

Aus der

Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und  
Gesichtschirurgie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. S. Reinert

Bedeutung des Proliferationsmarkers MIB-1 für die  
individuelle Überlebenszeitprognose bei Patienten mit  
Mundhöhlenkarzinomen

**Inaugural- Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der  
**Medizinischen Fakultät**  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

**Sandra Elna Rohleder**

aus Riesa

2006

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. J. Hoffmann
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Wehrmann

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Fragestellung</b>	<b>2</b>
<b>3. Literaturübersicht</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Tumorbiologie und Möglichkeiten der Tumordiagnostik</b>	<b>8</b>
3.1.1 Das Plattenepithelkarzinom	8
3.1.2 Theorien zur Krebsentstehung	10
3.1.3 Entwicklung einer gesunden Zelle zu einer Tumorzelle	11
<b>3.2 Tumorfrontgrading</b>	<b>14</b>
<b>3.3 DÖSAK</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Therapie von Mundhöhlenkarzinomen</b>	<b>15</b>
3.4.1 Tumorchirurgie	15
3.4.2 Bestrahlung und Chemotherapie	17
<b>3.5 Der Proliferationsmarker Ki-67 (MIB-1)</b>	<b>19</b>
3.5.1 Biologie von MIB-1	19
3.5.2 Genort	21
<b>3.6 Entwicklung von Proliferationsmarkern</b>	<b>24</b>
<b>4. Material und Methodik</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Immunhistochemische Färbung</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Halbautomatische Bildanalyse</b>	<b>27</b>
4.2.1 Auswertungskriterien und statistische Auswertung	29
<b>4.3 TNM-Stadien, UICC-Schema, Grading</b>	<b>30</b>

<b>5.</b>	<b>Auswertung des Patientengutes</b>	<b>33</b>
5.1	Patientengut	33
5.2	Patientenbezogene Angaben	33
5.3	Tumornachsorge	34
5.4	Alters- und Geschlechtsverteilung	34
5.5	Klinische Befunde	35
5.5.1	Primärtumorlokalisation	35
5.5.2	Differenzierungsgrad der untersuchten Plattenepithelkarzinome	36
5.6	Tumogrösse nach ICCC	37
5.6.1	Auswertung der verschiedenen Tumorparameter	37
5.6.2	Rezidiv	42
5.6.3	Therapiearten	43
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
6.1	Verteilung der MIB-1-positiven Zellkerne sowie der Gesamtzellkernzahl	45
6.2	Beurteilung der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne	47
6.3	Zusammenhang zwischen MIB-1-Färbeindex und Grading	49
6.4	Immunhistochemische Untersuchungen des Proliferationsmarkers MIB-1 in Abhängigkeit von der UICC-Klassifikation	50
6.4.1	Auswertung der Tumorparameter nach UICC	50
6.5	Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und der Überlebenszeit	56
6.5.1	Gesamtüberlebenszeit	56
6.5.2	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter des Patienten	57
6.5.3	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall	58

6.5.4	Abschluss der Nachsorge	59
6.5.5	Nachsorgezeitraum	59
6.5.6	Überlebenszeit nach Eintreten eines Rezidivs	60
<b>6.6</b>	<b>Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen und der Überlebenszeit</b>	<b>62</b>
<b>6.7</b>	<b>Zusammenhang zwischen dem Überleben und der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
7.1	Beurteilung der Methodik und möglicher Fehlerquellen	65
7.2	Beurteilung des Patientengutes und Vergleich mit dem DÖSAK Gesamtkollektiv	65
7.3	Beurteilung der Überlebenszeiten	67
7.3.1	Überlebenszeit	67
7.3.2	Überlebenszeit in Zusammenhang mit dem Alter	67
7.3.3	Gesamtüberlebenszeit der Patienten in Zusammenhang mit dem Lymphknotenbefall	68
7.3.4	Überlebenszeit in Zusammenhang mit einem Rezidiv	68
<b>7.4</b>	<b>Beurteilung der immunhistochemischen Befunde</b>	<b>69</b>
7.4.1	Zusammenhang zwischen MIB-1-Färbeindex und Überleben	69
7.4.2	Zusammenhang zwischen dem Überleben und der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne	71
7.4.3	Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeindex, dem Grading, den Tumorparameter nach UICC und dem Lymphknotenstatus	71
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>Verzeichnis</b>	<b>75</b>
9.1	Literaturverzeichnis	75

<b>9.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>9.4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>88</b>



# 1. Einleitung

Die Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome haben einen Anteil von zwei Prozent an den malignen Erkrankungen (Schwenzer, 2001) mit ansteigender Inzidenz, die in Deutschland bei etwa 10.000 Fällen pro Jahr liegt (Howaldt, 2000). Die Prognose ist im wesentlichen abhängig vom Tumorstadium, auch spielen Risikofaktoren wie Alkohol- und Nikotinabusus und wahrscheinlich auch genetische Dispositionen eine Rolle (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002; Howaldt, 2000). Mundhöhlenkarzinome haben die Eigenschaft lymphatisch vorwiegend in den Bereich des Halses zu metastasieren. Obwohl sich die Diagnostik in den letzten Jahren verbessert hat, ist die Fünfjahresüberlebensrate im Vergleich zu früheren Veröffentlichungen kaum gestiegen und beträgt 52.4% für die Patienten des DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich) (Howaldt, 2000).

Das Zentralregister des DÖSAK sammelte seit 1989 Daten über Tumoren des Kopf- und Halsbereiches. Im Jahre 2000 lagen dem DÖSAK Aufzeichnungen von 16.000 Patienten aus 71 Kliniken, unter anderem auch aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen vor. Der DÖSAK hat es sich zum Ziel gesetzt, durch den Vergleich und die Auswertung dieser Patientendaten eine befundorientierte und individualisierte Therapie zu finden, welche die besten Heilungs- und somit Überlebenschancen bietet.

Neben konventionellen Methoden der Tumorausbreitungsdiagnostik, wie die klinische Untersuchung, die Computer- oder Magnetresonanztomografie und Panendoskopie stehen neben klassischen pathologischen Untersuchungsmethoden zahlreiche immunhistochemische Untersuchungsmethoden zur Verfügung, um das Wachstumsverhalten des Tumors zu beschreiben (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002). Dazu zählen unter anderem die Untersuchung mittels Immunhistochemie am Tumorsuppressorgen p53, des Adhäsionsmoleküls Cd34, sowie Cd44, PCNA oder des Tumorproliferationsmarkers MIB-1 an histologischen Präparaten des Tumors (Ünal, 1999; Girod, 1993; Sommer und Olofsson 1997; Golusinski, 1998). Es wäre interessant abschätzen zu können, welches Malignitätspotential der Tumor besitzt und wie sich sein Wachstumsverhalten im Primärtumor abzeichnet. Für die individuelle Bewertung der Überlebensprognose des Patienten wäre es wichtig, eine Therapie zu finden, die sich an das individuelle Krankheitsgeschehen anpasst, sowie an der

Tumorart orientiert und in der Therapie am schonensten die beste Heilungschancen erreicht, mit einer geringen Einschränkung der Lebensqualität des Patienten.

## 2. Fragestellung

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die im Zentralregister des DÖSAK gesammelten Daten von 248 Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erkrankt waren, mit den Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung dieser Tumoren in Beziehung zu setzen.

Die Datensammlung des DÖSAK umfasst verschiedene Parameter, die prospektiv in standardisierten Formularen abgefragt und registriert wurden, dazu gehörten die Stammdaten des Patienten. Aufgezeichnet wurden das Alter, das Geschlecht, das Gewicht, eventuelle Vorerkrankungen oder ob ein Alkohol- und Nikotinabusus des Patienten vorlag. Die Datensammlung des DÖSAK ist in verschiedene Abschnitte unterteilt. Zum einem sind alle prätherapeutischen Daten über den Tumor festgehalten, wie die Lokalisation, das TNM- Stadium oder ob der Patient bereits zuvor behandelt wurde. In einem weiteren Unterpunkt sind alle pathohistologischen Befunde zusammengefasst. Dazu zählen die Tumorgrosse, das Grading, der Lymphknotenbefall und die Fernmetastasierung. Informationen zum Operationsdatum, Art der Therapie und Auftreten von Rezidiven sind im Abschnitt Therapie aufgezeichnet. Alle Angaben zur Nachsorge bis hin zum Sterbedatum waren im letzten Teil der Datensammlung zu finden. So sind alle relevanten Daten zu jedem einzelnen Patienten schnell herauszufinden und stehen zur Analyse bereit.

Die immunhistochemische Präparateanfärbung erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers MIB-1, der sich in paraffineingebettetem Gewebe darstellen lässt (Cattoretti, 1992). Dieser Proliferationsmarker färbt nur Zellkerne an, die sich in der Teilung befinden, mit einem Maximum des MIB-1-Nachweises in der G2- und M-Phase (Sasaki, 1987). Alle Präparate wurden mit dem vollautomatischen Färbegerät (TechMate 500®; DAKO Hamburg) eingefärbt, was eine gleichmässige Benetzung der Präparate und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglichte. Aufgrund der grossen Anzahl der Präparate erfolgte die anschliessenden Analysen computergestützt. Die Untersuchung der Präparate bestand aus der halbautomatischen Bildanalyse mit dem computergestützten Bildanalyzesystem Quantimet

600 der Firma Leica Microsystems Imaging Solutions, bestehend aus einem Mikroskop von Leitz DM RBE mit einem PC mit entsprechender Bildverarbeitungssoftware. Diese Rohdaten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 5.0 (Microsoft Corporation) gespeichert und mit dem Programm JMP Version 5.01 (SAS Institute Inc., NC USA) ausgewertet sowie mit dem Statistikprogramm DeltaGraph 5.01 (SPSS Inc. and Red Rock Software Inc.) dargestellt.

Dadurch sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie stehen die Daten der 248 Patienten, wie deren Alter, Geschlecht oder Lymphknotenbefall mit den Daten von 9002 Patienten des DÖSAK –Zentralregisters im Zusammenhang?
- Gibt es Zusammenhänge oder Unterschiede bezüglich des Gradings, der TNM-Stadien, des klinischen Stadiums, der angewandten Therapie, der Nachbeobachtungszeit und der Überlebenszeiten und den Ergebnissen des DÖSAK-Kollektivs?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem sogenannten MIB-1-Färbeindex (Anteil der MIB-1-positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl) und der Überlebenszeit?
- Ist es möglich, zwischen der optischen Dichte der MIB-1-positiv gefärbten Tumorzellkerne und der Überlebenszeit einen Zusammenhang herzustellen?
- Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeindex (Anteil der MIB-1-positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl) und dem TNM-Stadium, dem klinischen Stadium, dem Grading und dem Lymphknotenbefall?

### 3. Literaturübersicht

MIB-1 ist ein Proliferationsmarker, der das Ki-67-Antigen während der aktiven Phase des Zellzyklusses anfärbt. Als erster Forscher beschrieb Gerdes (1983) den monoklonalen Antikörper Ki-67. Weitergehende Untersuchungen zeichneten den Antikörper als guten Marker für Zellen aus, die sich in der G1-, S- und G2-Phase der Zellteilung befinden, Ki-67 ist jedoch nicht in der G0-Phase nachzuweisen (Gerdes 1984). Cattoretti (1992) gelang es mit MIB-1, den bis dahin nur an "frischen oder schockgefrosteten Tumorschnitten" anwendbaren Proliferationsmarker Ki-67 für paraffineingebettete Tumore nutzbar zu machen. MIB-1 hat die gleichen Eigenschaften wie Ki-67, da es das gleiche Antigen anfärbt. Häufig wird der Ki-67- oder MIB-1-Färbeindex (Färbeindex= Labeling Index= LI) zur Analyse herangezogen, er errechnet sich aus dem relativen Anteil der Ki-67 oder MIB-1 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl.

Seitdem erfolgten zahlreiche Untersuchungen von Tumorgewebe mit MIB-1. Isola (1990) beobachtete an 102 Brustkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem Lymphknotenstatus, fand aber einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen histologischem Grad und dem Ki-67 LI. Die Ergebnisse von Chino (1998) an 48 Ösophaguskarzinomen unterstrichen, dass die proliferative Aktivität der Krebszellen, ausgedrückt durch die Färbung mit MIB-1, mit der Tiefe der Invasion, der Differenzierung des Tumors und der Grösse und Häufigkeit der Lymphknotenmetastasen korrelierte.

Oosterhuis untersuchte im Jahre 2000 an 301 Blasenkarzinomen zufolge korrelierte der MIB-1-Färbeindex sehr gut mit dem Differenzierungsgrad, dem Stadium und dem klinischen Verhalten von Blasenkarzinomen. Das bessere Gesamtüberleben des Patienten war abhängig von einem geringeren Stadium und Grading des Blasentumors, wobei Patienten, die jünger als 68 Jahre alt waren, mit einem niedrigerem MIB-1-Färbeindex als 13%, länger lebten ( $p=0.0001$ ). Auch Popov, der im Jahr 1997 114 Blasenkarzinome untersuchte, sprach dem MIB-1-Färbeindex ein prognostisches Potential in der Voraussage zur Entstehung von Blasenkarzinomen zu, da der MIB-1-Färbeindex stark mit dem Fortschreiten des Tumors korrelierte. Für Gelb (1997) ergab die Untersuchung von 52 Nierenkarzinomen mit dem Proliferationsmarker MIB-1 keine zusätzlichen prognostischen Informationen. Das stand auch für Hantschmann (2000) fest, der bei Untersuchungen von

74 Plattenepithelkarzinomen der Vulva keinerlei Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und morphologischen sowie klinischen Parametern, der rezidivfreien Zeit oder dem Gesamtüberleben fand. Für Salmoso (2000) hingegen bestand eine strenge Assoziation zwischen dem mit Ki-67 gefärbten Gewebe und der Aggressivität von invasiven Vulvaplatte­pithelkarzinomen nach Untersuchungen von 112 Plattenepithelkarzinomen der Vulva. Davidson (2000) sprach Ki-67 keine herausragende Rolle im Voraussagen des Überlebens von 49 Patientinnen mit Cervixplattene­pithelkarzinomen zu.

Zu dem Ergebnis, dass der MIB-1-Färbeindex keine zusätzliche Informationen bei der Diagnostik brachte, kam Graflund (2002) nach der Auswertung der Daten von 141 Plattenepithelkarzinomen der Cervix. Es gab für die Forschergruppe keinerlei Zusammenhang zwischen der Anfärbung des Plattenepithelkarzinoms der Cervix mit dem Proliferationsmarker MIB-1 und dem Lymphknotenstatus des Beckens. Suzuki (2000) zufolge könnte, nach Untersuchung von 67 bestrahlten Cervixkarzinomen, der MIB-1-Färbeindex effektiv in der Voraussage der Sensitivität von Stadium IIIb Karzinomen der Cervix auf Bestrahlung sein. Dabei zeigten Patientinnen mit einem MIB-1-Färbeindex oberhalb des Färbeindexmedians von 26.4% eine bessere Fünfjahresüberlebensrate als Patientinnen mit einem niedrigeren MIB-1-Färbeindex. Nach der Analyse von Stadium Ib-Karzinomen der Cervix unterstrichen Ho und seine Forschergruppe (2000) den Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Lymphknotenmetastasen, der Tumorgroße und dem MIB-1-Färbeindex. Layfield (1997) erforschte 50 Ovarkarzinome und fand eine Verbindung zwischen einem erniedrigten MIB-1-Färbeindex und einem verbesserten Überleben, aber es bestand kein Zusammenhang mit dem klinischen Stadium.

Ebenso wurde der Proliferationsmarker MIB-1 zur Untersuchung von Tumoren der Kopf-Hals-Region, darunter auch von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, eingesetzt.

Ergebnissen von Sommer und Olofsson (1997) zufolge dargestellt an 64 oralen Plattenepithelkarzinomen- besass der Tumorp­roliferationsmarker Ki-67 keine prognostischen Qualitäten. Es ergab sich keine Korrelation zwischen der Expression der Antikörper und der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus, dem histologischen Differenzierungsgrad, der Rezidivwahrscheinlichkeit oder der Überlebensrate. Demgegenüber standen die Angaben von Tumuluri (2002), der einen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem histologischen Grading bei oralen Plattenepithelkarzinomen fand. Den Zusammenhang

zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem Grading unterstrich auch Zidar (1996) bei ihren Untersuchungen von 20 Plattenepithelkarzinomen des Larynx und Welkoborsky (1995) fand einen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem T1- und T4-Stadium bei Larynxkarzinomen, beidem der Ki-67-Färbeindex mit der Tumorgröße ansteigt.

Beobachtungen von Sittel (2000a) bei jeweils 28 Patienten mit und ohne Rezidiv zeigten einen Zusammenhang zwischen hohem Ki-67-Färbeindex über dem Median von 15% und der Überlebenswahrscheinlichkeit, Rezidivwahrscheinlichkeit und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Dabei war ein höherer Ki-67-Färbeindex ein Indikator für eine ungünstige Prognose. Die Gruppe der 28 Patienten mit Rezidivtumoren hatte mit 59.1% einen signifikant höheren Ki-67-Färbeindex als die Gruppe ohne Rezidive (50.5%), auch lag die mittlere rezidivfreie Zeit bei den Patienten mit einem höheren Ki-67-Färbeindex mit 45 Monaten unterhalb der Patienten mit einem niedrigeren Ki-67-Färbeindex (61.7 Monate). Spafford (1996) untersuchte Plattenepithelkarzinome des Larynx und fand einen Zusammenhang zwischen einem verringertem Überleben und einem ansteigenden Lymphknotenbefall, dabei hatten Patienten mit einem Rezidiv einen höheren Ki-67-Färbeindex. Valente (1994) schlussfolgerte aus den Studium an 31 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, dass der Ki-67-Färbeindex keine Beziehung zum letztendlichen Behandlungserfolg hatte, es zeigte sich eine geringe Verminderung des Ki-67-Färbeindex nach 10 Gy Bestrahlung, ebenso sank die Teilungsrates des Tumors. Für Valente war der Ki-67-Färbeindex eine unabhängige Variable zur Bewertung, ob der Tumor auf Bestrahlung ansprach.

Grabenbauer (2000) untersuchte 102 Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom erkrankt waren, wobei 53% der Tumoren an den Tonsillen und 26% am weichen Gaumen lokalisiert waren. Er erforschte, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem Überleben gab. Bei Tumoren mit einem Ki-67-Färbeindex unter 20% lag eine verbesserte Überlebensrate der Patienten vor. Zur gleichen Auffassung gelangte Homma (1999) nach Untersuchungen an 111 Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion. Er schlussfolgerte, dass ein geringerer MIB-1-Färbeindex im Zusammenhang mit einer verbesserten Überlebensrate steht. Demgegenüber ergaben die Untersuchungen von Nylander (1997) an 80 Patienten, die an einem Mundhöhlenkarzinom erkrankt waren, ein anderes Ergebnis, dabei zeigte die Auswertung des Ki-67-Färbeindex keinen Zusammenhang mit dem Überleben. Nach der Anfärbung von 156 Plattenepithelkarzinomen

der Mundhöhle und des Oropharynx mit Ki-67 kam die Forschergruppe um Stoll (1999) zu der Auffassung, dass der Ki-67-Färbeindex nicht in der Lage ist, das Überleben oder die rezidivfreie Zeit vorauszusagen. Dies bestätigte Lavertu (2001) an 105 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen, die sich einer Radiochemotherapie unterzogen hatten. Er färbte die Präparate immunhistochemisch mit Ki-67 an und stellte die Daten in Beziehung mit den Überlebensdaten der Patienten. Dabei bestand kein Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und dem Auftreten eines Tumorrezidives, der rezidivfreien Zeit und dem Gesamtüberleben. Ebenso fanden Bettendorf und Herrmann nach Untersuchungen von 329 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (2002) keine Korrelation zwischen dem Ki-67-Färbeindex und histologischen sowie klinischen Parametern, wie dem Grading, der Tiefe der Invasion oder der Fünfjahresüberlebensrate. Der Ki-67-Färbeindex hatte damit keine prognostische Relevanz bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle.

Couture (2002) beschrieb 304 Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erkrankt waren und bestrahlt wurden, dabei sprachen Patienten mit einer höheren Proliferationsrate (Ki-67-Färbeindex >20%) besser auf eine Bestrahlung an. Mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 könnten die Tumore herausgefiltert werden, die nicht strahlensensibel sind.

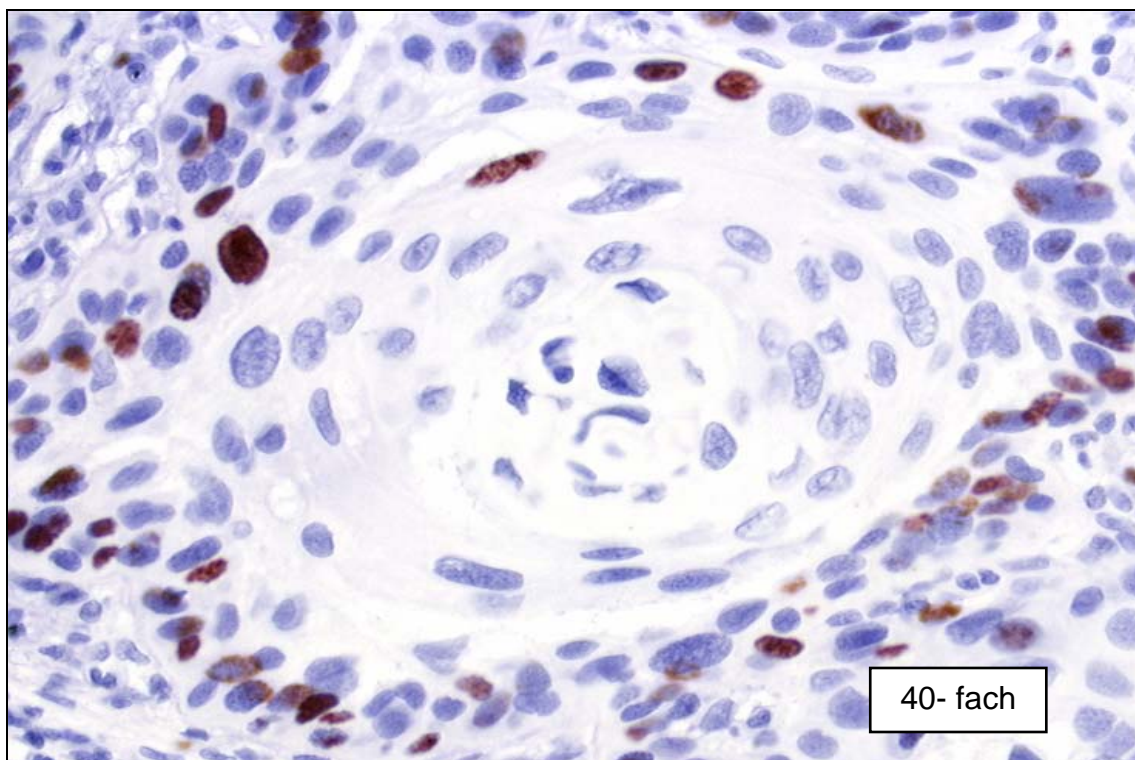
Sittel (2000b) untersuchte einundzwanzig Patienten, die an einem Larynxkarzinom mit dem Stadium T1 oder T2 erkrankt waren, dabei stellte er fest, dass der Ki-67-Färbeindex eventuell im Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs der Larynxkarzinome stehen könnte. Die Patienten mit einem Ki-67-Färbeindex unter 15% bekamen nach durchschnittlich 50 Monaten ein Rezidiv, im Gegensatz dazu standen die Patienten mit einem Färbeindex über 15%, welche ein Rezidiv nach durchschnittlich 23 Monaten bekamen. Er schlug deshalb vor, den Ki-67-Index zum Kriterium für die Therapieentscheidung zu machen.

## 3.1 Tumorbiologie und Möglichkeiten der Tumordiagnostik

### 3.1.1 Das Plattenepithelkarzinom

#### 3.1.1.1 Histologisch

Histologisch findet sich im beim Plattenepithelkarzinom in der Epidermis eine vollkommene Aufhebung der normalen Epithelschichtung, es zeigen sich atypische Stachelzellen mit deutlicher Zell- und Kernpolymorphie, Mitosereichtum und Auftreten von pathologischen Mitosen. Tumorformationen dringen zapfenartig durch die Basalmembran in das koriale Bindegewebe vor, das durch Tumorzellgruppen infiltriert wird. Bei gut differenzierten Karzinomen erfolgt die Ausbildung von Hornkugeln, diese Fähigkeit geht aber mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen verloren und der Reifegrad kann in verschiedenen Tumorarealen unterschiedlich sein (Feichtinger, 1992).



**Abb. 1: Darstellung der Hornkugel eines Plattenepithelkarzinomes der Mundhöhle (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin)**



Die tumorösen Veränderungen entstehen aus präkanzerösen Vorveränderungen, wobei als mögliche Vorstufen relativ unverdächtig weisse Flecken mit rauher Oberfläche oder erythematöse Areale angesehen werden. Dabei ist klinisch schwer festzustellen, wann eine Präkanzerose, wie eine Leukoplakie oder eine Erythroplakie in ein Karzinom übergeht (Bork, 1993). Das Karzinom entsteht am häufigsten als Schleimhautläsion mit sehr variabler Ausdehnung (Horch 1998). Erkennbar sind meistens drei Zonen. Im innersten Ring bildet sich ein unregelmässiger Ulkus mit gelegentlich erheblicher Tiefenausdehnung, der schmierig belegt ist und leicht blutet, dabei besteht in der Mitte eine Nekrose. Umgeben wird diese von einem aufgelappten Randwall mit unregelmässigen knolligen Auswerfungen, den aktiven Tumorproliferationszonen. Als äusserster Ring entsteht ein entzündlicher Schleimhautsaum mit diffuser Rötung um den Tumor, der als Abwehrring fungiert (Horch, 1998).

Tumoren erhalten sich eine Vielzahl der strukturellen und morphologischen Charakteristiken ihres Ursprungsgewebes, es entstand daher die Vorstellung, dass sich der Tumor aus arteigenen Stammzellen entwickelt (Horch, 1998). Die Stammzellen für Plattenepithelkarzinome liegen in der Basalmembran der Haut, denn bei ihrer Vermehrung halten sich die entarteten Zellen zunächst an ihr angestammtes Ausbreitungsgebiet im Epithel oberhalb der Basalmembran, das wird auch intraepitheliale Dysplasie oder Carcinoma in situ genannt. Im Laufe des weiteren, sphärischen Wachstums entwickelt sich ein kugeliges Tumor mit einem Nekrosezentrum aus absterbenden Tumorstammzellen und einer proliferierenden Aussenschicht aus teilungsaktiven Stammzellen. Der Tumor wölbt sich nach aussen zur Hautdecke auf, die später aufreißt und mit einer ulzerativen Läsion das nekrotische Tumorzentrum eröffnet (Horch, 1998).

Der Tumor hat dabei zwei Möglichkeiten sich auszubreiten, zum einem endophytisch - nach innen- und exophytisch- nach aussen- wachsend. Bei dem endophytischen Wachstum durchbricht der Tumor die Basalmembran und gewinnt Anschluss an Lymph- und Blutgefässe, wohingegen beim exophytischen Wachstum der Tumor auf der Spitze der Tumorschwellung sitzt (Horch, 1998). Makroskopisch unterscheidet man zwei Formen, die ulzeröse und die verruköse Form (Mittermayer, 1993). Die ulzeröse Form entspricht dabei der oben beschriebenen Form, sie ist bei weitem die häufigere, wohingegen die verruköse Form vermehrt bei älteren Menschen auftritt. Das Krebswachstum manifestiert sich als blumenkohlartige, papilläre Masse, die oft flächenhaft ausgebreitet ist. Hauptlokalisation ist

die Wangenschleimhaut und die Gingiva. Diese Tumorart zeichnet sich durch ein sehr langsames und wenig invasives Wachstum aus (Mittermayer, 1993).

