit Teil eines Gesamtprojektes ist, können nicht alle Daten anderer Teilprojekte mit verwendet werden. Diese Beschränkungen dienen dem Ziel, dem Problem der wissenschaftlichen Zweitverwertung aus dem Weg zu gehen. Daher kann hier nur cursorisch berichtet werden, dass die Ergebnisse für ER, PR und Her-2/neu den positiven Erwartungen aus der Literatur entsprochen haben. Da die Ergebnisse der labormedizinischen Bestimmung von ER und PR aber Allgemeingut für alle Teilprojekte sind, kann auf sie im Folgenden Bezug genommen werden. Ihre Resultate sind mit denen der immunhistochemischen Bestimmung hoch korreliert gewesen.

5.3 *Hormonrezeptorbestimmung an Primärtumoren nodal metastasierter Fälle*

Der PR-Status erwies sich in unserer Studie als stärkerer prognostischer Parameter als der ER-Status; bezogen auf alle Fälle war er zweitstärkster Prognosefaktor nach pN. In der Untergruppe der nodal metastasierten Fälle war er stärkster Prognosefaktor und wurde als erster in das Cox-Modell aufgenommen. Dieses Ergebnis überrascht auf den ersten Blick, weil dem PR-Status üblicherweise weniger Aufmerksamkeit geschenkt wird als dem ER-Status. Hintergrund dafür dürfte sein, dass der PR-Status als nicht geeignet angesehen wird, einen Erfolg einer endokrinen Therapie vorherzusagen (Selli et al. 2016), so dass in der senologischen Onkologie eher auf ER geschaut wird.

Andererseits ist bekannt, dass die 15% (Li et al. 2020) der Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinome, die ER+ und PR- sind, schlechter verlaufen als diejenigen mit ER+ und PR+ (Prat et al. 2013, Creighton et al. 2009, Li et al. 2020, Arpino et al. 2005, Blows et al. 2010, Bardou et al. 2003). Dahinter steht als vermutete Ursache, dass ein Fehlen der PR-Expression ein Indikator für eine Infunktionalität des ER-Pathway sein könnte und daraus ein schlechteres Ansprechen auf Medikamente wie Tamoxifen resultieren könnte (Cui et al. 2005). Genexpressionsanalysen zeigten ferner, dass bei (ER+/PR-)-Tumoren der PI3K/Akt/mTOR-Pathway hochreguliert ist (Creighton et al. 2009), was sich auch in einer höheren Zahl von PIK3CA-Mutationen in PR-positiven Tumoren niederschlägt (Bardou et al. 2003, Maruyama et al. 2007, Cizkova et al. 2012). Insgesamt ist heute für PR-negative Fälle anerkannt, dass ihr Ansprechen auf endokrine Therapien niedriger ist als für PR-positive, so dass PR-Negativität als gewisser Indikator für eine adjuvante Chemotherapie gesehen wird und als einer der Hauptrisikofaktoren für ein Rezidiv gilt (aktuell zusammengefasst bei Li et al. 2022).

5.4 Stellenwert von Ki-67 in der Diagnostik primärer Mammakarzinome im Kontext sich weiter entwickelnder S3-Leitlinien

Die vielfachen Bestrebungen, eine standardisierte Diagnostik und Therapie von Krankheiten zu erreichen, haben in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung von Leitlinien geführt, in der Onkologie darüber hinaus zur Gründung von Organzentren, in denen möglichst alle Tumorfälle besprochen werden sollen und Leitlinien-gerechte Therapieentscheidungen getroffen werden sollen. Auf diese Weise sollte in der Onkologie erreicht werden, dass allen Patienten mit vergleichbarer Fallkonstellation auch vergleichbare Therapien offenstehen. Diese wiederum orientieren sich an der prognostischen Einschätzung des Tumors, aber auch an individuellen Gegebenheiten der Patienten.

Die Leitlinien wiederum ändern sich über die Zeit. Manche Aspekte, die einmal wichtig waren, verlieren an Stellenwert bzw. werden komplett verlassen (Beispiel für das Mammakarzinom: uPA/PAI-1), andere kommen hinzu oder werden im Kontext aktueller Studien mehr in den Vordergrund gebracht. Auch für Ki-67 lassen sich solche Effekte beobachten, die im Folgenden anhand der Entwicklung der S3-Leitlinien beim

Mammakarzinom besprochen werden sollen. Diese Leitlinien wurden ausgewählt, weil an ihnen eine große Zahl von Fachgesellschaften und anderen Organisationen, überwiegend aus Deutschland, einzelne auch aus Österreich und aus der Schweiz, beteiligt waren, an der aktuellen Version von 2021 insgesamt 35 (S3 2021).

Die erste S3-Leitlinie für das Mammakarzinom erschien im Jahr 2004 unter dem Titel „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Eine nationale S3-Leitlinie“ (S3 2004). Zwei weitere Ausgaben folgten 2008 und 2012 (S3 2008, S3 2012), bevor 2017 die vierte S3-Leitlinie unter dem Titel „Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ als Version 4.0 vorgestellt wurde (S3 2017); inzwischen gilt seit 2021 die weiterentwickelte Version 4.4 (S3 2021). Im Laufe der Jahre ist die S3-Leitlinie dabei immer umfangreicher geworden. Ihr Umfang wuchs von anfangs 171 Seiten (S3 2004) über 298 Seiten, 362 Seiten und 448 Seiten auf jetzt 467 Seiten (S3 2021), und die Zahl der Quellen erhöhte sich von 781 auf aktuell 1620.

Ki-67 war bereits in der ersten S3-Leitlinie aus dem Jahr 2004 erwähnt. Während die Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu seinerzeit bereits etabliert war, galt das für Ki-67 definitiv nicht. Vielmehr wurde Ki-67 nur einmal kurz gestreift, und zwar im Abschnitt „Weitere Spezialuntersuchungen“, wo es heißt, dass eine „*routinemäßige Analyse (...) nach heutigem Kenntnisstand nicht in jedem Fall erforderlich*“ sei. Vier Jahre später tauchte Ki-67 insbesondere im Unterkapitel „Spezielle Zusatzuntersuchungen [von Operationspräparaten]“ auf (S3 2008), wo es erstmals im konkreten Zusammenhang mit den Hormonrezeptoren und Her-2/neu genannt wurde, allerdings immer noch mit dem Zusatz „*ggf.*“ als Ausdruck des Optionalen. Auch in der S3-Leitlinie von 2012 wurde ein allgemeiner Stellenwert für Ki-67 noch mit der Formulierung

„Der prognostische und prädiktive Wert des Proliferationsmarkers Ki-67 ist nicht ausreichend belegt. Außerhalb von Studien soll er daher nicht zur Subtypisierung ER-positiver Mammakarzinome (z. B. Ki-67 < 14 %: Luminal A; Ki-67 ≥ 14 %: Luminal B) als Entscheidungsgrundlage für die systemische Therapie klinisch angewendet werden.“

verneint, weil die „*technische Durchführung und Auswertung des Ki-67-Proliferationsindex keineswegs standardisiert sei*“ und die Inter- und Intraobserver-Variabilität „*gerade in dem kritischen Bereich zwischen 10% und 20% hoch*“ sei. Vor „*der klinischen Anwendung dieses Markers (...) [sei] eine Harmonisierung der Methodik und die Herstellung einer besseren Vergleichbarkeit zwischen den Labors und Studien notwendig*“ (S3 2012), zu der es seitdem aber nur bedingt gekommen ist.

Erst in der aktuell gültigen 4. Version der S3-Leitlinie ab 2017 (S3 2017, S3 2021) wurde Ki-67 als Prognosefaktor akzeptiert, vor allem begründet durch die Ergebnisse einer prognostischen Metastudie, bei der Ergebnisse aus 41 Einzelstudien mit mehr als 64.000 Fällen zusammengefasst worden waren (Petrelli et al. 2015). Außerdem wurde ein „*stärkerer Nutzen einer Chemotherapie bei Frauen mit hoch proliferierenden ER-/PR-positiven, HER2-negativen invasiven Mammakarzinomen*“ gewürdigt, der sich in einigen Studien gezeigt hatte (Gluz et al. 2016, Sonnenblick et al. 2015). Als Schlussfolgerung wurde festgehalten:

„Aus Sicht der Leitliniengruppe liegt daher ausreichende Evidenz vor, den Ki-67-Proliferationsindex bei Frauen mit histologisch gesichertem ER-/PR-positivem, HER2-negativem invasiven Mammakarzinom bei der Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie einzubeziehen.“

Ein rationelles Vorgehen in der morphologischen Diagnostik wäre somit, an einem Stanzbiopsat, welches ein Mammakarzinom enthält, zunächst nur die drei obligatorischen Marker ER, PR und Her-2/neu zu bestimmen und eine Ki-67-Bestimmung nur vorzunehmen, wenn die Konstellation ER+ / PR +/- / Her-2/neu- gegeben ist. Die Realität sieht allerdings anders aus. Statt einen Arbeitstag zu warten und Ki-67 nur bei Bedarf nachzuuntersuchen, wird in der täglichen Routine eine parallele Anwendung aller vier Antikörper bevorzugt. Eine erneute Bestimmung von Markern an einem eventuellen späteren primären Mammaresektat ist in den S3-Leitlinien nur in Fällen empfohlen, in denen die Bestimmung an der Stanze möglicherweise nicht repräsentativ war. Außerdem sind Neubestimmungen verpflichtend, wenn der operative Eingriff nach neoadjuvanter Chemotherapie erfolgt. Noch nicht in die S3-Leitlinie (Stand S3 2021) aufgenommen ist die inzwischen etablierte Praxis, nur Ki-67, nicht aber ER, PR

und Her-2/neu, bei primärer operativer Therapie am Operationspräparat bei denjenigen Fällen neu zu bestimmen, in denen zwischen Stanzdiagnostik und Operation der Aromatasehemmer Letrozol gegeben worden ist. Aus dieser Medikation resultiert häufig eine deutliche Senkung der Proliferationsrate. Eine Aufnahme dieser Vorgehensweise in eine kommende 5. Version der S3-Leitlinie ist zu erwarten.

