

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER PROLIFERATIONSMARKER KI67: VALIDITÄT UND RELIABILITÄT DER
MESSMETHODEN SOWIE EIGNUNG ALS PROGNOSEFAKTOR FÜR
BRUSTKREBSPATIENTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Gleixner

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MATTHIAS EVERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER PROLIFERATIONSMARKER KI67: VALIDITÄT UND RELIABILITÄT DER
MESSMETHODEN SOWIE EIGNUNG ALS PROGNOSEFAKTOR FÜR
BRUSTKREBSPATIENTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Gleixner

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter

2. Berichterstatter: PD Dr. Monika Klinkhammer- Schalke

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2017

Inhalt

Inhalt.....	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Graphikenverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung	8
1.1 Allgemeines zu Mamma- Karzinomen	8
1.2 Ursachen und Risikofaktoren	8
1.3 Früherkennung und Screening	9
1.4 Tumordiagnose und Gewebeuntersuchungen	10
1.5 Therapie.....	13
1.6 Tumorzentren	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	15
1.8 Themenstellung und Dissertationsziele.....	16
2 Patienten, Material und Methode	17
2.1 Studiendesign, Patientenkollektiv und Datensatz	17
2.2 Studiendurchführung und Versuchsaufbau	19
2.3 Methoden zur Ki67- Eigenauszählung	22
2.4 Erhebung klinischer Daten	25
2.5 Statistische Methoden	25
3 Ergebnisse	28
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	28
3.2 Deskriptive Analyse der Ki67- Pathologen- Messwerte	41
3.2.1 Präparatherkunft und Zellverteilung	41
3.2.2 Beschreibung der Ki67- Originalmesswerte (Pathologe).....	42
3.3 Beschreibung der selbsterhobenen Ki67- Werte und deskriptiver Vergleich mit den Pathologenwerten	46
3.4 Statistischer Vergleich zwischen Pathologenschätzung und Eigenzählung.....	51
3.5 Untersuchungen der selbsterhobenen Ergebnisse von Ki67- Doppelmessungen	58
an einem Kollektiv von 50 Patientinnen	58
3.6 Vergleich der selbsterhobenen Ki67-Werte von Resektat und Stanze.....	64
3.7 Einfluss von Ki67 auf Überleben – Kaplan-Meier-Analysen, univariable und	71
multivariable COX- Regression	71

3.7.1 Kaplan- Meier- Kurven und Log- Rank- Test.....	71
3.7.2 COX- Regression	84
4 Diskussion	91
4.1 Kritische Reflexion der eigenen Studie.....	91
4.2 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien	94
4.3 Vollautomatisches Ki67- Zählprogramm.....	98
5 Zusammenfassung	102
Literaturverzeichnis.....	105
Anhang	110
Lebenslauf	111
Erklärung zum Promotionsverfahren	112
Danksagungen	113

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Ablatio (Brustabnahme)
ANCOVA	Analysis of covariance
ANOVA	Analysis of variance
AWMF.....	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BET	Brusterhaltende Therapie
CTX.....	Chemotherapie
ER	Östrogenrezeptor
ET.....	Endokrine Therapie
HR.....	Hazard Ratio
HTX.....	Hormontherapie
ICD	International Classification of Diseases
IRS	Immunreaktiver Score
k.A.....	keine Angabe
KI.....	Konfidenzintervall
LINV.....	Tumoreinbruch ins Lymphsystem
Mamma- Ca	Mamma- Karzinom
MD	mammographische Dichte
MIB1	monoklonaler Antikörper zur Ki67- Anfärbung
OAS	overall survival (Gesamtüberleben)
OP	Operation
Patienten-ID	Patienten- Identifikationsnummer
PR.....	Progesteronrezeptor
RFS	rezidivfreies Überleben
RTX.....	Strahlentherapie
SNLB.....	Sentinel- Lymphknoten- Biopsie
TNM- Klassifikation	Klassifikation zum Staging von Tumor- erkrankungen (T= Tumorgröße, N= Nodalstatus, M= Metastasierung)
UICC.....	Union for International Cancer Control
VINV.....	Tumoreinbruch in das Gefäßsystem

Abbildungsverzeichnis

(Unter Abbildungen sind Fotografien, Screenshots und Ähnliches zu verstehen)

Abbildung 1: Archiv des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Regensburg
(Eigenfotografie)

Abbildung 2: Etikett eines Beispielpräparates (Eigenfotografie)

Abbildung 3: Mirax Scanner

Abbildung 4: Zählmaschine (Eigenfotografie)

Abbildung 5: Zählschablone (Eigenfotografie)

Abbildung 6: Screenshot einer vollautomatischen Ki67- Auswertung (Eigenaufnahme)

Abbildung 7: Screenshot eines Mamma- Ca Schnittes (Eigenaufnahme)

Abbildung 8: Anwendung des Ki67- Quantifiers am ersten Präparatausschnitt
(Eigenaufnahme)

Abbildung 9: Anwendung des Ki67- Quantifiers am zweiten Präparatausschnitt
(Eigenaufnahme)

Abbildung 10: Anwendung des Ki67- Quantifiers am dritten Präparatausschnitt
(Eigenaufnahme)

Abbildung 11: Auswertung durch Ki67- Quantifier mit zu hohen Proliferationsmarkerwerten

Graphikenverzeichnis

(Unter Graphiken sind Ergebnisse statistischer Auswertungen zu verstehen)

- Graphik 1:** Diagnosealter klassiert in 5 Jahres Schritten
- Graphik 2:** Prozentuale Aufteilung der verschiedenen histologischen Typen beim Mamma- Karzinom
- Graphik 3:** Graphische Gegenüberstellung zwischen Grading und UICC- Stadium
- Graphik 4:** Menopausenstatus
- Graphik 5:** Residualklassifikation (gesamt)
- Graphik 6:** Aufteilung der OP-Formen
- Graphik 7:** Zusammenhang zwischen Stadium und Operationsform
- Graphik 8:** Histogramm- Pathologenschätzung Ki67
- Graphik 9:** Ki67-Pathologenschätzung (5%-Schritte)
- Graphik 10:** Ki67-Pathologenschätzung (St. Gallen- Schritte)
- Graphik 11:** Ki67-Pathologenschätzung (klassiert in vier Stufen)
- Graphik 12:** Graphische Darstellung der Ki67- Selbstzählung (Histogramm)
- Graphik 13:** Ki67- Eigenzählung (5%- Schritte)
- Graphik 14:** Eigenzählung Ki67 (St. Gallen-Klassifikation)
- Graphik 15:** Eigenzählung Ki67 (Vier Stufen Modell)
- Graphik 16:** Vergleich zwischen Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung mit Hilfe eines Boxplots
- Graphik 17:** Gegenüberstellung von Eigenzählung und Pathologenschätzung jeweils in vier Stufen
- Graphik 18:** Streudiagramm mit Regressionslinie- Vergleich Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung
- Graphik 19:** Gegenüberstellung zwischen erster und zweiter Ki67- Eigenzählung (jeweils in vier Stufen)
- Graphik 20:** Gegenüberstellung der ersten und zweiten Ki67- Eigenzählung mittels Streu- Punkt- Diagramm
- Graphik 21:** Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf UICC- Stadium
- Graphik 22:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (OAS)
- Graphik 23:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (RFS)
- Graphik 24:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Stadium
- Graphik 25:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion RFS- Abhängigkeit vom Stadium
- Graphik 26:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (10er- Schritte)
- Graphik 27:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (St. Gallen- Schritte)
- Graphik 28:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (Vier Stufen Modell)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM- Klassifikation Brustkrebs

Tabelle 2: UICC- Stadieneinteilung Mamma- Ca

Tabelle 3: Alter bei Brustkrebs- Diagnosestellung

Tabelle 4: Diagnosealter klassiert in 10 Jahres Schritten

Tabelle 5: Stadienverteilung (UICC)

Tabelle 6: Verteilung der Gradingstufen im Kollektiv

Tabelle 7: Gegenüberstellung zwischen Grading und Stadium

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Menopausen- und Rezeptorstatus

Tabelle 9: Her2/neu- Status der Patientinnen

Tabelle 10: Anzahl der untersuchten/befallenen Lymphknoten

Tabelle 11: Anzahl der untersuchten/befallenen Sentinel-Lymphknoten

Tabelle 12: Therapieformen

Tabelle 13: Präparatherkunft und Zellverteilung der histologischen Schnitte

Tabelle 14: Deskriptive Statistik zur Ki67- Pathologenschätzung

Tabelle 15: Explorative Datenanalyse (Ki67- Eigenzählung)

Tabelle 16: Test auf Normalverteilung bei Ki67- Selbstzählung und Pathologenschätzung

Tabelle 17: T-Test (Eigenzählung/Pathologenschätzung)

Tabelle 18: Wilcoxon-Test zum Vergleich Ki67-Eigenzählung und Pathologenschätzung

Tabelle 19: Gegenüberstellung Eigenzählung/Pathologenschätzung (jeweils in vier Stufen)

Tabelle 20: Pearson-Koeffizient (Ki67-Eigenzählung/Pathologenschätzung)

Tabelle 21: Test auf Normalverteilung

Tabelle 22: T-Test (Mittelwertvergleich zwischen erster und zweiter Ki67- Selbstzählung)

Tabelle 23: Wilcoxon- Test (erste und zweite Selbstzählung)

Tabelle 24: Gegenüberstellung zwischen erster und zweiter Ki67- Eigenzählung (jeweils in vier Stufen)

Tabelle 25: Pearson- Korrelationskoeffizient (erste und zweite Eigenzählung)

Tabelle 26: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Stadium und Grading

Tabelle 27: Chi-Quadrat-Test für Stadium und Grading

Tabelle 28: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Her2/neu- und Rezeptorstatus

Tabelle 29: Chi-Quadrat-Test von Her2/neu- und Rezeptorstatus

Tabelle 30: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf OP- Form

Tabelle 31: Chi-Quadrat-Test (OP- Form)

Tabelle 32: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Zellverteilung (gleichmäßig/Hotspot)

Tabelle 33: Chi-Quadrat-Test für die Zellverteilung innerhalb des Präparats

Tabelle 34: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Ki67 (vier Stufen)

Tabelle 35: Chi-Quadrat-Test zu Ki67 (vier Stufen)

Tabelle 36: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (OAS)

Tabelle 37: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (RFS)

Tabelle 38: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Stadium

- Tabelle 39:** Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Stadien untereinander (OAS)
- Tabelle 40:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion RFS- Abhängigkeit vom Stadium
- Tabelle 41:** Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Stadien untereinander (RFS)
- Tabelle 42:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (10er- Schritte)
- Tabelle 43:** Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (10er Schritte; OAS)
- Tabelle 44:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (St. Gallen- Schritte)
- Tabelle 45:** Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (St. Gallen; OAS)
- Tabelle 46:** Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (Vier Stufen Modell)
- Tabelle 47:** Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (Vier Stufen Modell; OAS)
- Tabelle 48:** Univariable Auswertung des Gesamtüberlebens (OAS) und rezidivfreien Überlebens (RFS)- COX-
Regression
- Tabelle 49:** COX- Regression für Ki67 (univariabel; klassiert in vier Stufen; OAS)
- Tabelle 50:** Multivariable Auswertung des Gesamtüberlebens (OAS) und rezidivfreien Überlebens (RFS)- COX-
Regression

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Mamma- Karzinomen

Brustkrebs stellt sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar [1]. In Deutschland kommt es zu über 70000 Neudiagnosen pro Jahr, über 17000 Frauen sterben jährlich an dieser Krebsform. Rechtzeitig erkannt und behandelt, sind aber viele Tumorfälle relativ gut heilbar (5- Jahres- Überleben von über 80%) [2]. Das Mamma- Karzinom ist somit zwar die häufigste Krebsart bei Frauen, aber durchaus erfolgreich therapierbar [3]. Nur etwa jede hundertste Mamma- Ca- Diagnose kommt bei Männern vor [4]. Auch wenn die meisten Erkrankungen sporadisch auftreten, sind sowohl genetische als auch erworbene Risikofaktoren für Brustkrebs bekannt [5]. Früherkennung spielt eine entscheidende Rolle zur Prognoseverbesserung. Die linke Brust ist generell häufiger betroffen als die rechte [6]. Der obere äußere Quadrant stellt die häufigste Lokalisation dar [7]. Die Therapie sollte an das Erkrankungsstadium angepasst und individuell gestaltet werden. Kombinationen aus verschiedenen Operationsformen mit Chemo-, Hormon- und Strahlentherapie finden Anwendung [8]. Durch Einsatz von monoklonalen Antikörpern (beispielsweise Trastuzumab) gewinnen auch neue Erkenntnisse der Krebsimmuntherapie immer mehr an Bedeutung [9].

1.2 Ursachen und Risikofaktoren

Genetische Risikofaktoren

Etwa 5% aller Mamma- Karzinome sind erblich bedingt. Genau festgelegte, die Krankheit verursachende Mutationen sind hierbei eher eine Seltenheit. Viel häufiger kommt es vor, dass durch genetische Veränderungen die Anfälligkeit für Brustkrebs auf äußere Faktoren erhöht wird. Die höchste Wahrscheinlichkeit, an der erblichen Form des Brustkrebses zu erkranken, besteht bei Frauen mit Mutationen in den Breast- Cancer- Genen BRCA 1 und 2. Auch sind beispielsweise Mutationen im p53- Gen bekannt. Dabei handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, welches autosomal- dominant vererbt wird (Li- Fraumeni- Syndrom). So ist eine Vielzahl verschiedener genetischer Mutationen und Risikofaktoren bekannt. Die Wahrscheinlichkeit, für eine Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken, steigt statistisch nachweisbar ab zwei Krankheitsfällen in direkter Verwandtschaft an [10, 11]. Diesen Frauen sollte eine humangenetische Beratung angeboten werden.

Hormonelle Faktoren

Alle weiblichen Körperzellen, auch die Tumorzellen, tragen Rezeptoren für die weiblichen Sexualhormone (Östrogene und Gestagene). Das Tumorwachstum kann hormonabhängig beeinflusst werden [12].

Beispielsweise kann bei Einnahme von Hormonpräparaten bei Wechseljahresbeschwerden das Karzinomrisiko um bis zu 45% ansteigen [13]. Auch Frauen mit früher Menarche oder später Menopause tragen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Ein niedrigeres Risiko haben dagegen Frauen, die früh Kinder bekommen und lange stillen [14].

Weitere Faktoren

Einige Studien untersuchten, ob Linkshändigkeit das Brustkrebsrisiko erhöhen würde. Laut einer Erhebung aus dem Jahr 2007 steige die Wahrscheinlichkeit, Krebs zu entwickeln, um den Faktor 2,59 [15].

Bewegungsmangel erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit um 25% [16]. Ein erhöhtes Risiko haben außerdem Frauen, die in jungem Erwachsenenalter viel rohes Fleisch gegessen haben [17], viel Alkohol konsumieren (über 20 Gramm täglich), deutlich übergewichtig sind [18], sehr viel rauchen [19] oder in jungen Jahren ionisierender Strahlung ausgesetzt waren [20].

1.3 Früherkennung und Screening

Der überwiegende Teil der Brusttumoren wird von den Frauen selbst, meist durch Zufall, entdeckt. Da diese Geschwülste erst bei fortgeschrittenem Wachstum sicht- und tastbar sind, kann der Tumor bereits weit fortgeschritten sein. Aus diesem Grund macht eine konsequente Früherkennung Sinn, die bereits kleine, nicht tastbare Tumore aufspürt. Programme der systematischen Selbstuntersuchung beziehungsweise Untersuchung durch den Arzt können ebenso wie regelmäßige Teilnahme am Mammographie- Screening dabei helfen, die Sterblichkeit zu senken. Das Mammographie- Screening wurde 2005 in Deutschland eingeführt. Frauen zwischen 50 und 69 Jahren werden dazu alle zwei Jahre eingeladen [21].

1.4 Tumordiagnose und Gewebeuntersuchungen

Wird mittels Mammographie oder Ultraschall ein Tumor aufgefunden, ist eine histologische Sicherung indiziert, um die Dignität abzuklären.

Zu diesem Zweck kann mittels Stanzbiopsie ein histologisches Präparat gewonnen werden, welches mit Hilfe eines Mikroskops genau untersucht wird. Neben diesen sogenannten Stenzen beurteilt der Pathologe auch noch Schnitte, die während einer OP gewonnen werden. Diese entnommenen Gewebeteile bezeichnet man als Resektate. Das während einer OP gewonnene Präparat wird auf seine exakte Größe vermessen und auf weiteren Befall untersucht. Auch kann es vorkommen, dass Lymphknoten entnommen werden, um zu überprüfen, ob es bereits zur Metastasierung gekommen ist (Sentinel- Technik). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen spielen für die TNM Klassifikation, Prognose und weitere Behandlung des Patienten eine entscheidende Rolle [22].

In Deutschland gibt es S3- Leitlinien, in denen Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Brustkrebses beschrieben sind.

Histologische Klassifikation

Für eine optimale Behandlung und das Erstellen einer Prognose ist es sehr wichtig, dass durch den Pathologen genaue Informationen über Art und Eigenschaften des Krebses gewonnen werden. So wird ein zu untersuchendes Präparat im ersten Schritt histologisch klassifiziert. Der häufigste Brustkrebstyp ist mit einem Prozentsatz von 70-80% das sogenannte invasiv duktales Karzinom. Das invasiv lobuläre Karzinom tritt mit 10-15% viel seltener auf. Daneben gibt es noch invasiv tubuläre, muzinöse, medulläre, papilläre oder gemischte Tumortypen, die aber alle viel seltener vorkommen.

Außerdem finden sich noch die nicht-invasiven Mamma- Karzinome, die entweder innerhalb der Brustdrüsengänge (duktales Carcinoma in situ = DCIS) oder Drüsenläppchen (lobuläres Carcinoma in situ = LCIS) ohne Stromainvasion vorkommen. Eine Sonderstellung nimmt der Morbus Paget ein, bei dem es sich um eine nicht-invasive Tumorausbreitung in die Mamillenhaut handelt [23].

Grading (Differenzierungsgrad nach Elston und Ellis)

Die genannten Tumortypen werden in drei Differenzierungsgrade eingeteilt. Die Einstufung basiert auf drei Kriterien, nämlich Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate. Je höher das Grading, desto schlechter und ungünstiger ist das Tumorzellverhalten (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = schlecht differenziert) [24].

TNM- Klassifikation

Drei Kriterien gehen in die Beschreibung der TNM- Klassifikation ein, nämlich Tumorgöße (T), Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und eventuelle Fernmetastasierung (M). Die folgenden zwei Tabellen geben einen Überblick über die TNM- beziehungsweise Stadieneinteilung [25, 26, 27]. Die in Tabelle 1 und 2 verwendeten Daten entstammen allesamt der aktuellen TNM- Klassifikation der UICC.

Tabelle 1: TNM- Klassifikation Brustkrebs

T: Tumorgöße (Durchmesser)	N: Befallene Lymphknoten	M: Fernmetastasen
T0: kein Tumor nachweisbar	N0: keine	M0: keine nachweisbar
T1: bis 2 cm	N1: Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten	M1: nachweisbar (meist in Lunge, Leber, Knochen)
T2: bis 5 cm	N2: Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander verbacken oder in anderen Strukturen fixiert	
T3: mehr als 5 cm	N3: Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna	

Tabelle 2: UICC- Stadieneinteilung Mamma- Ca

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Hormonrezeptor- und Her2/neu- Status

Mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen werden Östrogen- (ER) und Progesteron-Rezeptorstatus (PR) untersucht. Zu diesem Zweck wird der Prozentsatz an Tumorzellen bestimmt, an denen sich die Rezeptoren nachweisen lassen. Man errechnet dann aus diesem Prozentsatz und der Färbeintensität einen 12-stufigen Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner oder den international gebräuchlicheren 8-stufigen Allred- Score. Nach neuen Leitlinien wird ein Tumor bereits als hormonrezeptorpositiv gewertet, wenn sich 1% der Zellen anfärben lassen. Liegt ein Hormonrezeptor- positiver Tumor vor, ist eine endokrine Therapie indiziert [28, 29].

Der Her2/neu- Rezeptorstatus ist wichtig für die Entscheidung, ob eine Antikörper- Therapie, beispielsweise mit Trastuzumab, indiziert ist [30]. In etwa 20% aller malignen Brusttumore findet sich eine Überexpression des Her2/neu- Wachstumsrezeptors, dem eine Alternation des entsprechenden Gens zu Grunde liegt. Eine Her2/neu- Überexpression wird mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die Anwendung von Trastuzumab verbessert diese erheblich. Bei der Her2/neu- Bestimmung findet ein vierstufiger Farbintensität-Score Anwendung. Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn sich keine Zellen anfärben lassen (Score 0). Auch der Score 1+ ist negativ, was bedeutet, dass eine Behandlung mit Trastuzumab ohne Effekt auf den Tumor verlaufen würde. Bei einer mittleren Färbeintensität (Score 2) wird der Tumor mit dem FISH- Test nachuntersucht und anhand der Amplifikation des Her2- Gens entschieden, ob es sich um einen Her2- positiven Tumor handelt, der mit Trastuzumab behandelt werden kann [31].

Proliferationsmarker Ki67

Ein weiterer Untersuchungsparameter in der immunhistologischen Routinediagnostik ist der Proliferationsmarker Ki67. In dieser Arbeit kommt dem Ki67- Wert eine ganz besondere Bedeutung zu. Es handelt sich um ein Protein, das zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen geeignet ist. Dieses Eiweiß kann während der Interphase im Zellkern gefunden werden. Während den aktiven G1-, S-, G2- und M- Phasen des Zellzyklus ist Ki67 nachweisbar, in der G0- Phase von ruhenden Zellen fehlt es. Dieser Umstand macht es zu einem geeigneten Marker, die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen. Zusammen mit anderen Faktoren spielt das Ki67 eine entscheidende Rolle für Prognoseabschätzung und Therapieplanung [32, 33].

1.5 Therapie

Um die Patientenversorgung zu verbessern und zu vereinheitlichen, gibt es seit dem Jahr 2003 an Krankenhäusern in Deutschland speziell zertifizierte Brustzentren [34]. Niedergelassene Ärzte können sich am Disease- Management- Programm beteiligen. Die Mamma- Ca Behandlung orientiert sich an den entsprechenden S3 Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Das Evidenzniveau der Leitlinie gilt als sehr hoch [35].

Im Frühstadium ist vorrangiges Ziel der Therapie eine rasche Heilung, beim metastasierten Tumor eine Verlängerung der Lebenszeit und im Spätstadium eine Linderung der Beschwerden. Ziel der Therapie sollte immer der Erhalt einer möglichst hohen Lebensqualität sein. Patientenwünsche dürfen nicht unberücksichtigt bleiben. Eine Standardtherapie, die bei allen Patienten Anwendung finden kann, gibt es nicht. Unter Berücksichtigung verschiedenster Faktoren muss die Behandlung individualisiert und an Patient und Krankheitsbild angepasst erfolgen [36]. In Krankenhäusern spielen auch sogenannte Tumorkonferenzen eine immer wichtigere Rolle. Gynäkologen, Pathologen, Radiologen, Strahlentherapeuten und (Psycho-) Onkologen beraten sich interdisziplinär und transsektoral, um die bestmögliche Therapiestrategie für jeden einzelnen Patienten zu entwickeln [37].

Brustkrebs ist eine heterogene Systemerkrankung und muss daher schon in frühen Stadien systemisch behandelt werden [38]. Als optimal für die Behandlung des Krebses wird eine Kombination verschiedener Therapieansätze angesehen [39].

Neoadjuvante Vorbehandlung

Es ist möglich, dass vor einer OP zunächst eine Chemo- oder antihormonelle Therapie durchgeführt wird. Dadurch soll im Idealfall eine Verkleinerung des Krebses erreicht beziehungsweise eine brusterhaltende Operation ermöglicht werden [39].

Operationsformen

Es gibt verschiedene Operationsvarianten. Bei 60-70% der Brustkrebspatientinnen ist es möglich, brusterhaltend zu operieren (BET) [40]. Dies bedeutet, dass das befallene Gewebe unter Einhaltung eines ausreichenden Sicherheitsabstandes entfernt, aber der Rest der Brust erhalten wird. Die andere OP- Form sieht eine Entfernung der ganzen Mamma vor (Ablatio, ABL). In der Regel werden auch einige Lymphknoten mit entfernt, um eine mögliche Metastasierung auszuschließen. Besondere Bedeutung kommt den sogenannten Sentinel- oder Wächterlymphknoten zu, in die der Tumor zuerst streuen würde. Bei klinisch beziehungsweise sonographisch nodal- negativen Tumoren zählt die Sentinelnodebiopsie (SNLB) zur Standardtherapie. Findet sich in diesen Wächterlymphknoten keine Tumorstreuung, kann in der Regel auf eine Axilladissektion verzichtet werden [39].

Adjuvante Behandlung

In der Regel sollte nach der Operation eine adjuvante Nachbehandlung erfolgen. Individualisiert auf Patient und Tumor kommen verschiedenste Kombinationsvarianten aus Chemotherapie, Strahlentherapie, antihormoneller Therapie und Antikörpertherapie in Betracht. Bei brusterhaltenden Operationen beispielsweise sollte anschließend regelhaft eine Strahlentherapie durchgeführt werden. Bei hormonrezeptorpositiven Tumoren ist eine endokrine Therapie (ET) indiziert. Nachsorge hat einen überaus großen Stellenwert [39].

1.6 Tumorzentren

Alle Daten zu den jeweiligen Krebspatienten werden in Teilen Deutschlands und in Bayern flächendeckend, interdisziplinär und bevölkerungsbezogen von den klinischen Krebsregistern der einzelnen Tumorzentren erfasst und verarbeitet. Neben Informationen zum Patienten selbst spielen hierbei histologische und immunhistologische Fakten zum Tumorgewebe eine entscheidende Rolle. Auch Therapie und Nachbehandlung werden in den klinischen Krebsregistern erfasst. In regelmäßigen Abständen findet auch immer wieder ein Abgleich mit

den Einwohnermeldeämtern statt, um genau erfassen zu können, ob Tumorpatienten im Laufe der Zeit verstorben sind. Auch Rezidive, Metastasen usw. werden durch Tumorzentren erfasst. Durch diese Dokumentation sind Informationen zur Diagnostik und Therapie sowie ein Follow-Up in der Nachsorge bis hin zum Tod vorhanden [41].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Neben Ki67 gibt es noch viele andere Faktoren, die beim Brustkrebs Beachtung finden, wie beispielsweise Hormonrezeptorstatus, Her2/neu- Status usw. Bei Her2/neu handelt es sich um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor, der in circa 20% der Mamma-Ca Fälle überexprimiert vorliegt. Bei diesen Tumoren rechnet man mit erhöhter Invasivität, Chemoresistenz und Metastasierungstendenz. Trastuzumab würde bei diesen Krankheitsbildern die Prognose verbessern [42]. Ist ein Brusttumor hormonrezeptorpositiv, bedeutet das, dass die Rezeptoren für Östrogen beziehungsweise Progesteron im Übermaß vorliegen. Solche Patienten profitieren von einer endokrinen Therapie. Bei Hormonrezeptor- negativen Brustkrebserkrankungen bleibt eine solche Antihormontherapie dagegen wirkungslos [43].

Daneben spielen auch noch Tumormarker eine Rolle, die im Labor bestimmt werden können. Zu den Markern erster Wahl zählen beim Brustkrebs CA 15-3 und CEA. Als Tumormarker zweiter Wahl kommen CA 549, MCA, TPA in Betracht [44].

Schwerpunkte dieser Arbeit sollen die Untersuchung der Reliabilität, Objektivität und Validität der Ki67- Messung sowie die besondere Bedeutung des Ki67 bei Prognoseeinschätzung und Therapieentscheidung sein. Es existieren bereits einige Untersuchungen und Studien zu diesem Proliferationsmarker, die unter dem Kapitel „4 Diskussion“ noch weiter erörtert werden sollen. Nach Gewinnung der histologischen Präparate (Stanze oder Resektat) wird in der Routinediagnostik meist mittels Schätzung ein Ki67- Wert ermittelt, indem die durch MIB1 (Antikörper) angefärbten Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil derer ermittelt wird. Da Ki67 nur während der teilungsaktiven Phasen auffindbar ist, stellt es einen guten Proliferationsmarker dar, der einen Anhaltspunkt für die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore gibt. In der Klinik wird meist anhand eines festgelegten Ki67- Cut- off- Wertes und anderer Parameter entschieden, ob eine Chemotherapie angewendet wird. Die Ermittlung eines exakten, objektivierbaren Ki67- Wertes spielt somit eine entscheidende Rolle, um unnötige Chemotherapien zu vermeiden. Die Festlegung eines geeigneten Ki67- Cut- off- Grenzwertes scheint keineswegs einfach [45].

1.8 Themenstellung und Dissertationsziele

Anhand von histologischen Mamma- Ca- Schnitten aus den Jahren 2005 und 2006 des Universitätsklinikums Regensburg wurde eine retrospektive Studie zum Ki67 Proliferationsmarker durchgeführt. Etwa 400 Präparate kamen anhand eines festgelegten Zählverfahrens erneut bezüglich Ki67 gefärbter Zellen zur Auswertung. Die Ergebnisse dieser Eigennachzählung wurden mit den Schätzungen der Pathologen, die den Fall damals bearbeitet haben, verglichen. Außerdem sollte überprüft werden, ob das Zählverfahren objektivierbar ist, indem bei 50 Schnitten eine Doppelzählung erfolgte. Auch wurden Stenzen und Resektate einander vergleichend gegenübergestellt. Ferner war zu eruieren, ob die Etablierung eines einheitlichen Zählverfahrens möglich scheint.

Das Überleben der Patientinnen und das Auftreten von Rezidiven in Abhängigkeit vom Ki67-Messwert wurde unter Berücksichtigung verschiedener Parameter wie Stadium, Grading und weiterer Faktoren untersucht. Die Daten entstammten dem Regensburger Tumorzentrum. Schwerpunkt der Arbeit war es herauszufinden, welche Rolle der Proliferationsmarker Ki67 für sich genommen, also unabhängig von allen anderen Faktoren, auf das Überleben und Rezidivrisiko betroffener Patientinnen hat.

2 Patienten, Material und Methode

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, die Messmethode und den prognostischen Wert von Ki67 bei Mammakarzinomen näher zu untersuchen. Dieses Protein gilt als wichtiger Proliferationsmarker und lässt Rückschlüsse auf die Anzahl mitotisch sich teilender Zellen in Gewebeschnitten zu. Neben dem Hormonrezeptorstatus und dem Her2/neu- Status kommt dem Ki67-Wert eine entscheidende Bedeutung bei der Prognoseeinschätzung zu [32, 33].

Durch das Auswerten digitalisierter, mikroskopischer Schnitte sollte ermittelt werden, welche Zählmethoden für Ki67 am besten geeignet sind, das Risiko einer Patientin abzuschätzen (Überleben, Lokalrezidiv, Lymphknotenbefall, Fernmetastasen usw.). Weiteres Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob es prognostisch günstiger ist, wenn Hotspots vorliegen oder wenn sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der mit MIB1 gefärbten Zellen findet. Hier galt es wiederum zu unterscheiden, ob die markierten Zellen sehr dicht nebeneinanderliegen oder ob nur wenige gefärbte Zellen zu sehen sind.

Ausgewertet und ausgezählt wurden die im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg vorliegenden Schnitte aus den Jahren 2005 und 2006 (insgesamt über 400 Schnitte). Diese beiden Jahrgänge wurden aus verschiedenen Gründen gewählt. Einerseits liefern diese eine genügend große Fallzahl im Vergleich zu den Jahren davor, andererseits liegen die Fälle lange genug zurück, um prüfen zu können, wie sich das Krebsleiden der Patientinnen weiterentwickelt hat (Überleben, Rezidive, Metastasen usw.) Die Vorbereitungen zur Datenerhebung starteten bereits im Herbst 2012.

In einem Studienprotokoll wurden die wichtigsten Arbeitsschritte und Zielsetzungen festgehalten.

2.1 Studiendesign, Patientenkollektiv und Datensatz

Zusammenfassend lässt sich anführen, dass es sich bei der durchgeführten Untersuchung um eine retrospektive Kohortenstudie handelt. Datenbasis sind histopathologische Präparate (Resektate oder Stanzen) des Pathologischen Institutes des Universitätsklinikums Regensburg und zu den Patienten gehörige klinische und pathologische Befunde aus dem klinischen Krebsregister des Tumorzentrums Regensburg (Jahrgänge 2005/2006). Das untersuchte

Patientenkollektiv bestand ursprünglich aus über 400 Brustkrebspatienten. Männliche Patienten und Schnitte ohne Ki67- Färbung wurden bewusst ausgeklammert. Zur Auswertung blieben die Schnitte von 394 Mamma- Ca- Patientinnen übrig. Bezüglich der einzelnen Präparate lagen gegen Ende der Auswertung folgende Parameter vor [46]:

- Präparatenummer (Pathologie)
- Originaler Schätzwert für den Proliferationsmarker (Pathologenbefund)
- Herkunft des Schnittes (Stanze/ Resektat)
- Ki67- Zellverteilung innerhalb des Schnittes (Hotspot/ gleichmäßige Verteilung)
- Schätzwert der Ki67- Eigenzählung
- Schätzwert der Ki67- Doppelzählung (bei 50 Patienten)

Zum Patienten selbst lagen auch einige Angaben vor, wie unter anderem beispielsweise Patientenidentifikationsnummer, Geburtsdatum, Geschlecht.

Für die statistischen Auswertungen wichtig waren vor allem die im Krebsregister dokumentierten Angaben zum Tumor selbst:

- Primärdiagosedatum
- Primäre Tumordiagnose (ICD-10)
- Primäre Tumorlokalisation (ICD-03)
- Histologischer Typ (Code und Benennung)
- Primäre TNM- Kategorie (pathologisch nach OP, sonst klinisch)
- Stadium UICC (klinisch und pathologisch)
- Grading
- Menopausenstatus
- Hormonrezeptorstatus (Östrogen/ Progesteron)
- Genetische Mutation (Her2/neu)
- Anzahl der befallenen/entnommenen Lymphknoten/ Sentinel-Lymphknoten
- Residualklassifikation R (Lokal-, Gesamtbefund)
- Durchgeführte primäre OP (Ablatio, BET)
- Durchgeführte primäre Chemotherapie und Intention der Therapie (adjuvant/ neoadjuvant, kurativ vs. palliativ)

- Durchgeführte primäre antihormonelle Therapie
- Durchgeführte primäre Strahlentherapie
- Angabe von Resektionsrand und Sicherheitsabstand

Um aussagekräftige Outcome- Analysen durchführen zu können, waren auch noch Angaben zum aktuellen Lifestatus, Sterbedatum, Lokalrezidiv (mit Datum), regionären Lymphknotenrezidiv (mit Datum) und Auftreten von Fernmetastasen (mit Datum) nötig.

Damit für alle Patienten ein vergleichbarer Beobachtungszeitraum gewählt werden konnte, legte man für die Überlebensstatistiken als Cut-off- Datum den 01.09.2013 fest. An diesem Tag erfolgte der letzte Abgleich mit dem Einwohnermeldeamt.