Im Anfangsstadium des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle, davon ausgenommen sind Zungenkarzinome, fehlen fast vollständig die Schmerzsymptome, weswegen viele Tumoren auch erst im späteren Stadium entdeckt werden (Bork, 1993).

### **3.1.1.2 Entstehungsort des Primärtumors**

Zu 36% entsteht der Primärtumor der Mundhöhle am Mundboden, gefolgt von der Zunge mit 21%, der Schleimhaut der Wange mit 15% und auf der Lippe mit 8%. An den schwer einsehbaren Regionen der Mundhöhle entstehen auch Tumore zu 2% in der Tonsillenregion und zu 2% im Oropharynx (Horch, 1998).

Das Plattenepithelkarzinom macht etwa 80% aller maligner Neubildungen innerhalb der Mundhöhle aus, dabei betrifft es in über 90% der Fälle Personen über 45 Jahre (Bork, 1993), Männer erkranken etwa dreimal häufiger als Frauen. Risikofaktoren für die Entstehung dieser Tumoren sind vor allem Nikotin- und Alkoholabusus in Kombination. Menschen mit diesen Risikofaktoren haben ein 200fach erhöhte Gefährdung derartige Tumoren zu entwickeln als Nichtraucher, die wenig trinken (Schwenzer, 2001).

Die geographische Verteilung spielt eine wichtige Rolle. In Indien und Südostasien bilden Plattenepithelkarzinome etwa 50% aller Karzinome, was auf das habituelle Betelnusskauen und “reverse smoking” zurückzuführen ist (Bork, 1993).

Die Grösse des Primärtumors ist bei der Entdeckung ausserordentlich variabel, sie liegt bei 51% der Tumoren zwischen 15 und 35 mm Durchmesser. Nur sehr selten werden die Tumore schon im früheren Stadium entdeckt. Über 50% der Mundhöhlentumore infiltrieren das Nachbargewebe, am häufigsten dringen sie dabei in die Muskeln (39%), die Knochen (26%) oder die Gesichtshaut ein (Horch, 1998).

## **3.1.2 Theorien zur Krebsentstehung**

Damit ein Gewebe wachsen kann, muss es die Zellteilung durchlaufen, das heisst aus einer Mutterzelle entstehen zwei identische Tochterzellen, dieser Prozess heisst Mitose. Er lässt

sich von der Meiose, auch Keimzellentwicklung genannt, abgrenzen, bei der aus einer Mutterzelle zwei nicht identische Tochterzellen entstehen.

Die Zelle durchläuft dabei verschiedene Abschnitte, dabei nimmt die G1-Phase die Wachstumsphase ein. Dort findet durch die Wiederaufnahme der Proteinsynthese die Neubildung der Enzyme und Zentriolen statt (Buselmaier 1994). Erst in der darauffolgenden S-Phase findet die DNA- Vermehrung statt, zum Abschluss liegt das ganze genetische Material verdoppelt vor. Dabei beginnt die Synthese nicht, wie man vermuten würde, an jedem Ende, sondern sie startet an verschiedenen Stellen des Chromosomes. Während der Synthese kann es durch verschiedene Umwelteinflüsse, wie ultraviolettes Licht, ionisierende Strahlung oder bestimmte Chemikalien zur Störung des Ablaufes der Synthese kommen (Buselmaier, 1994). Nach der Replikation beseitigen Reparaturenzyme die Fehler in der DNA.

Ein sehr wichtiges Kernphosphorprotein p53 ist das Produkt eines Tumorsuppressorgens, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosomes 17 befindet. Das p53 Protein ist ein negativer Regulator des Zellzyklusses, welches die Zellen während der G1-Phase arretiert. Der Wildtyp p53 hat eine sehr kurze Halbwertszeit, er ist praktisch nicht nachweisbar, wohingegen das mutierte p53 sich akkumuliert, da es stabiler ist und so ein immunhistochemischer Nachweis möglich ist. Diese Ansammlung des p53 Proteins scheint ein gemeinsamer Schritt in der Entwicklung von vielen Tumoren zu sein (Tralongo, 1999).

Nach dem Abschluss der S-Phase erfolgt die G2-Phase, danach die Mitose. Zellen, die ihre Teilungsaktivität einstellen und in einen Dauerzustand eintreten oder solche Zellen, die für längere Zeit in einem Ruhezustand verharren, ohne ihre Regenerationsfähigkeit aufgegeben zu haben, bleiben in der G0-Phase (Buselmaier, 1994).

Nach Abschluss der Intermitosephase schliesst sich die Mitose an. Sie besteht aus Pro-, Meta-, Ana- und Telophase.

### **3.1.3 Entwicklung einer gesunden Zelle zu einer Tumorzelle**

Es wurde postuliert, dass die Akkumulation von molekularen und genetischen Veränderungen eine phänotypische Veränderung des Gewebes bewirkt, welches sich histologisch nachweisen lässt mit einer Dysregulation und Abnahme der Differenzierung der Zellen während der Zellproliferation (Gonzales-Moles, 2000). Die fundamentale Regel der

Molekularbiologie besagt, dass der Genotyp den Phänotyp bedingt, oder anders gesagt, alles biologische Verhalten resultiert letztendlich aus dem genetischen Code (Koch, 2000). Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass nur Zellen, die eine hohe proliferative Aktivität haben, eine prä-maligne Gewebeveränderung während der Karzinogenese durchmachen können (Gonzales-Moles, 2000).

Die Tumorentwicklung vollzieht sich in Teilschritten, sie ist hier in sehr vereinfachter Form wiedergegeben (angelehnt an Horch, 1998).

## **1. Initiationsphase**

Durch krebserregende Substanzen, die auf die DNA einwirken, durch die Aktivierung zell-eigener Krebsgene, durch die Schädigung der Kontrollgene des Normalwachstums oder spontan ändern die wachstumsregulierenden Gene im Genom ihre physikochemischen Eigenschaften.

Molekularbiologen haben bis jetzt 50 Schlüsselgene gefunden, die in die menschliche Tumorgenese involviert sind (Koch, 2000). Der Forscher Paz fand 1997 in diesen Zusammenhang heraus, dass Patienten mit Tumoren im Waldeyerschen Rachenring einen aggressiveren Verlauf der Erkrankungen zeigten, wenn das Humanpapillomavirus im Gewebe nachgewiesen werden konnte, offensichtlich haben auch virale Einflüsse einen Anteil an der Krebsentstehung.

Anhand von Computermodellen konnte ermittelt werden, dass 7 bis 10 Mutationen, Deletionen oder andere genetische Ereignisse, wie zum Beispiel die tumorspezifische Methylierung der Genpromotorregion, die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinomes in der Kopf- und Halsregion auslösen (Koch, 2000). Diese Einschätzung wird unterstützt durch die Auflistung der Zahlen der tumorspezifischen Verluste und Erweiterungen der Chromosomen, dokumentiert anhand komparativer Genomhybridisierung und Studien der Heterozygotieverluste (Koch, 2000). Diese genetischen Veränderungen haben die Funktion einer „Türöffnung“, denn sie sind die Basis für weitere genetische Veränderung und unkontrolliertes Wachstum, wobei die generelle Anzahl der Onkogene geringer ist als angenommen. Spätere Ereignisse sind eher assoziiert mit der Metastasenentstehung und aggressivem Verhalten des Tumors (Koch, 2000).

Das am häufigsten veränderte Gen bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion ist das p16, welches sich auf dem Chromosom 9p21 lokalisiert. Das p16-Produkt ist ein

Cyclinkinaseinhibitor, welcher die Rate der Zellen reguliert, die den Zellzyklus durchlaufen. Das ist nicht nur die allgemeinste Genveränderung, sondern auch die früheste im Tumorprogressionsmodell, sie tritt bei 57% der Dysplasien, 80% der Karzinomata in situ und 73% der invasiven Tumoren auf (Koch, 2000). Die Einstellung der ordnungsgemässen Genfunktion basiert auf der Deletion beider Kopien des Genes oder der Methylierung der Promoterregion, nur sehr wenig ereignet sich aufgrund von Mutationen.

## **2. Reparaturversuch**

Normalerweise hat die Zelle die Möglichkeit der Selbstreparatur. In der G1- zu S- und der G2- zu M- Phase und der Mitose hat die Zelle Kontrollpunkte, die aus komplexen Signaltransduktionswegen bestehen. Sie haben die Aufgabe, die Ereignisse im Zellzyklus zu überwachen und gegebenenfalls die Zelle in einen Reparaturkreislauf einzuschleusen, falls genetische Fehlentwicklungen stattgefunden haben. Diese Kontrollpunkte sind lebensnotwendig für die genetische Stabilität der Zelle (Funk, 1999), denn Mutationen in diesen Komponenten sind der Weg der Zelle in die genetische Instabilität.

## 3.2 Tumorfrontgrading

Im Jahr 1923 entwickelte Broders eine Methode, um Karzinome quantitativ anhand der Zellen zu beurteilen. Das System basiert auf der Bewertung der Proportion von hoch differenzierten Zellen im Vergleich zum Gesamttumor (Bryne, 1989). Oft stimmt die histologische Bewertung des Tumors nicht mit dem späteren Tumorverhalten überein, was Bryne (1989) darauf zurückführt, dass die Zellpopulation des Tumors zu heterogen ist und ein Unterschied zwischen seinem invasiven und metastatischen Verhalten besteht.

Bryne entwickelte 1998 ein neues, einfaches Bewertungssystem, um Plattenepithelkarzinome einzustufen. Er betrachtet dabei nur die Entwicklung an der Tumorfront, welche seiner Meinung nach die aussagekräftigste Stelle ist, um das Tumorverhalten vorauszusagen, denn die Tumorfront zeigt einen geringeren Grad der Differenzierung als der Rest des Tumors. Er gibt zu bedenken, dass viele Institutionen die Behandlung des Tumors nur von der klinischen TNM-Klassifikation abhängig machen, obwohl diese Klassifikation offensichtliche Limitationen hat.

## 3.3 DÖSAK

Seit 1989 sammelt das Zentralregister des Deutsch-Österreichisch-Schweizerische Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) Daten von Patienten, die an Tumoren in Kopf- und Halsbereich erkrankt sind. Derzeit sind 16.000 Patienten aus 71 Kliniken erfasst. Aufgrund der umfangreichen Datensammlung mit für jeden Patienten standardisierten Formularen sind die Patientendaten untereinander vergleichbar, wodurch es möglich war, aus diesem Datenpool die Patienten herauszufiltern, die an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erkrankt waren. Neben Basisinformationen über den Patienten wie Patientennummer, Name, Alter, Geschlecht, Geburtsdatum, Gewicht, Alkohol- oder Nikotinabusus standen zahlreiche andere Fakten über den Patienten zur Verfügung. Die Datensammlung des DÖSAK ist in Unterabschnitte gegliedert: Prätherapeutischer Befund, Pathoanatomischer Befund, Therapie, und Abschluss. Zu jedem einzelnen Unterpunkt sind jeweils zahlreiche Informationen aufgeführt. So sind unter dem prätherapeutischen Befund alle Angaben zum Primärtumor zu finden, wie dessen Lage und Tumorentität oder eventuelle Vorerkrankungen des Patienten. Im pathoanatomischen

Befund sind alle Angaben zum Tumor gesammelt, wie sein Durchmesser, der Lymphknotenbefall, das TNM- Stadium, das pTNM- Stadium bis hin zum Grading. Unter dem Punkt Therapie sind alle Massnahmen bezüglich der Operation aufgeführt, es sind alle Angaben zum Operationszeitpunkt und zur Resektionsart zusammengestellt. Ob der Patient eine Bestrahlung, in welcher Dosishöhe, eine Chemotherapie oder Immuntherapie erhalten hat, ist ebenso aufgeführt, wie die Angaben ob und wie Knochen oder Weichteile rekonstruiert wurden. Unter dem Punkt Abschluss sind alle Angaben zum letzten Nachsorgebefund, Auftreten eines Zweittumors oder Metastasen zu finden und ob der Tod tumor- oder therapiebedingt eintrat. Diese Standardisierung und gute Dokumentation hilft bei der Auswertung der Daten.

## **3.4 Therapie von Mundhöhlenkarzinomen**

### **3.4.1 Tumorchirurgie**

Die Anfänge der Tumorchirurgie gehen auf die Forschungen des beginnenden 19. Jahrhunderts zurück. Besonders herausragend ist dabei die Arbeit der Virchow-Zellularpathologie zu nennen. Auf Grundlage dieser Forschungen entstand die Krebsbehandlung (Hausamen, 2000).

#### **3.4.1.1 Kurzer historischer Abriss**

Bereits 1812 wagte sich Dupuytren in Paris an die erste Resektion eines karzinomatös befallenen Unterkiefers heran. Dabei ist zu beachten, dass zu dieser Zeit noch keine Lokalanästhesie und Antisepsis bekannt war. Der Heidelberger Chirurg Weber modifizierte 1866 die Zugangswege für die Operationen. Sie sind auch teilweise noch heute gültig. Die Operation der Zunge gestaltete sich lange Zeit als Problem, vor allem die Unterbindung der Arteria lingualis. Zuerst favorisierte man die Umschnürung (ecrasement) des Zungentumors mit einer Kette, diese Methode wurde aber dann zugunsten der Operation durch die seitliche Kieferspaltung, 1875 vorgestellt auf dem Deutschen Chirurgenkongress von Langenbeck, aufgegeben (Hoffmann-Axthelm, 1995).

Bereits 1898 wiesen Gusenbauer und Küttner darauf hin, dass die Zunge mit submandibulären und tiefen zervikalen Lymphknoten beider Seiten kommuniziert. Sie

schlugen deshalb vor, auch nicht tastbare Lymphknoten am Hals zu entfernen und so die Rezidivrate zu senken (Küttner, 1898). Das noch heute gültige Prinzip der "ausreichend weiten Resektion des Primärtumors im Gesunden und radikale Ausräumung der regionären Lymphknoten im Block" ist auf Crile (1906) zurückzuführen. Er prägte auch den Begriff "Block dissection". Zur Zeit werden unterschiedliche Prinzipien der Lymphknotenausräumung angewandt, die suprahyoidale, die supraomohyoidale Ausräumung, die modifiziert radikale oder die radikale Neck dissection, wobei die Indikationsstellung vom Umfang des Lymphknotenbefalls abhängig ist. In Bezug auf die radikale Ausräumung der Lymphknoten ist es offensichtlich möglich, auch mit weniger Radikalität bei der Entfernung der drainierenden Lymphknoten den gleichen therapeutischen Effekt zu erreichen wie durch eine radikale Ausräumung (Hausamen, 2000).

Einen Fortschritt für die Tumorchirurgie lieferten die verschiedenen Techniken der Weichgewebsdeckung, wie zum Beispiel der Rundstiellappen (Schuchardt, 1944), einen weiteren Schritt bedeutete der Akromiopektorallappen und der arterialisierte Hautfettlappen (Hausamen, 2000). Eine bedeutende Erneuerung brachte die Einführung des Operationsmikroskopes, und die Entwicklung von mikrochirurgischen Techniken, wie die 1980 von Reuther und Steinau eingeführte Dünndarmtransplantationschirurgie (Reuther und Steinau, 1980), sowie die Unterarm- und Oberarmtransplantation und die Transplantation des Latissimus-dorsi-Lappens (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002).

### 3.4.1.2 Jetziger Stand und Zukunft der Tumorchirurgie

Trotz vieler Bemühungen im Bereich der Therapie sind die Prognose und damit die Überlebenszeit von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle in den letzten 30 Jahren nicht signifikant gestiegen. Bis jetzt ist das chirurgische Entfernen des Tumors in sano und die En-Bloc-Resektion das Mittel der Wahl in der Tumorbehandlung.

Fortschritte haben sich auf dem Gebiet der Diagnosemöglichkeiten ergeben, vor allem durch die Benutzung der Computer- und Magnetresonanztomografie. Mit diesen Techniken ist es möglich, auch versteckte Tumoren zu lokalisieren und die genaue Ausdehnung festzustellen (Hausamen, 2000).

Für einen benignen Tumor ist die vollständige Entfernung aus der umgebenden Kapsel das Mittel der Wahl, wohingegen bei malignen, infiltrativ wachsenden Tumoren die Einhaltung einer dreidimensionalen Sicherheitszone von mindestens 1.0 cm das chirurgische Vorgehen



zu bestimmen hat, dabei ist es unerheblich, welche Struktur sich in diesem Umkreis befindet, sei es Knochen oder Weichgewebe (Schwenzer, 2001).

### 3.4.1.3 Zukunft

Der Trend in der Chirurgie geht dahin, die Organe und Funktionen weitestgehend zu erhalten. Die grösste Radikalität ist schon erreicht, Fortschritte wird es im Bereich der Grundlagenforschung in Bezug auf Onkologie mit der Gewebetransplantation geben (Hausamen, 2000). Für die Knochentransplantation laufen zur Zeit klinische Studien zur autogenen Knochenentnahme mit anschliessendem Knochenwachstum durch Osteoinduktion, wobei die Knocheninduktion die Regenerationsfähigkeit des Knochens aufgrund der Pluripotenz der Mesenchymalzellen nutzt und sein Wachstum anhand von Leitstrukturen steuert.

## 3.4.2 Bestrahlung und Chemotherapie

In einigen Fällen ist es nicht mehr möglich, die Patienten chirurgisch zu behandeln, ein Grund dafür kann die Lage des Primärtumors, seine Grösse oder die Anzahl der Metastasen sein, einige Patienten lehnen auch jede Behandlung ab (Metelmann, 2000).

Ionisierende Strahlung übt ihre Wirkung über die Ionisation und Anregung von Atomen bzw. Molekülen durch Energieübertragung aus, die durch die Strahleneinwirkung hervorgerufenen Ionisationen lösen in der bestrahlten, lebenden Materie eine Vielzahl von strahlenchemischen Vorgängen aus, auch Radiolyse genannt (Erbar, 2000).

Für die Zelle gilt: erhält die Zelle in der Mitosephase eine Bestrahlung, erholt sie sich davon kaum. Ebenfalls strahlensensibel sind Zellen, die sich in der G1- und der frühen S-Phase befinden, im Laufe der S-Phase steigt die Strahlenresistenz an. In der G2-Phase reagieren die Zellen wieder sehr strahlenempfindlich. Es finden je nach Strahlenwirkung zwei Phänomene statt, zum einem die Mitoseverzögerung, zum anderen der Zelltod.

Ein Nachteil der primären Bestrahlung ist es, dass kein Präparat zur Diagnosesicherung gewonnen werden kann, auch ist eine erneute Bestrahlung bei Nichtansprechen nicht möglich, da sonst unkalkulierbare Nekrosen auftreten. Die Bestrahlung kann auch im Anschluss

an eine chirurgische Behandlung angeschlossen werden, sie wird dann adjuvante Bestrahlung genannt (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002).

Ein weiterer Baustein ist die Chemotherapie. Darunter versteht man die Applikation von Substanzen, die durch Eingriff in den Stoffwechsel maligner Zellen und deren Zellteilungsvorgänge entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken. Obwohl diese Substanzen bei allen Zellen wirken, zeigen Tumorzellen eine grössere Affinität aufgrund ihres geänderten Stoffwechsels. Die Chemotherapie maligner Erkrankungen hat meist antiproliferierenden Charakter und wirkt deswegen besonders gut bei schnellwachsenden Tumoren (Erbar, 2000). Die Chemotherapie als alleinige Behandlungsmethode wird nur in Palliativsituationen angewandt.

Die Überlebenszeiten der Patienten verbesserten sich bei einer Kombinationsbehandlung von Bestrahlung und Chemotherapie (Mohr, 1994; Metelmann 2000). Trotz Chemotherapie und Bestrahlung ist der dauerhafte Heilungserfolg doch vergleichsweise gering. Zwar tritt zeitweilig eine Tumorrückbildung und damit eine Verlängerung der Überlebenszeit oder Linderung der Schmerzen auf, aber die Mittel haben auch erhebliche Nebenwirkungen. Es treten zum Beispiel Schleimhautulzerationen, Schädigung der Keimzellen oder Lungenfibrose auf (Metelmann, 2000).

Schon 1964 stellt Scheunemann fest, dass die Zytostatika viel wirksamer sind, wenn sie direkt in den Tumor gelangen könnten (Metelmann, 2000). Heute wird die Monotherapie mit Zytostatika nur noch eingeschränkt angewendet, vielversprechendere Resultate erzielen Polychemotherapien.

Erbar (2000) spricht der Kombinationsbehandlung mit mehreren Zytostatika viele Vorteile zu, unter anderem soll die Zelltoxizität nicht so hoch sein und die Entwicklung von resistenten Zellklonen soll verzögert oder sogar verhindert werden.

In Zukunft werden die Therapiekonzepte verbessert, in dem die Zytostatika chemisch modifiziert und mit anderen Wirkstoffen und Therapieansätzen ergänzt werden. Es werden zwei Strategien verfolgt, zum einen sollen wirkungsversprechende Substanzen auf individuellen Tumorexplantaten getestet werden und zum anderen Chemotherapien in Zusammenhang mit Immuntherapien entwickelt werden (Metelmann, 2000).

## **3.5 Der Proliferationsmarker Ki-67 (MIB-1)**

### **3.5.1 Biologie von MIB-1**

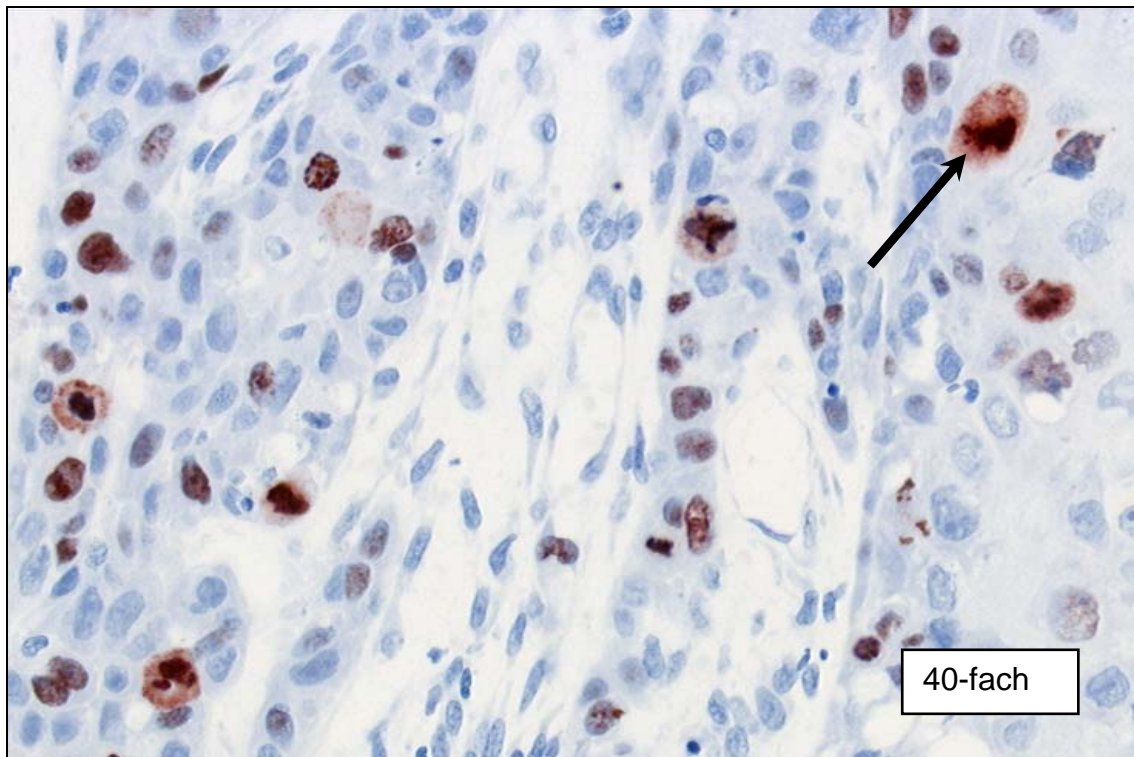
Im Jahr 1983 gelang Gerdes und seinen Mitarbeitern die Herstellung des monoklonalen Antikörpers Ki-67 unter der Zuhilfenahme der Fusion von Mausmyelomzellen mit Lymphozyten einer Maus und der Injektion von L428 Zellen, einer von der Hodgkin-Krankheit abstammenden Zelllinie (Gerdes, 1983). Antikörper von gemeinsamer Spezifität sind von ihrer Natur aus heterogen, sie werden von verschiedenen antikörperproduzierenden Zellen erzeugt (Stryer, 1996). Myelome sind eine Erkrankung antikörperproduzierender Zellen, bei der sich ein einzelner transformierter Lymphozyt unkontrolliert teilt, so dass eine grosse Anzahl gleichartiger Zellen entsteht. Sie stellen einen Klon dar mit identischen Eigenschaften, da sie von derselben Zelle abstammen, solche Tumoren produzieren grosse Mengen Antikörper einer einzigen Sorte (Stryer, 1996).

Antikörper bestehen aus 2 Arten von Polypeptidketten, einer leichten (L) über eine Disulfidbrücke an einer schweren (H) gebundenen Kette, wobei jede L- Kette eine variable Region hat (Stryer, 1996). Im Falle der Myelomzellen hat der Antikörper zwei homologe Bindungsstellen, diese erkennen die Antigene über ein Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Ki-67 erkennt ein Antigen, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird, in ruhenden Zellen aber fehlt (Gerdes, 1983). Weiterführende Studien derselben Forschergruppe ergaben, dass die Expression des Antigens nur in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklusses stattfindet, in ruhenden Zellen aber vollständig unterbleibt und mit einem Antigen reagiert, welches mit den Chromosomen assoziiert ist (Gerdes, 1984). Schlussfolgernd aus diesen Beobachtungen wurde Ki-67 zur Analyse der Proliferationsrate von malignen Tumoren vorgeschlagen (Gerdes, 1983).

Ki-67 interagiert mit einem Antigen, welches in den Zellkernen vorhanden ist, dabei stellt sich nukleoläre Antigen prädominant im nukleolären Kortex, in der Kernmatrix und in den dichten fibrillären Komponenten dar. Eine nukleoplasmäre Reaktivität konnte anhand von kleinen diskreten Strukturen festgestellt werden, wohingegen sich die Kernfärbung sehr heterogen darstellte (Verheijen, 1989a). Ki-67 erreichte seine höchste Färbeintensität während der Mitose und lokalisierte sich um die Chromosomen (Verheijen, 1989b). Nor-

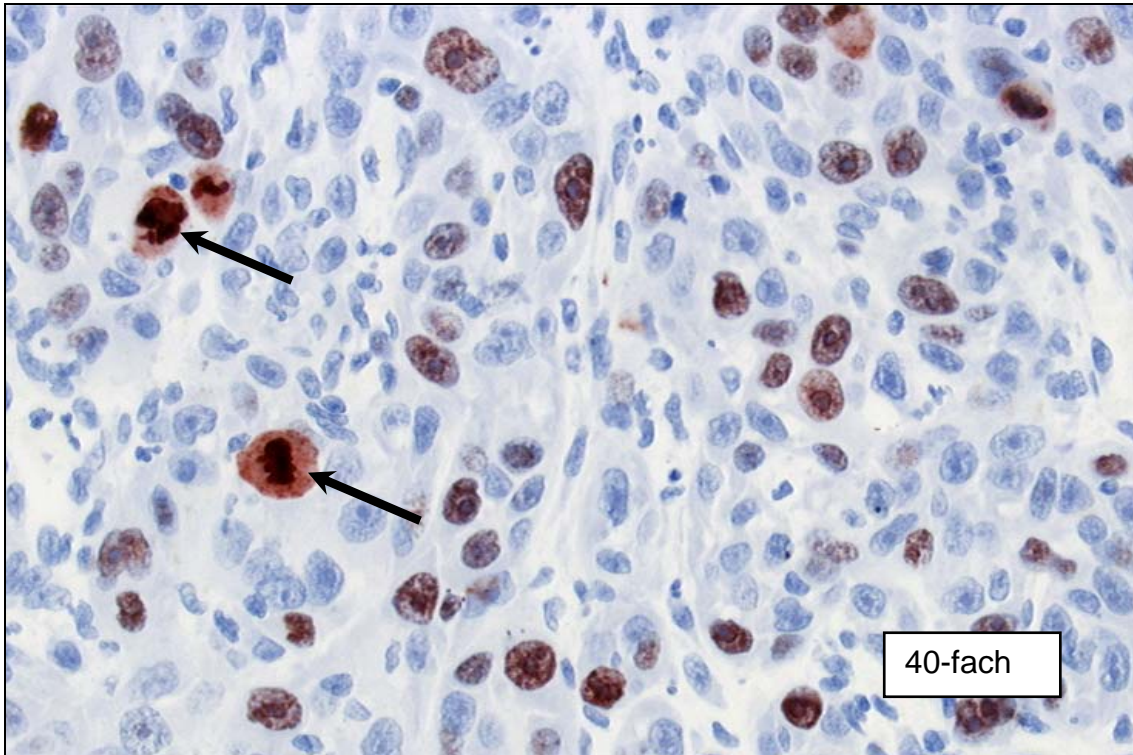
thern-Blot-Analysen zeigten, dass das Ki-67-Gen von einer riesigen mRNA transkribiert wird, diese cDNA benutzte Fonantsch, um das Ki-67-Gen auf dem Chromosom 10q25 (ter) zu erkennen (Fonantsch, 1991).