5.5 Ki-67 in der Diagnostik von Rezidiven bzw. Fernmetastasen von Mammakarzinomen

Lokale und lokoregionale Rezidive

Als diese Arbeit 2012/13 konzipiert wurde, war gerade üblich geworden, lokoregionäre und metachrone Fernmetastasen, sofern diese nicht nur bildgebend, sondern auch bioptisch gesichert wurden, auf die Expression von ER, PR und Her-2/neu zu untersuchen. Dieses Vorgehen ist inzwischen zumindest für lokoregionäre Rezidive auch in die S3-Leitlinie aufgenommen worden (S3 2021), wo im Kapitel 5.3.1 („Lokales (intramammäres) Rezidiv“) in Empfehlung 5.8 formuliert wird:

„Bei Verdachtsdiagnose eines lokoregionären Rezidivs soll zunächst eine histologische Sicherung mit erneuter Bestimmung von ER, PR und HER2 und ein komplettes Re-Staging erfolgen, um Metastasen auszuschließen und die Planung einer interdisziplinären Therapiestrategie zu ermöglichen.“

In den Kapiteln 5.3.2 („Lokalrezidiv nach Mastektomie“) und 5.3.3 („Axilläres Lymphknotenrezidiv“) wird für diese beiden Konstellationen ebenfalls eine operative Sicherung bzw. Revision empfohlen, wobei hier aber auf ER, PR und Her-2/neu nicht eingegangen wird. Man kann aber im Grunde davon ausgehen, dass die Empfehlung 5.8 sinngemäß auch begründet Anwendung auf die anderen beiden Arten von lokalen oder lokoregionären Rezidiven findet. Von Ki-67 ist in der S3-Leitlinie in diesem Zusammenhang nicht die Rede. Dennoch hat sich durchgesetzt, ähnlich wie beim Primärtumor das routinemäßige Markerpanel von ER, PR und Her-2/neu um Ki-67 zu ergänzen, im Grunde auf Wunsch der Kliniker, die nämlich ihrerseits begannen, Ki-67 im Sinne einer

Vervollkommnung des Markerprofils nachzubestellen, wenn sich die Pathologie bei einer solchen Untersuchung auf die übrigen drei Marker beschränkt hatte.

Fernmetastasen

Die Aussagen dazu, wann und ob überhaupt Fernmetastasen auch histologisch gesichert werden müssen, bleiben in der aktuellen S3-Leitlinie unklar (S3 2021). In der Empfehlung 5.6 heißt es:

„Bei Verdacht auf Fernmetastasen können diese durch geeignete diagnostische Maßnahmen ausgeschlossen werden. Bei neu diagnostiziertem Mammakarzinom und dem klinischen Verdacht auf Metastasen soll ein bildgebendes Staging erfolgen. Als Staginguntersuchungen sollen ein kontrastverstärktes CT (Thorax, Abdomen, Becken) sowie ein Knochenszintigramm durchgeführt werden.“

Natürlich müssen auch histologische Sicherungen von Läsionen mit zu den „geeigneten diagnostischen Maßnahmen“ gerechnet werden, insbesondere wohl zur erstmaligen Sicherung einer synchronen oder metachronen metastasierten Situation. Aussagen dazu, inwieweit dann noch ein ergänzendes Markerprofil erhoben werden muss, fehlen in der S3-Leitlinie komplett. Es hat sich aber auch hier eingebürgert, dass nach histologischer Sicherung ER, PR, Her-2/neu und Ki-67 erneut bestimmt werden, auch wenn die in der S3-Leitlinie wiedergegebene therapeutische Rationale hierfür keinen evidenten Grund erkennen lässt.

5.6 Ki-67 in der Charakterisierung synchroner Lymphknotenmetastasen: Ein weißer Fleck auf der onkologischen Landkarte

Während also Primärtumoren und in aller Regel auch synchrone und metachrone Fernmetastasen eine immunhistochemische Charakterisierung erfahren, ist dieses bei synchronen Lymphknotenmetastasen nicht der Fall. Ausnahmen stellen nach bestem Wissen allerdings die Fälle dar, in denen sich in derselben Mamma Karzinomherde mit unterschiedlichem Immunprofil präsentieren, also z.B. ein Tumor mit positivem und einer mit negativem ER-Status oder auch ein Tumor mit einer hohen und einer mit

einer niedrigen Ki-67-Expression. Solche Konstellationen werden dann gelegentlich durch eine Zusatzuntersuchung an einer Lymphknotenmetastase weiter in die eine oder andere Richtung geklärt und die Therapiewahl Leitlinien-gerecht an das Immunprofil der Lymphknotenmetastase angepasst.

In der S3-Leitlinie wird auf die synchronen Lymphknotenmetastasen in diesem Zusammenhang überhaupt nicht eingegangen. Auf das Thema der axillären Lymphknoten wird nur bezogen auf die Aufarbeitungsmethoden der Sentinel- bzw. Non-Sentinel-Lymphknoten jeweils eine Empfehlung zur konkreten Vorgehensweise gegeben, um Mikro- bzw. Makrometastasen in den Lymphknoten verlässlich zu erkennen und den Lymphknotenstatus der pTNM-Klassifikation korrekt zu benennen.

Ob es sinnvoll sein könnte, ergänzende Marker an Lymphknotenmetastasen zu bestimmen, soll im Folgenden ausschließlich für Ki-67 diskutiert werden, da nur dieser Marker im vorliegenden Projekt an Lymphknotenmetastasen angewandt worden ist, nicht hingegen ER, PR und Her-2/neu, die in einem separaten Projekt auf diese Frage hin untersucht werden.

5.6.1 Vergleich der Ki-67-Expression von Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen in der eigenen Studie

Sowohl für die klinische Aussage, als auch für methodische Untersuchungen mussten in unserer Studie Kompromisse gemacht werden, da nicht für alle Fälle die gleiche Zahl von Lymphknotenmetastasen vorlag. In den 11 Fällen, in denen nur eine Metastase zur Verfügung stand, gab es zu ihrer Berücksichtigung keine Alternative. In den 28 Fällen mit mehreren Metastasen wurde für die klinische Auswertung diejenige mit der größten Tumorfläche berücksichtigt. Die in Kapitel 4.4 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass die Ki-67-Expression, die sich insgesamt in einer breiten Datenverteilung zwischen fast 0% und > 80% bewegte,

- bezogen auf die Primärtumoren in den N1-Fällen im Durchschnitt höher war als in den N0-Fällen (11,0% vs. 8,9%) und
- die Lymphknotenmetastasen im Durchschnitt höher lagen als die Primärtumoren der N1-Fälle (16,5% vs. 11,0%),

und das bei vergleichbaren Streuungswerten. Beide Zahlenvergleiche lassen den Schluss darauf zu, dass die Ki-67-Expression am eigenen Datensatz durchaus auf eine Tumorprogression zu beziehen ist. Auch wenn die Unterschiede in den Prozentzahlen nicht sehr hoch wirken, so betragen die Quotienten der Mittelwerte immerhin 1,24 und 1,5.

Auf die Einteilung der Fälle in Luminal A und Luminal B wurde in unserer Studie im Ergebnisteil kein Bezug genommen, anders als dieses in einigen unten zitierten Studien der Fall ist. Dieses hat damit zu tun, dass die im Rahmen des Gesamtprojektes erhobenen Werte für die ER- und PR-Immunhistochemie aus formalen Gründen (Problemfeld wissenschaftliche Zweitverwertung) nicht verwendet werden konnten. Festzuhalten ist dabei, dass die N0-Primärtumoren und die N1-Primärtumoren ihren Mittelwert unterhalb des Schwellenwertes von 14% haben, der im Fall von Hormonrezeptorpositivität Luminal A und Luminal B trennt, wohingegen die Lymphknotenmetastasen im Durchschnitt über dem Schwellenwert lagen. Vergleicht man die einzelnen Wertepaare, so lagen 23 Fälle bei beiden Bestimmungen bei Werten bis 14% bzw. bei Werten über 14% (Konkordanz: 59,0%). Setzt man einen Schwellenwert von 20% an, wie dieses in einigen Publikationen gemacht wurde (siehe unten) so steigt die Zahl gleichgerichteter Fälle auf 28 (Konkordanz: 71,8%) an.

Bezogen auf die Prognose der Patientinnen ließ sich zeigen, dass die Ki-67-Expression in den Lymphknotenmetastasen von statistisch signifikanter Relevanz war (Abbildungen 25 und 26 und zugehörige Tabellen), wobei sich die beste Auftrennung der Patientinnen in prognostisch unterschiedliche Gruppen zeigte, wenn die Quantilgrenzen der Primärtumoren übernommen wurden. Multivariat war die Ki-67-Expression in den Lymphknotenmetastasen relevanter als die im Primärtumor, ablesbar am Chi²-Enter-Wert und dem zugehörigen p-Wert. Für die Lymphknotenmetastasen betrug er 12,96 ($p = 0,0003$), für den Primärtumor 7,78 ($p = 0,0053$). Es wäre somit auf einer Datenbasis allerdings nur von relativ wenigen Fällen zu überlegen, ob nicht eine Ki-67-Bestimmung an synchronen Lymphknotenmetastasen zukünftig durchgeführt werden sollte.

5.6.2 Vergleich der Ki-67-Expression von Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen in der Literatur

Bei der hohen Zahl von fast 8000 wissenschaftlichen Arbeiten an Mammakarzinomen, in denen die Ki-67-Expression bestimmt wurde, überrascht, wie selten sie auch an Lymphknotenmetastasen erhoben wurde. Dabei fällt weiter auf, dass nur in wenigen jener Arbeiten ein Streuungsmaß oder ähnliches bestimmt wurde; vielfach beschränken sich die Aussagen auf die Unterscheidung einer Luminal A- und einer Luminal B-Konstellation.