2.2 Studiendurchführung und Versuchsaufbau

Die Auswertung und Untersuchung der Patientenpräparate lief wie im Folgenden beschrieben: Zunächst wurde von einem Mitarbeiter des Tumorzentrums Regensburg eine Liste aller Patientinnen und Patienten, die für die Studie in Betracht kamen, erstellt (Näheres zum Kollektiv siehe später). Zu allen Brustkrebspatienten, die auf dieser Liste aufgeführt waren, lagen im Tumorzentrum Daten über den weiteren Krankheitsverlauf vor. Somit war es möglich, retrospektiv Schlüsse über die Aussagekraft des Proliferationsmarkers für die Prognoseeinschätzung zu ziehen. Diese Liste enthielt die bereits im Kapitel 2.1 aufgeführten Patientendaten. Alle Patienteninformationen wurden höchst vertraulich behandelt. Die Liste wurde im Pathologischen Institut aufbewahrt und verließ das Gebäude aus Datenschutzgründen nicht.

Erste Aufgabe war es, herauszufinden, welche Identifikationsnummer all diese Patienten im Pathologischen Institut trugen. Hierbei half ein hauseigenes Computerprogramm, mit dem man anhand des Geburtsdatums Patienten-ID und Befunde über den PC nachschlagen konnte. Einloggen war nur durch Eingabe eines geschützten Passwortes möglich. Standen für einen Patienten mehrere Schnitte zur Wahl, wurde vereinbarungsgemäß ein Resektat gewählt. Waren nur Stenzen vorhanden, wurden diese ausgewertet. Um Geschlechtseinflüsse auszuschließen, wurden Schnitte, die von Männern stammten, nicht untersucht. Bei Schnitten ohne MIB1 Färbung erfolgte keine Auswertung. Bei einigen wenigen Patienten fanden sich zwar Ki67 Schnitte, aber nicht von der Brustdrüse, sondern von anderen Organen, weshalb auch diese nicht weiter in der Arbeit betrachtet werden konnten. Ziel der Untersuchung sollte es auch sein,

den Pathologen- Schätzwert mit der eigenen "Handauszählung" zu vergleichen. Nach Einarbeitung durch den Institutsleiter erfolgte die Suche der Nummern der histologischen Präparate in Eigenregie. Dieser Arbeitsschritt nahm etwa eine Woche Zeit in Anspruch.



Abbildung 1: Archiv des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Regensburg (Eigenfotografie)

Nach einer kurzen Einweisung in die Archivarbeit, dauerte es mehrere Tage, all die für die Auswertungen relevanten Schnitte in den nach bestimmten Kategorien geordneten Schränken zu suchen. Für jedes entnommene Präparat musste eine Karteikarte mit Name und Entnahmedatum eingelegt werden, damit jeder wisse, wo die Präparate seien, falls jemand anders diese auch noch brauchen würde.



Abbildung 2: Etikett eines Beispielpräparates (Eigenfotografie)

Alle relevanten Präparate waren im immunhistologischen Bereich des Archivs. Wie in Abbildung 2 erkennbar, trägt jedes Präparat eine spezifische Kennzeichnung, an Hand derer es eindeutig einem Patienten und Fall zuordenbar ist. Das Beispielpräparat zeigt einen Schnitt aus dem Jahr 2006 mit der Fallnummer 1039. Dass es sich um einen mit MIB1 gefärbten Schnitt handelt, erkennt man an der Beschriftung oben links. Das Kürzel des Pathologen, der damals den Fall bearbeitet hat, findet man rechts unterhalb des Barcodes.

Um die Schnitte besser betrachten zu können, wurden diese zunächst digitalisiert. Dies erfolgte mit dem sogenannten Mirax Scan der Firma Zeiss [47]. Hierbei handelt es sich um ein medizinisches Laborgerät, das im Stande ist, histologische Präparate in digitalisierte Form umzuwandeln. Mit Hilfe des Computerprogramms Mirax Viewer war es nun möglich, die Schnitte über den PC zu betrachten. Parallel zu den Archivarbeiten begann bereits eine Mitarbeiterin des Instituts mit den Einscanprozessen. Einige der Präparate zeigten allerdings ein verrutschtes oder gebrochenes Deckglas, weshalb sie nicht sofort gescannt werden konnten.

Auch hatten einige Schnitte Luftblasen gezogen und waren deshalb so nicht auswertbar. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Präparate ja schon seit Jahren eingelagert waren und das viele Fettgewebe, das sich in den histologischen Mamma-Schnitten befindet, Luft gezogen hatte. Um auch diese davon betroffenen Präparate auswerten zu können, haben Mitarbeiter der Immunhistochemie diese insgesamt 73 Schnitte entdeckelt und mit einem neuen Deckglas versehen. Nachdem diese dann mit ihrem ursprünglichen Etikett beklebt und beschriftet wurden, konnten die Präparate dann anschließend problemlos eingescannt und ausgewertet werden.



Abbildung 3: Mirax Scanner

Nebensichende Abbildung [48] zeigt den verwendeten Mirax Scanner. Von einer Mitarbeiterin des Pathologischen Institutes erhielt ich eine detaillierte Einweisung sowohl für das Gerät als auch für den Mirax Viewer. Wichtig war es, jedes neue Präparat gründlich mit Alkohol zu reinigen, um ein bestmögliches Scanergebnis zu erzielen. Sobald man den histologischen Schnitt dann einlegt, zeigt das Programm ein grobes Vorschaubild. An dieser Stelle können dann verschiedene Einstellungen vorgenommen werden, wie beispielsweise Kontrast, Scan Profil, Speicherort und einige andere. Außerdem ist es möglich bestimmte kleinere Teile des Präparats aus dem Scanprozess auszuschließen. Benannt wurden alle Schnitte mit ihrer Jahreszahl und ihrer jeweiligen fünfstelligen Identifikationsnummer. Je nach Größe des Schnittes dauerte der Scanvorgang je Präparat unterschiedlich lange. Kleinere Stenzen wurden durchschnittlich in 10 bis 15 Minuten gescannt. Großflächige Resektate dauerten dementsprechend länger und konnten durchaus auch einen Zeitraum von einer halben bis dreiviertel Stunde pro Schnitt in Anspruch nehmen. Gelegentlich kam es auch vor, dass ein Scandurchlauf fehlschlug und der digitalisierte Schnitt somit nicht auswertbar war. Dann musste dasselbe Präparat nochmals eingescannt werden. Insgesamt waren diese Arbeitsschritte relativ langwierig und nahmen bei knapp 400 Schnitten einige Zeit in Anspruch. Parallel zum Scanvorgang konnten bereits die ersten Präparateauswertungen durchgeführt werden. Die eingescannten Schnitte wurden alle auf externen Festplatten doppelt gesichert. Um die Auswertung zu dokumentieren, führte man über jeden ausgewerteten Schnitt Protokoll. Sowohl

Jahreszahl als auch Präparatenummer waren zu notieren, Auffälligkeiten des jeweiligen Schnittes sollten vermerkt und jeweils eine kleine Skizze angefertigt werden, in der eingezeichnet wurde, an welchen Stellen die Zählung erfolgte.



Abbildung 4: Zählmaschine (Eigenfotografie)

Wichtig war es bei jedem Präparat festzulegen, ob die mit MIB1 rotgefärbten Zellen gleichmäßig verteilt oder verdichtet (Hotspot) vorlagen. Auch wurde notiert, ob Stanzen oder Resektate auftraten. Sämtliche Arbeitsschritte, alle Zähl- und Auswertungsprozesse, wurden exakt dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit einer Zählmaschine (siehe Abbildung 4). Meine Aufzeichnungen zu den einzelnen Präparaten füllten insgesamt knapp 500 Seiten.

2.3 Methoden zur Ki67- Eigenauszählung

Im Folgenden wird nun genauer auf die Auswertung der Schnitte eingegangen. Die Qualität der Präparate variierte stark. Der Hauptanteil der Schnitte war sehr gut auswertbar und das Zählen der angefärbten Zellen verlief problemlos. Allerdings gab es auch Präparate, die in sehr schlechtem Zustand erhalten waren. Zählung und Auswertung dauerten lang und waren entsprechend mühsam. Bei jedem Schnitt stellte sich als erstes die Frage, ob es sich um ein Resektat oder eine Stanze handelt.

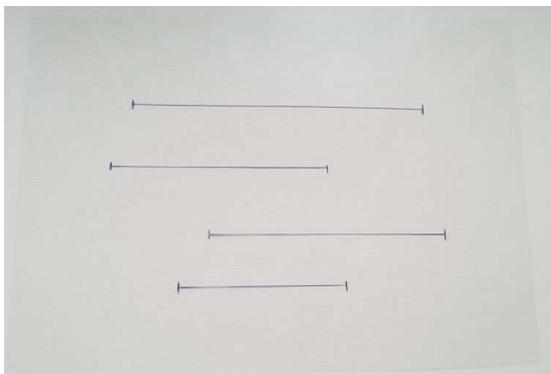


Abbildung 5: Zählshablone (Eigenfotografie)

Anschließend bestand die Aufgabe darin, das Tumorgewebe zu suchen. Auf keinen Fall sollten gesunde Zellen oder Lymphozyten mitgezählt werden, da dies das Ergebnis verfälscht hätte. Als nächstes musste die Frage geklärt werden, ob im Tumorgewebe Hotspots zu finden sind.

Als Hotspot bezeichnet man Areale, in denen die MIB1 gefärbten Zellen in sehr hoher Dichte vorkommen, wohingegen in anderen Bereichen des tumorösen Gewebes so gut wie keine gefärbten Zellen vorhanden sind.

Wenn keine Hotspots zu sehen waren und die rötlich gefärbten Zellen gleichmäßig verteilt schienen, wurde die oben abgebildete Schablone (siehe Abbildung 5) angelegt und alle auf den Zeilen befindlichen Zellen wurden ausgezählt [49].

Initial stand auch noch die Option zur Überlegung, ob man nicht auf die Folie, die auf den Computerbildschirm angebracht wurde, ein Kästchen mit vorgegebenen Längenmaßen zeichnet. Hierbei wäre dann geplant gewesen, alle darin befindlichen Zellen zu zählen und das Verhältnis zwischen gefärbten zu ungefärbten Zellen zu ermitteln.

Letztendlich erschien es aber sinnvoller die Zählung nach Ewald Weibels Punktzählverfahren durchzuführen [50]. Hierbei wurde die in Abbildung 5 gezeigte Folie auf dem PC- Bildschirm angebracht und die Präparate bei einer 40-fachen Vergrößerung über den Monitor betrachtet. Völlig willkürlich sollten Bereiche des tumorösen Gewebes gewählt werden, auf welche die Schablone gelegt wurde. Nun wurden alle Zellen gezählt, die die Linien berührten, gefärbte wie ungefärbte. Der prozentuelle Anteil der gefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl ist entscheidend. So verfuhr man sowohl mit niedrig- als auch mit hochproliferierenden Tumoren ohne Hotspot. Wie vorher vereinbart, wurden pro Schnitt genau 200 Zellen gezählt. Entscheidend für den Wert des Proliferationsmarkers im jeweiligen Schnitt war folglich bei dieser Auszählung, wie viele dieser 200 Zellen rötlich gefärbt waren. Hierbei spielte die Intensität der Rotfärbung keinerlei Rolle. Die Schablone wurde so oft angelegt bis 200 Zellen, die die Linien berührten, gezählt werden konnten. Je nach Dichte der Zellverteilung, reichte es bei manchen Schnitten die Folie dreimal anzulegen, bei anderen Präparaten musste man bis zu achtmal eine neue Position der Schablone wählen.

Bei Schnitten mit Hotspot war die Zählung etwas komplizierter. Zuerst musste man abschätzen, welche Fläche die Hotspots an der Gesamttumorfläche einnehmen. Anschließend bestimmte man mit Hilfe der Folienschablone den Proliferationsgrad innerhalb des Hotspots. Als nächstes suchte man innerhalb des tumorösen Gewebes eine Fläche, die außerhalb des Hotspots liegt, und bestimmte dort ebenfalls den prozentualen Anteil der rot gefärbten Zellen. Letzter Schritt war es nun, die Flächenanteile und Proliferationsgrade von Hotspot- und Nicht- Hotspotgebiet

so ineinander umzurechnen, dass man einen Prozentwert für den Gesamtproliferationsgrad dieses Tumors erhält [51].

Die Einarbeitung in die Präparateauswertung erfolgte durch den Institutsleiter der Pathologie. Die ersten Schnitte kontrollierte er parallel zu meinen Zählergebnissen. Nach ausreichender Einarbeitungszeit erfolgte die selbstständige Auswertung.

Fünfzig Schnitte wurden doppelt gezählt, um so eruieren zu können, wie objektiv und aussagekräftig die eigenen Zählungen waren. Näheres folgt dazu im Kapitel 3 "Ergebnisse".

Erprobung eines vollautomatisierten Ki67- Zählprogramms

Nach Zählung und Auswertung aller Schnitte wurde als nächstes der sogenannte „Ki67 Quantifier“ erprobt [52]. Hierbei handelt es sich um ein neues, kostenpflichtiges Computerprogramm, von dem behauptet wird, dass es den Ki67- Wert von Mamma- Ca- Schnitten vollautomatisch auswerten kann. Dies sollte eine objektivere Zählung ermöglichen.

Die Zählergebnisse des Quantifiers sollten nun mit den eigenen Auswertungen verglichen und so die Qualität dieses Programmes überprüft werden.

Hierbei ergaben sich allerdings einige Probleme und Unstimmigkeiten, weshalb Kontakt zu den Entwicklern des Ki67- Quantifiers aufgenommen wurde. Im vierten Kapitel dieser Arbeit wird noch näher auf die Problematik mit diesem neuen, vollautomatischen Auszählprogramm eingegangen.

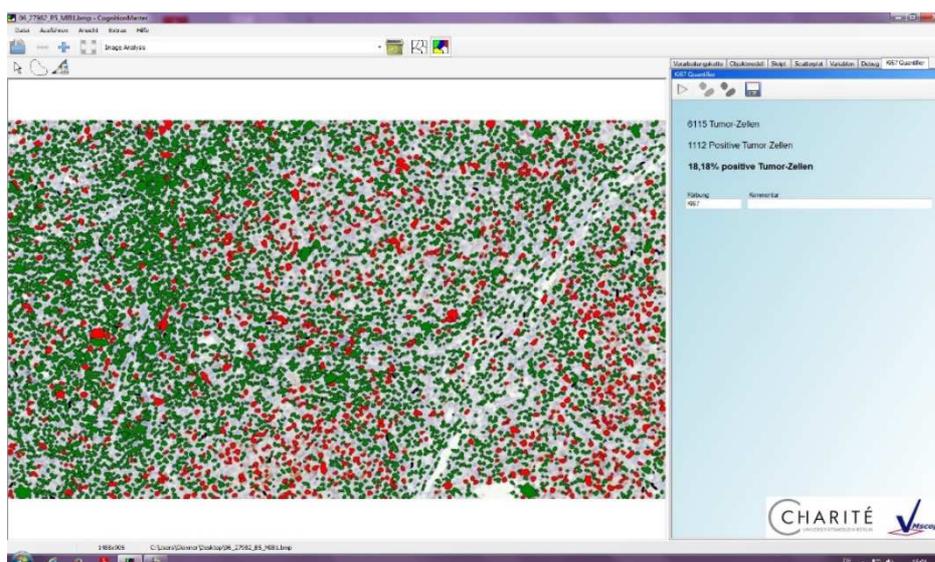


Abbildung 6:
Screenshot einer
vollautomatischen
Ki67- Auswertung
(Eigenaufnahme)

2.4 Erhebung klinischer Daten

Nach Beendigung aller Auszählungstätigkeiten erfolgten die nächsten Arbeitsschritte im Tumorzentrum Regensburg. Dort wurden Patientenlisten erstellt, die alle für die weitere Arbeit relevanten Daten enthielten (siehe 2.1). Aus dieser Auflistung konnte man entnehmen, ob Patientinnen im späteren Verlauf an ihrer Erkrankung gestorben sind, ob bei ihnen Rezidive, Lokalrezidive oder Fernmetastasen aufgetreten sind und wenn ja, in welchem Zeitraum nach Diagnosestellung es dazu kam. Auch Stadium, Grading, Operations- und Behandlungsmethoden (Chemo- oder Strahlentherapie) waren aufgeführt.

Diese Daten wurden zu den selbstgewonnenen Auszählwerten in Bezug gesetzt. Der Datensatz umfasste schließlich insgesamt 394 Patientinnen und alle dazu gehörigen Werte und Befunde. Die Auswertung und graphische Darstellung dieser Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS. Die statistischen Methoden sind genauer in Kapitel 2.5 beschrieben.

2.5 Statistische Methoden

Um nähere Aussagen zum Patientenkollektiv treffen zu können, wurden deskriptive Statistiken angefertigt, die für metrische Variablen Mittelwert, Median, Standardabweichung sowie Minimum und Maximum abbilden und für kategoriale Variablen die absolute und relative Häufigkeit darstellen. Mittels Balkendiagrammen, Histogrammen und Kreisdiagrammen sollen einige stichhaltige Ergebnisse auch noch graphisch dargestellt werden. Tabellen dienen zur detaillierten Auflistung wichtiger Untersuchungsergebnisse.

Die durch den Pathologen ermittelten Ki67- Werte werden genauso wie die selbst ausgezählten Proliferationsmarkerwerte mit deskriptiven Statistiken und Histogrammen beziehungsweise Balkendiagrammen beschrieben. Die Ki67- Werte werden hierbei in verschiedene Kategorien eingeteilt dargestellt (5%- Schritte, Einteilung nach St. Gallen, Einteilung in vier Stufen). Mit Hilfe eines Boxplots sollen dann Pathologenschätzung und Eigenzählung anhand deskriptiver Parameter einander gegenübergestellt werden.

Einen wichtigen Schwerpunkt dieser Dissertation stellt der Vergleich der eigens ausgezählten Ki67- Werte mit den ursprünglichen Pathologenmesswerten dar. Zu diesem Zweck soll zunächst ein Test auf Normalverteilung erfolgen (Kolmogorov- Smirnov, Shapiro- Wilk), um zu eruieren, welche Tests zur Analyse verwendet werden dürfen. Einige Tests, wie auch der t-Test (Mittelwertvergleich) für abhängige Stichproben dürfen nur bei normalverteilten

Differenzen Anwendung finden. Der t-Test zeigt die Höhe der Korrelation der Mittelwerte zueinander. Liegt diese möglichst hoch, also möglichst nahe an der Zahl eins, korrelieren die Mittelwerte der beiden Zählungen sehr gut. Betrachtet werden muss dabei immer noch die Signifikanz, deren Wert unter 0,05 liegen muss, damit die gewonnenen Werte verlässlich sind. Zum Mittelwertvergleich bei nicht normalverteilten Parametern wurde der sogenannten Wilcoxon- Test verwendet. Mit Hilfe des gewichteten Kappa- Koeffizienten ermittelte man, ob die Werte in den ausgewählten Ki67- Kategorien identisch sind oder nicht. Der Kappa- Koeffizient ist generell nur für den Vergleich weniger Parameter anwendbar, weshalb eine Ki67- Einteilung in Kategorien nötig ist. Graphisch dargestellt werden die Ergebnisse mit Hilfe eines Streu- Punkt- Diagramms, in das auch Regressionslinie, Winkelhalbierende des ersten Quadranten und Konfidenzintervall eingezeichnet werden. Im Idealfall lägen alle Punkte auf der Winkelhalbierenden und Pathologen- und Eigenwerte wären identisch. Die Regressionslinie zeigt die Abweichung von der Winkelhalbierenden und gibt Hinweise auf den Grad der Werteübereinstimmung. Mit Hilfe des Pearson Korrelationskoeffizienten kann ein genauer Wert ermittelt werden, der bei vorhandener Signifikanz das Maß der Korrelation, bzw. den Grad des linearen Zusammenhangs aufzeigt. Je höher der Pearson- Wert desto besser korrelieren die Werte der beiden Zählungen. Im Idealfall läge der Koeffizient bei eins.

Auf eine ähnliche Art und Weise werden die Ki67- Werte der ersten Auszählung mit denen der zweiten Eigenzählung verglichen. Durch Doppelzählung der fünfzig willkürlich ausgewählten Präparate soll die Qualität der Zählmethode überprüft werden. Auch hier findet zunächst ein Test auf Normalverteilung, ein t- Test, ein Wilcoxon- Test und eine Ermittlung des Kappa- Koeffizienten statt. Anschließend stellt man die Ergebnisse graphisch in einem Streu- Punkt- Diagramm dar und ermittelt den Pearson- Korrelationskoeffizienten.

Unter Zuhilfenahme von Tabellen sollen dann Stenzen und Resektate anhand verschiedener Parameter (Stadium, Grading, Her2/neu, Rezeptorstatus, OP- Form, Zellverteilung, Ki67) miteinander verglichen werden. Es soll festgestellt werden, ob sich gravierende Unterschiede zwischen Stenzen und Resektaten finden, beziehungsweise ob es möglich ist, beide Präparatformen für die folgenden Untersuchungen gemeinsam zu betrachten oder ob eine getrennte statistische Auswertung erfolgen muss.

Einen weiteren wichtigen Kernpunkt dieser Arbeit stellt die Überlebensanalyse mittels Kaplan- Meier Kurven und COX- Regression dar. Als Cut- off- Datum wurde der 01.09.2013 gewählt, da an diesem Tag der letzte Abgleich mit dem Einwohnermeldeamt erfolgte. So erhält man für alle Patienten einen annähernd gleichen Beobachtungszeitraum. Anhand der Überlebenskurven

kann abgeschätzt werden, wie viele der Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt noch überlebt haben (OAS) beziehungsweise überlebt haben und noch rezidivfrei sind (RFS). Die Kaplan-Meier Kurven werden sowohl für das Gesamtüberleben (OAS) und das rezidivfreie Überleben (RFS) angefertigt, als auch in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (Stadium, verschiedene Ki67- Einteilungsvarianten). Ein paarweiser Vergleich der einzelnen Kategorien (Log- Rang- Test) zeigt hierbei, ob ein signifikanter Unterschied der Überlebensraten zwischen den Gruppen besteht.

Bei der univariablen COX- Regression wird dann jeder Faktor für sich untersucht, ohne zu berücksichtigen, dass die Variablen nicht völlig unabhängig voneinander sind. So hängen Stadium und Grading beispielsweise eng zusammen und beeinflussen einander. In der multivariablen Auswertung werden diese Wechselwirkungen berücksichtigt, so dass man genau herausfiltern kann, welchen Einfluss ein bestimmter Faktor, zum Beispiel das Ki67, für sich genommen auf das Überleben (OAS und RFS) hat. Beide COX Regressionen, sowohl die univariable also auch die multivariable, werden in zwei separaten Tabellen dargestellt, die für OAS und RFS Hazard Ratio (HR), Konfidenzintervall und p- Wert bei den verschiedenen Variablen aufzeigen.

Die Datenerfassung, Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS Version 21, ergänzt durch ein Online- Rechenprogramm zur Berechnung des gewichteten Kappa- Wertes. Neben persönlicher Statistikbetreuung im Tumorzentrum Regensburg erfolgte die Einarbeitung in die statistische Thematik mit Hilfe verschiedenster Lehrbücher [53, 54, 55, 56].

3 Ergebnisse

Bei der durchgeführten retrospektiven Studie wurden die Schnitte von 394 Brustkrebspatientinnen der Jahre 2005 und 2006 mit Hilfe eines festgelegten Zählsystems erneut auf ihren Ki67- Wert hin ausgewertet, auch im Hinblick darauf, welche Rolle Ki67 für den Krankheitsverlauf und die Prognoseeinschätzung spielt. Überprüft werden sollte, inwieweit die so ermittelten Ki67- Werte von den Pathologenzählwerten abweichen und ob bei Zweitanzählung (50 Präparate) ähnliche Ergebnisse wie bei der ersten Eigenanzählung erzielt werden können. Außerdem sollte eruiert werden, ob es für die Auswertungen einen Unterschied macht, ob Stenzen oder Resektate vorliegen. Ein weiterer Gesichtspunkt der Arbeit war die Rolle des Ki67 für Überleben und rezidivfreies Überleben. Mit Hilfe von multivariabler COX-Regression wurde ermittelt, welche Bedeutung Ki67 für sich genommen, also unabhängig von allen anderen Faktoren, auf das Überleben hat. Informationen und Daten zu allen Patienten entstammten dem Tumorzentrum Regensburg.

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Grund- und Auswertekollektiv

Laut ursprünglicher Patientenliste des Tumorzentrums lagen Daten zu 473 Patientinnen und Patienten aus den Jahren 2005 und 2006 vor. Da festgelegt wurde, dass nur Frauen mit Mamma-Karzinomen betrachtet werden sollten, wurden sieben Männer ausgeschlossen. Auch konnten nur Patientinnen in die Studie aufgenommen werden, bei denen damals der Ki67- Wert ermittelt wurde. Frauen, bei denen nicht alle notwendigen Daten vorhanden waren, oder deren immunhistologische Schnitte für eine erneute Auswertung unbrauchbar waren, mussten ebenso ausgeschlossen werden. Übrig blieben zur weiteren Untersuchung und statistischen Auswertung letztendlich die Schnitte von 394 Patientinnen.

Diagnosealter

Aus Tabelle 3 wird deutlich, dass das Alter bei Diagnosestellung im Mittel bei 61,5 Jahren liegt. Mittelwert und Median (61,7 Jahre) des Diagnosealters liegen sehr nahe beieinander.

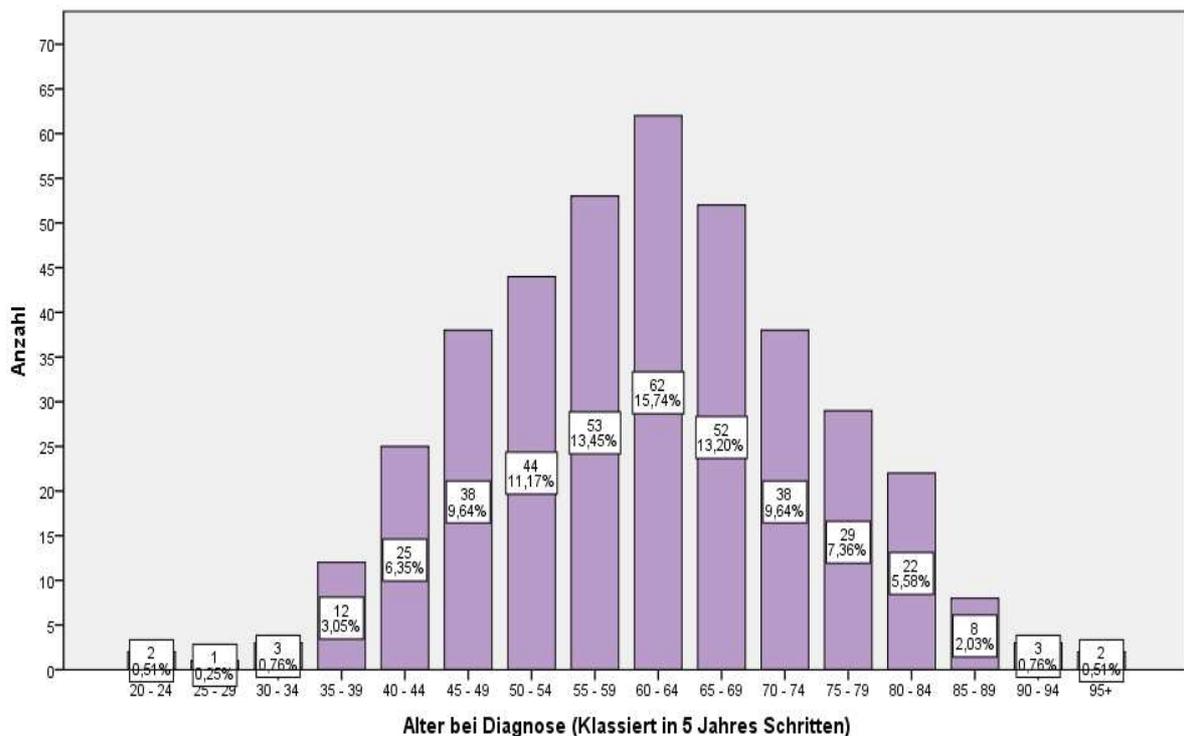
Tabelle 3: Alter bei Brustkrebs- Diagnosestellung

Alter bei Brustkrebs- Diagnosestellung		
Anzahl	Gültig	394
Mittelwert		61,5
Median		61,7
Standardabweichung		13,2
Minimum		24,6
Maximum		97,5

Die jüngste Patientin des untersuchten Kollektivs war bei Diagnosestellung 24,6 Jahre alt, die älteste 97,5 Jahre. Die Standardabweichung liegt bei etwa 13,2 Jahren.

In den folgenden zwei Darstellungen wird die Altersverteilung der Patientinnen bei Diagnosestellung aufgezeigt, zum einen klassiert in 5-Jahreschritten (Balkendiagramm), zum anderen unterteilt in Abschnitte zu je zehn Jahren (Tabelle).

Graphik 1 zeigt die Altersverteilung bei Diagnosestellung, klassiert in Schritten zu je fünf Jahren. Die Auftragung zeigt eine Normalverteilung. Die meisten Patienten (15,74%) bekamen die Diagnose Brustkrebs im Alter von 60 bis 64 Jahren gestellt. Sowohl nach links als auch nach rechts vom Maximum nimmt die Zahl der Diagnosestellungen kontinuierlich ab. Besonders wenige Diagnosen wurden im Alter von unter 35 Jahren oder über 85 Jahren gestellt.



Graphik 1: Diagnosealter klassiert in 5 Jahres Schritten

**Tabelle 4: Diagnosealter klassiert in 10
Jahres Schritten**

Tabelle 4 zeigt eine Klassifikation in Schritten zu je zehn Jahren auf. Dabei ergibt sich ein ähnliches Datenbild wie bei Graphik 1. 28,9% aller Patientinnen erhielten ihre Diagnose zwischen ihrem 60. und 69. Lebensjahr. Zu beiden Seiten nehmen die Werte ab.

	Anzahl	Anzahl der Spalten (%)
Alter bei Diagnose (Klassiert in 10 Jahres Schritte)		
20 - 29	3	0,8%
30 - 39	15	3,8%
40- 49	63	16,0%
50- 59	97	24,6%
60 - 69	114	28,9%
70 - 79	67	17,0%
80- 89	30	7,6%
90+	5	1,3%
Gesamt	394	100,0%

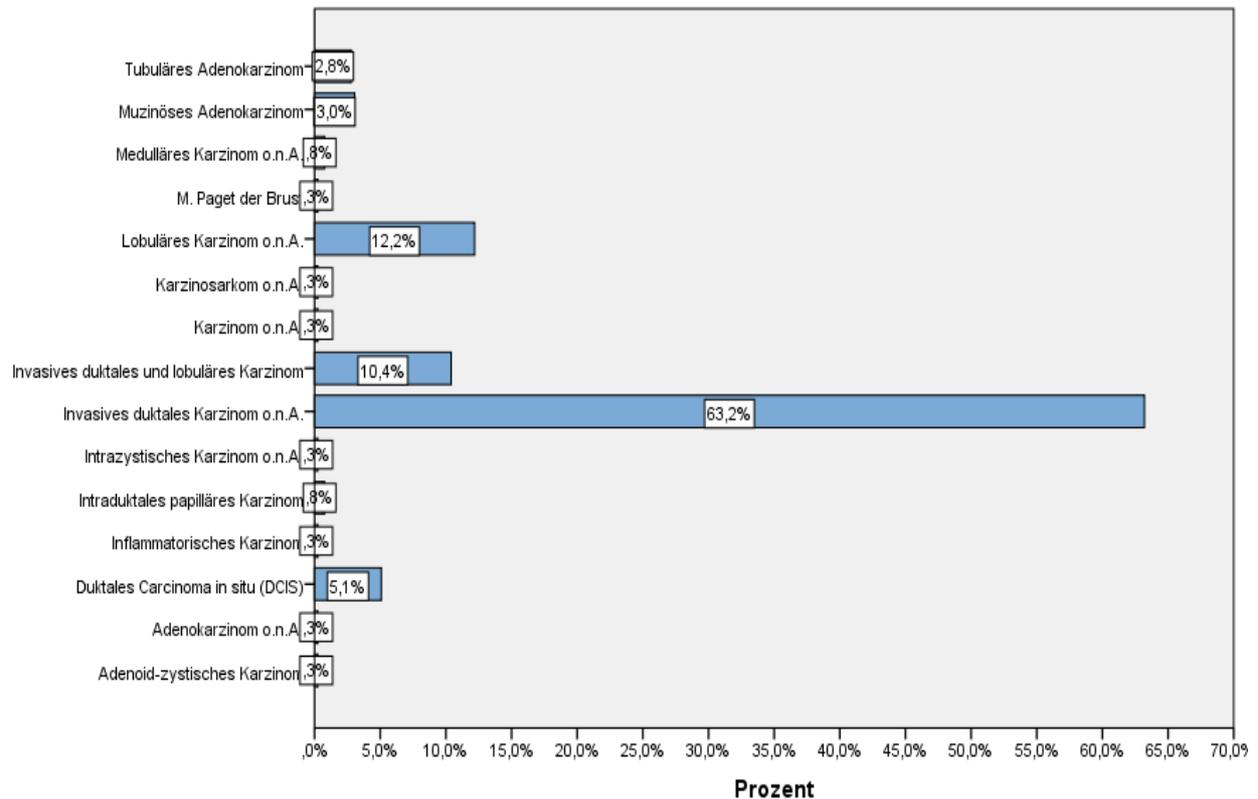
Als nächstes sollen die vorliegenden klinischen und histopathologischen Befunde näher betrachtet werden.

Histologische Mamma- Ca- Klassifikationen

Aus Graphik 2 ist abzulesen, dass es eine Vielzahl verschiedener histologischer Typen von Brustkrebs gibt, diese aber mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit auftreten.

So ist beispielsweise das invasive duktales Karzinom mit einer Patientenzahl von 249 (63,2% aller vorliegenden Präparate) am häufigsten. Das lobuläre Karzinom (12,2% aller Schnitte) und das invasiv duktales und lobuläre Karzinom (10,4%) folgen mit Abstand.

Bestimmte Tumorformen wie der Morbus Paget (0,3%) und das duktales Carcinoma in situ (5,1%) müssen wegen fehlender Invasivität im Folgenden bei verschiedenen Auswertungen bewusst ausgeschlossen werden.



Graphik 2: Prozentuale Aufteilung der verschiedenen histologischen Typen beim Mamma- Karzinom

UICC- Stadium

Stadium	Anzahl	Spalten (%)	
0 0	19	4,8%	
I I	153	38,8%	
II IIA	77	19,5%	
	IIB	39	9,9%
III IIIA	28	7,1%	
	IIIB	10	2,5%
	IIIC	16	4,1%
IV IV	32	8,1%	
X X	20	5,1%	
Gesamt	394	100,0%	

Tabelle 5: Stadienverteilung (UICC)

Hier werden die den Patienten zugehörigen Präparate anhand des Stadiums eingeteilt. Man unterscheidet die UICC-Stadien 0 bis IV. Aus Tabelle 5 kann man ablesen, dass 19 Patienten (4,8%) dem Stadium 0 zugeteilt werden. Hierbei handelt es sich um duktales Carcinomata in situ (DCIS), die bei einigen Untersuchungen bewusst ausgeschlossen werden müssen. 153 Frauen (38,8%) werden dem UICC-Stadium I zugerechnet. Die Stadien II und III sind in Untergruppen unterteilt. Insgesamt zählen 116 Patientinnen (29,4%) zum Stadium II

und 54 Frauen (13,7%) zum Stadium III. Auch die 32 Patienten aus Stadium IV (8,1%) müssen auf Grund ihrer Fernmetastasierung bei einigen Untersuchungen ausgeschlossen werden. Für 20 Schnitte (5,1%) konnte trotz mehrfacher Recherche kein Stadium ermittelt werden. Diese Präparate sind unter dem Stadium X aufgeführt.

