

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito
- Funktionsbereich Cytopathologie -

**Immunhistochemische Rezeptorkonversion
zwischen primären Mammakarzinomen
und synchronen Lymphknotenmetastasen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alessandro Berns

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist nicht nur weltweit, sondern auch in Deutschland mit 30% der Tumorneuerkrankungen der häufigste maligne Tumor bei Frauen und verfügt somit über eine besondere epidemiologische Bedeutung. Trotz inzwischen hoher relativer Überlebensraten (5-Jahre: 88%, 10 Jahre 83%) sterben jährlich mehr als 18.000 Patientinnen an dieser Tumorart. Um so wichtiger ist es, die Diagnostik so auszurichten, dass den Patientinnen nicht nur alle operativen Ansätze, sondern auch adjuvante bzw. neoadjuvante Optionen (Hormontherapie, Chemotherapie, Immuntherapie) zur Verfügung stehen. Dazu bedarf es der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (ER, PR) und des Her-2/neu-Status, die üblicherweise am Primärtumor erhoben werden und häufig auch im klinischen Verlauf, wenn ein Rezidiv oder eine metachrone Metastase auftritt, erneut bestimmt werden. Nicht untersucht werden hingegen bei primärer Diagnosestellung bereits vorhandene Lymphknotenmetastasen, ohne dass dieses kausal begründet wäre. Ziel der Arbeit war, herauszufinden, ob und in welcher Häufigkeit Unterschiede im Verteilungsmuster der drei Marker zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen auftreten. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sowohl ein Verlust, als auch ein Zugewinn der Markerexpression auftreten können.

Die vorliegende Studie wurde an Tissue Microarrays (TMA) durchgeführt und umfasste 35 Fälle von Mammakarzinomen und ihren synchronen Lymphknotenmetastasen. Pro Fall wurden bis zu sechs Lymphknotenmetastasen untersucht. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten unter Standardbedingungen; die ER-, PR- und Her-2/neu-Färbungen wurden von zwei Untersuchern unabhängig und verblindet nach den im Fach Pathologie in Deutschland üblichen Kriterien ausgewertet (ER, PR: PP und SI sowie davon abgeleitete Größen bzw. Her-2/neu: DAKO-Score).

Die Korrelationskoeffizienten zeigten im Vergleich zwischen Primärtumor und erster Lymphknotenmetastase bei ER Werte zwischen $r = 0,764$ und $r = 0,810$ und bei PR zwischen $r = 0,736$ und $r = 0,822$. Für Her-2/neu lagen sie mit $r = 0,567$ und $r = 0,646$

etwas niedriger. Für die interspezifische Reproduzierbarkeit der beiden Untersucher, ermittelt im Vergleich der Beurteilungen der ersten Lymphknotenmetastase, ergaben sich Werte von $r \geq 0,893$. Mehr-Felder-Tafeln zeigten, dass eine exakte Übereinstimmung zwischen der Markerexpression im Primärtumor und der Lymphknotenmetastase in ca. 50%-70% der Fälle vorliegt und eine Abweichung um eine Kategorie in ca. 25%-45% der Fälle. Stärkere Abweichungen waren selten. Bezogen auf das international bevorzugte Kriterium einer ER- bzw. PR-Positivität ab 10% markierter Zellen lag die Übereinstimmung für ER bei 91,4% (32/35) und für PR bei 82,9% (29/35). Für Her-2/neu, positiv bewertet ab einem DAKO-Score von 2+, ergaben sich ebenfalls 82,9% (29/35). Für ER und PR wurden Konversionen der Markerexpression in beide Richtungen beobachtet; bei Her-2/neu zeigten alle sechs diskordanten Fälle in der Lymphknotenmetastase einen Expressionsverlust. An 10 Fällen waren Untersuchungen vom Primärtumor und jeweils sechs Lymphknotenmetastasen möglich. Je nach dem, welche Grenze man für Positivität annimmt, ergab sich für ER eine Übereinstimmung bzgl. aller sieben Beurteilungen von 60% bzw. 80% und für PR von 80% bzw. 100%. Für Her-2/neu betrug die Übereinstimmung 70%.

Auch in der umfangreichen, nach bestem Wissen erstmals hier systematisch zusammengestellten Literaturübersicht bestätigt sich, dass Diskordanzen in der Markerexpression zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen nicht selten sind, sondern bei ER in ca. 10%, bei PR in ca. 16% und bei Her-2/neu in ca. 5% der Fälle auftreten, bezogen auf den Median aller Studien. Verluste treten dabei häufiger auf als Zugewinne, insbesondere bei PR. Nach neoadjuvanter Chemotherapie ergeben sich ähnliche Werte, so dass diese wohl keine signifikanten Änderungen der Markerexpression induziert. Für Rezidive und metachrone Fernmetastasen liegen gemäß Literatur etwa doppelt so hohe Werte für Diskordanz vor, was Therapieeffekte bzw. Aspekte einer Tumorprogression im zeitlichen Verlauf widerspiegeln dürfte. Inwieweit die Unterschiede zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen bei der Diagnostik und Therapieplanung berücksichtigt werden sollten, müsste im Kontext der beteiligten Fachdisziplinen entschieden werden.

Abstract

Breast carcinoma is the most common malignant tumor in women not only worldwide, but also in Germany. This is of particular epidemiological relevance as 30% of all initial tumor diagnosis are attributable to breast carcinoma. Despite high relative survival rates (5-year: 88%, 10-year 83%), more than 18,000 patients die from this type of tumor each year. It is therefore of great importance that patients are offered not only all currently available surgical options, but also adjuvant and neoadjuvant treatment alternatives (e.g., hormone therapy, chemotherapy, immunotherapy). This requires the determination of the estrogen receptor status (ER), the progesterone receptor status (PR) and the Her-2/neu status. These markers are usually measured on the primary tumor and often also in the clinical follow up when a recurrence or metachronous metastasis occurs. In contrast, lymph node metastases already present at the time of a primary diagnosis are generally not analyzed without causal justification. The key aim of this project was to delineate for the first time if and to what extent differences in distribution patterns of these three markers are observed in primary tumors compared to lymph node metastases. It was assumed that both loss as well as gain of marker expression may occur.

The present study was performed on tissue microarrays (TMAs) including 35 cases with breast carcinoma as well as the synchronous lymph node metastases. Up to six lymph node metastases were examined for each patient. Immunohistochemical analyses of each tissue were performed using well-established procedures; staining for ER, PR, and Her-2/neu was conducted blinded by two independent examiners according to the common criteria in the Departments of Pathology throughout Germany. Hence, for ER and PR the percentage of positive tumor cells (PP) and the staining intensity (SI) were analyzed. Her-2/neu staining was evaluated according the DAKO score.

Comparing primary tumor and the first lymph node metastasis, the correlation coefficient r ranged between 0.764 and 0.810 for ER and between 0.736 and 0.822 for PR. For Her-2/neu, the correlation was somewhat lower with $r=0.567$ and 0.646, respectively. For the interspecific reproducibility of both investigators, the assessments of the first lymph node metastasis were compared leading to an r -value ≥ 0.893 .

Multiple-field tables showed that an exact overlap between marker expression in the primary tumor and the lymph node metastasis is present in approx. 50%-70% of cases and a mismatch of one category in approx. 25%-45%. More severe deviations were observed less frequently. Following international guideline with an ER- or PR-positivity with at least 10% of labeled cells, the ER-positive frequency was 91.4% (32/35) and for PR 82.9% (29/35). For Her-2/neu, the threshold for a positive evaluation was set to a DAKO score of 2+ leading to a frequency of 82.9% in all cases (29/35). For ER and PR, conversion of marker expression in both directions was detected; for Her-2/neu, all six discordant cases showed a loss of expression in lymph node metastasis. For 10 cases, studies of the primary tumor as well as six lymph node metastases were conducted. Depending on the positivity threshold, for ER a concordance between all seven assessments was present in 60% and 80% of cases and for PR in 80% and 100%, respectively. For Her-2/neu the overlap was 70%.

Based on an extensive literature review, which has been conducted to the best of our knowledge, it was supported that discordances in marker expression between primary tumors and synchronous lymph node metastases are no rare events. Reporting here the median of all studies, this has been described for ER in approx. 10% of all cases, for PR in approx. 16%, and for Her-2/neu in approx. 5%. Losses occur more frequently than gains, especially for PR. After neoadjuvant chemotherapy, similar values are obtained suggesting that this treatment most likely does not induce significant changes in marker expression. According to the literature, the values for discordance double in cases of recurrence of the tumor and metachronous distant metastases, which may reflect either an impact due to therapeutic treatment or tumor progression over time. To what extent the differences between primary tumors and synchronous lymph node metastases should be taken into account for diagnosis and further treatment strategies has to be decided by each of the involved medical disciplines.

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
CISH	chromogene <i>in situ</i> -Hybridisierung
DAB	3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAKO-Score	Auswertesystem für die Her-2/neu-Immunhistochemie
DCC	<i>dextran-coated charcoal</i>
ER	Östrogenrezeptor, sowohl verwendet für den eigentlichen Rezeptor, als auch für den dagegen gerichteten immunhistochemischen Antikörper
ER-DCC	biochemische Analyse des Östrogenrezeptors
ER-PP	Prozentsatz positiver Tumorzellen für den Östrogenrezeptor
ER-SI	Färbeintensität positiver Tumorzellen für den Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
GATA-3	Antikörper in der Diagnostik von Mammakarzinomen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Her-2/neu	Her-2/neu-Rezeptor, sowohl verwendet für den eigentlichen Rezeptor, als auch für den dagegen gerichteten immunhistochemischen Antikörper
IRS	Immunreaktiver Score
Ki-67	Antikörper zur Bestimmung der Proliferationsrate
LK	Lymphknoten
M	Fernmetastasen nach TNM-Klassifikation
MTTB	<i>Multitumor (sausage) tissue block</i>
N	Regionärer Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation
N+	Zusammenfassung aller Konstellationen nach TNM-Klassifikation mit regionärer Lymphknotenmetastasierung
N0	ein präoperativer Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation: keine regionäre Lymphknotenmetastasierung

N1, N2, N3	bestimmte Ausprägungen des präoperativen Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation: regionäre Lymphknotenmetastasierung unterschiedlichen Ausmaßes
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NST	<i>no special type</i>
p	<i>probability</i>
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> (Pufferlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pN0	ein postoperativer Lymphknotenstatus nach TNM-Klassifikation: keine regionäre Lymphknotenmetastasierung
PP	<i>percentage of positivity</i>
PR	Progesteronrezeptor, sowohl verwendet für den eigentlichen Rezeptor, als auch für den dagegen gerichteten immunhistochemischen Antikörper
PR-DCC	biochemische Analyse des Progesteronrezeptors
PR-PP	Prozentsatz positiver Tumorzellen für den Progesteronrezeptor
PR-SI	Färbeintensität positiver Tumorzellen für den Progesteronrezeptor
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
S3	bestimmte Qualitätsstufe einer Leitlinie (S1, S2 ...)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SI	<i>staining intensity</i>
SOP	<i>standard operation procedures</i>
T	Tumorgröße nach TNM-Klassifikation
Tab.	Tabelle
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM-Klassifikation	Klassifikation der UICC zur standardisierten Kategorisierung von Tumorgröße (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen (M) maligner Tumoren
TRPS1	Antikörper in der Diagnostik von Mammakarzinomen
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
uPa-/PAI-1	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator / Plasminogenaktivator-Inhibitor 1

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mammakarzinom	..1
1.1.1	Epidemiologie	..1
1.1.2	Prognosefaktoren	2
1.1.3	Ausprägungscharakteristika des Hormonrezeptorstatus und des Her-2/neu-Status	..5
1.2	Tissue Microarray (TMA)	6
1.3	Aufbau und Zielsetzung der Arbeit	..9
1.4	Ethikvotum	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Charakterisierung der untersuchten Tumoren (Gesamtstudie)	11
2.1.2	Charakterisierung der nodal metastasierten Fälle	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Block- und Schnittmaterial aus der Routinediagnostik	12
2.2.2	Materialauswahl für die TMAs	12
2.2.3	Gewinnung des Stanzmaterials für die TMAs	13
2.2.4	Herstellung der TMA-Blöcke	14
2.2.5	Herstellung der Paraffinschnitte	16
2.2.6	Ablauf der immunhistochemischen Färbungen	17
2.2.7	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	18
2.3	Statistik	20

3	Ergebnisse	23
3.1	Vergleich der immunhistochemischen ER-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase	23
3.2	Vergleich der immunhistochemischen PR-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase	31
3.3	Vergleich der immunhistochemischen Her-2/neu-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase	38
3.4	Darstellung von Korrelationskoeffizienten	41
3.5	Dokumentation: Zehn Fälle mit sechs untersuchten Lymphknotenmetastasen	43
4	Diskussion	48
4.1	Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu am Primärtumor - ein diagnostisches Standardvorgehen beim Mammakarzinom	48
4.2	Aktuelle Leitlinien-basierte Empfehlungen zur Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu an Lymphknotenmetastasen, lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen	52
4.3	Vergleichende Untersuchungen zur ER- und PR-Expression sowie zum Her-2/neu-Status an unbehandelten Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen	55
4.3.1	ER und PR	55
4.3.2	Her-2/neu	64
4.3.3	Klinische Überlegungen zur Markerexpression in synchronen Lymphknotenmetastasen bei Mammakarzinomen	69
4.4	Ergänzende Aspekte	71
4.5	Zusammenfassende Bewertung	76
5	Literaturverzeichnis	80

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit ca. 2,26 Millionen Neuerkrankungen im Jahr der weltweit häufigste bösartige Tumor (11,7%), bezogen auf Männer und Frauen gemeinsam; ca. 685.000 Menschen sterben pro Jahr an dieser Erkrankung (6,9%) (IARC 2020). Da der Tumor bei Männern sehr selten ist, können die absoluten Zahlen im Grunde als Zahlen für Frauen eingesetzt werden; in Deutschland beispielsweise (RKI 2021) stellen Männer fast genau 1% der Tumorfälle.

Für Deutschland gibt das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2018, aus dessen aktueller Publikation „Krebs in Deutschland für 2017/2018“ alle Zahlen im folgenden Absatz stammen (RKI 2021), bei Frauen 69.900 Neuerkrankungen mit 18.591 Sterbefällen an. Damit stellen die Mammakarzinome in Deutschland bei den Neuerkrankungen 30,0% aller maligner Tumoren bei Frauen, bei den Sterbefällen beträgt der Anteil 17,7%. Insgesamt gehört das Mammakarzinom trotz der hohen Zahl an Sterbefällen dennoch zu den malignen Tumoren mit vergleichsweise guter Prognose; die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 88%, die relative 10-Jahres-Überlebensrate bei 83%. Die absoluten Überlebensraten, bei denen kein Bezug auf das Absterben eines gesunden altersgleichen Patientenkollektivs genommen wird, betragen 79% bzw. 67%. Die deutlich bessere Prognose von Mammakarzinomen zeigt sich vor allem auch im Vergleich mit den gepoolten Überlebensdaten aller maligner Tumoren bei Frauen, die für die relativen 5-Jahres- und 10-Jahres-Überlebensraten mit 66% bzw. 61% und für die absoluten gleichen Überlebenszeiträume mit 59% bzw. 51% angegeben werden.

1.1.2 Prognosefaktoren

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom ist der Lymphknotenstatus bzw. auch die Anzahl der axillär befallenen Lymphknoten. Aus den umfangreichen Daten des Krebsregisters München (siehe aktuell: Tumorregister München 2022) beispielsweise geht aus einer nur einige Jahre alten Aufstellung hervor, dass bei einem negativen Lymphknotenstatus (pN0) die 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate bei 98,3% bzw. 94,1% liegt. Dagegen sinkt bei 10 oder mehr befallenen Lymphknoten die Rate auf 55,7% bzw. 36,8% (Schrodi et al. 2017); die zugehörigen Überlebenskurven über 15 Jahre zeigen, dass sich vier Gruppen mit unterschiedlichem Überleben (N0, N+ mit 1-3 LK-Metastasen, N+ mit 4-9 LK-Metastasen und N+ mit ≥ 10 LK-Metastasen) klar voneinander abgrenzen. Daneben hat natürlich auch die Ausdehnung des Primärtumors, die mit der Wahrscheinlichkeit der Metastasierung in Lymphknoten bzw. andere Organe korreliert ist, eine starke prognostische Bedeutung.

Die in dieser Arbeit thematisierten Hormonrezeptoren, nämlich der Östrogenrezeptor (ER) und der Progesteronrezeptor (PR), spielen bei der Prognoseabschätzung und bei der Therapieplanung ebenfalls eine mitentscheidende Rolle. Auch hier zeigt sich abhängig vom Expressionsmuster eine deutliche Differenz der Überlebenswahrscheinlichkeit, im Wesentlichen bedingt durch die sich aus der Expression ableitenden therapeutischen Optionen. Bei Patientinnen mit einem ER- und PR-positiven Tumor zeigt sich mit 91,8% die höchste 5-Jahres-Überlebensrate, bei der Konstellation ER-negativ/PR-negativ mit 74,6% die geringste. Bei einem Mischbild von ER-positiv/PR-negativem Rezeptorstatus liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 82,1% und damit höher als beim Status ER-negativ/PR-positiv mit 76,3% (Schrodi et al. 2017). Diese Unterschiede blieben auch in der 10-Jahres-Analyse erhalten. Als dritter wichtiger Rezeptor hat der Her-2/neu-Rezeptor seine Bedeutung vor allem in der zusätzlichen therapeutischen Möglichkeit mit Antikörpern wie vor allem Trastuzumab (und weiteren), für den Patientinnen mit Her-2/neu-positiven Tumoren in Betracht kommen. Es zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede in der 5-Jahres-Überlebensrate. Patientinnen mit einem negativen Her-2/neu-Status im Tumor

zeigen eine relative Überlebensrate von 89,8% und somit eine gleichartige Prognose wie beim Hormonrezeptorstatus ER+/PR+. Ist Her-2/neu positiv, beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate 84,3% (Schrodi et al. 2017).

Allerdings sind ER, PR und Her-2/neu voneinander nicht unabhängig zu sehen. So ist die Konstellation ER+/PR+/Her-2/neu- aus der Erfahrung relativ häufig, so dass bei vielen Patientinnen für alle Variable günstige Ergebnisse vorliegen. Andererseits sind auch typische Expressionsmuster wie ER-/PR-/Her-2/neu+ und sogenannt *triple negative* Konstellationen bekannt; bei letzterer, prognostisch ungünstiger Kombination wird keiner der drei Marker exprimiert.

Sie wurden in dem St. Galler Konzept der Einteilung von Mammakarzinomen in therapeutische unterschiedliche Subtypen (Goldhirsch et al. 2013) abgebildet:

- Als „Luminal A“ wurden dabei Mammakarzinome mit ER- oder PR-Expression, Her-2/neu-Negativität und niedriger Ki-67-Proliferationsrate eingeordnet,
- als „Luminal B“ Tumoren mit ER- oder PR-Expression und hoher Ki-67-Proliferationsrate, später noch unterteilt in einer Her-2/neu-positive und eine Her-2/neu-negative Untergruppe,
- ferner Her-2/neu-positive Tumoren ohne Hormonrezeptorexpression und
- Triple-negative Tumoren, die für ER, PR und Her-2/neu gleichermaßen negativ sind.

Auf diese Weise werden alle möglichen Kombinationen von Markerexpressionen bei Mammakarzinomen erfasst. Führend sind dabei gemäß den Zahlen aus dem Tumorzentrum München für die Jahre 2011-2015 (Schrodi et al. 2017), bezogen auf mehr als 14.000 Fälle, die prognostisch günstigste Gruppe Luminal A mit 37,5% und die Kategorie Luminal B ohne Her-2/neu-Expression mit 43,2%, so dass insgesamt etwa 80% der Mammakarzinome Hormonrezeptor-positiv und Her-2/neu-negativ sind. Her-2/neu-positiv mit oder ohne Hormonrezeptorexpression waren 11,1%; die übrigen 8,2% der Fälle waren Triple-negativ. Ähnliche Verteilungen wurden auch vom Deutschen Krebsforschungszentrum

angegeben, wo man von etwa 75% der Fälle in den günstigen Kombinationen des Luminal A bzw. des Luminal B ohne Her-2/neu-Expression ausgeht (DKFZ 2021).

Da beim Mammakarzinom eine große Heterogenität im klinischen Verlauf besteht, ist für die Patientinnen und für die behandelnden ärztlichen Disziplinen durch Beschreibung von Prognosefaktoren eine entsprechend passende individuelle Therapieplanung von großer Bedeutung. Wichtig dabei sind vor allem prädikative Faktoren, welche die spezifische Behandlung optimieren. Hier kommt der Pathologie eine entscheidende Rolle zu, denn die Bestimmung des Lymphknotenstatus und der Expression der drei genannten Marker sowie auch von Ki-67 gehören zum klassischen Repertoire der Pathologie. Gleiches gilt für im Individualfall zu bestimmende molekulare Parameter. Zu den weiteren klassischen Prognosefaktoren zählen der Tumortyp, das morphologische Grading sowie vor allem die Tumorausdehnung, bestimmt nach der TNM-Klassifikation (S3 2021). Auch diese Größen werden von der Pathologie bestimmt, der damit als Fach eine entscheidende Aufgabe in der Diagnostik der Mammakarzinome zukommt.

Beim TNM-Status werden der Primärtumor (T) und eventuelle regionäre Lymphknotenmetastasen (N) oder Fernmetastasen (M) nach einem Schema eingeteilt, welches von der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) entwickelt worden ist. Das Rezidiv- und das Metastasenrisiko steigen beispielhaft mit zunehmender Tumorgöße (T) (Balslev et al. 1994), wobei die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten sinken (Rosen et al. 1993, Schrodi et al. 2017). Seit 01.01.2017 ist die 8. Auflage der TNM-Klassifikation in Kraft (Wittekind 2017), die allerdings beim Mammakarzinom im Vergleich zu den Vorgängerversionen keine wesentlichen Veränderungen erfahren hat.