In Tabelle 40 sind Daten verschiedener Arbeiten zum Vergleich der Zählwerte zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen wiedergegeben:

Autoren	Methodik	Zahl der Fälle	MW +/- SD Primärtumor [%]	MW +/- SD LK-Metastase [%]
Buxant et al. 2002	500 Zellen	38	21,8 +/- 9,8%	29,8 +/- 12,2%
Kinoe et al. 2018	1000 Zellen Hotspot	104	20,3 +/- 20,7	37,1 +/- 28,0
Tawfik et al. 2013	MW von 5-10 Hotspot-GF	103	20 (Median)	15 (Median)
<i>Eigene Studie 2023</i>	<i>im Mittel > 2000 Zellen</i>	<i>39</i>	<i>11,0 +/- 10,1</i>	<i>16,5 +/- 14,1</i>

Tabelle 40: Vergleich der ausgezählten Ki-67-Expression zwischen Primärtumoren und LK-Metastasen in der Literatur mit Angabe von Mittelwerten (MW) sowie von Standardabweichungen (SD). GF = Gesichtsfeld

Insgesamt zeigen die vier Arbeiten, dass zwar mehrheitlich die Lymphknotenmetastasen höhere Mittelwerte für Ki-67 aufweisen, aber eine der beiden größeren Studien eine gegenteilige Aussage trifft. Auch die Mittelwerte als solche schwanken deutlich, und zwar etwa um den Faktor 2, beispielsweise für die Primärtumoren zwischen 11,0% und 20,3%. Entsprechend liegen keine einheitlichen Resultate vor.

Die Arbeiten, die mit einem Schwellenwert arbeiten, sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 41), geordnet nach den Schwellenwerten, die zwischen 10% und 20% lagen.

Autoren	Methodik	Zahl der Fälle	Schwellenwert [%]	Konkordanz [%]	PT hoch - -Met. niedrig vs. PT niedrig - LK-Met. Hoch
Buxant et al. 2002	500 Zellen	38	10	81,6	0 / 7
Tawfik et al. 2013	MW von 5-10 Hotspot-GF	103	10	81,6	12 / 7
Khande et al. 2020	1000 Zellen Hotspot	60	10	83,3	4 / 6
Kinoe et al. 2018	1000 Zellen Hotspot	104	14	56,7	13 / 32
Georgescu et al. 2016	nicht angegeben	41	14	32,0	26 / 6
Kuncman et al. 2021	Zählung am TMA	43	16	76,8	5 / 5
Falck et al. 2013	Schätzung am TMA	60	20	91,7	0 / 5
Mandó et al. 2017	nicht angegeben	89	20	83,1	12 / 3

Tabelle 41: Vergleich der Ki-67-Expression zwischen Primärtumoren und LK-Metastasen in der Literatur mit von Konkordanzen, bezogen auf einen Schwellenwert. Die letzte Spalte benennt die diskrepanten Fälle. Beispiel 4 / 6: In vier Fällen lag der Primärtumor über dem Schwellenwert, die LK-Metastase darunter, in sechs Fällen war es umgekehrt.

Die Datenverteilung zeigt auch hier eine Uneinheitlichkeit der Ergebnisse; es gab sowohl Studien, in denen Primärtumoren häufiger oberhalb der Schwelle lagen und die Lymphknotenmetastasen darunter, als auch umgekehrt.

5.6.3 Exkurs: Andere Vergleiche der Ki-67-Expression beim Mammakarzinom

Vergleich Stanzbiopsie - Resektat

Arbeiten, in denen die Ki-67-Bestimmungen an Stanzbiopsie und Resektat verglichen wurden, können in gewisser Weise als Beispiele für die Repräsentativität der Untersuchung angesehen werden, da die Bestimmungen ja an verschiedenen Stellen des Tumors erfolgt sein werden. Gleichzeitig müssen aber auch Fixationseffekte bedacht werden, da Stanzen ungleich schneller durchfixieren als die größeren Resektate. Man weiß aus experimentellen Arbeiten an Hirngewebe und an Osteosarkomen, dass Mitosen unter Ischämie und Gewebsazidose schneller und vermehrt ablaufen, so dass sich in verzögert fixierten Geweben später weniger Mitosen darstellten als in schnell fixierten (Cavanagh und Lewis 1969, Graem und Helweg-Laersen 1979). Ob dieses für Abläufe in der S-Phase und damit für Ki-67 ähnlich gelten würde, ist unseres Wissens nach nicht systematisch untersucht. Die Ergebnisse der wenigen Vergleiche klinischer Studien zeigen ein uneinheitliches Bild (Tabelle 42).

Autoren	Methodik	Zahl der Fälle	MW +/- SD Stanzbiopsie [%]	MW +/- SD Resektat [%]
Ahn et al. 2018	TV-Bildanalyse	89	25,6	22,1
Kim et al. 2016	5000 Zellen, überwiegend in der Tumor- peripherie	310	16,1 +/- 15,8	21,2 +/- 21,5

Tabelle 42: Vergleich der Ki-67-Expression zwischen Stanzbiopsien und späteren Resektaten von Primärtumoren in der Literatur mit Angabe von Mittelwerten (MW) sowie, soweit vorhanden, von Standardabweichungen (SD).

In der einen Arbeit lagen somit im Mittelwert die Stanzbiopsien um 3,5 Prozentpunkte höher als die Resektate, in der anderen Arbeit um 5,1 Prozentpunkte niedriger. Beide Arbeiten gaben darüber hinaus auch die Konkordanzwerte für einen Schwellenwert von 14% an, der jeweils hoch bei 82,0% (Ahn et al. 2018) bzw. 85,2% (Kim et al. 2016)

lag. Zwei Untersuchungen im identischen Tumor streuen somit in etwa um +/- 5%. Damit sind die Margen für Schwankungen geringer als im Vergleich von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen (siehe Tabelle 36), auch wenn in der eigenen Studie ebenfalls eine Schwankungsbreite von ca. 5% vorlag. Die Konkordanz ist ebenfalls deutlich höher als im Durchschnitt der Arbeiten, in denen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen verglichen werden.

Vergleich nach Durchführung neoadjuvanter / adjuvanter Therapien

Treten Therapieeffekte hinzu, so sind entsprechende Vergleiche kaum noch aussagekräftig.

In einer aktuellen Studie wurde die Ki-67-Expression an Mammakarzinomen vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie an 448 Fällen bestimmt, bei denen 500-1000 Tumorzellen an der Wachstumsfront ausgewertet wurden (Ding et al. 2020). Abweichungen zwischen den beiden erhobenen Werten von mehr als 20 Prozentpunkten wurden als diskordant definiert. Unter dieser Maßgabe waren nur 75 Fälle konkordant (16,7%) und 373 diskordant (83,3%). Dabei wiesen 243 Fälle nach der neoadjuvanten Chemotherapie einen um mehr als 20 Prozentpunkte niedrigeren Ki-67-Wert auf und 130 einen höheren - dies entspricht einer Verteilung im annähernden Verhältnis von 2:1.

Eine Arbeit, in der mit dem Schwellenwert von 14% gearbeitet wurde, zeigte allerdings weniger deutlich abweichende Resultate für 65 Fälle, in denen der Wert im Primärtumor mit dem in einem Rezidiv bzw. einer Fernmetastase verglichen wurde (Peng et al. 2021). Die Konkordanz betrug 79,5%, was den Ergebnissen der Tabelle 37 ähnelt; dabei traten Abweichungen in beide Richtungen auf: In neun Fällen sank der Ki-67-Wert vom Primärtumor zu Rezidiv oder Metastase auf unter 14% ab, in fünf Fällen stieg er über 14% an. Allerdings wurden die eventuellen Therapien zwischen Primärtumor und Metastase in der Studie nicht aufgeführt.

Ferner soll noch eine Arbeit an 97 Fällen von Primärtumoren und vorwiegend Rezidiven (sowie wenigen Fernmetastasen) erwähnt werden, in der allerdings mit dem unüblichen Schwellenwert von 50% gearbeitet wurde (Nishimura et al. 2011). Hier

betrug die Konkordanz 77,3%; in fünf Fällen sank die Ki-67-Rate auf unter 50% im Rezidiv, in 17 Fällen stieg sie auf über 50% an.

Die Daten dieser Vergleiche können zusammenfassend als Beleg dafür gewertet werden, dass Ki-67-Werte unbehandelter Primärtumoren nicht auf eine metastasierte Situation nach adjuvanter Therapie übertragen werden dürfen.

5.7 Beurteilung der Eignung von Ki-67 als Marker unter methodischen Gesichtspunkten

Rahmenbedingungen und Empfehlungen zur Präanalytik, nachfolgenden Probenbehandlung, Färbung und Befundinterpretation der Ki-67-Expresion sind sehr detailliert und gut nachvollziehbar in einer Arbeit der *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* (Dowsett et al. 2011) zusammengefasst. Insbesondere wird empfohlen,

- ein standardisiertes Färbeprotokoll anzuwenden und eine interne und eine externe Qualitätskontrolle mitzuführen,
- mindestens 3 Gesichtsfelder mit 400-facher Vergrößerung, vorzugsweise in der Wachstumsfront des Tumors gelegen, auszuwerten und
- die Angabe des Prozentsatzes Ki-67-positiver Zellen relativ zur Zahl aller Tumorzellen durch Zählung, Schätzung in 5%-Schritten oder durch Bildanalyse zu ermitteln.

Stellt man diesen Forderungen, die auch Eingang in die S3-Leitlinie gefunden haben, die übliche Vorgehensweise in der Diagnostik gegenüber, so sind die erste und die dritte Anforderung heute überall umgesetzt. Anders sieht es mit der zweiten aus. Den Ergebnissen einer eigenen Kurzumfrage an mehreren Instituten für Pathologie folgend arbeitet praktisch niemand regelmäßig mit einer 400x-fachen Vergrößerung, sondern üblicherweise mit einer 100x-fachen, anhand derer über das Präparat gemittelt wird - Letzteres mit dem Argument, man könne an einer Stanze normalerweise die Wachstumsfront nicht definieren bzw. sie sei kleinherdig und damit nicht repräsentativ erfasst.