Grading

Tabelle 6: Verteilung der Gradingstufen im Kollektiv

	Anzahl	Spalten (%)
G1	64	16,2%
G2	179	45,4%
G3	128	32,5%
GX/ k.A.	23	5,8%
Gesamt	394	100,0%

Aus Tabelle 6 kann man Informationen zur Verteilung der Gradingstufen ablesen. Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv finden sich die Stufen G1 bis G3. 64 Patienten (16,2%) wurden G1 zugeteilt. 45,4% der Frauen zu G2. Zur Gradingstufe 3 wurden insgesamt 128 Frauen gerechnet (32,5%). Bei insgesamt 23 Patientinnen (5,8%) konnte das Grading nicht bestimmt werden beziehungsweise war es trotz

Nachforschungen nicht möglich, in Erfahrung zu bringen, welches Grading vorlag (GX/ k.A.).

Bezug zwischen Grading und Stadium

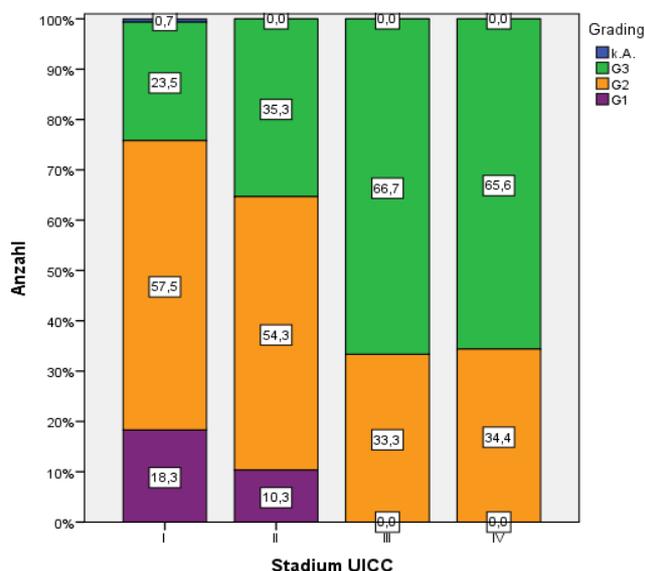
In diesem Zusammenhang scheint es interessant, die Beziehung zwischen Grading und Stadium näher zu betrachten. Tabelle 7 zeigt eine Kreuztabelle, in der beide Variablen einander gegenübergestellt werden. Auffallend zeigt sich, dass mit steigendem UICC-Stadium in der Regel auch die Höhe des Gradings zunimmt. Die beiden Variablen stehen somit in Bezug zueinander und verdeutlichen, dass man immer das Zusammenspiel der Faktoren betrachten sollte. So zeigen beispielsweise 21 Patientinnen, die dem Stadium IV zugeordnet wurden, auch die höchste Gradingstufe G3. Dies entspricht 65,6% aller Patienten mit Stadium IV. Theoretisch wäre es auch möglich gewesen, die Patienten mit Stadium 0 aus der Betrachtung auszuklammern, da es in der Regel nicht üblich ist, für DCIS eine Grading- Stufe anzugeben.

Der Vollständigkeit halber wurden aber auch diese Werte in die Kreuztabelle mit aufgenommen.

	Grading									
	G1		G2		G3		X/ k.A.		Gesamt	
	Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)
0	0	0,0%	1	5,3%	1	5,3%	17	89,5%	19	100,0%
I	28	18,3%	88	57,5%	36	23,5%	1	0,7%	153	100,0%
II	12	10,3%	63	54,3%	41	35,3%	0	0,0%	116	100,0%
III	0	0,0%	18	33,3%	36	66,7%	0	0,0%	54	100,0%
IV	0	0,0%	11	34,4%	21	65,6%	0	0,0%	32	100,0%
X	2	10,0%	10	50,0%	7	35,0%	1	5,0%	20	100,0%
Gesamt	42	10,7%	191	48,5%	142	36,0%	19	4,8%	394	100,0%

Tabelle 7: Gegenüberstellung zwischen Grading und Stadium

In der Graphik 3 wurden die Ergebnisse der Kreuztabelle mit Hilfe eines gestapelten Balkendiagrammes dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden hier allerdings die Stadien 0 und X ausgeklammert und nicht mit graphisch aufgeführt. Auch in dieser Abbildung wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Stadium und Grading besteht. Je höher das Stadium, desto höher ist auch in der Regel der Wert für das Grading.



Graphik 3: Graphische Gegenüberstellung zwischen Grading und UICC- Stadium (ohne Stadium 0 und X)

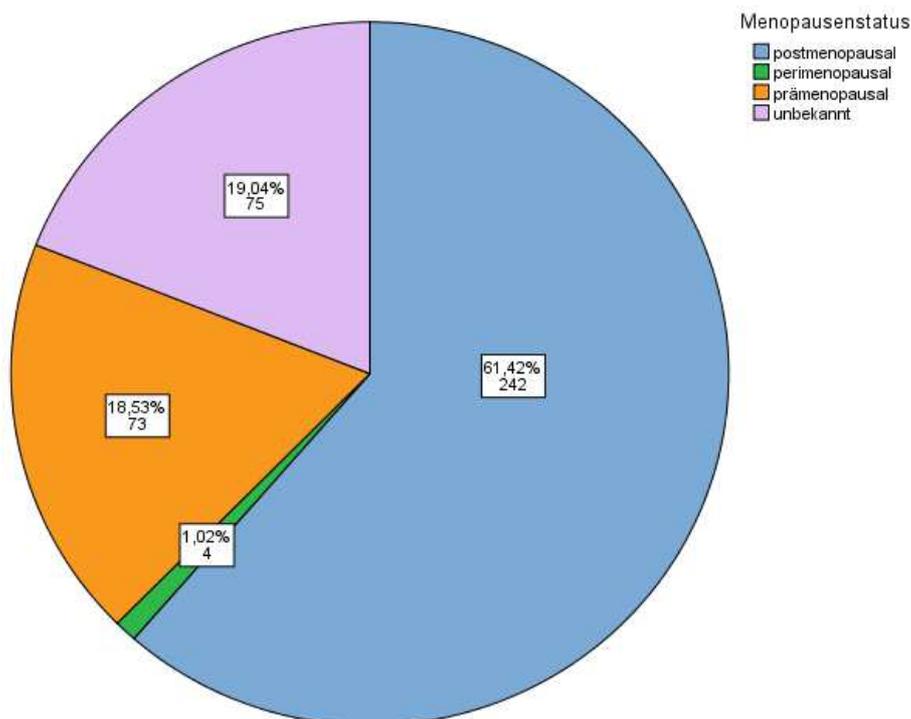
Über die Hälfte der Patienten mit UICC- Stadium I werden der Gradingstufe 2 zugeordnet (57,5%). Stufe 1 und 3 sind mit 18,3% und 23,5% auch relativ häufig.

Beim Stadium II finden sich Patienten der Stufen G1 (10,3%), G2 (54,3%) und G3 (35,3%).

Sowohl bei Stadium III als auch Stadium IV kommen keine Tumorpatienten mit G1 vor. Auch sonst ähneln sich beide in ihrer prozentualen Häufigkeitsverteilung. Bei beiden UICC- Stufen findet sich die Gradingstufe 3 zu über 65%.

Menopausenstatus im Zusammenhang mit dem Rezeptorstatus

Als nächstes soll der Menopausenstatus der 394 Patientinnen betrachtet werden. (Graphik 4) Der überwiegende Teil der Frauen, nämlich 242 (61,42%), befand sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon in der Menopause. 73 Krebspatientinnen (18,53%) waren noch prämenopausal und vier Patientinnen (1,02%) befanden sich gerade perimenopausal. Bei 75 Patienten (19,04%) liegen keine Angaben zum Menopausalstatus vor.



Graphik 4: Menopausenstatus

In der folgenden Tabelle wird der Zusammenhang zwischen Menopausenstatus und Hormonrezeptorstatus dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Menopausen- und Rezeptorstatus

		Rezeptorstatus					
		Negativ		Positiv		Gesamt	
		Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)	Anzahl	Zeilen (%)
Menopausen- Status	postmenopausal	34	14,0%	208	86,0%	242	100,0%
	perimenopausal	1	25,0%	3	75,0%	4	100,0%
	prämenopausal	20	27,4%	53	72,6%	73	100,0%
	unbekannt	13	17,3%	62	82,7%	75	100,0%
	gesamt	68	17,3%	326	82,7%	394	100,0%

Von den 242 postmenopausalen Frauen zeigt die überwiegende Mehrheit (86,0%) einen positiven Hormonrezeptorstatus. Nur 34 Patientinnen in der Postmenopause sind rezeptor-negativ (14%). Auch in der Perimenopause zeigt sich vor allem ein positiver Hormonrezeptorstatus (75%). Auch von den 73 prämenopausalen Patientinnen ist die Mehrzahl (72,6%) hormonrezeptor-positiv. Bei den 75 Frauen, deren Menopausenstatus unbekannt ist, findet sich auch überwiegend ein positiver Rezeptorstatus (82,7%). Alles in allem ist die überwiegende Mehrzahl der Tumorpatientinnen in diesem Kollektiv hormonrezeptorpositiv (82,7%).

Her2/neu

Die Betrachtung des Her2/neu Wertes erbrachte folgende Verteilung:

Tabelle 9: Her2/neu- Status der Patientinnen

		Anzahl	Spalten (%)
Her2/neu	negativ	233	59,1%
	positiv	148	37,6%
	k.A.	13	3,3%
	Gesamt	394	100,0%

Der überwiegende Teil der 394 Frauen, nämlich 233 (59,1%), ist Her2 negativ. Einen positiven Marker findet man dagegen bei 148 Patientinnen (37,6%). Bei 13 Krebspatienten (3,3%) waren trotz Recherche keine Angaben zum Her2/neu detektierbar.

Lymphknoten/ Sentinel- Lymphknoten

Wichtig erscheint außerdem, inwieweit Lymphknoten zur Untersuchung entnommen wurden und wie viele davon tumorös befallen waren. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden nur Patienten betrachtet, die operiert wurden, bei denen also eine Lymphknotenentnahme überhaupt möglich war. Außerdem wurden Patienten des Stadiums IV wegen bereits erfolgter Metastasierung ausgeschlossen. So bleiben von den ursprünglich 394 Frauen noch 355 zur weiteren Betrachtung.

Tabelle 10: Anzahl der untersuchten/befallenen Lymphknoten (nur operierte Patienten; kein Stadium IV)

		Lymphknoten untersucht	Lymphknoten befallen
N	Gültig	273	273
	Fehlend	82	82
Mittelwert		13,72	2,08
Median		14,00	,00
Minimum		1	0
Maximum		57	57

Von den verbliebenen 355 Patientinnen wurden bei 273 (76,9%) Lymphknoten entnommen. Bei 82 operierten Patienten (23,1%) unterließ man eine diesbezügliche Lymphknotenuntersuchung. Im Mittel wurden 13,72 Lymphknoten überprüft. Der Median liegt bei 14,00 Knoten.

Das Minimum der untersuchten Lymphknoten lag bei eins, das Maximum bei 57. Befallen waren dagegen im Mittel nur 2,08 Knoten, mit einem Minimum von Null befallenen Lymphknoten und einem Maximum von 57. Die Maxima erscheinen recht hoch, wurden aber mit den digitalisierten Befunden nochmals abgeglichen.

Tabelle 11: Anzahl der untersuchten/befallenen Sentinel-Lymphknoten (nur operierte Patienten; kein Stadium IV)

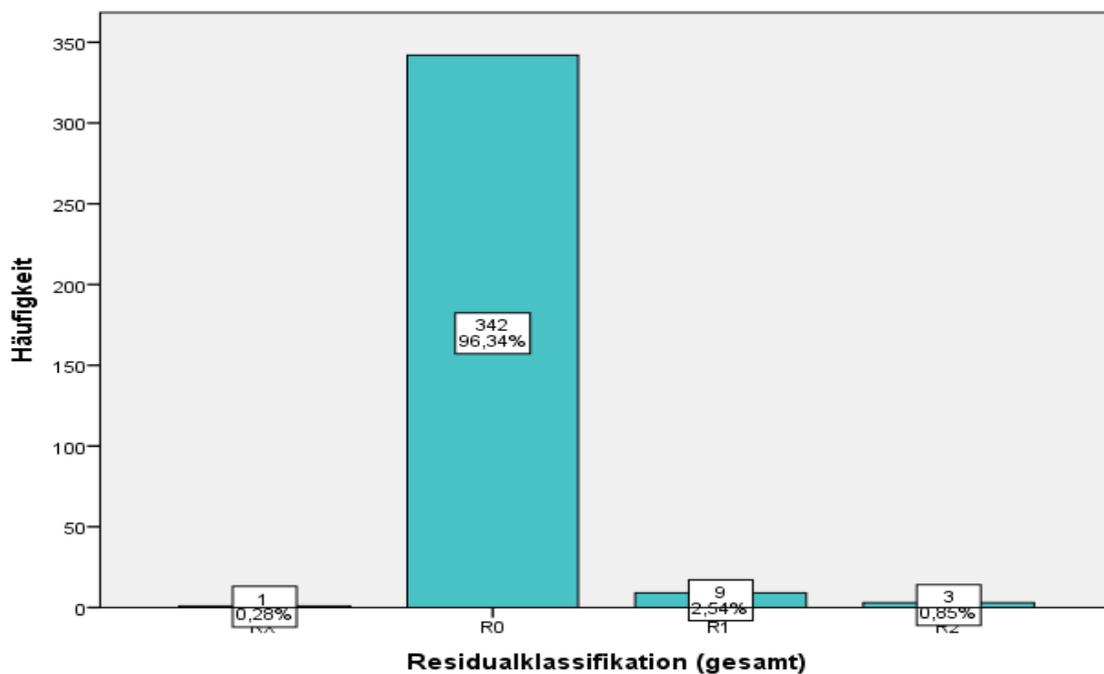
		Sentinel untersucht	Sentinel befallen
Anzahl	Gültig	98	98
	Fehlend	257	257
Mittelwert		2,42	0,19
Median		2,00	0,00
Minimum		1	0
Maximum		10	4

Auch bei der Betrachtung der Sentinel-Lymphknoten (Tabelle 11) wurden nur operierte Patienten betrachtet, die nicht das Stadium IV hatten. 98 der 355 übrigen Patienten erhielten eine Sentinel-Untersuchung, bei der im Mittel 2,42 Knoten betrachtet wurden. Überprüft wurden hier ein bis zehn

Sentinel- Lymphknoten je Patient. Einen befallenen Sentinel- Knoten fand man im Mittel bei 0,19 untersuchten Knoten. Minimal null, maximal vier der Knoten waren je Patientin befallen.

Residualklassifikation

Zuletzt wird bei Beschreibung der klinischen und histologischen Parameter noch auf die Residualklassifikation (R) eingegangen. Für Prognose und Therapie spielt es eine entscheidende Rolle, ob der komplette Tumor intraoperativ entfernt werden konnte oder ob befallene Reste zurückgeblieben sind. Daher macht es auch hier Sinn, nur operierte Frauen in die Statistik aufzunehmen und Stadium IV- Patienten auszuklammern.



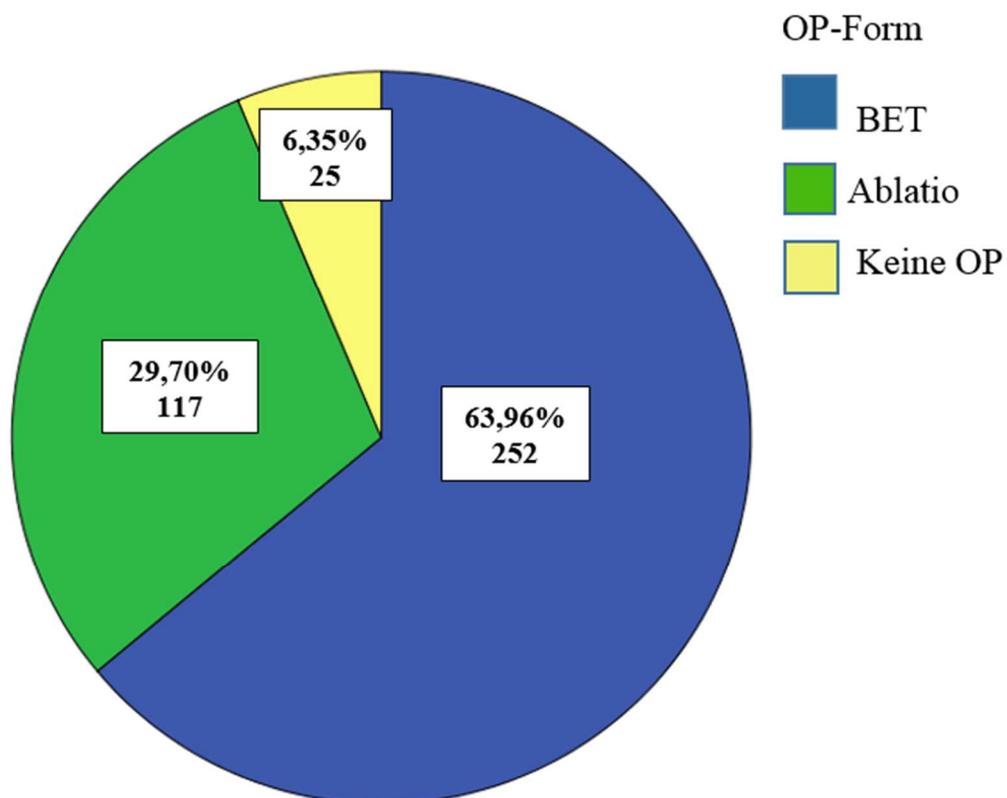
Graphik 5: Residualklassifikation (gesamt) (nur operierte Patienten; kein Stadium IV)

342 der 355 Patientinnen (96,34%) wurden R0 reseziert, was bedeutet, dass der Tumor restlos entfernt werden konnte. Bei insgesamt 12 der 355 Frauen war eine solche komplett eradizierende Operation nicht erfolgt und Reste des Tumors blieben zurück. Neun der Frauen (2,54%) wurden R1 reseziert, drei Patienten (0,85%) R2. In einem Fall (0,28%) war es trotz Nachforschung nicht möglich, eine Residualklassifikation zu bestimmen.

Therapie

Bei der Behandlung spielt es vor allem eine Rolle, ob operiert wurde oder nicht, und welche Form der Operation durchgeführt worden ist (siehe Graphik 6).

Bei der überwiegenden Zahl der Patientinnen wurde eine brusterhaltende Therapie (BET) durchgeführt. Hierbei wurde versucht alles tumoröse Gewebe mit Sicherheitsabstand zu entfernen, aber die Brust an sich zu erhalten. 252 Patienten (63,96%) wurden brusterhaltend operiert. 117 Frauen (29,7%) wurden abladiert, was bedeutet, dass ihnen die komplette Brust entfernt werden musste.

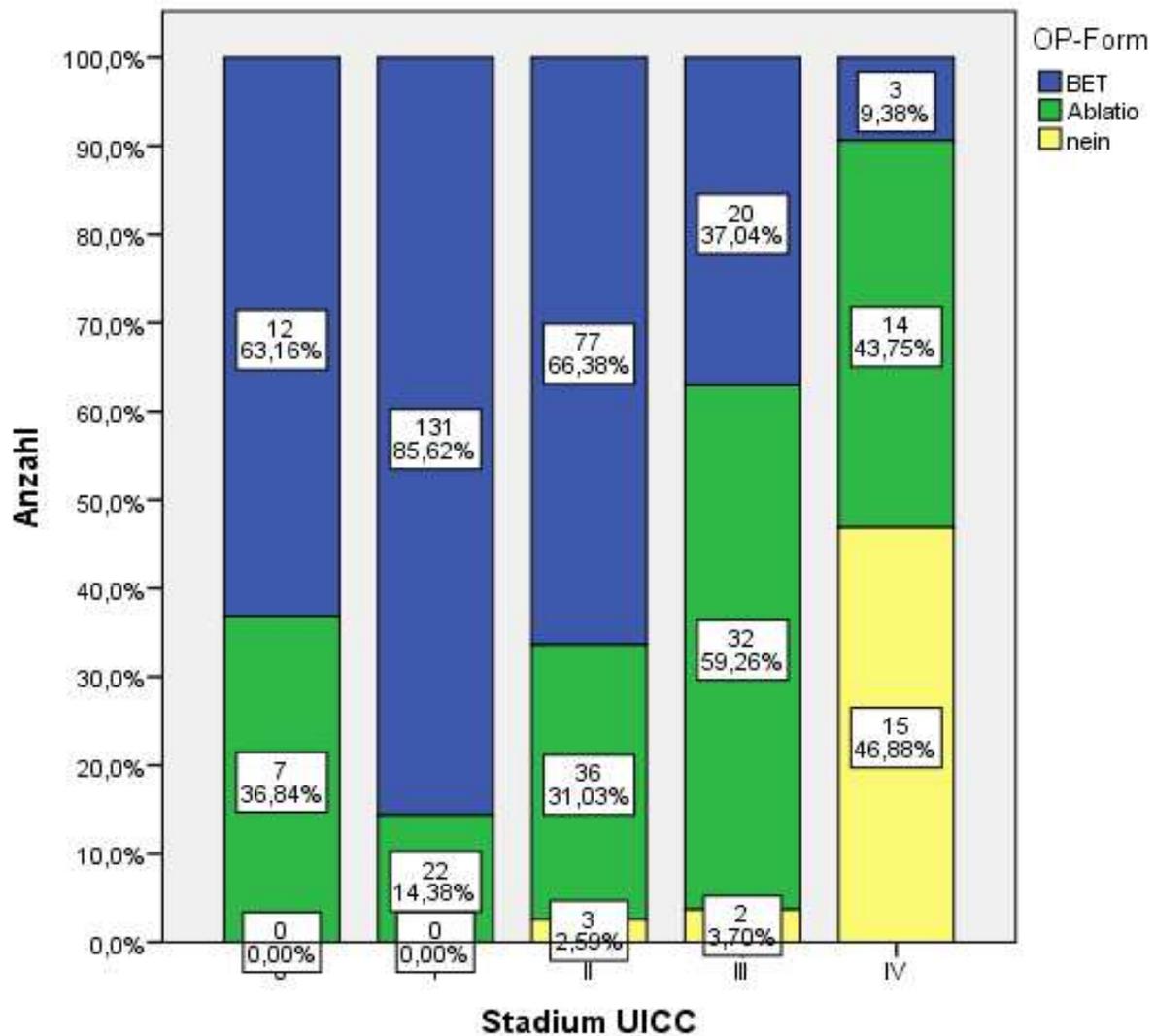


Graphik 6: Aufteilung der OP-Formen

Bei 25 Krebspatienten (6,35%) wurde keine Operation mehr durchgeführt. Laut Daten aus Pathologie und Tumorzentrum waren dies vor allem Patienten mit palliativer Situation, die relativ bald nach Diagnosestellung verstarben, oder auch Frauen, die sich bewusst gegen eine Operation oder gegen eine Therapie im Ganzen aussprachen.

Die nächste Fragestellung ist nun, ob das UICC- Stadium auf irgendeine Weise in Bezug steht zur angewandten Operationsform (siehe Graphik 7).

Graphik 7: Zusammenhang zwischen Stadium und Operationsform



Deutlich ist, dass bei niedrigem Stadium generell eine Operation durchgeführt wurde. Erst bei höheren UICC- Klassen mehren sich Fälle, bei denen nicht operiert wurde. Im Stadium IV nimmt die Anzahl der nicht operierten Mamma-Tumore stark zu (46,88%). Ursache sollte das Vorliegen von Fernmetastasen, sowie die hohe Aggressivität und Mortalitätsrate dieser Tumorklasse sein. Tendenziell kann man feststellen, dass bei niedrigeren Stadien eher brusterhaltend operiert wurde und bei höheren UICC- Klassen der Trend Richtung Ablatio ging.

Tabelle 12 gibt detailliert Aufschluss über die verschiedenen Therapieformen, die bei diesem Patientenkollektiv Anwendung fanden.

Die grobe Einteilung erfolgt in drei große Gruppen, nämlich BET, ABL und keine Operation. Bei jedem dieser Blöcke wird aufgeschlüsselt, welche perioperative Therapie durchgeführt wurde. Hierzu zählen RTX (Strahlentherapie), CTX (Chemotherapie) und HTX (Hormontherapie).

Eine Antihormontherapie war natürlich nur bei den 82% der Frauen mit positivem Hormonrezeptorstatus indiziert. Die Darstellung ist somit eine Vereinfachung und entspricht nicht den Indikationsgruppen.

Tabelle 12: Therapieformen

Operation	Perioperative Therapie	Anzahl	Spalten %
BET	BET+RTX+CTX+HTX	69	27,38
	BET+RTX+CTX	36	14,29
	BET+RTX+HTX	114	45,23
	BET+RTX	12	4,76
	BET+CTX+HTX	5	1,98
	BET+CTX	2	0,79
	BET+HTX	8	3,17
	BET	6	2,38
	Gesamt	252	100
ABL	ABL+RTX+CTX+HTX	27	23,08
	ABL+RTX+CTX	8	6,84
	ABL+RTX+HTX	10	8,55
	ABL+RTX	3	2,56
	ABL+CTX+HTX	10	8,55
	ABL+CTX	10	8,55
	ABL+HTX	22	18,80
	ABL	27	23,08
	gesamt	117	100
Keine OP	RTX+CTX+HTX	5	20,00
	RTX+CTX	2	8,00
	CTX+HTX	2	8,00
	CTX	3	12,00
	HTX	6	24,00
	Therapie nein/ k.A.	7	28,00
	gesamt	25	100

Beispielsweise wurden 45,23% der Patienten mit brusterhaltender Operation anschließend sowohl mit Strahlen- als auch mit Hormontherapie nachbehandelt. Bei 27,38% aller BET-

Patienten kam zusätzlich noch Chemotherapie zum Einsatz. 14,29% der Frauen erhielten neben der BET sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie, aber keine Hormontherapie. Alle anderen Kombinationsvarianten der Nachbehandlung kamen weniger zur Anwendung. Die Leitlinien empfehlen bei jeder brusterhaltenden Operation eine Nachbestrahlung [24]. Knapp 92% der BET- Patienten im vorliegenden Kollektiv erhielten eine Radiatio (RTX).

Bei der Ablatio ergibt sich eine andere Verteilung der Nachbehandlungsvarianten. Sowohl die reine Operation als auch die Kombination von OP mit RTX, CTX und HTX stellen die häufigsten Varianten mit je 23,08% dar. Die Kombination aus Ablatio und endokriner Therapie ist mit 22 Fällen (18,8% aller Ablationen) auch noch ein relativ häufiges Procedere. Alle anderen Nachbehandlungsvarianten kommen seltener vor.

Bei insgesamt 25 Patienten (6,3%) wurde keine Operation durchgeführt. Fünf der Patientinnen (20%) erhielten eine Kombination aus Hormon-, Chemo- und Strahlentherapie. Jeweils zwei der Frauen (8%) erhielten entweder RTX und CTX oder CTX und HTX. Auch die Option einer reinen CTX (12%) oder HTX (24%) kam vor. Sieben Patienten ohne OP (28%) wurden nicht mehr therapiert.

3.2 Deskriptive Analyse der Ki67- Pathologen- Messwerte

3.2.1 Präparatherkunft und Zellverteilung

Ziel war es, möglichst wenige Stenzen auszuwerten und, sofern vorhanden, Resektate für die Untersuchungen heranzuziehen. Bei 292 Schnitten der insgesamt 394 Patientinnen (74,1%) handelte es sich um Resektate. Bei 102 Patienten (25,9%) war kein Resektat verfügbar und man musste auf die vorliegende Stanze zurückgreifen. Jeder Patient hat entweder Resektat oder Stanze, bei keinem liegt beides vor.

Tabelle 13: Präparatherkunft und Zellverteilung der histologischen Schnitte

		Anzahl	Spalten (%)
Präparatherkunft	Stanze	102	25,9%
	Resektat	292	74,1%
	Gesamt	394	100,0%
Zellverteilung	Hotspot	38	9,6%
	gleichmäßige Verteilung	356	90,4%
	Gesamt	394	100,0%

Es spielt eine entscheidende Rolle, ob die Ki67 markierten Zellen im Präparat gleichmäßig verteilt vorliegen oder sich auf bestimmte Hotspots konzentrieren. 38 Schnitte (9,6%) wiesen Hotspots auf. Die übrigen 90,4% der histologischen Schnitte zeigten eine weitgehend gleichmäßige Verteilung der gefärbten Zellen.

3.2.2 Beschreibung der Ki67- Originalmesswerte (Pathologe)

Bei der Ki67- Messung durch die zuständigen Pathologen wurde für jeden Schnitt ein Ki67- Wert ermittelt.

Tabelle 14: Deskriptive Statistik zur Ki67- Pathologenschätzung

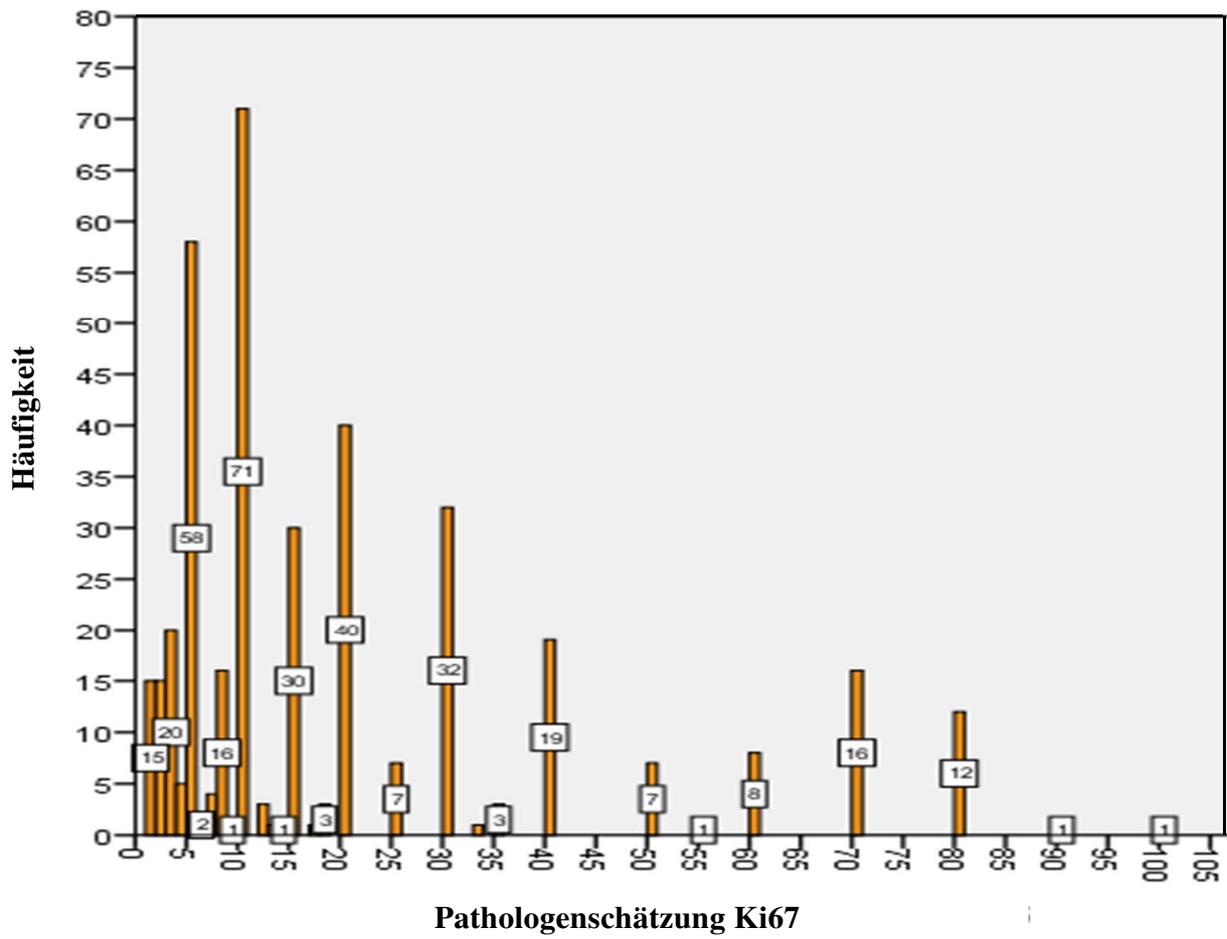
Pathologenschätzung Ki67

N	Gültig	394
	Fehlend	0
Mittelwert		19,99
Median		10,00
Standardabweichung		20,72
Minimum		1
Maximum		100

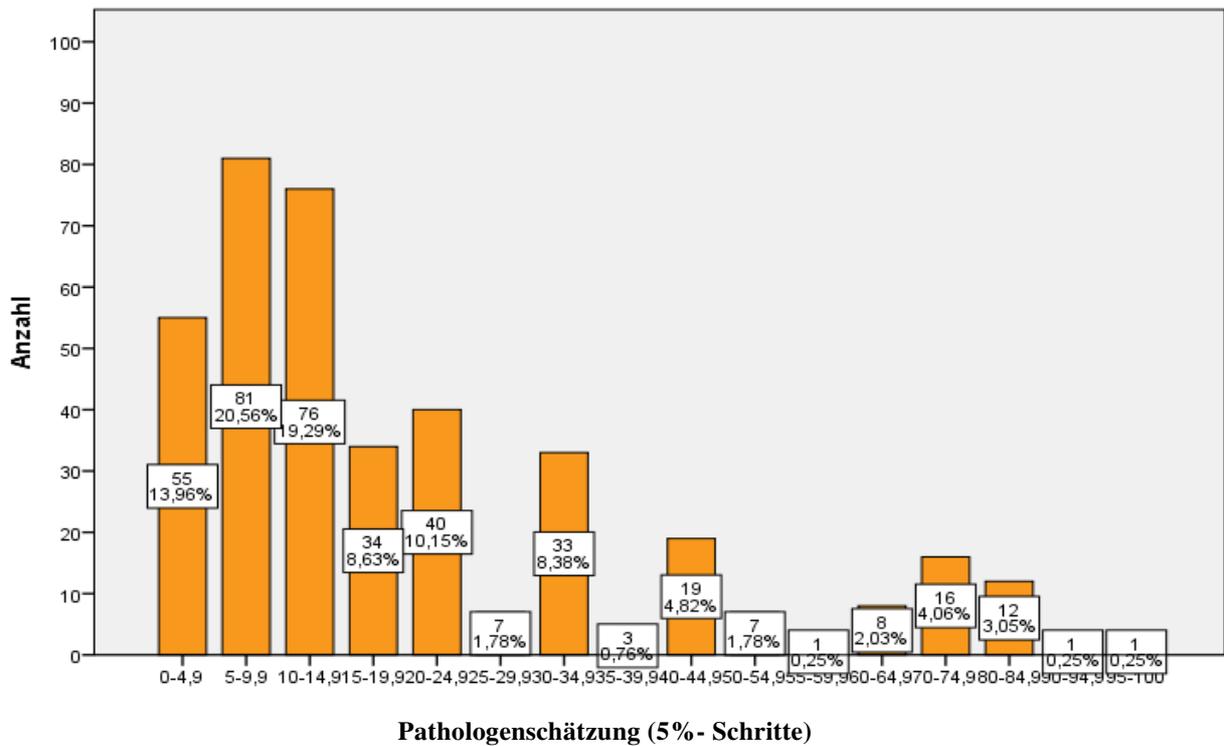
Im Normalfall wird der Ki67- Wert durch den Pathologen nicht exakt ausgezählt, sondern geschätzt. Im Mittel über alle 394 Schnitte liegt dieser Schätzwert bei etwa 20%. Der Median ist bei 10%, die Standardabweichung bei etwa 20,7. Der geringste ermittelte Ki67- Wert liegt bei 1%, der höchste bei 100%.