In Bezug auf die adjuvante Therapieplanung ist gemäß den Vorgaben der Leitlinien (hier: S3 2021) der bereits beschriebene immunhistochemische Hormonrezeptorstatus von größter Bedeutung: Die Planung der endokrinen

Therapie ist abhängig vom prozentuellen Anteil der positiven Zellen für Progesteron- und Östrogenrezeptoren. Liegt dieser Anteil bei über 10%, so wird dieser als hormonsensibel bezeichnet. Hingegen wird ein Anteil von unter 1% als hormonunsensibel beschrieben und gilt somit für eine adjuvante endokrine Therapie als weniger geeignet. Bei diesen Patientinnen ist dann andererseits häufig mit einer Chemotherapie ein deutlich besseres Ergebnis zu erzielen. Bei Patientinnen mit einem prozentuellen Anteil von 1-10% Positivität herrscht zum aktuellen Zeitpunkt ein uneinheitliches Vorgehen. Diese Gruppe wird als fraglich hormonsensibel bezeichnet und je nach Risikogruppe erhält diese trotzdem gegebenenfalls zudem eine Chemotherapie.

Die Ansprechrate der Hormontherapie bei Progesteron- oder Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen ist sehr unterschiedlich und unterscheidet sich sogar innerhalb der einzelnen Risikogruppen (Osborne 1998), so dass weitere Prognosefaktoren wünschenswert wären.

1.1.3 Ausprägungscharakteristika des Hormonrezeptor- und des Her-2/neu-Status

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu werden stets prätherapeutisch am Primärtumor der Patientin und in Fällen einer neoadjuvanten Therapie auch am späteren Resektat durchgeführt. Vollkommen unüblich ist derzeit ihre Bestimmung an synchron festgestellten regionären Lymphknotenmetastasen oder synchronen Fernmetastasen. Anders sieht es bei metachronen Fernmetastasen aus, bei denen die Frauenkliniken in zunehmendem Maße eine Wiederholung der Untersuchungen beauftragen, um die entsprechenden Therapien an die konkrete Situation anpassen zu können.

Dieses bedeutet, dass zumindest im Rahmen der Planung einer Primärtherapie als repräsentativ angenommen wird, was am Primärtumor an Ergebnissen erzielt wird. Auf der einen Seite ist diese Vorgehensweise in gewisser Weise naiv, da maligne Tumoren als heterogen aufgebaute "Organismen" bekannt sind und man somit nie im Vorfeld von einem gleichartigen Verhalten irgendeines Markers ausgehen darf. Auf der anderen Seite wäre es unpraktikabel und auch

ökonomisch, ohne dass ein definierter klinisch-therapeutischer Grund vorläge, nicht recht zu vertreten, den Primärtumor und jede der manchmal multiplen Metastasen zu untersuchen.

1.2 Tissue Microarray (TMA)

Die hier vorgelegte Studie zu ER, PR und Her-2/neu-neu wurde an *tissue microarrays* (TMA) vorgenommen. Da diese Methode nicht allgemein verbreitet und außerhalb der Pathologie wenig bekannt ist, soll im Folgenden auf sie genauer eingegangen werden.

Battifora beschrieb 1986 den „*multitumor (sausage) tissue block*“ (MTTB). Dabei wurden erstmals Proben aus verschiedenen Geweben in einen einzelnen großflächigen Paraffinblock zusammengestellt (Battifora 1986). Er stellte vor allem sogenannte thematische MTTBs her. Hierbei kombinierte er verschiedene Einheiten von gemeinsamen Geweben in einem Block. Seinerzeit dienten diese Blöcke bereits vor allem zu Screeningzwecken von neu entwickelten Antikörpern darauf, an welchen Geweben sie eine Expression zeigten und an welchen nicht. Einige Jahre später wurde in einem Gemeinschaftsprojekt der Pathologie in Basel und dem NIH in Bethesda Battiforas Entwicklung aufgegriffen und entscheidend weiterentwickelt. Es wurde die Möglichkeit geschaffen, im Maximalfall mehr als 1000 Gewebezyylinder in einen einzelnen Paraffinblock zu bringen (Kononen et al. 1998). Dazu war die Entwicklung einer sehr dünnen Stanzeinrichtung notwendig, welche mit einem Durchmesser von 0,6 mm einzelne Zylinder aus einem Gewebeblock („Donor“) entnehmen konnte. Mit einem xy-Koordinatensystem wurden diese Zylinder parallel entnommen und daraufhin mit dem gleichen System in vorgegebene Löcher eines vorbereiteten Empfängerblocks („Recipient“) eingesetzt. Solche Blöcke werden als „*tissue microarray*“ (TMA) oder auch kurz als „Multiblöcke“ bezeichnet (Abb. 1.1).

Als eine Übersicht über technische Aspekte der TMA-Technik, in der auch auf andere Weiterentwicklungen der ursprünglichen Idee von Battifora eingegangen wird, soll hier auf einen Review von Vogel (2014) verwiesen werden. Den

gewissen *Run* auf diesem Sektor kann man auch daraus ablesen, dass 2012 extra eine Zeitschrift mit dem Namen *Microarrays* gegründet wurde, in der auch der Artikel von Vogel erschienen ist. 2017 wurde sie allerdings dann in *High-Throughput* umbenannt und heißt seit 2020 *BioTech*.

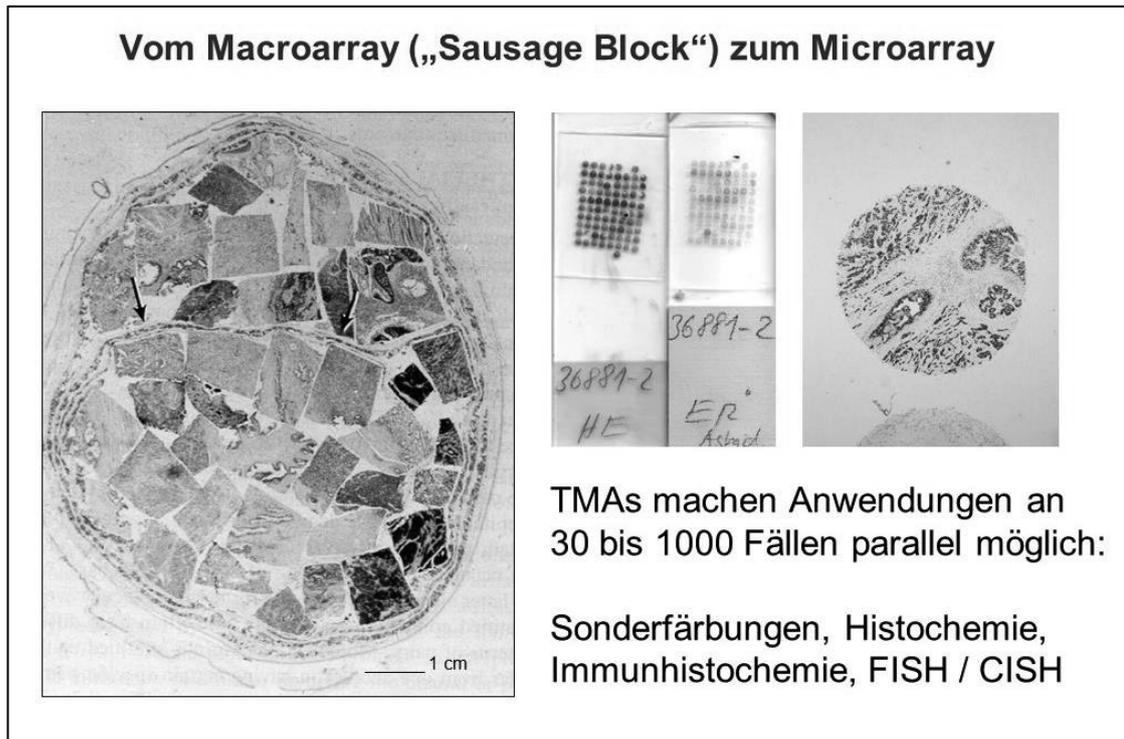


Abb. 1.1: Historische Entwicklung vom Macroarray (MTTB) zum Microarray (TMA). Links: MTTB von Battifora, unten rechts im Bild dunkel gefärbte Weichteiltumoren, positiv gegenüber dem eingesetzten Antikörper. Rechts: HE- bzw. ER-gefärbtes Schnittpräparat aus einem unserer TMA's sowie Beispiel eines ER-positiven Biopsiezylinders (Biesterfeld 2015)

Vorteile dieses Verfahrens sind zum einen die niedrigen Materialkosten, zum anderen ist es vor allem möglich, mit sehr wenig Zeitaufwand viele verschiedene Gewebeteile zu analysieren, wenn man sich einmal die nicht unerhebliche Mühe der TMA-Herstellung gemacht hat. Eine der Anwendungen dieses Verfahrens gleicht dem Vorgehen von Battifora, nämlich die Testung neuer Antikörper an verschiedenen Geweben darauf, an welchen Geweben man welche Expressionsmuster erwarten darf. Eine andere Anwendung wäre diejenige in wissenschaftlichen Studien zur Prognostik maligner Tumoren; hierzu würde man eine große Zahl von Stanzeln verschiedener Tumoren von klinisch gut charak-

terisierten Fällen in einen TMA-Block einbringen und könnte dann rationell immunhistochemische Marker auf prognostische Relevanz an einer bestimmten Tumorentität testen. Die Untersuchungsart, die in unserer Studie zum Tragen kommt, stellt eine weitere Modifikation dar; sie dient (s. unten) dem Vergleich verschiedener Regionen eines Tumors, was sowohl am gleichen Material (z.B. drei Stellen aus einem Primärtumor), als auch an unterschiedlichen Materialien (z.B. Vergleich zwischen Primärtumor und Metastasen) möglich ist.

Neben Auswertungen immunhistochemischer Untersuchungen kämen auch Beurteilungen von anderen morphologischen Anwendungen, vor allem auch von *in situ*-Hybridisierungen in Betracht, sowohl als chromogene wie auch als Fluoreszenz-basierte Methodik (CISH, FISH).

Klinisch gesehen sind adjuvante morphologische Methoden, selbst wenn sie auch in der Charakterisierung z.B. entzündlicher Erkrankungen zum Einsatz kommen könnten, vor allem bei Tumorerkrankungen von Belang. Nicht selten hängen die Diagnose und das Therapieprocedere unmittelbar von bestimmten Markerexpressionen ab bzw. werden von ihnen beeinflusst, so dass auf die Analyse von Eigenschaften bestehender und insbesondere neuer Marker besonderer Wert gelegt wird. Anhand von TMA-Anwendungen sind solche Informationen relativ leicht zu erhalten. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode ist jedoch, dass der benutzte Antikörper das entsprechend verfügbare Gewebe vergleichsweise homogen anfärbt, da man sonst vermutlich nicht aus der Expression an einem kleinen Gewebsanteil auf das Gesamtgewebe rückschließen können wird.

Diverse Studien verwenden diese Multiblöcke mittlerweile vor allem im Hinblick auf die Beantwortung immunhistochemischer Fragestellungen (Insabato et al. 2009, Gokmen-Polar et al. 2010, Li et al. 2010), gerade auch bei Mammakarzinomen: Hier wurde beispielsweise 2014 in einer wichtigen TMA-basierten Studie an 2040 Gewebeproben epithelialer Tumoren herausgearbeitet, dass der damals kurz zuvor erst eingeführte Marker GATA-3 in der Tat geeignet ist, insbesondere Mammakarzinome und urotheliale Karzinome zu erkennen (Miettinen

et al. 2014). Gleiches gilt auch für einen weiteren neueren Marker, nämlich TRPS1, der als selektiver als GATA-3 gilt, da er für Urothelkarzinome in der Regel negativ ist, und in Progenitorzellkarzinomen und Triple-negativen Karzinomen, die zu ca. einem Drittel kein GATA-3 exprimieren, häufiger positiv sein soll; hier wurden entsprechende TMA-basierte Ergebnisse an 1713 Tumorgewebsproben generiert (Ai et al. 2021). Beide Studien wären an konventionellen Schnittpräparaten kaum mit vertretbarem Aufwand möglich gewesen.

1.3 Aufbau und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser retrospektiven, methodisch ausgerichteten Arbeit ist es, TMA-basiert Unterschiede im Verteilungsmuster für die Expression der beiden Hormonrezeptoren (ER, PR) von Her-2/neu in Mammakarzinomen im Vergleich zu ihren axillären Lymphknotenmetastasen darzustellen. Die Auswahl der Marker erfolgte in erster Linie aus der Überlegung heraus, dass sie routinemäßig an allen Fällen primärer Mammakarzinome bestimmt werden und sehr wichtige Kriterien in der Entscheidung zur Therapieplanung sind. Ausgewertet wurden die in TMA-Blöcke eingebrachte Proben synchroner, also im Rahmen der operativen Primärtherapie festgestellter Lymphknotenmetastasen bezüglich der Östrogen- (ER) und der Progesteronrezeptoren (PR) und der Her-2/neu-Expression unter Zugrundelegung international anerkannter Kriterien. Insgesamt standen aus einem Kollektiv von 124 Fällen von Mammakarzinomen die Proben von 35 Patientinnen zur Verfügung, die als „Nicht-N0“ befundet worden waren, also über entsprechende Lymphknotenmetastasen in unterschiedlichen Ausprägungen (N1, N2, N3) verfügten.

Arbeitshypothese dieser Arbeit ist, dass sich in diversen Fällen durchaus Unterschiede im Verteilungsmuster der Hormonrezeptoren zwischen Lymphknotenmetastasen und Primärtumor darstellen lassen, die im Kontext der klinischen und prognostischen Daten diskutiert werden sollen. Ferner wurde angenommen, dass die Unterschiede im Verteilungsmuster sich "in beide Richtungen" darstellen lassen würden und dass somit in den Lymphknotenmetastasen sowohl ein Expressionsverlust (bei positivem Primärtumor),

als auch ein Expressionserwerb (bei negativem Primärtumor) auftreten könnte. Aufgabe war, die Ergebnisse der bislang vorliegenden Arbeiten zu sichten und systematisch zusammenzustellen; ferner sollte ein Vergleich mit Rezidiven oder metachronen Fernmetastasen angestrebt werden. Hierzu lagen aus der Literatur mit Stand 2011/2012, als diese Arbeit projektiert wurde, bereits einige Studien vor (siehe später Kapitel 4, Diskussion).

1.4 Ethikvotum

Zur vorliegenden Studie liegt von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität unter der Studiennummer 4217 vom 8.4.2013 ein positives Votum vor.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Charakterisierung der untersuchten Tumoren (Gesamtstudie)

Bei dieser Arbeit wurde Material aus einer Studie von invasiven Mammakarzinomen weiterverwendet, die konsekutiv in einem definierten Zeitraum von 18 Monaten am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Aachen untersucht worden waren. Dabei waren nur Präparate von Patientinnen ohne vorherige Tumoranamnese herangezogen worden, bei denen aktuell ein primäres unilaterales Mammakarzinom, überwiegend vom invasiv-duktalem (heute als NST [*no special type*] bezeichnet) bzw. vom invasiv-lobulären Typ (WHO 2019) diagnostiziert worden war. Insgesamt umfasste die Studie 124 Fälle; das durchschnittliche Alter der Patientinnen lag bei 61,4 Jahren, wobei die jüngste Patientin 32 Jahre und die älteste Patientin 95 Jahre alt war.

Von den Mammakarzinomen wurden 89 als invasiv-duktales Karzinom und 18 als invasiv-lobuläres Karzinom diagnostiziert. Bei den übrigen 17 Fällen handelte es sich um tubuläre, muzinöse bzw. medulläre Karzinome oder um sogenannte Mischtypen mit lobulären sowie duktalem Anteil.

Nicht mit in die Studie aufgenommen worden waren Fälle von Männern bzw. von Frauen mit Tumoranamnese sowie mit mehreren synchron auftretenden Mammakarzinomen, da die Gesamtstudie unter prognostischen Gesichtspunkten akquiriert worden war. Außerdem mussten diejenigen ansonsten geeigneten Fälle ausgeschlossen werden, in denen die Paraffinblöcke nicht mehr ausreichend viel Tumormaterial aufwiesen bzw. nicht auffindbar waren.

2.1.2 Charakterisierung der nodal metastasierten Fälle

Eine Lymphknotenmetastasierung zeigte sich bei insgesamt 36 der 124 Fälle. Bezogen auf die Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen betrug das durch-

schnittliche Erkrankungsalter 60,6 +/- 12,5 (SD) Jahre und reichte von 37 bis 95 Jahre. Im Vergleich zu der Altersverteilung aller Patientinnen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (U-Test: $p > 0,05$).

2.2 Methoden

2.2.1 Block- und Schnittmaterial aus der Routinediagnostik

Routinemäßig waren von den Fällen, die nach Formalinfixation des Materials in üblicher Paraffinschnitt-Technik bearbeitet worden waren, bereits die HE-Färbungen (Hämatoxylin und Eosin) sowie die immunhistochemischen Färbungen für ER, PR und Her-2/neu in Form repräsentativer Gesamt-tumorschnitte vorhanden. In den Fällen, in denen die Schnittpräparate im Archiv fehlten oder beschädigt waren, wurde aus archiviertem Blockmaterial entsprechende Nachschnitte angefertigt. Zur Vereinheitlichung der Beurteilung wurden alle Schnittpräparate bzgl. Differenzierung und Tumortyp neu befundet und mit dem Originalbefund abgeglichen.

In einem metastasierten Fall stand keinerlei Blockmaterial zur Verfügung, so dass sich die Fallzahl auf 35 reduzierte.

2.2.2 Materialauswahl für die TMAs

Pro Fall wurde Stanzmaterial aus dem Primärtumor und aus Lymphknotenmetastasen entnommen. Die Zahl der Lymphknotenmetastasen unterschied sich dabei deutlich von Fall zu Fall. Bei zehn Patientinnen war genau ein Lymphknoten befallen. Acht Fälle wiesen jeweils zwei, zwei Fälle jeweils drei, ein Fall vier und vier Fälle jeweils fünf Lymphknotenmetastasen auf. In zehn Fällen lagen sechs oder mehr Lymphknotenmetastasen vor. In nur einem Fall gelang es nicht, alle Paraffinblöcke mit Lymphknotenmetastasen zu ermitteln; in dem Fall waren im Befund zwei Lymphknotenmetastasen dokumentiert, es ließ sich jedoch nur ein Paraffinblock mit einer metastatischen Absiedlung in die Studie einschließen.

Bei bis zu sechs befallenen Lymphknoten wurden alle Lymphknotenmetastasen berücksichtigt. Waren mehr als sechs Lymphknoten befallen, so wurden die siebte und weitere Lymphknotenmetastasen nicht mehr berücksichtigt, die Zahl von zur Untersuchung anstehenden Lymphknotenmetastasen also auf sechs beschränkt. Die Lymphknotenmetastasen wurden nach Fläche des Tumorf infiltrates geordnet bezeichnet, so dass die "erste Lymphknotenmetastase" diejenige mit der größten Tumorf läche darstellte, die "zweite Lymphknotenmetastase" diejenige mit der zweitgrößten usw.

Die Gesamtzahl an zu bearbeitenden Stanzungen aus Lymphknotenmetastasen von betrug somit 115, so dass unter Einbeziehung der 35 Stanzungen der Primärtumoren 150 Stanzungen zu beurteilen waren.

2.2.3 Gewinnung der Stanzmaterials für die TMAs

Alle methodischen Aspekte zur Gewinnung des Stanzmaterials sowie zur Präparation der TMA-Blöcke und der Schnittpräparate folgen den *Standard Operation Procedures* (SOPs), die am Institut für Pathologie in Aachen für diese Methode hinterlegt waren und sollen daher hier nur cursorisch bzw. ausschließlich dort detailliert besprochen werden, wo sie Aspekte der Beurteilung von Lymphknotenmetastasen berühren.

Ohne Kenntnisse der Rezeptorverteilung wurde an den HE-Schnitten des Primärtumors mittels eines folienfesten Stiftes ein tumorzellreicher Bereich im Präparat gekennzeichnet. Diese Stiftmarkierung wurde nach visuellem Vergleich auf den originalen Paraffinblock übertragen. Ähnlich wurde bei den Lymphknotenmetastasen vorgegangen.

Die Multiblöcke wurden mit dem gewerblich erhältlichen TMA-System der Firma Zytomed (Berlin) angefertigt. Zu diesem gehört eine Hohlstanze mit einem Innendurchmesser von 1 mm, bestehend aus einer Hohnadel mit innen-

liegendem Stempel (Abbildung 2.1). Diese wurde senkrecht zum markierten Areal auf dem Paraffinblock aufgesetzt und der entsprechende Gewebezylinder durch Eindrücken der Hohlzylinder bis auf den Kunststoffgrund des Paraffinblockes gewonnen. Danach wurde der Gewebezylinder in ein durch die Firma Zytomed zur Verfügung gestelltes vorkennzeichnetes Röhrcchen eingesetzt und die entsprechende Nummerierung in einer Datei mit der Eingangs- und Blocknummer des Gewebes zusammengeführt.