**Abb. 2: Darstellung von DNA-Kernmitosen durch die Anfärbung mit MIB-1 (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin) Pfeil: proliferierende Tumorzelle**

Gerdes gelang es 1991, das Protein zu beschreiben, welches Ki-67 identifizieren kann. Ki-67 bindet sich an ein Protein von 395 und 345 kD (Kilodalton), wobei nach dem Klonen und Sequenzieren der vollen Länge der cDNA zwei unterschiedliche Isoformen der mRNA dargestellt werden konnten. Diese differenziert gespaltene Isoformen besitzen eine „Open-Reading Frame“ von 9.768 und 8.688 bp und codieren ein Protein von geschätzten Molekulargewicht von 358.761 D und 319.508 D (Gerdes, 1991).

Obwohl das Ki-67-Antigen seit 1983 bekannt ist, stehen die Forscher noch am Anfang der Aufklärung deren Funktion (Scholzen und Gerdes, 2000), offensichtlich hat das Ki-67-Antigen eine Kontrollfunktion in der höheren Chromatinstrukturordnung (Scholzen, 2002).



**Abb. 3: Akkumulation des Proliferationsmarkers MIB-1 um das Chromatin (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin)  
Pfeil: proliferierende Tumorzelle**

Im Jahre 1999 entdeckte Takagi ein neues Protein namens Chmadrin. Es enthält wie Ki-67 eine zentrale Wiederholungsdomäne, die eine Verwandtschaft mit Ki-67 zeigt. Die Übereinstimmung ist nur an bestimmten Stellen sichtbar, sie erscheint in der N-terminalen Region, der Chmadrin-Wiederholungssequenz und der LR-Region. Zusätzlich zu diesen Primärstrukturen kommen bei den beiden Proteinen Ki-67 und Chmadrin eine analoge subzelluläre Lokalisation während des Zellzyklusses vor. Das legt die Vermutung nahe, dass die beiden Proteine eine ähnliche Funktion haben (Takagi, 1999). Von diesem Protein erhoffen sich die Forscher eine genauere Einsicht in die Funktion des Ki-67-Proteins.

### 3.5.2 Genort

Duchrow stellte fest, dass die cDNA 11,4 und 12,5 kb besitzt, entstehend aus dem alternativen Splicen vom Exon 7. Ganz wichtig ist das Exon 13, welches das Zentrum des Genes darstellt und 16 homologe Segmente, bestehend aus 366 bp, sogenannten Ki-67-Wieder-

holungen, enthält. Jedes dieser 366 bp besitzt ein hoch konserviertes „neues Motiv“, welches von ausserordentlich wichtiger Funktion sein muss, sonst hätte es die Evolution nicht so extrem geschützt (Duchrow, 1996). Der komplette Genort des Ki-67-Proteins besteht aus einer 74 bp 5'Region und einer 264 bp 3'Region. Das Gen ist in 15 Exons mit einer Grösse von 67 bis zu 6845 bp und 14 Introns, mit 87 zu 3569 Basenpaaren organisiert, wobei das Exon 13 die Eingangswiederholungsregion markiert.

Drei Introns enthalten homologe Kopien einer 'Alurepeat'. Diese Introns flankieren das alternativ splicende Exon 7 und sind frei von Donor- und Akzeptor-Splicing Signalen.

Die komplette 5'Region enthält die ersten 2 Exons, welche ein Cp-reiches Gebiet darstellen. Es ist möglich, dass die Sequenzen oberhalb und unterhalb des Exons 7 und 8 der Grund für das alternative Splicen des Exons 7 verantwortlich sind, weil 3 potentielle Bindungsstellen in der Nähe des Exons 7 lokalisiert sind, wohingegen in der Gegend des Exons 8 nur eine Stelle die Möglichkeit zum Intron-Exon-Übergang hat. Das Exon bildet den Transkriptionsbeginn. Das Auftreten von zwei potentiellen AP2-Bindungsstellen legt die Annahme nahe, die Promotorregion könnte von 2 verschiedenen Signaltransduktionssystemen beeinflusst werden, eine davon enthält Phorbolster und Proteinkinase C und die zweite wird von cAMP aktiviert, die noch die Proteinkinase A enthält (Duchrow, 1996).

Das Ki-67-Protein hat einige ungewöhnliche Eigenschaften. Als erstes die abnormale Grösse des Exons 13, seine repetitive Struktur, das alternativ splicende Exon 7, verschiedene mögliche Polyadenylationsseiten, die zellzyklusabhängige Expression des Genproduktes und seine absolute Notwendigkeit für das Fortschreiten des Zellzyklus (Duchrow, 1996).

Im gleichen Jahr fand Heidebrecht mit Hilfe von Westernblot und Immunopräzipitation heraus, dass die Daten des Molekulargewichtes des Ki-67-Proteins auf 350 und 320 kDa korrigiert werden müssen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Halbwertszeit des Ki-67-Proteins 90 Minuten beträgt. Das Protein wird am Serin und Threonin phosphoryliert und diese Phosphorylierung steigt rapide während des Zellzyklusses an, wobei das Protein schwach N-glycosyliert ist (Heidebrecht, 1996).

Der Forschergruppe um Starborg gelang 1996 die Isolation eines Mäusehomologes des menschlichen Ki-67-Antigens. Die cDNA enthält z.B. nur 13 der 16 menschlichen Tandemwiederholungen, ansonsten hat es die gleichen Merkmale wie die menschliche DNA. Anhand dieses Modells gelang es Starborg viele Funktionen des menschlichen Ki-67-An-

tigens aufzuklären. Das Mäuseprotein TSG-126 beginnt während der späten G1-Phase des Zellzyklusses zu akkumulieren und wird als erstes in schmalen Granula im Kern dargestellt (Starborg, 1996). Während der S-Phase und G2-Phase entstehen grössere Punkte, welche sich mit den Nukleoli und den heterochromatischen Regionen überlagern (Starborg, 1996). Mit dem Beginn der Mitose beginnt sich das TSG-126-Protein dramatisch zurückzubilden und mit der Oberfläche der kondensierten Chromosomen zu verschmelzen (Starborg, 1996). Ähnliche Beobachtungen am menschlichen Ki-67-Protein hatte auch Verheijen gemacht (Verheijen, 1989a).

Die Funktion des Proteins in der Interphase ist bis jetzt noch nicht klar, wobei aber 3 mögliche Funktionen diskutiert werden. Zum einem könnten sie dem Schutz und der Stabilisierung von Chromosomen dienen oder die Lokalisation dieser Proteine würde ein Mechanismus der symmetrischen Verteilung der Kernproteine zwischen den Tochterzellen sein (Starborg, 1996). Allerdings widerspricht Starborg der letztgenannten Auffassung, da das Protein fast vollständig während der G1-Interphase fehlt. Stattdessen legte die intrazelluläre Verteilung des TSG-126-Proteins während des Zellzyklusses den Schluss nahe, dass seine Funktion mit dem Chromatin in den beiden Interphasen und mitotischen Zellen assoziiert sei.

Viele Vorschläge zur Funktion des Ki-67-Proteins wurden gemacht, Verheijen schlug vor, dass das Protein mit der Kernmatrix verbunden sei (Verheijen, 1989a), Isola (1990) sah eine Verbindung mit Periribosomen, weiterhin wurde der Zusammenhang zu der DNA der Zellkerne in der Interphase diskutiert (Lopez, 1994; Sasaki, 1987).

Starborg (1996) machte die Entdeckung, dass das TSG-126-Protein in der Interphase mit den heterochromatischen Regionen verbunden ist. Damit könnte man auch die Entdeckung der variablen Zahl von kleinen diskreten Strukturen erklären, die sich nicht mit dem Nukleoli überlagern (Isola, 1990, Verheijen, 1989a). Laut Starborg könnte sich das menschliche Ki-67-Antigen auch in der heterochromatischen Region akkumulieren. Die Forschergruppe postuliert, dass das TSG-126- und das Ki-67-Protein eine Funktion im Interphasezellkern und der mitotischen Zelle ausübt und eine chromatinassoziierte Funktion hat.

Gerdes gelang es 1983, einen monoklonalen Antikörper Ki-67 gegen ein Antigen zu entwickeln, nun war es möglich, die Proliferation von Zellen direkt am schockgefrosteten Gewebe zu bewerten. Plattenepithelkarzinome und Plattenepithel zeigen bei der Ki-67-

Färbung neben der typischen Kernfärbung eine zum Teil deutliche Mitreaktion des Zytoplasmas, bei der uncharakteristischen Färbung handelt es sich vermutlich um eine Kreuzreaktion mit Zytokeratinen, welche die Auswertung zum Teil deutlich erschwerte (Lörz, 1994).

Parwaresch (1996) gab zu bedenken, dass der Antikörper Ki-67 alle Phasen des Zellzyklus anfärbt. Die höchste Färbeintensität des Ki-67-Antigen zeigt sich in der Metaphase (Verheijden, 1989b; Starborg, 1996), während die Färbung bei der Ana- und Telophase beginnt schwächer zu werden. Bridger zeigte in seiner Studie die Assoziation des Ki-67-Proteins in der zeitigen G1-Phase mit den Regionen des Satelliten-DNA, wie Zentromer, Alpha-, Telomerische Minisatelliten DNA und die Satelliten DNA III der heterochromatischen DNA (Bridger, 1998).

Ob die G1-Phase des Zellzyklus wirklich so aussagekräftig ist, bleibt dahingestellt, denn die Zellen haben viele Möglichkeiten sich während der Teilung weiterzuentwickeln. Zum einen könnten sie in eine Ruhephase eintreten, altern oder die Apoptose durchlaufen (Parwaresch und Rudolph, 1996). Du Manoir (1991) stellte eine Hypothese auf, bei der sich Ki-67 auf drei verschiedenen Wegen in der G1-Phase entwickeln könnte, dabei charakterisiert der „absteigende Weg“ die Abnahme der Färbung und das eventuelle Verlassen der aktiven Phase der Zelle und Übergang in die G0-Phase. Der „ansteigende Weg“ bringt die Zelle wieder zurück in die S-Phase und beim „konstanten Weg“ zeigt sich eine konstante Färbeintensität während der G1-Phase.

Der Ausschluss der G1-Phase würde demnach eine präzisere Bestimmung der proliferativen Aktivität erlauben und die Bewertung der Apoptoserate könnte zusätzliche Informationen zum Tumorwachstum liefern (Kuropkat, 1999).

### **3.6 Entwicklung von Proliferationsmarkern**

Um die proliferative Aktivität eines Tumors zu bewerten und damit sein Verhalten in Zukunft voraussagen und die Therapie darauf abzustimmen, wurde in vielen Studien radioaktiv markiertes Thymidin verwendet. Diese Methode barg aber viele Nebenwirkungen und Risiken in sich, sie war teuer und liess sich schlecht in der Routinediagnostik anwenden. Ausserdem bedurfte es komplizierter mathematischer Rechenoperationen, um die Zellzahl



der sich in Mitose befindlichen Zellen zu ermitteln. Es war notwendig dem Patienten das radioaktiv markierte Thymidin vor der Biopsie zu injizieren. Die Vorstufe wurde anstelle von Thymin in die replizierende DNA eingebaut und färbte nur Zellen an, die sich in der S-Phase des Zellzyklusses befanden (Schaer, 1978). Die Färbung der Sektionen variierte stark in den einzelnen Tumorabschnitten (Greenberg, 1988), ausserdem ist die Substanz toxisch und es war nicht klar, inwieweit sie Zellen zum Entarten anregte (Jones, 1994).

Eine Weiterentwicklung ohne Verwendung radioaktiv markierter Substanzen brachte das Bromedeoxyuridin (BRDU), welches in die DNA eingebaut wird. Allerdings bedurfte es auch hier der Injektion von BRDU vor der Behandlung (Wilson, 1996).

Ki-67 selbst war nur an schockgefrostenem oder frischem Biopsiematerial anwendbar, was seine Nutzbarkeit sehr eingeschränkte. Im Jahr 1992 erlaubte die Entwicklung von MIB-1 den Nachweis von rekombinanten Teilen von Ki-67-Antigen auch an formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben (Shi, 1991). Damit wurden viele Schritte überflüssig und teilweise sehr verkürzt, die enzymatische Vorbehandlung fiel weg, die Inkubationszeit konnte reduziert und die Antikörperverdünnung gesteigert werden. Auch war es nun möglich, Tumore auch retrospektiv zu bewerten (Shi, 1991), dazu musste das Gewebe einer Mikrowellenbehandlung unterzogen werden (Cattoretti, 1992). Dabei zeigte MIB-1 exakt das gleiche Verhalten wie Ki-67, es färbte die Gewebe sogar noch stärker an. MIB-1 stellte sich als sehr zuverlässige und einfach zu handhabende Methode heraus, um Tumorgewebe zu bewerten.

Im Jahre 1996 gelang es der Forschergruppe um Maria Starborg, ein Mäusehomologes des menschlichen Ki-67-Antigen zu isolieren (Starborg, 1996), welches die Möglichkeit eröffnete, das Antigen anhand von Tiermodellen zu untersuchen.

Bis zum heutigen Tag versprechen die Entwicklung der quantitativen DNA-Analyse und die Expression von E-Cadherinen noch genauere Angaben über die Tumorprogression (Welkoborsky, 2000).

## 4. Material und Methodik

### 4.1 Immunhistochemische Färbung

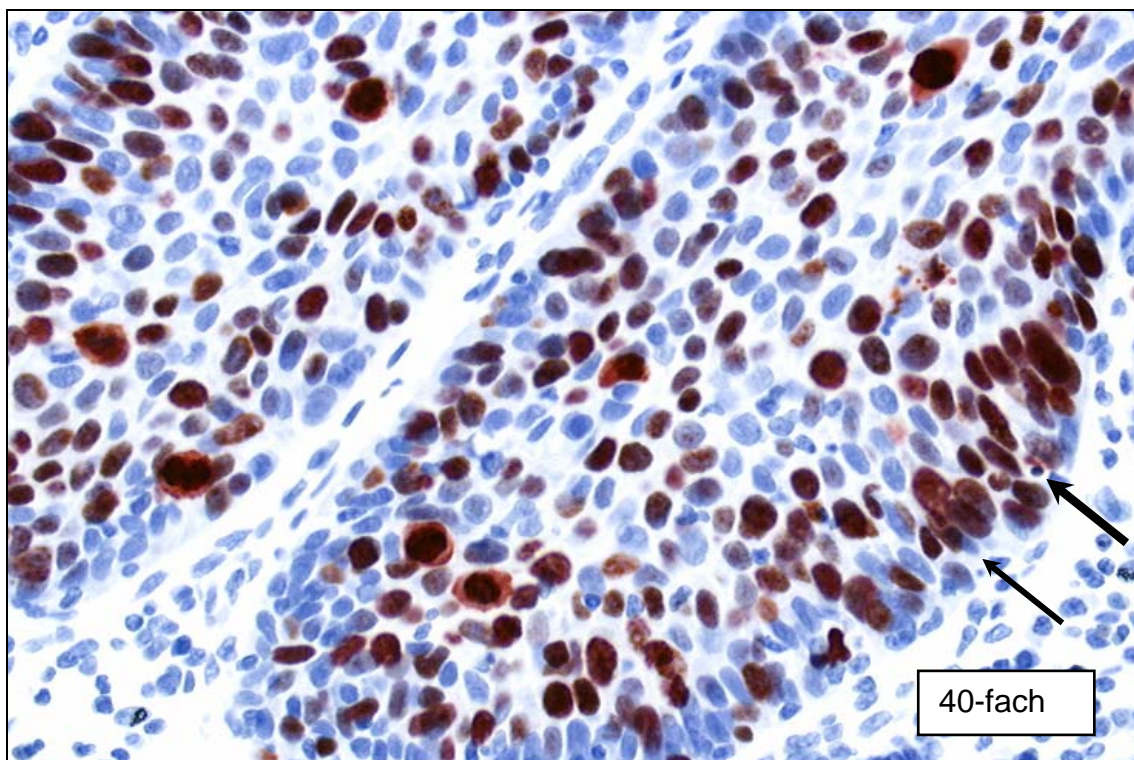
Die Immunfärbung wurde unter Verwendung der Alkalische-Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP) durchgeführt. Die 248 Gewebeproben der Tumorpatienten lagen routinemässig fixiert und in Paraffin eingebettet vor. Nach dem Schneiden mittels eines Leitz-Mikrotoms in 4 µm Schnitte erfolgte das Aufziehen der gestreckten Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichteten Kapillarspaltobjektträger (DAKO ChemMate™), die über Nacht bei 37° trocknen mussten. Die Waschung der Paraffinschnitte mit Xylol diente der Entparaffinierung und die anschliessende Behandlung mit der absteigenden Konzentration von Isopropanol der Rehydrierung der Schnitte auf die eine Waschung in dem TBS-Puffer (pH 7.2) folgte.

Die Hitzedemaskierung der Präparate erfolgte mit Mikrowellenbehandlung für 3x5 Minuten bei 600 Watt, wobei ein 10 mM Citratpuffer (pH 6.0) mit der Verdünnung 1:10 benötigte wurde.

Danach kühlten die Schnitte 20 Minuten auf Raumtemperatur herunter. Anschliessend erfolgte die Inkubation im vollautomatischen Färbegerät (TechMate 500®, DAKO, Hamburg). Zur Färbung der MIB-1 Schnitte (Ki-67, MIB-1 Dianova, Hamburg) wurde der monoklonale Mausantikörper in der Verdünnung 1:500 verwendet. Nach der Waschung mit Techmate Puffer (DAKO, Hamburg) erfolgte die Inkubation für 25 Minuten bei Raumtemperatur mit einem aus Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte unspezifische Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Anti-Maus (DAKO) als Brückenantikörper. Anschliessend wurden die Präparate mit dem Techmate-Puffer gewaschen.

Die Detektion wurde mit dem APAAP- Kit (DAKO) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Ein weiterer gebrauchsfertiger Sekundärantikörper (LINK) gegen Maus-Anti-Kaninchen entwickelter Antikörper wurde eingesetzt, der 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren musste. Nach erneuter Spülung mit Techmate Puffer erfolgte die Inkubation mit dem gebrauchsfertigen APAAP- Komplex, wobei es sich dabei um ein Maus-IgG1-Antikörper handelt, der spezifisch an die alkalische Phosphatase aus Kälberdarmmukosa gebunden ist. Die letzten drei Schritte wurden zur Verstärkung noch

einmal für 10 Minuten wiederholt. Eine DAB-Entwicklerlösung sorgte für die Braunfärbung der Antikörperbindungsstellen. Die zehnmütige Inkubation mit 1% Hydrogenperoxid in Methanol diente der Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität, womit die unspezifische Anfärbung verhindert werden konnte. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für eine Minute mit Mayers Haematoxylin (DAKO ChemMate™). Danach mussten die Schnitte mit der aufsteigenden Alkohollösung dehydriert und permanent eingedeckt werden.



**Abb. 4: Lichtmikroskopische Darstellung der MIB-1-positiven Zellkerne (braun, Pfeil) an der Tumorfront des Plattenepithelkarzinoms (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin)**

## 4.2 Halbautomatische Bildanalyse

Die Präparateanalyse erfolgte mit dem computergestützten Bildverarbeitungssystem Quantimet 600 der Firma Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd, es bestand aus einem Mikroskop Leitz DM RBE und einem PC mit entsprechender Bildverarbeitungssoftware.

Zur Aufnahme des mikroskopischen Bildes wurde eine 3 CCD-Farbvideokamera der Firma Sony verwendet, die ein elektronisches Signal erzeugt, dessen Stärke proportional zur Helligkeit des Bildes variierte. Das Signal wurde zu Bildpunkten, den sogenannten Pixeln, digitalisiert. Für jedes dieser Pixel erfolgte die Ermittlung der Helligkeit des Bildes, welche als Grauwert zwischen 0 und 255 codiert wurde. Diese digitale Form diente als Grundlage für die Analyse.

Die Auswertung konnte sowohl rein manuell erfolgen als auch durch teilweise oder vollständig automatisiert ablaufende „QUIPS“-Routinen (Quantime Interactive Programming System). Die „QUIPS“ erlaubten die Ablaufsteuerung von Quantimetaktionen mit Hilfe von Kontrollstrukturen, die an der Programmiersprache BASIC orientiert sind.

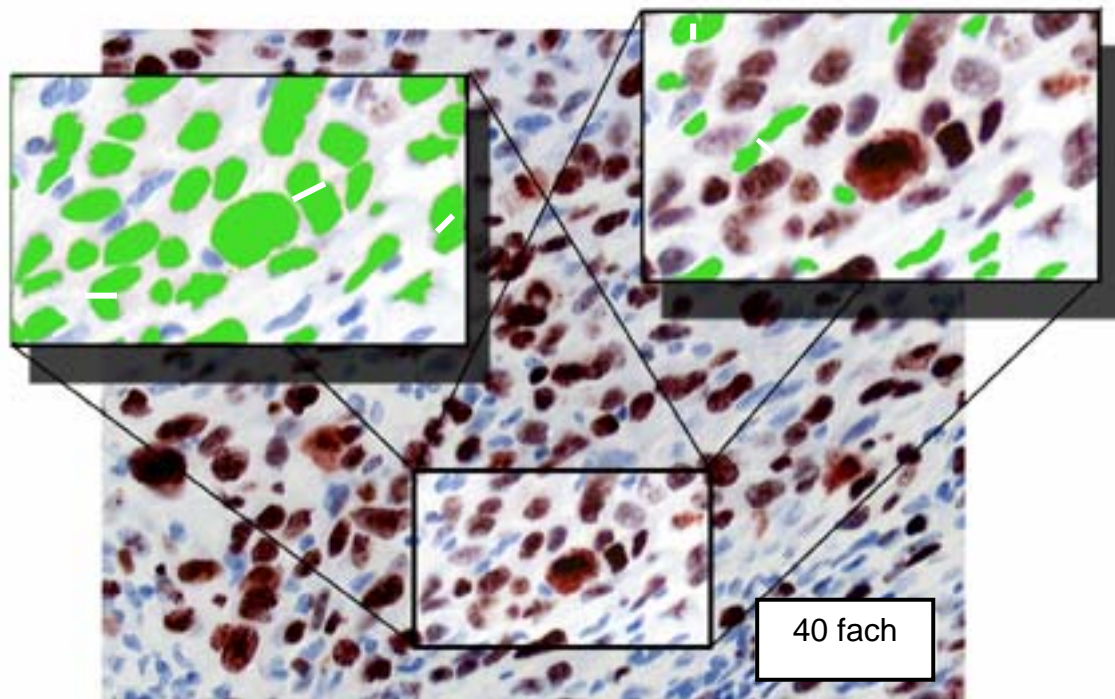
Um ein optimal ausgeleuchtetes Objektfeld ohne Reflexe zu erhalten, erfolgte das Köhlern. Nach der korrekten Einstellung der Helligkeit des Bildes, folgte eine sogenannte “Shading Correction”, um die ungleiche Ausleuchtung der Präparate auszugleichen.

Zur densitometrischen Messung, also der Messung der optischen Dichte, wurde nach der optimalen Einstellung des Bildes eine Kalibrierung am Graubild mit Filtern bekannter optischer Dichte notwendig. Die Grauwertkalibrierung erfolgt durch Erstellen einer Eichkurve, in der jedem Grauwert von 0-255 ein entsprechender kalibrierender Wert zugeordnet wurde. Die optische Dichte konnte einen Wert zwischen 0 und 2 annehmen.

Wurde das Bild soweit optimal eingestellt, erfolgte am Livebild die Schwellenfestsetzung, welche die interessierenden Teile des Bildes detektierte und mass. In unserer Studie war die Schwelle für Rot und Blau festzusetzen.

Durch die Detektion wurden die zu messenden Objekte des Bildes für eine anschließende binäre Weiterverarbeitung ausgewählt und markiert. Dabei bestimmte der Benutzer einen Schwellenwert. Alle Pixel, deren Grauwert ober- bzw. unterhalb dieses Schwellenwertes lagen, werden selektiert und in ein Binärbild übertragen. Die Detektion legte die Abgrenzung des zu messenden Objekts fest und war somit eine fundamentale Funktion des Bildanalysesystems.

Mit der Funktion „Kalibrierung“ wählte man zu der Objektivvergrößerung, mit der man arbeiten möchte. Bei der vorliegenden Arbeit wurde mit einer 40fachen Vergrößerung gearbeitet. Die Messung wurde an fünf Feldern an der Tumorgrenze durchgeführt, da dort die optimale Bewertung des Wachstums des Tumors möglich war.



**Abb. 5: Detailaufnahme der Zählung von MIB-1-positiven/-negativen Zellkernen (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin)**

linker Ausschnitt: Zählung der MIB-1-positiven Zellkerne  
 rechter Ausschnitt: Zählung der MIB-1-negativen Zellkerne

#### 4.2.1 Auswertungskriterien und statistische Auswertung

Das Programm hatte folgende Aufgaben und Funktionen, die für jedes Präparat ausgeführt wurden:

- ➔ Bestimmung der mittleren optischen Dichte der MIB-1-positiv gefärbten Zellkerne
- ➔ Anzahl der MIB-1-positiven Zellkerne pro Messfläche ( $2.89 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ )
- ➔ Anzahl der MIB-1-negativen Zellkerne pro Messfläche ( $2.89 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ )
- ➔ Berechnung des prozentualen Anteils der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl

Nach Abschluss der Messung errechnete das Programm folgende Werte für jedes Präparat:

- ⇒ Anzahl der angefärbten MIB-1-positiven Tumorzellkerne
- ⇒ Anzahl der MIB-1-negativen Tumorzellkerne
- ⇒ optische Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne
- ⇒ optische Dichte der MIB-1-negativen Zellkerne
- ⇒ Flächenmessung der fünf ausgewählten Gesichtsfelder
- ⇒ Summe der Gesamtzellkernzahl
- ⇒ Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl, Färbeindex
- ⇒ Anteil der MIB-1-negativen Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl, Färbeindex
- ⇒ Anzahl der MIB-1-positiven Zellkerne, hochgerechnet auf das ganze Präparat

Die Auswertung über die optische Dichte der MIB-1-negativen Zellkerne und der Anteil der MIB-1 negativen Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl ist hier nur der Vollständigkeit aufgeführt, sie waren nicht Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit und erfuhren deswegen keine weitere Auswertung.

Diese Rohdaten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Exel 5.0 (Microsoft Corporation) aufgezeichnet und auf Diskette abgespeichert. Die Auswertung und die Darstellung der Daten erfolgte dem Programm JMP Version 5.01 (SAS Institute Inc., NC USA) sowie dem Statistikprogramm DeltaGraph 5.01 (SPSS Inc. and Red Rock Software Inc.).