In Graphik 8, die die Verteilung der vom Pathologen geschätzten Ki67- Werte zeigt, fällt auf, dass runde Zahlen wie 10, 20, 30 und so weiter für den Ki67 bei den Pathologenschätzungen gehäuft erscheinen. So ist beispielsweise bei 71 der 394 Patienten (18,02%) ein Ki67- Wert von 10% angegeben.

Anschließend soll der Frage nachgegangen werden, welche Klassierung der Ki67- Werte die sinnvollste Variante für die weiteren Untersuchungen darstellt.



Graphik 8: Histogramm- Pathologenschätzung Ki67



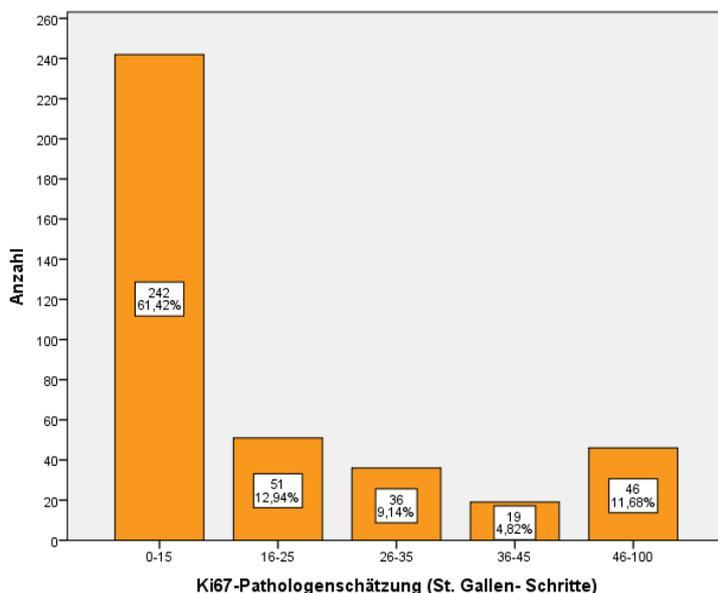
Graphik 9: Ki67-Pathologenschätzung (5%-Schritte)

Zunächst sollen die Proliferationsmarkerwerte in Intervalle zu je 5%- Schritten eingeteilt und mit Hilfe eines Diagramms bildlich dargestellt werden.

Zur besseren Übersicht sind in Graphik 9 nicht nur die absoluten Fallzahlen, sondern auch die prozentualen Anteile mit dargestellt. Die drei größten Balken liegen noch vor der 15%- Marke und betreffen insgesamt 212 Patienten (53,8%). Die verschiedenen Sparten sind unterschiedlich groß und umfassen zum Teil recht kleine Fallzahlen. Das Diagramm ähnelt mit seiner rechtsschiefen Lage einer logarithmischen Normalverteilung.

Sinnvoll erscheint es, die Intervalle zu vergrößern, um die Fallzahlen je Gruppe zu erhöhen. 10%- Schritte wären denkbar, sollen aber der Übersichtlichkeit halber hier nicht extra aufgeführt werden.

Eine weitere Option stellt die St. Gallen Klassifikation dar, die auch in einer umfassenden deutschen Analyse des Ki67- Markers als Prognosefaktor Anwendung fand [57].



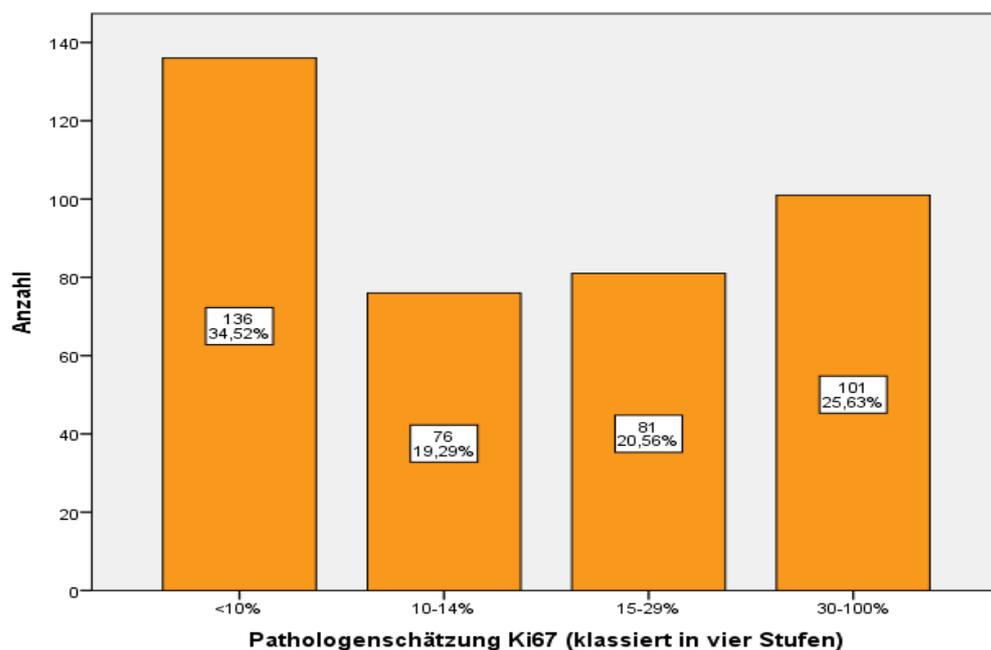
Graphik 10: Ki67-Pathologenschätzung (St. Gallen-Schritte)

Der große Vorteil dieser Einteilung besteht darin, dass es nur noch fünf verschiedene Ki67- Gruppen gibt und der therapeutische Grenzwert von 15% berücksichtigt ist. Allerdings ist auch hier die Gruppengröße immer noch recht unterschiedlich. So werden 242 Personen (61,42%) dem ersten

Intervall zugerechnet. Es gibt aber auch Gruppen mit sehr geringen Fallzahlen wie die vierte Ki67- Sparte mit 4,82% aller Patienten. Daher kann es mit der St. Gallen Klassifikation zu Signifikanzproblemen kommen.

Für eine multivariable Analyse wäre es sinnvoll, Gruppen zu haben, die alle in etwa gleich stark besetzt sind. Daher sollen in einer weiteren Klassifizierungsvariante ungefähr gleich große Gruppen mit ausreichend großer Fallzahl geschaffen werden.

Selbst bei einer Einteilung in vier Kategorien (Graphik 11) differieren die Fallzahlen je Sparte. Zumindest sind jetzt die Fallzahlen pro Gruppe hinreichend groß. Diese Intervalle wurden durch Professor Hofstädter aus der Pathologie der Uniklinik Regensburg festgelegt. Im Folgenden wird diese Einteilungsvariante als „Vier Stufen Modell“ bezeichnet. Der derzeitige Cut- off- Wert von 15% markiert die untere Grenze des Wertebereiches drei (15-29%).



Graphik 11: Ki67-Pathologenschätzung (klassiert in vier Stufen)

Welche Einteilungsvariante am sinnvollsten ist, bleibt zu diskutieren und je nach Betrachtungsziel sorgfältig auszuwählen. Im Folgenden sollen vor allem die St. Gallen Klassifikation und die Einteilung in vier Stufen zur Anwendung kommen. Bei beiden Varianten ist die Gruppenzahl überschaubar und die jeweiligen Fallzahlen scheinen groß genug.

3.3 Beschreibung der selbsterhobenen Ki67- Werte und deskriptiver Vergleich mit den Pathologenwerten

Bei der Beschreibung der selbstausgezählten Ki67- Werte wird neben einer explorativen Datenanalyse die graphische Darstellung der Einzelwerte und die Einteilung mittels verschiedener Klassifikationen betrachtet. Pathologenschätzung und Eigenzählung werden mit Hilfe eines Boxplots verglichen.

Tabelle 15: Explorative Datenanalyse (Ki67- Eigenzählung)

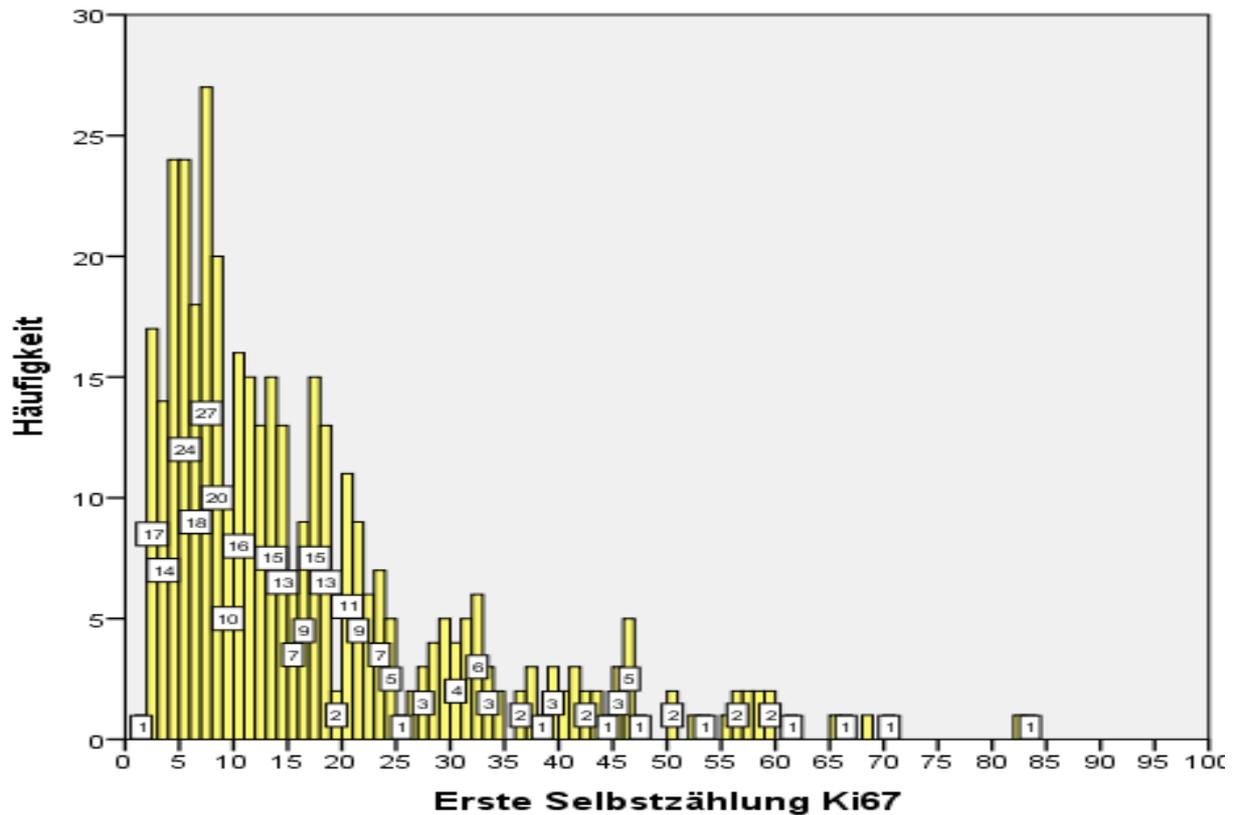
Selbstzählung Ki67

Anzahl	Gültig	394
	Fehlend	0
Mittelwert		17,31
Median		12,50
Standardabweichung		14,967
Minimum		1
Maximum		83

Der Mittelwert der selbst ausgezählten Ki67- Präparate ist mit 17,31% etwas niedriger als der Mittelwert der Pathologenschätzung (19,99%).

Der geringste Zählwert liegt sowohl bei Eigen- als auch bei Pathologenbetrachtung bei 1%. Das Maximum für den Ki67- Wert liegt bei Eigenzählung niedriger (83%) als der Höchstwert der Pathologenschätzung (100%). Der Median der Eigenzählung liegt bei 12,5% (Pathologenschätzung: 10%). Die Standardabweichung liegt bei Eigenzählung bei fast 15, bei der Pathologenschätzung bei 20,72.

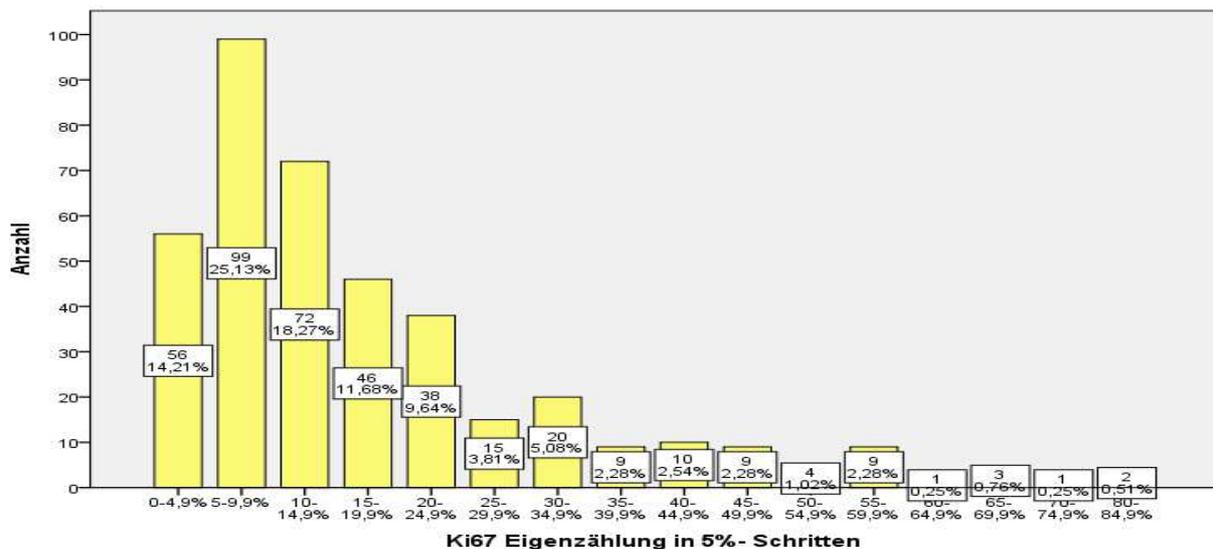
Mit Hilfe eines Histogramms soll die Häufigkeitsverteilung der selbst ausgezählten Ki67- Werte bildlich dargestellt werden.



Graphik 12: Graphische Darstellung der Ki67- Selbstzählung (Histogramm)

Hier wird deutlich, dass, anders als bei der Pathologenschätzung, keine bevorzugten Zahlen vorkommen, die überproportional oft gewählt werden. Der höchste Balken im Histogramm ist durch 27 Patienten repräsentiert. Auch „krumme“ Zahlen tauchen gehäuft auf und die Verteilung der einzelnen Prozentwerte wirkt weiträumiger gestreut.

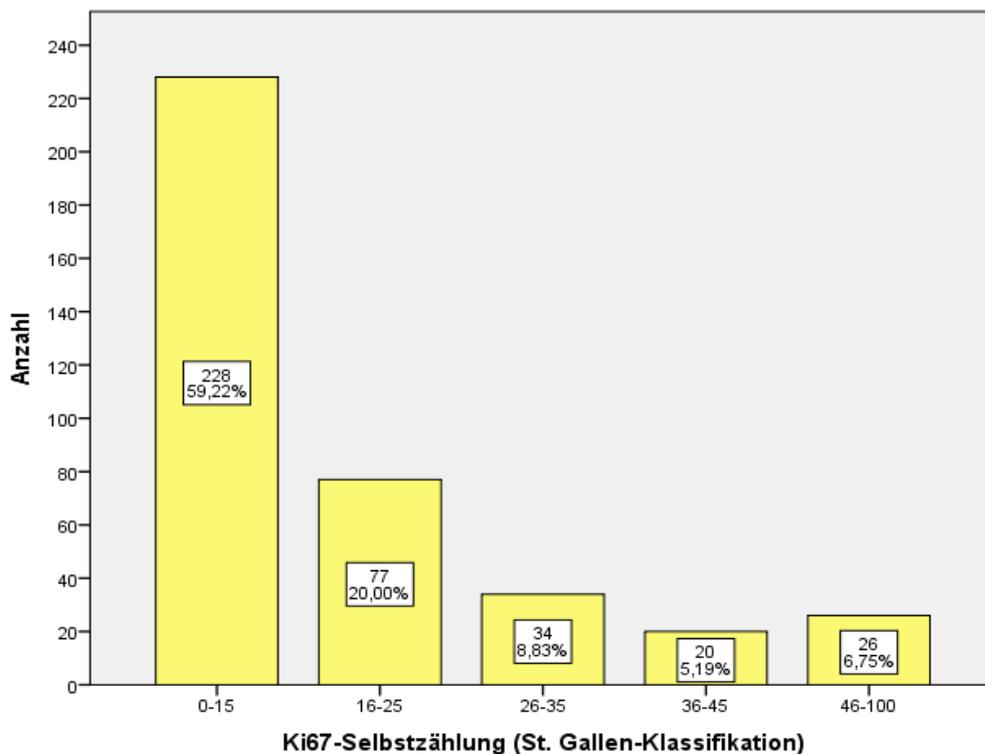
Es folgt eine Einteilung in 5%- Schritte:



Graphik 13: Ki67- Eigenzählung (5%- Schritte)

Zur besseren Informationsgewinnung sind in Graphik 13 sowohl absolute Zahlenwerte als auch Prozentsätze angegeben. 99 der 394 Patientinnen (25,13%) liegen in der Kategorie 5-9,9%. Alle weiteren Kategorien zeigen geringere Fallzahlen. Ab circa 35% finden sich nur mehr wenige Patienten in den einzelnen Kategorien. Nur insgesamt 48 Frauen (12,2%) weisen einen solch hohen Proliferationsmarkerwert auf.

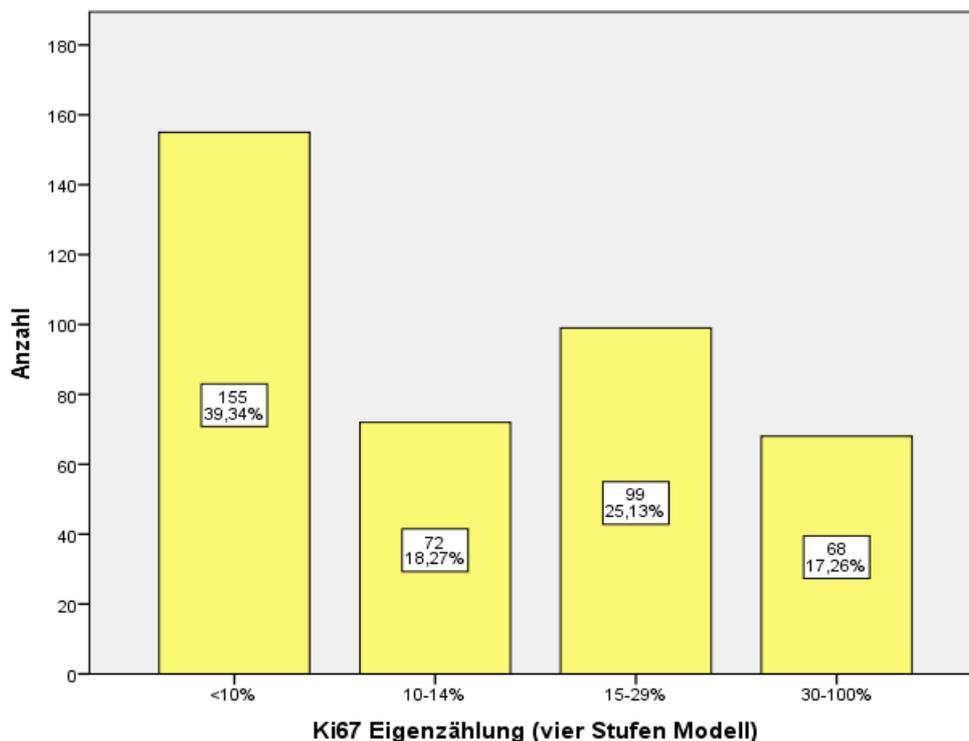
Als nächstes soll eine etwas gröbere Einteilung mittels St. Gallen Klassifikation erfolgen. Betrachtet man die fünf Gruppen der St. Gallen Klassifikation zeigt sich wiederum, dass der Großteil der Patienten (59,22% aller Frauen) der ersten Gruppe von 0-15% zugeordnet werden muss. Nur 20 Betroffene liegen im Ki67- Bereich von 36-45%.



Graphik 14:
Eigenzählung
Ki67 (St.
Gallen-
Klassifikation)

Aus diesem Grund macht es Sinn, auch hier noch die Vier- Stufen- Einteilungsvariante zu erproben:

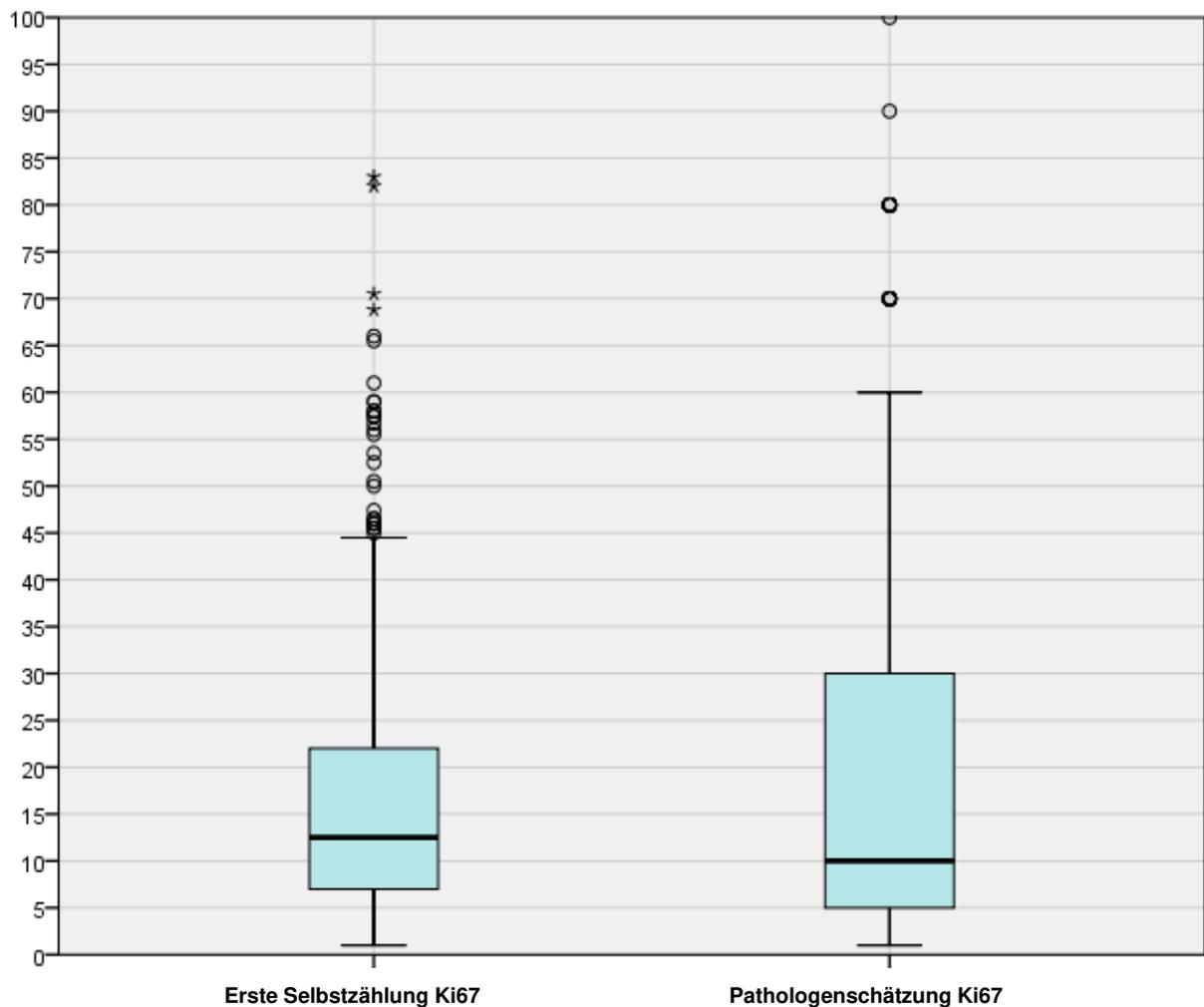
Graphik 15: Eigenzählung Ki67 (Vier Stufen Modell)



Die erste Ki67- Stufe (<10%) beinhaltet mit 155 Patienten (39,34%) die Mehrheit des Kollektivs. Die anderen Gruppen zeigen mit 72, 99 und 68 hinreichend große Fallzahlen.

Ein deskriptiver Vergleich zwischen Eigen- und Pathologenzählung kann mittels Boxplot veranschaulicht werden (Graphik 16).

Die etwas stärkere Linie inmitten der Box stellt den Median dar. Dieser liegt bei der Selbstzählung (linker Boxplot) bei etwa 12,5%, bei der Pathologenschätzung (rechter Boxplot) bei 10%. In der Box an sich finden sich jeweils 50% des Patientenkollektivs. Bei der Pathologenschätzung ist diese Box weitaus höher als bei der Eigenzählung. Die Ki67-Verteilung ist also bei den Pathologen breiter gefächert und bei Darstellung in einem Balkendiagramm weiter nach rechts verschoben als bei der Eigenzählung, was mit einem höheren Mittelwert korrespondiert.



Graphik 16: Vergleich zwischen Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung mit Hilfe eines Boxplots

Die 5%- Marke befindet sich bei beiden etwa auf dem gleichen Niveau und liegt bei einem Ki67 von etwa 2%. Die Linie, bis zu der 25% der Patienten eingeordnet werden können, liegt bei der Eigenzählung bei etwa 7%, bei der Pathologenschätzung etwas niedriger, nämlich bei einem Ki67 von 5%. Die Marke, bis zu der 75% der Patienten eingeordnet werden können, liegt bei der Selbstzählung (Ki67= 22%) um einiges niedriger als bei der Untersuchung durch den Pathologen (Ki67= 30%). Auch der Wert, bis zu dem 95% der Patienten liegen, ist bei den Pathologen um ein Vielfaches höher (Ki67= 60%) als bei den selbsterhobenen Ergebnissen (Ki67= 44%). Die Kreise, die über den Boxplots verstreut zu sehen sind, stellen lediglich Ausreißer dar, die in die weiteren Betrachtungen nicht mit einfließen.

3.4 Statistischer Vergleich zwischen Pathologenschätzung und Eigenzählung

Test auf Normalverteilung

Um feststellen zu können, welche Tests für die Auswertung im Rahmen eines Vergleiches herangezogen werden können, soll zunächst untersucht werden, ob die Variablen normalverteilt vorliegen.

Tabelle 16: Test auf Normalverteilung bei Ki67- Selbstzählung und Pathologenschätzung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Erste Selbstzählung Ki67	0,154	394	0,000	0,830	394	0,000
Pathologenschätzung Ki67	0,226	394	0,000	0,778	394	0,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Sowohl im Kolmogorov- Smirnov- Test als auch im Shapiro- Wilk- Test zeigen sich bei beiden Ki67- Zählungen Signifikanzen von unter 5% ($p < 0,001$). Somit zeigt sich, dass keine der beiden Zählungen normalverteilt vorliegt. Daher können bestimmte Untersuchungen (wie beispielsweise der t-Test) nicht angewendet werden, da diese nur bei Normalverteilung zulässig sind. Trotz allem soll im Folgenden der Vollständigkeit halber ein Mittelwertvergleich mittels t-Test erfolgen, im Anschluss daran aber auch noch ein Wilcoxon- Test, der auch bei nicht normalverteilten Parametern anwendbar ist.

Mittelwertvergleich: t-Test (verbundene Stichprobe)

Mit dem t-Test bei verbundenen Stichproben werden die Mittelwerte der zwei Variablen Ki67- Selbstzählung und Pathologenschätzung miteinander verglichen. Hierbei wird der gleiche Patientenschnitt zweimal beurteilt, zum einen durch den Pathologen, zum anderen durch die Eigenzählung.

Tabelle 17: T-Test (Eigenzählung/ Pathologenschätzung)

Statistik bei gepaarten Stichproben

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1 Erste Selbstzählung Ki67	17,31	394	14,967	0,754
Paaren 1 Pathologenschätzung Ki67	19,99	394	20,715	1,044

Korrelationen bei gepaarten Stichproben

	N	Korrelation	Signifikanz
Paaren 1 Erste Selbstzählung Ki67 & Pathologenschätzung Ki67	394	0,826	0,000

Test bei gepaarten Stichproben

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)
	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paaren 1 Erste Selbstzählung Ki67 Pathologenschätzung Ki67	-2,675	11,875	0,598	-3,851	-1,498	-4,471	393	0,000

Der Mittelwert der Selbstausswertung (17,31%) liegt niedriger als der der Pathologenzählung (19,99%). Somit unterscheiden sich die Ki67- Mittelwerte um 2,68%- Punkte. Die Korrelation der Mittelwerte ist laut Auswertung recht hoch und liegt bei 0,826. Die Signifikanz liegt weit unter 5%, was bedeutet, dass die Mittelwerte hoch signifikant differieren.

Da der t- Test nur bei normalverteilten Variablen angewendet werden darf, diese Voraussetzung hier aber nicht erfüllt ist, müssen noch andere Tests zusätzlich erprobt werden.

Wilcoxon Test

Tabelle 18: Wilcoxon-Test zum Vergleich Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung

Statistik für Test ^a	
	Pathologenschätzung Erste Selbstzählung Ki67
Z	-2,488 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,013

Der Wilcoxon Test setzt keine normalverteilten Variablen voraus. Wie aus Tabelle 18 zu lesen, liegt die Signifikanz unter dem 5%-Niveau ($p = 0,013$). Zwar ist die Signifikanz nicht mehr so hoch wie

beim t-Test, aber dennoch ausreichend, um zu belegen, dass die Mittelwerte der beiden Zählungen signifikant unterschiedlich sind.

Bestimmung des Kappa- Koeffizienten mit klassierten Ki67- Werten (Vier Stufen)

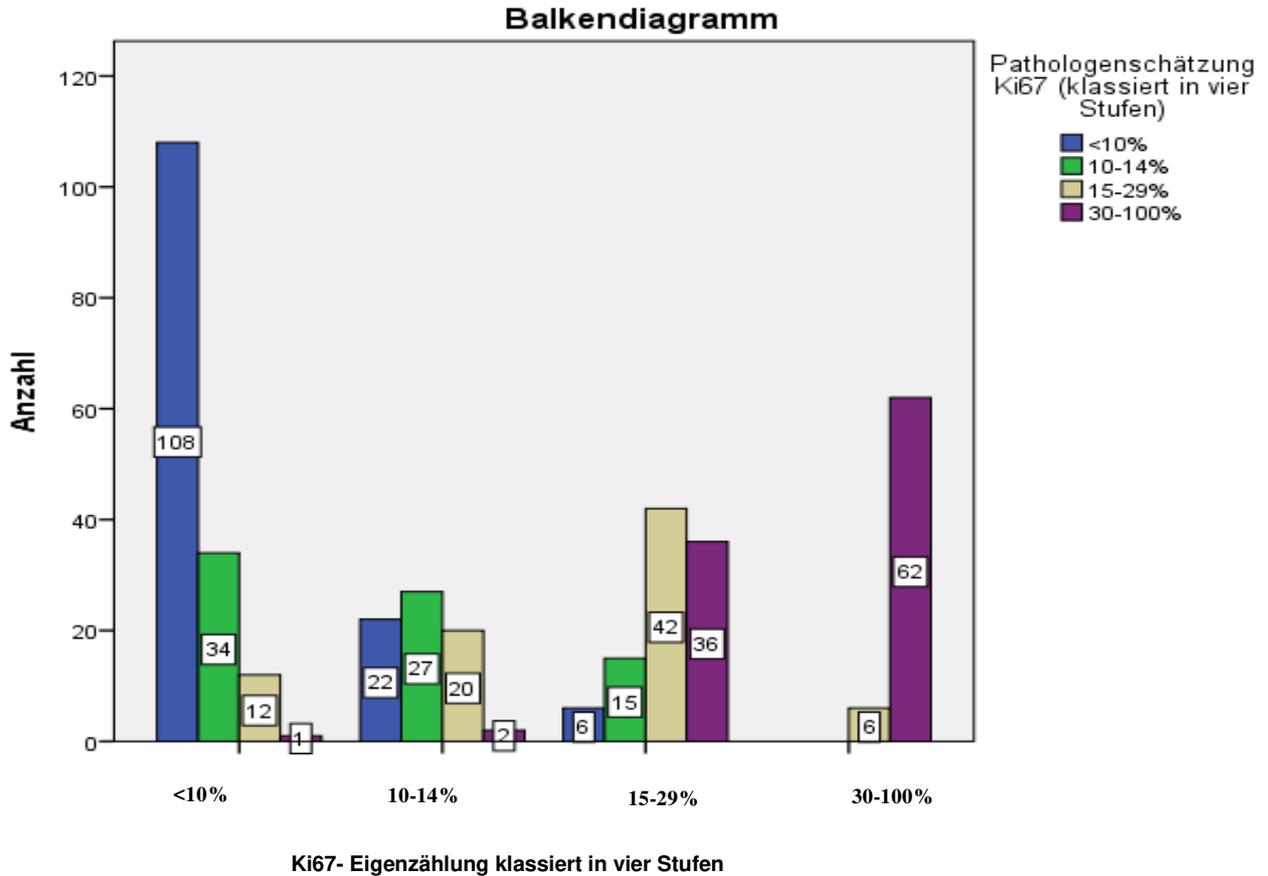
In der Pathologie findet der Kappa-Koeffizient oft Anwendung, wenn es darum geht, zwei verschiedene Messungen oder Schätzungen am gleichen Objekt miteinander zu vergleichen und festzustellen, ob diese signifikant unterschiedlich voneinander sind.

Hier ist die Anwendung des Kappa allerdings kritisch, da in der Regel nur eine geringe Zahl verschiedener Gruppen miteinander verglichen werden kann. Für die folgende Auswertung wird die Vier- Stufen- Einteilung des Ki67 als Basis genommen. Kappa setzt keine normalverteilten Variablen voraus.

Aus Tabelle 19 und Graphik 17 wird deutlich, dass die Ki67- Eigenzählung und die Schätzung der Pathologen über die Vier- Stufen- Klassierung relativ gut übereinstimmen.