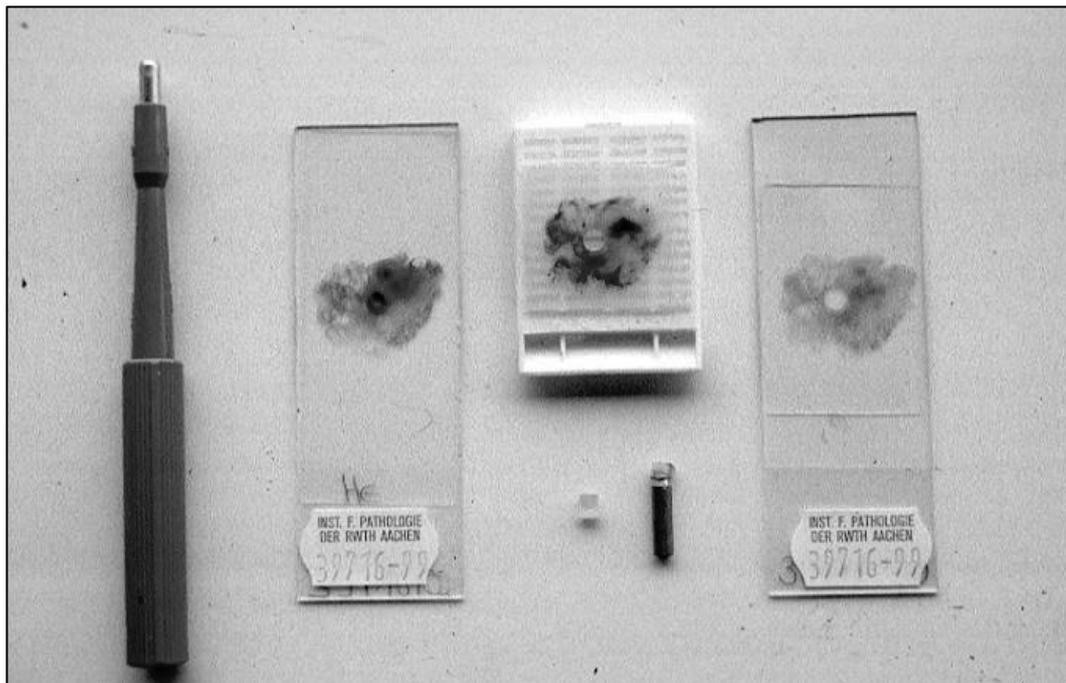


Abb. 2.1: Summarische Dokumentation einer Gewinnung von Stanzmaterial für einen TMA-Block. Von links nach rechts: 1. Stanzvorrichtung. 2. Originaler HE-Schnitt mit einem mit wasserfestem Filzstift aufgemalten Kreis mit der zu stanzenden Struktur, der als Vorlage für die Stanzung des Blockes dienen soll. 3. Paraffinblock nach Stanzentnahme (oben) und ausgestanzter Zylinder (unten). 4. Später angefertigter HE-Schnitt vom Paraffinblock nach Stanzentnahme (Biesterfeld 2015).

2.2.4 Herstellung der TMA-Blöcke

Die verschlossenen nummerierten Röhrcchen wurden an die Firma Zytomed nach Berlin versandt. Die Herstellung der TMA-Blöcke erfolgte dort mit einem patentierten Verfahren, bei dem die nummerierten Gewebezylinder im vordefinierten

Abstand und parallel zueinander in einen Paraffinblock-Rohling zusammengefügt werden.

Dabei schließen alle Gewebestanden mit der Seite des Gewebes nach oben plan ab. Anhand einer Schablone, bestehend aus einem exzentrisch gelegenen Referenzgewebe (Herzmuskel des Hundes), welches der Markierung dient, können die Gewebestanden dem jeweiligen Fall zugeordnet werden. Die Nummerierung entsprach der Markierung der vorher nummerierten Transportröhrchen (Abb. 2.2).

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei Multiblöcke verwendet, in welchen sich insgesamt maximal 96 Stenzen unterbringen lassen. Dabei können acht Proben in x-Richtung sowie zwölf in y-Richtung eingebracht werden. Ein Block wurde mit 84 Proben und zwei Blöcke mit jeweils 79 Proben bestückt. Neben den in dieser Arbeit ausgewerteten TMA-Stenzen waren darin noch weitere Stenzen aus dem Primärtumor, die aber nicht im Rahmen dieser Studie bearbeitet wurden.

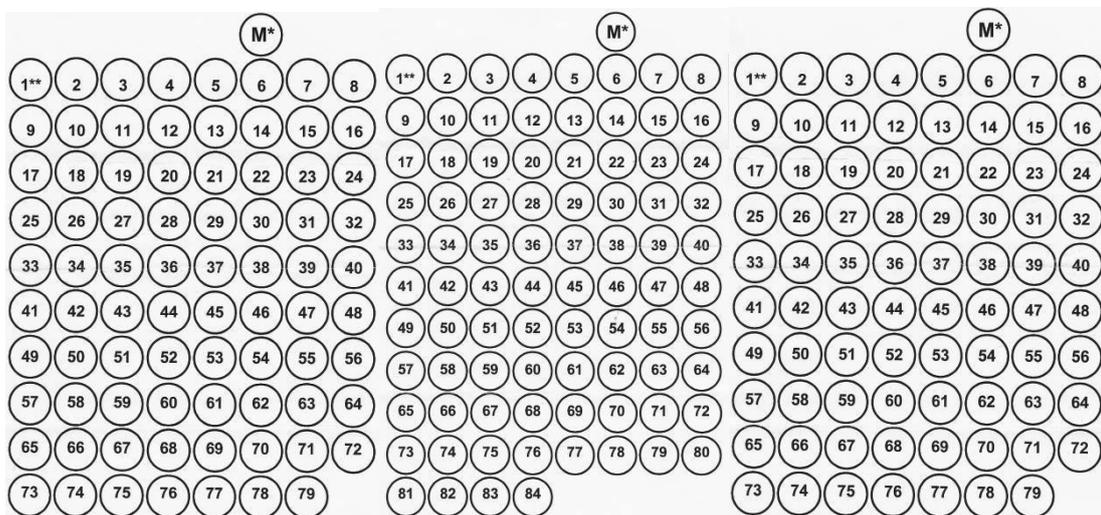


Abb. 2.2: Schablonen der drei verwendeten TMA-Blöcke. Die mit M* bezeichneten Stenzen dienen jeweils der Orientierung im Präparat (Herzmuskulatur des Hundes)

2.2.5 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Herstellung der Paraffinschnitte erfolgte gemäß den *Standard Operation Procedures* (SOP) des Institutes für Pathologie der RWTH Aachen. Zunächst wurde die Blöcke auf eine Kühlplatte vorgekühlt, um sie durch Härten schneidfähig zu machen. Danach wurden mit einem Rotationsmikrotom einige je 3-4 µm dicke Schnitte vom Block abgenommen und zum Glätten auf ein 38 °C warmes Wasserbad gelegt. Im Anschluss daran wurden sie auf mit Silan beschichtete Objektträger aufgezogen.

Über Nacht wurden die Objektträger in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte durch eine zehninütige Inkubation in Xylol entparaffiniert.

Zur Orientierung wurde dann jeweils ein Schnitt einer konventionellen HE-Färbung gemäß den SOPs unterzogen. An den Schnitten, die für immunhistochemische Färbungen vorgesehen waren, erfolgte zur Blockade der die spätere Färbung eventuell störenden endogenen Peroxidase eine fünfzehnminütige Inkubation in H₂O₂-Methanol. Zur Rehydrierung schloss sich eine absteigende Alkoholreihe mit einem zweimaligen Bad in 96% Äthanol, anschließend zweimalig in 70% Äthanol und in A. dest. an. Danach wurden die Schnitte in PBS-Puffer eingestellt.

Zur Demaskierung von Antigenen („*antigen retrieval*“) wurde ein Mikrowellenherd genutzt, wobei die Schnitte in einer mit Citratpuffer gefüllten Küvette stehend bei 600 Watt viermal für jeweils fünf Minuten gekocht wurden. Zwischen den Schritten wurden die Gefäße jeweils mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach den Kochphasen wurde die Küvette mit PBS-Puffer aufgefüllt und anschließend abgekühlt.

Die einzelnen Objektträger wurden sich mit dem Gewebe gegenüber liegend in einen Objektträgerhalter, gefüllt mit Puffer, mit entsprechenden Abstandhaltern gesteckt. Dieser kleine Spalt sorgte für die gewünschte Kapillarwirkung, wodurch

der Puffer zwischen den Geweben nach oben verlief. Dasselbe Prozedere erfolgte zur besseren Flüssigkeitsverteilung während der Färbung zum Abschluss noch mit Wasser.

2.2.6 Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden im Immunhistochemischen Labor des Institutes für Pathologie der RWTH Aachen in einem Immunostainer (DAKO, Kopenhagen) unter Anwendung einer indirekten Streptavidin-Biotin-Methode vorgenommen.

Die folgenden Primärantikörper mit Verdünnungsangaben wurden verwendet:

- ER anti-Maus (NCL-ER-6F-11 von Nova Castra, Berlin), Verdünnung 1:100,
- PR anti-Maus (NCL-PGR 312 von Nova Castra, Berlin), Verdünnung 1:100,
- Her-2/neu anti-Kaninchen (A0485 von Dako Agilent, Kopenhagen), Verdünnung 1:400

Der biotinylierte Sekundärantikörper von der Ziege bindet unspezifisch mit dem Primärantikörper. Zur stärkeren Bindung dient dieser, da mehrere Streptavidin-Biotin-Komplexe dort binden können. Die Peroxidase konjugiert diese Komplexe. Daraufhin entsteht eine Reaktion mit der Chromogen-Substrat-Lösung (H_2O_2 + 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid [DAB]), durch welche die Antigen-Antikörperreaktion braun sichtbar wird. Die braune Farbe entsteht dabei durch die eisenhaltige Hämgruppe im Peroxidasezentrum. Zur blauen Färbung der Kerne hingegen dient die Gegenfärbung mit dem Hämatoxylin. Während der einzelnen Färbeschritte wurde mehrfach mit Puffer gespült. In den letzten Schritten wurden die Färbungen jeweils in aufsteigender Alkoholreihe behandelt. Dabei je dreimal in 70% und 96% sowie zweimal in 100% Alkohol., anschließend viermal in Xylol für ungefähr zwei Minuten. Zum Abschluss wurde jeder Schnitt mit einem Tropfen Vitro-Clud unter einem Deckgläschen eingeschlossen.

2.2.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Östrogen- und Progesteronrezeptor (ER, PR)

Die ER- und PR-Antikörper führen im positiven Fall zu einer Anfärbung des Zellkerns, während Zytoplasma und Zellmembran ungefärbt bleiben. Bei der Beurteilung der ER- und PR-Darstellungen wurden, wie in der Pathologie in Deutschland allgemein üblich, der Prozentsatz angefärbter Tumorzellkerne (PP, prozentuale Positivität, *percentage of positivity*) sowie die Intensität der Färbung (SI, *staining intensity*) am lichtmikroskopischen Bild semiquantitativ beurteilt (Tab. 2.1, Tab. 2.2).

Tab. 2.1: Bewertung der prozentuellen Positivität (PP) der immunhistochemischen ER- bzw. PR-Darstellung

PP	Geschätzte Zahl positiver Zellkerne
0	0%
1	< 10%
2	10%-50%
3	50%-80%
4	> 80%

Tab. 2.2: Bewertung der Färbeintensität (SI) der immunhistochemischen ER- bzw. PR-Darstellung

SI	Geschätzte Färbeintensität
0	0%
1	gering
2	mäßig
3	stark

Als Produkt der PP und der SI ergibt sich der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987), üblicherweise kurz "Remmele-Score" genannt. Seine Werteskala reicht von 0 bis 12 mit Einzelwerten von 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12 (Tab. 2.3):

Tab. 2.3: Aus dem Produkt von PP und SI gebildeter Immunreaktiver Score (IRS, Remmele-Score) zur Auswertung der immunhistochemischen ER- bzw. PR-Darstellung

Immunreaktiver Score (IRS, Remmele-Score) für ER und PR				
PP	SI			
	0	1	2	3
0	0			
1		1	2	3
2		2	4	6
3		3	6	9
4		4	8	12

Da der IRS zu viele Gruppen aufweist, um ohne weitere Unterteilungen praktikabel zu sein, wurde er weiter in Subgruppen unterteilt und als negativ (IRS 0), schwach positiv (IRS 1-3) bzw. positiv (IRS 4-12) interpretiert. Bei begrenzter Zahl von höchstens 35 Fällen und insgesamt 10 Merkmalsausprägungen des Remmele-Scores wird im Ergebnisteil ausschließlich auf diese dreigliedrige zusammenfassende Version eingegangen. Ein von Reiner et al. (1990) aus PP und SI entwickelter additiver Score wurde in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt, da er sich international nicht durchgesetzt hat.

Her-2/neu-Färbung

Bei der Beurteilung der Her-2/neu-Färbung, bei der es sich um eine Zellmembranfärbung handelt, kam der DAKO-Score zur Anwendung, der 1999 von der Firma DAKO Agilent veröffentlicht wurde (aktuelles Manual: DAKO 2014). Bei diesem Score werden das Färbemuster sowie die Intensität der

Färbung der Zellmembran nach Tabelle 2.4 bewertet. Eine zytoplasmatische Färbung gilt als nicht spezifisch und spielte bei der Bewertung keine Rolle. Konventionsgemäß dienen DAKO-Scores von 0, 1+ und 3+ in Deutschland als alleinige Grundlage für therapeutische Entscheidungen bzgl. einer eventuellen Trastuzumab-Therapie, weil ihr Ergebnis sehr hoch mit dem Ausschluss bzw. dem Nachweis einer Amplifikation im Her-2/neu-Gen korreliert ist.

Bei einem DAKO-Score von 2+ hingegen wird diese Entscheidung vom Ausfall einer noch anzuschließenden *in situ*-Hybridisierung des Her-2/neu-Gens abhängig gemacht. Diese ergänzende Untersuchung war nicht Gegenstand unserer Studie, so dass hierauf im Folgenden nicht mehr eingegangen wird.

Tab. 2.4: Bewertung der Her-2/neu-Färbung nach dem DAKO-Score

Ergebnis der Her-2/neu-Färbung	DAKO-Score
keine Färbung bzw. lediglich < 10% der Tumorzellen mit membranständiger Färbung	0 (= negativ)
schwache oder kaum sichtbare, unvollständige Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen	1+ (= negativ)
schwache bis mittelstarke komplette Membranfärbung in > 10% der Tumorzellen	2+ (= schwach positiv)
starke, die komplette Membran umfassende Färbung in > 10% der Tumorzellen	3+ (= positiv)

Die aktuelle neue Zuordnung eines Score 1+ zu einem Ergebnis „Her-2 low“, das in Abgrenzung zu einem Score 0 jetzt seit Kurzem nicht mehr als negativ gilt (Modi et al. 2022), war seinerzeit noch nicht etabliert. Da sich an der Ermittlung eines Score 1+ aber nichts Substantielles geändert hat, ist diese neue Interpretation für unsere Studie ohne Belang.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation zwischen dem Funktionsbereich Cytopathologie der Universität Düsseldorf und dem Institut für

Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

In der vorliegenden Untersuchung wurden fast ausschließlich kategorisierte Variablen erhoben, die in Mehr-Felder-Tafeln dargestellt wurden. Nicht besetzte Kategorien in den Tafeln wurden überwiegend freigelassen, statt sie mit einer 0 zu versehen, um auf diese Weise optisch leichter die von links oben nach rechts unten verlaufenden Diagonalen sichtbar werden zu lassen, welche übereinstimmende Einstufungen bei den jeweiligen Vergleichen dokumentieren. Die Beziehungen zwischen den Variablen wurden in Mehr-Felder-Tafeln dargestellt und mit dem Pearson Chi²-Test auf statistische Signifikanz getestet. Ferner wurden Korrelationskoeffizienten berechnet. Zum Vergleich von Datenverteilungen ungestufter Daten kam der U-Test zur Anwendung.

Sowohl für den Chi²-Test, als auch für den U-Test wurde statistische Signifikanz für ein p-Niveau von $p < 0,05$ angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5 \%$, die Nullhypothese irrtümlich zu verwerfen.

Ferner soll hier kurz auf Cohen's Kappa (κ) eingegangen werden, das wir zwar nicht verwendet haben, das aber in den in der Diskussion berücksichtigten Publikationen anderer Gruppen verschiedentlich angewandt wurde. Diese Größe macht gewichtete Übereinstimmungen zwischen Mehr-Felder-Tafeln verschiedenen Umfangs, z.B. zwischen einer 4-Felder-Tafel (2 x 2) und einer 9-Felder-Tafel (3 x 3) besser vergleichbar, weil sie nach der Formel

$$\kappa = (p_0 - p_c) / (1 - p_c)$$

eine gefundene Übereinstimmung von p_0 mit der Zufallsübereinstimmung p_c in Beziehung setzt. Letztere unterscheidet sich zwischen Mehr-Felder-Tafeln verschiedener Größe, aber auch bei ungleicher Verteilung der Daten innerhalb der zur Verfügung stehenden Kategorien. Es errechnet sich ein zwischen 0 und 1 liegender κ -Wert, der bzgl. der Qualität der Übereinstimmung interpretiert wird (Tab. 2.5):

Tab. 2.5: Bewertung der Übereinstimmung von Mehr-Felder-Tafeln durch Interpretation von Cohen's Kappa (κ); in Klammern die englische Originalbezeichnung

Cohen's Kappa (κ)	Übereinstimmung
0,0 - 0,2	sehr gering (slight)
0,21 - 0,4	gering (fair)
0,41 - 0,6	mittel (moderate)
0,61 - 0,8	gut (substantial)
0,81 - 1,0	sehr gut (almost perfect)

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der immunhistochemischen ER-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase

Prozentuale Positivität (ER-PP)

Tabelle 3.1 vergleicht die prozentuelle Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2.

Die beiden Befunder beurteilten die ER-PP der ersten Lymphknotenmetastasen in 29 Fällen (= 82,9%) übereinstimmend, in weiteren 5 Fällen (= 14,2%) ergab sich eine Abweichung von +/- einer Kategorie und in einem Fall (= 2,9%) wich die Beurteilung um mehr als eine Kategorie ab.

Tab. 3.1: Vergleich der prozentualen Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 (p < 0,0001)

ER-PP der ersten Lymphknotenmetastase		Befunder 2					
		0	1	2	3	4	Σ
Befunder 1	0	12					12
	1	1	4				5
	2			2	2	1	5
	3				5	2	7
	4					6	6
	Σ	13	4	2	7	9	35

Die Tab. 3.2 und 3.3 zeigen die Daten für die Beurteilung der ER-PP zwischen Primärtumoren und erster Lymphknotenmetastase für beide Befunder.

In 17 Fällen (= 48,6%) wurde die ER-PP zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren von Befunder 1 übereinstimmend bewertet

(Tab. 3.2). Abweichungen um eine Kategorie ergaben sich in 15 Fällen (= 42,9%), Abweichungen um mehr als eine Kategorie in 3 Fällen (= 8,5%).

Tab. 3.2: Vergleich der prozentualen Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 ($p = 0,0050$)

ER-PP, Befunder 1		Erste Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Primärtumor	0	7	1				8
	1	5	2	1			8
	2		1	1	2	1	5
	3			2	3	1	6
	4		1	1	2	4	8
	Σ	12	5	5	7	6	35

Für Befunder 2 zeigte der Vergleich der Bewertung der ER-PP 20 Übereinstimmungen (= 57,2%). Eine Abweichung um eine Kategorie lag in 11 Fällen (= 31,4%) vor, um mehr als eine Kategorie in 4 Fällen (= 11,4%).

Tab. 3.3: Vergleich der prozentualen Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und dem Primärtumor durch Befunder 2 ($p = 0,0007$)

ER-PP, Befunder 2		Erste Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Primärtumor	0	7	1				8
	1	5	2		1		8
	2		1	1	1	2	5
	3			1	4	1	6
	4	1			1	6	8
	Σ	13	4	2	7	9	35

Die Tab. 3.4 zeigt den Vergleich der Bewertung der ER-PP von Befunder 1 zwischen den ersten und zweiten Lymphknotenmetastasen. Es ergaben sich 16 Übereinstimmungen (= 66,7%). Eine Abweichung um eine Kategorie ergab sich in 5 Fällen (= 20,8%) und eine Abweichung um mehr als eine Kategorie in 3 Fällen (= 12,5%). Ähnlich war das Ergebnis für Befunder 2 (Tab. 3.5).

Tab. 3.4: Vergleich der prozentualen Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 1 ($p < 0,0001$)

ER-PP, Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	6					6
	1		3		1		4
	2			2	1	1	4
	3			1	3	3	7
	4			1		2	3
	Σ	6	3	4	5	6	24

Tab. 3.5: Vergleich der prozentualen Positivität des Östrogenrezeptors (ER-PP) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

ER-PP, Befunder2		Zweite Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	7					7
	1		2			1	3
	2				1		1
	3				2	5	7
	4			1		5	6
	Σ	7	2	1	3	11	24

Färbeintensität (ER-SI)

Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 zeigen die Beurteilung der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2.

Im Vergleich befundeten Befunder 1 und Befunder 2 die ER-SI der ersten Lymphknotenmetastasen in 32 Fällen (= 91,4%) übereinstimmend, in weiteren 2 Fällen (= 5,7%) ergab sich eine Abweichung von +/- einer Kategorie, und nur in einem Fall (= 2,9%) wich die Beurteilung um mehr als eine Kategorie ab.

Tab. 3.6: Vergleich der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

ER-SI der ersten Lymphknotenmetastase		Befunder 2				
		0	1	2	3	Σ
Befunder 1	0	12				12
	1		7			7
	2			7		7
	3	1		2	6	9
	Σ	13	7	9	6	35

In Tabelle 3.7 werden die Beurteilungen der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) zwischen der ersten Lymphknotenmetastasen und der Primärtumoren dargestellt.

In 19 Fällen (= 54,2%) wurde die ER-SI zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren von Befunder 1 übereinstimmend bewertet. Abweichungen in einer Kategorie ergaben sich in 15 Fällen (= 42,9%), wobei sich Abweichungen in mehr als einer Kategorie in einem Fall (= 2,9%) ergaben.

Tab. 3.7: Vergleich der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 ($p = 0,0009$)

ER-SI, Befunder 1		Erste Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Primärtumor	0	7	1			8
	1	4	4	2		10
	2	1	2	4	5	12
	3			1	4	5
	Σ	12	7	7	9	35

Tabelle 3.8 zeigt den Vergleich der Bewertung der ER-SI von Befunder 2 zwischen den Primärtumoren und den ersten Lymphknotenmetastasen. Es ergaben sich 21 Übereinstimmungen (= 60%), Abweichungen um eine Kategorie in 12 Fällen (= 34,3%) und um mehr als eine Kategorie in 2 Fällen (= 5,7%).