Für jeden der oben aufgeführten Werte sind die Mittelwerte, die Standardabweichung, der Median, der maximale und minimale Wert errechnet und in Tabellen und Grafiken umgesetzt worden (siehe Kapitel 6).

### **4.3 TNM-Stadien, UICC-Schema, Grading**

Um einen Tumor einzuordnen, wird das UICC-Schema (Union Internationale Contre le Cancer), auch TNM-Schema genannt, verwendet. Für jede Tumorart und -lokalisierung ergibt sich eine andere Einteilung, womit das Erstellen einer individuellen Formel für jeden Tumor möglich ist. Das TNM-System beschreibt die anatomische Ausdehnung der Tumorerkrankung, dabei steht T für Tumor, N für lokoregionale Filiae und M für Fernmetastasen (Schwenzer und Ehrenfeld 2002; Sobin 2001).

Lippe, Mundhöhle, Oropharynx					
T0	kein Primärtumor	N0	keine regionalen Lk	M0	keine Fernmetastasen
T1	≤ 2cm	N1	solitärer ipsilateraler Lk, <3cm	M1	Fernmetastasen
T2	>2-4 cm	N2a	solitärer ipsilateraler Lk, >3 < 6 cm		
T3	> 4cm	N2b	multiple, ipsilaterale Lk, < 6cm		
T4	Nachbarorgane infiltriert	N2c	bilaterale, kontralaterale Lk, < 6 cm		
		N3	Lk, > 6cm		

**Tab. 1: TNM-Klassifikation für Lippen-, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome**

### Klinische Stadieneinteilung nach UICC

Zur Vereinfachung wurden aufgrund der Empfehlung der UICC auf der Basis der TNM-Klassifikation bei Mundhöhlen und Oropharynxkarzinomen die Einteilung in vier klinische Stadien vorgegeben, welche mit den römischen Ziffern von I-IV angegeben sind (Tab. 2).

Lippe, Oropharynx, Mundhöhle	T1	T2	T3	T4	
N0	Stadium I	Stadium II			
N1			Stadium III		M0
N2				Stadium IV	
N3					
N0-3			Stadium IV		M1

**Tab. 2: Stadieneinteilung der Lippen-, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome auf Grundlage der TNM-Klassifikation der UICC**

## Histologisches Grading

Das entnommene Gewebe wird histologisch untersucht. Dabei spielen unter anderem der Zellreichtum, die Mitoserate oder das Vorliegen von Nekrosen eine Rolle. Der Grad der Differenzierung ist von sehr grosser Relevanz. Dabei ergeben sich folgende Stadien:

G0: Papillom, kein Nachweis einer Anaplasie

G1: Tumor gut differenziert

G2: Tumor mässig differenziert

G3: Tumor schlecht differenziert

G4: Tumor entdifferenziert (anaplastisch)

GX: Differenzierungsgrad nicht bestimmbar

Bei radikaler Tumorresektion beurteilt der Pathologe anhand des Resektates die Grösse des Tumores, die Lymphknoten mit Bewertung einer Infiltration sowie eines Kapseldurchbruchs, sowie die Resektionsgüte. Dabei können sich durchaus andere Einteilungen der Klassifikation als bei der cTNM-Klassifikation ergeben, obwohl anhand aufwändiger bildgebender Verfahren, wie Sonographie oder CT die Genauigkeit in der Tumordickenschätzung zugenommen hat (Howaldt, 2000). Die neue TNM-Einteilung für den Tumor und Lymphknoten unterscheidet sich von der cTNM-Klassifikation dahingehend, dass vor die Buchstaben der TNM-Nomenklatur ein p eingefügt wird, also pT, pN, ....



## 5. Auswertung des Patientengutes

### 5.1 Patientengut

Untersucht wurden die Operationspräparate von 268 Tumorpatienten, die in einem Zeitraum vom 18.03.1988 bis 22.08.1997 an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen operiert wurden. Dabei konnten nur Patienten einbezogen werden, deren in Paraffin eingebettetes Gewebe in ausreichender Anzahl und Qualität in den Archiven des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen vorhanden waren. Aufgrund dessen reduzierte sich die Präparateanzahl auf 248.

### 5.2 Patientenbezogene Angaben

Zur Auswertung wurden verschiedene Patientenparameter herangezogen, die standardmässig im Register des DÖSAK erhoben werden. Nachfolgend ist nur ein kleiner Ausschnitt der Daten aufgelistet und aus Datenschutzgründen anonymisiert.

Personenbezogene Daten:	Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht, Grösse, Alkohol- und Nikotinabusus
Tumorbezogene Daten:	Datum der Erstdiagnose, Lokalisation des Tumors, Art des Tumors, Infiltration des Knochens und der Nachbarorgane, Lymphknotenstatus, Fernmetastasen, TNM-Status, Grading
Art der Behandlung:	Operation, Chemotherapie, Bestrahlung
Operationsdaten:	Datum der Operation, Tumorfremie Resektionsränder, Infiltration von Nachbarstrukturen, Umfang der Lymphknotenausräumung
Nachsorge:	Rezidiv, Recallintervall, Fernmetastasen, Überlebenszeit
Abschluss:	Überlebenszeit, Sterbedaten, Todesursache

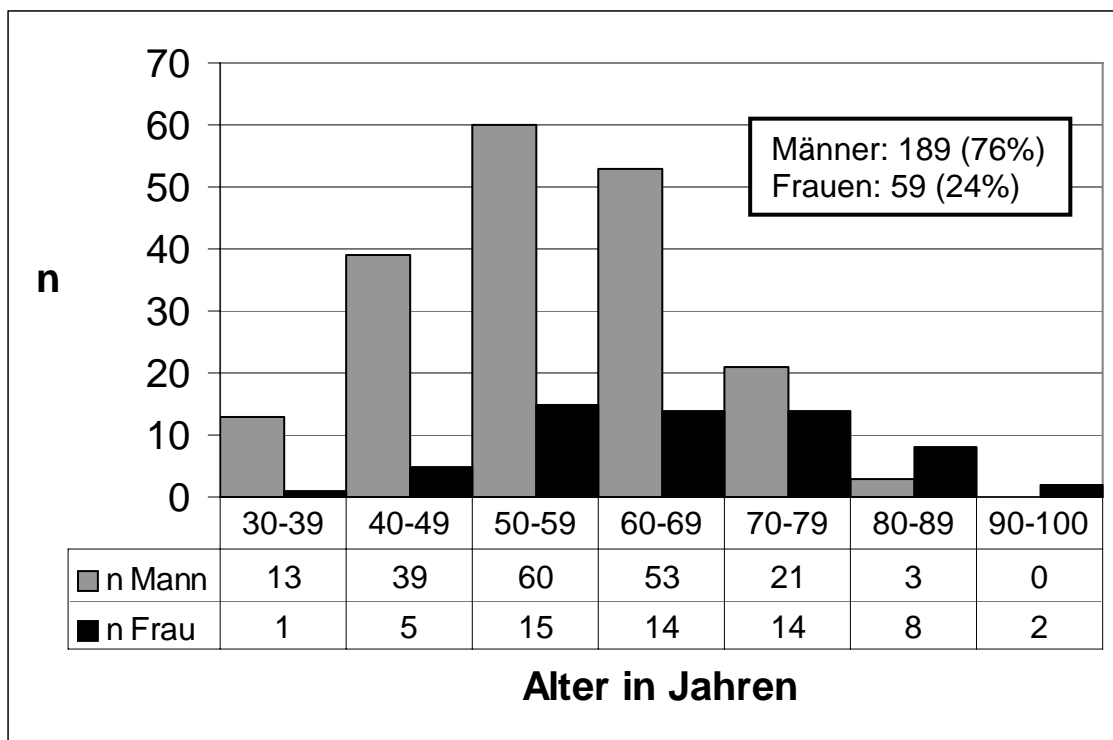
### 5.3 Tumornachsorge

Ein Tumornachuntersuchungsprogramm beinhaltet die Suche nach Tumorrezidiven, Zweitumoren, sowie Metastasen, so dass rechtzeitig sinnvoll therapeutisch interveniert werden kann (Schwenzer und Ehrenfeld 2002).

Die Patienten der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen sind in eine regelmässige Tumornachsorge eingebunden. Im ersten Jahr erscheinen sie monatlich zur Nachkontrolle, wobei dieser Abstand im zweiten Jahr auf 8 Wochen erhöht wird und der Recallturnus im dritten Jahr 3 Monate beträgt.

### 5.4 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das Patienten Klientel setzte sich aus 189 Männern (76%) und 59 Frauen (24%) zusammen. Bei den Männern lag das durchschnittliche Alter bei 56.9 Jahren (Median = 57), wobei das Alter des jüngsten Patienten 34 und das des ältesten 87 Jahre betrug. Das mittlere Alter der weiblichen Patienten betrug 65.9 Jahre (Median= 66), die Spanne erstreckte sich von 38 Jahre bis 93 Jahre.



**Abb. 6: Alters- und Geschlechtsverteilung**

## 5.5 Klinische Befunde

### 5.5.1 Primärtumorlokalisation

Für diese retrospektive Studie kamen nur die Patienten in Frage, die an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle erkrankt waren. Bei 65 Patienten lokalisierte sich der Tumor im vorderen Mundbodenbereich und bei 18 Patienten im seitlichen Mundboden. 49 Tumorpräparate wurden an der Zunge entnommen, an der Lippe stellte sich 28 und am Gaumen 15mal ein Plattenepithelkarzinom dar. An der Unterkieferschleimhaut befand sich bei 33 Erkrankten und an der Oberkieferschleimhaut bei 7 Patienten ein Tumor und an der Wangenschleimhaut konnte bei 20 Patienten ein Plattenepithelkarzinom diagnostiziert werden und 13 Resultate entfallen auf sonstige Lokalisationen.

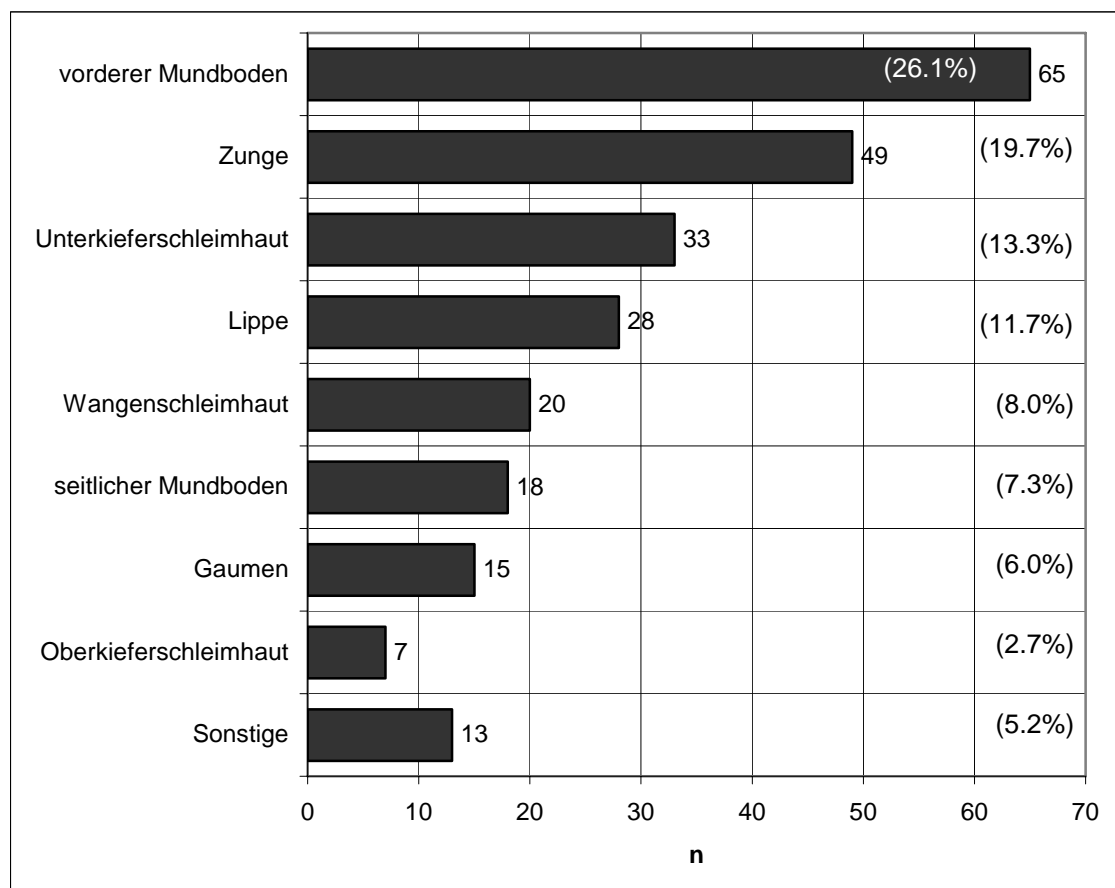
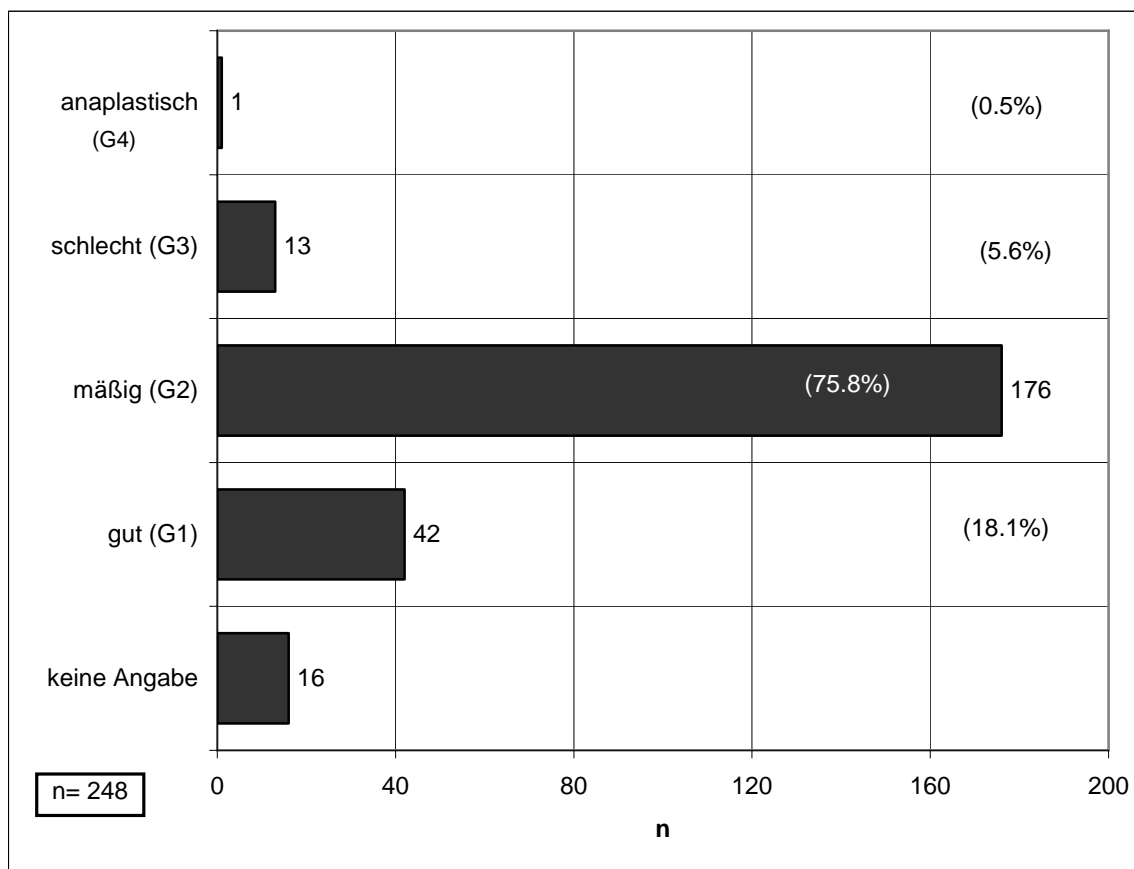


Abb. 7: Hauptlokalisation der Tumormanifestation bei 248 Patienten

## 5.5.2 Differenzierungsgrad der untersuchten Plattenepithelkarzinome

Zur histopathologischen Beurteilung wurden die Präparate an das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen übersandt. In 176 Fällen (75.8%) trat eine mässigen Differenzierungsgrad ihres Tumors auf, wohingegen bei 18.1% (42 Patienten) eine gute Differenzierung des Karzinoms vorlag. In 13 Fällen (5.6%) erfolgte die histopathologische Einstufung des Plattenepithelkarzinoms als schlecht differenziert und lediglich ein Patient wurde in das G4-Stadium eingeordnet, denn sein Tumor war anaplastisch. Von 16 Patienten konnten keine Angaben evaluiert werden, sie fliessen somit nicht in die Auswertung ein.



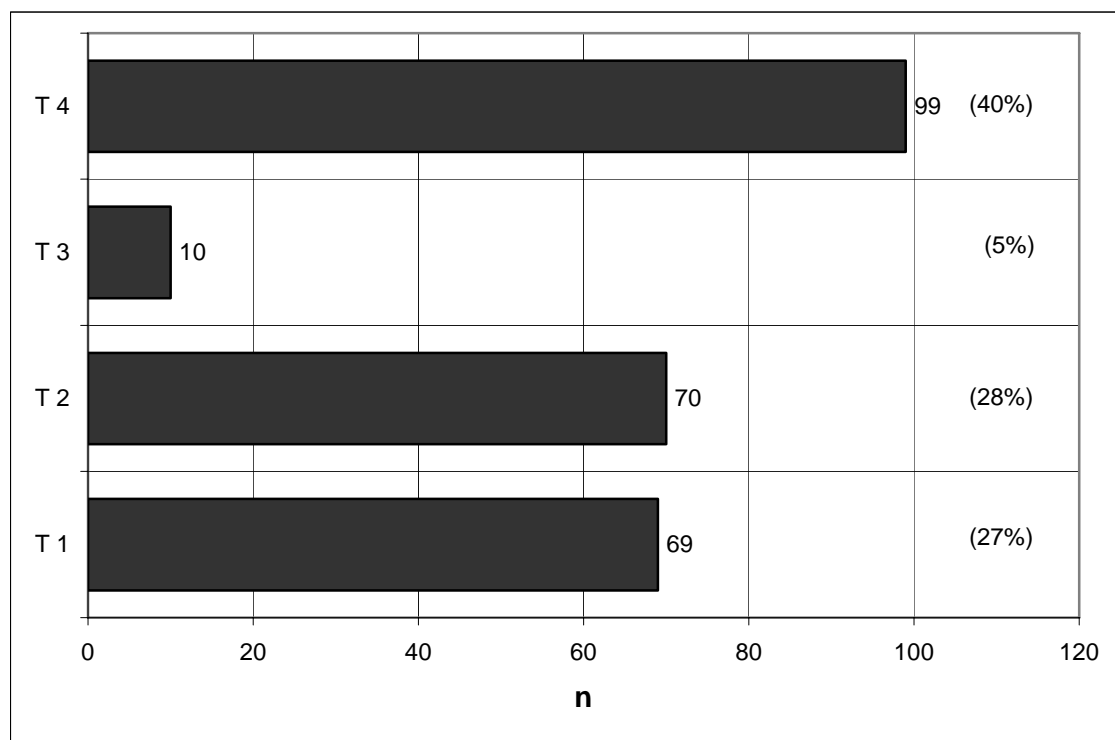
**Abb. 8: Patientenverteilung im Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Plattenepithelkarzinome**

## 5.6 Tumorgrösse nach IUCC

### 5.6.1 Auswertung der verschiedenen Tumorparameter

#### 5.6.1.1 präoperative Tumorgrösse cT

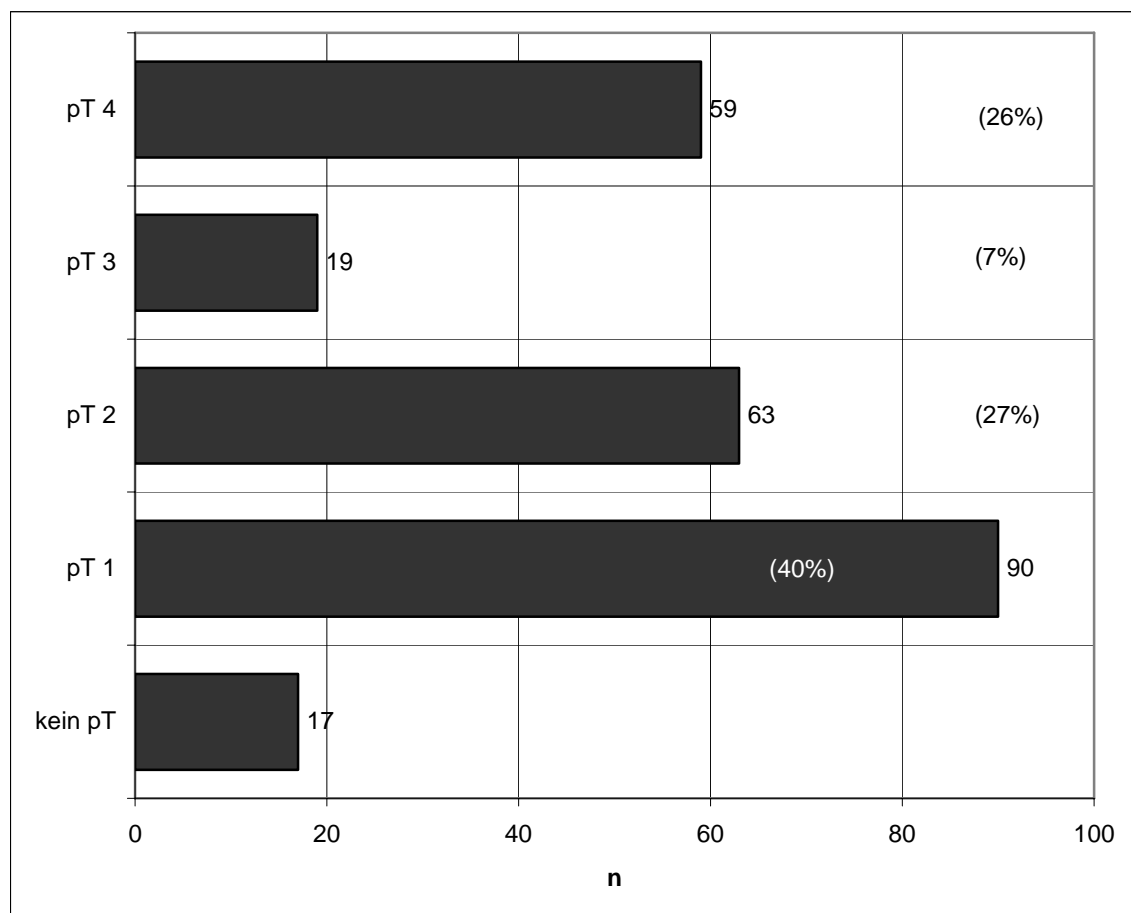
40% der Patienten wurden präoperativ in das cT4-Stadium eingeordnet, da ihr Tumor Nachbarorgane infiltriert hatte. Bei 69 Patienten (27%) lag ein Tumor im cT1-Stadium und bei 70 (28%) Patienten das cT2-Stadium vor. Karzinome im cT3-Stadium traten bei 10 Patienten (5%) auf.



**Abb. 9: Patientenverteilung in Abhängigkeit von der Tumorgrösse cT**

### 5.6.1.2 Tumorgröße pT

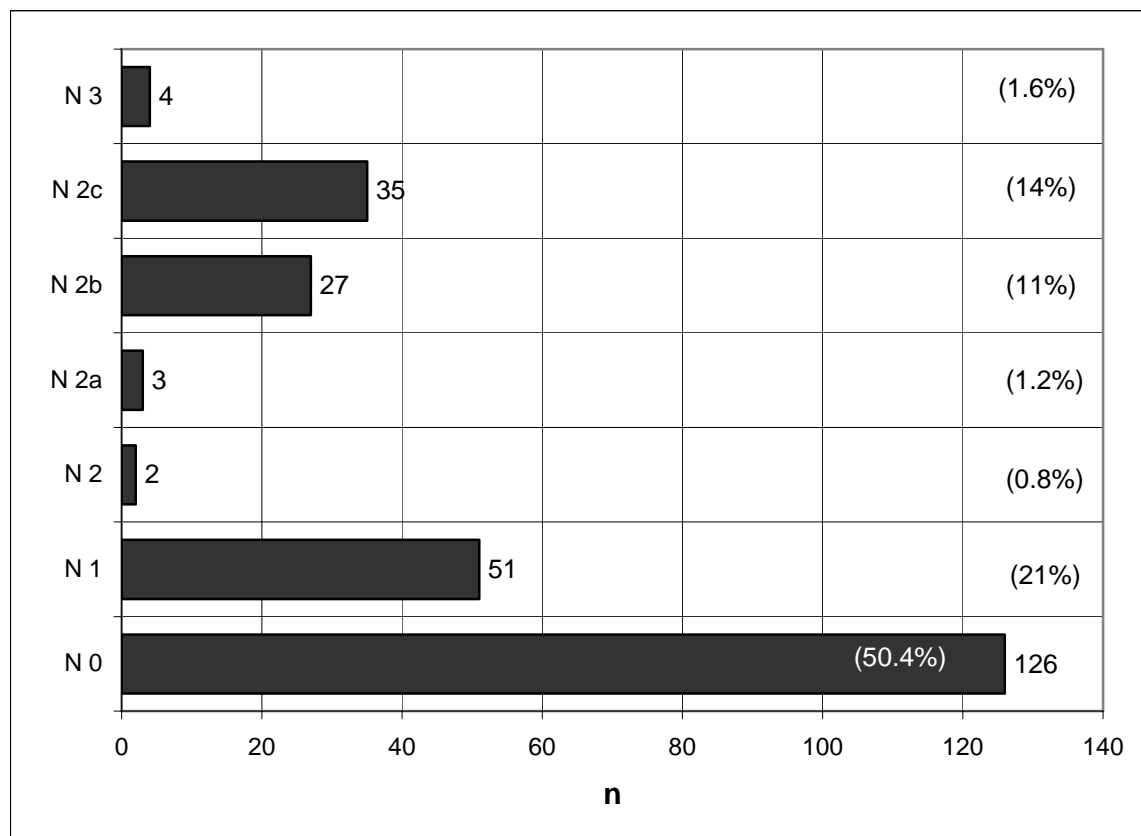
Nach der Untersuchung der Resektate durch den Pathologen resultierte eine andere Tumoreinteilung, denn 90 Karzinome (40%) wurden nun in das pT1-Stadium und 63 (27%) in das pT2-Stadium eingeordnet. Die Tumorgröße pT3 lag in 19 Fällen (7%) vor, lediglich bei 59 Tumoren (26%) erfolgte die Einstufung in das pT4-Stadium. Bei 17 Patienten konnte keine Einteilung in das pT-Stadium vorgenommen werden, da sie primär nicht operiert, sondern bestrahlt wurden. Sie wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt.