Dieser Widerspruch zur S3-Leitlinie ist natürlich nicht unproblematisch. Nimmt man aber hinzu, dass es im täglichen Alltag um die Einordnung der Ki-67-Proliferationsphase um einen Schwellenwert herum geht, egal ob dieser nun bei 14%, 15% oder 20% liegt, dann macht die eher lockere Einstellung zur Bestimmung dennoch unter folgender Überlegung Sinn: Vergleicht man die Ergebnisse mehrerer Untersucher in Studien zur Reproduzierbarkeit der Auswertung, so gilt diese bei Werten von < 10% und von > 25%, also in Bereichen, die weit weg liegen vom Schwellenwert, als gut (S3 2021). Letzten Endes ist es unter dieser Maßgabe auch irrelevant, ob man auf 5% oder 10% bzw. auf 25% oder 35% als Ergebnis kommt. Wichtig ist im Grunde nur, sich für den Fall, dass therapeutische Entscheidungen an einem bestimmten Schwellenwert festgemacht werden sollen, den Bereich dazwischen ordnungsgemäß abzubilden. Die S3-Leitlinie empfiehlt hier, statt drei lieber vier bis fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder auszuwerten. Auch die befragten Pathologen gaben an, genauer hinzuschauen und teilweise auch höher zu vergrößern, wenn sie sich mit ihrem zu erwartenden Ergebnis im kritischen Bereich befänden.

5.7.1 Anforderungen an die Bestimmung der Ki-67-Expression in der aktuellen S3-Leitlinie

Immunhistochemische Reaktionen unterliegen in ihrer technischen Ausführung, von der die Färbeintensität und auch die Gleichmäßigkeit einer Färbung abhängen, naturgemäß einer gewissen Variabilität. Vergleicht man über mehrere Tage das Ergebnis der mitgeführten Positivkontrolle, so ist diese bereits bei rein lichtmikroskopischer Auswertung nicht deckungsgleich, obwohl alle Schritte jeden Tag in gleicher Weise durchgeführt werden und heute ja annähernd ausschließlich in immunhistochemischen Färbautomaten vorgenommen werden. Unter Verwendung der TV-Bildanalyse lassen sich Unterschiede auch zahlenmäßig objektivieren, insbesondere bzgl. Schwankungen in der Intensität der Färbungen (Biesterfeld et al. 2003, Kraus 2008).

Des Problemfeldes als solchem sind sich auch die Autoren der S3-Leitlinie bewusst. Dort wird in der derzeit gültigen Version 4.4 im Kapitel 4.5 unter der Überschrift „Auswertung Ki-67-Proliferationsindex“ wie folgt formuliert (S3 2021):

„Für die Bestimmung des Ki-67-Proliferationsindex (PI) ist bislang keine allgemein anerkannte, umfassende Empfehlung zur Standardisierung verfügbar. (...) Die Konsensus-Empfehlung einer internationalen Arbeitsgruppe zum Thema Ki-67 beim Mammakarzinom konzentriert sich aufgrund der heterogenen Vorgehensweise in den Studien lediglich auf bestimmte Eckpunkte zum methodischen Vorgehen einschließlich Auswertung und Interpretation der Ergebnisse [485]. Von den Experten wurde betont, dass es nicht möglich ist, allgemein gültige Ki-67-Grenzwerte für Prognose, Prädiktion und Monitoring anzugeben. In Studien definierte Grenzwerte könnten lokal nur angewandt werden, wenn die lokalen Ergebnisse gegenüber den Studienergebnissen validiert wurden.“

5.7.2 Abschätzung von methodisch bedingten Schwankungsbreiten in der Bestimmung der Ki-67-Expression

Die eingeschränkte interspezifische Reproduzierbarkeit der Ki-67-Expression kann man recht gut an zwei umfassenden, komplex angelegten systematischen Untersuchungen aus den Jahren 2013 und 2016 darstellen. Beide Arbeiten sind von Gruppen erarbeitet worden, die über Expertenwissen verfügen. Eine kanadische Arbeit erfolgte im Namen der *„International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group“* (Polley et al. 2013): Die andere Arbeit stammt aus Südkorea und wurde unter Mitwirkung der *„Korean Breast Pathology Ki-67 Study Group“* verfasst (Chung et al. 2016). Kurz zusammengefasst ergaben sich folgende Hauptaussagen.

In der Studie von Polley et al. (2013), die auch in der S3-Leitlinie zitiert wird, wurde die Ki-67-Expression von 100 Fällen von Mammakarzinomen in einem *Tissue Microarray* (TMA) untersucht; die acht teilnehmenden Institute erhielten einen in einem Referenzlabor gefärbten TMA-Schnitt und färbten einen weiteren selber. Alle Labore werteten die Ki-67-Expression nach eigenem Gusto jeweils verschieden aus (Schätzung in 1%-Schritten, Schätzung in 5%-Schritten, Zählung, Bildanalyse etc.). Sechs der acht Institute nahmen darüber hinaus an einem ergänzenden Teilversuch teil, bei dem 50 Fälle an drei verschiedenen Tagen Ki-67-gefärbt wurden und die Werte verglichen wurden. So entstand ein komplexes System von Daten, die auf Abhängigkeit untereinander überprüft wurden. Insgesamt zeigte sich, dass die Ergebnisse verschiedener Institute nicht untereinander vergleichbar sind. Beispielsweise reichten die Mediane bei der

Auswertung der Ki-67-Expression für die 100 Fälle des gefärbt vorgegebenen TMA-Präparates von 10% - 28% und für das im jeweiligen Institut gefärbte Präparat von 5% - 33%. Die Schwankungen, die sich beim Vergleich der Werte für die Ki-67-Expression an verschiedenen Tagen ergaben, waren zwischen den einzelnen Instituten sehr unterschiedlich und ebenfalls kaum vergleichbar. Der Intraclass-Korrelationskoeffizient (ICC) für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Institutes wurde allerdings als hoch ermittelt („high“, ICC = 0.94; 95%-Konfidenzintervall 0.93 - 0.97), derjenige zwischen den Instituten für den vorgefärbten TMA-Schnitt aber nur als mittel („moderate“, 0.71; 0.47 - 0.78), ebenso der für den im jeweiligen Institut gefärbten TMA-Schnitt („moderate“, 0.59; 0.37 - 0.68). Vermutlich können die meisten Institute auf ihre spezifischen Bedingungen abgestimmte Färbeprotokolle verlässlich anwenden. Die stark unterschiedlichen Mediane lassen aber daran zweifeln, dass ein Arbeiten mit international festgelegten Schwellenwerten zu klinisch verwertbaren Ergebnissen führen kann.

Drei Jahre später wurde eine weitere verschachtelt konzipierte Studie an 20 Fällen von Mammakarzinomen aufgelegt (Chung et al. 2016), in der ganze Tumorschnitte und TMAs, ferner Fälle mit und ohne Hotspot und von jedem der 30 Untersucher Ergebnisse von zwei Auswerteverfahren (Zählung und Schätzung) verglichen wurden. Die Untersuchung erfolgte an gescannten Präparaten und somit PC-basiert. Auch in dieser Studie zeigten sich große Schwankungsbreiten. So kamen Fälle vor, bei denen Schätzungen in alle fünf Kategorien fielen (< 5%, 5-10%, 10-20%, 20-50%, > 50%). Beim Auszählen ergaben sich in einzelnen Fällen Minimal- und Maximalwerte, die sich um mehr als 50 Prozentpunkte unterschieden. In zugehörigen Boxplot-Darstellungen ist zu erkennen, dass eine Reihe von Fällen Ausreißer (außerhalb der 1,5-fachen Breite des vorgegebenen Referenzintervalls) und einzelne Fälle auch Extremabweichungen (außerhalb der 3-fachen Breite) aufwiesen. Bezieht man sich auf den Variationskoeffizienten pro Fall, so lagen diese für ganze Schnitte (ohne Hotspot) zwischen 24,5% und 57,4% und für TMAs zwischen 8,3% und 35,8%. Für den Vergleich der einzelnen Datensätze lagen hohe ICC-Werte zwischen 0.736 und 0.895 vor - dennoch sind die Schwankungen in den Datensätzen so hoch, dass man auch in dieser Arbeit nicht von einer hohen Reproduzierbarkeit der Ki-67-Bestimmungen ausgehen kann.

Im Grunde kann man offenbar nur Zähl- oder Schätzwerte vergleichen, die im selben Institut erarbeitet worden sind. Eine Übertragung von Werten auf eine andere Einrichtung scheint bis heute nicht verlässlich möglich zu sein.

5.8 Resumée

Klinischer Ausblick

- Die mittlere, per Zählung quantitativ bestimmte Ki-67-Expression der Primärtumoren im Stadium pN0 war niedriger als die in den Primärtumoren im Stadium pN1, und diese wiederum war niedriger als die der synchronen Lymphknotenmetastasen (p jeweils $< 0,05$ im t-Test). Hieraus lässt sich die Hypothese entwickeln, dass Ki-67 eine Bedeutung in der Tumor-Evolution zukommt. Diese Aussage gilt dabei allerdings nur für das Patientenkollektiv als Ganzes; bezogen auf die Einzelfälle kamen Überlappungen der Ki-67-Werte vor, so dass nicht in allen Fällen ein entsprechender Schluss zulässig ist.
- In der multivariaten Überlebensanalyse zeigte sich, dass die Ki-67-Expression in den Lymphknotenmetastasen von höherer prognostischer Relevanz war als die im Primärtumor, wobei sich diese Daten leider nur auf 39 Fälle beziehen. Dennoch zeichnet sich hier ein Trend ab, der bisher so nicht beschrieben ist.
- Die Validierung des multivariaten Cox-Modells durch die Kombination der Ki-67-Expression in Lymphknotenmetastasen mit einem weiteren Parameter, hier dem Progesteronrezeptor, hilft, den „wahren Einfluss“ von Variablen, die in einem Cox-Modell aufgenommen werden, abzuschätzen. Dabei zeigt die Validierung der Modellannahmen durch Gegenüberstellung in Kaplan-Meier-Kurven, die die „Wahrheit“ im Datensatz abbilden, dass tatsächlich ein gewisser belegbarer prognostischer Effekt durch die Hinzunahme von Ki-67 eingetreten ist: Die Kurven weichen weiter auseinander, und es ist neben einer günstigen und einer ungünstigen Gruppe, wie sie der Progesteronrezeptor vorhält, eine dritte Gruppe mit intermediärer Prognose abgrenzbar (Abb. 28). Der Effekt lässt sich

auch durch die statistischen Kenngrößen (p-Werte im Wilcoxon-Breslow-Test) in Zahlen fassen.