Tab. 3.8: Vergleich der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 2 ($p = 0,0002$)

ER-SI, Befunder 2		Erste Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Primärtumor	0	7	1			8
	1	4	4	2		10
	2	2	2	6	2	12
	3			1	4	5
	Σ	13	7	9	6	35

Tabelle 3.9 gibt den Vergleich der Bewertung der ER-SI von Befunder 1 zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen wieder. 18 Fälle wurden gleich eingestuft (= 75%). Abweichungen um eine Kategorie ergaben sich fünfmal

(= 20,8%) und um mehr als eine Kategorie einmal (= 4,2%). Ähnlich waren auch hier die Ergebnisse für Befunder 2 (Tab. 3.10).

Tab. 3.9: Vergleich der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 1 ($p < 0,0001$)

ER-SI, Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	6				6
	1		3	1	1	5
	2		3	4		7
	3			1	5	6
	Σ	6	6	6	6	24

Tab. 3.10: Vergleich der Färbeintensität des Östrogenrezeptors (ER-SI) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

ER-SI, Befunder 2		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	7				7
	1		2	2	1	5
	2		4	3	1	8
	3				4	4
	Σ	7	6	5	6	

Immunreaktiver Score nach Remmele

Der Remmele-Score wurde, wie bereits in Kapitel 2.2.7 ausgeführt, in drei Subgruppen der Ausprägungen 0, 1-3 und 4-12 berücksichtigt. Tabelle 3.11 gibt die Ergebnisse für den Vergleich der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 wieder.

Die beiden Befunder beurteilten gemäß Remmele-Score der ER-Status der ersten Lymphknotenmetastasen in 34 Fällen (= 97,1%) übereinstimmend, in einem Fall (= 2,9%) wich die Beurteilung um eine Kategorie ab.

Tab. 3.11: Vergleich der Remmele-Scores für den Östrogenrezeptor der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (ER) der ersten Lymphknoten- metastase		Befunder 2			
		0	1-3	4-12	Σ
Befunder 1	0	12	1		13
	1-3		7		7
	4-12			15	15
	Σ	12	8	15	35

Die Tab. 3.12 und 3.13 zeigen die Daten für die Einstufung des Remmele-Scores zwischen Primärtumoren und erster Lymphknotenmetastase für beide Befunder.

In 24 Fällen (= 68,6%) wurde die ER-PP zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren von Befunder 1 übereinstimmend bewertet (Tab. 3.12). Abweichungen um eine Kategorie lagen in 10 Fällen (= 28,5%) vor, Abweichungen um mehr als eine Kategorie in einem Fall (= 2,9%).

Tab. 3.12: Vergleich der Remmele-Scores für den Östrogenrezeptor zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 ($p = 0,0002$)

Remmele-Score (ER), Befunder 1		Erste Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Primärtumor	0	7	1		8
	1-3	5	4	2	11
	4-12	1	2	13	16
	Σ	13	7	15	35

Für Befunder 2 zeigte der Vergleich der Bewertung des Remmele-Scores für ER 28 Übereinstimmungen (= 80,0%). Eine Abweichung um eine Kategorie lag in 6 Fällen (= 17,1%) vor, um zwei Kategorien in einem Fall (= 2,9%) (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Vergleich der Remmele-Scores für den Östrogenrezeptor zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (ER), Befunder 2		Erste Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Primärtumor	0	12	1	1	14
	1-3		3	1	4
	4-12		4	13	17
	Σ	12	8	15	35

Die Tab. 3.14 zeigt den Vergleich des Remmele-Scores für ER von Befunder 1 zwischen den ersten und zweiten Lymphknotenmetastasen. Es ergaben sich 18 Übereinstimmungen (= 75,0%). Eine Abweichung um eine Kategorie ergab sich in 6 Fällen (= 25,0%). Etwas höher in der Konkordanz war das Ergebnis für Befunder 2 (Tab. 3.15) mit 19 Übereinstimmungen (= 85,7%) und einer Abweichung um eine Kategorie in 5 Fällen (= 14,3%).

Tab. 3.14: Vergleich der Remmele-Scores für den Östrogenrezeptor zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 1 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (ER), Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	7			7
	1-3		2	3	5
	4-12		3	9	12
	Σ	7	5	12	24

Tab. 3.15: Vergleich der Remmele-Scores für den Östrogenrezeptor zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (ER), Befunder 2		Zweite Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	6			6
	1-3		4	2	6
	4-12		3	9	12
	Σ	6	7	11	24

3.2 Vergleich der immunhistochemischen PR-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase

Prozentuale Positivität (PR-PP)

Tabelle 3.16 vergleicht die prozentuelle Positivität des Progesteronrezeptors (PR-PP) der jeweils ersten Lymphknotenmetastase zwischen Befunder 1 und Befunder 2. Die beiden Befunder beurteilten die PR-PP der ersten Lymphknotenmetastasen in allen 35 Fällen (= 100%) übereinstimmend.

Tab. 3.16: Vergleich der prozentualen Positivität des Progesteronrezeptors (PR-PP) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

PR-PP der ersten Lymphknoten- metastase		Befunder 2					
		0	1	2	3	4	Σ
Befunder 1	0	18					18
	1		5				5
	2			3			3
	3				5		5
	4					4	4
	Σ	18	5	3	5	4	35

Tabelle 3.17 zeigt die Daten für die Beurteilung der PR-PP zwischen Primärtumoren und erster Lymphknotenmetastase für beide Befunder gemeinsam, da sie auch dort zu einem komplett übereinstimmenden Ergebnis kamen.

In 17 Fällen (= 48,6%) wurde die PR-PP zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren von beiden Befundern jeweils übereinstimmend bewertet. Abweichungen um eine Kategorie ergaben sich in 13 Fällen (= 37,1%), Abweichungen um mehr als eine Kategorie in 5 Fällen (= 14,3%).

Tab. 3.17: Vergleich der prozentualen Positivität des Progesteronrezeptors (PR-PP) zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 bzw. für Befunder 2 ($p = 0,0003$)

PR-PP, Befunder 1 bzw. 2		Erste Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Primärtumor	0	13	1				14
	1	4	2	1	1		8
	2	1		1	2		4
	3		1		1	4	6
	4		1	1	1		3
	Σ	18	5	3	5	4	35

Tabelle 3.18 zeigt den Vergleich der Bewertung der PR-PP von Befunder 1 zwischen den ersten und zweiten Lymphknotenmetastasen.

Es ergaben sich 15 Übereinstimmungen (= 62,5%). Eine Abweichung um eine Kategorie ergab sich in 9 Fällen (= 37,5%) und eine Abweichung um mehr als eine Kategorie in keinem Fall (= 0,0%). Für Befunder 2 waren auch hier die Ergebnisse mit 16 Übereinstimmungen (= 66,7%) und eine Abweichung um eine Kategorie in 8 Fällen (33,3%) ähnlich (Tab. 3.19).

Tab. 3.18: Vergleich der prozentualen Positivität des Progesteronrezeptors (PR-PP) zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 1 ($p = 0,0043$)

PR-PP, Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	11	1				12
	1	2	2				4
	2		1		1		2
	3			1	2	1	4
	4				2		2
	Σ	13	4	1	5	1	24

Tab. 3.19: Vergleich der prozentualen Positivität des Progesteronrezeptors (PR-PP) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 2 ($p = 0,0092$)

PR-PP Befunder2		Zweite Lymphknotenmetastase					
		0	1	2	3	4	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	10	2				12
	1	2	2				4
	2		1		1		2
	3			1	2	1	4
	4					2	2
	Σ	12	5	1	3	3	24

Färbeintensität (PR-SI)

Tabelle 3.20 zeigt die Beurteilung der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2, die in allen 35 Fällen übereinstimmte (100%).

Tab. 3.20: Vergleich der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) der ersten Lymphknotenmetastase zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

PR-SI der ersten Lymphknotenmetastase		Befunder 2				
		0	1	2	3	Σ
Befunder 1	0	18				18
	1		2			2
	2			8		8
	3				7	7
	Σ	18	2	8	7	35

In Tabelle 3.21 werden die Beurteilungen der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren für beide Befunder gemeinsam dargestellt, da sie die PR-SI in den Lymphknotenmetastasen in allen Fällen gleich beurteilten.

Im Vergleich zwischen den Primärtumoren und den ersten Lymphknotenmetastasen wurde in 22 Fällen (= 62,9%) die PR-SI durch beide Befunder gleich bewertet. Abweichungen in einer Kategorie ergaben sich in 11 Fällen (= 31,4%), Abweichungen in mehr als einer Kategorie in zwei Fällen (= 5,7%).

Tab. 3.21: Vergleich der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 bzw. Befunder 2 ($p = 0,0005$)

PR-SI, Befunder 1 bzw. 2		Erste Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Primärtumor	0	13	1			14
	1	3		2		5
	2	2	1	4	2	9
	3			2	5	7
	Σ	18	2	8	7	35

Die Tabellen 3.22 und 3.23 geben die Vergleiche der Bewertung von PR-SI durch beide Befunder zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen wieder. Dabei wurden von Befunder 1 18 Fälle (= 75,0%) und von Befunder 2 16 (= 66,7%) Fälle gleich eingestuft. Abweichungen um eine Kategorie ergaben sich insgesamt fünfmal (= 20,8%) bzw. siebenmal (= 29,2%) und um mehr als eine Kategorie je einmal (= 4,2%).

Tabelle 3.22: Vergleich der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 1 ($p = 0,0019$)

PR-SI, Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	11	1			12
	1	1				1
	2	1	1	3	1	6
	3			1	4	5
	Σ	13	2	4	5	24

Tab. 3.23: Vergleich der Färbeintensität des Progesteronrezeptors (PR-SI) zwischen den ersten und den zweiten Lymphknotenmetastasen durch Befunder 2 ($p = 0,0042$)

PR-SI, Befunder 2		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	10	2			12
	1	1				1
	2	1	2	2	1	6
	3			1	4	5
	Σ	12	4	3	5	24

Immunreaktiver Score nach Remmele

Tabelle 3.24 zeigt die in allen 35 Fällen identischen Einstufungen für den Vergleich der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen den beiden Befundern.

Tab. 3.24: Vergleich der Remmele-Scores für den Progesteronrezeptor der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (PR) der ersten Lymphknoten- metastase		Befunder 2			
		0	1-3	4-12	Σ
Befunder 1	0	18			18
	1-3		5		5
	4-12			12	12
	Σ	18	5	12	35

Die Tab. 3.25 und 3.26 geben die Einstufungen des Remmele-Scores zwischen Primärtumoren und erster Lymphknotenmetastase für beide Befunder wieder. In 25 Fällen (= 71,4%) wurde die PR-PP zwischen den ersten Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren von Befunder 1 übereinstimmend bewertet (Tab. 3.25). Abweichungen um eine Kategorie lagen in 9 Fällen (= 25,7%) vor, Abweichungen um mehr als eine Kategorie in einem Fall (= 2,9%).

Tab. 3.25: Vergleich der Remmele-Scores für den Progesteronrezeptor zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 ($p = 0,0002$)

Remmele-Score (PR), Befunder 1		Erste Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Primärtumor	0	13	1		14
	1-3	4	2	2	8
	4-12	1	2	10	13
	Σ	18	5	12	35

Für Befunder 2 zeigte der Vergleich der Bewertung des Remmele-Scores für PR 28 Übereinstimmungen (= 80,0%). Eine Abweichung um eine Kategorie lag in 6 Fällen (= 17,1%) vor, um mehr als eine Kategorie in einem Fall (= 2,9%) (Tab. 3.26).

Tab. 3.26: Vergleich der Remmele-Scores für den Progesteronrezeptor zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (PR), Befunder 2		Erste Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Primärtumor	0	12	1	1	14
	1-3		3	1	4
	4-12		4	13	17
	Σ	12	8	15	35

Die Tab. 3.27 zeigt den Vergleich des Remmele-Scores für PR von Befunder 1 zwischen den ersten und zweiten Lymphknotenmetastasen, Tab. 3.28 den identischen Vergleich für Befunder 2. Es zeigten sich jeweils 20 Übereinstimmungen (= 80,0%). Eine Abweichung um eine Kategorie ergab sich in 4 Fällen (= 20,0%).

Tab. 3.27: Vergleich der Remmele-Scores für den Progesteronrezeptor zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 1 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (PR), Befunder 1		Zweite Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	10			10
	1-3	2	4		6
	4-12		2	6	8
	Σ	12	6	6	24

Tab. 3.28: Vergleich der Remmele-Scores für den Progesteronrezeptor zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Remmele-Score (PR), Befunder 2		Zweite Lymphknotenmetastase			
		0	1-3	4-12	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	11	1		12
	1-3	2	2		4
	4-12		1	7	8
	Σ	13	4	7	24

3.3 Vergleich der immunhistochemischen Her-2/neu-Bestimmungen an Primärtumor und erster und zweiter Lymphknotenmetastase

In Tabelle 3.29 werden die Färbemuster des Her-2/neu-Rezeptors der ersten Lymphknotenmetastasen für Befunder 1 und Befunder 2 gegenübergestellt.

Im Vergleich befundeten beide Befunder Her-2/neu in 33 Fällen (= 94,3%) übereinstimmend, in weiteren 2 Fällen (= 5,7%) ergab sich eine Abweichung von +/- einer Kategorie und in keinem Fall (= 0%) wich die Beurteilung um mehr als eine Kategorie ab.

Tab. 3.29: Vergleich des Färbemusters von Her-2/neu der ersten Lymphknotenmetastasen zwischen Befunder 1 und Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Her-2/neu der ersten Lymphknoten- metastase		Befunder 2				
		0	1	2	3	Σ
Befunder 1	0	24				24
	1		2			2
	2		1	3		4
	3			1	4	5
	Σ	24	3	4	4	35

Die Tabellen 3.30 vergleicht das Färbemuster des Her-2/neu-Rezeptors zwischen der ersten Lymphknotenmetastasen und dem Primärtumor für Befunder 1. In 24 Fällen (= 68,6%) wurde Her-2/neu übereinstimmend bewertet. Abweichungen in einer Kategorie ergaben sich in 7 Fällen (= 20%), Abweichungen in mehr als einer Kategorie in 4 Fällen (= 11,4%).

Tab. 3.30: Vergleich des Färbemusters von Her-2/neu zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 1 ($p = 0,0066$)

Her-2/neu, Befunder 1		Erste Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Primärtumor	0	24	1	2	1	28
	1	2	1	1	1	5
	2			1	1	2
	3					0
	Σ	26	2	4	3	35

Die Tabelle 3.31 zeigt den identischen Vergleich der Bewertung des Her-2/neu-Rezeptors für Befunder 2. Es ergaben sich 20 Übereinstimmungen (= 57,2%). Eine Abweichung um eine Kategorie lag in 11 Fällen (= 31,4%) vor, eine Abweichung um mehr als eine Kategorie in 4 Fällen (= 11,4%).

Tab. 3.31: Vergleich des Färbemusters von Her-2/neu zwischen der ersten Lymphknotenmetastase und dem Primärtumor durch Befunder 2 ($p = 0,0006$)

Her-2/neu, Befunder 2		Erste Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Primärtumor	0	21	1	2	1	25
	1	2	1	2	1	5
	2				2	2
	3				3	3
	Σ	23	1	4	7	35

Tabelle 3.32 gibt den Vergleich der Beurteilung von Her-2/neu von Befunder 1 zwischen den ersten und zweiten Lymphknotenmetastasen wieder. Es ergaben sich 21 Übereinstimmungen (= 87,5%). Eine Abweichung um eine Kategorie lag in 3 Fällen vor (= 12,5%). Eine Abweichung um mehr als eine Kategorie kam insgesamt nicht vor. Für Befunder 2 waren auch hier die Ergebnisse ähnlich (Tab. 3.33) mit 22 Übereinstimmungen (91,7%) und zwei Abweichungen um eine Kategorie (8,3%).

Tab. 3.32: Vergleich des Färbemusters von Her-2/neu zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 1 ($p < 0,0001$)

Her-2/neu, Befunder1		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	18				18
	1					
	2		1	1	1	3
	3			1	2	3
	Σ	18	1	2	3	24

Tab. 3.33: Vergleich des Färbemusters von Her-2/neu zwischen der ersten und der zweiten Lymphknotenmetastase durch Befunder 2 ($p < 0,0001$)

Her-2/neu, Befunder2		Zweite Lymphknotenmetastase				
		0	1	2	3	Σ
Erste Lymphknoten- metastase	0	18				18
	1					
	2		1	1	1	3
	3				3	3
	Σ	18	1	1	4	24

3.4 Darstellung von Korrelationskoeffizienten

Ergänzend sollen die Korrelationen zwischen den Einstufungen der fünf Variablen ER-PP, ER-SI, PR-PP, PR-SI und Her-2/neu dargestellt werden, zuerst für den Östrogenrezeptor (ER-PP und ER-SI) (Tab. 3.34).

Tab. 3.34: Korrelationskoeffizienten für die Expression von ER-PP und ER-SI zwischen den Färbemustern des Primärtumors und der ersten bzw. der zweiten Lymphknotenmetastase

ER	LK-Met. 1, Untersucher1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 1, Untersucher 1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 2, Untersucher 1	LK-Met. 2, Untersucher2
	35 Vergleiche		24 Vergleiche			
<u>ER-PP</u>						
Primär-Tu.	0,810	0,785	0,794	0,740	0,778	0,632
LK-Met. 1, Untersucher 1		0,985		0,936		0,940
<u>ER-SI</u>						
Primär-Tu.	0,790	0,764	0,797	0,758	0,656	0,604
LK-Met. 1, Untersucher 1		0,893		0,839		0,809

Die Korrelationskoeffizienten zeigen sowohl für den ER-PP, als auch für den ER-SI im Vergleich aller 35 Fälle Werte im Bereich zwischen $r = 0,764$ und $r = 0,810$, wenn man die Primärtumoren und die erste (bzw. einzige) Lymphknotenmetastase vergleicht. Dabei unterscheiden sich die Werte zwischen Untersucher 1, der auch die Primärtumoren ausgewertet hatte, und Untersucher 2 kaum. Die hohe Korrelation zwischen ihren Bewertungen zeigt sich auch in den hohen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,985$ (ER-PP) und $r = 0,893$ (ER-SI) im Vergleich der jeweiligen Beurteilung der ersten Lymphknotenmetastase (= inter-

spezifische Reproduzierbarkeit). Für die 24 zweiten Lymphknotenmetastasen liegen ähnlich hohe Werte vor, die aber jeweils etwas geringer als diejenigen der 35 ersten Lymphknotenmetastasen ausfallen.

Tab.3.35 zeigt die entsprechenden Korrelationskoeffizienten für den Progesteronrezeptor (PR-PP und PR-SI).

Tab. 3.35: Korrelationskoeffizienten für die Expression von PR-PP und PR-SI zwischen den Färbemustern des Primärtumors und der ersten bzw. der zweiten Lymphknotenmetastase

PR	LK-Met. 1, Untersucher1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 1, Untersucher 1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 2, Untersucher 1	LK-Met. 2, Untersucher2
	35 Vergleiche		24 Vergleiche			
<u>PR-PP</u>						
Primär-Tu.	0,736	0,736	0,728	0,728	0,738	0,720
LK-Met. 1, Untersucher 1		1,000		1,000		0,976
<u>PR-SI</u>						
Primär-Tu.	0,822	0,822	0,822	0,822	0,794	0,757
LK-Met. 1, Untersucher 1		1,000		1,000		0,973

Ähnliche Effekte lassen sich auch für den Progesteronrezeptor beobachten. Dies gilt sowohl im Wesentlichen für die Dimension der Werte der Korrelationskoeffizienten, auch wenn sie sich insofern unterscheiden, dass die Korrelation für ER-PP etwas höher ist als für PR-PP, diejenige für ER-SI aber etwas niedriger als für PR-SI. Gleichsam gilt, dass die Einstufungen der beiden Untersucher an der ersten bzw. der zweiten Lymphknotenmetastase höher korreliert sind als die Vergleiche zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen. Da alle 35 Einstufungen der ersten Lymphknotenmetastase für PR-PP und PR-SI zwischen beiden Untersuchern gleich waren, liegt der Korrelationskoeffizient bei 1,0, so

dass auch hier eine sehr hohe interspezifische Reproduzierbarkeit vorliegt. Für die zweite Lymphknotenmetastasen liegt der entsprechende Wert bei 0,973.

Die Daten für Her-2/neu sind in Tabelle 3.36 wiedergegeben:

Tab. 3.36: Korrelationskoeffizienten für die Expression von Her-2/neu zwischen den Färbemustern des Primärtumors und der ersten bzw. der zweiten Lymphknotenmetastase

Her-2/neu	LK-Met. 1, Untersucher1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 1, Untersucher 1	LK-Met. 1, Untersucher 2	LK-Met. 2, Untersucher 1	LK-Met. 2, Untersucher2
	35 Vergleiche		24 Vergleiche			
Primär-Tu.	0,646	0,567	0,455	0,334	0,437	0,437
LK-Met. 1, Untersucher 1		0,977		0,960		0,943

Für Her-2/neu fallen die Korrelationskoeffizienten für die Vergleiche zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen mit Werten zwischen $r = 0,437$ und $r = 0,646$ deutlich geringer aus als für die beiden Hormonrezeptoren. Die Einordnung der Lymphknotenmetastasen durch die beiden Untersucher ist aber auch hier im Sinne einer hohen interspezifischen Reproduzierbarkeit mit Korrelationskoeffizienten zwischen $r = 0,943$ und $r = 0,977$ sehr hoch.

3.5 Dokumentation: Zehn Fälle mit sechs untersuchten Lymphknotenmetastasen

Wie in Kapitel 2.2.2 ausgeführt, schwankte die Zahl der Lymphknotenmetastasen recht deutlich, und aus statistischen Gründen wurde entschieden, systematische Untersuchungen nur für die ersten beiden anzubieten. Andererseits waren 10 Fälle vorhanden, in denen sechs Lymphknotenmetastasen untersucht werden konnten. Daher sollen die Datenverteilungen im Folgenden am Beispiel von Befunder 1 zumindest tabellarisch dokumentiert (Tab. 3.37) und im Anschluss kurz kommentiert werden.