**Abb. 10: Patientenverteilung in Abhängigkeit von der Tumorgröße pT**

### 5.6.1.3 Lymphknotenbeteiligung cN

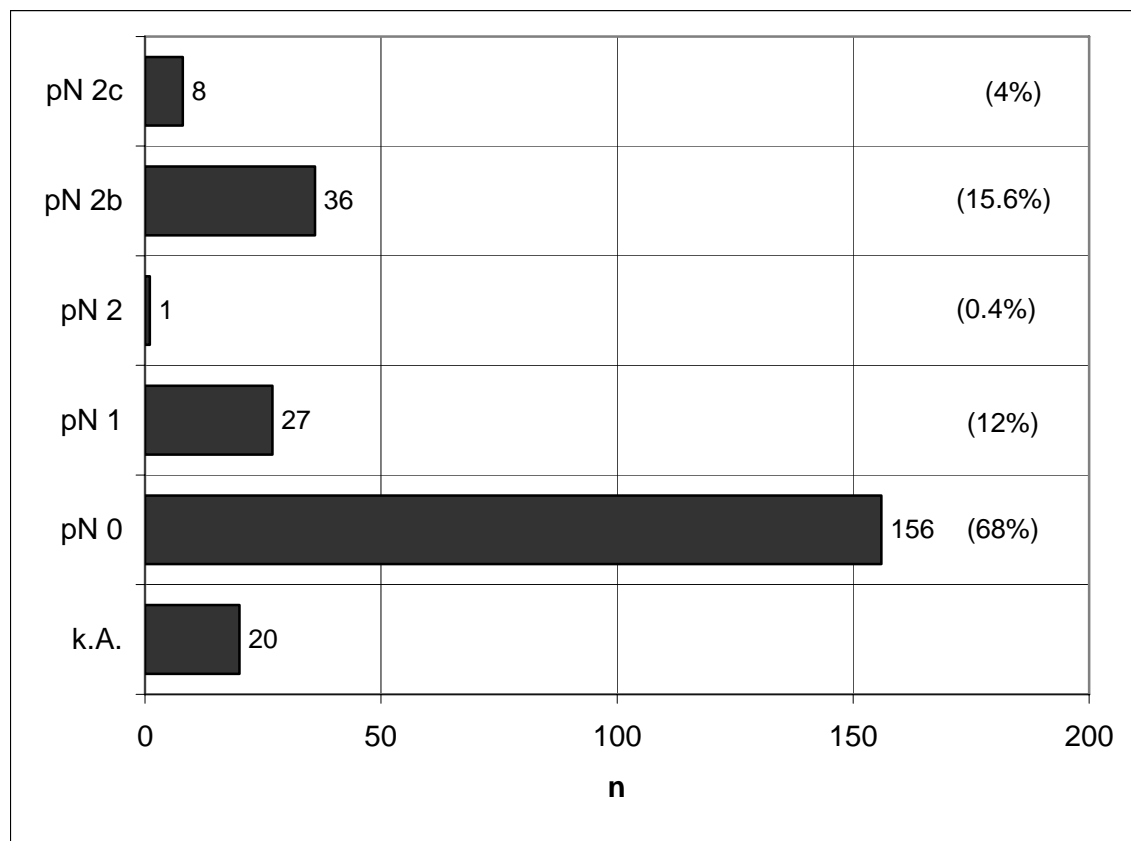
Bei 126 Patienten (50.4%) konnte präoperativ keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden, wohingegen bei 51 Erkrankten (21%) das Lymphknotenstadium cN1 auftrat. 2 Patienten (0.8%) wurden in das Lymphknotenstadium cN2 eingeteilt und 3 Fälle (1.2%) in das Lymphknotenstadium cN2a. Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten mit bis zu 6 cm Grösse konnten bei 27 Patienten (11%) nachgewiesen werden und bei 35 Tumorerkrankten (14%) erreichten die Metastasen in bilateralen und kontralateralen Lymphknoten einen Durchmesser von bis zu 6 cm. Bei 4 Patienten (1.6%) trat das Lymphknotenstadium cN3 auf.



**Abb. 11: präoperativer Lymphknotenbefall cN bei 248 Patienten**

#### 5.6.1.4 Lymphknotenbeteiligung pN

Nach der Beurteilung durch den Pathologen wurde eine neue Einteilung des Lymphknotenstatus erstellt, dabei konnte bei 156 Patienten (68%) kein Lymphknotenbefall festgestellt werden. Bei 27 Erkrankten (12%) erfolgte die Einteilung in das pN1-Stadium und bei einem Patienten (0.4%) in das pN2-Stadium. In 36 Fällen (15.6%) wurde das Stadium pN2b, in 8 Fällen (4%) das Stadium pN2c dokumentiert. Von 20 Patienten konnten keine Angaben ermittelt werden, da sie teilweise nicht operiert wurden und fließen somit nicht in die Auswertung mit ein.



**Abb. 12: postoperativer Lymphknotenbefall pN**



### 5.6.1.5 Auftreten von Fernmetastasen M

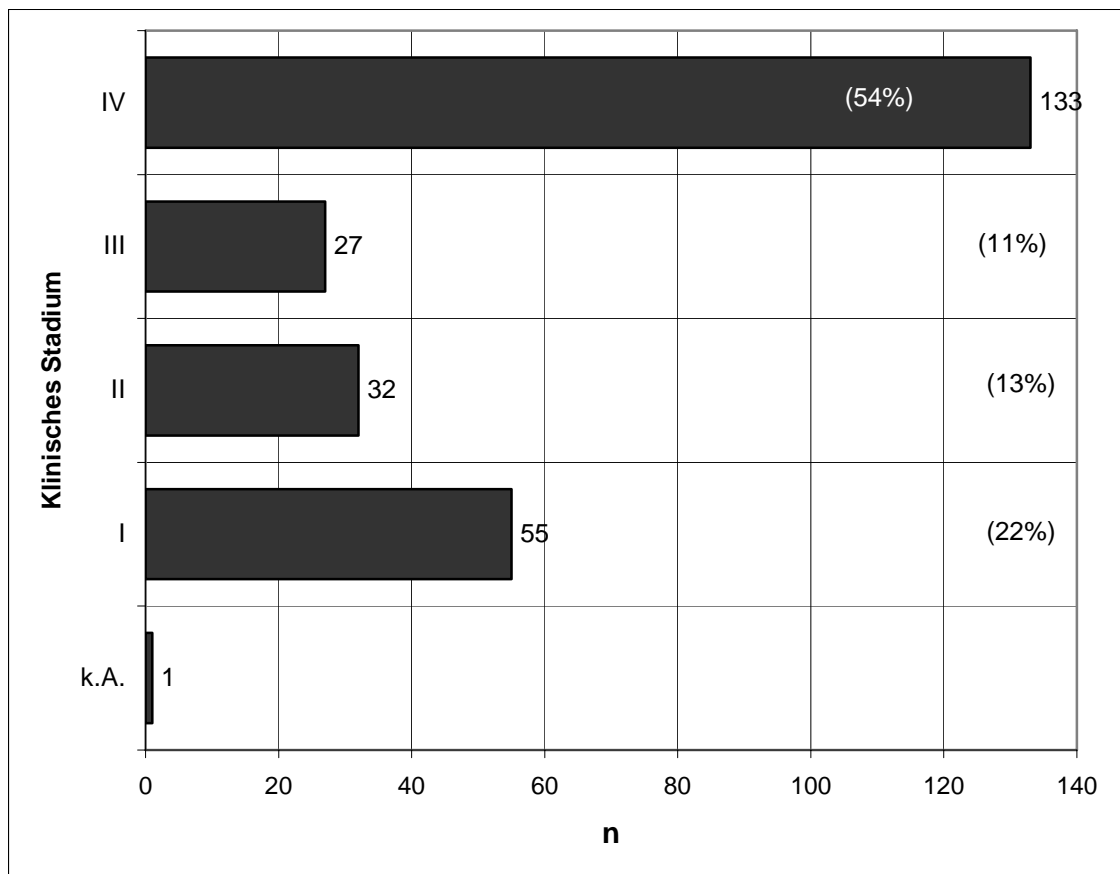
Die Beurteilung der Fernmetastasen ergab bei 219 Patienten (99%) kein Anzeichen für eine Fernmetastase, lediglich bei 2 (1%) Fällen konnte eine Fernmetastase entdeckt werden. Von 27 Patienten konnten keine Angaben evaluiert werden und fließen somit nicht in die Auswertung mit ein.

	Keine Fernmetastase	Fernmetastase	Summe	Keine Angabe
n	219	2	221	27
Prozent	99	1	100	-

**Tab. 3: Auftreten von Fernmetastasen**

### 5.6.1.6 Klinisches Stadium

Die präoperative Einstufung der Patienten in die klinischen Stadien erfolgte nach den Vorgaben der UICC (Union Internationale contre le Cancer). Bei mehr als der Hälfte der Patienten (54%) lag das klinische Stadium IV vor und 55 Patienten (22%) wurden in das klinische Stadium I eingeteilt. Das klinische Stadium II trat bei 32 Fällen (13%) und das Stadium III bei 27 Erkrankten (11%) auf, von einem Patienten konnte keine Angaben ermittelt werden, er fließt nicht in die Auswertung mit ein.



**Abb. 13: Verteilung der Patienten in den klinischen Stadien nach UICC**

### 5.6.2 Rezidiv

Bei 195 Patienten (78.6%) kam kein Rezidiv vor, während bei 53 Patienten (21.4%) ein Rezidiv durchschnittlich nach 25.0 Monate nach Erstdiagnose auftrat (Stddev.± 1.6 Monate). Die mittlere Überlebenszeit nach Auftreten des Rezidivs betrug 36.8 Monate (Stddev.± 2.8 Monate).

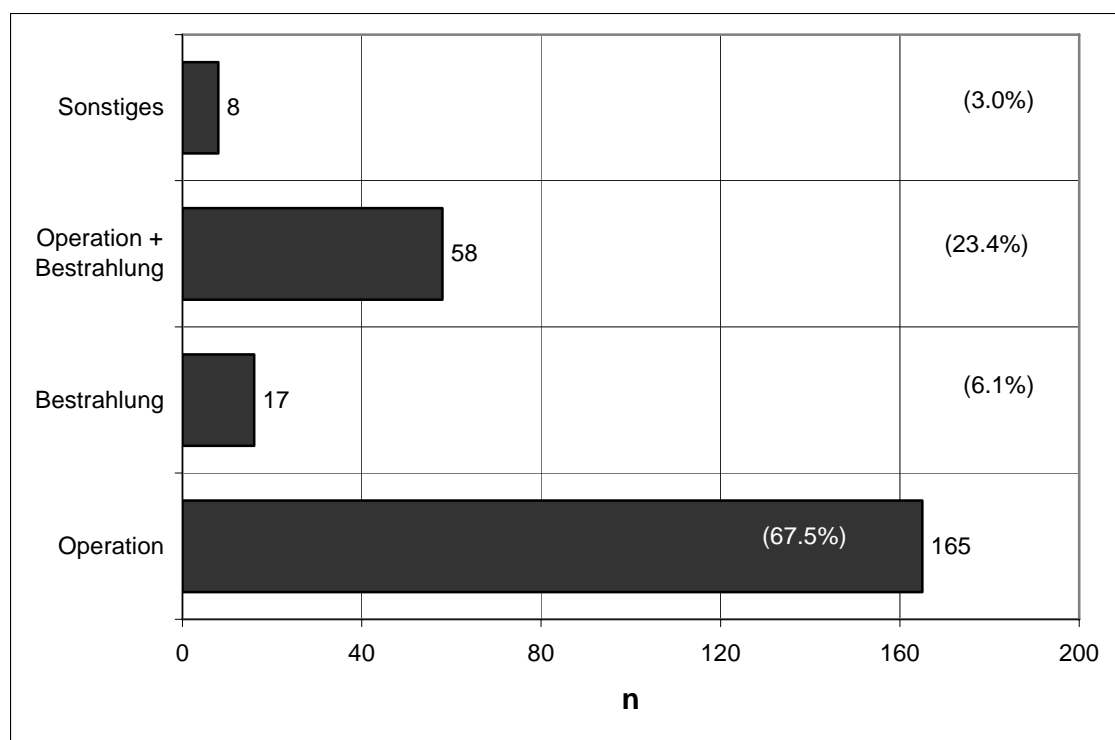
	Rezidiv	kein Rezidiv	Summe
n	53	195	248
Prozent	21.4	78.6	100

**Tab. 4: Rezidivverteilung**

## 5.6.3 Therapiearten

### 5.6.3.1 Chirurgie, Bestrahlung

165 Patienten (67.5%) wurden operiert und bei 58 Erkrankten (23.4%) erfolgte zusätzlich zur Operation eine Bestrahlung. In 17 Fällen (6.1%) bestand die Behandlung aus der alleinigen Bestrahlung, 8 Patienten (3.0%) unterzogen sich einer alternativen Behandlungsmethode zur Operation, zum Beispiel einer Chemotherapie oder einer Immuntherapie.

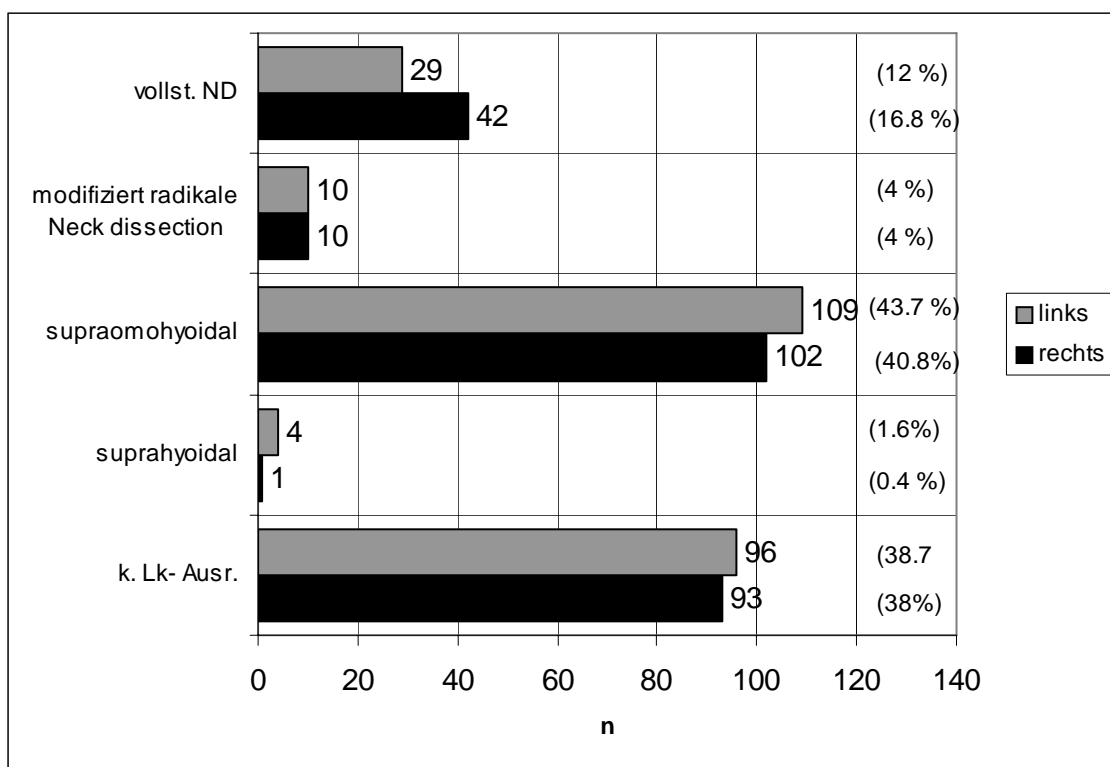


**Abb. 14: Therapiearten**

### 5.6.3.2 Lymphknotenausräumung

Lymphknotenausräumungen werden im lokalen Lymphknotenabstromgebiet des Tumors durchgeführt. Da die Lymphabstromgebiete sehr stark miteinander vernetzt sind können bei der Absiedelung Tumorzellen Lymphknotenstationen überspringen. Am Hals werden verschiedene Lymphknotenstationen unterschieden, die mit den Leveln I-V bezeichnet werden. Bei der Lymphknotenausräumung spielen verschiedene Ausräumungsgrenzen und

der Level des Lymphknotenbefalls eine Rolle. Wichtig sind die Lymphknoten der jugolodigastri-  
 gastrische Region, die sich in Level II befinden, sie sollten zur Bewertung für den Patholo-  
 gen entnommen werden. Bei der supraomohyoidalen Neck dissection werden dabei routi-  
 nemässig die Lymphknotenlevel I, II und III ausgeräumt, der M. omohyoideus dient dabei  
 als kaudale Begrenzung. Falls aber eine weitere Absiedelung der Metastasen stattgefunden  
 hat, wird eine modifiziert radikale Neck dissection durchgeführt, dabei werden wichtige  
 anatomische Strukturen wie die V. jugularis interna, der N. accessorius, sowie die Ansa  
 cervicalis geschont. Bei 93 Patienten wurde rechts und bei 96 Patienten links keine  
 Lymphknotenausräumung vorgenommen. Am häufigsten erfolgte die supraomohyoidale  
 Lymphknotenausräumung bei 109 (43.7%) links und 102 Patienten (40.8%) rechts. Bei  
 jeweils 10 Fällen (4%) wurde die modifiziert radikale Neck dissection rechts oder links  
 angewandt. 42 Tumorkranke (16.8%) mussten sich einer rechtsseitigen und 29 (12%)  
 Patienten einer linksseitigen vollständigen Neck dissection unterziehen.



**Abb. 15: Umfang der lokoregionalen Lymphknotenausräumung**

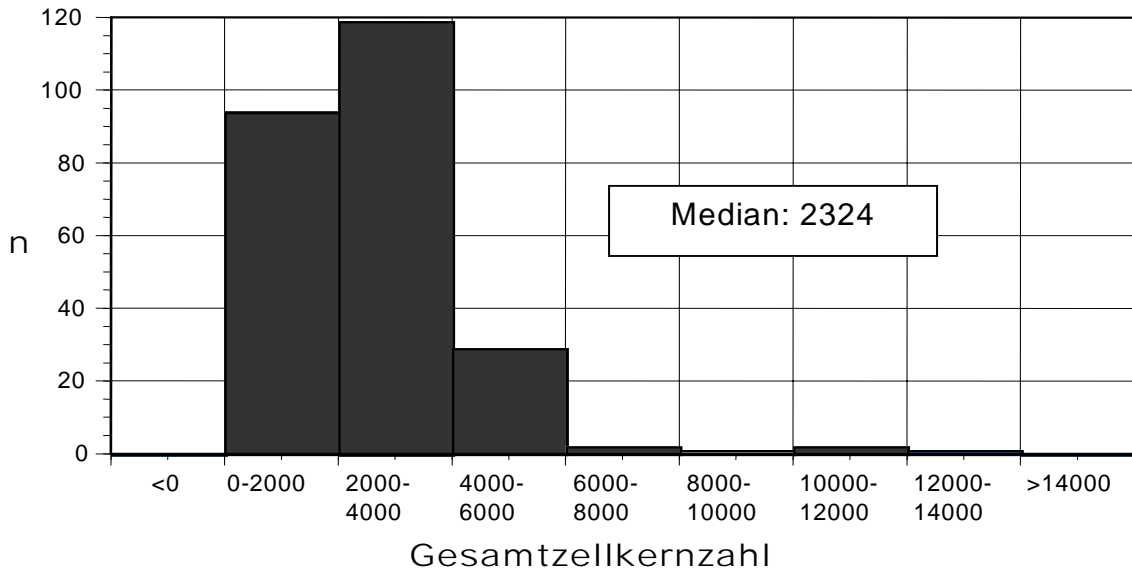
## 6. Ergebnisse

### 6.1 Verteilung der MIB-1-positiven Zellkerne sowie der Gesamtzellkernzahl

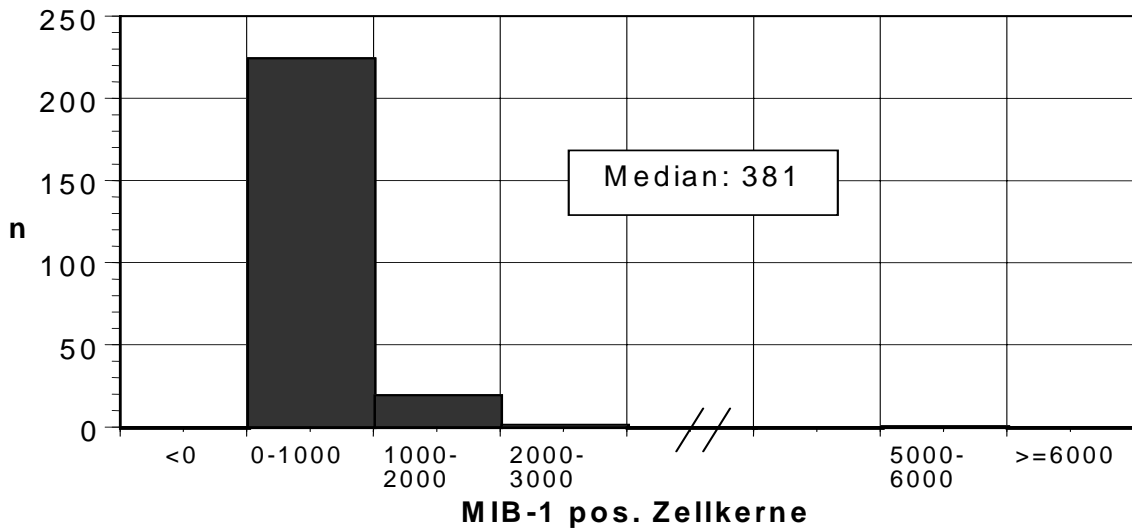
In fünf Gesichtsfeldern wurden die Zellkerne gezählt und dabei verschiedenen Kategorien zugeordnet, wie der Gesamtzellkernzahl oder der Anzahl der MIB-1-positiven und -negativen Zellkerne. Die höchste in einem der 248 Präparate gezählte Anzahl von Zellkernen betrug 12970, die niedrigste Anzahl nimmt einen Wert von 740 an. Der Median aller gezählter Zellkerne der 248 Präparate, also der Zentralwert einer Zahlenreihe, entspricht 2324 Zellkerne (Mittelwert: 626). Die Anzahl der MIB-1-positiven Zellkerne erstreckt sich von minimal 6 Zellkernen, 381 Zellkernen im Median (Mittelwert 482) bis zu maximal 5638 Zellkernen. Die geringste Anzahl von MIB-1-negativen Zellkernen der 248 Präparate lag bei 172, der Medianwert bei 1834 (Mittelwert: 2144) und die maximalste Anzahl von MIB-1-negativen Zellkernen der 248 Präparate entspricht 12650 Zellkernen. Bei der Zählung der MIB-1-positiven Zellkerne pro mm<sup>2</sup> wird die Anzahl der MIB-1-positiven Zellkerne gezählt und auf die Fläche der fünf Gesichtsfelder hochgerechnet. Als kleinste Anzahl von MIB-1-positiven Zellkerne pro Quadratmillimeter wurden 21 Zellkerne ausgewiesen, der Medianwert liegt bei 1309 (Mittelwert: 1660) und der Maximalwert bei 19424 Tumorzellkernen.

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mittelwert
n Gesamtzellkernzahl	740	1699	<b>2324</b>	3028	12970	626
n Mib-1-positive Zellkerne	6	163.5	<b>381</b>	681.5	5638	482
n Mib-1-negative Zellkerne	172	1150	<b>1834</b>	2677	12650	2144
n Mib-1-positive Zellkerne pro mm <sup>2</sup>	21	570	<b>1309</b>	2344	19242	1660

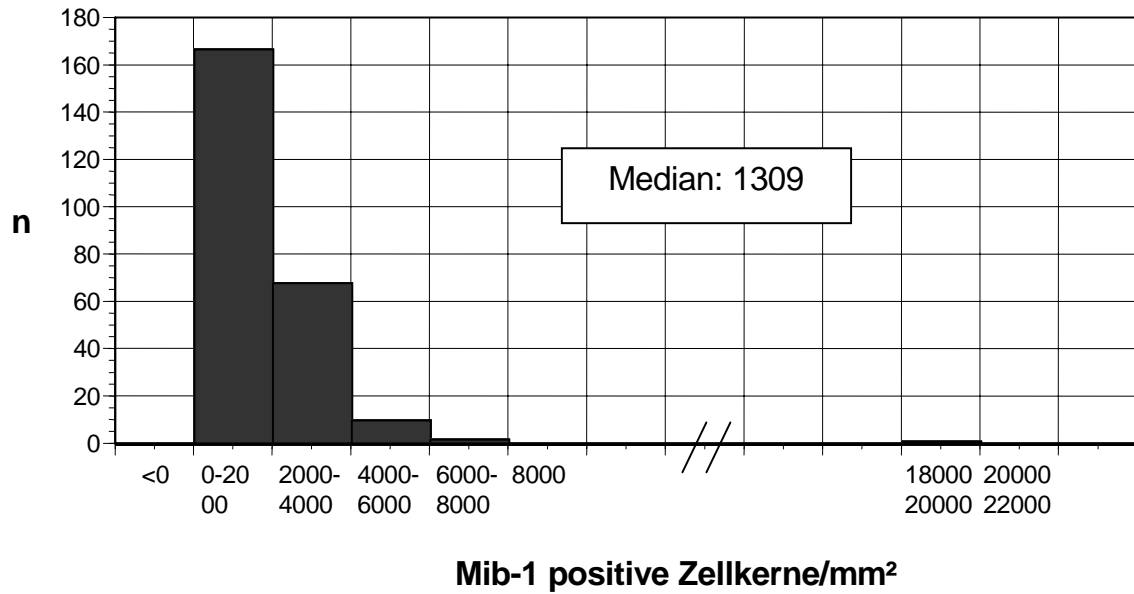
Tab. 5: Verteilung der MIB-1-positiven und -negativen Zellkerne sowie der Gesamtzellkernzahl



**Abb. 16: Verteilung der Gesamtzellkernanzahl in fünf Gesichtsfeldern**



**Abb. 17: Verteilung der MIB-1-positiven Zellkerne in fünf Gesichtsfeldern**



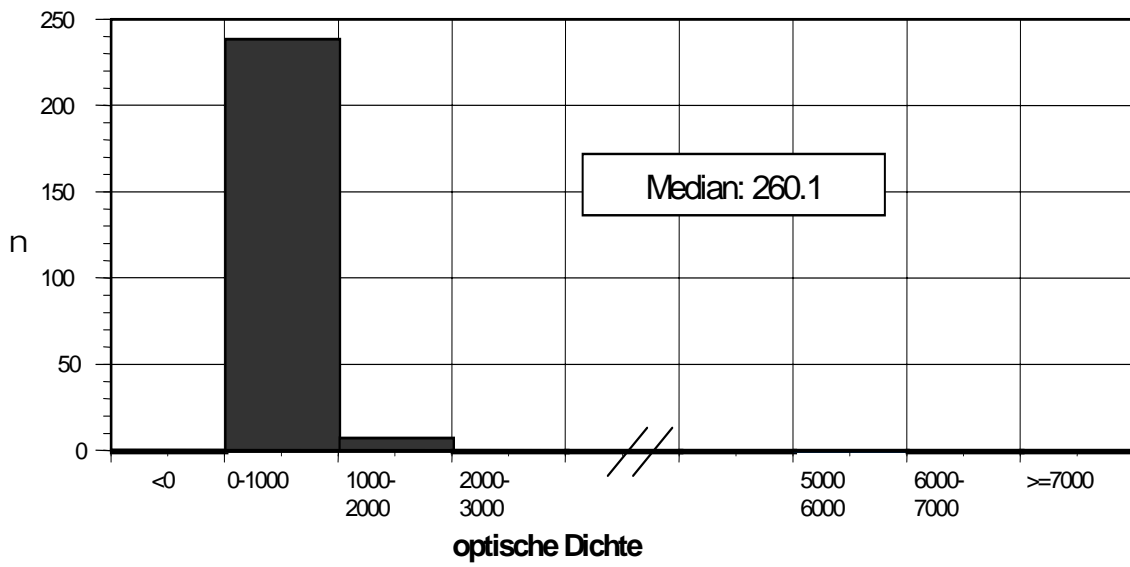
**Abb. 18: Verteilung von MIB-1-positiven Zellkerne pro mm<sup>2</sup> in den fünf Gesichtsfeldern**

## 6.2 Beurteilung der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne

Die optische Dichte ist ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung in einem Medium. Der Medianwert der optischen Dichte der MIB-1 positiven Zellkernen liegt bei 260.1. Der Maximalwert der optischen Dichte beträgt 5090.6, der Minimalwert 3.5 und der Mittelwert 349.2, wobei die Kurve zeigt eine nach links schiefe Verteilung zeigt.