Tabelle 19: Gegenüberstellung Eigenzählung/Pathologenschätzung (jeweils in vier Stufen)

	Pathologenschätzung Ki67 (klassiert in vier Stufen)	Gesamt				
		<10%	10-14%	15-29%	30-100%	
Ki67 Eigenzählung (Vier Stufen Modell)	<10%	108	34	12	1	155
	10-14%	22	27	20	2	72
	15-29%	6	15	42	36	99
	30-100%	0	0	6	62	68
Gesamt		136	76	81	101	394



Graphik 17: Gegenüberstellung von Eigenzählung und Pathologenschätzung jeweils in vier Stufen

Graphik 17 zeigt die Verteilung der Pathologenschätzungen in Abhängigkeit von der Eigenzählung, jeweils in vier Klassen. Blau steht in der Graphik für diejenigen, die laut Pathologenbefund ein Ki67 von unter 10% aufweisen. Der überwiegende Teil dieser Gruppe, nämlich 108 Frauen, zeigt auch bei der Eigenzählung einen Proliferationsmarkerwert von unter 10%. Zu höheren Prozentsätzen auf der x-Achse hin nimmt die Höhe des blauen Balkens immer mehr ab. Ähnlich verhält es sich auch bei den anderen Gruppen. Zumeist liegt der höchste Balkenausschlag bei dem Prozentsatz vor, bei dem auch die Pathologenschätzung liegt. Die genauen Fallzahlen der Gegenüberstellung von Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung (jeweils in vier Stufen) werden in Tabelle 19 aufgezeigt. Vor allem in den oberen und unteren Ki67- Bereichen zeigen sich große Übereinstimmungen.

Zum Berechnen des gewichteten Kappa-Koeffizienten (für Messwerte mit mehr als zwei Kategorien) gibt es in SPSS keine Prozedur. Daher wurde auf einen im Internet angebotenen Online- Rechner zurückgegriffen, der den ungewichteten, den linearen und den quadratisch gewichteten Kappa- Wert nach Eingabe der eigenen Daten berechnet [58]. Der ungewichtete

Kappa ist hier nicht aussagekräftig, da er die Distanz der Kategorien untereinander nicht berücksichtigt.

Die hieraus gewonnenen Kappa- Werte lauten wie folgt:

Ungewichteter Kappa: 0,4633

Linearer Kappa: 0,6549

Quadratisch gewichteter Kappa: 0,7949

Der quadratisch gewichtete Kappa- Koeffizient ist derjenige Wert, der am besten geeignet ist, vier verschiedenen Kategorien miteinander zu vergleichen, bei denen auch der Abstand zwischen den Kategorien eine Rolle spielt, also bei ordinalen Werten wie den Ki67- Kategorien. Je höher dieser Wert ist, also je näher er an der Zahl eins liegt, desto stärker zeigt sich, dass die zu vergleichenden Gruppen in den ausgewählten Kategorien übereinstimmen. Ein Ergebnis von ungefähr 0,79 ist also ein recht hoher Kappa- Wert. Laut Online- Statistik- Tabellen [59] zeigt ein Kappa- Koeffizient von 0,79 „starke Übereinstimmung“ zwischen den zwei Ki67- Zählungen. Die Gruppen stimmen also gut überein, sind aber nicht identisch.

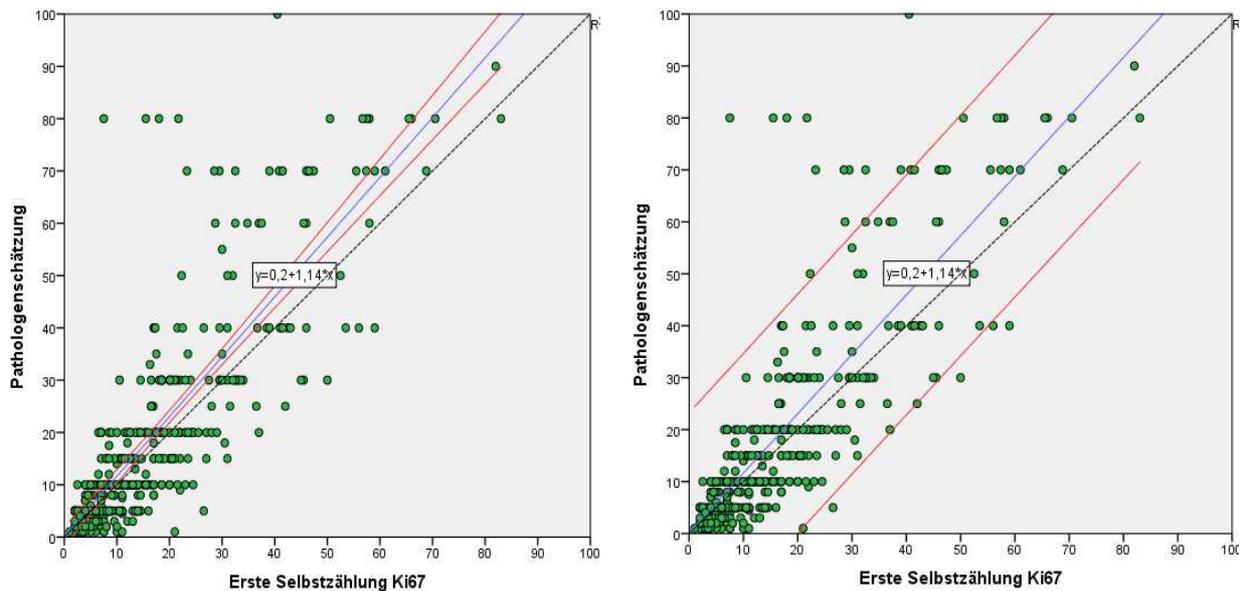
Streudiagramm mit Regressionslinie und Konfidenzintervall; Korrelationskoeffizient Pearson

Mit Hilfe des dargestellten Streu- Punkt- Diagrammes in Graphik 18 werden Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung miteinander verglichen.

Bei der gestrichelten Linie handelt es sich um die Winkelhalbierende des ersten Quadranten mit der Gleichung $y = x$. Im Idealfall lägen alle Punkte auf dieser Linie, und Eigenzählung und Pathologenschätzung entsprächen einander. Bis auf einige Ausreißer liegen die meisten Punkte mehr oder weniger nahe um diese Linie verteilt. Auffällig erscheint die starke Diskrepanz zwischen einigen extrem hohen Pathologenschätzwerten und den sehr viel niedrigeren eigenen Zählergebnissen.

Betrachtet man die Anpassungslinie einer einfachen linearen Regression (blaue Linie), sieht man, dass diese von der Winkelhalbierenden etwas abweicht. Die Gleichung der Anpassungslinie lautet $y = 1,14x + 0,2$. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt folglich bei 0,2 und geht nicht durch den Nullpunkt. Allerdings ist diese Abweichung relativ klein und liegt

noch im Rahmen. Die Steigung der Anpassungslinie liegt bei 1,14, was bei einem erwarteten Wert von 1,0 auch noch in Ordnung ist.



Graphik 18: Streudiagramm mit Regressionslinie- Vergleich Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung

Die anderen beiden Linien in roter Farbe legen das Konfidenzintervall (linkes Bild) und das Vorhersageintervall (rechte Graphik) dieser Regressionsgeraden fest. Das Konfidenzintervall wird durch die Mittelwerte bestimmt, das Vorhersageintervall ist von den individuellen Werten abhängig. Insgesamt ist zu beobachten, dass die Pathologenschätzungen bei Abweichungen eher zu höheren als zu niedrigeren Werten gegenüber der Eigenzählung tendieren. Deutlich außerhalb des Vorhersageintervalls liegen insbesondere zehn Wertepaare mit eigenen Zählungen unter 30% und Pathologenschätzungen über 50%. Extreme Abweichungen der Pathologenwerte haben also starken Einfluss auf dieses Intervall. Je höher die Fallzahl, desto geringer werden die Intervalle. Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt mit 0,862 relativ hoch.

Es folgt eine weitere wichtige Untersuchung zur Prüfung der Korrelation zwischen Ki67-Eigenzählung und Pathologenschätzung, nämlich der Pearson- Korrelationskoeffizient.

Tabelle 20: Pearson-Koeffizient (Ki67-Eigenzählung/Pathologenschätzung)

Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Standardabweichung	Anzahl
Erste Selbstzählung Ki67	17,31	14,967	394
Pathologenschätzung Ki67	19,99	20,715	394

Korrelationen

	Erste Selbstzählung Ki67	Pathologenschätzung Ki67
Korrelation nach Pearson	1	0,826**
Erste Selbstzählung Ki67 Signifikanz (2-seitig)		0,000
Anzahl	394	394
Korrelation nach Pearson	0,826**	1
Pathologenschätzung Ki67 Signifikanz (2-seitig)	0,000	
Anzahl	394	394

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

Betrachtet man den Pearson- Koeffizienten zeigt sich eine recht hohe Korrelation von 0,826 bei einem Signifikanzniveau von unter 5% ($p < 0,001$). Der Pearson- Koeffizient hat den Vorteil, dass nicht nur eine Aussage über die Übereinstimmung der Werte getroffen wird sondern auch über die Distanz. Der Vollständigkeit halber sind oben nochmals Mittelwerte und Standardabweichungen der Ki67- Eigenauswertung und Pathologenzählung mit aufgeführt.

Zusammenfassung

In allen durchgeführten Betrachtungen zeigen sich zum Teil Unterschiede zwischen Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung, wobei letztere bei Abweichungen eher zu hoch ausfallen. Die Korrelation beider Zählwerte ist allerdings sehr hoch. Besonders bei histologischen Schnitten mit Hotspots scheinen Fehleinschätzungen des Ki67-Wertes durch den Pathologen leicht möglich.

Beide Zählungen sind nicht normalverteilt, weshalb bestimmte statistische Tests, wie beispielsweise auch der t- Test, nicht angewendet werden dürften. Um die Mittelwerte dennoch vergleichen zu können, nutzt man den Wilcoxon Test. Dieser zeigt, dass die Mittelwerte beider Zählungen signifikant unterschiedlich liegen (Wilcoxon $p = 0,013$). Mit Hilfe des quadratisch gewichteten Kappa- Koeffizienten vergleicht man die beiden Ki67- Zählungen untereinander, jeweils klassiert in vier Stufen und unter Berücksichtigung der Distanzen zwischen den Kategorien. Der Kappa- Wert zeigt hohe Übereinstimmung in den gewählten Kategorien (Kappa = 0,7949). Dass die Proliferationsmarkerzählungen starke Korrelation zeigen, wird durch den Pearson- Koeffizienten belegt (Korrelation nach Pearson 0,826) und mittels Streudiagrammen graphisch dargestellt.

3.5 Untersuchungen der selbsterhobenen Ergebnisse von Ki67- Doppelmessungen an einem Kollektiv von 50 Patientinnen

Um die Qualität der Selbstzählung zu überprüfen, werden zwei Eigenzählungen an einem Kollektiv von 50 Patienten durchgeführt.

Test auf Normalverteilung

Auch bei dieser Untersuchung soll zunächst überprüft werden, ob die beiden Variablen normalverteilt vorliegen. Zu diesem Zweck werden Tests nach Kolmogorov- Smirnov und Shapiro- Wilk durchgeführt (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Test auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	Df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Erste Selbstzählung Ki67	0,120	50	0,070	0,943	50	0,018
Zweite Selbstzählung Ki67	0,156	50	0,004	0,919	50	0,002

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Die erste Selbstzählung zeigt beim Test nach Kolmogorov- Smirnov ein Signifikanzniveau von über 5%, nach Shapiro-Wilk unter 5%. Die zweite Selbstzählung liegt dagegen in beiden Tests

signifikant unter 5%. Dies hat zur Folge, dass einige Tests, wie zum Beispiel der t- Test, nur unter Vorbehalt Anwendung finden können und zur Ergänzung andere Untersuchungen wie beispielsweise der Wilcoxon- Test nötig sind. Dieser ist, wie bereits erwähnt, unabhängig davon, ob die beiden Variablen normalverteilt vorliegen oder nicht.

Trotz allem wird zunächst der Vollständigkeit halber ein t- Test durchgeführt.

Mittelwertvergleich: T-Test (verbundene Stichprobe)

Die im Folgenden aufgeführte Tabelle zeigt den Mittelwertsvergleich mittels t-Test.

Tabelle 22: T-Test (Mittelwertvergleich zwischen erster und zweiter Ki67-Selbstzählung)

Statistik bei gepaarten Stichproben

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	
Paaren 1	Erste Selbstzählung Ki67	27,98	50	19,199	2,715
	Zweite Selbstzählung Ki67	28,390	50	19,6329	2,7765

Korrelationen bei gepaarten Stichproben

	N	Korrelation	Signifikanz	
Paaren 1	Erste Selbstzählung Ki67 & Zweite Selbstzählung Ki67	50	0,930	0,000

Test bei gepaarten Stichproben

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)	
	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz					
				Untere	Obere				
Paaren 1	Erste Selbstzählung Ki67 - Zweite Selbstzählung Ki67	-0,4140	7,2841	1,0301	-2,4841	1,6561	-0,402	49	0,690

Die Mittelwerte aus erster (27,98%) und zweiter (28,39%) Selbstzählung liegen sehr eng beieinander und sind mit einem p-Wert von 0,690 nicht signifikant voneinander verschieden. Auch Standardabweichungen und Standardfehler unterscheiden sich kaum. Die Korrelation liegt mit 0,93 und einem Signifikanzniveau von weit unter 5% extrem hoch. Die beiden Eigenzählungen korrelieren somit stark und zeigen, dass das Zählsystem reproduzierbar scheint.

Da der t-Test eigentlich nur für normalverteilte Variablen angewendet werden darf, bleibt somit unklar, ob die Verwendung wirklich sinnvoll ist.

Wilcoxon Test

Zur weiteren Überprüfung sollte daher noch der Wilcoxon Test erfolgen.

Hier liegt die Signifikanz weit über dem 5%- Niveau ($p=0,958$). Die Mittelwerte sind also nicht signifikant unterschiedlich.

Statistik für Test ^a	
	Zweite Selbstzählung Ki67 - Erste Selbstzählung Ki67
Z	-,053 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,958

Tabelle 23: Wilcoxon- Test (erste und zweite Selbstzählung)

a. Wilcoxon-Test

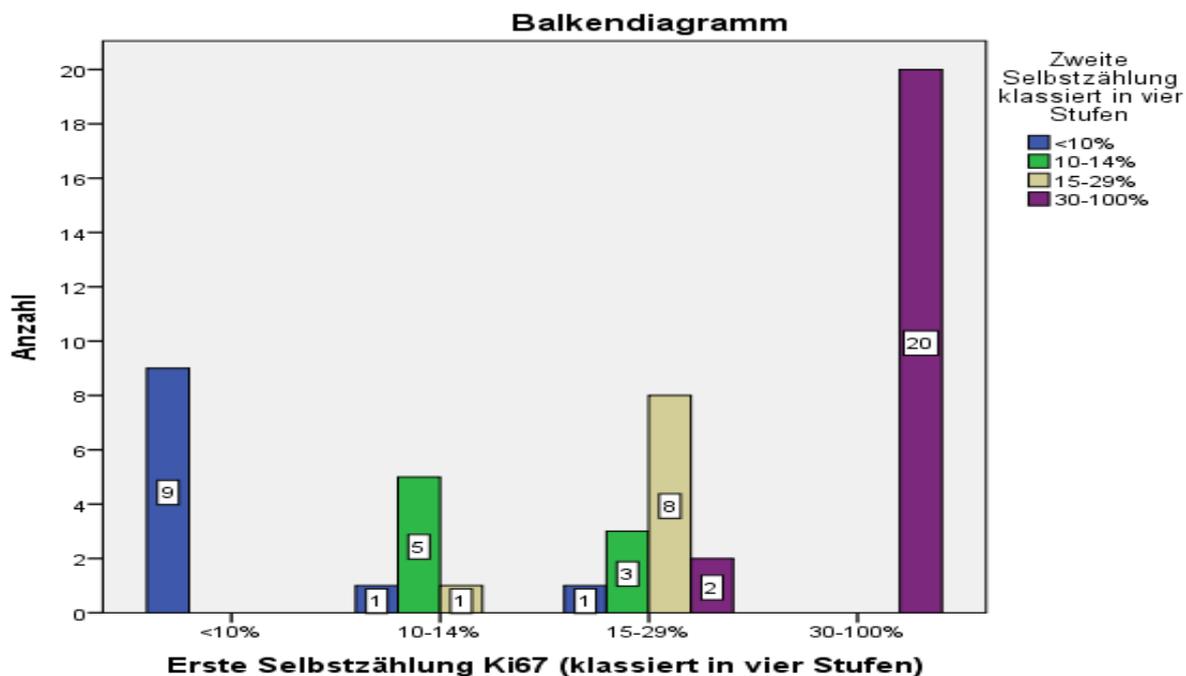
b. Basiert auf positiven Rängen.

Bestimmung des Kappa- Koeffizienten mit klassierten Ki67- Werten (vier Stufen)

In Tabelle 24 und Graphik 19 dargestellt, sieht man eine Gegenüberstellung der ersten und zweiten Eigenzählung, jeweils klassiert in vier Stufen.

Tabelle 24: Gegenüberstellung zwischen erster und zweiter Ki67- Eigenzählung (jeweils in vier Stufen)

		Zweite Selbstzählung klassiert in vier Stufen				Gesamt
		<10%	10-14%	15-29%	30-100%	
Ki67 Eigenzählung (Vier Stufen Modell)	<10%	9	0	0	0	9
	10-14%	1	5	1	0	7
	15-29%	1	3	8	2	14
	30-100%	0	0	0	20	20
Gesamt		11	8	9	22	50



Graphik 29: Gegenüberstellung zwischen erster und zweiter Ki67- Eigenzählung (jeweils in vier Stufen)

Die neun Patientinnen, die nach der ersten Eigenzählung einen Proliferationsmarker unter 10% aufwiesen, zeigen auch bei der zweiten Zählung einen Ki67- Wert unter 10%. Von den sieben Frauen, die der Ki67- Gruppe 10-14% zugeteilt wurden, zeigen fünf Personen auch bei der zweiten Selbstzählung Zugehörigkeit zu dieser Kategorie. Jeweils ein Patient hat geringere beziehungsweise höhere Proliferationsmarkerwerte. Bei der Gruppe 15-29% werden bei Zweitählung insgesamt sechs Frauen anderen Gruppen zugeordnet. Aber acht Patientinnen bleiben auch nach zweiter Auswertung in dieser Kategorie. Bei den 20 Frauen, die bei Erstzählung einen Proliferationsmarkerindex von über 30% zugesprochen bekamen, werden auch alle 20 bei Zweitählung dieser höchsten Kategorie zugeordnet.

Auch hier wurden wieder mit Hilfe des bereits erwähnten Online- Rechners [58] Kappa- Werte berechnet:

Ungewichteter Kappa: 0,7752

Linearer Kappa: 0,8578

Quadratisch gewichteter Kappa: 0,9188

Da Kappa nur eine geringe Anzahl verschiedener Gruppen miteinander vergleichen kann, wurde die Einteilung in die vier in der Graphik und Tabelle dargestellten Stufen vorgenommen. Bei dieser Gruppeneinteilung liefert der quadratisch gewichtete Kappa die exaktesten Ergebnisse.

Laut Internet- Statistik- Tabelle [59] spricht ein Kappa von etwa 0,92 für „fast vollständige Übereinstimmung“ zwischen den zu vergleichenden Gruppen.

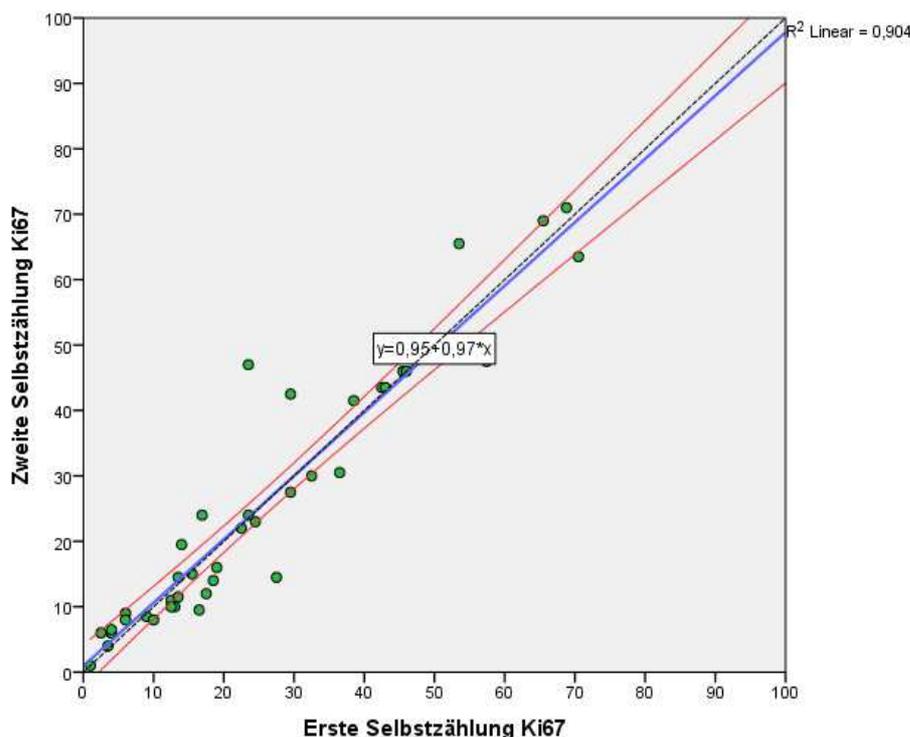
Streudiagramm mit Regressionslinie und Konfidenzintervall; Korrelationskoeffizient Pearson

Graphik 20 zeigt eine Gegenüberstellung von erster und zweiter Eigenzählung mittels Streu-Punkt- Diagramm. Die gestrichelt eingezeichnete Linie symbolisiert die Winkelhalbierende des ersten Quadranten, auf der im Idealfall alle Punkte liegen würden, wenn erste und zweite Zählung komplett identisch wären.

Bis auf wenige Ausreißer zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung und der überwiegende Teil der Punkte liegt sehr nahe bei dieser gestrichelten Linie.

Die blaue Linie ist die sogenannte Regressionslinie mit der Gleichung $y = 0,97x + 0,95$. Beide Linien, also Anpassungslinie und Winkelhalbierende, liegen sehr eng beieinander.

Die anderen beiden roten Linien grenzen das sogenannte Konfidenzintervall ein, welches durch die Mittelwerte bestimmt wird. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist mit einem Wert von 0,904 sehr hoch.



Graphik 20:
Gegenüberstellung
der ersten und
zweiten Ki67-
Eigenzählung
mittels Streu-
Punkt-Diagramm

Um das Maß der Korrelation genauer zu ermitteln, erfolgt als nächster Schritt die Auswertung des Pearson- Korrelationskoeffizienten (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Pearson- Korrelationskoeffizient (erste und zweite Eigenzählung)

		Korrelationen	
		Erste Selbstzählung Ki67	Zweite Selbstzählung Ki67
Erste Selbstzählung Ki67	Korrelation nach Pearson	1	0,930**
	Signifikanz (2-seitig)		0,000
	N	394	50
Zweite Selbstzählung Ki67	Korrelation nach Pearson	0,930**	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	
	N	50	50

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

Der Pearson- Koeffizient ist mit einem Wert von 0,930 sehr hoch. Je näher der Wert an 1 kommt, desto höher ist die Korrelation. Die Signifikanz liegt hier weit unter 5% ($p < 0,001$). Dies macht deutlich, dass die beiden Variablen sehr stark korrelieren. Das Zählverfahren ist somit recht gut geeignet, weitgehend reproduzierbare Ergebnisse mit hoher Reliabilität zu liefern.

Zusammenfassung

Da nicht alle Variablen normalverteilt vorkommen, darf der t- Test, der eine recht hohe Korrelation zeigt, eigentlich nicht verwendet werden, um Mittelwertvergleiche zwischen den beiden Eigenzählungen vorzunehmen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich noch der Wilcoxon Test ($p = 0,958$) durchgeführt, der aufzeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten beider Zählungen bestehen. Mit Hilfe von gewichtetem Kappa- Koeffizient (0,9188) und graphischer Darstellung im Balkendiagramm zeigt sich eine sehr hohe Übereinstimmung der Proliferationsmarkerwerte beider Zählungen. Durch Berechnung von Pearson- Koeffizient (0,930) und Aufzeichnung eines Streu- Punkt- Diagrammes wird ebenso eine sehr hohe Korrelation deutlich.

3.6 Vergleich der selbsterhobenen Ki67-Werte von Resektat und Stanze

Alle Auswertungen der folgenden Kapitel beziehen sich auf die bei der ersten Eigenzählung erhobenen Ki67- Werte.

Bei einigen Untersuchungen wird es notwendig sein, bestimmte Fälle auszuschließen wie beispielsweise DCIS oder Morbus Paget. Auch metastasierte Tumore (M1) nehmen eine Sonderstellung ein. Tumore, die bereits neoadjuvant vorbehandelt wurden, weisen in der Regel geringere Ki67- Werte auf und sollten auch gesondert betrachtet werden. Wenn Ausschlüsse vorgenommen werden, wird darauf explizit im Text hingewiesen.

Bei der vergleichenden Gegenüberstellung von Resektaten und Stanzen werden zunächst keine Fallausschlüsse vorgenommen. Alle 394 Patienten gehen in diese Auswertung mit ein.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen soll geklärt werden, ob Stanzen und Resektate bezüglich verschiedener Faktoren ähnlich sind und im weiteren Prozedere gemeinsam untersucht werden können.

Wichtig ist es hierbei nochmals darauf hinzuweisen, dass bei jedem Patienten nur Resektat oder Stanze vorliegt. Somit ist eine vergleichende Gegenüberstellung nur unter Vorbehalt möglich.

Als erstes erscheint in Tabelle 26 auffällig, dass alle 19 Schnitte, die dem Stadium 0 zugerechnet werden, Resektate sind. Weiterhin ist erwähnenswert, dass jeweils etwa 30% aller Stanzen dem Stadium I beziehungsweise II zugeteilt werden können. 41,8% aller Resektate werden dem Stadium I zugeordnet, 28,8% dem Stadium II. 9,8% aller Stanzen und 15,1% aller Resektate finden sich im Stadium III. Bei Stadium IV differieren die Werte mit 20,6% und 3,8% deutlich, da bei diesen Patienten häufig kein Resektat vorliegt, weil nicht operiert wurde.

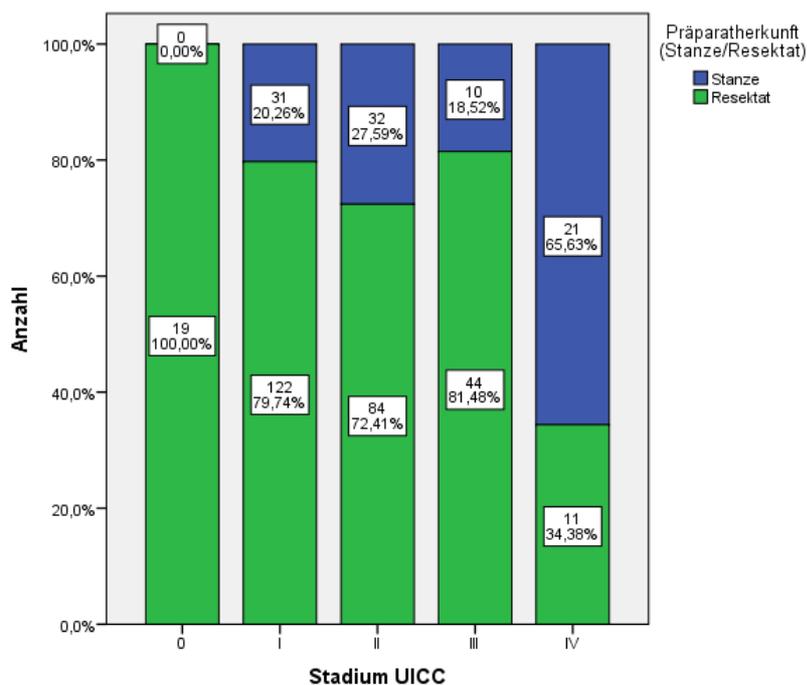
Bei den Stanzen vermutet man zunächst ein schlechteres Outcome und einen höheren Ki67-Wert, da diese Schnitte auch tendenziell ein höheres UICC- Stadium aufweisen. Ob die zur Verfügung stehenden Werte eine statistisch haltbare Aussage ermöglichen, kann bei der geringeren Zahl an Stanzen nicht eindeutig festgelegt werden.

Beim Grading zeigen Stanzen und Resektate eine tendenziell ähnliche Aufteilung in die Grading- Stufen eins bis drei. 11,8% der Stanzen und 17,8% der Resektate sind G1. Der prozentuale Anteil der Stanzen (48%) und der der Resektate (44,5%), die die Grading-Stufe 2 aufweisen, ist annähernd gleich. 38,2% der Stanzen und 30,5% der Resektate zeigen G3.

Tabelle 26: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Stadium und Grading

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)					
		Stanze		Resektat		Gesamt	
		Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)
Stadium	0	0	0,0%	19	6,5%	19	4,8%
	I	31	30,4%	122	41,8%	153	38,8%
	II	32	31,4%	84	28,8%	116	29,4%
	III	10	9,8%	44	15,1%	54	13,7%
	IV	21	20,6%	11	3,8%	32	8,1%
	X	8	7,8%	12	4,1%	20	5,1%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%
Grading	G1	12	11,8%	52	17,8%	64	16,2%
	G2	49	48,0%	130	44,5%	179	45,4%
	G3	39	38,2%	89	30,5%	128	32,5%
	GX	2	2,0%	21	7,2%	23	5,8%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%

Graphik 21: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf UICC- Stadium



Anhand der aufgeführten Graphik soll noch einmal veranschaulicht werden, wie Stanze und Resektat bei den jeweiligen UICC- Stadien vorliegen. Wie bereits vorher erläutert, sind alle vorkommenden Stadium 0 Präparate Resektate. Bei den ersten vier Stufen ist der prozentuale Anteil an Resektaten höher als der an Stanzen, was vermutlich an

der generell höheren Resektanzahl liegen mag. Auffällig hoch (66%) ist der Anteil an Stanzen im Stadium IV.

Schließt man sowohl beim Stadium als auch beim Grading die unbekannt Fälle (Stadium X, GX) aus, erhält man folgende Ergebnisse für den Chi-Quadrat-Test (siehe Tabelle 27).

Beim Stadium ist die Signifikanz deutlich unter dem 5%-Niveau, was bedeutet, dass die Ergebnisse signifikant unterschiedlich voneinander sind. Die Herkunft ist somit abhängig vom Stadium.

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson		
		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)
Stadium	Chi-Quadrat	34,106
	Df	4
	Sig.	0,000
Grading	Chi-Quadrat	2,359
	Df	2
	Sig.	0,307

Tabelle 27: Chi-Quadrat-Test für Stadium und Grading (ohne Stadium X und GX)

Beim Grading liegt die Signifikanz bei 0,307, also über 5%. Die Präparatherkunft ist unabhängig vom Grading.

Allerdings sind all diese Ergebnisse möglicherweise nicht aussagekräftig, da Kategorien mit ungenügend großen Fallzahlen auftauchen. Die eben gewonnenen Schlussfolgerungen sind also nur unter Vorbehalt zu sehen.

Auch Her2- und Rezeptorstatus sollen vergleichend untersucht werden. Stanze und Resektat zeigen in Tabelle 28 beim Her2/neu eine tendenziell ähnliche prozentuale Aufteilung in die einzelnen Kategorien und Gruppen. Beim Rezeptorstatus differieren die Werte mehr.

Tabelle 28: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Her2/neu- und Rezeptorstatus

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)					
		Stanze		Resektat		Gesamt	
		Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)
Her2/neu	negativ	65	63,7%	168	57,5%	233	59,1%
	positiv	35	34,3%	113	38,7%	148	37,6%
	k.A.	2	2,0%	11	3,8%	13	3,3%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%
Rezeptorstatus	negativ	24	23,5%	44	15,1%	68	17,3%
	positiv	78	76,5%	248	84,9%	326	82,7%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)
Her2/neu	Chi-Quadrat	0,844
	df	1
	Sig.	0,358
Rezeptorstatus	Chi-Quadrat	4,221
	df	1
	Sig.	0,040

Tabelle 29: Chi-Quadrat-Test von Her2/neu- und Rezeptorstatus (ohne fehlende Her2/neu- Werte)

Mit Hilfe des Chi- Quadrat- Tests sollen auch bei diesen Parametern vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden. Auch hier werden die nicht klar einordenbaren Variablen ausgeklammert.

Beim Her2/neu liegt die Signifikanz deutlich über 5% (0,358). Hier spielt es also keine Rolle, ob Stanzen oder Resektate vorliegen.

Beim Rezeptorstatus dagegen liegt die Signifikanz knapp unter dem 5% Niveau. Es ist also bedeutsam, ob Stenzen vorliegen oder Resektate.

Da ein genauer Vergleich aller perioperativen Behandlungs- und Therapieformen zu unübersichtlich wäre und auch wenig gewinnbringend scheint, soll sich im Folgenden auf die vergleichende Untersuchung der beiden Operationsvarianten BET und ABL beschränkt werden.

Bei brusterhaltenden Operationen zeigen sich beim Vergleich zwischen Stanze und Resektat eindeutige Unterschiede (42,2% zu 71,6%). Bei der Ablatio differieren die beiden Werte nur um knapp fünf Prozent. Bei den nicht- operierten Patienten lagen zu 100% Stenzen vor.

Tabelle 30: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf OP- Form

	Präparatherkunft (Stanze/Resektat)						
	Stanze		Resektat		Gesamt		
	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	
OP-Form	BET	43	42,2%	209	71,6%	252	64,0%
	Ablatio	34	33,3%	83	28,4%	117	29,7%
	Nein	25	24,5%	0	0,0%	25	6,3%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson

	Präparatherkunft (Stanze/Resektat)
OP-Form	Chi-Quadrat 82,411
	df 2
	Sig. 0,000

Tabelle 31: Chi-Quadrat-Test (OP- Form)

Beim Chi- Quadrat- Test zeigt sich bei der Kategorie OP- Form eine hohe Signifikanz von weit unter 5% ($p < 0,001$). Bei der Betrachtung der Operationsform spielt es eine Rolle, ob ein Resektat oder eine Stanze vorliegt.

Jetzt wird die Zellverteilung innerhalb des Präparates in Abhängigkeit von der Präparateherkunft betrachtet.

Tabelle 32: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Zellverteilung (gleichmäßig/Hotspot)

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)					
		Stanze		Resektat		Gesamt	
		Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)
Zellverteilung	Hotspot	22	21,6%	16	5,5%	38	9,6%
	gleichmäßige Verteilung	80	78,4%	276	94,5%	356	90,4%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%

21,6% aller Stanzen und 5,5% aller Resektate zeigen Hotspots. Der Rest, also 78,4% der Stanzen und 94,5% der Resektate, zeigt eine gleichmäßige Verteilung der gefärbten Zellen.

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)
Zellverteilung (Gleichmäßig/Hotspot)	Chi-Quadrat	22,455
	df	1
	Sig.	0,000

Tabelle 33: Chi-Quadrat-Test für die Zellverteilung innerhalb des Präparats

Die Signifikanz liegt auch hier unter 0,001 und zeigt dadurch, dass die Werte signifikant unterschiedlich voneinander sind. Es spielt also durchaus eine Rolle, ob es sich bei den Schnitten um Stanzen oder Resektate handelt.