Aufgrund der geringen Fallzahl wäre es sicher sinnvoll, an einem weiteren und deutlich größeren, aktuelleren Patientenkollektiv beispielsweise aus der Zeit um 2010 die Studie zu wiederholen und dabei auch Ki-67-Bestimmungen an synchronen Fernmetastasen hinzuzunehmen. Auf diese Weise ließe sich der Wert unserer Studie noch einmal absichern, und es würde die Wissenslücke um den Vergleich zwischen Primärtumoren und synchronen Fernmetastasen bei Mammakarzinomen möglicherweise geschlossen. Die Sequenz Primärtumor - synchrone Lymphknotenmetastasen - synchrone Fernmetastasen ist anscheinend nämlich noch gar nicht untersucht: Eine am 20.2.2023 vorgenommene Pubmed-Recherche ergab zwar für Arbeiten an synchronen (Fern-)Metastasen 5014 Treffer. Kreuzt man diese mit Ki-67 / MIB-1 in verschiedenen Schreibweisen an, reduziert sich die Zahl der Arbeiten auf 70, und Arbeiten, in denen Mammakarzinome behandelt wurden, sind nicht darunter. Auffällig ist die gewisse Häufung von Studien an neuroendokrinen Tumoren, vielleicht dadurch bedingt, dass ihre Primärtumoren oft klein sind und die Erkrankung nicht selten durch vergleichsweise große Metastasen z.B. in der Leber erstdiagnostiziert wird.

Methodischer Ausblick

Dass weitere Studien zu unserem Thema Sinn machen würden, hat auch damit zu tun, dass Ki-67 auch in Zukunft eine bedeutende Rolle in der Mammapathologie spielen wird. Eine grundlegend andere Sicht auf diesen Marker ist in Deutschland trotz der dargestellten methodischen Limitationen nicht zu erwarten, wenn demnächst eine fünfte Version der S3-Leitlinie mit einer Laufzeit von vermutlich wieder 5-6 Jahren aufgelegt wird. Dabei muss aber darauf hingewiesen werden, dass nicht alle internationalen Leitlinien Ki-67 als sinnvollen Marker anerkennen, sondern dass die Meinungen dazu auseinandergehen. Auf diesen Aspekt wurde aktuell in einem Review-Artikel zu Ki-67 hingewiesen, der den Weg des Markers von seiner Entdeckung in Kiel durch Gerdes im Jahr 1983 bis heute für das Mammakarzinom nachzeichnet (Finkelman et al. 2023). Dort werden als Fachgesellschaften, die Ki-67 für die Prognose von

Mammakarzinomen als Marker empfehlen oder berücksichtigen, die *Italian Association of Medical Oncology*, die *European Group on Tumor Markers*, die *European Society for Medical Oncology* und das *National Institute for Health and Care Excellence* genannt, während dieses die *American Society of Clinical Oncology* oder das *National Comprehensive Cancer Network* nicht tun. Das wichtige *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* nimmt demnach eine neutrale Haltung ein, indem es keine Empfehlungen gibt, aber empfiehlt, weiter Ki-67-Daten zu sammeln (*“providers and registries should continue to collect and record Ki-67 results”*).

Für die Zukunft von Ki-67 in der senologischen Onkologie sind aus methodischer Sicht zwei Dinge ausschlaggebend:

- Der Marker muss auch nach eventuellen methodischen Modifikationen einen Wissenszuwachs bieten zu den Tumoreigenschaften, die bereits aus den allgemeinen morphologischen Untersuchungen bekannt sind (Tumortyp, TNM-Klassifikation inklusive ihrer Komponenten, modifiziertes Grading inklusive seiner Komponenten) bzw. parallel erhoben werden (bislang ER, PR und Her-2/neu). Dies bedeutet, dass für den Fall, dass solche Modifikationen etabliert werden, auch entweder neue Studien auf diese bezogen die Validität von Ki-67 erneut belegen müssen oder Datensätze bereits vorhandener Studien auf die neuen Bedingungen hin kritisch hinterfragt und neu berechnet werden müssen.
- Ki-67 muss sich als methodisch so robuster Marker erweisen, dass er mit später entwickelten Testverfahren konkurrieren kann. Als solche sind derzeit im Besonderen die verschiedenen Genprofiltests („Multigentests“) zu verstehen wie Prosigna, MammaPrint, EndoPredict oder Oncotype (zu Details siehe Degenhardt et al. 2017). Im Folgenden soll exemplarisch auf den Oncotype-Test eingegangen werden. Mit diesem wird über einen mit einer Zahl ausgedrückten *Recurrence Score* ein statistisches Risiko ermittelt, dass die Patientin in einem bestimmten Zeitraum ein Rezidiv oder Fernmetasen entwickeln. Dabei wird ein 21 Gene umfassender mRNA-basierter Multigen-Assay verwendet, der mit einer RT-qPCR analysiert wird. Innerhalb dieser sind auch fünf Gene vertreten,

die Proliferations-assoziiert sind. Bei insgesamt bekannter guter Korrelation von Ki-67 mit dem Ergebnis des Oncotype-Tests wird Ki-67 für den Fall, dass seine Bestimmung besser standardisiert werden könnte, als eine „*potentially cost-effective alternative to genomic profiling assays*“ gesehen (Finkelman et al. 2023) - in der Tat liegen die Kosten für eine Ki-67-Bestimmung bei einem Bruchteil derer für den Oncotype-Test. Im Grunde vergleichbare Korrelationen wurden auch für die andere Genexpressionstests wie EndoPredict, MammaPrint oder Prosigna erhoben. Das Vertrauen in diese Tests ist zwar auf der einen Seite hoch, andererseits ist aber auch bekannt, dass die Konkordanz zwischen solchen Tests in Arbeiten, in denen mehrere von ihnen auf das gleiche Patientengut angewandt wurden, nicht sehr hoch war. Daher wird in der S3-Leitlinie, die in Kapitel 4.5.4.4 breit und sehr ausgewogen das Thema der Multigentests behandelt, festgestellt, dass „für die individuelle Patientin unterschiedliche Tests unterschiedliche Risikoeinteilungen und damit divergente Empfehlungen für oder gegen eine Chemotherapie ergeben können“ (S3 2021). Wie ambivalent das ganze Thema ist, zeigt sich dann in der fast skurril klingenden Empfehlung 4.79 mit dem Wortlaut „Wenn ein Multigentest durchgeführt wird, soll nicht mehr als ein Test zur Entscheidungsfindung herangezogen werden“ (S3 2021), die nicht so recht mit dem Zitat zuvor in Einklang zu bringen ist.

Ganz allgemein verführen scheinbar genaue Zahlenangaben leicht dazu, einen dargestellten Sachverhalt als „objektiv“ und „wahr“ anzusehen und gewissermaßen unüberprüft, ohne Berücksichtigung der Randbedingungen, zu übernehmen. Am Beispiel des Ki-67 wurde diskutiert, wie schwierig die Materie in Wirklichkeit ist, wenn man hinter die Kulissen der Methodik und der Widersprüchlichkeit von Aussagen in wissenschaftlichen Arbeiten schaut. Gleiches gilt aber auch für alle anderen Größen, die herangezogen werden. Darauf wurde 2010 in der bereits oben zitierten Arbeit von Rakha et al. hingewiesen. Sie räumten ein, dass es für das von ihnen unterstützte Grading (dort als NGS für *Nottingham Grading System* bezeichnet) ebenfalls methodische Einwände gäbe und dass man unbestreitbar an der interspezifischen Reproduzierbarkeit weitere Verbesserungen erreichen müsse. Hieran schlossen sie aber eine vollkommen be-

rechtigte allgemeine Mahnung bzgl. der eingeschränkten Objektivität anderer Variablen an, die sich auf das Staging (pT, pN, L, V) und prädiktive Marker (Her-2/neu, ER) bezogen:

„Despite the undeniable need to improve the inter-observer agreement for histological grade, the criticisms directed against NGS should be tempered by the fact that other parameters used to determine the therapy of patients with breast cancer also suffer from inter-observer variability, including the assessment of small-volume nodal metastases (LN stage), HER2 immunohistochemical and in situ hybridization scoring, ER scoring, assessment of vascular invasion, and even the assessment of tumor size.“

Dem kann man nur hinzufügen, dass das Gleiche natürlich auch für die Multigentests gilt, die in die Betrachtung der Autoren 2010 noch nicht einbezogen worden waren, und ebenso für alle weiteren, in Zukunft zur Anwendung kommenden adjuvanten Ansätze.

6 Zusammenfassung

Die Expression von Ki-67 wurde häufig als prognostisch nützlich bei primärem Brustkrebs bewertet. Lymphknotenmetastasen wurden jedoch selten untersucht, und die prognostische Bedeutung ihrer Ki-67-Expression ist unklar. In unserer Studie präsentieren wir prognostische Daten zu einer Reihe von 39 N1-Brustkrebsfällen mit Ki-67, die sowohl im Primär- als auch im Sekundärtumor mit einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 11,5 Jahren analysiert wurden.

Es wurde eine Ki-67-Immunhistochemie unter Verwendung eines Standardprotokolls durchgeführt. Der Prozentsatz der immunreaktiven Zellen wurde durch manuelles Zählen in 20 Hochleistungsfeldern bewertet. Die Ergebnisse wurden mit klinischen und morphologischen Daten korreliert.