Tab. 3.37 (Anfang): Vergleich des Färbemusters von ER-PP, ER-SI, PR-PP, PR-SI und Her-2/neu in 10 Fällen, in denen jeweils sechs Lymphknotenmetastasen untersucht wurden. Schwarz: Expressionsmuster des Primärtumors, rot: Expressionsmuster der Lymphknotenmetastasen

Fall- Nummer	ER-PP	ER-SI	PR-PP	PR-SI	Her-2/neu
1	1	3	1	3	0
	0	0	1	1	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0
	0	0	1	1	0
	0	0	1	1	0
2	3	2	3	3	0
	4	2	4	3	0
	2	1	3	3	0
	3	1	4	2	0
	3	2	4	3	0
	2	1	2	3	0
	4	2	4	3	0
3	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	1	3	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0

Tab. 3.37 (Fortsetzung): Vergleich des Färbemusters von ER-PP, ER-SI, PR-PP, PR-SI und Her-2/neu in 10 Fällen, in denen jeweils sechs Lymphknotenmetastasen untersucht wurden. Schwarz: Expressionsmuster des Primärtumors, rot: Expressionsmuster der Lymphknotenmetastasen

Fall-Nummer	ER-PP	ER-SI	PR-PP	PR-SI	Her-2/neu
5	4	2	1	2	0
	3	2	1	2	0
	2	1	0	0	0
	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	4	3	1	1	0
	3	2	1	2	0
6	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
7	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	3	2	0	0	0
	4	1	0	0	0
8	2	2	0	0	1
	1	3	0	0	3
	1	3	0	0	3
	1	2	0	0	2
	1	1	0	0	3
	1	2	0	0	1
	2	1	0	0	1

Tab. 3.37 (Fortsetzung und Ende): Vergleich des Färbemusters von ER-PP, ER-SI, PR-PP, PR-SI und Her-2/neu in 10 Fällen, in denen jeweils sechs Lymphknotenmetastasen untersucht wurden. Schwarz: Expressionsmuster des Primärtumors, rot: Expressionsmuster der Lymphknotenmetastasen

Fall-Nummer	ER-PP	ER-SI	PR-PP	PR-SI	Her-2/neu
9	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
	0	0	0	0	2
10	2	1	0	0	2
	1	1	0	0	2
	3	3	0	0	3
	2	3	0	0	3
	2	2	0	0	3
	0	0	0	0	0
	4	3	0	0	2

Für ER und PR zusammengenommen gibt es eine Reihe von Fällen, in denen alle Einstufungen für ER-PP bzw. PR-PP (und damit auch für ER-SI und PR-SI) immer 0 waren, und zwar für ER drei Fälle (Nr. 3, 6 und 9) und für PR sieben Fälle (Nr. 3, 4 sowie 6 bis 10). In den übrigen sieben bzw. drei Fällen lagen hin und wieder diskrepante Einstufungen vor. Von Fall 1 für ER abgesehen wies kein Fall, der eine Hormonrezeptorexpression im Primärtumor gezeigt hatte, ein immer identisches Expressionsprofil für alle sechs Lymphknotenmetastasen auf.

Dichotomisiert man die Ergebnisse als positiv und negativ, so wäre denkbar, wie es auch häufiger auf klinisch-pathologischen Konferenzen diskutiert wird, einen IRS von 0 und einen IRS von 1 als negativ anzunehmen und Fälle mit einem IRS ≥ 2 als positiv zu werten. Bei diesem Ansatz zeigten sich für ER sechs homogene

Fälle, davon drei durchgehend positiv (Nr. 2, 5 und 7) und drei durchgehend negativ (Nr. 3, 6 und 9); vier Fälle waren diskrepant, von denen allerdings in zwei Fällen (Nr. 4 und Nr. 8) nur eine der sechs Lymphknotenmetastasen abweichend zum Primärtumor gewertet wurde. Für PR ergaben sich acht homogene Expressionen, davon war ein Fall durchgehend positiv (Nr. 2), sieben waren durchgehend negativ (Nr. 3, 4, 6, 7, 8, 9 und 10) und zwei diskrepant.

Legt man als Grenze für Positivität bei ER und PR, wie es (siehe Diskussion) in der internationalen Literatur gemacht wird, ab 10% positiver Zellen fest, so wären unabhängig von ER-SI oder PR-SI nur Fälle mit einem ER-PP > 1 oder einem PR-PP > 1 als positiv zu werten, und die mit 1 beurteilten Fällen fielen in die Gruppe der Negativen. Bei diesem Ansatz wären bezogen auf ER acht von zehn Fällen homogen für den Primärtumor und alle sechs Lymphknotenmetastasen, und zwar drei positiv (Nr. 2, 5 und 7) und fünf negativ (Nr. 1, 3, 4, 6 und 9). Bei zwei im Primärtumor positiven Fällen sind zwei (Nr. 10) bzw. fünf Lymphknotenmetastasen (Nr. 8) negativ. Für PR wurden bei diesem Ansatz alle 10 Fälle immer gleichartig beurteilt; ein Fall war positiv (Nr. 2), die übrigen neun negativ.

Bezogen auf Her-2/neu ergaben sich in sieben Fällen (Nr. 1-5 sowie 7 und 9) komplette Übereinstimmungen, wobei sechsmal alle Beurteilungen 0 und einmal 2 waren. In den Fällen 6, 8 und 10 liegen Diskrepanzen vor, die sich über eine ergänzende FISH-Untersuchung lösen ließen. Eine FISH-Anwendung wäre naturgemäß auch bei Fall 9 indiziert.

4. Diskussion

4.1 Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu am Primärtumor - ein diagnostisches Standardvorgehen beim Mammakarzinom

Seit in den 70er Jahren mit der damals auf biochemischem Weg durchgeführten Hormonrezeptoranalyse erste therapeutisch und prognostisch sinnvolle Marker in die Diagnostik des Mammakarzinoms eingeführt wurden, hat man sich in der täglichen Routine zunächst über längere Zeit fast ausschließlich auf Untersuchungen am Primärtumor beschränkt.

Historisch hat dieses sicher damit zu tun, dass die biochemischen Hormonrezeptoren anfangs nur an unfixiertem, unter Einhaltung einer Kühlkette transportiertem Material untersucht werden konnten. Dazu wurde der Primärtumor operativ entfernt, auf Eis gelagert in die Pathologie gebracht, wo dann wiederum nach Durchführung von Gefrierschnitten („Schnellschnitt“) kleinere Proben von rein makroskopisch vital erscheinenden Tumoranteilen bei mindestens -18 °C abgefroren wurden. Die gefrorenen Proben wurden dann zur eigentlichen Rezeptorbestimmung später in ein Labor gebracht, das in den meisten Einrichtungen wiederum nicht in der Pathologie beheimatet war, sondern beispielsweise im Zentrallabor oder in der zugehörigen Frauenklinik selber. Eine Untersuchung an Lymphknotenmetastasen, die man erst histologisch hätte sichern müssen, war unter diesen Bedingungen unrealistisch, und Fernmetastasen wurden zu dieser Zeit kaum biopsiert, sondern nach klinisch-bildgebenden Gesichtspunkten diagnostiziert bzw. als wahrscheinlich angenommen.

Auch die immunhistochemisch bestimmbaren Hormonrezeptoren, die in den mittleren 80er Jahren auf den Markt kamen, benötigten zunächst eine Aufarbeitung in Gefrierschnitt-Technik, hatten aber den Vorteil, dass die Schnitte unmittelbar vom Schnellschnittblock gewonnen werden konnten und eingefroren gelagert werden konnten. Als zweiter Vorteil war zu nennen, dass die lagernde Abteilung, nämlich die Pathologie, auch die späteren Untersuchungen per

Immunhistochemie selber vornahm. Daran, Lymphknotenmetastasen zu untersuchen, wurde seinerzeit wenig gedacht, und während die Primärtumoren damals zur diagnostischen Sicherung frisch übersandt wurden, folgten die axillären Dissektate später in Formalin fixiert nach.

Wieder ein paar Jahre später, nämlich in den 90er Jahren, wurden dann Primärantikörper für ER und PR eingeführt, die auch an Paraffinschnitten und damit an fixiertem Material funktionierten. Parallel dazu war das *antigen retrieval* entwickelt worden, d.h. Methoden, mit denen man die Formalin-bedingte sogenannte Maskierung von antigenen Strukturen zumindest partiell rückgängig machen konnte. Formalin entfaltet seine fixierende Wirkung im Gewebe durch die Quervernetzung von Proteinstrukturen, welche z.T. durch Erhitzung reversibel ist. Dieses ist der Grund, weswegen bei diversen Antikörpern eine Behandlung der Schnitte im Schnellkochtopf o.ä. vorgenommen wird. Diese Vorgehensweise hat sich gegenüber anderen Ansätzen zum *antigen retrieval*, die in einer methodischen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe zur Qualitätssicherung in der Immunhistochemie früher bereits besprochen wurden (Biesterfeld et al. 2003, Kraus 2008), weitgehend durchgesetzt und wird üblicherweise, so auch in dieser Studie, unter Verwendung von Citratpuffer durchgeführt.

Innerhalb relativ kurzer Zeit löste dann die immunhistochemische Methode die biochemische Methode ab, nachdem gezeigt werden konnte, dass die Korrelation zwischen den Ergebnissen hoch war: Andersen et al. (1988) stellten die Ergebnisse aus 16 Arbeiten für den Vergleich beider Anwendungen zur Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus zusammen; dabei ergaben sich Übereinstimmungen zwischen 65% und 94% mit einem Median von 86,5%. Addiert man die einzelnen Fallzahlen aller Arbeiten auf, so berechnet sich die Übereinstimmung mit 85,7%, bezogen auf insgesamt 1166 Fälle.

Untersuchungen zum Her-2/neu-Status wurden nach Identifikation dieses Rezeptors ebenfalls bereits in den 90er Jahren etabliert und schnell an allen Mammakarzinomen vorgenommen, obwohl die therapeutische Konsequenz seinerzeit formal erst im Falle einer Metastasierung gegeben war und somit eine

Art von Überdiagnostik betrieben wurde. Die Bestimmung von Her-2/neu erfolgte von Beginn an rein an Paraffinschnitten; eine „Vorphase“ an Gefrierschnitten gab es für diesen Marker nicht. Dennoch war die Vorgehensweise, sofort den Her-2/neu-Status zu erheben, insofern sinnvoll, als es zwar auch in der Pathologie eine arzttypische Dokumentationspflicht gibt, die aber nicht eine allgemeine Aufbewahrungspflicht für Paraffinblöcke einschließt¹, sondern sich zumindest formal auf Schnittpräparate und den schriftlichen Befund beschränkt.

Neuere immunhistochemische Marker in der Pathologie (Beispiele für Mammakarzinome: GATA-3 und neuerdings [seit 2021/22] auch TRPS-1) sind allesamt an Paraffinschnitten anwendbar. Gleiches gilt für die PCR-Verfahren und genetischen Tests, die in manchen Fällen (z.B. Oncotype-DX- oder Endopredict-Test) die morphologische Diagnostik ergänzen, und auch für die *in situ*-Hybridisierung. Diese Methode hat bei Mammakarzinomen Bedeutung, da sie als ergänzende Anwendung bei einem Her-2/neu-Status mit dem Score 2 eingesetzt wird. Lediglich für die biochemische Bestimmung des uPa-/PAI-1-Status, der aber bei Mammakarzinomen nur noch selten nachgefragt wird, nur noch von wenigen Laboren vorgehalten wird und inzwischen auch nicht mehr in den Leitlinien empfohlen wird, ist unfixiertes, eingefrorenes Frischmaterial vonnöten. Vermutlich deswegen wurde in der neuen aktuellen S3-Leitlinie darauf verzichtet, weiterhin eine Empfehlung für die Anwendung von uPa-/PAI-1 auszusprechen (S3 2021).

Der Standard in der morphologischen Diagnostik ist in aus dem Jahr 2017 stammenden, zuletzt im Juni 2021 aktualisierten Leitlinie *„Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des*

¹ In der Pathologie muss genau wie in jeder anderen ärztlichen Disziplin die gesetzlich vorgegebene Dokumentationspflicht eingehalten werden, die in diesem Fach 10 Jahre beträgt. Als „Dokument“ gelten dabei landläufig der Befund (inklusive eventueller Nachtragsbefunde) und die Präparate, an denen der Befund zustande kam, d.h. die zugehörigen Schnittpräparate. Die Paraffinblöcke sind zwar die Grundlage für die angefertigten Schnitte, fallen aber formal bisher wohl nicht unter die Dokumentationspflicht. Heute allerdings heben alle Pathologien ihre Blöcke von selber über lange Zeit auf, was früher nicht durchgehend der Fall war. Seitens der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Senologie werden inzwischen Archivierungszeiträume für Paraffinblöcke von 15 Jahren gefordert bzw. dringend empfohlen (Mayr et al. 2017).

Mammakarzinoms“, AWMF-Register-Nummer 032/045OL, niedergelegt (S3 2021) bzw. wird in den einzelnen Unterkapiteln der ebenfalls aus dem Jahr 2017 stammenden 16. Auflage des *Manual Mammakarzinom* des Tumorzentrums München (Bauerfeind 2017) erläutert.

Bezüglich der Untersuchungen am Primärtumor wird in der aktuellen S3-Leitlinie im Kapitel 4.5.3 "Bestimmung des Hormonrezeptor- und Her2-neu-Status sowie des Ki-67-Proliferationsindex invasiver Karzinome" in der Evidenzbasierten Empfehlung 4.64 ausgeführt (S3 2021):

Evidenzbasierte Empfehlung 4.64: „a.) Beim invasiven Mammakarzinom sollen in der Primärdiagnostik der Östrogen- und Progesteronrezeptor-status sowie der HER2-Status bestimmt werden, vorzugsweise bereits an der Stanzbiopsie.“

Dabei wird in späteren Abschnitten der Leitlinie festgehalten, dass die beiden Hormonrezeptoren immunhistochemisch und Her-2/neu immunhistochemisch oder per *in-situ*-Hybridisierung bestimmt werden sollen. Wiederholungen am Resektat sollen nur an Fällen vorgenommen werden, bei denen die Voruntersuchungen am Stanzbiopsat mit methodischen Einschränkungen behaftet waren.

Nicht explizit in der S3-Leitlinie empfohlen werden die Bestimmungen an Residualtumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie, auch wenn dieses im täglichen klinischen Alltag anders gehandhabt wird. Im *Manual Mammakarzinom* (Bauerfeind 2017) wird dazu im Abschnitt "Histopathologische Beurteilung nach PST" [= primäre systemische Therapie] begründend ausgeführt, letztlich sei ungeklärt, ob eine "Überprüfung der Tumorbiologie am Residualtumorgewebe in Mamma und / oder Lymphknoten ggf. eine Änderung der postoperativen adjuvan-ten Therapie indizieren" könne (Wolf et al. 2017). In der täglichen Praxis werden Neubestimmungen für ER, PR und Her-2/neu aber im Rahmen der Falldiskussionen auf den Tumorkonferenzen der Brustzentren regelhaft verlangt, so dass hier über die derzeitig konsentierten Empfehlungen hinausgegangen wird.

Auf die Bestimmung anderer Faktoren zur Therapieplanung und Prädiktion soll hier nur cursorisch eingegangen werden. In den Leitlinien fest verankert ist trotz aller methodischer Probleme im Moment nur die Ki-67-Immunhistochemie, über die die Proliferationsaktivität der Tumoren semiquantitativ angegeben wird. Inzwischen bereits gewerblich erhältliche, also über die experimentelle Phase hinaus gekommene Multigentestungen (Endopredict, Oncotype DX, MammaPrint oder Prosigna) kommen in bestimmten Fallkonstellationen optional hinzu (Senkus et al. 2015), insbesondere wenn es in unklaren Staging- und Gradingssituationen um die Indikationsstellung einer adjuvanten Chemotherapie geht. In der S3-Leitlinie wird dazu die folgende Evidenzbasierte Empfehlung 4.78 gegeben, die später im Kapitel 4.5.4.4 der Leitlinie sehr differenziert diskutiert wird (S3 2021):

Evidenzbasierte Empfehlung 4.78: „Nur, wenn bei Frauen mit einem ER/PR-positiven, HER2-negativen, nodal-negativen invasiven Mammakarzinom die konventionellen Prognoseparameter einschließlich Ki-67 keine eindeutige Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie erlauben, kann ein methodisch standardisierter und klinisch validierter Multigentest bei der Entscheidung herangezogen werden.

Hinsichtlich des Nutzens der Multigentests besteht jedoch weiterer Forschungsbedarf, da die Studienlage und die Nachbeobachtungszeiten in den vorliegenden Studien noch nicht ausreichend sind.“

Gerade auch wegen ihrer hohen Kosten behielten sich gesetzliche Krankenkassen über längere Zeit hier eine Einzelfallentscheidung über die Kostenübernahme vor. Inzwischen ist aber eine allgemeine Regelung getroffen worden.

4.2 Aktuelle Leitlinien-basierte Empfehlungen zur Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu an Lymphknotenmetastasen, lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen

Die Empfehlungen der S3-Leitlinie zum Vorgehen bei Metastasen sollen im Folgenden zusammengefasst werden.

Synchrone Lymphknotenmetastasen

Der Aspekt der synchron, also gleichzeitig zum Primärtumor diagnostizierten Lymphknotenmetastasen, der unserer Studie zugrunde liegt, wird in der S3-Leitlinie sowie auch international nicht aufgenommen. An ihnen werden auch üblicherweise im klinischen Alltag keine Zusatzuntersuchungen vorgenommen.

Lokale und lokoregionäre Rezidive

Bezüglich der Untersuchungen an Rezidiven wird in der aktuellen S3-Leitlinie im Kapitel 5.3 "Therapie des lokalen / lokoregionalen Rezidivs" in der Empfehlung 5.8 ausgeführt (S3 2021):

Konsensbasierte Empfehlung 5.8: „a.) Bei Verdachtsdiagnose eines lokoregionären Rezidivs soll zunächst eine histologische Sicherung mit erneuter Bestimmung von ER, PR und Her2neu und ein komplettes Re-Staging erfolgen, um Metastasen auszuschließen und die Planung einer interdisziplinären Therapiestrategie zu ermöglichen.

Redaktionell unglücklicherweise steht diese Empfehlung allerdings formal im Unterkapitel 5.3.1 ("Lokales (intramammäres) Rezidiv") und wird in den Unterkapiteln 5.3.2 ("Lokalrezidiv nach Mastektomie") und 5.3.3 ("Axilläres Lymphknotenrezidiv") nicht konkret wieder aufgenommen. Andererseits wiederum wird in Unterkapitel 5.3.4 ("Medikamentöse Therapie"), das sich konkret mit Systemtherapien aller drei Rezidivformen befasst, auf den erneuerten ER-, PR- und Her-2/neu-Status eingegangen. Dies bedeutet wiederum, dass letztendlich eine Bestimmung bei allen drei Arten der lokoregionalen Rezidive vorausgesetzt wird. Es wäre auch keine Rationale gegeben, die bei einer bestimmten Rezidivart eine solche Untersuchung indizierte und bei einer anderen ausschliesse. Diese Auffassung bestätigt sich auch im Münchener *Manual Mammakarzinom* (Bauerfeind 2017), in dessen Kapitel "Behandlung des lokalen und regionären Tumorrezidivs" explizit ausgeführt wird: "*Die Angabe der Lokalisation des Rezidivs (...) der Histologie und des Rezeptorstatus (Östrogen, Progesteron, HER2) sollte daher Standard sein*" (Schaffer et al. 2017).

Fernmetastasen

Im Kapitel 5.4 "Fernmetastasen" gibt die S3-Leitlinie streng genommen keinen Aufschluss darüber, inwieweit man sich bzgl. ER, PR und Her-2/neu auf Untersuchungsergebnisse am Primärtumor stützen kann oder neu untersuchen soll. In einem früheren Kapitel wird in der Evidenzbasierten Empfehlung 5.6 lediglich allgemein das notwendige Vorgehen angesprochen (S3 2021):

Evidenzbasierte Empfehlung 5.6: „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.“

Was mit „geeignete diagnostische Maßnahmen“ gemeint ist, wird dabei nicht näher ausgeführt; sie umfassen aber sicher auch insbesondere die histologische Sicherung. Vernünftig wäre, die oben besprochene Empfehlung 5.8, die für lokale oder lokoregionale Rezidive gedacht ist, nämlich die Tumorsicherung und erneute Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu, auch auf vermutete Fernmetastasen anzuwenden. Formal aber wird keine Empfehlung gegeben, was die Anwendung ergänzender Marker bei histologischem Metastasennachweis betrifft.

Auch im *Manual Mammakarzinom* (Bauerfeind 2017) wird im Kapitel "Nachsorge" bekräftigt, es sollte "zur Abklärung von Metastasen (...) nach Möglichkeit immer eine erneute Biopsie mit Bestimmung der Histologie sowie des Hormonrezeptor- und HER2-Status erfolgen" (Schindlbeck et al. 2017). Ebenso verweisen internationale Richtlinien auf die Notwendigkeit einer erneuten Untersuchung des Markerprofils an Metastasen. Die aktuelle europäische Richtlinie zum fortgeschrittenen Mammakarzinom ("*3rd ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3)*") begründet dieses in einer ihrer

Empfehlungen mit therapeutischen Konsequenzen in Fällen von Diskrepanzen zwischen den Untersuchungsergebnissen (Cardoso et. al., 2017):

"If the results of tumour biology in the metastatic lesion differ from the primary tumor, it is currently unknown which result should be used for treatment-decision making. Since a clinical trial addressing this issue is difficult to undertake, we recommend considering the use of targeted therapy ([endocrine therapy] and/or anti-HER-2 therapy) when receptors are positive in at least one biopsy, regardless of timing."

Entsprechend wäre eine erneute Bestimmung von ER, PR und Her-2/neu an jeder synchronen oder metachronen Fernmetastase verpflichtend, um keine Option für eine endokrine oder eine anti-Her-2/neu-Therapie zu verpassen. Ob man eine Histologie an Metastasen in jedem Fall erzwingen muss, beispielsweise wenn sie multipel sind, ist eine nicht konkret behandelte Frage - die Erfahrung lehrt, dass eine histologische Sicherung von Metastasen in der Regel nicht unter dieser Fragestellung erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Leitlinien in der Wertigkeit von synchronen und metachronen Absiedlungen bei Mammakarzinomen derzeit Unterschiede sehen, was die Notwendigkeit betrifft, therapeutisch nutzbare Marker wie ER, PR und Her-2/neu zu bestimmen.