	Minimum	25%	Median	75%	Maximum	Mittelwert
opt. Dichte der MIB-1-pos. Zellk.	3.5	102.9	<b>260.1</b>	487.4	5090.6	349.2

**Tab. 6: Verteilung der optischen Dichte der MIB-1-pos. Zellk.**



**Abb. 19: Verteilung der optischen Dichte (OD) der MIB-1-positiven Zellkerne in den fünf Gesichtsfeldern**



### 6.3 Zusammenhang zwischen MIB-1-Färbeindex und Grading

In Abb. 20 ist der Zusammenhang zwischen dem relativen Anteil der MIB-1 positiv gefärbten Zellkerne an der Gesamtumorzellkernzahl in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad G anhand eines Boxplotdiagrammes veranschaulicht. Boxplotdiagramme stellen schematisch die Häufigkeitsverteilung dar und sind dazu geeignet, mehrere Verteilungen miteinander zu vergleichen (Harms, 1998). Der Median der MIB-1-positiven Zellkerne steigt von 12.4% im Differenzierungsgrad G1 über 18.9% im Gradingstadium G2 zu 19.3% im Stadium G3 an. Da nur ein Patient in das Gradingstadium 4 eingestuft wurde, konnte dieser bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

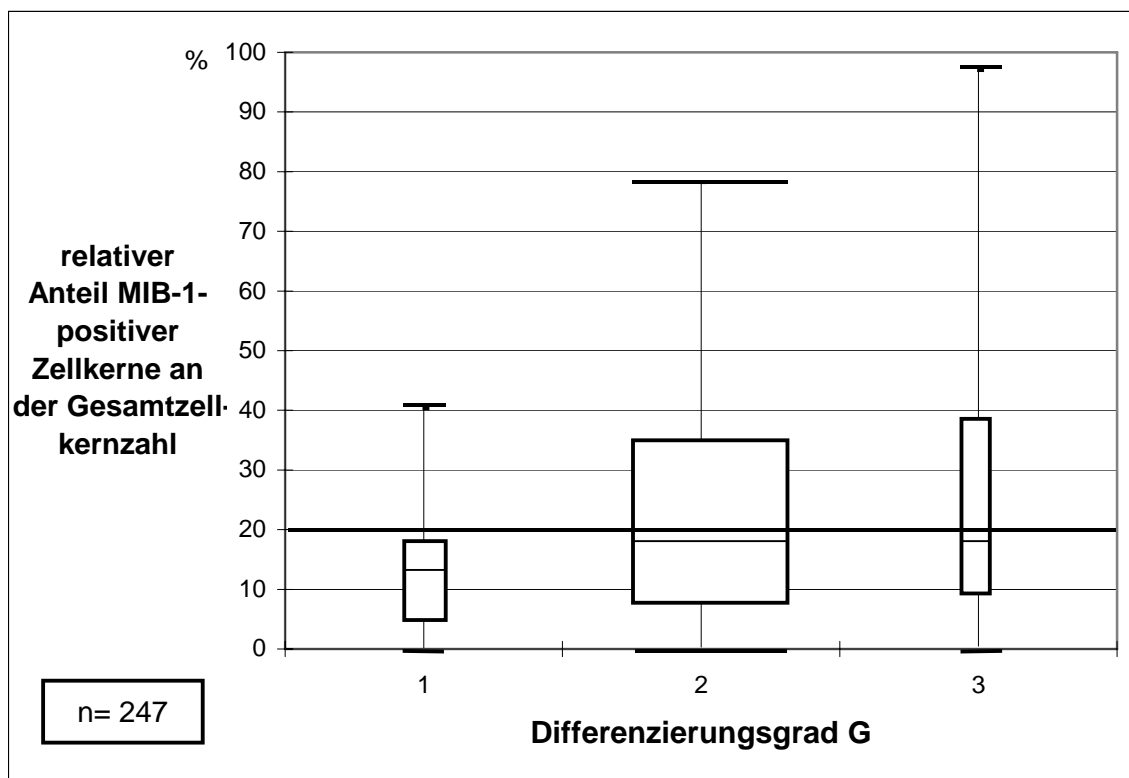


Abb. 20: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad G

Differenzierungsgrad G	1	2	3
Minimum in %	0.2	0.3	0.5
<b>Median in %</b>	<b>12.4</b>	<b>18.9</b>	<b>19.3</b>
Maximum in %	40.3	78.2	97.0

Tab. 7: Differenzierungsgrad G in Abhängigkeit vom relativen Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl

## 6.4 Immunhistochemische Untersuchungen des Proliferationsmarkers MIB-1 in Abhängigkeit von der UICC-Klassifikation

### 6.4.1 Auswertung der Tumorparameter nach UICC

#### 6.4.1.1 Tumorgröße cT

Das Boxplotdiagramm in Abb. 21 zeigt den relativen Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl im Zusammenhang mit der Tumorgröße cT nach der UICC-Klassifikation (Union Internationale Contre le Cancer) auf. Der Medianwert steigt vom Stadium cT1 (13.7%) über 15.3% im Stadium cT2 und 16.5% im Stadium cT3 auf 20.7% im Stadium cT4 an. Die Streubereiche überlappen sich erheblich, was auf keinen statistischen Zusammenhang hindeutet.

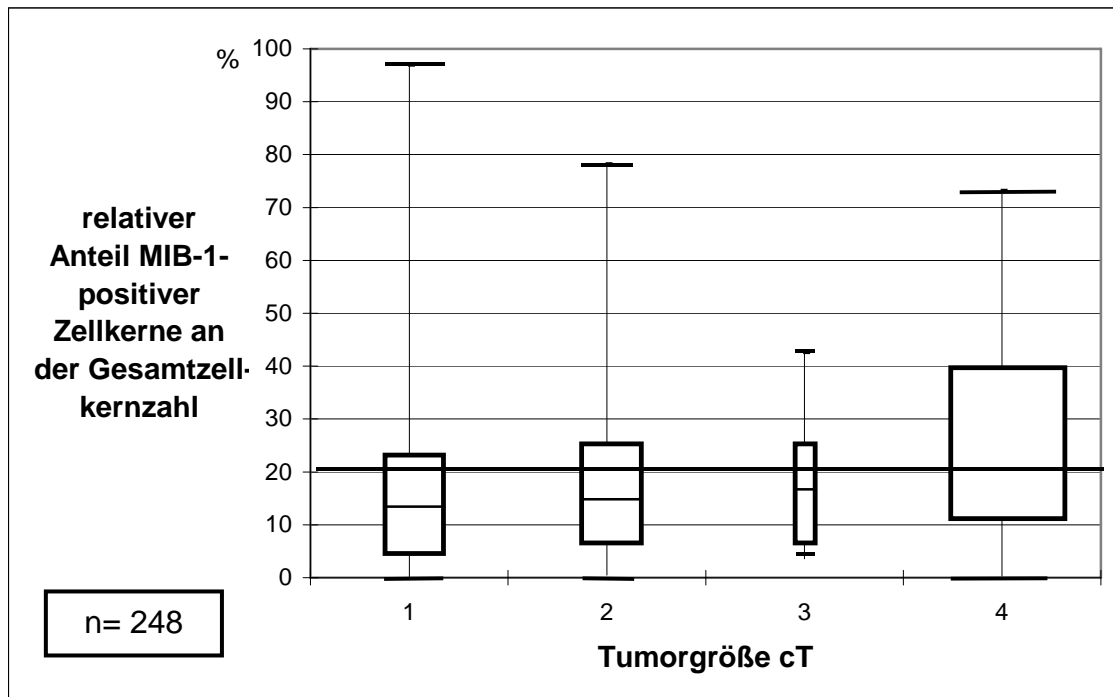


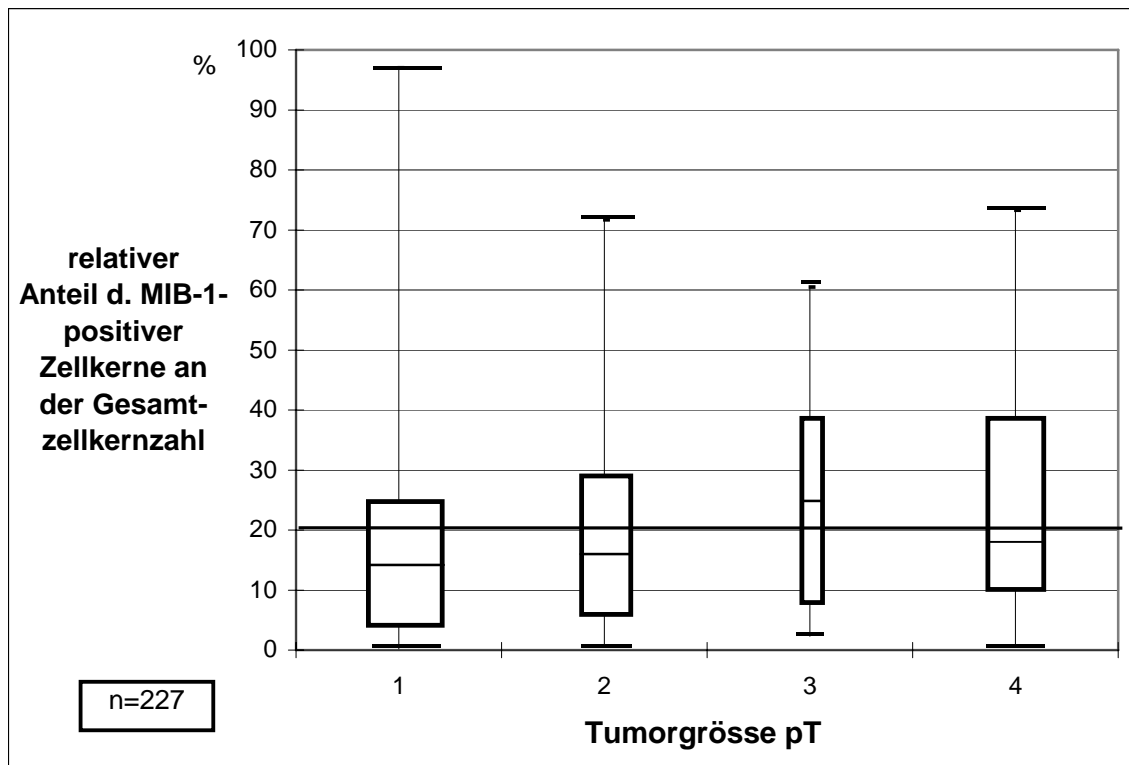
Abb. 21: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgröße cT

Tumorgröße cT	1	2	3	4
Minimum in %	0.2	0.5	3,6	0.3
<b>Median in %</b>	<b>13.7</b>	<b>15.3</b>	<b>16.5</b>	<b>20.7</b>
Maximum in %	97.0	78.2	42.6	73.2

**Tab. 8: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgröße cT**

#### 6.4.1.2 Postoperative Tumorgröße pT

Im Gegensatz zur Tumorgröße cT erreicht der Medianwert bei der postoperativen Tumorgröße pT den Wert 14.4% im pT1-Stadium, 15.2% im pT2-Stadium, 24.8% im pT3-Stadium und im pT4-Stadium 18.7%. Die Streubereiche überlappen sich erheblich, welches auf keinen statistischen Zusammenhang hinweist. Von 21 Patienten konnten keine Angaben evaluiert werden, sie fließen somit nicht in die Auswertung ein.



**Abb. 22: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgröße pT**

Tumorgrösse pT	1	2	3	4
Minimum in %	0.2	0.6	2,3	0.5
<b>Median in %</b>	<b>14.4</b>	<b>15.2</b>	<b>24.8</b>	<b>18.7</b>
Maximum in %	97.0	71.7	60.5	73.3

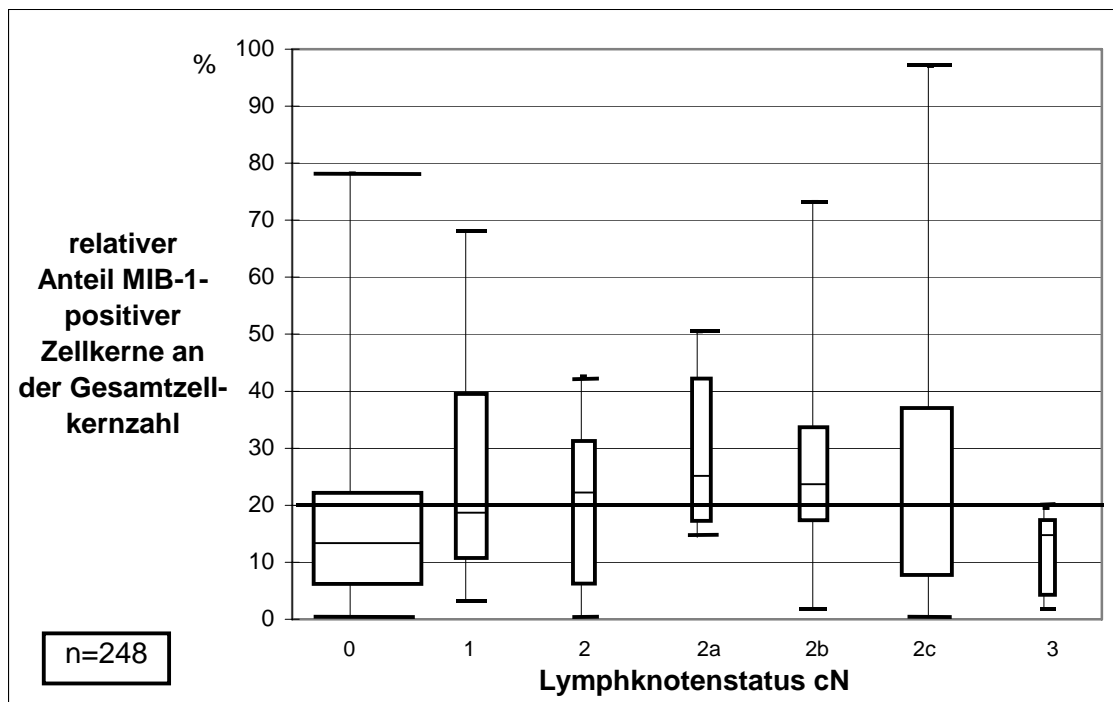
**Tab. 9: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgrösse pT**

#### 6.4.1.3 Lymphknotenbeteiligung cN

Die Abbildung 23 zeigt die relative Verteilung der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus cN. Der prozentuale Anteil von MIB-1-positiven Zellkernen an der Gesamtzellkernzahl lag bei den Patienten, die keinen regionalen Lymphknotenmetastasenbefall (cN0) aufwiesen, bei 13.7%, danach folgten die Patienten des Stadiums cN3 mit einem Medianwert von 16.5%. Dem Stadium cN1 mit 18.9% folgt das Stadium cN2c mit 20.1%, daran schliesst sich das Stadium cN2 mit 21.6% und das Stadium cN2b mit 23.2% MIB-1-positiver Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl an. Der höchste Medianwert wurde im Stadium cN2a erreicht, hier betrug der Wert 25.9%. Die Streubereiche überlappen sich erheblich, was auf keinen statistischen Zusammenhang hinweist.

Lymphknotenbeteiligung cN	0	1	2	2a	2b	2c	3
Minimum in %	0.3	3.1	0.5	14.4	1.7	0.3	1.6
<b>Median in %</b>	<b>13.7</b>	<b>18.9</b>	<b>21.6</b>	<b>25.9</b>	<b>23.2</b>	<b>20.1</b>	<b>16.5</b>
Maximum in %	78.2	68.1	42.6	50.5	73.2	97	19.5

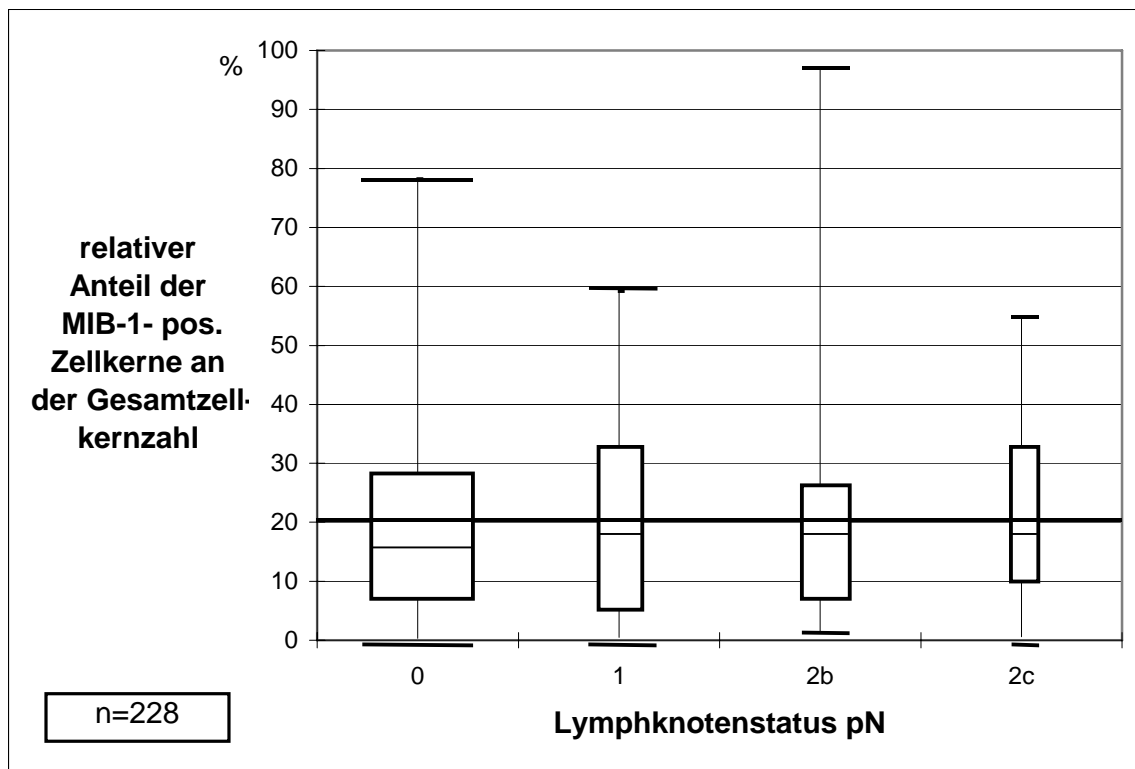
**Tab. 10: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus cN**



**Abb. 23: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus cN**

#### 6.4.1.4 Lymphknotenbeteiligung pN

Nach der Beurteilung durch den Pathologen stellt sich die Einteilung der Lymphknotenmetastasen nicht so differenziert dar. Es fehlen die Stadieneinteilungen pN2, pN2a und pN3. Die Patienten, die keinen Lymphknotenbefall aufwiesen, haben mit 15.2% den geringsten relativen Anteil an MIB-1-positiven Zellkernen an der Gesamtzellkernzahl, denn im Stadium pN1 erreicht der Median den Wert 18.5% und im Stadium pN2b 18.9% und im Stadium pN2c liegt der Wert bei 17.2%. Von 20 Patienten konnten keine Angaben evaluiert werden, sie fließen nicht in die Auswertung ein. Die Streubereiche überlappen sich erheblich, was auf keinen statistischen Zusammenhang hinweist.



**Abb. 24: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus pN**

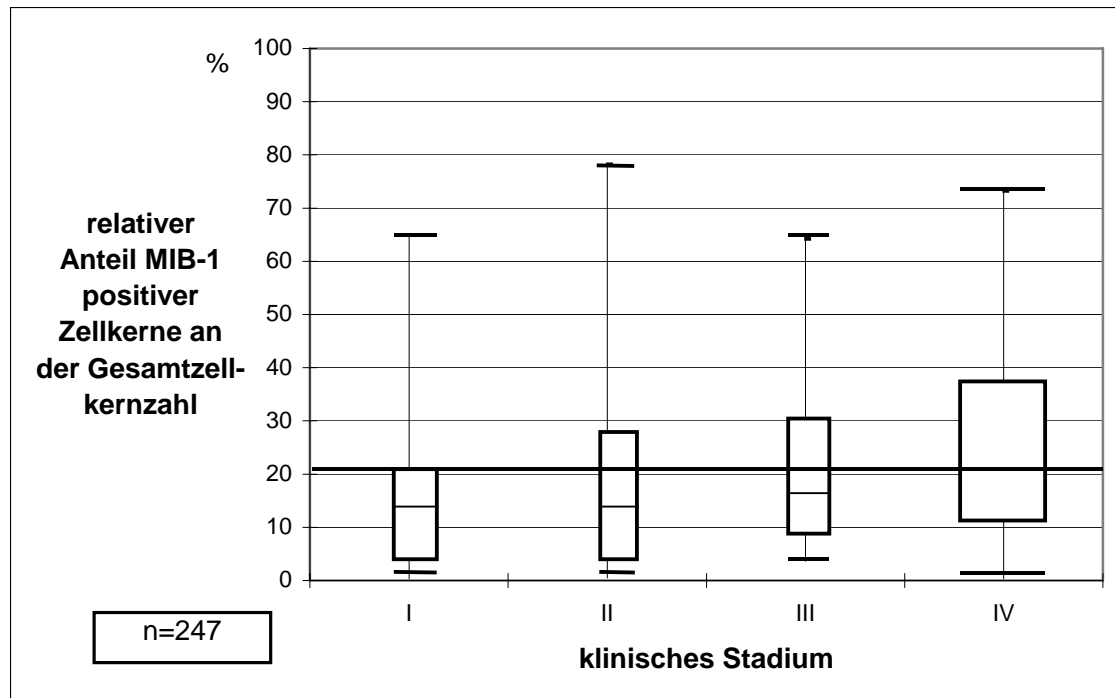
Lymphknotenbeteiligung pN	0	1	2b	2c
Minimum in %	0.3	0.5	1.6	0.6
<b>Median in %</b>	<b>15.2</b>	<b>18.5</b>	<b>18.9</b>	<b>17.2</b>
Maximum in %	78.2	59.2	97	54.8

**Tab. 11: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus pN**

#### 6.4.1.5 Klinisches Stadium

Der Median des relativen Anteils der MIB-1 positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl steigt im klinischen Stadium I von 13.3% über 15.6% im Stadium III an und erreicht 20.4% im Stadium IV. Im klinischen Stadium II ergibt der Wert 11.2%. Die Streubereiche überlappen sich erheblich. Das lässt auf einen fehlenden statistischen Zusammenhang

schliessen. Von einer Person konnte keine Angabe zum klinischen Stadium ermittelt werden.



**Abb. 25: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom klinischen Stadium nach UICC**

klinisches Stadium	I	II	III	IV
Minimum in %	0.3	0.5	3.6	0.3
<b>Median in %</b>	<b>13.3</b>	<b>11.2</b>	<b>15.6</b>	<b>20.4</b>
Maximum in %	64.9	78.2	64.2	73.2

**Tab. 12: Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom klinischen Stadium nach UICC**

## 6.5 Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und der Überlebenszeit

### 6.5.1 Gesamtüberlebenszeit

Sämtliche im nachfolgenden beschriebenen Überlebenszeitkurven sind univariate Analysen. Die Abbildung 26 zeigt die Überlebenszeit der 248 Patienten dargestellt durch eine Kaplan-Meier-Kurve. Der maximale Nachbeobachtungszeitraum umfasste 150 Monate, die mittlere Überlebenszeit betrug 56.6 Monate (Stddev.  $\pm$  2.5 Monate), nach 60 Monaten lebten noch 50.84% der Patienten.

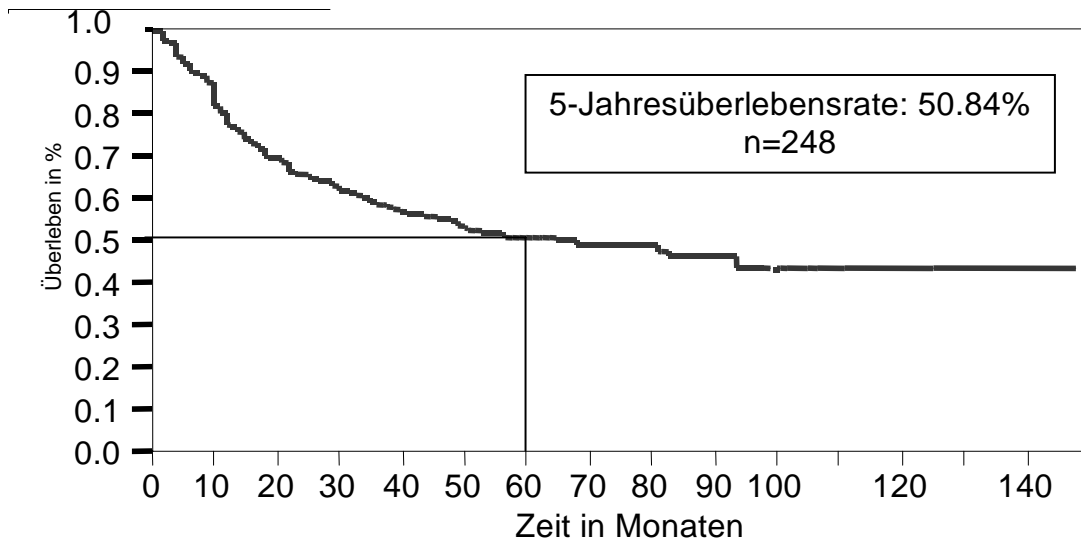


Abb. 26: Gesamtüberlebenszeit der 248 untersuchten Patienten

Monate	12	24	36	48	60	72	84
Überleben in %	76.3	66.5	58.2	54.9	<b>50.8</b>	49.2	45.6

Tab. 13: Gesamtüberlebenszeit



## 6.5.2 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter des Patienten

Der Median des Alters der 248 Patienten lag bei 57 Jahren, wobei die Patienten, die 57 Jahre oder älter sind, eher starben als Patienten, deren Alter unterhalb dieser Grenze lag. Die Fünfjahresüberlebensrate bei den jüngeren Erkrankten ergab 59.9% und die mittlere Überlebenszeit 56.3 Monaten (Stddev.  $\pm$  2.8 Monate). Von den älteren Patienten lebten nach 5 Jahren dagegen nur noch 41.5%, wobei die mittlere Überlebenszeit 49.2 Monate betrug (Stddev.  $\pm$  3.7 Monate), der Unterschied war statistisch signifikant mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.0027$ .