Informativ könnte auch noch die Betrachtung der Proliferationsmarkerwerte eingeteilt in vier Stufen sein. Aber die in Tabelle 34 aufgelisteten Prozentzahlen lassen nur spekulative Vergleichsmöglichkeiten zu. Die beobachteten höheren Ki67-Werte bei den Stanzen korrespondieren mit dem hierbei höheren Anteil fortgeschrittener Stadien.

Tabelle 34: Gegenüberstellung von Resektat und Stanze in Bezug auf Ki67 (vier Stufen)

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)					
		Stanze		Resektat		Gesamt	
		Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)	Anzahl	Spalten (%)
Ki67 (klassiert in vier Stufen)	<10%	33	32,4%	122	41,8%	155	39,3%
	10-14%	14	13,7%	58	19,9%	72	18,3%
	15-29%	30	29,4%	69	23,6%	99	25,1%
	30-100%	25	24,5%	43	14,7%	68	17,3%
	Gesamt	102	100,0%	292	100,0%	394	100,0%

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson

		Präparatherkunft (Stanze/Resektat)
Ki67 (klassiert in vier Stufen)	Chi-Quadrat	8,300
	df	3
	Sig.	0,040

Tabelle 35: Chi-Quadrat-Test zu Ki67 (vier Stufen)

Die Signifikanz liegt mit 0,04 knapp unter der 5%- Marke und zeigt, dass es durchaus eine Rolle spielt, ob Resektate oder Stanzen betrachtet werden. Die Signifikanz ist grenzwertig.

Zusammenfassung

Generell spielt es bei den meisten untersuchten Faktoren durchaus eine Rolle, ob Stanzen oder Resektate betrachtet werden. Tendenziell weisen Stanzen ein höheres Stadium und einen höheren Ki67- Wert, sowie einen größeren Anteil an nicht operierten Patienten auf. Brusterhaltende Operationen kommen seltener vor als bei Resektaten und der Prozentsatz an Schnitten mit Hotspot ist höher.

Schwachpunkt all dieser Untersuchungen ist, dass man für einen exakten Vergleich besser Stanze und Resektat desselben Patienten gegenüberstellen sollte, um wirklich valide Ergebnisse zu erhalten.

3.7 Einfluss von Ki67 auf Überleben – Kaplan-Meier-Analysen, univariable und multivariable COX- Regression

Für die folgenden Betrachtungen des gesamt- und rezidivfreien Überlebens werden Frauen mit duktalem Carcinoma in situ (DCIS) oder mit Morbus Paget ebenso wie mit metastasierten Tumoren (M1) ausgeklammert. Cut- off- Datum ist der 01.09.2013.

3.7.1 Kaplan- Meier- Kurven und Log- Rank- Test

Gesamtüberleben (OAS):

Da vom Patientenkollektiv (394) 51 Fälle entsprechend den bereits genannten Kriterien ausgeschlossen wurden, bleiben für die weiteren Untersuchungen noch 343 Frauen übrig. In den folgenden Graphiken und Tabellen werden diese 343 Personen als „alle Patienten“ bezeichnet. Der Anteil der zensierten Patienten darf hier aber nicht mit der Überlebensrate verwechselt werden.

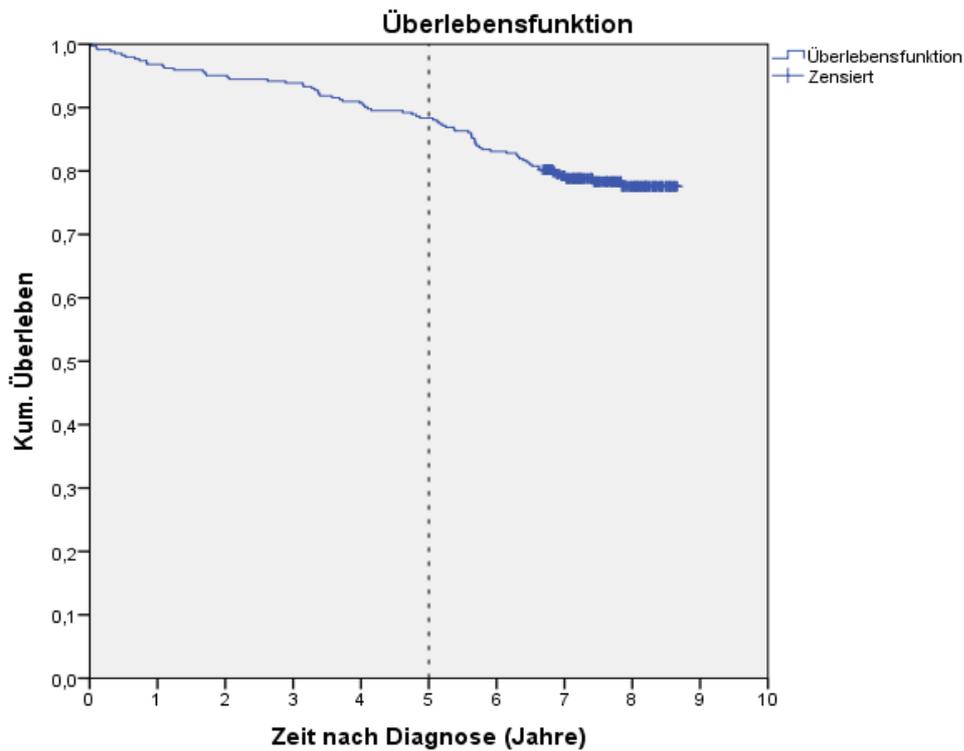
Tabelle 36: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (OAS)

Zusammenfassung der Fallverarbeitung			
Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
		N	Prozent
343	74	269	78,4%

74 dieser 343 Frauen (21,6%) verstarben im Laufe der Jahre, wobei der genaue Zeitpunkt im Tumorzentrum registriert und in den Daten vermerkt wurde. Alle Angaben beziehen sich auf das Gesamtüberleben (OAS), ohne zu berücksichtigen, ob es zu einem Tumorrezidiv kam oder nicht.

Aus dieser Kaplan- Meier- Überlebenskurve lässt sich entnehmen, wie viele Frauen in Prozent des ursprünglichen Kollektivs nach einer bestimmten Zeit (angegeben in Jahren) noch lebten. Die gestrichelte Linie zeigt hierbei das 5- Jahres- Überleben. Aus der von SPSS mitgelieferten Tabelle kann der exakte Wert für das 5- Jahres- OAS abgelesen werden. Die geschätzte 5- Jahres- Überlebensrate liegt bei 88,3%.

Graphik 22: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (OAS)



Rezidivfreies Überleben (RFS):

Auf selbe Weise wird nun das RFS über alle 343 Patientinnen betrachtet. Hierbei ist entscheidend, dass nun nicht nur das Gesamtüberleben untersucht wird, sondern besonderes Augenmerk darauf gerichtet wird, ob es zu einem Rezidiv kam.

Die Anzahl der Ereignisse liegt bei einer Zahl von 87 (25,4%). Laut Definition entspricht ein solches Ereignis bei der Betrachtung des rezidivfreien Überlebens entweder dem Tod oder der Entwicklung eines Rezidivs.

In der darauffolgenden Graphik 23 soll die Überlebenskurve des RFS bildlich dargestellt werden.

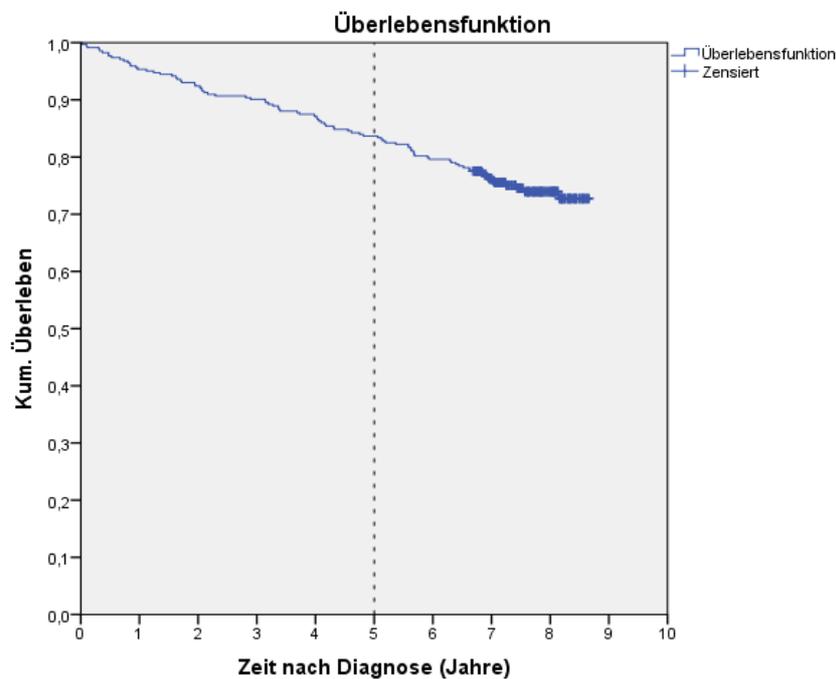
Tabelle 37: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (RFS)

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
		N	Prozent
343	87	256	74,6%

Auch hier symbolisiert die gestrichelte Linie das 5- Jahres- Überleben. Die geschätzte 5- Jahres- Rate für das rezidivfreie Überleben beträgt 83,7%.

Graphik 23: Kaplan- Meier Überlebensfunktion über alle Patienten (RFS)



UICC Stadium

Zur besseren Übersichtlichkeit und Interpretierbarkeit wurden alle 20 Schnitte mit unbekanntem Stadium X aus den Betrachtungen ausgeschlossen. Die Fälle mit Stadium 0 und Stadium IV wurden allerdings mit untersucht.

OAS in Abhängigkeit vom Stadium

Insgesamt gehen 374 Fälle in diese OAS- Untersuchung mit ein. Tabelle 38 zeigt sowohl die Gesamtzahl der Fälle, die dem jeweiligen UICC Stadium zugeordnet werden als auch die Anzahl der Ereignisse, also Todesfälle. Ob es im Krankheitsverlauf zu einem Rezidiv kam oder nicht wird nicht mitberücksichtigt.

Prozentual zeigt sich ein umso höheres Überleben je niedriger das UICC Stadium ist. Allerdings hat man unterschiedlich große Fallzahlen bei den einzelnen Tumorstadien.

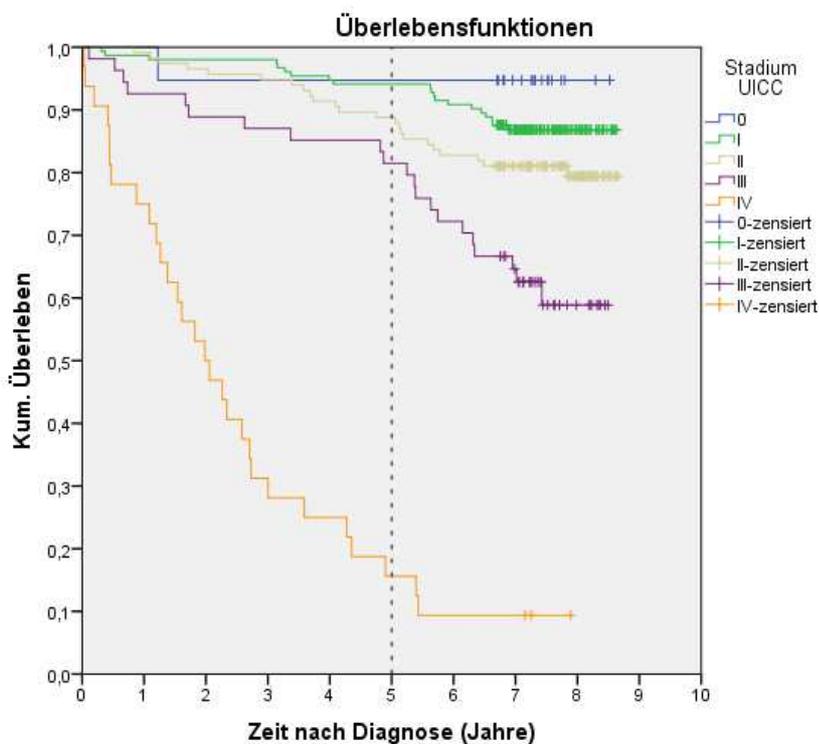
Mittels einer Kaplan- Meyer- Überlebenskurve soll dies bildlich veranschaulicht werden (siehe Graphik 24).

Tabelle 38: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Stadium

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

Stadium UICC	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
0	19	1	18	94,7%
I	153	20	133	86,9%
II	116	23	93	80,2%
III	54	21	33	61,1%
IV	32	29	3	9,4%
Gesamt	374	94	280	74,9%

Graphik 24 zeigt recht eindrücklich, dass der Prozentsatz der Überlebenden abnimmt je höher das UICC Stadium ist. Besonders nach der gestrichelt dargestellten 5- Jahres- Überlebensmarke differieren die Linien immer weiter. Ein besonders steiler Kurvenabfall zeigt sich in den ersten fünf Jahren beim Stadium IV. Ein klarer Zusammenhang zwischen Höhe des Stadiums und Gesamtüberleben (OAS) wird deutlich.



Graphik 24: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Stadium

Die geschätzten Werte für die 5- Jahres- Überlebensraten lassen sich wiederum aus der Überlebens- Tabelle ablesen:

Bei Stadium 0 ergab sich eine Rate von 94,7%, bei Stadium I waren es 94,1%. Stadium II zeigt eine Überlebensrate von 88,8%, Stadium III liegt bei 81,5% und Stadium IV bei 15,6%.

Um festzustellen, ob es für das OAS Überleben einen signifikanten Unterschied macht, welche Stadienstufe vorliegt, werden alle Stufen paarweise miteinander verglichen. Hierbei hilft der Log Rank Test.

Liegt der p- Wert (Sig.) unter 0,05, macht es signifikant einen Unterschied, ob die eine oder die andere Stadienstufe vorliegt.

Tabelle 39: Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Stadien untereinander (OAS)

		Paarweise Vergleiche									
		0		I		II		III		IV	
	Stadium UICC	Chi-Quadrat	Sig.	Chi-Quadrat	Sig.	Chi-Quadrat	Sig.	Chi-Quadrat	Sig.	Chi-Quadrat	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0			0,87	0,351	1,99	0,158	6,39	0,012	32,02	0,000
	I	0,87	0,351			2,27	0,132	18,14	0,000	172,88	0,000
	II	1,99	0,158	2,27	0,132			7,25	0,007	114,08	0,000
	III	6,38	0,012	18,14	0,000	7,25	0,007			42,17	0,000
	IV	32,02	0,000	172,88	0,000	114,08	0,000	42,17	0,000		

Vergleicht man beispielsweise das Stadium 0 mit dem Stadium I liegt der Signifikanzwert bei 0,351, also deutlich höher als 0,05. Es macht also kaum Überlebensunterschied, ob man dem Stadium 0 oder I zugehört. Vergleicht man dagegen Stadium II und III miteinander, liegt die Signifikanz mit 0,007 weit unter dem 5%- Niveau und es zeigt sich ein signifikanter Unterschied fürs Überleben.

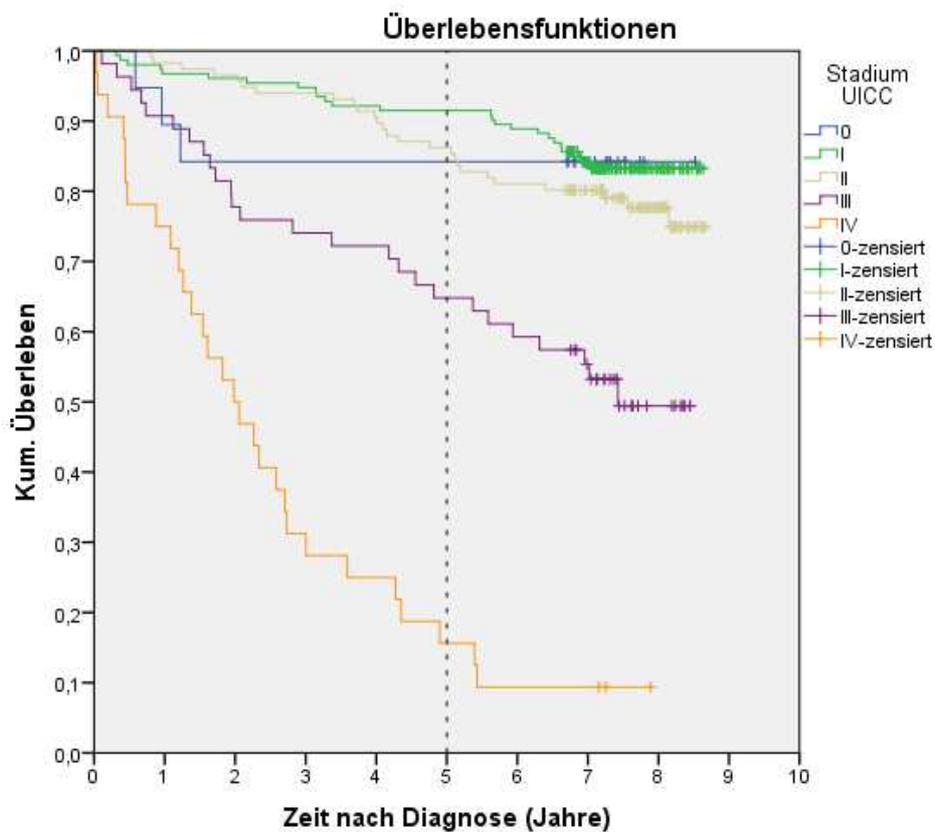
Ein solcher Überlebensunterschied zeigt sich beim Vergleich der Stadium III- Patienten mit allen Patienten der übrigen Stufen, genauso wie bei den Stadium IV- Patientinnen im Vergleich mit allen anderen UICC- Stadien.

RFS in Abhängigkeit vom Stadium:

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					
Stadium UICC	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		
			N	Prozent	
0	19	3	16	84,2%	
I	153	25	128	83,7%	
II	116	26	90	77,6%	
III	54	26	28	51,9%	
IV	32	29	3	9,4%	
Gesamt	374	109	265	70,9%	

Tabelle 40: Kaplan- Meier Überlebensfunktion RFS- Abhängigkeit vom Stadium

Die Betrachtung des rezidivfreien Überlebens wird ähnlich durchgeführt wie beim OAS. In Tabelle 40 sind alle 374 Patienten aufgeführt, geordnet nach Stadien, und die Anzahl der jeweiligen Ereignisse. Auch hier besteht eine Beziehung zwischen Höhe des Stadiums und Überleben.



Graphik 25: Kaplan- Meier Überlebensfunktion RFS- Abhängigkeit vom Stadium

Je höher der Grad des Stadiums, desto geringer der Prozentsatz der Überlebenden ohne Rezidiv (siehe Graphik 25).

Paarweise Vergleiche

	Stadium UICC	0		I		II		III		IV	
		Chi- Qua- drat	Sig.								
	0			0,004	0,953	0,149	0,700	4,565	0,033	23,135	0,000
Log	I	0,004	0,953			1,371	0,242	25,396	0,000	144,512	0,000
Rank	II	0,149	0,700	1,371	0,242			14,200	0,000	105,838	0,000
(Mante	III	4,565	0,033	25,396	0,000	14,200	0,000			24,819	0,000
I-Cox)	IV	23,135	0,000	144,512	0,000	105,838	0,000	24,819	0,000		

Tabelle 41: Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Stadien untereinander (RFS)

Geschätzte Werte für die 5- Jahres- Überlebensraten lauten wie folgt: Stadium 0: 84,2%, Stadium I: 91,5%, Stadium II: 86,2%, Stadium III: 64,8%, Stadium IV: 15,6%

Auch hier soll ein paarweiser Vergleich der Stadien untereinander erfolgen (siehe Tabelle 41). Es gelten hierbei dieselben Regeln, die bei Tabelle 39 ausführlich beschrieben wurden.

Ein signifikanter Unterschied des rezidivfreien Überlebens zeigt sich nur zwischen Stadium III und allen übrigen Stadien beziehungsweise Stadium IV und allen anderen UICC- Stufen. Bei den übrigen Kombinationsmöglichkeiten liegt der p-Wert immer über 5%.

Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Ki67- Wert (OAS)

Bei der Untersuchung, inwieweit Überleben und Ki67- Status zusammenhängen, werden drei verschiedene Ki67- Klassierungsmodelle ausgewählt und miteinander verglichen. Auch hier werden DCIS und metastasierte Tumore (M1) ausgeklammert und finden in den weiteren Graphiken und Tabellen keine Berücksichtigung. Grundsätzlich wäre es möglich bei allen drei Ki67- Klassierungsvarianten sowohl OAS als auch RFS zu betrachten. Da sich keine nennenswerten Unterschiede gezeigt haben, soll im Folgenden nur das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Proliferationsmarker untersucht werden.

Ki67- Klassierung in 10er Schritten:

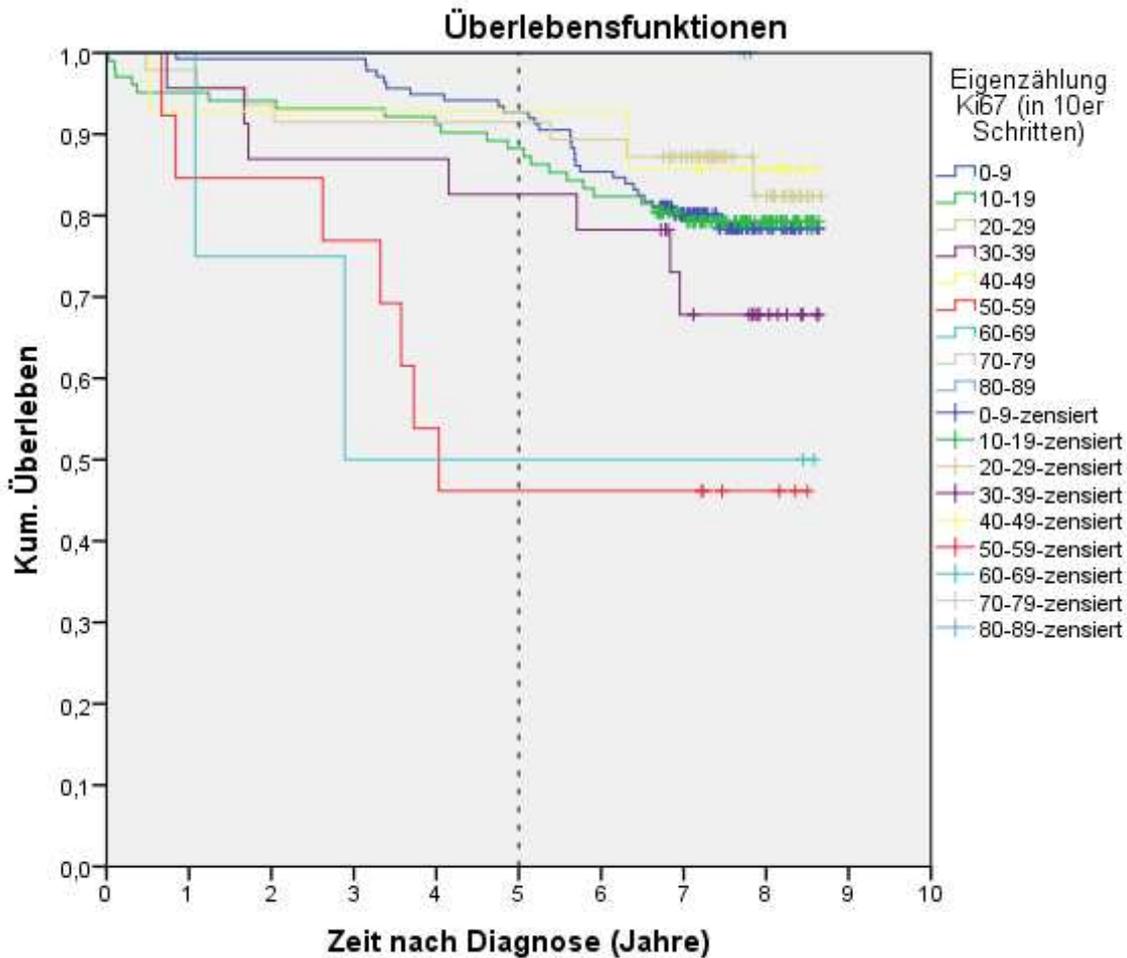
Augenfällig ist, dass die Fallzahlen der einzelnen Gruppen sehr stark variieren, mit zunehmenden Ki67-Wert deutlich kleiner werden und es somit schwierig scheint, allgemein gültige Aussagen von diesem Kollektiv ableiten zu können. So überlebte beispielsweise die eine Patientin, die einen Ki67- Wert von 70-79% aufwies, und verschaffte somit dieser Gruppe ein Gesamtüberleben von 100%, das heißt bei dieser Klassierung ist das Problem der kleinen Fallzahlen besonders deutlich.

Tabelle 42: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (10er- Schritte) (nur Stadium I-III)

Eigenzählung Ki67 (in 10er Schritten)	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
0-9	137	28	109	79,6%
10-19	102	21	81	79,4%
20-29	47	7	40	85,1%
30-39	23	7	16	69,6%
40-49	14	2	12	85,7%
50-59	13	7	6	46,2%
60-69	4	2	2	50,0%
70-79	1	0	1	100,0%
80-89	2	0	2	100,0%
Gesamt	343	74	269	78,4%

Die Erwartung, dass der Prozentsatz an Überlebenden mit hohem Ki67- Wert niedriger ist, wird durch die abzulesenden Prozentzahlen durch die Gruppen „50-59“ und „60-69“ bestätigt, die ein schlechteres Überleben gegenüber den anderen zeigen. Die Gruppen von 0 bis 29 liegen nahe beieinander im oberen Bereich, Gruppe 30-39 setzt sich mit einem schlechteren Verlauf etwas davon ab.

Auch die graphische Darstellung des Gesamtüberlebens untermauert diese Aussage. Täuschen lassen darf man sich nicht durch die beiden Kurven, die ein 100%- Überleben vortäuschen. Sie fußen nur auf einer Person beziehungsweise zwei Personen.



Graphik 26: Kaplan- Meier Überlebensfunktion: OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (10er- Schritte) (nur Stadium I-III)

Die gestrichelte Linie zeigt wiederum das 5- Jahres- Überleben. Exakte Werte entstammen der SPSS- Überlebenstabelle: 0-9%: 92,7%; 10-19%: 88,2%; 20-29%: 91,5%; 30-39%: 82,6%; 40-49%: 92,9%; 50-59%: 46,2%; 60-69%: 50%; 80-89%: 100%

Ein paarweiser Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen untereinander (Log Rank) soll zeigen, ob es für das Outcome eine Rolle spielt, welcher Klasse man zugeordnet ist. Dort, wo in Tabelle 43 beim p- Wert ein Wert kleiner 0,05 steht, macht es signifikant einen Überlebensunterschied, in welcher der beiden Gruppen man sich befindet. Dies trifft für folgende Paarungen zu:

- 50-59% mit 0-9%
- 50-59% mit 10-19%
- 50-59% mit 20-29%
- 50-59% mit 40-49%
- 60-69% mit 0-9%

Alle übrigen Paarungen zeigen Signifikanzen über 0,05.

Zum Teil sehr kleine Fallzahlen vermindern die Aussagekraft der Betrachtungsweise mit dieser Klassierung.

Tabelle 43: Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (10er Schritte; OAS) (nur Stadium I-III; dargestellt sind nur die p- Werte)

		Paarweise Vergleiche								
	Eigen- zählung Ki67 (in 10er Schritten)	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89
		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
	0-9		0,919	0,406	0,269	0,570	0,000	0,044	0,623	0,487
	10-19	0,919		0,410	0,316	0,573	0,002	0,083	0,631	0,497
	20-29	0,406	0,410		0,136	0,890	0,002	0,061	0,713	0,603
	30-39	0,269	0,316	0,136		0,270	0,122	0,363	0,539	0,385
	40-49	0,570	0,573	0,890	0,270		0,030	0,121	0,700	0,586
	50-59	0,000	0,002	0,002	0,122	0,030		0,979	0,393	0,227
	60-69	0,044	0,083	0,061	0,363	0,121	0,979		0,445	0,281
	70-79	0,623	0,631	0,713	0,539	0,700	0,393	0,445		.
	80-89	0,487	0,497	0,603	0,385	0,586	0,227	0,281	.	.

Ki67- Klassierung (St. Gallen Klassifikation)

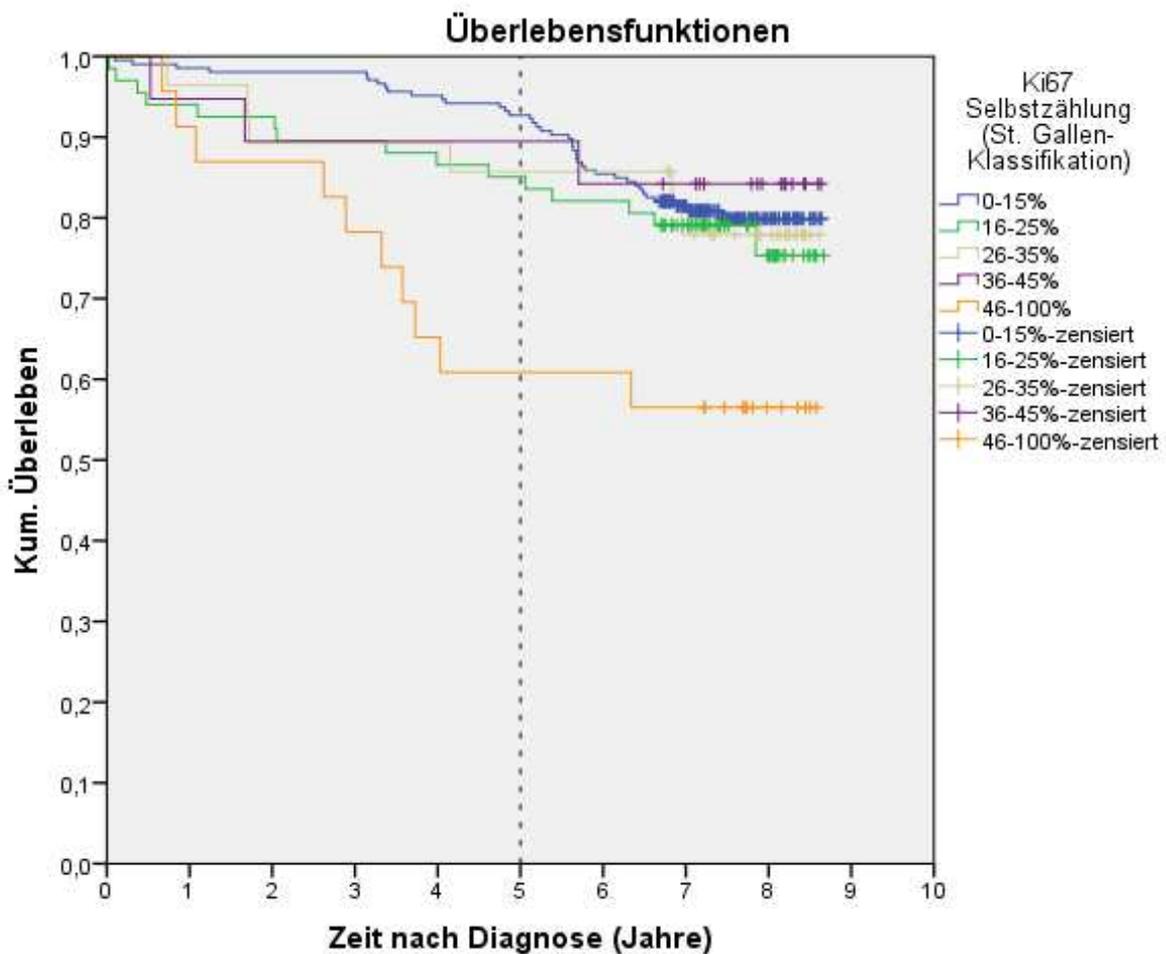
Trotz weniger Gruppen ist auch hier die Verteilung der 343 Patienten nicht wesentlich gleichmäßiger als bei der Unterteilung in 10%- Schritte, allerdings sind die Gruppen deutlich besser besetzt. Die Gruppe der Patientinnen mit Ki67-Werten unter 15% zeigt bis 5 Jahre nach Diagnose die günstigste Überlebensrate, gefolgt von den Gruppen 16-45%. Die Gruppe der Patientinnen mit mehr als 46% zeigt einen deutlich ungünstigeren Verlauf des Gesamtüberlebens, signifikant gegenüber den Gruppen 0-15% und 16-25%.

Tabelle 44: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (St. Gallen- Schritte) (nur Stadium I-III)

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

Ki67 Selbstzählung (St. Gallen- Klassifikation)	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
0-15%	206	40	166	80,6%
16-25%	67	15	52	77,6%
26-35%	28	6	22	78,6%
36-45%	19	3	16	84,2%
46-100%	23	10	13	56,5%
Gesamt	343	74	269	78,4%

Auch die graphische Darstellung zeigt diese Erkenntnisse:



Graphik 27: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (St. Gallen- Schritte) (nur Stadium I-III)

Für die in der Graphik 27 dargestellten Kurven berechnete der Computer mit Hilfe des SPSS-Programmes folgende Schätzwerte für das 5- Jahres- Überleben:

0-15%: 92,7%; 16-25%: 85,1%; 26-35%: 85,7%; 36-45%: 89,5%; 46-100%: 60,9%

Mit Hilfe des Log- Rank Tests soll auch hier in Erfahrung gebracht werden, bei welchen Paarungen es einen signifikanten Unterschied fürs Überleben macht, welcher Gruppe man zugeordnet wird. Wie aus Tabelle 45 zu lesen, ist dies nur bei der Paarung zwischen 0-15% mit 46-100% und 16-25% mit 46-100% der Fall.

Tabelle 45: Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (St. Gallen; OAS) (nur Stadium I-III)

		Paarweise Vergleiche									
	Ki67	0-15%		16-25%		26-35%		36-45%		46-100%	
	Selbstzählung (St. Gallen- Klassifikation)	Chi- Qua- drat	Sig.								
	0-15%			0,422	0,516	0,066	0,797	0,119	0,730	10,367	0,001
	16-25%	0,422	0,516			0,040	0,842	0,435	0,509	4,089	0,043
	26-35%	0,066	0,797	0,040	0,842			0,177	0,674	3,024	0,082
	36-45%	0,119	0,730	0,435	0,509	0,177	0,674			3,415	0,065
	46-100%	10,367	0,001	4,089	0,043	3,024	0,082	3,415	0,065		

Ki67- Klassierung (Vier- Stufen- Modell)

Als letzte Einteilungsvariante soll noch die Unterteilung in vier Stufen betrachtet werden. Die Fallzahlen sind hier besser verteilt, das Ergebnis wird aber dadurch nur bedingt aussagekräftiger. Die Sparten eins bis drei unterscheiden sich vom prozentualen Wert her kaum. Sparte vier mit unterer Grenze von 30% liegt niedriger (siehe Tabelle 46).