4.3 Vergleichende Untersuchungen zur ER- und PR-Expression sowie zum Her-2/neu-Status an unbehandelten Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen

4.3.1 ER und PR

Seit der Einführung der immunhistochemischen Bestimmung von ER und PR an Paraffinschnitten sind diverse Arbeiten erschienen, die sich an oft relativ kleinen Kollektiven mit dem Vergleich der Markerexpression an Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen befasst haben. Die Ergebnisse für ER und PR sind bezogen auf die reine Konkordanz der Daten, also bezogen auf ein „negatives“ oder „positives“ Ergebnis ohne Berücksichtigung der Expressionsstärke, in Tabelle 4.1 wiedergegeben. Dabei ist vorab zu bemerken, dass die

Ergebnisse bezüglich der Lymphknoten nur in einer der Arbeiten erkennen lassen, ob sie sich auf eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen beziehen. Entsprechend ist in aller Regel auch nicht ablesbar, wie man bzgl. der Einordnung konkreter Fälle als konkordant oder diskordant mit eventuellen diskrepanten Expressionen innerhalb verschiedener Lymphknotenmetastasen umgegangen ist. Unsere eigenen Daten sind in Tabelle 4.1 in der Art berücksichtigt, dass Fälle, in denen mindestens eine Lymphknotenmetastase eine Rezeptorexpression zeigte, für den Gesamtfall als positiv gewertet wurde. Da die große Mehrzahl der Arbeiten als Grenzwert für Positivität eine ER-PP bzw. PR-PP von 10% angesetzt hat, wurden auch die eigenen Daten hier nach dieser Vorgabe in die Tabelle eingebracht, und zwar für die Ergebnisse von Befunder 1 (vgl. Tab. 3.2 und Tab. 3.12). Fälle, die in beiden Beurteilungen für den ER-PP bzw. den PR-PP in die Kategorien 0 und 1 bzw. in die Kategorien 2 bis 4 fielen, galten als konkordant, die übrigen als diskordant.

Tab. 4.1 (Anfang): Übereinstimmung des Östrogenrezeptor- (ER) und des Progesteronrezeptorstatus (PR) in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen

(*) = Untersuchung an Sentinel-Lymphknoten. (**) = Untersuchung an Paraffinschnitten (Primärtumoren) bzw. Feinnadelaspiraten (Metastasen). (***) = Unterschiedliche Grenzwerte für ER (links) und PR (rechts). Prozentangaben in der Spalte "Positiv ab" beziehen sich rein auf den Anteil positiver Tumorzellen (entsprechend ER-PP bzw. PR-PP) ohne Berücksichtigung der Färbeintensität. IRS = Immunreaktiver Score. n.a. = nicht angegeben.

Autor / Jahr	Positiv ab	Konkordanz ER		Konkordanz PR	
		Fälle	%	Fälle	%
Konventionelle Histologie					
Andersen 1988	n.a.	35/37	94,6%	---	---
Kamby 1989	0%	26/29	89,7%	---	---
Mori 1991	0%	19/19	100%	---	---
Nedergaard 1995	10%	80/101	79,2%	---	---
van Agthoven 1995	n.a.	25/26	96,2%	24/26	92,3%
Tsutsui 2002	n.a.	84/104	80,8%	82/104	78,8%
Iguchi 2003	10%	66/87	75,9%	---	---
de la Haba Rodríguez 2004	10%	56/60	93,3%	51/60	85,0%
Dikicioglu 2005	5%	18/22	81,8%	18/22	81,8%

Tab. 4.1 (Fortsetzung und Ende): Übereinstimmung des Östrogenrezeptor- (ER) und des Progesteronrezeptorstatus (PR) in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen

(*) = Untersuchung an Sentinel-Lymphknoten. (**) = Untersuchung an Paraffinschnitten (Primärtumoren) bzw. Feinnadelaspiraten (Metastasen). (***) = Unterschiedliche Grenzwerte für ER (links) und PR (rechts). Prozentangaben in der Spalte "Positiv ab" beziehen sich rein auf den Anteil positiver Tumorzellen (entsprechend ER-PP bzw. PR-PP) ohne Berücksichtigung der Färbeintensität. IRS = Immunreaktiver Score. n.a. = nicht angegeben.

Autor / Jahr	Positiv ab	Konkordanz ER		Konkordanz PR	
		Fälle	%	Fälle	%
Konventionelle Histologie					
d'Andrea 2007	10%	85/88	96,6%	84/87	96,6%
Aitken 2009	n.a.	139/194	71,6%	147/192	76,6%
Azam 2009	10%	91/100	91,0%	88/100	88,0%
Strien 2010 (*)	10%	49/56	87,5%	47/56	83,9%
Gong 2011 (**)	10%	112/124	90,3%	---	---
Tawfik 2013	10%	85/90	94,4%	77/89	86,5%
Ieni 2014	n.a.	141/148	95,3%	141/148	95,3%
Georgescu 2017	1%	48/78	61,5%	44/78	56,4%
Kinoe 2018	10%	74/105	70,5%	71/104	68,2%
Khande 2020	10%	23/25	92,0%	31/35	88,6%
Janeva 2023	10%	93/94	98,9%	84/94	89,4%
Gesamt		1349/1587	85,0%	989/1195	82,8%
TMA					
Falck 2010	10%	243/262	92,8%	215/257	83,9%
Jensen 2012	1%	48/50	96,0%	---	---
Ataseven 2013	IRS 2	114/117	97,4%	112/116	96,6%
Kuncman 2021 (***)	1% / 20%	40/49	81,6%	34/44	77,3%
Eigene Daten 2023	10%	32/35	91,4%	29/35	82,9%
Gesamt		477/513	93,0%	390/452	86,3%
Konventionelle Histologie und TMA					
Gesamt		1826/2100	87,0%	1379/1647	83,7%

Insgesamt zeigen die zitierten Arbeiten somit eine nicht unerhebliche Schwankungsbreite der Konkordanzwerte sowohl für ER, als auch für PR. Um einen tieferen Eindruck über die Konkordanz der ER- und PR-Bestimmung zu erreichen, wurden ergänzend zu den summarischen Ergebnissen der Fälle aller Studien auch Mittelwerte und Mediane sowie der Range berechnet und in den Tabellen 4.2 und 4.3 dargestellt. Auf diese Weise sollte auch eine gewisse Wichtung der Studiengrößen mit eingebracht werden.

Tab. 4.2: Konkordanzwerte der ER-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die Fallzahlen bzw. die einzelnen Konkordanzwerte von 25 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
ER				
Konventionelle Histologie	85,0%	61,5% - 98,9%	87,1%	90,7%
TMA	93,0%	77,3% - 96,6%	91,8%	92,8%
gemeinsam	87,0%	61,5% - 98,9%	88,0%	91,4%

Tab. 4.3: Konkordanzwerte der PR-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die Fallzahlen bzw. die einzelnen Konkordanzwerte von 18 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
PR				
Konventionelle Histologie	82,8%	56,4% - 96,6%	83,4%	85,8%
TMA	86,3%	77,3% - 96,6%	85,2%	83,4%
gemeinsam	83,7%	56,4% - 96,6%	83,8%	84,5%

Die Tabellen 4.2 und 4.3 lassen erkennen, wie sich trotz verschiedener Konkordanzwerte und verschiedenen Fallzahlen der einzelnen Studien die Werte in den Mittelwerten bei etwas über (ER) bzw. etwas unter (PR) 85% einpendeln. Der statistisch robustere Median allerdings liegt für ER mit 91,4% für alle Studien einige Prozentpunkte höher als für PR (84,5%). Aus dem Vergleich von konventioneller Histologie und TMAs kann man eine gute Vergleichbarkeit beider Methoden ableiten; jedenfalls zeigten sich für TMAs keine grundlegend abweichenden Konkordanzwerte. Unsere eigenen Ergebnisse von 91,4% (ER) und 82,9% (PR) liegen jeweils am bzw. nahe am Median der gemeinsamen Betrachtung aller Studien von 91,4% bzw. 84,5%.

Zwei Arbeiten, in denen ebenfalls Vergleiche zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen angestellt worden waren, wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt. In ihnen wurden Vergleiche bzgl. der molekularen Subtypen nach der St. Gallen-Klassifikation (Luminal A, Luminal B, Her-2/neu positiv [ER/PR negativ], Triple-negativ; siehe Goldhirsch et al. 2013) vorgenommen, so dass Berechnungen von Konkordanzen nicht uneingeschränkt möglich sind (Falck et al. 2013, Mandó et al. 2017).

Eine wesentliche und in der Literatur bislang nicht im größeren Maße beachtete Frage ist in diesem Zusammenhang, ob die Diskordanzen der Hormonrezeptor-Expression ausschließlich oder überwiegend „in einer Richtung“ vorkommen. d.h. ob beispielsweise Expressionsverluste oder -zugewinne bei Lymphknotenmetastasierung die Regel sind. Zahlen hierzu liegen aus verschiedenen Publikationen zwar vor. Es finden sich aber unseres Wissens bislang keine systematischen Zusammenstellungen wie die im Folgenden vorgelegten. Die entsprechenden Angaben in den Tabellen 4.4 und 4.5 beziehen sich dabei zum Teil auf weniger Literaturquellen als in Tabelle 4.1, da nicht in allen Arbeiten eine Aufschlüsselung der diskrepanten Fälle erfolgt ist. In einer der Publikationen ließen sich für ER die Zahlenangaben zu diesem Teilaspekt nicht nachvollziehen (van Agthoven et al. 1995).

Tab. 4.4: Übereinstimmungen zwischen Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen für den Östrogenrezeptor (ER), aufgeschlüsselt nach dem Ergebnis des Primärtumors. Diskordanz = Prozentsatz der abweichenden Einstufungen von der Gesamtzahl der Fälle; Beispiel ER-positive Primärtumoren bei Andersen 1988: $7,4\% = 2 / (25 + 2)$

Autor / Jahr	Primärtumor positiv - Lymphknotenmetastase:			Primärtumor negativ - Lymphknotenmetastase:		
	positiv	negativ	Diskor- danz	positiv	negativ	Diskor- danz
ER						
Andersen 1988	25	2	7,4%	0	12	0%
Kamby 1989	9	3	25,0%	0	17	0%
Mori 1991	12	0	0%	0	7	0%
Nedergaard 1995	37	18	32,7%	3	43	6,5%
Tsutsui 2002	47	13	21,7%	7	37	15,9%
Iguchi 2003	20	15	42,9%	6	46	11,5%
de la Haba Rodríguez 2004	39	2	4,9%	2	17	10,5%
Dikicioglu 2005	9	4	30,8%	0	9	0%
Aitken 2009	75	35	31,8%	20	64	23,8%
Azam 2009	25	3	10,7%	0	72	0%
Strien 2010	38	3	7,3%	4	11	26,7%
Jensen 2012	38	1	2,6%	1	10	9,1%
Ataseven 2013	89	0	0%	3	25	10,7%
Tawfik 2013	50	3	5,7%	2	35	5,4%
Georgescu 2017	46	19	29,2%	11	2	84,6%
Kinoe 2018	30	23	43,4%	7	44	13,7%
Khande 2020	23	4	14,8%	2	31	6,1%
Kuncman 2021	34	3	8,1%	6	6	50,0%
Janeva 2023	85	1	1,2%	0	8	0%
Eigene Daten 2023	17	2	10,5%	1	15	6,3%
Gesamt	748	154	17,1%	75	511	12,8%

Tab. 4.5: Übereinstimmungen zwischen Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen für den Progesteronrezeptor (PR), aufgeschlüsselt nach dem Ergebnis des Primärtumors. Diskordanz = Prozentsatz der abweichenden Einstufungen von der Gesamtzahl der Fälle; Beispiel PR-positive Primärtumoren bei van Agthoven 1995: 6,3% = 1 / (15 + 1)

Autor / Jahr	Primärtumor positiv - Lymphknotenmetastase			Primärtumor negativ - Lymphknotenmetastase		
	positiv	negativ	Diskordanz	positiv	negativ	Diskordanz
PR						
van Agthoven 1995	15	1	6,3%	1	9	10,0%
Tsutsui 2002	33	13	28,3%	9	49	15,6%
de la Haba Rodríguez 2004	30	8	21,1%	1	21	4,5%
Dikicioglu 2005	9	4	30,8%	0	9	0%
Aitken 2009	52	28	35,0%	17	95	15,2%
Azam 2009	22	6	21,4%	0	72	0%
Strien 2010	20	9	31,0%	0	27	0%
Ataseven 2013	82	3	3,5%	1	30	3,2%
Tawfik 2013	28	8	22,2%	4	49	7,5%
Georgescu 2017	38	22	36,7%	12	6	66,7%
Kinoe 2018	25	28	52,8%	5	46	9,8%
Khande 2020	13	5	27,8%	1	41	2,4%
Kuncman 2021	15	3	16,7%	7	19	26,9%
Janeva 2023	67	7	9,5%	3	17	15,0%
Eigene Daten 2023	10	3	23,1%	2	20	9,1%
Gesamt	459	148	24,4%	63	510	11,0%

In den Tabellen 4.6 und 4.7 werden die Ergebnisse der Tabellen gleichartig wie oben in den Tabellen 4.2 und 4.3 noch einmal mit den verschiedenen Verfahren zur Angabe von Diskordanzwerten wiedergegeben.

Tab. 4.6: Diskordanzwerte der ER-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, aufgeteilt nach Zugewinn bzw. Verlust der Expression in den Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die summierten Fallzahlen bzw. die einzelnen Werte von 19 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
ER				
Primärtumor + LK-Metastase -	18,8%	0% - 43,4%	17,3%	10,7%
Primärtumor - LK-Metastase +	13,0%	0% - 84,6%	14,8%	9,1%
gemeinsam	16,4%	0% - 84,6%	16,1%	10,5%

Tab. 4.7: Diskordanzwerte der PR-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, aufgeteilt nach Zugewinn bzw. Verlust der Expression in den Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die summierten Fallzahlen bzw. die einzelnen Werte von 14 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
PR				
Primärtumor + LK-Metastase -	26,5%	3,5% - 52,8%	25,5%	25,5%
Primärtumor - LK-Metastase +	10,8%	0% - 66,7%	12,2%	8,3%
gemeinsam	18,5%	0% - 66,7%	18,8%	16,2%

Betrachtet man die Mittelwerte und die Ergebnisse für die summierten Fälle aller Studien für ER und PR, so erkennt man, dass die Werte für ER wesentlich weniger auseinanderliegen als für PR und sich nur 13,0% und 18,8% bewegen. Die Mediane sind beide Vergleiche mit 10,7% und 9,1% noch sehr ähnlich. Es kamen also insgesamt vergleichbar viele Fälle vor, in denen bei ER-positivem Primärtumor eine ER-negative synchrone Lymphknotenmetastase vorlag, wie umgekehrt. Bei PR sieht es anders aus. Alle Kennwerte zeigen hier einen deutlichen Unterschied an: Ein Verlust der PR-Expression in der Lymphknoten-

metastase ist mit bezogen auf alle Kennwerte ca. 25% der Fälle deutlich häufiger als ein Zugewinn der PR-Expression in ca. 16% bis 19% der Fälle. Auch unsere Daten unterstützen diese Aussage klar. In einem Review aus den Niederlanden über 39 Studien aus dem Jahr 2018, von denen einige auch in unserer Aufstellung enthalten sind, wurden vergleichbare Werte berichtet (Schrijver et al. 2018). Bezogen auf einen Schwellenwert von 10% ergab sich für ER ein Rezeptorverlust in Lymphknotenmetastasen positiver Primärtumoren in 23,9% der Fälle und ein Zugewinn im umgekehrten Fall von 17,3%. Für PR lagen die entsprechenden gleichartigen Werte bei 47,0% bzw. bei 16,6%, so dass sich übereinstimmend hier größere Unterschiede darstellten.

Untersuchungen zur heute früheren biochemischen DCC-Methode ("*dextran-coated charcoal*") zur Hormonrezeptorbestimmung ("ER-DCC", "PR-DCC") sollen hier nur cursorisch referiert werden. Dabei soll insbesondere auf einen Review aus dem Jahr 1985 verwiesen werden (Hähnel und Twaddle 1985), der unter verschiedenen Aspekten von den Autoren selber erhobene Daten und Daten anderer Arbeitsgruppen für die ER-DCC-Bestimmung zusammenfasst. Ein Vergleich zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen wird zwar nicht angeboten, wohl aber einer zwischen Primärtumoren und synchronen Absiedlungen im Allgemeinen, wobei dann (häufige) Lymphknotenmetastasen gemeinsam mit (seltenen) anderen Metastasen, z.B. Hautmetastasen, betrachtet werden². Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass in der überwältigenden Mehrheit der Fälle ("*overwhelming*") rein qualitativ (ja / nein) ein identischer ER-Status vorläge; die Konkordanz wurde von ihnen für 20 Arbeiten und insgesamt 516 Fälle mit 82% errechnet. Ähnliche Daten ergaben sich auch in einer späteren Arbeit aus dem Jahr 1989 mit 81,1% (30/37) für ER-DCC und von 81,1% (30/37) für PR-DCC (Butler et al. 1989). In der Krankenversorgung haben die DCC-basierten Methoden an Lymphknotenmetastasen allerdings nie eine Rolle gespielt, wohl wegen des unter

² In welchem Verhältnis Lymphknotenmetastasen und andere synchrone Metastasen zueinander stehen, lässt sich nicht ableiten. Da aber die bioptische Sicherung von Fernmetastasen in den 80er Jahren nicht üblich war, dürfte es sich in der großen Mehrzahl der Fälle um Lymphknotenmetastasen handeln. Im Krankengut von Hähnel und Twaddle selber waren es 12 von 14 Fällen (85,7%).

Routinebedingungen zu großen Aufwandes, auch Lymphknotenmetastasen unfixiert und unter Einhaltung einer Kühlkette zu präparieren. Nach Einführung der Immunhistochemie wurden die DCC-basierten Bestimmungen schnell verlassen, in erster Linie sicher aufgrund der besseren Praktikabilität der Immunhistochemie. Außerdem ließ sich auch zeigen, dass die mit beiden Anwendungen erhaltenen Aussagen zum Rezeptorstatus hoch korreliert waren. Dieses wurde für ER schon in der Anfangsphase der Immunhistochemie in einem Review belegt, in dem 1168 Fälle aus 16 Studien zusammengefasst sind; der Mittelwert für die Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden lässt sich aus den Einzeldaten mit 85,7% berechnen (Andersen et al. 1988). Entsprechende Werte wurden auch in späteren Arbeiten bestätigt, insbesondere in einer großen, mehr als 500 Fälle umfassenden Arbeit mit 85,5% für ER (496/580) und 82,2% für PR (439/534) (Kyndi et al. 2008). Andererseits ist zu bedenken, dass die prognostischen Aussagen beider Methoden am Primärtumor nicht deckungsgleich, sondern komplementär sind und sich somit ergänzen (Biesterfeld et al. 1997).

4.3.2 Her-2/neu

Untersuchungsergebnisse zum Her-2/neu-Status in Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen sind in Tab. 4.8 wiedergegeben.

Tab. 4.8 (Anfang): Übereinstimmung des Her-2/neu-Status in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen

CISH + = nur per CISH als Gen-amplifiziert identifizierte Proben des DAKO-Scores 2+ wurden als positiv akzeptiert; CISH-negative gelten als negativ.

Autor / Jahr	DAKO-Score der positiven Proben	Konkordanz Her-2/neu	
		Fälle	%
Konventionelle Histologie			
Masood 2000	2+ / 3+	56/56	100%
Carlsson 2004	2+ (CISH +) und 3+	47/47	100%
d'Andrea 2007	2+ / 3+	73/76	96,1%
Santinelli 2008	2+ / 3+	42/45	93,3%
Azam 2009	2+ / 3+	95/100	95,0%
Falck 2013	2+ / 3+	84/85	98,8%

Tab. 4.8 (Fortsetzung und Ende): Übereinstimmung des Her-2/neu-Status in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen

CISH += nur per CISH als Gen-amplifiziert identifizierte Proben des DAKO-Scores 2+ wurden als positiv akzeptiert; CISH-negative gelten als negativ.

Autor / Jahr	DAKO-Score der positiven Proben	Konkordanz Her-2/neu	
		Fälle	%
Konventionelle Histologie			
Tawfik 2013	2+ / 3+	13/19	68,4%
Ieni 2014	2+ (CISH +) und 3+	141/148	95,3%
Georgescu 2017	2+ (CISH +) und 3+	31/40	77,5%
Mandó 2017	3+	108/118	91,5%
Kinoe 2018	2+ (CISH +) und 3+	90/104	86,5%
Khande 2020	2+ / 3+	57/60	95,0%
Janeva 2023	2+ / 3+	90/94	95,7%
Gesamt		928/992	93,5%
TMA			
Simon 2001	2+ / 3+	110/114	96,5%
Aitken 2009	2+ / 3+	173/190	91,1%
Falck 2010	3+	101/104	97,1%
Jensen 2012	2+ (CISH +) und 3+	52/52	100%
Ataseven 2013	2+ / 3+	113/117	96,6%
Kuncman 2021	3+	31/31	100%
Eigene Daten 2023	2+ / 3+	29/35	82,9%
Gesamt		704/743	94,8%
Konventionelle Histologie und TMA			
Gesamt		1632/1735	94,1%

Unsere eigenen Daten, die hier am unteren Ende der in der Literatur dargestellten Werte liegen, gehen auf eine Zuordnung der als 2+ oder 3+ beurteilten Gewebeproben als positiv zurück, wobei Ergebnisse einer in-situ-Hybridisierung (CISH, FISH) nicht vorlagen. Andere Gruppen nahmen nur per CISH als Gen-

amplifiziert bestätigte Fälle, die als 2+ beurteilt worden waren, als positiv auf. Wiederum andere akzeptierten nur als 3+ bewertete Proben als positiv. Unabhängig von den jeweiligen Festlegungen der einzelnen Studien, ab wo eine Gewebeprobe als positiv zu gelten hat, ergaben sich aber sehr hohe mittlere Übereinstimmungswerte von 93% und höher. Insbesondere die Medianwerte liegen allesamt bei 95% und höher.