Zur Validierung des Cox-Modells am konkret zugrundeliegenden Datensatz wurden zum einen bei stetigen Variablen die Aufstellung einer „Multivariaten Funktion“ mit späterer Gruppenbildung, z.B. nach 1:2:1-Quantilisierung und zum anderen bei dichotomisierten Variablen über die Definition von Untergruppen kombiniert angewandt. Die visuelle und statistische Validierung erfolgte durch die Darstellung der neugebildeten Gruppen gemeinsam mit dem PR-Status in Kaplan-Meier-Kurven

Die Mittelwerte (11,1 % vs. 20,7 %) und die Medianwerte (7,9 % vs. 18,4 %) für Ki-67 waren zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen recht unterschiedlich und nur schwach korreliert ($r=0,57$). In der univariaten Überlebensanalyse (Grenzwert: jeweiliger Medianwert) war die Ki-67-Expression in den Lymphknoten von höherer prognostischer Bedeutung ($p=0,0001$) als in Primärtumoren ($p=0,0029$). In einem multivariaten Cox-Regressionsmodell galten die Ki-67-Expression in den Lymphknoten und der Progesteronrezeptorstatus (PR) als prognostisch unabhängige Faktoren, die Ki-67-Expression des Primärtumors, das Tumorgrading und der Östrogenrezeptorstatus hingegen nicht.

Die Analyse der Ki-67-Expression in Lymphknotenmetastasen erwies sich als von höherer prognostischer Bedeutung als bei primärem Brustkrebs, möglicherweise auf-

grund der Expansion eines unterschiedlichen Tumorklons während der Lymphknotenmetastasierung. Daher kann bei Brustkrebs eine quantitative Ki-67-Auswertung tumorpositiver Lymphknoten empfohlen werden.

7 Conclusion

The expression of Ki-67 has been frequently evaluated as prognostically useful in primary breast cancer. Lymph node metastases, however, have been rarely investigated, and the prognostic impact of their Ki-67-expression is unclear. In our study, we present prognostic data on a series of 39 N1-breast cancer cases with Ki-67 analysed both in primary and secondary tumour with a follow-up period of up to 11.5 years.

Ki-67-immunohistochemistry was performed using a standard protocol. The percentage of immunoreactive cells was evaluated by manual counting in 20 high-power-fields. The results were correlated with clinical and morphological data.

In order to validate the Cox model on the concrete underlying data set, the establishment of a "multivariate function" with later group formation, e.g. after 1:2:1 quantification, was applied on the one hand for continuous variables and on the other hand for dichotomized variables to the the definition of subgroups. The visual and statistical validation was carried out by representing the newly formed groups together with the PR status in Kaplan-Meier curves

The mean values (11.1% vs. 20.7%) and the median values (7.9% vs. 18.4%) for Ki-67 were quite different between primary tumours and lymph node metastases and only weakly correlated ($r=0.57$). In univariate survival analysis (threshold: the respective median value), the Ki-67 expression in the lymph nodes was of higher prognostic significance ($p=0.0001$) compared to that in primary tumours ($p=0.0029$). In a multivariate Cox regression model, the Ki-67 expression in the lymph nodes and the progesterone receptor status (PR) were entered as prognostically independent factors while the Ki-67 expression of the primary tumour, the tumour grading and the estrogen receptor status were rejected.

The analysis of the Ki-67 expression in lymph node metastases proved to be of higher prognostic significance than in primary breast cancer possibly due to the expansion of a distinct tumour clone during lymph node metastasizing. Thus, quantitative Ki-67 evaluation of tumour-positive lymph nodes can be recommended for breast cancer.

8 *Literaturverzeichnis*

- Abdel-Rahman O: Validation of the 8th AJCC prognostic staging system for breast cancer in a population-based setting. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 168: 269-275
- Abenhardt W, Haidinger R, Hecken S, Gutschow K, Lutz L, Sommer H, de Waal JC, Wypior HJ: Nachsorge. In: *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 14. Auflage, 2013. W. Zuckschwerdt Verlag München. S. 173ff.
- Ahn S, Lee J, Cho MS, Park S, Sung SH. Evaluation of Ki-67 Index in Core Needle Biopsies and Matched Breast Cancer Surgical Specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Mar;142(3):364-368. doi: 10.5858/arpa.2017-0014-OA. Epub 2017 Nov 16.
- Ali D, Le Scodan R. Treatment of the primary tumor in breast cancer patients with synchronous metastases. *Ann Oncol* 2011; 22: 9-16
- Andersen JA: Lobular Carcinoma in situ. A long-term follow-up in 52 cases. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1974; 82: 519-533
- Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, de Placido S, Osborne CK, Elledge RM: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1254-1261
- Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G: Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer* 2006; 106: 743-750
- Baak JPA, van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 374-382
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM: Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1973-1979
- Bartelink H, Rubens RD, van der Schueren E, Sylvester R. Hormonal therapy prolongs survival in irradiated locally advanced breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 207-215
- Beckmann MW, Picard E, An HX, van Roeyen CR, Dominik SI, Mosny DS, Schnurch HG, Bender HG, Niederacher D. Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA 1 and BRCA 2 markers in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 1220-1226

- Berns EM, Foekens JA, van Staveren IL, van Putten WL, de Koning HY, Portengen H, Klijn JG. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995; 159: 11-18
- Biesterfeld S, Kraus HL, Reineke T, Muys L, Mihalcea AM, Rudlowski C: Analysis of the reliability of manual and automated immunohistochemical staining procedures. A pilot study. *Analyt Quant Cytol Histol* 2003; 25: 90-96
- Biesterfeld S: Methodische Aspekte bei der standardisierten Beurteilung der mitotischen Aktivität von Tumorgewebe. *Pathologe* 1997; 18: 439-444
- BLOOM HJ, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359-77.
- Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC, Gelmon K, Nielsen TO, Blomqvist C, Heikkilä P, Heikkinen T, Nevanlinna H, Akslen LA, Bégin LR, Foulkes WD, Couch FJ, Wang X, Cafourek V, Olson JE, Baglietto L, Giles GG, Severi G, McLean CA, Southey MC, Rakha E, Green AR, Ellis IO, Sherman ME, Lissowska J, Anderson WF, Cox A, Cross SS, Reed MW, Provenzano E, Dawson SJ, Dunning AM, Humphreys M, Easton DF, García-Closas M, Caldas C, Pharoah PD, Huntsman D: Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010; 7: e1000279
- Brackstone M, Fletcher GG, Dayes IS, Madarnas Y, Sen Gupta SK, Verma S: Locoregional therapy of locally advanced breast cancer: a clinical practice guideline. *Current Oncol* 2015; 22 (Suppl 1):S54-S66
- Breslow N: A generalized Kruskal-Wallis test for comparing k-samples subjected to unequal patterns of censorship. *Biometrika* 1970; 57: 579-594
- Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Nestle-Krämling C, Matuschek C. Adjuvant radiation therapy of regional lymph nodes in breast cancer - a meta-analysis of randomized trials - an update. *Radiat Oncol* 2015; 10: 258
- Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, Bergh J, Bhattacharyya G, Biganzoli L, Cardoso MJ, Carey L, Corneliussen-James D, Curigliano G, Dieras V, El Saghir N, Eniu A, Fallowfield L, Fenech D, Francis P, Gelmon K, Gennari A, Harbeck N, Hudis C, Kaufman B, Krop I, Mayer M, Meijer H, Mertz S, Ohno S, Paganini O, Papadopoulos E, Peccatori F, Penault-Llorca F, Piccart MJ, Pierga JY, Rugo H, Shockney L, Sledge G, Swain S, Thomssen C, Tutt A, Vorobiof D, Xu B, Norton L, Winer E: 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Ann Oncol* 2015; 28: 16-33
- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187

- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363
- Cavanagh JB, Lewis PD: Perfusion-fixation, colchicine and mitotic activity in the adult rat brain. *J Anat* 1969; 104: 341-350
- Champion HR, Wallace IWJ: Breast cancer grading. *Br J Cancer* 1971; 25: 441-448
- Choritz H, Büsche G, Kreipe H, Study Group HER2 Monitor: Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch* 2011; 459: 283-289
- Chung YR, Jang MH, Park SY, Gong G, Jung WH; Korean Breast Pathology Ki-67 Study Group. Interobserver Variability of Ki-67 Measurement in Breast Cancer. *J Pathol Transl Med.* 2016 Mar;50(2):129-37.
- Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, Fourme E, Lidereau R, Bièche I: PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R28
- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang T. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366: 2087-2106
- Cox D: Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 1972; 34: 187-220
- Creighton CJ, Osborne CK, van de Vijver MJ, van de Vijver MJ, Foekens JA, Klijn JG, Horlings HM, Nuyten D, Wang Y, Zhang Y, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Lee AV, Schiff R: Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114: 287-299
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV: Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy *J Clin Oncol* 2005; 23: 7721-7735
- D'Andrea MR, Limiti MR, Bari M, Zambenedetti P, Montagutti A, Ricci F, Pappagallo GL, Sartori D, Vinante O, Mingazzini PL. Correlation between genetic and biological aspects in primary non-metastatic breast cancers and corresponding synchronous axillary lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101: 279-284
- Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 1707-1716