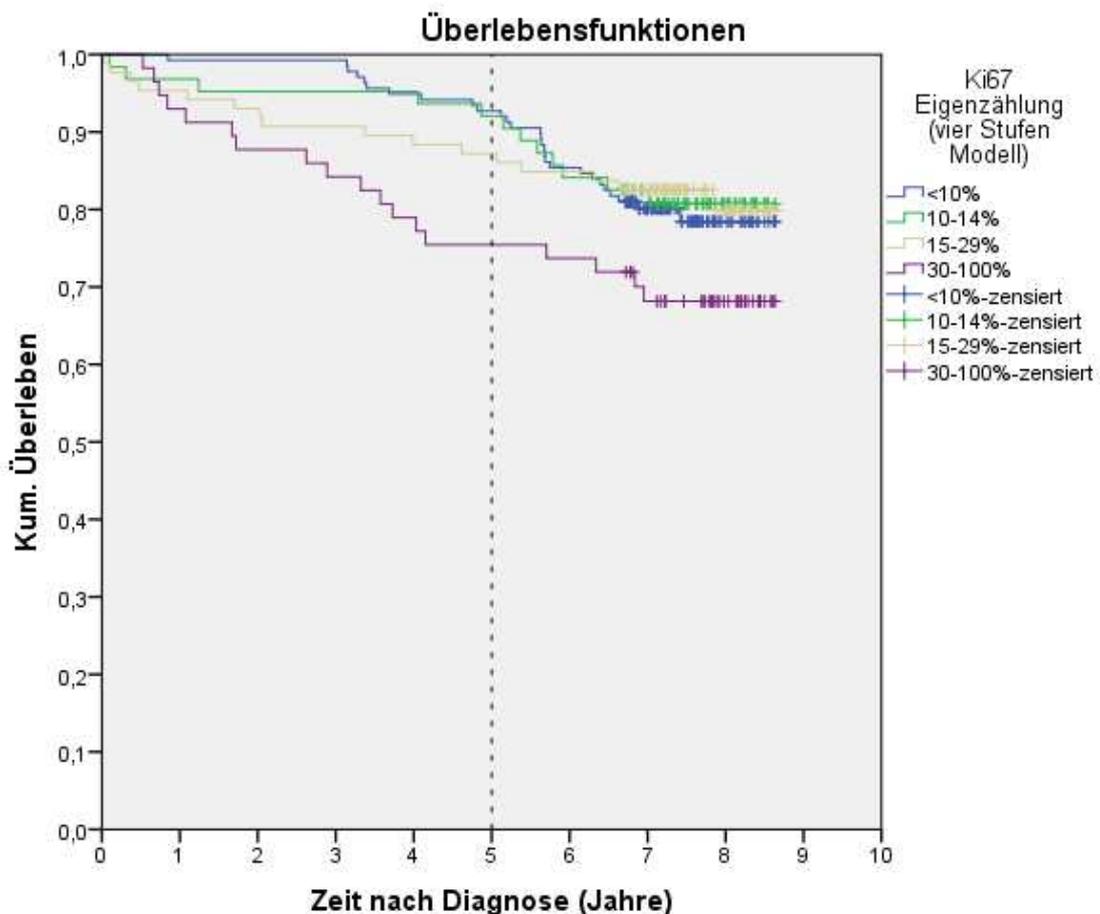
Noch besser ins Bild passen die 5 Jahres Überlebensraten: Hier sinken die Prozentwerte bei steigendem Ki67 durchwegs mehr oder minder stark: <10%: 92,7%; 10-14%: 92,1%; 15-29%: 87,2%; 30-100%: 75,4%

Tabelle 46: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (Vier Stufen Modell) (nur Stadium I-III)

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

Ki67 Eigenzählung (Vier Stufen Modell)	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
<10%	137	28	109	79,6%
10-14%	63	12	51	81,0%
15-29%	86	16	70	81,4%
30-100%	57	18	39	68,4%
Gesamt	343	74	269	78,4%

Bis zu der gestrichelten 5 Jahres Marke sinkt mit steigendem Ki67 das kumulative Überleben. Nach dieser Linie gehen die obersten drei Kurven zunehmend ineinander über.



Graphik 28: Kaplan- Meier Überlebensfunktion OAS- Abhängigkeit vom Ki67- Status (Vier Stufen Modell) (nur Stadium I-III)

Bei Durchführung des Log Rank Tests sieht man dann allerdings beim paarweisen Vergleich, dass keine der Ki67- Gruppierungen unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 liegt (siehe Tabelle 47).

Tabelle 47: Log Rank Test zum paarweisen Vergleich der einzelnen Ki67- Stufen (Vier Stufen Modell; OAS) (nur Stadium I-III)

		Paarweise Vergleiche							
	Ki67	<10%		10-14%		15-29%		30-100%	
	Eigenzählung (Vier Stufen Modell)	Chi- Quadrat	Sig.	Chi- Quadrat	Sig.	Chi- Quadrat	Sig.	Chi- Quadrat	Sig.
	<10%			0,059	0,808	0,063	0,802	3,465	0,063
	10-14%	0,059	0,808			0,000	0,994	2,807	0,094
	15-29%	0,063	0,802	0,000	0,994			3,023	0,082
	30-100%	3,465	0,063	2,807	0,094	3,023	0,082		

3.7.2 COX- Regression

Bei den folgenden Untersuchungen wird analysiert, wie sich die einzelnen Parameter (Ki67 und die weiteren erhobenen klinischen und histopathologischen Variablen) auf Gesamtüberleben (OAS) und rezidivfreies Überleben (RFS) auswirken. Betrachtet werden alle 394 Patientinnen ohne Ausschluss.

Zunächst wird jeder Faktor für sich allein betrachtet (univariable Analyse), ohne dass berücksichtigt wird, dass die Parameter nicht völlig unabhängig voneinander sind. So hängen beispielsweise Grading und Stadium eng zusammen und beeinflussen einander. Ein Ziel der Arbeit ist es auch herauszufinden, ob die Höhe des gemessenen Ki67 für sich genommen einen Einfluss auf das Überleben hat, beziehungsweise wie groß dieser ist. Zu diesem Zweck wird im zweiten Schritt eine multivariable Analyse durchgeführt, die alle Faktoren und deren Wechselwirkungen berücksichtigt, so dass man genau herausfiltern kann, welchen Einfluss ein bestimmter Faktor für sich allein genommen auf das Überleben hat.

Aus Tabelle 48 lassen sich verschiedene Erkenntnisse zur univariablen Auswertung gewinnen. Die Spalte ganz links führt alle untersuchten Variablen mit dazugehörigen Untergruppen auf. Die obersten beiden Zeilen zeigen aufgeteilt in Gesamtüberleben (OAS) und rezidivfreies

Überleben (RFS) verschiedene statistische Parameter. Die HR (Hazard Ratio) gibt an, um wie viel höher das Risiko für das OAS beziehungsweise RFS im Vergleich zur Referenzkategorie ist. So ist beispielsweise beim Parameter „Menopausenstatus“ die Untergruppe „postmenopausal“ die Referenzgruppe, deren HR auf den Wert 1 festgesetzt wird. Prä- und Perimenopausal werden dann mit Postmenopausal verglichen und eine entsprechende HR angegeben.

Beim Alter verhält es sich anders, da diese Variable kontinuierlich und nicht wie die anderen kategorial angegeben wurde. Pro Lebensjahr, in dem die Diagnose später gestellt wurde, nimmt der Einfluss auf das Gesamtüberleben (OAS) um 5,7% zu.

Die nächste statistische Variable ist das sogenannte 95%- Konfidenzintervall (95%- KI), das die Präzision der Lageschätzung einer Hazard Ratio angibt.

Die dritte Statistik- Variable ist die Signifikanz (p- Wert). Damit die Ergebnisse als signifikant angesehen werden können, sollte dieser p- Wert unter 5%, bzw. 0,05 liegen. An einigen Stellen der Tabelle finden sich p- Werte weit über 5%. Generell sollte man bei all diesen Auswertungen bedenken, dass das untersuchte Kollektiv nur 394 Patientinnen beinhaltet und die Signifikanzen bei so geringer Fallzahl nicht besonders hoch ausfallen werden. Für hoch signifikante Ergebnisse bräuchte man Fallzahlen von mehreren tausend Probanden. Trotz zum Teil ungenügender Signifikanz lassen sich die Ergebnisse dieser Untersuchung brauchbar auswerten.

Tabelle 48: Univariable Auswertung des Gesamtüberlebens (OAS) und rezidivfreien Überlebens (RFS)-COX-Regression

univariabel	OAS			RFS		
	HR	95% KI	P- Wert	HR	95% KI	P- Wert
Alter (kontinuierlich)	1,057	1,040-1,074	<0,001	1,047	1,031-1,062	<0,001
Ki67 (in%)						
≤15	1,000	-	0,007	1,000	-	0,011
16-25	1,418	0,860-2,338	0,171	1,449	0,913-2,298	0,115
26-35	1,874	0,999-3,515	0,051	2,013	1,142-3,551	0,016
36-45	1,383	0,593-3,225	0,452	1,171	0,505-2,715	0,712
46-100	3,000	1,630-5,522	<0,001	2,557	1,401-4,667	0,002
Menopausenstatus						
Postmenopausal	1,000	-	0,019	1,000	-	0,040
Perimenopausal	0,913	0,127-6,578	0,928	0,773	0,108-5,556	0,798
Prämenopausal	0,346	0,166-0,718	0,004	0,413	0,220-0,775	0,006
unbekannt	1,226	0,777-1,937	0,381	1,082	0,696-1,683	0,727
Grading						
G1	1,000	-	0,008	1,000	-	0,012
G2	1,173	0,630-2,186	0,615	1,284	0,709-2,326	0,409
G3	2,087	1,127-3,864	0,019	2,176	1,204-3,932	0,010
GX	0,638	0,182-2,239	0,483	1,058	0,381-2,938	0,914
Stadium						
0	1,000	-	<0,001	1,000	-	<0,001
I	2,476	0,332-18,448	0,376	0,942	0,284-3,120	0,922
II	3,886	0,525-28,784	0,184	1,305	0,395-4,313	0,663
III	8,498	1,143-63,186	0,037	3,516	1,064-11,619	0,039
IV	52,212	7,071-385,553	<0,001	13,910	4,209-45,975	<0,001
unbekannt	13,560	1,735-105,965	0,013	3,985	1,096-14,489	0,036
LINV						
L0	1,000	-	<0,001	1,000	-	<0,001
L1	2,132	1,373-3,309	0,001	2,073	1,379-3,116	<0,001
unbekannt	3,381	1,954-5,848	<0,001	3,188	1,903-5,342	<0,001
VINV						
V0	1,000	-	<0,001	1,000	-	<0,001
V1	2,602	1,577-4,293	<0,001	2,871	1,810-4,552	<0,001
unbekannt	3,100	1,948-4,934	<0,001	2,930	1,882-4,563	<0,001
Östrogenrezeptor						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	0,800	0,495-1,291	0,361	0,936	0,589-1,487	0,778
Progesteronrezeptor						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	0,718	0,473-1,089	0,119	0,787	0,530-1,167	0,233
Rezeptorstatus						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	0,804	0,494-1,310	0,382	0,936	0,584-1,500	0,784
Her2/neu						
Negativ	1,000	-	0,137	1,000	-	0,322
Positiv	0,731	0,483-1,105	0,137	0,954	0,657-1,386	0,807
unbekannt	0,238	0,033-1,713	0,154	0,221	0,031-1,591	0,134

Folgende Erkenntnisse können aus der univariablen COX- Regression gewonnen werden:

Je höher das Diagnosealter, desto größer das Ereignisrisiko, sowohl signifikant bei OAS (HR=1,057, entsprechend 5,7% pro zusätzlichem Jahr) als auch bei RFS (HR=1,047, entsprechend 4,7% pro Jahr).

Bei Betrachtung des Ki67 sieht man, dass bei steigenden Proliferationsmarkerwerten die HR-Werte ansteigen und das Sterbe- und Rezidivrisiko zunimmt. Die signifikanten p-Werte, die bei der Referenzgruppe stehen, gelten nicht nur für die Referenzkategorie, sondern für die gesamte Variable. Ki67 hat also insgesamt einen signifikanten Einfluss auf das Überleben.

Ein Prämenopausalstatus (HR=0,346) zeigt signifikant eine dreimal bessere Überlebensrate im Vergleich zur Referenzkategorie „Postmenopausal“. Die perimenopausalen Werte zeigen sich nicht signifikant.

Je höher der Grad des Grading, desto höher die Hazard Ratio und damit das Ereignisrisiko. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei steigendem Stadium.

Bei Tumoreinbruch in Blut- oder Lymphgefäße (VINV, LINV) steigt signifikant der negative Einfluss auf das Überleben deutlich an (OAS und RFS).

Östrogen-, Progesteron- beziehungsweise Rezeptorstatus zeigen keine signifikanten Ergebnisse. Ein positiver Status hat eine etwas geringere HR als ein negativer, der Unterschied ist aber nicht signifikant zum 5%- Niveau.

Ein positiver Her2/neu zeigt auch eine etwas niedrigere HR als der negative Status, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Wichtig erscheint auch die Betrachtung einer anderen Ki67- Klassifikation (Vier Stufen Modell) am Beispiel derselben univariablen COX- Regression (OAS).

In der folgenden Tabelle 49 zeigt sich, dass sich hierbei die HR mit steigenden Proliferationsmarkerwerten kontinuierlich und ohne Unterbrechung erhöht (die Gruppe 36-45% ist hierbei in die Gruppe 30-100% subsummiert). Anders als bei der St. Gallen-

Klassifikation zeigen sich keine davon abweichenden Unstimmigkeiten. Gegenüber der Referenzkategorie „<10%“ ist nur die höchste Kategorie mit über 30% signifikant erhöht.

Tabelle 49: COX- Regression für Ki67 (univariabel; klassiert in vier Stufen; OAS)

Ki67- Wert	HR	95% KI	P-Wert
<10%	1	-	0,003
10-14%	1,036	0,572-1,876	0,908
15-29%	1,247	0,744-2,090	0,403
30-100%	2,407	1,465-3,953	0,001

Um überprüfen zu können, welchen Einfluss die einzelnen Variablen bei einer gemeinsamen Betrachtung auf das Überleben haben, wird eine multivariable COX- Regression durchgeführt. Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Parametern werden hierbei herausgerechnet und man erhält Hazard Ratios, die den Einfluss aufs Überleben einer einzelnen Variablen zeigen, adjustiert für den Einfluss der anderen Parameter.

Tabelle 50: Multivariable Auswertung des Gesamtüberlebens (OAS) und rezidivfreien Überlebens (RFS)- COX- Regression

<i>multivariabel</i>	OAS			RFS		
	HR	95% KI	P- Wert	HR	95% KI	P- Wert
Alter (kontinuierlich)	1,045	1,025-1,066	<0,001	1,034	1,015-1,053	<0,001
Ki67 (in%)						
≤15	1,000	-	0,115	1,000	-	0,274
16-25	1,051	0,584-1,890	0,868	1,098	0,651-1,853	0,725
26-35	0,896	0,397-2,019	0,791	1,136	0,556-2,320	0,726
36-45	1,388	0,513-3,755	0,519	1,195	0,455-3,138	0,718
46-100	2,618	1,198-5,720	0,16	2,308	1,094-4,872	0,028
Menopausenstatus						
Postmenopausal	1,000	-	0,666	1,000	-	0,979
Perimenopausal	2,451	0,304-19,765	0,400	1,476	0,183-11,881	0,714
Prämenopausal	1,213	0,499-2,946	0,670	1,062	0,487-2,316	0,880
unbekannt	1,286	0,774-2,136	0,331	1,061	0,655-1,718	0,809
Grading						
G1	1,000	-	0,182	1,000	-	0,230
G2	0,783	0,397-1,545	0,480	0,897	0,474-1,698	0,739
G3	1,306	0,605-2,819	0,496	1,359	0,661-2,793	0,404
GX	0,437	0,094-2,026	0,290	0,490	0,121-1,980	0,317
Stadium						
0	1,000	-	<0,001	1,000	-	<0,001
I	1,715	0,151-19,487	0,663	0,539	0,096-3,009	0,481
II	2,341	0,205-26,748	0,494	0,665	0,117-3,767	0,644
III	4,800	0,427-53,889	0,204	1,630	0,294-9,045	0,576
IV	25,935	2,362-285,146	0,008	5,055	0,956-26,727	0,056
unbekannt	6,191	0,534-71,847	0,145	1,632	0,279-9,543	0,587
LINV						
L0	1,000	-	0,375	1,000	-	0,379
L1	0,819	0,461-1,454	0,495	0,862	0,509-1,460	0,581
unbekannt	1,661	0,527-5,238	0,386	1,740	0,576-5,253	0,326
VINV						
V0	1,000	-	0,628	1,000	-	0,593
V1	1,315	0,703-2,456	0,391	1,347	0,759-2,391	0,309
unbekannt	1,414	0,521-3,835	0,496	1,220	0,462-3,223	0,689
Östrogenrezeptor						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	0,595	0,074-4,803	0,626	0,799	0,101-6,333	0,832
Progesteronrezeptor						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	1,375	0,686-2,758	0,370	1,157	0,626-2,138	0,642
Rezeptorstatus						
Negativ	1,000	-	-	1,000	-	-
Positiv	1,178	0,132-10,532	0,884	1,332	0,154-11,526	0,795
Her2/neu						
Negativ	1,000	-	0,088	1,000	-	0,250
Positiv	0,614	0,388-0,972	0,037	0,863	0,575-1,294	0,476
unbekannt	0,388	0,044-3,425	0,394	0,185	0,022-1,580	0,123

Tabelle 50 beinhaltet dieselben Variablen wie die vorherige univariable COX- Regression (Tabelle 48). Auch die statistischen Parameter sind gleich. Bei dieser multivariablen Auswertung liegen allerdings fast alle Signifikanzen über dem 5%- Niveau, auch wenn die Hazard Ratios zumeist die Einflüsse der univariablen Analyse bestätigen.

Folgende Ergebnisse können aus der multivariablen COX- Regression gewonnen werden:

Pro höherem Lebensjahr, in dem die Diagnose gestellt wurde, nimmt der Einfluss auf das Überleben signifikant um 3,4% (RFS) beziehungsweise 4,5% (OAS) zu.

Tendenziell steigt die HR mit höherem Ki67- Wert an. Allerdings fällt auch bei der multivariablen Auswertung die Ki67- Stufe 26-35% bei der Betrachtung des OAS aus der Reihe, beim RFS bleibt ein Gradient erhalten.

Anders als bei der univariablen Auswertung zeigen bei der multivariablen Analyse Prä- und Perimenopausalstatus höhere HR- Werte als der Postmenopausalstatus, vermutlich durch die Adjustierung des Diagnosealters.

Beim Grading fällt der G2- Wert aus der Reihe. Bei Betrachtung des Stadiums überrascht der signifikant hohe Wert 25,935 (OAS) beim Stadium IV ($p=0,008$). Je höher die Stufe des Stadiums, desto schlechtere Überlebensraten.

Weder Lymphgefäß- noch Veneninvasion zeigen einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben.

Bei Untersuchung des Östrogen-, Progesteron- und Hormonrezeptorstatus finden sich auch keine signifikanten Ergebnisse.

Besonderes Augenmerk sollte auf die Bedeutung des Ki67 als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben gelegt werden. Alles in allem sieht man durchaus einen Zusammenhang zwischen Höhe des Ki67 und Auswirkung auf OAS und RFS. Allerdings sind die Fallzahlen mit insgesamt 394 Patientinnen zu gering, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

4 Diskussion

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse kritisch hinterfragt und mit anderen Studien verglichen werden.

Bei der durchgeführten Untersuchung (Titel der Arbeit: „Der Proliferationsmarker Ki67: Validität und Reliabilität der Messmethoden sowie Eignung als Prognosefaktor für Brustkrebspatienten“) handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie mit einem Kollektiv von insgesamt 394 Brustkrebs- Patientinnen. Untersucht wurden nur betroffene Frauen der Jahre 2005 und 2006, deren histologische Schnitte im Archiv der Pathologie der Universitätsklinik Regensburg gelagert sind. Patientendaten und Informationen zum Krankheitsverlauf entstammen dem Regensburger Tumorzentrum.

Zwar liegen bereits einige Studien vor, die sich mit dem Einfluss von Ki67 auf Therapieentscheidung und Prognose beschäftigen, aber bezüglich Proliferationsmarker-Zählverfahren fehlen bisher aussagekräftige Untersuchungsdaten.

4.1 Kritische Reflexion der eigenen Studie

Die aus der Kohortenstudie gewonnenen Daten sollen noch einmal kritisch reflektiert werden.

Statistische Auswertung: Vergleich der Messmethoden

Erster Schritt der Datenauswertung war ein Vergleich der selbst ausgezählten Ki67- Werte mit denen, die durch die Pathologen erhoben wurden. Da es sich bei den beiden oben genannten Ki67- Zählungen nicht um normalverteilte Variable handelt, ist der Mittelwertvergleich mittels t- Test nur bedingt anwendbar. Daher wurde zusätzlich der sogenannte Wilcoxon Test durchgeführt, der nicht auf normalverteilte Variablen angewiesen ist. Dieser Test belegt, dass die Mittelwerte der beiden verglichenen Kategorien signifikant unterschiedlich sind ($p = 0,013$).

Die Ermittlung des Kappa- Koeffizienten ist für den Vergleich zweier Variablen oder einer Gruppe von wenigen verschiedenen Parametern geeignet. Aus diesem Grund konnten die Eigen- und Pathologenwerte nur in Gruppen klassiert miteinander mittels quadratisch gewichtetem Kappa verglichen werden. Ein hier ermittelter Kappa- Wert von 0,79 spricht für „starke Übereinstimmung“.

Streudiagramm und Regressionslinie zeigen hohe Korrelation zwischen Eigen- und Pathologenzählung. Auch ein Pearson- Koeffizient von 0,826 spricht für eine starke Korrelation. Der höhere Mittelwert der Pathologenschätzungen ist vermutlich durch eine deutliche Überschätzung der Ki67-Werte in einer kleinen Untergruppe der betrachteten Schnitte bedingt.

Zusammenfassend zeigt dieser Messwertvergleich eine recht hohe Übereinstimmung und Korrelation zwischen Ki67- Eigenzählung und Pathologenschätzung. Die bei dieser Studie verwendete Messmethode liefert genauere Ergebnisse mit differenzierterer Verteilung der Messwerte.

Ein Untersuchungskollektiv von insgesamt 394 Patienten ist für einen solchen Vergleich mehr als ausreichend und liefert aussagekräftige Werte.

Die wichtigste statistische Operation stellt bei diesem Untersuchungsabschnitt die Ermittlung des quadratisch gewichteten Kappa- Koeffizienten dar.

Im nächsten Arbeitsschritt kam es zu einer Ki67- Doppelzählung bei 50 willkürlich ausgewählten Patientenschnitten. Auch hier hat der t-Test aus bereits genannten Gründen wenig Aussagekraft. Ein Mittelwert- Vergleich geschieht mit Hilfe des Wilcoxon Tests. Sein Ergebnis mit $p = 0,96$ spricht für einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten. Der quadratisch gewichtete Kappa- Wert deutet mit 0,92 auf „fast vollständige Übereinstimmung“ hin und stellt auch hier die aussagekräftigste Untersuchung dar. Der Pearson- Koeffizient liegt mit 0,93 extrem hoch.

Das verwendete Zählverfahren scheint somit gut reproduzierbar und für die Anwendung bei Routine- Untersuchungen in der Pathologie geeignet. Ein Untersuchungskollektiv von 50 Patienten (12,7% der insgesamt 394 Patientinnen) dürfte für eine derartige Vergleichsuntersuchung mehr als ausreichend sein.

Beim Vergleich zwischen Stanzen und Resektaten sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied für die Auswertungen macht, welcher Präparatetyp vorliegt. Zu diesem Zweck wurden Stanzen und Resektate gegenübergestellt und anhand verschiedener Parameter verglichen (Stadium, Grading, Her2/neu, Rezeptorstatus, OP-Form, Zellverteilung, Ki67). Dabei zeigte sich, dass Stanzen einen höheren Stadium IV- Anteil aufwiesen als Resektate. Auch hatten sie höhere Ki67- Werte und einen größeren Anteil an nicht operierten Patienten. BET- Operationen kamen seltener vor und der Anteil an Hotspot- Schnitten lag höher.

Erwähnt muss hier werden, dass von jedem Patienten immer nur Stanze oder Resektat vorlag und somit kein direkter Vergleich bei ein und demselben Patienten erfolgen konnte.

Auswertung: Überlebensanalysen

Mit Hilfe von Kaplan- Meier- Überlebenskurven wurden Gesamtüberleben (OAS) und rezidivfreies Überleben (RFS) untersucht und Auswertungen anhand verschiedener Einflussvariablen vorgenommen. Log- Rank- Tests dienten zum paarweisen Vergleich.

Bei Betrachtung des UICC- Stadiums zeigten sich recht eindeutige Ergebnisse. Mit höherem Stadium sinkt das kumulative Überleben zunehmend.

Beim Ki67 waren die statistischen Ergebnisse weniger eindrücklich. Die Untersuchung erfolgte anhand verschiedener Ki67- Klassifikationen (10%- Schritte, St. Gallen- Klassifikation, Vier- Stufen- Modell). Ein direkter Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkerhöhe und kumulativem Überleben ließ sich nicht eindeutig ableiten, außer in den jeweils höchsten gegenüber den niedrigsten Kategorien, die im Log-Rank-Test signifikant schlechtere Überlebensraten bei hohen Ki67-Werten zeigten.

Dies liegt wahrscheinlich an den zum Teil stark differierenden, beziehungsweise zu kleinen Fallzahlen der einzelnen Ki67- Gruppen. Die Bildung von Ki67- Kategorien mit annähernd gleich großen Fallzahlen erschiene für künftige Untersuchungen sinnvoll.

Als letzter Arbeitsschritt sollte eine COX- Regression durchgeführt werden. Hierbei wird der Einfluss verschiedener Parameter auf OAS und RFS untersucht. Nach einer univariablen Auswertung erfolgte eine multivariable, um den Einfluss eines jeden Parameters adjustiert gegenüber anderen Faktoren zu betrachten.

Die bei der COX- Regression gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 48 und 50 aufgeführt. Mit höheren Ki67- Werten steigt die Hazard Ratio im univariablen Modell zunehmend an, zum Teil mit signifikanten p-Werten im Log-Rank-Test. In der univariablen Analyse erweisen sich zudem Diagnosealter, Menopausenstatus, Grading, Stadium UICC, Lymphgefäß- und Veneninvasion als signifikante Einflussvariablen.

Bei den Schätzungen aus der multivariablen Analyse fällt auf, dass die Schätzungen für die Hazard Ratios größtenteils nicht mehr signifikant sind, insbesondere für den Einfluss von Ki67. Dies liegt vermutlich an der relativ geringen Fallzahl von 394 Patientinnen und daran, dass der Effekt von Ki67 zum Teil durch andere Variablen, z.B. dem Stadium erklärt ist. Die Durchführung einer Studie mit größerem Patientenkollektiv erschiene für diese Fragestellung sinnvoll.

Studiendurchführung und Patientenkollektiv

Die Durchführung der Studie an sich verlief nach einem vorher festgelegten Plan und zeigt ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. Die Patientendaten aus dem Tumorzentrum waren fast komplett vollständig und der Lifestatus durch regelmäßigen Abgleich mit dem Einwohnermeldeamt aktualisiert.

Das Verfahren, mit dem die rot gefärbten Ki67- Zellen gezählt wurden, erfolgte nach einem einheitlichen System und ist daher jederzeit reproduzierbar.

Einige Patienten mussten von vornherein für die Untersuchungen ausgeschlossen werden, da nur weibliche Patientinnen betrachtet werden sollten, die allesamt immunhistologische Schnitte mit Ki67- Färbung aufwiesen. Unwahrscheinlich ist, dass durch die Ausklammerung der männlichen Patienten oder derer, die keine MIB1- Färbung aufwiesen, Ergebnisse entscheidend verfälscht wurden.

Es ist zu bedenken, dass ein Kollektiv von 394 Patienten für stratifizierte und multivariable Analysen der Überlebenszeiten zu niedrig ist. Für den Vergleich zwischen den selbsterhobenen Ki67- Werten mit den Pathologenergebnissen stellen die 394 Probanden allerdings ein ausreichend großes Kollektiv dar.

Sinnvoll wäre daher die Durchführung einer ähnlichen Studie mit größerem Patientenkollektiv, um für die COX- Regression eine größere Teststärke (Power) zu erzielen.

Auch sollte man noch einmal überdenken, welche Ki67- Einteilungsklassifikation am meisten Sinn macht für die jeweilige Untersuchung. Bei den verschiedenen Betrachtungspunkten bieten sich je nach Bedarf unterschiedliche Einteilungsvarianten an (5%- Schritte, 10%- Schritte, St. Gallen Klassifikation, Vier- Stufen- Modell), wobei sich im Rahmen der vorliegenden Untersuchung das Vier-Stufen-Modell aufgrund der guten Gruppenbesetzung als vorteilhaft erwies.

4.2 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien

Sinnvoll erscheint an dieser Stelle ein Vergleich mit anderen Studien. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob sich bereits andere Untersuchungen mit Ki67 und dessen Eignung als Prognosefaktor beim Brustkrebs beschäftigt haben und welche Ergebnisse dabei gewonnen wurden.

Mittels Pubmed konnten einige Studien zu Ki67 gefunden werden. Allgemein kann man sagen, dass zwar viele Untersuchungen Ki67 als Randthema mit aufgreifen, aber ihren Schwerpunkt meist anderen Themen widmen. Reine Forschungsartikel zum Proliferationsmarker finden sich nur spärlich.

Erwähnenswert erscheint hierbei vor allem eine Arbeit aus dem Tumorzentrum Regensburg, die im Jahr 2013 publiziert wurde [57]. Hierbei handelt es sich um eine retrospektive Kohortenstudie, deren Ziel es war, nachzuprüfen, ob Ki67 für sich genommen einen prognostischen Parameter bei Brustkrebserkrankungen darstellt. Obwohl nach nationalen Leitlinien und internationalen Empfehlungen eine Ki67- Bestimmung nicht als obligat gilt, zählt die Ermittlung des Proliferationsmarkers schon lange zur pathologischen Routinediagnostik. Insgesamt wurden bei 4692 Brustkrebspatientinnen aus den Jahren 2005 bis 2011 Diagnose- und Ergebnisqualitätsdaten analysiert. Zur Studie zugelassen waren nur Frauen mit Erstdiagnose eines primären, nicht metastasierten, nicht neoadjuvant vorbehandelten Mammakarzinoms. Die Patientendaten stammten aus dem klinischen Krebsregister des Tumorzentrums Regensburg. Bei insgesamt 78% der Fälle lagen Angaben zum Proliferationsmarkerwert vor. Die Mehrheit der Brustkrebspatienten, nämlich 2074 Frauen, zeigte einen Ki67- Wert von $\leq 15\%$. 1584 Menschen zeigten dagegen Proliferationsmarkerwerte von über 15%, ein Verhältnis, das der vorliegenden Untersuchung entspricht. Ki67 korrelierte dabei signifikant mit dem Grading, genauso wie mit dem 5-Jahres-Gesamtüberleben bei prä- und postmenopausalen Patientinnen. Frauen vor der Menopause (mit Ki67 $\leq 15\%$) wiesen im Vergleich zu postmenopausalen Frauen den größten 5-Jahres-Überlebensvorteil auf (5-Jahres-Gesamtüberleben bei Ki67 $\leq 15\%$: 97,7% vs. 88,0%, bei Ki67 $>15\%$: 93,0% vs. 81,4%, $p < 0,001$) [57].

Diese Studie konnte deutlicher als in der selbst durchgeführten zeigen, dass Ki67 einen wertvollen Prognoseparameter für den Verlauf von Brustkrebserkrankungen darstellen kann. Bei der Studie wurde ein viel größeres Patientenkollektiv untersucht als in der vorliegenden Arbeit, weshalb bei uni- und multivariablen Auswertungen hohe Signifikanzen erzielt wurden, wohingegen hier nur vergleichbare Tendenzen gezeigt werden konnten. Insgesamt liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit vor allem darin herauszufinden, welche Bedeutung dem Ki67 für den klinischen Alltag zukommt. Bei der selbst durchgeführten Untersuchung wurden neben diesem Aspekt noch weitere Fragestellungen bearbeitet, wie beispielsweise die Problematik des objektivierbaren Ki67- Auszählens.

Auch eine Studie des Universitätsklinikums Saarland aus dem Jahr 2012 beschäftigt sich mit diesem Thema. Hierbei wollte man herausfinden, ob das Ki67 als Prädiktionsmarker für das Ansprechen einer neoadjuvanten Chemotherapie geeignet wäre. Alle Brustkrebspatienten der Homburger Klinik, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, wurden retrospektiv betrachtet (Zeitraum: 2007 bis Studienende). Abhängig vom ursprünglichen Ki67- Wert (Stanze) wurde überprüft, ob es zu einer sonographischen und pathologischen Remission kam. Das Kollektiv der Studie war mit nur 40 Frauen sehr klein. Ergebnis der Untersuchung war Folgendes: Die Arbeit konnte nicht eindeutig belegen, dass die Höhe des Ki67 einen Einfluss auf die pathologische Remission unter neoadjuvanter Chemotherapie aufweist. Allerdings korreliert ein höherer Proliferationsindex mit einer sonographischen Remission [60].

Alles in allem scheint ein Kollektiv von nur 40 Patienten zu wenig repräsentativ, da selbst bei meinem Patientenkollektiv immer wieder Probleme bezüglich der Fallzahlen auftraten.

In einer anderen Studie wollte man überprüfen, ob verschiedene Pathologie- Institute für identische Tumorschnitte auch gleiche Ergebnisse erzielen. Insgesamt nahmen 25 Institute an dieser Studie teil. All diese Pathologien führten an identischen Tumorschnitten Ki67-Färbungen nach ihren Routineprotokollen durch. Pro Institut wurden 38 Proben ausgewertet. Die Färbeintensität sollte unberücksichtigt bleiben.

Folgendes Ergebnis zeigte sich: Die ermittelten Ki67- Werte weisen starke Abhängigkeit von laborspezifischen Variablen auf. Problematisch erscheint daher die Festlegung eines allgemeingültigen Ki67- Cut- Off- Wertes [61].

Die Ermittlung von objektivierbaren Ki67- Werten scheint unbedingt nötig. Mit diesem Problem habe ich mich auch im Rahmen dieser Arbeit näher auseinanderzusetzen versucht.

Der Bundesverband Deutscher Pathologen e.V. und die Deutsche Gesellschaft für Pathologie versuchen durch ihr gemeinsames Projekt QuIP (Qualitätssicherungsinitiative Pathologie) eine externe Qualitätssicherung zu erreichen. In Ringversuchen soll überprüft werden, ob externe Standards in der Immunhistochemie und Molekularpathologie von den Pathologischen Instituten eingehalten werden. Prof. Dr. med. Hans Kreipe (MH Hannover) zeigt dabei besonderes Engagement bei dieser Qualitätssicherungsinitiative. [62]

Eine Studie der Universitätsklinik Erlangen beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen Ki67 und Mammographischer Dichte (MD). Untersucht wurden insgesamt 1975 Patientinnen. Für die Analyse lagen verschiedene Daten vor, unter anderem MD und Informationen zu Patient und Tumor. Die Beurteilung der Mammographischen Dichte erfolgte halbautomatisiert durch zwei unabhängige Gutachter. Die Untersuchung erfolgte mittels multifaktorieller Kovarianz- Analyse (ANCOVA). Verschiedene Faktoren, die die MD beeinflussen (Alter, Parität, BMI usw.), gingen in die Analyse mit ein.