In Tabelle 4.9 sind die entsprechenden Werte tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 4.9: Konkordanzwerte der Her-2/neu-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die Fallzahlen bzw. die einzelnen Konkordanzwerte von 20 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
Her-2/neu				
Konventionelle Histologie	93,5%	68,4% - 100%	91,8%	95,0%
TMA	94,8%	82,9% - 100%	94,9%	96,6%
gemeinsam	94,1%	68,4% - 100%	92,9%	95,2%

Eine wichtige methodische frühe TMA-basierte Arbeit aus Basel, die bereits mit dem DAKO-Score arbeitete, konnte aus methodischen und inhaltlichen Gründen nur teilweise berücksichtigt werden (Simon et al. 2001). Hier wurden von 125 Primärtumoren mit jeweils drei Lymphknotenmetastasen, insgesamt also 375, jeweils vier Stenzen pro Gewebematerial untersucht, so dass pro Primärtumor vier Stenzen und pro Fall 16 Stenzen vorlagen. Diese Vielfalt an 2000 Einzelbeobachtungen macht methodische Probleme dabei, zu entscheiden, welcher Primärtumor und welche Lymphknotenmetastase als „positiv“ oder „negativ“ zu klassifizieren ist, da nicht in allen Fällen alle 16 Beobachtungen das gleiche Ergebnis erbracht hatten. Insgesamt waren 110 Fälle (88,0% von 125) 16-mal einheitlich beurteilt, davon 24 als positiv (19,2%) und 86 als negativ

(68,8%). Vierfach positive Primärtumoren, die in den Lymphknotenmetastasen 12-fach negativ waren, traten in zwei Fällen auf (1,6%), der umgekehrte Fall von vierfach negativen Primärtumoren mit 12-facher Positivität in den Lymphknotenmetastasen ebenfalls in 2 Fällen (1,6%). Die übrigen 11 Fälle (8,8%) zeigten viele verschiedene wechselnde Expressionsmuster. Neben den methodischen Schwierigkeiten, die Ergebnisse zu interpretieren, gibt es aber gegen die Färbemuster auch inhaltlich Einwände. An allen Gewebeproben wurde zusätzlich per FISH auf eine Genamplifikation untersucht, für die ja die Immunhistochemie ein Surrogatmarker sein soll. Die Amplifikationsraten für Proben mit Score 0 (3,5%) und mit Score 3+ (99,5%) sind glaubhaft, die für Score 1+ (66,2%) und Score 2+ (97,1%) sind aber viel höher als in der Literatur in einer Meta-Analyse von Bahreini et al. (2014) mit ca. 3,4% bzw. 29,2% angegeben, so dass hier inhaltliche Fragezeichen bleiben.

Andere Arbeiten kamen wegen ihrer Auswertemodi nicht in Betracht.

In einer Studie wurde Her-2/neu als negativ, heterogen positiv oder homogen positiv definiert (Tsutsui et al. 2001), in anderen wurde starke Positivität angenommen, wenn mehr als 50% bzw. mehr als 70% der Tumorzellen angefärbt waren (de la Haba Rodríguez et al. 2004, Xu et al. 2002). In einer weiteren Arbeit waren die Auswertungen quantitativ, d.h. durch Auszählung der Zellen vorgenommen worden (Dikicioglu et al. 2005). In der Arbeit von Strien et al. (2010) wurde zwar eine Her-2/neu-Immunhistochemie durchgeführt, die Konkordanzdaten zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen beziehen sich aber rein auf CISH-Ergebnisse, die denen in Tabelle 4.9 gleichen (61/65, 93,9%).

Wie sich die Veränderungen in der Her-2/neu-Expression bzgl. Zugewinnen bzw. Verlusten zwischen Primärtumor und Metastasen darstellen, ist in Tabelle 4.10 wiedergegeben.

Tab. 4.10: Übereinstimmungen zwischen Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen für Her-2/neu, aufgeschlüsselt nach dem Ergebnis des Primärtumors. Diskordanz = Prozentsatz der abweichenden Einstufungen von der Gesamtzahl der Fälle; Beispiel Her-2neu-positive Primärtumoren bei Simon 2001: $7,7\% = 2 / (24 + 2)$

Autor / Jahr	Primärtumor positiv - Lymphknotenmetastase:			Primärtumor negativ - Lymphknotenmetastase:		
	positiv	negativ	Diskor- danz	positiv	negativ	Diskor- danz
Her-2/neu						
Masood 2000	18	0	0%	0	38	0%
Simon 2001	24	2	7,7%	2	86	2,3%
Carlsson 2004	21	0	0%	0	26	0%
Santinelli 2008	21	2	8,7%	1	21	4,5%
Aitken 2009	25	3	12,0%	14	148	8,6%
Azam 2009	42	2	4,5%	3	53	5,4%
Falck 2010	17	0	0%	3	84	3,4%
Jensen 2012	7	0	0%	0	45	0%
Ataseven 2013	26	1	3,7%	3	87	3,3%
Falck 2013	10	0	0%	1	74	1,4%
Tawfik 2013	3	0	0%	6	10	37,5%
Ieni 2014	52	4	7,1%	3	89	3,3%
Georgescu 2017	2	9	81,8%	1	29	3,3%
Mandó 2017	11	4	26,7%	5	98	4,9%
Kinoe 2018	16	13	44,8%	1	74	1,4%
Khande 2020	21	3	12,5%	0	36	0%
Kuncman 2021	27	0	0%	0	4	0%
Janeva 2023	6	4	40,0%	0	84	0%
Eigene Daten 2023	5	0	0%	6	24	20,0%
Gesamt	354	47	11,7%	56	1110	4,8%

In der Tabelle 4.11 werden die statistischen Kennwerte aller Studien noch einmal kurz zusammengefasst.

Tab. 4.11: Diskordanzwerte der Her-2/neu-Expression in Mammakarzinomen und synchronen Lymphknotenmetastasen, aufgeteilt nach Zugewinn bzw. Verlust der Expression in den Lymphknotenmetastasen, bezogen auf die summierten Fallzahlen bzw. die einzelnen Werte von 19 Studien

Untergruppe	Summierte Fälle aller Studien	Werte der einzelnen Studien		
		Range	Mittelwert	Median
Her-2/neu				
Primärtumor + LK-Metastase -	11,7%	0% - 81,8%	13,1%	4,5%
Primärtumor - LK-Metastase +	4,8%	0% - 37,5%	5,2%	3,3%
gemeinsam	6,6%	0% - 81,8%	9,2%	3,3%

4.3.3 Klinische Überlegungen zur Markerexpression in synchronen Lymphknotenmetastasen bei Mammakarzinomen

Fasst man die Ergebnisse der Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 anhand der Daten der Tabellen 4.6, 4.7 und 4.11 zusammen, so fällt zum einen die Heterogenität der Daten, bezogen auf die jeweiligen Werte für den Range, auf. Diese macht die Vergleichbarkeit der Daten in gewisser Weise schwierig. Dennoch lassen sich bei insgesamt recht hoher Gesamtfallzahl durchaus klinische Schlüsse ziehen.

- Bezogen auf den Median ist in ca. 10% der Fälle bei ER mit einer Diskordanz zwischen Primärtumor und synchroner Lymphknotenmetastase zu rechnen (10,5%), und zwar sowohl in Richtung Verlust der ER-Expression in der Metastase (10,7%), als auch in Richtung Zugewinn (9,1%) (Tab. 4.6).
- Für PR betrug der Median bezogen auf alle Fälle 16,2%, wobei Verluste der PR-Expression mit 25,5% etwa dreimal so häufig vorkamen wie Zugewinne mit 8,3% (Tab. 4.7).

- Bei Her-2/neu wiederum lag der Median mit 3,3% deutlich niedriger, wobei auch hier Verluste der Her-2/neu-Expression mit 7,1% gerundet etwa doppelt so oft anzunehmen sind wie Zugewinne mit 3,3% (Tab. 4.11).

Auch wenn man die Schwankungen zumindest teilweise durch methodischen Bias, Selektion von Fällen oder die verschiedenen Schwellenwerte für die Festlegung von „positiv“ oder „negativ“ begründen kann, bleiben am Ende dennoch klare Unterschiede bestehen. Letztendlich muss man auf der Basis der Mediane für alle Fälle bei jeder 10. (ER), 6. (PR) bzw. 33. (Her-2/neu) Patientin mit einem abweichenden Ergebnis in der synchronen Lymphknotenmetastase rechnen. Macht man sich vor dem geistigen Auge klar, dass neuerdings für Her-2/neu die Einteilung als „positiv“ oder „negativ“ nicht mehr genügt, sondern noch die Kategorie „Her-2/neu low“ hinzukommt (Modi et al. 2022), so werden auch die Abweichungen für Her-2/neu in Zukunft deutlich mehr Patientinnen betreffen. Und da man nicht weiß bzw. wissen kann, welche der Patientinnen die 6., 10. oder 33. etc. ist, wird man im Grunde bei allen synchron nodal metastasierten Fällen auch über eine Untersuchung einer oder mehrerer Lymphknotenmetastasen zumindest nachdenken müssen. Legt man das in der Medizin übliche *Nil nocere*-Prinzip zugrunde, müsste dieses zumindest für die Fälle gelten, bei denen der Primärtumor negativ ist und somit einer Patientin ein therapeutischer Weg nach heutiger Therapieplanung verschlossen bliebe.

In diesem Zusammenhang soll auch auf die Unterschiede innerhalb mehrerer Lymphknotenmetastasen eingegangen werden, die bisher nur selten untersucht worden sind. Legt man das in der Literatur üblicherweise gewählte Kriterium für Positivität für ER bzw. PR, nämlich eine Expression in $> 10\%$ der Tumorzellen, zugrunde, so ergibt sich für ER eine Konkordanz zwischen Primärtumor und allen sechs Lymphknotenmetastasen von 80% und für PR von 100%. Für Her-2/neu waren 70% der Fälle bei einer Annahme von Positivität ab Score 2 konkordant. Die Verlässlichkeit der Bestimmungen ist somit in der Marge der Abweichungen, die auch bei anderen Vergleichen gefunden werden.

4.4 Ergänzende Aspekte

Im Folgenden sollen einzelne Sonderaspekte exemplarisch angesprochen werden, die über den in Kapitel 4.3 diskutierten Vergleich der Markerexpressionen an Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen hinausgehen.

Vergleichbarkeit von Ergebnissen an konventionellen Schnitten und an TMAs

In unserer Studie wurden alle Ergebnisse rein an TMAs erhoben, also an sehr kleinen, aber möglichst repräsentativen Abschnitten des Tumorgewebes, nicht aber an konventionellen Schnitten, die eine größere Gewebsfläche und damit auch eine größere Tumorfläche abdecken. In der in Kapitel 4.3 zitierten Literatur werden solche Vergleiche ebenfalls nicht angestellt, sondern im Grunde die Vergleichbarkeit vorausgesetzt.

Diese ergibt sich aus unterschiedlich großen, zum Teil > 200 Patientinnen umfassenden Studien verschiedener Arbeitsgruppen an Primärtumoren, bei denen sich Konkordanzwerte für ER zwischen 72,9% und 97,3%, für PR zwischen 69,5% und 96,4% und für Her-2/neu zwischen 85,6% und 100% ergaben (Torhorst et al. 2001, Zhang et al. 2003, Bhargava et al. 2004, Selvarajan et al. 2006, Henriksen et al. 2007, Thomson et al. 2010, Chavan et al. 2017). Soweit Werte für Cohen's Kappa angegeben wurden, bewegten sich diese um Werte zwischen $\kappa = 0,65$ und $\kappa = 0,85$, also im Bereich guter Übereinstimmungen („*substantial*“). Nicht durchgehend, aber im Trend lagen die Werte für PR dabei etwas unterhalb derer von ER, was eine gewisse Inhomogenität in der PR-Expression anzeigen könnte. Insgesamt aber können offenbar TMA-Resultate für ER, PR und Her-2/neu als ebenso verlässlich gelten wie diejenigen, die an konventionellen Schnitten gewonnen wurden.

Die Zahl ausgewerteter Stenzen beeinflusst das Endergebnis nicht; jedenfalls zeigten sich im Vergleich von zwei, drei oder vier Stanzzyindern mit den konventionellen Schnitten nur marginale, nichts signifikante Unterschiede in der

Konkordanz mit Dimensionen von ca. einem bis eineinhalb Prozentpunkten (Thomson et al. 2009).

Staining Intensity (SI), Remmele-Score und Reiner-Score bei ER und PR

Die Betrachtungen des Kapitels 4.3 gründen sich für ER und PR ausschließlich auf den ER-PP bzw. den PR-PP. Der jeweilige SI und die hieraus abgeleiteten Scores, insbesondere der Remmele-Score, blieben außen vor, weil sie zwar in Deutschland (Remmele-Score) gebräuchlich bzw. im deutschsprachigen Raum (Reiner-Score) entwickelt worden sind, aber international keine Verbreitung gefunden haben. Entsprechend wurde auch darauf verzichtet, ihre Ergebnisse weiter zu interpretieren; die Auswertung dient hier letztendlich vorwiegend der Dokumentation. Der immer wieder geäußerte wissenschaftliche Verdacht, PP und SI seien untereinander hoch korreliert, trägt sicher auch dazu bei, dass zusammengesetzte Scores (auch der international zeitweise verwendete Allred-Score) in wissenschaftlichen Untersuchungen kaum verwendet werden.

Änderung der Markerexpressionen unter neoadjuvanter Chemotherapie

Die Neubestimmung von ER, PR und Her-2/neu nach neoadjuvanter Chemotherapie ist heute allgemein als obligat anerkannt. Die Ergebnisse von Studien, die die Markerexpression an der prätherapeutischen Stanze mit der des posttherapeutischen Residualtumors verglichen haben, zeigen ähnlich wie die oben besprochenen Vergleiche zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen ein heterogenes Bild³.

Mit Stand 2011 wurde ein größerer Review zu diesem Thema vorgelegt (van de Ven et al. 2011). Die dort angegebenen Zahlen für eine Änderung der Marker-

³ Sowohl in Kapitel 3.3, als auch hier in Kapitel 3.4 konnte eine größere, 211 (ER, PR) bzw. 205 (Her-2/neu) Vergleiche von Primärtumoren und simultanen Lymphknotenmetastasen umfassende aktuelle Arbeit aus Leipzig (Weydandt et al. 2022) nicht berücksichtigt werden. In ihr sind sowohl unbehandelte (69%), als auch neoadjuvant vorbehandelte (31%) Fälle zusammengefasst, ohne dass die Daten der beiden Untergruppen separat dargestellt worden wären. Die Konkordanzwerte für beide Untergruppen zusammen insgesamt lagen jeweils im oberen Bereich (ER: 92,9%, PR: 73,0%, Her-2/neu: 87,3%).

expression bewegen sich für ER zwischen "no significant difference" über 2,5% bis hin zu 46%, für PR zwischen 5,9% und 58%, jeweils bezogen auf 13 Arbeiten. Für Her-2/neu, für das fünf Arbeiten vorliegen, werden Werte zwischen 5,7% und 32% angegeben. Was die Frage nach Zugewinn oder Verlust der jeweiligen Eigenschaft betrifft, so werden für alle drei Marker sowohl Trends zum Zugewinn als auch zum Verlust sowie Arbeiten berichtet, in denen beide Effekte etwa gleich häufig waren. Eine klare Richtung war somit mit Stand 2011 wohl weder bezüglich der Zahl von Fällen, in denen sich das Expressionsmuster eines oder mehrerer Marker wandelt, erkennbar, noch bezüglich der Frage, ob bei einer neoadjuvanten Chemotherapie ER, PR oder Her-2/neu zuzurechnende Eigenschaften einen Vorteil oder einen Nachteil für die Überlebensfähigkeit von Tumorzellen bedeuten. Eine große neuere Arbeit aus dem Jahr 2020 (Ding et al. 2020) bestätigt die von van de Ven reviewartig zusammengestellten Befunde insofern, als auch dort Diskordanzen im Rahmen der vorgeschriebenen Margen ermittelt wurden: Bezogen auf 482 Fälle betrug die Diskordanz nach neoadjuvanter Chemotherapie 10,4% für ER und 17,0% für PR; für beide Marker war die Zahl der Fälle mit Expressionsverlust gegenüber denen mit Expressionsgewinn deutlich höher (ER: 36 vs. 14, PR: 52 vs. 27). Beide Diskordanzarten waren bei ER prognostisch ungünstig; für PR bedeutete ein Expressionsnachweis im Resektat eine Verbesserung der Prognose. Her-2/neu wurde in der Arbeit nicht berücksichtigt.

Ein grundsätzliches Problem ist bei dieser Betrachtung, dass nur Fälle erfasst werden können, bei denen eine Indikation für eine neoadjuvante Therapie bestand; es ist somit anzunehmen, dass die Studien mit größeren bzw. klinisch-prognostisch ungünstigeren Tumoren „angereichert“ waren. Außerdem beschränken sich die Ergebnisse naturgemäß nur auf diejenigen Fälle, in denen es nicht zu einer Komplettremission gekommen ist.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen und den Zahlen aus Literatur erscheint insgesamt fraglich, ob hinter den Expressionsänderung nach einer neoadjuvanten Therapie ein tumorbiologisch begründbarer Effekt steht, also eine echte Rezeptorkonversion. Wenn die Veränderungen sich nicht signifikant von denen unterscheiden, die zwischen nicht vorbehandelten Primärtumoren und

ihren synchronen Lymphknotenmetastasen bestehen, spricht dieses für ein Spektrum von Veränderungen, das einfach biologisch vorhanden ist. Davon, dass die neoadjuvante Chemotherapie die Markerexpressionen kausal beeinflusst, kann dann jedenfalls wohl nicht gesprochen werden.

Änderungen der Her-2/neu-Expression unter Trastuzumab-Therapie

Der Antikörper Trastuzumab (Herzeptin) ist das Medikament, das traditionell bei Her-2/neu-positiven Fällen therapeutisch eingesetzt wurde; inzwischen sind auch andere ähnlich gebaute Antikörper auf dem Markt. Im Jahr 2014 wurde eine TMA-basierte Arbeit veröffentlicht, die sich gezielt mit dem Verlust einer Her-2/neu-Expression primär Her-2/neu-positiver Mammakarzinome unter bzw. nach Trastuzumab-Therapie befasste (van Rooijen et al. 2014). Von 169 Fällen, für die klinische Daten zur Verfügung standen, zeigten 21 einen Verlust der Her-2/neu-Expression (12,4%); diese Patientinnen zeigten einen über sieben Jahre verfolgbar schlechten prognostischen Verlauf, wobei die Unterschiede aber (noch) nicht statistisch signifikant waren ($p > 0,05$). Aus der veröffentlichten Kaplan-Meier-Kurve lässt sich allerdings ein medianes Überleben von ca. 30 Monaten für die Her-2/neu-positive Gruppe gegenüber ca. 18 Monaten für die Her-2/neu-negative Gruppe ableiten. Außerdem wurden Übereinstimmungen zwischen der primären Auswertung der Her-2/neu-Bestimmung zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors mit der Re-Evaluation im Rahmen der Studie verglichen; die Konkordanz betrug hier 87,8% und unterschied sich nicht zwischen Bestimmungen an einer Stanzbiopsie (90,9%) bzw. am Resektat (86,7%).

Änderung der Markerexpression bei Rezidiven bzw. Fernmetastasen

Eine detaillierte Diskussion von Vergleichen zwischen Markerexpressionen zwischen Primärtumor und Rezidiven / metachronen Fernmetastasen kann in dieser Arbeit nicht erfolgen, obwohl es zu diesem Themenfeld diverse Einzelarbeiten gibt. Auf sie soll aber hier nur zusammenfassend eingegangen werden. Ein prinzipielles Problem bei diesen Vergleichen ist nämlich, dass sehr heterogene Patientengruppen präsentiert wurden und insbesondere zur

Zeitachse des Auftretens der erneuten Tumorherde und zur zuvor applizierten adjuvanten Therapie oft keine konkreten Angaben vorliegen. Hierdurch ist die Vergleichbarkeit der Studien begrenzt.

Die Ergebnisse der einzelnen Studien wurden verschiedentlich in Reviews zusammengefasst (Idrisinghe et al. 2010, Lindström et al. 2010, Bogina et al. 2011, Khasraw et al. 2011, Aurilio et al. 2014, Rossi et al. 2015), die jeweils zwischen etwa 10 und über 30 Arbeiten berücksichtigen. Fasst man alle Daten zusammen, so darf man bei Rezidiven oder metachronen Fernmetastasen im Vergleich zum Primärtumor mit einer Konkordanz für ER von ca. 75%-80% rechnen, für PR von ca. 60%-70% und für Her-2/neu von ca. 90%-95%. Die einzelnen Studien zeigen dabei aber sehr starke Schwankungsbreiten von Konkordanzen, die für ER und PR zwischen nur 40% und 100% und für Her-2/neu 80% bis 100% reichen.

Von besonderer Bedeutung für unsere Fragestellung, in welche Richtung eine Veränderung der Markerexpression geht, ist dabei die Arbeit von Aurilio et al. (2014), die sich speziell diesem Thema widmet (Tabelle 4.12).

Tab. 4.12: Übereinstimmungen zwischen Mammakarzinomen und Rezidiven bzw. metachronen Fernmetastasen für den Östrogenrezeptor (ER), den Progesteronrezeptor (PR) und Her-2/neu im Review von Aurilio et al. 2011, aufgeschlüsselt nach dem Ergebnis des Primärtumors. Diskordanz = Prozentsatz der abweichenden Einstufungen von der Gesamtzahl der Fälle; Beispiel ER-positive Primärtumoren: 22,4% = 496 / (1721 + 496). Diskordanz in Klammern = Angabe einer *pooled concordance* im Review nach *double arcsine transformation* der Daten nach Freeman und Tukey (1950).