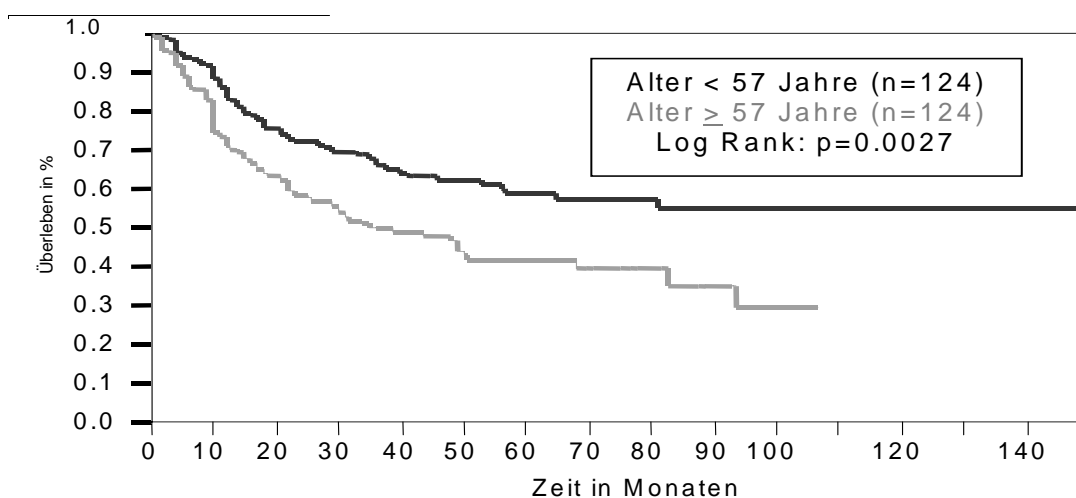


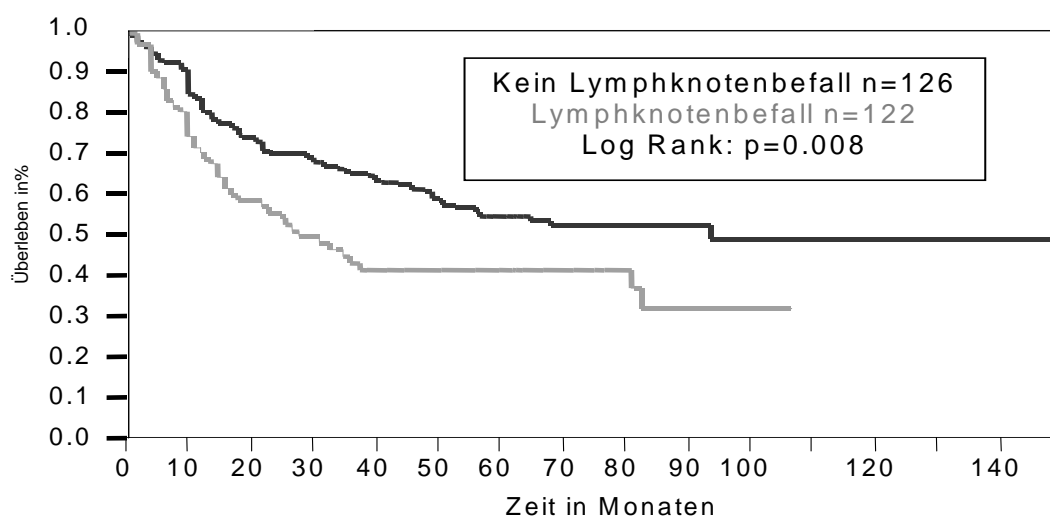
Abb. 27: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter der Patienten

Monate	12	24	36	48	60	72	84
Überleben in % in Abh. vom Alter <57 Jahren	83.4	71.9	67.2	61.9	<b>59.9</b>	57.8	55.2
Überleben in % in Abh. Vom Alter $\geq$ 57 Jahren	70.9	58.2	49.9	47.2	<b>41.5</b>	39.8	35.4

Tab. 14: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter der Patienten

### 6.5.3 Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall

Der Lymphknotenbefall spielte eine wichtige Rolle bei der Überlebenszeit der Patienten. War bei den Patienten kein Lymphknotenbefall festzustellen, lebten nach 60 Monaten noch 55.1% der Patienten mit einer mittleren Überlebenszeit von 60.9 Monaten (Stddev.± 3.0 Monate). Sind dagegen Lymphknoten befallen, ergab sich eine Fünfjahresüberlebensrate von 41.3% und die mittlere Überlebenszeit lag hier bei 43.3 Monaten (Stddev.± 4.2 Monate), der Zusammenhang war mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.008$  statistisch auffällig.



**Abb. 28: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall**

Monate	12	24	36	48	60	72	84
Überleben in % ohne Lymphknotenbefall	81.1	70.2	67.2	61.9	<b>55.1</b>	51.9	51.8
Überleben in % mit Lymphknotenbefall	68.9	54.3	44.6	41.8	<b>41.3</b>	41.1	31.9

**Tab. 15: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall**

### 6.5.4 Abschluss der Nachsorge

Am Tag des Abschlusses dieser Studie waren von den 248 Patienten 117 verstorben, bei vier Patienten erfolgte der Tod aufgrund der Therapie. Von den restlichen 113 Patienten verschieden 71 tumorbedingt und 26 aufgrund anderer Ursachen. Von 16 Patienten konnten keine Angaben ermittelt werden.

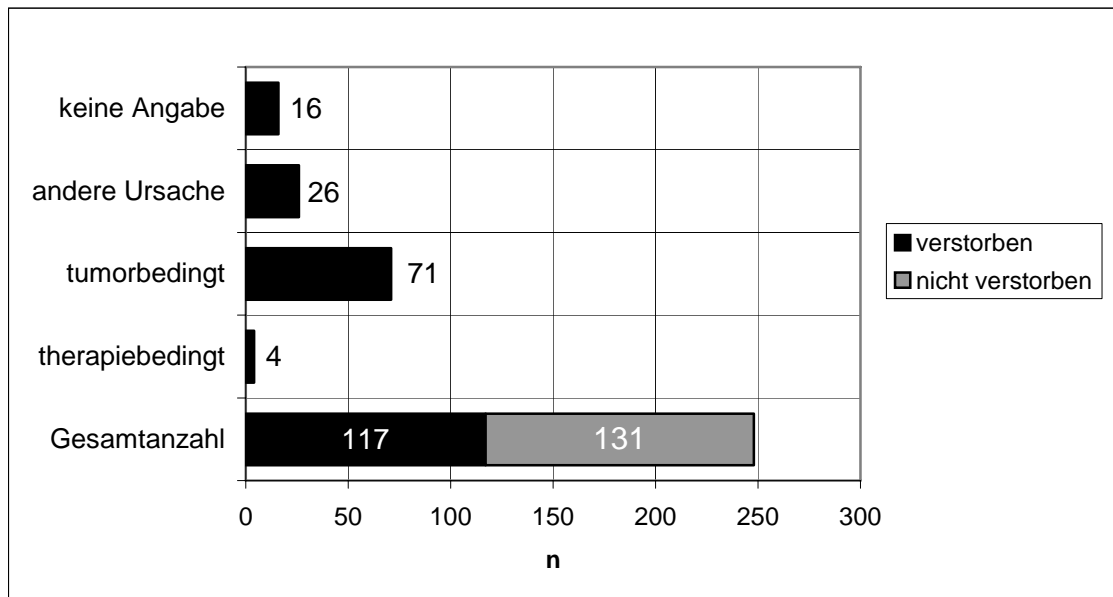
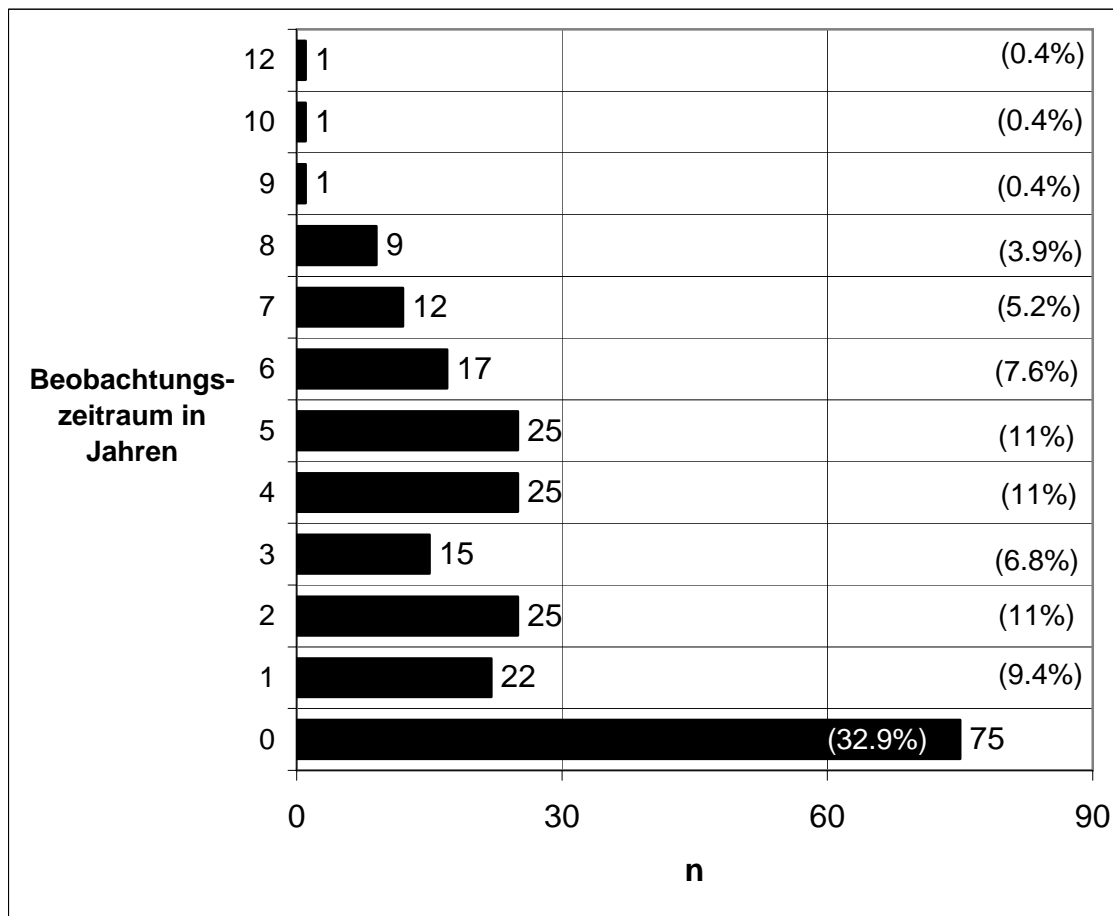


Abb. 29: Todesursache bis zum Abschluss der Nachsorge

### 6.5.5 Nachsorgezeitraum

Die Nachsorge der Patienten erstreckte sich maximal über einen Zeitraum von 12 Jahren und der Mittelwert des Nachuntersuchungsintervalls beträgt 2.8 Jahre (Stddev.  $\pm$  2.7 Monate). 75 Patienten kamen innerhalb des ersten Jahres nach der Operation zur Nachuntersuchung und 20 Patienten erschienen nicht zum Recall, von ihnen konnten keine Angaben evaluiert werden.



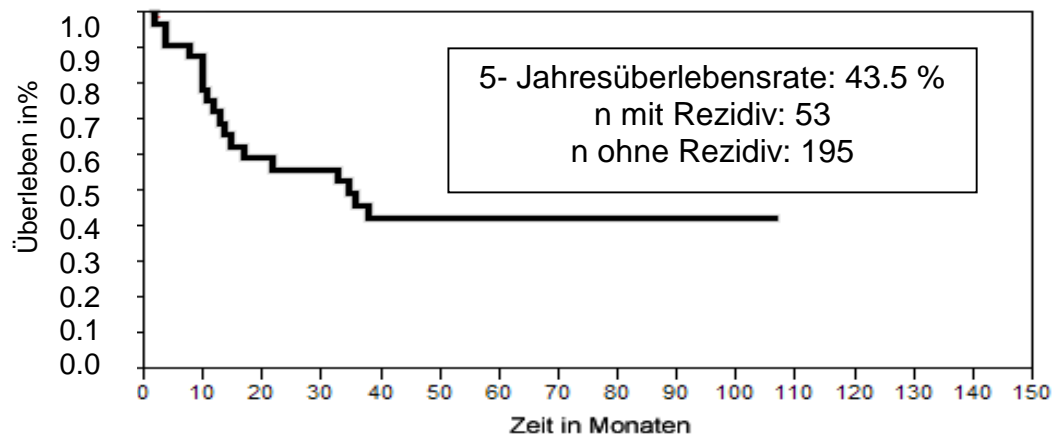
**Abb. 30: Klinischer Nachbeobachtungszeitraum**

### 6.5.6 Überlebenszeit nach Eintreten eines Rezidivs

Die Abbildung 31 zeigt die Überlebenszeitkurve nach dem Auftreten eines Lokalrezidivs. Ein Rezidiv trat bei 53 Patienten auf. Die mittlere Überlebenszeit betrug 36.8 Monate (Stddev.± 2.8 Monate) mit einer Fünffjahresüberlebensrate der Patienten von 43.5%. Die maximale Nachbeobachtungszeitraum betrug 150 Monate.

Monate	12	24	36	48	60	72	84
Überleben in % nach Eintreten eines Rezidivs	69.2	56.3	45.3	43.7	<b>43.5</b>	43.4	43.4

**Tab. 16: Überlebenszeit nach Eintreten eines Rezidivs**



**Abb. 31: Überlebenszeit der Patienten nach Auftreten eines Lokalrezidivs**

## 6.6 Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen und der Überlebenszeit

Der *LI* (*Labeling Index= Färbeindex*) berechnet sich aus dem relativen Anteil der MIB-1-positiv gefärbten Zellkernen an der Gesamtumorzellkernzahl. Er gibt einen Wert in Prozent an.

Sortierte man eine Reihe von Messwerten der Grösse nach, so ist der Zentralwert der Reihe der Median, welcher dem 50%- Percentil entsprach. Im Gegensatz zum arithmetischen Mittelwert veränderte sich der Median durch einzelne Extremwerte kaum. Als Referenzwert für die Auswertung des MIB-1-Färbeindexes wurde der Median der Werte angenommen, der in allen nachfolgenden Auswertungen als LIM angegeben (Labeling Index Median) ist. Der Wert lag bei 17.4%, deswegen unterteilten sich die Patienten in 2 Untergruppen.

Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, deren Prozentwerte unter 17.4 lagen, betrug 65 Monate (Stddev.± 3 Monate) und die Fünfjahresüberlebensrate lag bei 59.8%. Bei der Gruppe mit Werten über 17.4% ergab die mittlere Überlebenszeit 45 Monate (Stddev.± 3 Monate) und die Fünfjahresüberlebensrate 43%. Für die jeweiligen Gruppen wurde die Überlebenszeit univariat ermittelt und anhand von einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Es ergab sich eine statistische Auffälligkeit bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.0012$ .

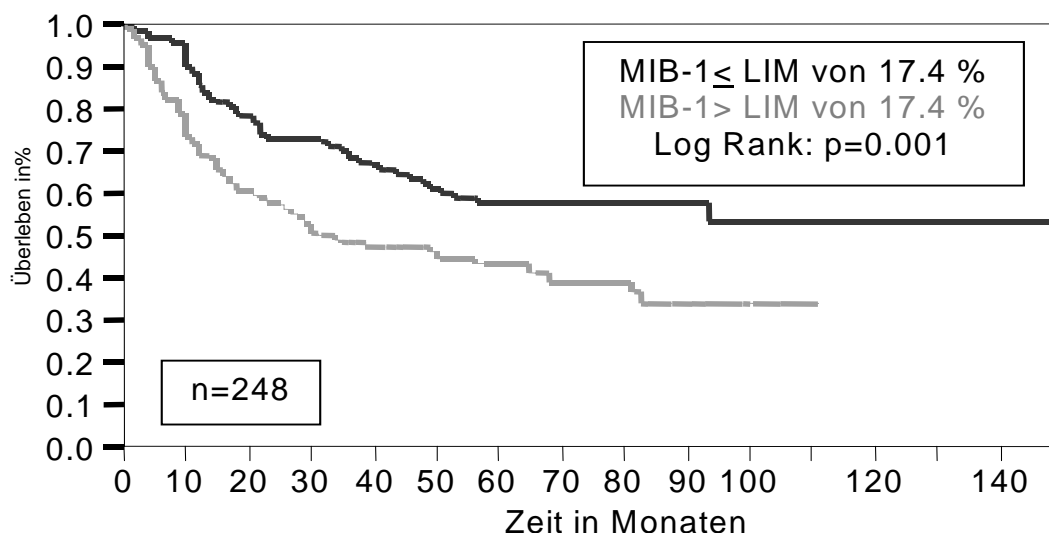


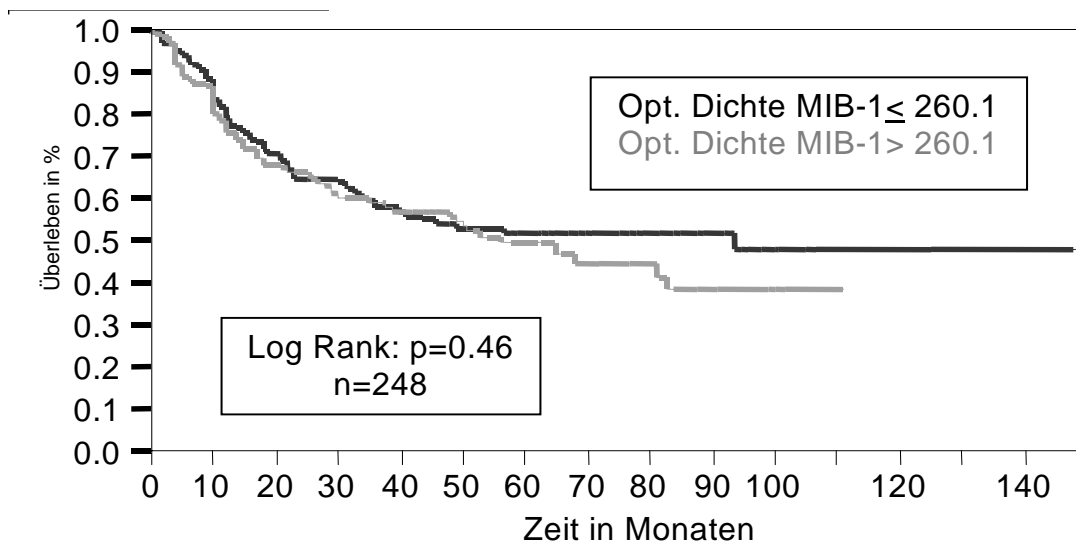
Abb. 32: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MIB-1-Färbeindexmedian von 17.4%

Monate	12	24	36	48	60	72	84
Überleben in % in Abh. vom MIB-1 LI $\leq$ 17.4%	87.2	72.7	57.9	61.6	<b>59.8</b>	59.1	58.9
Überleben in % in Abh. vom MIB-1 LI $>$ 17.4%	69.8	58.1	48.5	48.1	<b>43.0</b>	39.2	33.1

**Tab. 17: Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MIB-1-Färbeindexmedian von 17.4%**

## 6.7 Zusammenhang zwischen dem Überleben und der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne

Die Unterteilung der Werte erfolgte in 2 Gruppen anhand des Medians der optischen Dichte von 260.1. Die erste Gruppe, deren optische Dichte einen Wert unter 260.1 annahm, hatten eine Fünfjahresüberlebensrate von 52.1% mit einer mittleren Überlebenszeit von 58.2 Monaten (Stddev.  $\pm$  3.6 Monate). Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, deren optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne über 260.1 lag, betrug 50.3 Monate (Stddev.  $\pm$  3.1 Monate) und die Fünfjahresüberlebensrate 50.0%. Es zeigte sich bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.46$  kein statistischer Zusammenhang zwischen den Grössen.



**Abb. 33: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne**

Monate	12	24	36	48	<b>60</b>	72	84
Überleben in % in Abh. von opt. Dichte MIB-1 <260.1	80.2	64.5	59.2	53.2	<b>52.1</b>	51.3	51.1
Überleben in % in Abh. von opt. Dichte MIB-1 >260.1	79.8	66.2	59.2	58.4	<b>50.0</b>	44.4	38.2

**Tab. 18: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne**



## **7. Diskussion**

### **7.1 Beurteilung der Methodik und möglicher Fehlerquellen**

Die automatische maschinelle Färbung mit dem TechMate® ermöglichte eine Fehlerminimierung im Ablauf der Färbung und die Reproduzierbarkeit der Schritte. Die 248 Präparateschnitte der Patienten zeigten dadurch eine gleichmässige Färbung und sind somit miteinander vergleichbar.

Ein Vorteil der computergestützten Analyse mit dem Bildverarbeitungssystem Quantimet 600 ist die Betrachterunabhängigkeit und selbständige Zählung der Zellkerne. Dieses Bildanalysesystem erkennt die Grauwerte, die vorher als Schwellenwerte detektiert worden sind. Bei einer zu niedrigen Schwelle oder einem zu stark bzw. schwach angefärbten Präparat, ist das Analyseprogramm nicht in der Lage, den vollständigen Kern zu erfassen, was ein manuelles Nacharbeiten der Zellkerne erfordert. Dazu gehört die flächenmässige Trennung und die Vervollständigung der Kerne. Nur so kann das Programm zur Analyse die richtige und genaue Zellkernanzahl messen.

### **7.2 Beurteilung des Patientengutes und Vergleich mit dem DÖSAK Gesamtkollektiv**

Die Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen ist Mitglied des DÖSAK (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kopf- und Halsbereich). Die Datensammlung des DÖSAK ist sehr umfassend, die Daten über den Patienten werden in standardisierten Formularen abgefragt und aufgezeichnet, was mit der Tumorerkrankung des Patienten zusammenhängt. Es gehören die Stammdaten, wie das Alter, das Geschlecht, das Gewicht oder eventuelle Vorerkrankungen ebenso dazu, wie ein eventuell bestehender Alkohol- und Nikotinabusus des Patienten.

Diese Befunddaten wurden in Zusammenhang mit der MIB-1-Färbung gestellt und ausgewertet.

Sämtliche Daten sind mit den Ergebnissen verglichen worden, die Howaldt im Jahr 2000 in einer Auswertung von 9002 Patienten des DÖSAK vorgenommen hat.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 189 Männern (76%) und 59 Frauen (24%) zusammen mit einem durchschnittlichen Alter von 56.9 Jahren bei den männlichen und 65.9 Jahren bei den weiblichen Patienten. Im DÖSAK-Gesamtkollektiv waren 77.2% der Patienten männlich mit einem Altersgipfel zwischen 50 und 60 Jahren. Bei den Frauen lag er zwischen 50 und 75 Jahren.

Der Hauptanteil der im DÖSAK- Register erfassten Tumoren umfasste die Lokalisation Mundhöhle mit 88% und Lippe mit 8%. In dem hier ausgewerteten Patientenkollektiv lag die Lokalisation an der Lippe an 4. Stelle mit 11.7%, wobei die grösste Anzahl an Tumoren mit 26.1% am vorderen Mundboden und mit 19.7% an der Zunge ausgemacht werden konnten.

Im DÖSAK-Gesamtkollektiv wurden etwa zwei Drittel der Tumore im Grading als mässig differenziert eingestuft, was sich mit dieser vorliegenden Untersuchung deckt, wo bei 75.5% der Tumore die Einstufung in mässig differenziert erfolgte.

Bei 40% der Patienten hatte der Tumor das Stadium cT4 erreicht, wohingegen in Howaldts Auswertung der 9002 Patientendaten 60% aller Tumore in das cT-Stadium 4 eingeteilt wurden. Auch wies Howaldt auf die Tatsache hin, dass der Lymphknotenbefall N3 in den Daten sehr wenig dokumentiert ist, was er auf die derzeit gültige Klassifikationsvorschrift zurückführte. Bei meinen ausgewerteten Daten der 248 Patienten sind die Lymphknotenbefallstadien N2, N2a und N3 mit jeweils nur 2, 3 und 4 Patienten gering eingestuft.

In 99 Fällen erfolgte anhand der ersten Diagnose die Einteilung der Tumorgrosse in das cT4-Stadium, nach der Beurteilung durch den Pathologen wurden nun 58 Patienten dem pT4-Stadium zugeordnet. Ähnliches ergibt sich aus der Beurteilung der Lymphknotenbeteiligung N. 156 Patienten wiesen nach der Beurteilung durch den Pathologen keinen Lymphknotenbefall auf, vor der Behandlung ergab die erste Diagnose bei 126 Patienten die Einstufung in das N0-Stadium. Daraus ist ersichtlich, dass die Beurteilung durch den Pathologen sehr wichtig ist, denn die Untersuchung der Patienten vor der Behandlung und die Einstufung in die jeweiligen Stadien gibt nur eine Richtlinie, die erst durch den Pathologen anhand des Ausräumungspräparates präzisiert wird.

In unserer Studie unterzogen sich 67.5% der Patienten einer Operation, wobei dieser Wert über den Ergebnissen von Howaldt liegt, der bei der Analyse des DÖSAK-Gesamtkollektives festgestellt hatte, dass 52% der 9002 Patienten radikal operiert wurden.

Bei 1% der Patienten trat eine Fernmetastase auf, bei Howaldt waren es 1.5% des Krankengutes. Daraus ist abzuleiten, dass das Plattenepithelkarzinom selten fern metastasiert.

Im DÖSAK-Gesamtkollektiv wurden 19% der Patienten mehr als 5 Jahre weiterbeobachtet, bei den hier untersuchten Patientendaten waren es 16.7%.

## **7.3 Beurteilung der Überlebenszeiten**

### **7.3.1 Überlebenszeit**

Die Fünfjahresüberlebensrate der 248 Patienten betrug 50.84% in der Kaplan-Meier-Analyse, wohingegen in dem von Howaldt ausgewerteten Patientengut die Fünfjahresüberlebensrate bei 52.4% lag. In der Literatur schwankten die Angaben zur Fünfjahresüberlebensrate zwischen 53% (Oosterhuis, 2000), 53.1% (Sommer und Olofsson, 1997), 54% (Roland, 1994), 58% (Grabenbauer, 2000), 63% (Koelbl, 2001) bis zu 80% (Okabe, 2001).

### **7.3.2 Überlebenszeit in Zusammenhang mit dem Alter**

Beim Auftreten des Plattenepithelkarzinoms spielte das Alter eine Rolle. Die Unterteilung des Patientenkollektivs erfolgte anhand des Medians von 57 Jahren in zwei Gruppen, die jeweils jünger und älter waren, dabei zeigte sich ein statistischer Zusammenhang bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.0027$ . Von den älteren Patienten lebten nach 5 Jahren 41.5%, wobei die mittlere Überlebenszeit 49.2 Monate betrug (Stddev.  $\pm$  3.7 Monate). Die Fünfjahresüberlebensrate der jüngeren Patienten ergab 59.9% und die mittlere Überlebenszeit lag bei 56.3 Monaten (Stddev.  $\pm$  2.8 Monate).

Diese Ergebnisse stützen die Untersuchungen von Oosterhuis (2000) und Layfield (1997). Oosterhuis untersuchte 301 Patienten mit Blasenkarzinomen und fand eine bessere Fünfjahresüberlebensrate von 64% bei Patienten, die jünger als 68 Jahre waren, ältere Patienten als 68 hatten dagegen eine Fünfjahresüberlebensrate von 35% mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.0001$ . Layfield analysierte die Daten von 50 Patientinnen mit Ovarienkarzinomen

und fand eine schlechtere Fünfjahresüberlebensrate bei den über 60 Jährigen mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.06$ .

Das stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Homma (1999), der bei seinen Untersuchungen an 111 bestrahlten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle keinen Zusammenhang zwischen Alter und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten entdecken konnte mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.514$ . Couture gelangte im Jahr 2002 bei der Datenauswertung von 304 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle zur gleichen Schlussfolgerung, bei ihm gab es keinen Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Gesamtüberlebenszeit.

### **7.3.3 Gesamtüberlebenszeit der Patienten in Zusammenhang mit dem Lymphknotenbefall**

Die Untersuchungen ergaben bei den Patienten mit Lymphknotenbefall eine Fünfjahresüberlebensrate von 41.3% mit einer mittleren Überlebenszeit von 43.3 Monaten (Stddev.  $\pm$  4.2 Monate) und einem Log-Rank-Wert von  $p=0.008$ . War bei den Patienten kein Lymphknotenbefall nachweisbar, lebten nach 60 Monaten 55.1% der Patienten und die mittlere Überlebenszeit dieser Patientengruppe rangierte bei 60.9 Monaten (Stddev.  $\pm$  3.0 Monate).

Zur gleichen Schlussfolgerung kam Homma (1999) in seinen Forschungen, es ergab sich ein statistischer Zusammenhang zwischen dem positiven Lymphknotenbefall und der verschlechterten Überlebenszeit der Patienten (Log-Rank-Wert,  $p=0.001$ ). Die Forschergruppe um Spafford (1996) entdeckte keinen Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenbefall und der Überlebenszeit der Patienten nach Auswertungen der Untersuchungsergebnissen von 70 Plattenepithelkarzinomen des Larynx.

### **7.3.4 Überlebenszeit in Zusammenhang mit einem Rezidiv**

Die mittlere Überlebenszeit nach Auftreten eines Lokalrezidivs betrug 36.8 Monate (Stddev.  $\pm$  2.8 Monate), wobei ein Lokalrezidiv nach rund 25 Monaten auftrat (Stddev.  $\pm$  1.6 Monate). Die Fünfjahresüberlebensrate ergab 43.5%, was sich mit den Ergebnissen von Howaldt deckte, der bei seinen Daten eine Rezidivüberlebensrate von 43.9% angab.