- DeCensi A, Guerrieri-Gonzaga A, Gandini S, Serrano D, Cazzaniga M, Mora S, Johansson H, Lien EA, Pruneri G, Viale G, Bonanni B. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 582-587
- Degenhardt T, Braun M, Harbeck N, Schaller G, Schindlbeck C, Stötzer O: Prognostische und prädiktive Faktoren. In: *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 16. Auflage, 2017. W. Zuckschwerdt Verlag München. S. 106-122
- Delides GS, Garas G, Georgouli G, Jiotsziatis D, Lecca J, Liva T, Flemenoglu J: Intralaboratory variation in the grading of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1982; 106: 126-128
- Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, Gerber B, Tesch H, Hilfrich J, Huober J, Fehm T, Barinoff J, Jackisch C, Prinzler J, Rüdiger T, Erb-Stösser E, Blohmer JU, Budczies J, Mehta KM, von Minckwitz G: Ki-67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol* 2013; 24: 2786-2793
- Denley H, Pinder SE, Elston CW, Lee AH, Ellis IO: Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 20-24
- Dikicioglu E, Barutca S, Meydan N, Meteoglu I: Biological characteristics of breast cancer at the primary tumour and the involved lymph nodes. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 1039-1044
- Ding Y, Ding K, Qian H, Yu X, Zou D, Yang H, Mo W, He X, Zhang F, Qin C, Zheng Y, Ding X. Impact on survival of estrogen receptor, progesterone receptor and Ki-67 expression discordance pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One*. 2020 Apr 16;15(4):e0231895.
- Dixon D: BMDP statistical software. Dept. of Biomathematics, University of California, Los Angeles, University of California Press, 1981
- DKFZ 2021 (Zitierweise): Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft: Krebsinformationsdienst. Luminaler Brustkrebs: Was ist das eigentlich? Bedeutung molekularer Subtypen für die klinische Praxis. Online unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2021/fk13-was-ist-luminaler-brustkrebs.php>, zuletzt abgerufen am 12.6.2023
- DKG 2018 (Zitierweise): Patientinnenleitlinie Brustkrebs im frühen Stadium. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V., der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Stiftung Deutsche Krebshilfe. Artikel-Nr. 182 0010, Stand: Dezember 2018. Online unter https://www.krebshilfe.de/infomaterial/Patientenleitlinien/Brustkrebs-im-fruehen-Stadium_Patientenleitlinie_DeutscheKrebshilfe.pdf, zuletzt abgerufen am 4.6.2023

- Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF, International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki-67 in breast cancer: recommendations from the International Ki-67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1656-1664
- Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Hills M, Walsh G; IMPACT Trialists Group: Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 167-170
- Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F: Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* 2017; 75: 284-298
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
- Erić I, Petek Erić A, Kristek J, Koprivčić I, Babić M. Breast cancer in young women: pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin Croat* 2018; 57: 497-502
- Ettl J, Aivazova-Fuchs V, Ataseven B, Harbeck N, Heinemann V, Jansen H, Lutz L, Michl G, Rack B, Rieder B, Schaller G, Sommer H, Stötzer Ö: Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. In: *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 14. Auflage 2013. W. Zuckschwerdt Verlag München, S. 283 ff.
- Falck AK, Fernö M, Bendahl PO, Ryden L: Does analysis of biomarkers in tumor cells in lymph node metastases give additional prognostic information in primary breast cancer? *World J Surg* 2010; 34: 1434-1441
- Farshid G, Dhattrak D, Gilhotra A, Koszyka B, Nolen J: The impact of 2018 ASCO-CAP HER2 testing guidelines on breast cancer HER2 results. An audit of 2132 consecutive cases evaluated by immunohistochemistry and in situ hybridization *Mod Pathol* 2020; 33: 1783-1790
- Finkelman BS, Zhang H, Hicks DG, Turner BM: The evolution of Ki-67 and breast carcinoma: Past observations, present directions, and future considerations. *Cancers* 2023; 15: 808
- Fischer U, Baum F: *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*, Georg-Thieme Verlag, Leipzig 2014, S. 18-19

- Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1233-1241
- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-1087
- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R: Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in nodenegative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-1087
- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ: Prognostic factors in breast cancer. *Arch Path Lab Med* 2000; 124: 966-978
- Galimberti V, Cole BF, Viale G, Veronesi P, Vicini E, Intra M, Mazzarol G, Massarut S, Zgajnar J, Taffurelli M, Littlejohn D, Knauer M, Tondini C, Di Leo A, Colleoni M, Regan MM, Coates AS, Gelber RD, Goldhirsch A: Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19: 1385-1393
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31:13-20
- Gluz O, Nitz UA, Christgen M, Kates RE, Shak S, Clemens M, Krämer S, Aktas B, Kümmel S, Reimer T, Kusche M, Heyl V, Lorenz-Salehi F, Just M, Hofmann D, Degenhardt T, Liedtke C, Svedman C, Würstlein R, Kreipe HH, Harbeck N: West German Study Group Phase III Plan B Trial: first prospective outcome data for the 21-gene recurrence score assay and concordance of prognostic markers by central and local pathology assessment. *J Clin Oncol* 2016; 34: 2341-2349
- Goerke K, Steller J, Valet A: *Klinikleitfaden Gynäkologie und Geburtshilfe*. Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 7. Auflage, 2008; 453-459
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ und Panel members: Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-1583
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; 24: 2206-2223

- Gong Y, Booser DJ, Sneige N: Comparison of Her-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103:1763-1769
- Gordian-Arroyo AM, Zynger DL, Tozbikian GH: Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 guideline focused update. *Am J Clin Pathol* 2019; 152: 17-26
- Graem M, Helweg-Laersen K: Mitotic activity and delay in fixation in tumour tissue. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1979; 87:375–378
- Greenough RB: Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J Cancer Res* 1925; 9: 453-463
- Haag P, Hanhart N. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*, 6. Aufl. Med. Verl.- und Informationsdienste, Breisach am Rhein, 2012, S. 94-102
- Haagensen CD: The bases for the histologic grading of carcinoma of the breast. *Am J Cancer* 1933; 19: 285-327
- Haffty BG, Hauser A, Choi DH, Parisot N, Rimm D, King B, Carter D: Molecular markers for prognosis after isolated postmastectomy chest wall recurrence. *Cancer* 2004; 100: 252-263
- Hayes DF, Henderson IC, Shapiro CL: Treatment of metastatic breast cancer: present and future prospects. *Semin Oncol* 1995; 22 (Suppl 5): 5-19
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE: The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99-110
- Houssami N, Ciatto S, Turner RM, Cody HS, Macaskill P: Preoperative ultrasound-guided needle biopsy of axillary nodes in invasive breast cancer: meta-analysis of its accuracy and utility in staging the axilla. *Ann Surg* 2011; 254: 243-251
- IARC 2020 (Zitierweise): International Agency for Research on Cancer: Breast Globocan 2020. Online unter <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, zuletzt abgerufen am 24.4.2023
- Ibrahim T, Farolfi A, Scarpi E, Mercatali L, Medri L, Ricci M, Nanni O, Serra L, Amadori D: Hormonal receptor, Human epidermal growth factor receptor-2, and Ki-67 discordance between primary breast cancer and paired metastases: clinical impact. *Oncol* 2013; 84: 150-157
- Ieni A, Barresi V, Caltabiano R, Cascone AM, Del Sordo R, Cabibi D, Zeppa P, Lanzafame S, Sidoni A, Franco V, Tuccari G: Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation *Onco Targets Ther* 2014; 7: 1267-1272

- Ishihara M, Mukai H, Nagai S, Onozawa M, Nihei K, Shimada T, Wada N: Retrospective analysis of risk factors for central nervous system metastases in operable breast Cancer: Effects of biologic subtype and Ki-67 overexpression. *Surv Oncol* 2013; 84: 135-140
- Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW: Determination of Her-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000; 13: 37-45
- Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481
- Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, Blohmer JU, Eiermann W, Jackesz R, Jonat W, Lebeau A, Loibl S, Miller W, Seeber S, Semiglazov V, Smith R, Souchon R, Stearns V, Untch M, von Minckwitz G: Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1940-1949
- Khasraw M, Brogi E, Seidman AD: The need to examine metastatic tissue at the time of progression of breast cancer: is re-biopsy a necessity or a luxury? *Curr Oncol Rep* 2011; 13: 17-25
- Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG, Halberg F, Somerfield MR, Davidson NE; American Society of Clinical Oncology: American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5091-5097
- Kim HS, Park S, Koo JS, Kim S, Kim JY, Nam S, Park HS, Kim SI, Park BW. Risk Factors Associated with Discordant Ki-67 Levels between Preoperative Biopsy and Postoperative Surgical Specimens in Breast Cancers. *PLoS One*. 2016 Mar 8;11(3):e0151054.
- Knörr K, Knörr-Gärtner H, Beller FK, Lauritzen C: *Geburtshilfe und Gynäkologie, Physiologie und Pathologie der Reproduktion*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 3. Auflage, 1989
- Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, Karaikos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki-67 and breast cancer prognosis. *Oncol* 2013; 84: 219-225
- Kraus HL: *Immunhistometrisch gestützte Untersuchungen zur Färbekonzanz manuell bzw. im Färbeautomaten durchgeführter immunhistochemischer Kernreaktionen am Beispiel des Östrogen- und des Progesteronrezeptors*. Med. Diss., RWTH Aachen, 2008

- Kurian AW, Lichtensztajn DY, Keegan THM, Nelson D: Use of and mortality after bilateral mastectomy compared with other surgical treatments for breast cancer in California, 1998-2011. *JAMA* 2014; 312: 902-914
- Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn HP: Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation. *Pathologie* 2014; 35: 7-17
- Li A, Bai Q, Kong H: Impact of the updated 2018 American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2020; 144: 1097-1107
- Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, Wang M, Yi Z, Li H, Li H, Ren G: Clinicopathological characteristics and breast cancer-specific survival of patients with single hormone receptor-positive breast cancer. *JAMA Network Open* 2020; 3: e1918160
- Li Z, Wei H, Li S, Wu P, Mao X: The role of progesterone receptors in breast cancer. *Drug Des Devel Ther* 2022; 16: 305-314
- Lian W, Fu F, Lin Y, Lu M, Chen B, Yang P, Zeng B, Huang M, Wang C. The impact of young age for prognosis by subtype in women with early breast cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 11625
- Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S: Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 408-414
- Mayr D., Högel B: Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma. In: *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 14. Auflage 2013, W. Zuckschwerdt Verlag, München, S. 58-70
- McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Gray R, Mannu G, Peto R, Whelan T, Wang Y, Wang Z, Darby S: Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* 2014; 383: 2127-2135
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM: ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624-628
- Ménard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A: HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncol* 2001; 61 (Suppl 2): 67-72
- Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK: Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol* 2002; 198: 292-299

- Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE: Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002; 235: 10-26
- Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D'Amico R: Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2012 (4): CD006243
- Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, Klimberg S, Chavez-MacGregor M, Freedman G, Houssami N, Johnson PL, Morrow M: Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1507-1515
- Müller O, Wagener C: *Molekulare Onkologie*, 3. Aufl. 2009 Thieme Verlag, Stuttgart
- Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N: Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis . *World J Surg Oncol* 2011; 9: 131
- Nogami T, Shien T, Tanaka T, Doihara H, Taira N, Takabatake D, Nishimura R, Nishiyama K, Mizoo T, Ohsumi S: The discordance between primary breast cancer lesions and pulmonary metastatic lesions in expression of aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer cells. 8 January 2013 The Japanese Breast Cancer Society (2013)
- Othake T, Abe R, Kimijima I, Fukushima T, Tsuchiya A, Hoshi K, Wakasa H: Intraductal extension of primary invasive breast carcinoma treated by breastconservative surgery. Computer graphic three-dimensional reconstruction of the mammary duct-lobular systems. *Cancer* 1995, 76: 32-45
- Parise CA, Caggiano V: Risk of mortality of node-negative, ER/PR/HER2 breast cancer subtypes in T1, T2, and T3 tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 165: 743-750
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ: Assessment of methods for tissue-based detection of the Her-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3651-3664
- Peng L, Zhang Z, Zhao D, Zhao J, Mao F, Sun Q. Discordance in ER, PR, HER2, and Ki-67 Expression Between Primary and Recurrent/Metastatic Lesions in Patients with Primary Early Stage Breast Cancer and the Clinical Significance: Retrospective Analysis of 75 Cases. *Pathol Oncol Res.* 2021 Apr 9;27:599894.
- Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S: Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 153: 477-491

- Phung MT, Tin Tin S, Elwood JM: Prognostic models for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer* 2019; 19: 230
- Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, Viale G, Zabaglo LA, Penault-Llorca F, Bartlett JM, Gown AM, Symmans WF, Piper T, Mehl E, Enos RA, Hayes DF, Dowsett M, Nielsen TO: International Ki-67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group. An international Ki-67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 1897-1906
- Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM: Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 203-209
- Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM.: The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 283-291
- Radecka B, Litwiniuk M: Breast cancer in young women. *Ginekol Pol* 2016; 87: 650-663
- Rakha EA, Ellis IO: An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1300-1306
- Rhiem K, Engel C, Graeser M, Zachariae S, Kast K, Kiechle M, Ditsch N, Janni W, Mundhenke C, Golatta M, Varga D, Preisler-Adams S, Heinrich T, Bick U, Gadzicki D, Briest S, Meindl A, Schmutzler RK: The risk of contralateral breast cancer in patients from BRCA1/2 negative high risk families as compared to patients from BRCA1 or BRCA2 positive families: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R 156
- RKI 2019 (Zitierweise): Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016. Online unter: https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6012/krebs_in_deutschland_2015_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y, zuletzt abgerufen am 24.4.2023
- RKI 2021 (Zitierweise): Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Online abrufbar unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=C7A366B26C5AEA8734C453219E825776.internet051? blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=C7A366B26C5AEA8734C453219E825776.internet051?blob=publicationFile), zuletzt abgerufen am 24.4.2023
- Rosen PP, Senie R, Schottenfeld D, Ashikari R: Noninvasive breast carcinoma frequency of unsuspected invasion and implications for treatment. *Ann Surg* 1979; 89: 377-382

Ross JS, Fletcher JA: The Her-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;16: 413- 428

S3 2004 (Zitierweise): Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.) (2004): Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Eine nationale S3-Leitlinie. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/S3-Leitlinie-Mammakarzinom-2004-07-21.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

S3 2008 (Zitierweise): Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.) (2008): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 1. Aktualisierung. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/interdisziplin_s3-ll_mamma_080211.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

S3 2012 (Zitierweise): Leitlinienprogramm Onkologie (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom/S3-Brustkrebs-v2012-OL-Langversion.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

S3 2017 (Zitierweise): Leitlinienprogramm Onkologie (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 4.0, Dezember 2017, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.0/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.0_01.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

S3 2020 (Zitierweise): Leitlinienprogramm Onkologie (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 4.3, Februar 2020, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.3.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

S3 2021 (Zitierweise): Leitlinienprogramm Onkologie (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 4.4, Juni 2021, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL. Online unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf, zuletzt abgerufen am 27.2.2023

Sauer G, Kreienberg R: Neue molekulare Therapiekonzepte beim Mammakarzinom. *Gynäkologe* 2005: 432-438

- Sauer G, Schneiderhan-Marra N, Kazmaier C, Hutzel K, Koretz K, Muche R, Kreienberg R, Joos T, Deissler H: Prediction of nodal involvement in breast cancer based on multiparametric protein analyses from preoperative core needle biopsies of the primary lesion. *Clin Cancer Res* 2008; 11: 3345-3353
- Scholzen T, Gerdes J.: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182: 311-322
- Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S: Histologic grade remains a prognostic factor of breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161.708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1048-1052
- Scotti V, Desideri I, Meattini I, Di Cataldo V, Cecchini S, Petrucci A, Franzese C, Greto D, Livi L, Bonomo P, Biti G: Management of inflammatory breast cancer: focus on radiotherapy with an evidence-based approach. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 119-124
- Selli C, Dixon JM, Sims AH: Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers. *Breast Cancer Res* 2016; 18: 118
- Sledge GW, Hu P, Falkson G, Tormey D, Abeloff M: Comparison of chemotherapy with chemohormonal therapy as first-line therapy for metastatic, hormone-sensitive breast cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 262-266
- Sommer H, Ettl J, Farr A, Gutschow K, Lück A, Riepl M, Winkler C, Wypior H: Lokoregionäre Therapieoptionen im metastasierten Stadium. In: *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 14. Auflage 2013, W. Zuckschwerdt Verlag München, S. 273-282
- Sonnenblick A, Francis PA, Azim HA Jr, de Azambuja E, Nordenskjöld B, Gutiérrez J, Quinaux E, Mastropasqua MG, Ameye L, Anderson M, Lluch A, Gnant M, Goldhirsch A, Di Leo A, Barnadas A, Cortes-Funes H, Piccart M, Crown J. Final 10-year results of the Breast International Group 2-98 phase III trial and the role of Ki67 in predicting benefit of adjuvant docetaxel in patients with oestrogen receptor positive breast cancer. *Eur J Cancer*. 2015 Aug;51(12):1481-9.
- Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B, Westman-Naeser S: Histopathological system of breast cancer: classification, reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983; 36: 392-398
- Stenkvist B, Westman-Naeser S, Vegelius J, Holmquist J, Nordin B, Bengtsson E, Eriksson O: Analysis of reproducibility on subjective grading system for breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1979; 32: 979-985

- Stickeler E, Schneeweiss A: Adjuvante Chemotherapie und Antikörpertherapie (Trastuzumab). In: Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome, Zuckschwert Verlag 2013, S. 134-143
- Stolnicu S, Bauer O, Naznean A, Podoleanu C, Georgescu R: ER-/PR+ subset of invasive breast carcinoma (IBC): a distinct phenotype with good prognosis. *Pol J Pathol* 2018; 69: 311-313
- Theissig F, Kunze KD, Haroske G, Meyer W. Histological grading of breast cancer. Interobserver, reproducibility and prognostic significance. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 732-736
- TNM 2016 (Zitierweise): Gospodarowicz MK, Wittekind C, Brierley JD: TNM classification of malignant tumours. Wiley-Blackwell, 8. Auflage, 2016
- Untch M, Jackisch, C, Thomssen, C, Nitz, U, von Minckwitz, G, Kaufmann, M: Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Dtsch Arztebl* 2006; 103: A-3406-A-3410
- Vaidya JS, Bulsara M, Wenz F, Coombs N, Singer J, Ebbs S, Massarut S, Saunders C, Douek M, Williams NR, Joseph D, Tobias JS, Baum M: Reduced mortality with partial-breast irradiation for early breast cancer: A meta-analysis of randomized trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96: 259-265
- Valachis A, Carlqvist P, Ma Y, Szilcz M, Freilich J, Vertuani S, Holm B, Lindman H: Overall survival of patients with metastatic breast cancer in Sweden: a nationwide study. *Br J Cancer* 2022; 127: 720-725
- van Diest PJ, Baak JPA, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans ECM, van Galen CM, Kurver PFIJ, Bellot SM, Fijnheer J, van Gorp LHM, Kwee WS, Los J, Peterse JL, Ruitenberg HM, Schapers RFM, Schipper MEI, Somsen JG, Willig AWPM, Ariens AT: Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: Results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project. *Hum Pathol* 1992; 23: 603-607
- van Dooijeweert C, van Diest PJ, Ellis IO: Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. *Virchows Arch* 2022; 480: 33-43
- Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, Frick H, Kaup D, Noske A, Obermann E, Öhlschlegel C, Padberg B, Rakozy C, Sancho Oliver S, Schobinger-Clément S, Schreiber-Facklam H, Singer G, Tapia C, Wagner U, Mastropasqua MG, Viale G, Lehr HA.: How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS One* 2012; 7: e37379
- von Minckwitz G: Ki-67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol* 2013; 24: 2786-2793

- Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R: Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000; 53: 374-381
- Weiss, A, Mac Gregor MC, Lichtensztajn D, Yi M, Tadros A, GN, Giordano SH, Hunt KK, Mittendorf EA: Validation study of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition prognostic stage compared with the anatomic stage in breast cancer. *JAMA Oncol*; 2018; 4: 203-209
- WHO 2003 (Zitierweise): Tavassoli FA, Devilee P (Edit.): World Health Organization classification of tumours, 3rd edition. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, 2003
- WHO 2012 (Zitierweise): Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (Edit.): World Health Organization classification of tumours, 4th edition. WHO classification of tumours of the breast. IARC Press, Lyon, 2012
- WHO 2019 (Zitierweise): WHO Classification of Tumours Editorial Board (Edit.): World Health Organization classification of tumours, 5th edition. Breast tumours. IARC Press, Lyon, 2019
- Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison K, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 241-256