Marker	Zahl der Studien	Primärtumor positiv - Rezidiv / Metastase			Primärtumor negativ - Rezidiv / Metastase		
		positiv	negativ	Diskordanz	positiv	negativ	Diskordanz
ER	26	1721	496	22,4% (24%)	216	1009	17,6% (14%)
PR	17	634	582	47,9% (46%)	143	823	14,8% (15%)
Her-2/neu	25	461	79	14,6% (13%)	100	1620	5,8% (5%)

Die Zahlen zeigen, dass die Diskordanz bei allen drei Markern in Richtung Expressionsverlust stärker ausgeprägt war. Dieser Unterschied war insbesondere für PR statistisch signifikant ($p < 0,0001$), aber auch für ER ($p = 0,0183$) und für Her-2/neu ($p = 0,0004$) (Aurilio et al. 2011).

4.5 Zusammenfassende Bewertung

Die hier vorgelegte Studie war ursprünglich als Teil einer Pilot-artigen Erprobung des TMA-Systems der Firma Zytomed am Beispiel von Mammakarzinomen angelegt gewesen, wobei sich das Gesamtprojekt insgesamt als nicht durchführbar erwies. Daraufhin wurde der Teil, der sich mit synchronen Lymphknotenmetastasen befasste, separat herausgelöst, obwohl sich die zu erhebenden methodischen Daten nur auf relativ wenige Fälle beziehen. Andererseits war es möglich, eine relativ große Zahl von bis zu sechs Lymphknotenmetastasen bzgl. der Expression von ER, PR und Her-2/neu mit dem Primärtumor zu vergleichen.

Die ursprüngliche klinische Fragestellung, ob es eine Art Gradienten in den Unterschieden der Markerexpressionen im Vergleich der Primärtumoren mit den synchronen Lymphknotenmetastasen gibt, wurde beibehalten. Diese Frage stand klinisch von vornherein im Vordergrund, da in den Leitlinien und in anderen Verfahrensvorgaben für die Behandlung von Mammakarzinomen hierzu keine Vorgaben gemacht wurden, aber auch nicht begründet wurde, weswegen die synchronen Lymphknotenmetastasen als ohne weiteren Wert sozusagen „stiefmütterlich“ behandelt wurden. Als die Arbeit konzipiert wurde, gab es hierzu noch wenige klinische Daten, die inzwischen in größerer Zahl vorliegen und in dieser Arbeit Review-artig aufgearbeitet wurden.

Diskordanz: Steigend im Rahmen der zeitlichen metastasierenden Tumorprogression

In Kapitel 4.3.3 war zusammenfassend gefolgert worden, dass zwischen Primärtumoren und den synchronen Lymphknotenmetastasen mit einer

Diskordanz von ca. 10% bei ER, von ca. 16% bei PR und mit etwas mehr als 3% bei Her-2/neu auszugehen ist.

In der neoadjuvanten Situation zeigte sich, wie in Kapitel 4.4 aus dem Review von van de Ven et al. (2011) ablesbar, keine stärkere Diskordanz als zwischen Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen.

Eine singuläre Arbeit zu Her-2/neu an mit dem Antikörper Trastuzumab (Herzeptin) vor der Tumorresektion vorbehandelten Patientinnen (van Rooijen et al. 2014) zeigte im Vergleich der prätherapeutischen und der posttherapeutischen Situation am Primärtumor eine Diskordanz von 12,4%, also höher als man es im Vergleich von unbehandelten Primärtumoren und synchronen Lymphknotenmetastasen im Mittel findet - andererseits liegen die 12,4% noch durchaus im Spektrum der von Arbeit zu Arbeit unterschiedlichen Schwankungsbreiten, könnten also auch Kollektiv-bedingt sein. Auffällig ist allerdings, dass ausschließlich Verluste der Her-2/neu-Expression vorkamen, was dann doch als therapeutischer Effekt im Sinne einer klonalen Selektion verstanden werden könnte. Hierfür spricht auch die oben bereits angesprochene, zumindest im Trend schlechtere Prognose der Patientinnen mit Expressionsverlust im 7-Jahre-Verlauf.

Für Rezidive und metachrone Fernmetastasen liegen die Diskordanzwerte gemäß den oben genannten sechs Reviews (Idrisinghe et al. 2010, Lindström et al. 2010, Bogina et al. 2011, Khasraw et al. 2011, Aurilio et al. 2014, Rossi et al. 2015) höher. Oben als Konkordanzwerte dargestellt, ergeben sich umgekehrt betrachtet Erwartungswerte für Diskordanz zum Primärtumor von 20%-25% für ER, von 30%-40% für PR und von 5%-10% für Her-2/neu. In der Gegenüberstellung zu den Daten für den Vergleich zwischen Primärtumor und synchronen Lymphknotenmetastasen mit Werten von ca. 10%, ca. 16% bzw. etwas mehr als 3% werden somit im Rezidiv-/Metastasierungsfall deutlich höhere Abweichungen in den Expressionen beschrieben.

Diskordanz: In beide Richtungen (Zugewinn / Verlust) möglich

Während der Verlust einer Markerexpression allgemein plausibel erscheint, wurde gerade klinischerseits früher einem Zugewinn nicht so recht Glauben geschenkt und manchmal in Konferenzen als eine Art „Messfehler“ nicht wesentlich beachtet. Deswegen war uns wichtig, hierzu eine Datenübersicht zu erstellen.

Diese zeigte, dass bereits in synchronen Lymphknotenmetastasen immer wieder Abweichungen der Markerexpressionen in beide Richtungen vorkommen können (Kurzform: Tabellen 4.6, 4.7 und 4.11). Dabei waren, hier bezogen auf den Median der Diskordanzen, für alle drei Marker Verluste der Expression in den Lymphknotenmetastasen (ER: 10,7%, PR: 25,5%, Her-2/neu: 7,1%) zwar häufiger als ein Zugewinn (ER: 9,1%, PR: 8,3%, Her-2/neu: 3,3%). Als exotische Rarität kann man aber die Prozentzahlen für Zugewinne sicherlich auch nicht einfach links liegenlassen, sondern muss sie bei den Planungen der Therapie und der Abschätzung der Prognose bedenken.

Für Rezidive und metachrone Fernmetastasen zeigt sich ein identischer Trend (Tab. 4.12), allerdings mit deutlich höheren Werten sowohl bei Expressionsverlusten (ER: 22,4%, PR: 47,9%, Her-2/neu: 14,6%), als auch bei den Zugewinnen der Expression (ER: 17,6%, PR: 14,8%, Her-2/neu: 5,8%).

Insgesamt lässt sich ableiten, dass schon im Rahmen der axillären Lymphknotenmetastasierung offenbar Mechanismen greifen, die man nicht nur im Rahmen der dem Tumorgewebe innewohnenden allgemeinen Heterogenität erklären kann. Der gewisse Überhang von Expressionsverlusten wäre nämlich auch bereits als Ausdruck einer progressiven klonalen Selektion zu deuten. In gewisser Weise setzt sich diese bei der späteren Bildung von lokoregionären Rezidiven bzw. der Fernmetastasierung sicher weiter fort. Ihr Anteil an den häufigeren Expressionsveränderungen ist aber nicht quantifizierbar, da die Proben nach postoperativer adjuvanter Therapie entnommen wurden und somit Therapie-bedingte Effekte berücksichtigt werden müssen. Interessant wäre hier ein Vergleich mit Tumoren,

die bereits zum Zeitpunkt der Tumordiagnose Fernmetastasen gezeigt hätten; an diesen wäre dann ohne vorherige medikamentöse Therapie ein Vergleich von Markerexpressionen am Primärtumor, an synchronen Lymphknotenmetastasen und an synchronen Fernmetastasen möglich. Leider ist nach bestem Wissen der Literatur bislang keine entsprechende Studie durchgeführt worden.

Die Quintessenz unserer Studie kann sicher nicht sein, eine ER-, PR- und Her-2/neu-Untersuchung jeder synchronen Lymphknotenmetastase bei Mammakarzinomen zu empfehlen. Sie kann aber das Bewusstsein stärken, dass der alleinige Blick auf den Primärtumor täuschen kann oder jedenfalls nicht in jedem Fall alles erklärt. Was man dann aus dieser Erkenntnis klinisch machen kann oder sollte, müsste im Dialog zwischen Pathologie und beteiligten klinischen Fächern überlegt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. van Agthoven T, Timmermans M, Dorssers LC, Henzen-Logmans SC. Expression of estrogen, progesterone and epidermal growth factor receptors in primary and metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 63: 790-793
2. Ai D, Yao J, Yang F, Huo L, Chen H, Lu W, Soto LMS, Jiang M, Raso MG, Wang S, Bell D, Liu J, Wang H, Tan D, Torres-Cabala C, Gan Q, Wu Y, Albarracin C, Hung MC, Meric-Bernstam F, Wistuba II, Prieto VG, Sahin AA, Ding Q: TRPS1: a highly sensitive and specific marker for breast carcinoma, especially for triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2021; 34: 710-719
3. Aitken SJ, Thomas JS, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D: Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann Oncol* 2010; 21:1254-1261
4. Andersen J, Ørntoft TF, Poulsen HS: Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors (ER) in formalin-fixed, paraffin-embedded human breast cancer tissue by use of a monoclonal antibody to ER. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 1553-1556
5. 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
6. Ataseven B, Gologan D, Gunesch A, Kehl V, Hoegel B, Beer M, Eiermann W: HER2/neu, topoisomerase 2a, estrogen and progesterone receptors: discordance between primary breast cancer and metastatic axillary lymph node in expression and amplification characteristics. *Breast Care (Basel)* 2012; 7: 465-470
7. Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, Bagnardi V, Viale G, Curigliano G, Adamoli L, Munzone E, Sciandivasci A, de Vita F, Goldhirsch A, Nolè F: A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014; 50: 277-289
8. Azam M, Qureshi A, Mansoor S: Comparison of estrogen receptors, progesterone receptors and HER-2/neu expression between primary and metastatic breast carcinoma. *J Pak Med Assoc* 2009; 59: 736-740
9. Bahreini F, Soltanian AR, Mehdipour P: A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2015; 22: 615-625

10. Balslev I, Axelsson CK, Zedeler K, Rasmussen BB, Carstensen B, Mouridsen HT: The Nottingham Prognostic Index applied to 9,149 patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 281-290
11. Battifora, H: The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986; 55: 244-248
12. Bauerfeind I (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.* W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017
13. Bhargava R, Lal P, Chen B: Feasibility of using tissue microarrays for the assessment of HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;13: 213-216
14. Biesterfeld S: *Zurverfügungstellung von urheberrechtlich geschützten Abbildungen aus dem Bestand des Funktionsbereichs Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 2015
15. 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
16. Biesterfeld S, Schröder W, Steinhagen G, Koch R, Veuskens U, Schmitz FJ, Handt S, Böcking A: Synchronous immunohistochemical and biochemical hormone receptor assessment in breast cancer provides complementary prognostic information. *Anticancer Res* 1997; 17: 4723-4730
17. Bogina G, Bortesi L, Marconi M, Venturini M, Lunardi G, Coati F, Massocco A, Manfrin E, Pegoraro C, Zamboni G: Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss. *Virch Arch* 2011; 459: 1-10
18. Butler JA, Trezona T, Vargas H, State D: Value of measuring hormone receptor levels of regional metastatic carcinoma of the breast. *Arch Surg* 1989; 124: 1131-1134
19. 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, Pagani 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* 2017; 28: 16-33

20. Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, Ostenstad B, Lundqvist H, Blomqvist C: HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer* 2004; 90: 2344-2348
21. Chavan SS, Ravindra S, Prasad MSN: Breast biomarkers - comparison on whole section and tissue microarray section. *J Clin Diagn Res* 2017, 11: EC40-EC44
22. DAKO 2014 (Zitierweise): DAKO Agilent Technologies (Hrsg.): Hercep test interpretation manual: breast cancer. Version 17.9.2014. Online unter https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf, zuletzt abgerufen am 30.8.2023
23. DKFZ 2021 (Zitierweise): Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft: Krebsinformationsdienst. Luminaler Brustkrebs: Was ist das eigentlich? Bedeutung molekularer Subtypen für die klinische Praxis. Online erhältlich über den aktuellen Link https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2021/fk13_was-ist-luminaler-brustkrebs.php, zuletzt abgerufen am 31.8.2023
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
25. 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; 15: e0231895
26. Falck AK, Ferno 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
27. Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Ferno M, Ryden L: Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 140: 93-104
28. Freeman MF, Tukey JW: Transformations related to the angular and the square root. *Ann Math Stat* 1950; 21: 607-611
29. Georgescu R, Boros M, Moncea D, Bauer O, Coros MF, Oprea A, Moldovan C, Podoleanu C, Stolnicu S. Discordance rate in estrogen receptor, progesterone receptor, HER2 status, and Ki67 index between primary unifocal and multiple homogenous breast carcinomas and synchronous axillary lymph node metastases have an impact on therapeutic decision. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018; 26: 533-538

30. Gokmen-Polar Y, Mehta R, Tuzmen S, Mousses S, Thorat MA, Sanders KL, Turbin D, Leung S, Huntsman DG, Sledge GW, Badve S: Differential subcellular expression of protein kinase C beta11 in breast cancer: correlation with breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124: 327-335
31. 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
32. 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
33. de la Haba-Rodríguez JR, Ruiz Borrego M, Gómez España A, Villar Pastor C, Japón MA, Travado P, Moreno Nogueira JA, López Rubio F, Aranda Aguilar E: Comparative study of the immunohistochemical phenotype in breast cancer and its lymph node metastatic location. *Cancer Invest* 2004; 22: 219-224
34. Hähnel R, Twaddle E: The relationship between estrogen receptors in primary and secondary breast carcinomas and in sequential primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5: 155-163
35. Henriksen KL, Rasmussen BB, Lykkesfeldt AE: Semi-quantitative scoring of potentially predictive markers for endocrine treatment of breast cancer: a comparison between whole sections and tissue microarrays. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 397-404
36. IARC 2020 (Zitierweise): International Agency for Research on Cancer: Breast Globocan 2020. Online abrufbar unter dem Link <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>, zuletzt abgerufen am 26.8.2023
37. Idirisinghe PKA, Thike AA, Cheek PY, Tse GM, Lui PC, Fook-Chong S, Wong SN, Tan PH: Hormone receptor and c-ERBB2 status in distant metastatic and locally recurrent breast cancer. Pathologic correlations and clinical significance. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 416-429
38. 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
39. Iguchi C, Nio Y, Itakura M. Heterogeneous expression of estrogen receptor between the primary tumor and the corresponding involved lymph nodes in patients with node-positive breast cancer and its implications in patient outcome. *J Surg Oncol* 2003; 83: 85-93

40. Janeva S, Parris TZ, Krabbe E, Sundquist M, Karlsson P, Audisio RA, Olofsson Bagge R, Kovács A: Clinical relevance of biomarker discordance between primary breast cancers and synchronous axillary lymph node metastases. *Clin Exp Metastasis* 2023; 40: 299-308
41. Jensen JD, Knoop A, Ewertz M, Laenkholm AV: ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 511-521
42. Kamby C, Rasmussen BB, Kristensen B. Oestrogen receptor status of primary breast carcinomas and their metastases. Relation to pattern of spread and survival after recurrence. *Br J Cancer* 1989; 60: 252-257
43. Kinoe H, Yamanouchi K, Kuba S, Morita M, Sakimura C, Kanetaka K, Takatsuki M, Abe K, Yano H, Matsumoto M, Otsubo R, Hayashida N, Nagayasu T, Eguchi S: Discordance of hormone receptor, human epidermal growth factor receptor-2, and Ki-67 between primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastasis. *J BUON* 2018; 23: 60-66
44. Khande TA, Joshi AR, Khandeparkar SGS, Kulkarni MM, Gogate BP, Kakade AR, Sahu PD, Khillare CD: Study of ER, PR, HER2/neu, p53, and Ki67 expression in primary breast carcinomas and synchronous metastatic axillary lymph nodes. *Indian J Cancer* 2020; 57: 190-197
45. 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
46. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-847
47. 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*
48. Kuncman W, Orzechowska M, Kuncman Ł, Kordek R, Taran K: Intertumoral heterogeneity of primary breast tumors and synchronous axillary lymph node metastases reflected in IHC-assessed expression of routine and nonstandard biomarkers. *Front Oncol* 2021; 11: 660318
49. Li L, Yu C, Gao H, Li Y: Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 38

50. Lindström L, Howell S, Åström G, Wilking U, Lidbrink E, Armstrong A, Karlsson E, Hatschek T, Bergh J: Controversies in the management of metastatic breast cancer: biologic evaluation of breast cancer—Should metastases be biopsied? In American Society of Clinical Oncology 2010 Educational Book. Alexandria (USA) 2010; e7-e12
51. Mandó P, Rizzo M, de la Puente CP, Maino M, Ponce C, Pombo MT, Amat M, Costanzo MV, Nervo A, Nadal J, Fabiano V, Loza J, Loza CM, Colo F, Reinaldo C: High Histologic grade and high Ki-67 expression predict phenotypic alterations in node metastasis in primary breast cancers. *J Breast Cancer* 2017; 20: 170-175
52. Masood S, Bui MM. Assessment of Her-2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 259-265
53. Mayr D, Beer M, Schmöckel E: Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma. In: Bauerfeind I (Hrsg.): Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 65-97
54. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Czapiewski P, Wazny K, Langfort R, Waloszczyk P, Biernat W, Lasota J, Wang Z: GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 13-22
55. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, Lee KS, Niikura N, Park YH, Xu B, Wang X, Gil-Gil M, Li W, Pierga JY, Im SA, Moore HCF, Rugo HS, Yerushalmi R, Zagouri F, Gombos A, Kim SB, Liu Q, Luo T, Saura C, Schmid P, Sun T, Gambhire D, Yung L, Wang Y, Singh J, Vitzka P, Meinhardt G, Harbeck N, Cameron DA; DESTINY-Breast04 Trial Investigators: Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2022; 387: 9-20
56. Mori T, Morimoto T, Komaki K, Monden Y. Comparison of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor content of primary and involved nodes in human breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 532-537
57. Tumorregister München: ICD-10 C50: Mammakarzinom (Frauen). Survival. Online erhältlich über den Link https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC50f_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Survival.pdf, Version vom 14.4.2022, zuletzt abgerufen am 31.8.2023
58. Nedergaard L, Haerslev T, Jacobsen GK: Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS* 1995; 103: 20-24

59. Osborne CK: Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1609-1618
60. Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R: Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7057-7061
61. Remmele W, Stegner H: Vorschlag zur einheitlichen Definierung eines immunreaktiven Scores (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 1987; 8: 138-140
62. 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, zuletzt abgerufen am 29.8.2023
63. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L: Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090-2100
64. van Rooijen JM, de Munck L, de Graaf JC, Siesling S, de Vries EG, Boers JE: Limited human epidermal growth factor receptor 2 discordance in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab, a population based study. *Eur J Cancer* 2014; 50: 885-891
65. 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 16.8.2023
66. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G: HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer* 2008; 122: 999-1004
67. Schindlbeck C, Dathe O, Gutschow K, Haidinger R, Hecken S, König A, Maurer S, Sommer H, de Waal J, Wypior H: Nachsorge. In: Bauerfeind, I. (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 203-218

68. Schrijver WAME, Suijkerbuijk KPM, van Gils CH, van der Wall E, Moelans CB, van Diest PJ: Receptor conversion in distant breast cancer metastases: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2018; 110: 568-580
69. Schrodi S, Engel J, Schubert-Fritschle: Epidemiologie. In: Bauerfeind, I. (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, 2017, S. 1-12
70. Selvarajan S, Tan SY, Sii LH, Tan PH: c-erbB2 (HER2/neu) immunohistochemistry in invasive breast cancer: is there concordance between standard sections and tissue microarrays? *Pathology* 2006; 38: 316-320
71. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F, on behalf of the ESMO Guidelines Committee: Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice. Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl 5): v8–v30
72. Simon R, Nocito A, Hübscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Moch H, Wilber K, Schötzau A, Kononen J, Sauter G: Patterns of Her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1141-1146
73. Strien L, Leidenius M, von Smitten K, Heikkilä P: Concordance between HER-2 and steroid hormone receptor expression between primary breast cancer, sentinel node metastases, and isolated tumor cells. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 253-258
74. Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O: Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum Pathol* 2013; 44: 39-46
75. Thomson TA, Zhou C, Ceballos K, Knight B: Tissue microarray for routine clinical breast biomarker analysis. The British Columbia cancer agency 2008. Experience. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 909-914
76. Thomson TA, Zhou C, Chu C, Knight B: Tissue microarray for routine analysis of breast biomarkers in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 899-905
77. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarray for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 2001;159: 2249-2256
78. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y: EGFR, c-erbB2 and p53 protein in the primary lesions and paired metastatic regional lymph nodes in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 383-387

79. van de Ven S, Smit VT, Dekker TJ, Nortier JW, Kroep JR: Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2011; 37: 422-430
80. Vogel U: Overview on techniques to construct tissue arrays with special emphasis on tissue microarrays. *Microarrays* 2014; 3: 103-136
81. Weydandt L, Nel I, Kreklau A, Horn LC, Aktas B. Heterogeneity between core needle biopsy and synchronous axillary lymph node metastases in early breast cancer patients - a comparison of HER2, estrogen and progesterone receptor expression profiles during primary treatment regime. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 1863
82. WHO 2019 (Zitierweise): WHO Classification of Tumours Editorial Board (Edit.): World Health Organization classification of tumours, 5th edition. Breast tumours. IARC Press, Lyon, 2019
83. Wolf, C., Bauerfeind, I., Hasmüller, S., Salat, C., Würstlein, R. (2017): Primäre systemische Therapie. In: Bauerfeind, I. (Hrsg.): *Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. W. Zuckschwerdt Verlag, München, 16. Auflage, S. 177-185
84. Wittekind C (Hrsg.): *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley VCH Verlag, 8. Auflage, 2017
85. Xu R, Perle MA, Inghirami G, Chan W, Delgado Y, Feiner H: Amplification of Her-2/neu gene in Her-2/neu overexpressing and -nonexpressing breast carcinomas and their synchronous benign, premalignant, and metastatic lesions detected by FISH in archival material. *Mod Pathol* 2002; 15: 116-124
86. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarray in detecting protein expression and gene amplification in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2003; 16: 79-85