Die MD korreliert negativ mit der Ki67- Proliferation, aber nur in einigen Patientensubgruppen. Ansonsten ist kein Zusammenhang feststellbar [63].

4.3 Vollautomatisches Ki67- Zählprogramm

Da es bisher kein einheitliches System für das Zählen von MIB1- gefärbten Tumorzellen gibt, entwickelt jeder Pathologe mit der Zeit sein eigenes Verfahren. Weil es ein recht aufwändiges Unterfangen darstellt, alle immunhistologischen Schnitte per Hand auszuzählen, sind viele Pathologen dazu übergegangen, den Proliferationsmarkerwert per Augenmaß abzuschätzen. So ist es möglich, dass ein und dasselbe Brustkrebs- Präparat von verschiedenen Pathologen unterschiedlich bewertet wird. Aus diesem Grund macht es Sinn, ein einheitliches System zu entwickeln, um sicher zu gehen, dass Ki67- Werte ermittelt werden, die auch bei erneuter Zählung oder bei Auswertung durch einen anderen Begutachter ähnliche Ergebnisse liefern.

Seit vielen Jahren ist es Gegenstand der Forschung, ein vollautomatisches Ki67- Zählprogramm zu entwickeln, das objektive und reliable Ergebnisse liefern kann. Schon viele PC- Programme kamen auf den Markt, aber keines genügte den hohen Anforderungen.

Eine der Aufgaben war es nun, ein neues, kostenpflichtiges Computerprogramm zu testen, von dem behauptet wird, dass man mit einem einzigen Mausklick eine vollautomatische Ki67- Zählung an Mamma- Ca- Schnitten durchführen könne. Entwickelt wurde dieser Ki67 Quantifier durch die Firma VMscope in Zusammenarbeit mit der Charite Berlin [52, 64].

Um überprüfen zu können, inwieweit die selbst gewonnenen Ergebnisse denen des neuen Zählprogramms entsprachen, sollte eine Demoversion dieses Ki67- Quantifiers, mit der sich eine begrenzte Anzahl an Schnitten kostenlos auswerten ließ, verwendet werden.

Die Auswertung der Schnitte erfolgt folgendermaßen:

Zunächst muss eine digitalisierte Form der immunhistologischen Präparate vorliegen. Dies ist nur möglich mit einer entsprechenden Apparatur wie beispielsweise dem MiraxScan. Anschließend muss per Hand ein Präparatausschnitt gewählt werden, der für den histologischen Schnitt besonders charakteristisch scheint. Von diesem Ausschnitt muss dann ein Screenshot gemacht werden, der vom Ki67 Quantifier ausgewertet werden kann. Die Auszählung an sich erfolgt nach Klicken der Starttaste vollautomatisch.

Bei Anwendung des Quantifiers ergaben sich allerdings einige Schwierigkeiten, weshalb das PC- Programm für die vorliegenden Schnitte nicht optimal schien.

Als erstes stellte es ein großes Problem dar, welche Vergrößerungsstufe optimalerweise gewählt werden sollte. Nach mehrmaligem Ausprobieren einigte man sich auf eine 20-fache Vergrößerung. Allerdings war damit noch nicht das Problem gelöst, welcher Präparatausschnitt für die Auswertung am geeignetsten wäre. Je nachdem, welcher Bereich betrachtet wurde, ergaben sich ganz unterschiedliche Zählergebnisse. Dies soll im Folgenden an einem Beispiel aufgezeigt werden:

Bei Abbildung 7 handelt es sich um einen der 394 Mamma- Ca- Schnitte, der nach eigener Zählung einen Proliferationsmarkerwert von 11% aufwies.

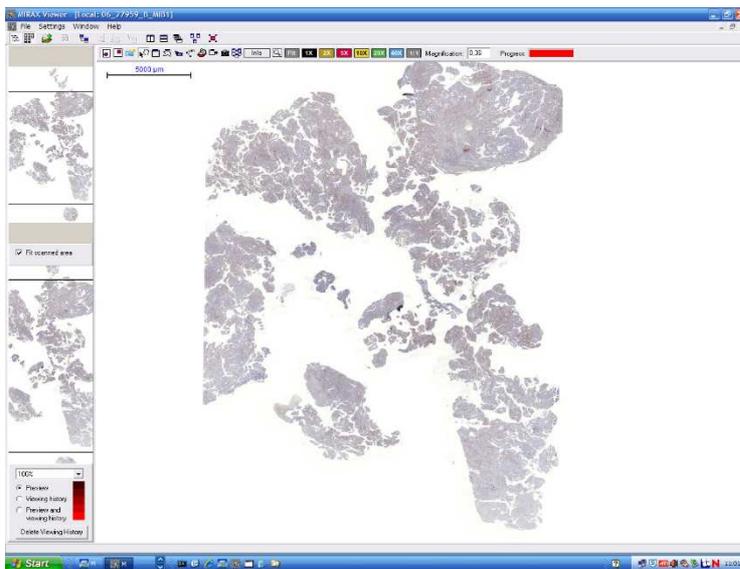


Abbildung 7: Screenshot eines Mamma- Ca Schnittes (Eigenaufnahme)

Im Folgenden werden willkürlich drei verschiedene Bereiche des Resektates gewählt, die in 20-facher Vergrößerung vom Ki67 Quantifier ausgewertet werden.

Wie aus Abbildung 8 zu lesen, liegt der ermittelte Ki67- Wert bei 14,51% und somit sehr nah an dem per Hand ausgezählten Wert von 11%.

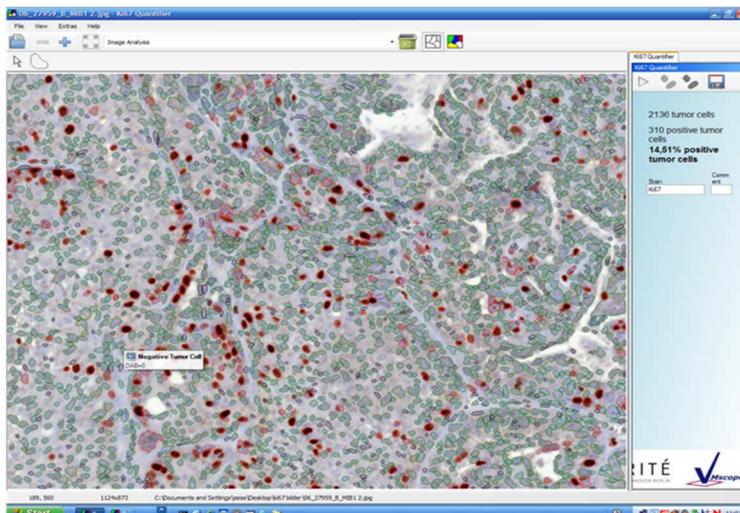


Abbildung 8: Anwendung des Ki67- Quantifiers am ersten Präparatausschnitt (Eigenaufnahme)

Wählt man allerdings andere Präparatausschnitte, ist die Abweichung zur Eigenzählung recht groß. So zeigt der in Abbildung 9 aufgezeigte Präparatausschnitt einen Ki67- Wert von 34,07%, der in Abbildung 10 dargestellte einen Wert von 39,74%.

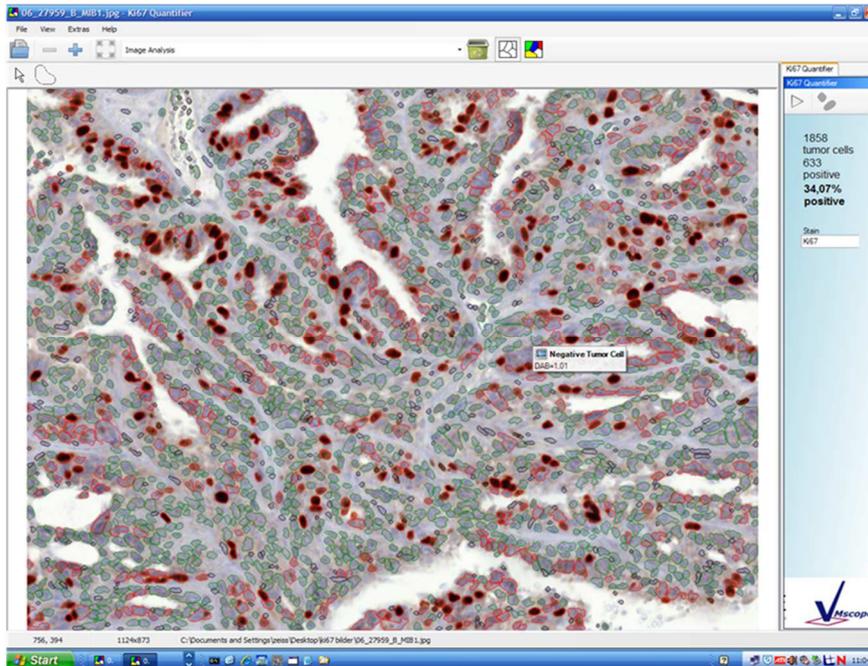


Abbildung 9:
Anwendung des Ki67-
Quantifiers am
zweiten
Präparatausschnitt
(Eigenauf-nahme)

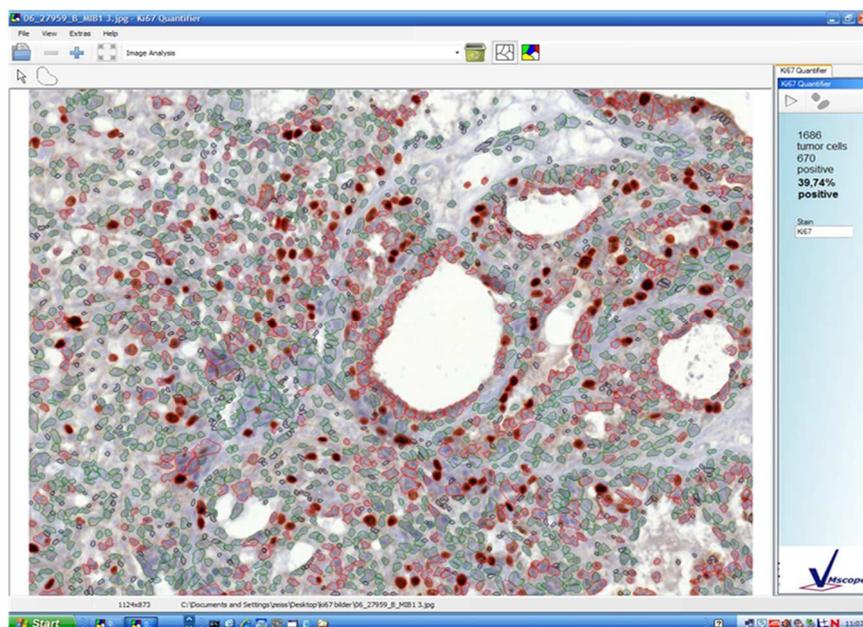


Abbildung 10:
Anwendung des Ki67-
Quantifiers am dritten
Präparatausschnitt
(Eigenauf-nahme)

Die Ergebnisse des Ki67 Quantifiers sind also nicht wirklich objektiv, da sie sehr vom gewählten Untersuchungsabschnitt abhängen. Außerdem ergaben sich im Verlauf noch gravierendere Probleme. Bei Schnitten, die nur wenige rot gefärbte Zellen enthielten, wurden

sehr viele Zellen als Ki67 positiv gewertet, da das PC- Programm den roten Hintergrundsraum nicht von Ki67- positiven Zellen unterscheiden konnte. Im Folgenden ist dies an einem Beispiel aufgezeigt:

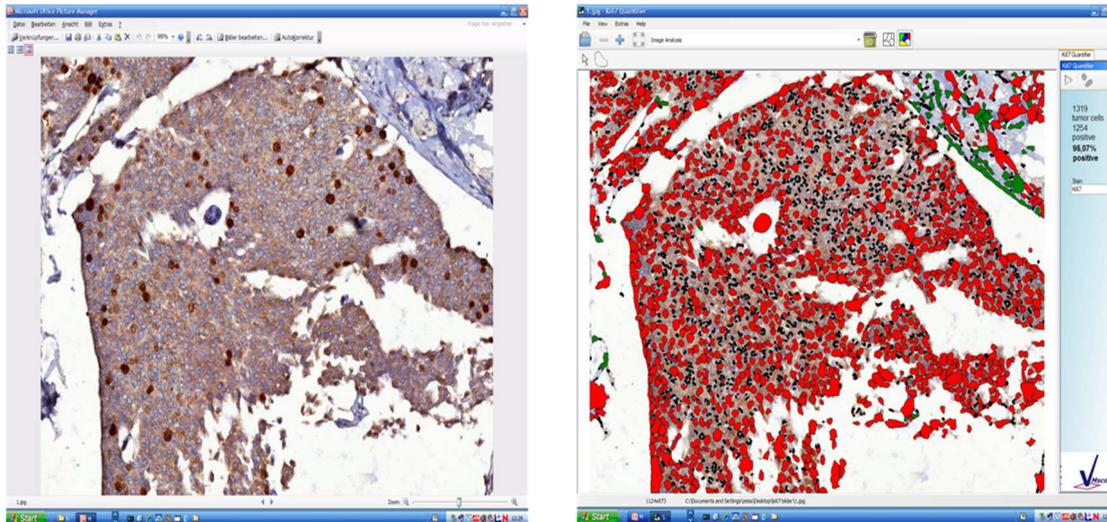


Abbildung 11: Auswertung durch Ki67- Quantifier mit zu hohen Proliferationsmarkerwerten

Um eine Lösung für dieses Problem zu finden, erfolgte Rücksprache mit den Entwicklern des vollautomatischen Zählprogramms. Im Moment gäbe es keine Möglichkeit, meine Schnitte mit diesem Programm auszuwerten, da eine Kontrasteinstellung noch nicht möglich wäre. Sie versuchen daran zu arbeiten und die Software noch weiter zu verbessern. Die Rückantwort der Softwareentwickler findet sich im Anhang.

Die Entwicklung einer objektivierbaren Zählmethode für Ki67- Schnitte wäre mehr als notwendig. Objektive und reliable Proliferationsmarkerwerte sind nötig, eine korrekte Therapieentscheidung treffen und die Prognose abschätzen zu können. Die Entwicklung eines vollautomatischen Zählprogrammes könnte hierbei eine große Hilfe sein.

Das von mir getestete Zählprogramm hat allerdings noch erhebliche Schwächen und Fehler und kann daher im klinischen Alltag nicht wirklich sinnvoll Anwendung finden. Ist es den Entwicklern möglich, all diese Schwachstellen zu beseitigen, wäre der Ki67- Quantifier eine enorme Erleichterung und Bereicherung für alle Pathologen.

5 Zusammenfassung

Bei der durchgeführten retrospektiven Kohortentudie wurden die immunhistologischen Schnitte von insgesamt 394 Brustkrebspatientinnen der Jahre 2005 und 2006 mit Hilfe eines festgelegten Zählsystems erneut auf ihren Proliferationsmarkerwert hin ausgewertet. Überprüft werden sollte zum einen, inwieweit die so ermittelten Ki67- Werte von den Pathologenschätzwerten abweichen und ob bei erneuter Zählung von 50 Präparaten ähnliche Ergebnisse wie bei der ersten Eigenzählung erzielt werden können. Außerdem sollte betrachtet werden, ob es für die Auswertungen einen Unterschied macht, ob Stanz- oder Resektate vorliegen. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag darin herauszufinden, welche Rolle der Proliferationsmarkerindex für Überleben und rezidivfreies Überleben spielt. Mit Hilfe von multivariabler COX- Regression wurde ermittelt, welche Bedeutung Ki67 für sich genommen, also unabhängig von allen anderen Faktoren, auf das Überleben hat. Ausführliche Informationen und gesammelte Daten zu allen Patienten entstammten dem Tumorzentrum Regensburg.

Bei einem Vergleich der selbsterhobenen Ki67- Werte mit den Pathologenschätzwerten zeigt sich eine recht hohe Korrelation (Pearson-Koeffizient: 0,826). Die Mittelwerte der beiden Zählungen sind laut Wilcoxon- Test signifikant unterschiedlich ($p=0,013$). Ein quadratisch gewichteter Kappa- Wert von 0,79 spricht für „starke Übereinstimmung“ der beiden Zählungen. Für einen Teil der Patientinnen ergaben sich auffällig höhere Schätzungen der Pathologen gegenüber den eigenen Zählwerten. Die selbst ermittelten Ki67- Werte sind mit einer genaueren systematischen und definierten Methode erhoben, während die Pathologenwerte auf Schätzungen beruhen.

Um überprüfen zu können, ob die gewonnenen Proliferationsmarkerwerte reproduzierbar sind, wird eine zweite eigene Zählung von 50 Präparaten vorgenommen. Hier korrelieren die gewonnenen Ki67- Werte überaus stark (Pearson- Koeffizient: 0,930). Der Wilcoxon- Test zeigt, dass die Mittelwerte der beiden Zählungen nicht signifikant unterschiedlich sind ($p=0,958$). Ein quadratisch gewichteter Kappa von 0,92 spricht für „fast vollständige Übereinstimmung“. Die verwendete Zählmethode scheint gut reproduzierbar und für pathologische Routine- Untersuchungen geeignet.

Beim Vergleich zwischen Stanz- und Resektaten sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied für die Auswertungen macht, welcher Präparatetyp vorliegt. Dabei zeigte sich, dass Stanz- einen höheren Stadium IV- Anteil aufwiesen als Resektate. Auch hatten sie höhere

Ki67- Werte und einen größeren Anteil an nicht operierten Patienten. BET- Operationen kamen seltener vor und der Anteil an Hotspot- Schnitten lag höher.

Schwachstelle der Untersuchung war, dass von jedem Patienten immer nur Stanze oder Resektat vorlag und somit kein direkter Vergleich bei ein und demselben Patienten erfolgen konnte.

Mit Hilfe von Kaplan- Meier- Überlebenskurven wurden Gesamtüberleben (OAS) und rezidivfreies Überleben (RFS) untersucht und Auswertungen anhand verschiedener Parameter vorgenommen. Log-Rank-Tests dienten zum paarweisen Vergleich. Bei Betrachtung des UICC- Stadiums zeigte sich, dass mit höherem Stadium das kumulative Überleben zunehmend sinkt. Beim Ki67 erfolgte die Auswertung anhand verschiedener Ki67- Klassifikationen (10%- Schritte, St. Gallen- Klassifikation, Vier- Stufen- Modell). Ein direkter Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkerhöhe und kumulativem Überleben ließ sich nicht eindeutig, nur tendenziell beobachten. Ein signifikant schlechteres Überleben ergab sich für die höchsten gegenüber den niedrigsten Ki67-Klassen. Dies liegt wahrscheinlich an den zum Teil stark differierenden und zu kleinen Fallzahlen der einzelnen Ki67- Gruppen. Die Bildung von Ki67- Kategorien mit annähernd gleich großen Fallzahlen erschiene für künftige Untersuchungen sinnvoll.

Bei der COX- Regression wird der Einfluss verschiedener Parameter auf OAS und RFS untersucht. Nach einer univariablen Auswertung erfolgte eine multivariable, um den Einfluss eines jeden Parameters für sich genommen, also unabhängig von allen anderen Faktoren, zu betrachten. Die bei der COX- Regression gewonnenen Ergebnisse sind ausführlich in den Tabellen 48 und 50 aufgeführt. Mit höheren Ki67- Werten steigt die Hazard Ratio zunehmend an. Während in der univariablen Analyse Ki67, Diagnosealter, Menopausenstatus, Grading, Stadium, Lymphgefäß- und Veneninvasion signifikante Einflussvariablen darstellen, zeigt sich bei der multivariablen Analyse, dass diese größtenteils nicht signifikant sind. Dies liegt vermutlich an der relativ geringen Fallzahl von 394 Patientinnen und an der gegenseitigen Beeinflussung. Beispielsweise korreliert Ki67 mit der Stadiengruppe UICC.

Sinnvoll erschiene die Durchführung einer ähnlichen Studie mit größerem Patientenkollektiv, um die Teststärke (Power) zu erhöhen. Das angewandte Zählverfahren erscheint in klinischer Praxis praktikabel und reproduzierbar. Als Prognosemarker spielt Ki67 eine wichtige Rolle und könnte bei der Therapieentscheidung Berücksichtigung finden.

Das vollautomatische Zählprogramm Ki67- Quantifier wurde an einigen ausgewählten Präparaten getestet. Hierbei zeigten sich allerdings verbesserungswürdige Schwachstellen, weshalb ein routinemäßiger Einsatz momentan noch nicht empfohlen werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Silva, O./ Zurrida S.: Brustkrebs, Diagnostik und Therapie, 1. Auflage, Elsevier München 2007, S. 21.
- [2] Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland, Brustdrüse.
http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/kid_2013_c50_brust.pdf;jsessionid=55509346AA94A87CAC8D254185E9E05.2_cid381?__blob=publicationFile (Stand: 31.03.15)
- [3] Deutsche Krebsgesellschaft: Brustkrebs/ Mammakarzinom. <http://www.krebsgesellschaft.de/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs.html> (Stand: 13.09.14)
- [4] Grimm, L. u.a. (2013): Male Breast Cancer Imaging. <http://emedicine.medscape.com/article/345979-overview> (Stand: 27.09.14)
- [5] Uhl, B.: Gynäkologie und Geburtshilfe kompakt, 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2010, S.716 ff.
- [6] Fritschi, L. u.a.: Left-handedness and risk of breast cancer, in: British Journal of Cancer, Heft 97, 2007, S. 686-687.
- [7] Perkins C. u. a.: Association between breast cancer laterality and tumor location, United States, 1994-1998, in: Cancer Causes Control, Heft 15(7), 2004, S. 637-645.
- [8] Weyerstrahl, T. u.a.: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe, 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2013, S.362 ff.
- [9] Böcker, W. u.a.: Pathologie, 4. Auflage, Elsevier München 2008, S. 1020.
- [10] Stevens, A. u.a.: Pathologie, 1. Auflage, Elsevier München 1997, S.396.
- [11] Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease, in: The Lancet, Band 358, Nr. 9291, 2001, 1389-1399.
- [12] Pschyrembel, W. u.a.: Praktische Gynäkologie für Studium, Klinik und Praxis, 5. Auflage, de Gruyter Berlin 1990, S.720.
- [13] Siegmund- Schultze, N. u.a.: Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage, in: Deutsches Ärzteblatt, Heft 105(6), 2008, A-260 / B-234 / C-230.

- [14] Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease, in: *The Lancet*, Heft 360(9328), 2002, S. 187-195.
- [15] Roychoudhuri, R. u.a.: Cancer and laterality: a study of the five major paired organs (UK), in: *Cancer Causes Control*, Heft 17(5), 2006, S. 655–662.
- [16] Lynch, B. u.a.: Physical activity and breast cancer prevention, in: *Recent results in cancer research*, Heft 186, 2011, S. 13–42.
- [17] Farvid, M. u. a.: Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study, in: *British Medical Journal*, Heft 348, 2014, g3437.
- [18] Wienecke, A. u.a.: Präventionspotenziale für Darm- und Brustkrebs in Deutschland, Band 56, Ausgabe 3, 2013, S. 439-446.
- [19] Reynolds, P. u.a.: Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study, in: *Journal of the National Cancer Institute*, Band 96, Ausgabe 1, 2004, S. 29–37.
- [20] Nekolla, E.: Epidemiologie des strahleninduzierten Mammakarzinoms, Dissertation LMU München, 2004.
- [21] Deutsche Krebshilfe: Die blauen Ratgeber- Brustkrebs- Antworten. Hilfen. Perspektiven, Stand 4/2014, S.15 ff.
- [22] MVZ für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik Trier: <http://www.patho-trier.de/leistungsspektrum/mammapathologie.html> (Stand: 21.02.15)
- [23] Lakhani S. u.a.: WHO Classification of Tumours of the Breast, 4. Auflage, WHO Press Genf 2012.
- [24] Deutschen Krebsgesellschaft (2012): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms
- [25] Grundmann, E. u.a.: Allgemeine Pathologie, 10. Auflage, Elsevier München 2004, S.208.
- [26] Brustkrebs- Info: Brustkrebs- Lexikon. <http://www.brustkrebs-info.de/brustkrebs-lexikon/lexikon.php?buchstabe=T#TNM-Klassifikation> (Stand: 02.11.14)
- [27] Wittekind, C. u.a.: TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage, Wiley- VCH Verlag Weinheim 2010, S.169ff.
- [28] Silva, O./ Zurrída S.: Brustkrebs, Diagnostik und Therapie, 1. Auflage, Elsevier München 2007, S.376 f.

- [29] Praxis für Pathologie Vechta: Klassifizierungen. https://www.pathologie-vechta.de/deu/physicians/knowledgebase/classifications/hormone_receptors.php (Stand: 21.02.14)
- [30] Keyhani, E. u.a.: Prevalence of HER-2-positive invasive breast cancer: a systematic review from Iran, in Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Heft 13(11), 2012, S. 5477-5482.
- [31] Pathologie Lübeck: Her2/neu. http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/Her2_neu/her2_neu.html (Stand 21.02.15)
- [32] Scholzen, T. u.a.: The Ki-67 protein: From the known and the unknown, in: Journal of Cellular Physiology, Band 182, Ausgabe 3, 2000, S. 311–322.
- [33] Pathologen Lübeck: Das Ki67- Antigen. <http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/Ki67/ki67.html> (Stand: 21.02.15)
- [34] Deutsche Gesellschaft für Senologie: Brustzentren. <http://www.senologie.org/brustzentren/> (Stand: 14.12.14)
- [35] AWMF: Leitlinien. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-045OL.html> (Stand 13.12.14)
- [36] Charite Berlin: Therapie von Brustkrebs. <http://frauenklinik.charite.de/behandlung/brustkrebs/therapie/> (Stand: 21.02.15)
- [37] Springermedizin: Tumorboards als Wegweiser durch komplexe Behandlungspfade. <http://www.springermedizin.at/artikel/41246-tumorboards-als-wegweiser-durch-komplexe-behandlungspfade> (Stand: 01.02.15)
- [38] Tumorzentrum München: Primär systemische Therapie beim Mammakarzinom. http://www.tumorzentrum-muenchen.de/fileadmin/Downloads/Eiermann_Okt2009.pdf (Stand: 21.02.15)
- [39] Breckwoldt, M.: Gynäkologie und Geburtshilfe, 5. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2008, S. 252 ff.
- [40] Janni, W. u. a.: Zertifizierte medizinische Fortbildung: Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms, in: Deutsches Ärzteblatt, Heft 102(41), 2005, A-2795 / B-2360 / C-2226.
- [41] Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren: <http://www.tumorzentren.de/wer-ist-die-adt.html> (Stand: 14.09.14)
- [42] Untch, M. u.a.: Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen, in: Deutsches Ärzteblatt, Heft 103(50), 2006, A-3406 / B-2961 / C-2841.

- [43] Meine Therapieentscheidung: Hormonrezeptorstatus (ER/PR). <http://www.meine-therapieentscheidung.de/de-DE/Befund/Hormonrezeptorstatus-ERPR.aspx> (Stand: 21.02.15)
- [44] City Praxen Berlin: Tumormarker (nach Organ).
<http://www.citypraxen.de/index.php/Wissenswertes/tumormarker-nach-organ.html> (Stand: 21.02.15)
- [45] Tashima, R.: Evaluation of an optimal cut-off point for the Ki-67 index as a prognostic factor in primary breast cancer, in: The Journal of Cancer Research, 2012, Band 72, Ausgabe 24.
- [46] Die in der Dissertation verwendeten Informationen zu Patienten und histologischen Schnitten stammen aus Datenbanken des pathologischen Institutes der Uniklinik Regensburg und des Tumorzentrums Regensburg.
- [47] Zeiss: Broschüre zum Mirax Scan. http://tech.zeiss.net-base.de/data/MIRAX-DVD/ALZ100_DVD/info/46-0064_d_Mirax_Scan.pdf (Stand: 21.02.15)
- [48] Storeforscience: Mirax Scanner. http://www.storeforscience.nl/uploads/infrastructure_media/48/mirax-desk-20110310092002.jpg (Stand: 14.02.14)
- [49] Die Zählshablone stammt von Herrn Professor Dr. med. Hofstädter (Pathologie Uniklinik Regensburg). Er hat diese selbst angefertigt.
- [50] Weibel, E. u.a.: Quantitative Methods in Morphology, 1. Auflage, Springer Berlin 1967, S. 167ff.
- [51] Das Zählverfahren wurde von Herrn Professor Dr. med. Hofstädter (Pathologie Uniklinik Regensburg) vorgegeben.
- [52] VMscope: Ki67 Quantifier. <http://www.vmscope.de/produkte-ki67-quantifier.html> (Stand: 21.02.15)
- [53] Bühl, A.: Statistik SPSS 20- Einführung in die moderne Datenanalyse, 13. Auflage, Pearson München 2011.
- [54] Brosius, F.: SPSS 20 für Dummies; 1. Auflage, Wiley- VCH Verlag Weinheim 2012.
- [55] Duller, C.: Einführung in die Statistik mit Excel und SPSS- Ein anwendungsorientiertes Lehr- und Arbeitsbuch, 3. Auflage, Springer Hamburg 2013.
- [56] Persönliche Beratung durch den Statistik- Mitarbeiter Dr. Michael Gerken vom Tumorzentrum Regensburg
- [57] Inwald, EC.: Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry, in: Breast Cancer Research and Treatment, 139(2), 2013, S. 539-552.
- [58] Vassarstats: Kappa. <http://vassarstats.net/kappa.html> (Stand: 29.08.14)

[59] Medistat: Glossar zur Biostatistik. http://www.medistat.de/statistikberatung-glossar-artikel.php?id=Cohen%27s_Kappa_Koeffizient (Stand: 30.08.14)

[60] Moga, S.: Validierung von Ki67 als Prädiktionsmarker für das Ansprechen einer neoadjuvanten Chemotherapie am eigenen Mammakarzinomkollektiv, Kongressbeitrag (32. Jahrestagung der Gesellschaft für Senologie), 2012.

[61] Csernie, G.: Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values, in: Breast, 23(3), 2014, S. 259-263.

[62] Bundesverband Deutscher Pathologen e.V., <http://www.pathologie.de/pathologie/quip/> (Stand 22.08.16)

[63] Heusinger, K.: Association of mammographic density with the proliferation marker Ki-67 in a cohort of patients with invasive breast cancer, in: Breast Cancer Research and Treatment, 135(3), 2012, S. 885-892.

[64] Jenoptik: Ki67 Quantifier. <http://www.jenoptik.com/de-mikroskopkamera-treiber-Vmscope-1> (Stand: 21.02.15)

Anhang

Antwort- E-Mail der Entwickler des Ki67 Quantifiers vom 28.10.2013 im Originaltext:

Hallo Frau Gleixner,

das Bild, das Sie mir geschickt haben, hat leider einige Eigenschaften, die eine digitale/automatische Auswertung unmöglich machen. Man muss bedenken, dass der Computer bei der Mustererkennung (bis jetzt) dem Menschen gegenüber klar im Nachteil ist. Der Vorteil des Computers ist, dass er Farbe, Form, Größe und Anzahl exakt messen kann, wenn die Zellen erkannt wurden. Um diese Vorteile zu nutzen, muss man aber bei der Erstellung des Bildes darauf achten, dass die Zellen für den Computer auch "gut zu sehen" sind. Ich habe mal 2 Beispiele angehängt: Bild 1 aus unserem Labor und Bild 2 und 3 aus zwei anderen Laboren in Deutschland. Der Unterschied zu Ihrem Bild ist, dass die Zellen viel klarer zum Hintergrund abgegrenzt sind.

Ich vermute, dass Sie eine sehr alte Version des Programms verwenden. Wir haben mittlerweile eine Version, die wesentlich besser mit unterschiedlichen Färbungen umgehen kann. Ihr Bild bleibt aber leider ein im Moment unlösbarer Fall. Ich glaube auch nicht, dass wir mit der Änderung von Schwellwerten o.ä. das Problem lösen können.

Viele Grüße
Stephan Wienert

Lebenslauf

Stefanie Gleixner

Schopenhauerstraße 12

92637 Weiden i. d. OPf. / Bayern

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 30.10.1990
Geburtsort: Weiden i. d. OPf.
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNGSDATEN

1997-2001 Hammerweg- Grundschule Weiden
2001-2010 Elly-Heuss- Gymnasium Weiden
2010 Abitur
Seit 2010 Medizinstudium an der Universität Regensburg und Aufnahme in das
Klinikstudentenprogramm der Kliniken Nordoberpfalz AG
2012 Ablegen des Ersten Staatsexamens
2016 Ablegen des Zweiten Staatsexamens
2017 Ablegen des mündlichen Staatsexamens
Approbation
Beginn eines Arbeitsverhältnisses im Klinikum Weiden (Med. 1)

BISHERIGE PRAKTIKA

2005 Einwöchiges Praktikum im Kindergarten St. Konrad Weiden
2007 Dreiwöchiges Praktikum in der Schwangerenberatungsstelle der Caritas Weiden
2010 Vierwöchiges Pflegepraktikum auf der Urologiestation im Klinikum Weiden
2011 Vierwöchiges Pflegepraktikum auf der Kinderstation im Klinikum Weiden
Vierwöchiges Pflegepraktikum auf der Kardiologiestation im Klinikum Weiden
2013 Erste Famulatur im Bereich Anästhesie/ operative Intensivmedizin (Klinikum Weiden)
Zweite Famulatur im Bereich Allgemeinmedizin und Naturheilverfahren (Praxis
Dr. Michael Nicklas, Weiden)
2014 Dritte Famulatur im Bereich Gynäkologie und Geburtshilfe (Klinikum Weiden)
Vierte Famulatur im Bereich der Kinderheilkunde im Klinikum Weiden
2016/17 Praktisches Jahr im Klinikum Weiden (Chirurgie, Innere Medizin, Pädiatrie)

Erklärung zum Promotionsverfahren

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Gleixner
Vorname: Stefanie
geb. am: 30. 10. 1990
in: Weiden i. d. OPf.

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Medizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades zugelassen bin
- dass ich die medizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.

Danksagungen

Abschließend möchte ich noch ein paar Worte des Dankes aussprechen.

Zum einen möchte ich auf diesem Weg Herrn Professor Dr. med. Ferdinand Hofstädter danken. Tatkräftig hat er mich während meiner Auswertungen und Untersuchungen unterstützt und hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Auch den Mitarbeitern des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Regensburg bin ich überaus dankbar für all die Mithilfe und Unterstützung während meiner Arbeit dort. Besonders hervorzuheben ist hierbei Frau Silvia Seegers, die mir mit besonderem Engagement immer zu helfen vermochte.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Tumorzentrums Regensburg, die mir bei der Beschaffung der Patientendaten und der statistischen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Hervorzuheben sind hierbei Herr Gerstenhauer und Herr Pauer, die mir bei der Sammlung und Aktualisierung der notwendigen Patientendaten halfen. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. Gerken verpflichtet, der mir bei meinen statistischen Auswertungen immer hilfreich zur Seite stand.

Auch Frau Dr. med. Inwald bin ich für ihre hilfreiche Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Danken möchte ich außerdem noch Frau Privatdozentin Dr. med. Klinkhammer- Schalke, die als Leiterin des Tumorzentrums Regensburg sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.