Oosterhuis berichtete in seinen Forschungsergebnissen vom Jahre 2000 von 301 Blasenkarzinompatienten mit Rezidiven mit einer 51% Fünfjahresüberlebensrate.

Das steht im Gegensatz zu Hantschmann, der nach Untersuchungen von 74 Plattenepithelkarzinomen der Vulva keinen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und der Überlebenszeit mit Rezidiv oder dem Gesamtüberleben fand (Hantschmann, 2000).

## **7.4 Beurteilung der immunhistochemischen Befunde**

### **7.4.1 Zusammenhang zwischen MIB-1-Färbeindex und Überleben**

Der LI (Labeling Index= Färbeindex) berechnet sich aus dem relativen Anteil der MIB-1-positiv gefärbten Zellkernen an der Gesamttumorzellkernzahl und gibt einen Prozentwert an. Nach der Bestimmung des MIB-1-Färbeindexmedians, der LIM (Labeling Index Median), welcher einen Wert von 17.4% annahm, unterteilte sich das Patientenkollektiv in zwei Gruppen. Dabei setzte sich der eine Block aus allen Patienten zusammen, deren LI unter oder auf dem Median von 17.4% lagen und die andere Gruppe bestand aus den Patienten, deren Ergebnisse sich über dem LIM von 17.4% befanden.

Die Patienten, bei denen die Werte unterhalb des LIM rangierten, hatten eine höhere Gesamtüberlebenszeit, wobei die mittlere Überlebenszeit 65 Monate (Stddev.± 3 Monate) betrug mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 59.8%. Bei der Patientengruppe, deren Werte über dem LIM von 17.4% lagen, ergab sich eine mittlere Überlebenszeit von 45 Monate (Stddev.± 3 Monate) und eine Fünfjahresüberlebensrate von 43%. Dabei war der Log-Rank-Wert von  $p=0.0012$  statistisch auffällig.

So haben Patienten mit einer höheren MIB-1 Zellkernzahl, also mit einem weit fortgeschrittenen, sich aggressiver teilenden Tumor, eine geringere Gesamtüberlebenszeit. Auf diesen Erkenntnissen basierend ist es vielleicht in der Zukunft möglich, für jeden Patienten ein individuelles Risikoprofil zu erstellen.

Homma untersuchte im Jahr 1999 111 Plattenepithelkarzinome der Kopf-und Halsregion und kam zu dem Ergebnis, dass das Gesamtüberleben vom MIB-1-Färbeindex abhängig sei. Patienten mit einer geringeren Färbeindexrate von 40% lebten länger als die Patienten, welche einen höheren Färbeindex aufwiesen bei einem statistisch auffälligen Log-Rank-Wert von  $p=0.008$ . Diese Auffassung bestätigte auch Grabenbauer (2000) nach Untersuchungen an 102 Oropharynxkarzinomen mit einem Ki-67-Färbeindexmedian von

20%. Patienten mit einem LI kleiner als 20% hatten eine Fünfjahresüberlebensrate von 84% und Patienten mit MIB-1-Färbeindexwert von über 20% die Fünfjahresüberlebensrate von 49% bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.006$ . Grabenbauer behauptete, dass eine verbesserte Überlebensrate für Patienten bestehe, deren Karzinome ein geringeres Proliferationspotential besitzt. Okabe untersuchte im Jahr 2001 Speicheldrüsentumoren der Mundhöhle, dabei betrug die Fünfjahresüberlebensrate bei Patienten mit einem hohen Ki-67-LI 53%, wohingegen Patienten mit einem niedrigen Index eine Fünfjahresüberlebensrate von 95% aufwiesen bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.024$ .

In der Literatur waren auch entgegengesetzte Ansichten zu finden. Jones untersuchte im Jahr 1994 75 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und färbte sie mit dem Proliferationsmarker Ki-67 an, dabei fand er keinen Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit der Patientengruppen, die aufgrund des Färbeindexmedians von 298 unterteilt wurden. Couture (2002) kam zu der gleichen Auffassung nach der Auswertung der 304 Patientendaten von bestrahlungsresistenten Kopf und Halstumoren. Dabei sah er keinen Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Index und der Fünfjahresüberlebensrate, denn der Ki-67-Färbeindex unter dem Median von 20% hatte keinen Einfluss auf die 48% Fünfjahresüberlebensrate der Patienten bei einem Log-Rank-Wert von  $p=0.6$ . Ebenso schlussfolgerte Nylander im Jahr 1997, wobei bei ihm die Unterteilung der Patientengruppen hinsichtlich des LI in 3 Gruppen erfolgte (LI: 11-24%; 25-38%; 39-60%) mit einem Median von 32%. Innerhalb dieser 3 Reihen zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zum Überleben der Patienten. Die Zählung der Zellkerne erfolgte an 5-10 zufällig ausgewählten Arealen, die über den ganzen Tumor verteilt waren, worin auch der Schwachpunkt der Untersuchung liegt, denn die Tumorfront ist die am aussagekräftigsten Stelle hinsichtlich des Tumorwachstums.

In den Literaturquellen sind Untersuchungen von anderen Tumorgeweben zu finden, wobei auch hier die Auffassung über den Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit und MIB-1-Färbeindex schwankt.

Ho (2000) stellte in seiner Arbeit fest, dass das Gesamtüberleben bei an Plattenepithelkarzinomen der Cervix erkrankten Patientinnen, signifikant unterschiedlich in den Gruppen war, die aufgrund des MIB-1 Indexmedian von 55% unterteilt wurden. Die Patientengruppe mit einem Färbeindex unter dem Median hatte eine Fünfjahresüberlebensrate von 90%, währenddessen bei der Patientenklientel mit dem Färbeindex über 55% eine Fünfjahresüberlebensrate von 73.1% vorlag. Die Forschergruppe um Suzuki (2000)

untersuchte 67 Cervixkarzinome, wobei die Patienten mit einem MIB-1-Färbeindex über dem Median von 26.4% eine Überlebensrate von 75.8% hatten. Die Überlebensrate von den Patientinnen mit einem Färbeindex unter dem Median betrug 59.6% bei einem Log-Rank-Wert von  $p < 0.05$ . Davidson (2000) kam zu der Auffassung nach der Untersuchung von 49 Cervixkarzinomen, dass der Ki-67-Färbeindex keine grosse Voraussagekraft in Bezug auf die Überlebensrate der Patienten hatte, denn die Signifikanz der Ergebnisse war mit einem Log-Rank-Wert von  $p = 0.07$  grenzwertig. Graflund argumentierte im Jahre 2002 nach der Auswertung der Daten von 134 Plattenepithelkarzinomen der Cervix, dass der MIB-1-Färbeindex keine Faktor sei, der das Überleben der Patienten voraussagen könne. Gelb (1997) untersuchte 52 Nierenzellkarzinome und entdeckte keinen Zusammenhang zwischen dem 1% bis 21% rangierenden MIB-1-Färbeindex und der Überlebenszeit der Patienten.

#### **7.4.2 Zusammenhang zwischen dem Überleben und der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne**

Wurde die optische Dichte der Präparate mit dem Überleben in Zusammenhang gestellt, ergab sich keine Korrelation zwischen diesen Grössen bei einem Log-Rank-Wert von  $p = 0.46$ . Anhand von densitometrischen Messungen konnte keine Information über den Tumor gesammelt werden, denn die Angaben waren abhängig von der verwendeten Färbung. Grabenbauer (2000) fand in seiner Arbeit keinen Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeintensität und dem Überleben bei einem Log-Rank-Wert von  $p = 0.3$ .

#### **7.4.3 Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeindex, dem Grading, den Tumorparameter nach UICC und dem Lymphknotenstatus**

Die Daten der MIB-1 Färbung wurden mit den Daten der Patienten über das Grading, den Tumorparameter nach UICC, die T-Klassifikation, dem klinischen Stadium und dem Lymphknotenstatus in Zusammenhang gestellt. Zwar steigt der Median innerhalb des Grading an, da sich aber die Streubereiche in den Gradingstadien 1-3 überlappen, wies das auf keine statistische Korrelation hin. Genauso verhielt es sich mit den anderen genannten klinischen Parametern. Die Streubereiche überlappen sich jeweils erheblich, wodurch kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden konnte. Wurde die MIB-1-Färbung in

Zusammenhang mit dem Tumorparameter nach UICC gestellt, ergaben die Medianwerte in der cT1-Stadium 13.7%, 15.3% im cT2-Stadium und 16.5% im cT3- bis 20.7% im cT4-Stadium. Im Gegensatz zum cT-Stadium erreichte der Medianwert im pT1-Stadium 14.4%, 15.2% im pT2-Stadium und im pT3-Stadium den Höchstwert von 24.8%, um im pT4-Stadium auf 18.7% abzufallen.

Der prozentuale Anteil von MIB-1 Zellkernen an der Gesamtzellkernzahl war bei den Patienten ohne Lymphknotenmetastasenbefall am kleinsten mit 13.7% im Median. Bei Patienten mit der Lymphknotenbeteiligung cN3 erreichte der Medianwert 16.5%. Dem cN1-Stadium mit einem Medianwert von 18.9% folgte das cN2-Stadium mit 21.6%, daran schloss sich das cN2b-Stadium mit 23.2% an. Der Median ergab im cN2c-Stadium den Wert 20.1%. Am höchsten mit 25.9% war der Prozentsatz der Medianwerte bei Patienten im cN2a-Stadium. Die Streubereiche überlappten sich erheblich, was auf keinen statistischen Zusammenhang hinwies.

Nach der Beurteilung durch den Pathologen stellte sich die Einteilung der Lymphknotenmetastasen anders dar. Es fehlten die pN-Stadieneinteilungen 2, 2a und 3. Die Patienten ohne Lymphknotenbefall wiesen den kleinsten Medianwert an prozentualer Verteilung von MIB-1 positiver Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl mit 15.2% auf. Im pN1-Stadium und pN2b ergibt der Median 18.5% und 18.9%, um im pN2c-Stadium 17.2% zu erreichen.

Der Median der MIB-1-positiven Färbewerte stieg vom klinischen Stadium I bis IV an, von 13.3% in Stadium I über 15.6% im Stadium III zu 20.4% im Stadium IV, ausser im klinischen Stadium II, wo der Medianwert 11.2% ergab.

In der Literatur waren neben Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion auch andere Tumorlokalisationen zu finden. Die Forscher kamen auf unterschiedliche Sichtweisen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeindex oder dem Grading, dem TNM und dem Lymphknotenstatus gab.

Valente (1999) konnte in seinen Untersuchungen von 102 Larynxkarzinomen keine Korrelation zwischen der Wachstumsfraktion, dem Grading und dem pathologischen Staging feststellen. Zu dem gleichen Ergebnis kommt Bettendorf und Herrmann (2002), sie fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Färbeindex und den histologischen und klinischen Parametern nach der Untersuchung von 329 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. Die Forschergruppe um Hantschmann (2000) untersuchte 74 mit Ki-67 angefarbte Plattenepithelkarzinome der Vulva und entdeckte keinen Zusammenhang zu den klinischen



Parametern. Krecicki (1998) fand bei Untersuchung von Larynxkarzinomen keine Übereinstimmung zwischen Ki-67-Färbeindex und T- und N-Stadium. Sittel (2000b) erkannte nach Analyse von Daten der 58 Plattenepithelkarzinome des Oropharynx und der Mundhöhle keinen Zusammenhang zwischen dem MIB-1-Färbeindex und dem Grading. Zum gleichen Ergebnis kamen Sommer und Olofsson (1997) in ihren Untersuchungen an 64 Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem MIB-1-Färbeindex und Lymphknotenstatus oder Grading.

Zu einem anderen Ergebnis kam Tumuluri (2002), er unterstrich bei seinen Auswertungen über 42 oralen Plattenepithelkarzinomen den Zusammenhang zwischen dem histologischen Brodersgrading und dem Mittelwert im Ki-67-Färbeindex, es fand sich eine positive Assoziation zwischen ansteigendem Ki-67-Färbeindex und ansteigendem Grading mit einem Log-Rank-Wert von  $p=0.05$ . Ein gut differenzierter Tumor wies einen niedrigen mittleren Färbeindex von 1549 auf, niedrig differenzierte Tumore hatten die höchsten LI-Indexwert mit 2232. Homma (1999) unterteilte die Patientendaten von 111 Plattenepithelkarzinomen der Kopf-und Halsregion bezüglich des Gradings und Stagings ein. Er fand eine statistische Auffälligkeit zwischen MIB-1-Färbeindex und klinischem Stadium III und IV und histologischem Grad 3. Zidar (1996) entdeckte in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen einem ansteigenden Grading und Prozentsatz von gefärbten Ki-67 positiv gefärbten Zellkernen ( $p<0.1$ ) nach der Untersuchung von 20 Plattenepithelkarzinome des Larynx. Welkoborsky (1995) wies in seiner Arbeit an 40 Larynxkarzinomen nach, dass es einen Zusammenhang zwischen einem ansteigendem Ki-67 Index und T1-Stadium und T4-Stadium gab.

Die MIB-1-Färbung ist eine vergleichsweise kostengünstige Möglichkeit, um Plattenepithelkarzinome zu untersuchen. Die computergestützte Untersuchung und Auswertung der Flächen und das automatisierte Zählen der Zellkerne ist zeitsparend sowie fehlerreduzierend.

Die Zählung der Zellkerne erfolgte an der Tumorfront. Die Daten müssen durch eine grössere Fallzahl evaluiert werden. Die biologische Aktivität des Krebsgewebes kann durch die immunhistochemische Färbung des Tumors mit MIB-1 besser eingeschätzt werden. Eine Auswertung einer grösseren Patientengruppe wird nötig sein, auch im Zusammenhang mit anderen klinischpathologischen Parametern und Tumormarkern, um für jeden Patienten ein individuelles Risikoprofil zu erstellen und die Therapie darauf abzustimmen.

## 8. Zusammenfassung

Von 248 Patienten wurden die Tumorpräparate vollautomatisch mit dem Proliferationsmarker MIB-1 angefärbt und die Präparate mit dem Quantimet 600 einem computergestützten Bildverarbeitungssystem der Firma Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd. analysiert. Als erstes erfolgte der Vergleich der Werte mit den von Howaldt im Jahre 2000 ausgewerteten 9002 Patientendaten des DÖSAK-Datenpools. Hinsichtlich des Alters (Männer: Median 57 Jahre, DÖSAK: Altersgipfel: 50-60 Jahre, Frauen: 66 Jahre, DÖSAK: Altersgipfel: 50-75 Jahre), der Geschlechtsverteilung (189=76% männlich, DÖSAK: 77.2% männlich; 59=24% weiblich, DÖSAK: 22.8% weiblich), der Lokalisation des Tumors (29% Lippe, DÖSAK: 8% Lippe), des cT-Stadiums (cT4-Stadium 40%, DÖSAK: 60%) der Fünfjahrsüberlebensrate (50.84%, DÖSAK: 52.4%) und der Entstehung von Fernmetastasen (1% ) lagen die Werte in ähnlichen Bereichen. Im DÖSAK-Gesamtkollektiv und der hier vorliegenden Untersuchung wurden im Grading zwei Drittel als mässig differenziert eingestuft. 67.5% der 248 Patienten mussten sich einer Operation unterziehen, im Gegensatz zu Howaldts Analyse, bei dem 52% der Patienten operiert wurden.

Der MIB-1-Färbeindex errechnete sich aus dem relativen Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamttumorzellkernzahl. Das Patientenkollektiv wurde hinsichtlich des MIB-1-Färbeindexmedianes von 17.4% unterteilt. Die erste Gruppe mit Prozentwerten unterhalb und auf dem Medians wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 65 Monaten auf (Stddev.± 3 Monate) mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 59.8%. Die mittlere Überlebenszeit der Gruppe mit Prozentwerten über 17.4% betrug 45 Monate (Stddev.± 3 Monate) mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 43%, Log-Rank-Wert,  $p=0.0012$ .

Patienten ohne Lymphknotenbefall wiesen eine Fünfjahresüberlebensrate von 55.1% (mittlere Überlebenszeit: 60.9 Monate, Stddev.± 3 Monate) auf, mit Lymphknotenbefall lag sie bei 41.3% (mittlere Überlebenszeit: 43.3 Stddev.± 4.2 Monate).

Ein Rezidiv trat bei 53 Patienten auf und die mittlere Überlebenszeit betrug 36.8 Monate (Stddev.± 2.8 Monate) mit einer Fünfjahresüberlebensrate lag bei 43.5%.

Die optische Dichte der MIB-1 Zellkerne war nicht dazu geeignet, für die Patienten eine Aussage hinsichtlich des Überlebens zu machen, denn es gab keinen statistischen Zusammenhang zwischen diesen Grössen, Log-Rank-Wert,  $p=0.46$ .

Der Proliferationsmarker MIB-1 könnte ein Parameter sein, ein individuelles Risikoprofil für den Patienten zu erstellen und die Therapie darauf einzustellen.

## 9. Verzeichnis

### 9.1 Literaturverzeichnis

Bettendorf O, Herrmann G: Prognostic relevance of Ki-67-Antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinomas. *ORL-J-Otorhinolaryngol-Relat-Spec.* 64:200-5, 2002

Bork K, Hoede N, Korting GW: Mundschleimhaut- und Lippenkrankheiten Klinik, Differentialdiagnostik und Therapie, Atlas und Handbuch, 2. neubearbeitete und wesentlich erweiterte Auflage. Stuttgart-New York, Schattauer, 1993

Bridger JM, Kill IR, Lichter P: Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res* 6:13-24, 1998

Bryne M: Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis* 4:70-7, 1998

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al.: New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 18:432-7, 1989

Buselmaier W: Biologie für Mediziner-Begleittext zum Gegenstandskatalog, 7. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-HongKong-Barcelona-Budapest, Springer Verlag, 1994

Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al.: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67-Antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-63, 1992

Chino O, Makuuchi H, Shimada H, et al.: Assessment of the proliferative activity of superficial esophageal carcinoma using MIB-1 immunostaining for the Ki-67-Antigen. *J-Surg-Oncol.* 67:18-24, 1998

Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, et al.: p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 94:713-22, 2002

Crile G.: Excision of cancer of the head and neck. *J Am Med Assoc* 47: 1780-88, 1906

Davidson B, Goldberg I, Lerner-Geva L, et al.: Expression of topoisomerase II and Ki-67 in cervical carcinoma-clinicopathological study using immunohistochemistry. *APMIS* 108:209-15, 2000

du Manoir S, Guillaud P, Camus E, et al.: Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* 12:455-63, 1991

Duchrow M, Schluter C, Wohlenberg C, et al.: Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 29:1-12, 1996

Erbar P: *Onkologie*. Stuttgart- New York, Schattauer, 2000

Feichtinger H, Maier H, Schmid W: *Histopathologischer Kurs, Kursbegleiter für Studenten zu den Praktika der Histopathologie und der speziellen Pathologie*. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag, 1992

Fonantsch C, Duchrow M, Rieder H, et al.: Assignment of the human Ki-67-Gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics* 11:476-477, 1991

Funk JO: Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19:4772-80, 1999

Gelb AB, Sudilovsky D, Wu CD, et al.: Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer* 80:1768-75, 1997

Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, et al.: Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2:365-71, 1984

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5, 1984

Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al.: Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867-73, 1991

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983

Girod SC, Krueger G, Pape HD: p53 and Ki 67 expression in preneoplastic and neoplastic lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 22:285-8, 1993

Golusinski W, Olofsson J, Szmeja Z, et al.: A comprehensive analysis of selected diagnostic methods with respect to their usefulness in evaluating the biology of neoplastic cells in patients with laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256:306-11, 1999

Gonzalez-Moles MA, Caballero R, Rodriguez-Archilla A, et al.: Prognosis value of the expression of Ki-67 for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Acta Stomatol Belg* 93:159-65, 1996

Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A, et al.: Suprabasal expression of Ki-67-Antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck* 22:658-61, 2000

Grabenbauer GG, Muhlriedel C, Rodel F, et al.: Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:1041-50, 2000

Graflund M, Sorbe B, Bryne M, et al.: The prognostic value of a histologic grading system, DNA profile, and MIB-1 expression in early stages of cervical squamous cell carcinomas. *Int-J-Gynecol-Cancer*. 12:149-57, 2002

Greenberg B, Woo L, Blatchford S, et al.: Variability of the thymidine labeling index in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 98:668-70, 1988

Hantschmann P, Lampe B, Beysiegel S, et al.: Tumor proliferation in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol* 19:361-8, 2000

Harms V: *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*, 7, Harms Verlag, 1998

Hausamen J-E: *Tumorchirurgie. Mund Kiefer GesichtsChir* 4:S142-154, 2000

Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, et al.: Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 29:413-25, 1996

Ho DM, Hsu CY, Chiang H: MIB-1 labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 76:97-102, 2000

Hoffmann- Axthelm W: *Die Geschichte der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Quintessenz*, Berlin S104-116, 1995

Homma A, Furuta Y, Oridate N, et al.: Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 5:801-6, 1999

Horch H-H, Austermann KH, Bill JS, et al.: *Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie II, 10/II. München- Wien- Baltimore, Urban&Schwarzenberg*, 1998

Howaldt HP, Kainz M, Euler B, et al.: Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *DOSAK. J Craniomaxillofac Surg* 27:275-88, 1999

Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, et al.: Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 Suppl 1:S216-25, 2000

Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, et al.: Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer* 65:1180-4, 1990

Jones AS, Roland NJ, Caslin AW, et al.: A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Laryngol Otol* 108:859-64, 1994

Key G, Becker MH, Baron B, et al.: New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 68:629-36, 1993

Koch W: Tumor Biology-Introduction tumor progression in International Conference of Head and Neck Cancer, San Francisco, 2000

Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, et al.: p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int-J-Radiat-Oncol-Biol-Phys.* 49:147-54, 2001

Krecicki T, Jelen M, Zaleska-Krecicka M, et al.: Ki-67 immunostaining and prognosis in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol* 23:539-42, 1998

Küttner H.: Über die Lymphgefäße und Lymphdrüsen der Zunge in Beziehung auf die Verbreitung des Zungencarcinoms. *Beitr Klin. Chir* 21, 732-86, 1898

Kuropkat C, Rudolph P, Frahm SO, et al.: Proliferation marker Ki-S11--a prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Virchows Arch* 435:590-5, 1999

Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, et al.: P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 111:1878-92, 2001

Layfield LJ, Saria EA, Berchuck A, et al.: Prognostic value of MIB-1 in advanced ovarian carcinoma as determined using automated immunohistochemistry and quantitative image analysis. *J-Surg-Oncol.* 66:230-6, 1997

Lopez F, Belloc F, Lacombe F, et al.: The labelling of proliferating cells by Ki67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp Cell Res* 210:145-53, 1994

Lörz M: MIB 1- ein neuer paraffingängiger, proliferationsassoziiertes monoklonaler Antikörper. *Otorhinolaryngol Nova* 4:53-55, 1994

Metelmann HR: Chemotherapie und Radiochemotherapie bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 1:S155-9, 2000

Mittermayer C: Oralpathologie- Erkrankungen der Mundregion, Lehrbuch der Zahnmedizin, Mund- und Kieferheilkunde, Band. 3.erweiterte Auflage. Stuttgart-New York, Schattauer Verlag, 1993

Mohr Ch, Bohndorf W, Carstens J, Härle F et al.: Preoperative radiochemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone- A prospective, multicentric, randomized DÖSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx (a 3 year follow-up), *Int J Oral Maxillofac Surg*, 23, 140- 48, 1994

Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, et al.: PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anal Cell Pathol* 14:101-10, 1997

Okabe M, Inagaki H, Murase T, et al.: Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod-Pathol*. 14:1008-14, 2001

Oosterhuis JW, Schapers RF, Janssen-Heijnen ML, et al.: MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder: clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer* 88:2598-605, 2000 Jun 1

Parwaresch R, Rudolph P: The cell cycle-theory and applications to cancer. *Onkologie* 19:464-472, 1996

Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, et al.: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79:595-604, 1997



Popov Z, Hoznek A, Colombel M, et al.: The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 80:1472-81, 1997

Reuther J, Steinau U.: Mikrochirurgische Dünndarmtransplantation zur Rekonstruktion grosser Tumordefekte der Mundhöhle. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 4: 131-36, 1980

Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, et al.: Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clin Otolaryngol* 19:13-8, 1994

Salmaso R, Zen T, Zannol M, et al.: Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Eur-J-Gynaecol-Oncol.* 21:479-83, 2000

Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, et al.: The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 133:579-84, 1987

Schaer JC, Maurer U, Schindler R: Determination of thymidine in serum used for cell culture media. *Exp Cell Biol* 46:1-10, 1978

Schuchardt K.: *Der Rundstiellappen in der Wiederherstellungschirurgie des Gesichtskieferbereiches*, Thieme Leipzig, 1944

Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, et al.: The Ki-67-Protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol* 196:135-44, 2002

Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67-Protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-22, 2000

Schwenzer K, Dekoleadenu P, Schwenzer N: *OP- Abläufe und - Instrumentarium in der MKG und Oralchirurgie*, 1. Stuttgart- New York, Thieme Verlag, 2001

Schwenzer N, Ehrenfeld M: *Allgemeine Chirurgie*, 1, Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag, 2000a

Schwenzer N, Ehrenfeld M: Zahnärztliche Chirurgie, 3, Stuttgart- New York, Georg Thieme Verlag, 2000b

Schwenzer N, Ehrenfeld M: Spezielle Chirurgie, 2, Stuttgart- New York, Georg Thieme Verlag, 2002

Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-8, 1991

Sittel C, Eckel HE, Damm M, et al.: Ki- 67(MIB1), p53, and Lewis.X (LeuM1) as Prognostic Factors of Recurrence in T1 and T2 Laryngeal Carcinoma. *Laryngoscope* 110:1012-1017, 2000b

Sittel C, Ruiz S, Kvasnicka HM, et al.: Zur prognostischen Relevanz der Proliferationsmarker Ki-67 (MIB 1), PCNA und p53 bei kombiniert chirurgisch und radiologisch therapierten Karzinomen des Oropharynx und der Mundhöhle. *Laryngorhinootologie*. 79:86-92, 2000a

Sobin LH: TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors. *Cancer* 91:1589-92, 2001

Sommer T, Olofsson J: Die Bedeutung von p53, PCNA und Ki-67 für die Prognose von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle. *Laryngorhinootologie*. 76:189-96, 1997

Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, et al.: Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:627-32, 1996

Starborg M, Gell K, Brundell E, et al.: The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109 ( Pt 1):143-53, 1996

Stoll C, Baretton G, Ahrens C, et al.: Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 436:102-8, 2000

Stryer L: Biochemie, 4, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 1996

Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, et al.: Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 79:300-4, 2000

Takagi M, Matsuoka Y, Kurihara T, et al.: Chmadrin: a novel Ki-67-Antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J Cell Sci* 112 ( Pt 15):2463-72, 1999

Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, et al.: Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res* 19:3503-10, 1999

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS: Analysis of the Ki-67-Antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J-Oral-Pathol-Med* 31:598-604, 2002

Unal OF, Ayhan A, Hosal AS: Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue. *J Laryngol Otol* 113:446-50, 1999

Valente G, Orecchia R, Gandolfo S, et al.: Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? *J Clin Pathol* 47:109-12, 1994

Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, et al.: Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* 92 ( Pt 1):123-30, 1989a

Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, et al.: Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92 ( Pt 4):531-40, 1989b

Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, et al.: Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:503-10, 1995

Welkoborsky H-J, Jacob R, Brombacher R, et al.: Molecular Assessment of Metastasizing and Non- Metastasizing Tumors in International Conference of Head and Neck, San Fransisco Californien U.S.A., 2000

Wilson GD, Saunders MI, Dische S, et al.: Direct comparison of bromodeoxyuridine and Ki-67 labelling indices in human tumours. *Cell Prolif* 29:141-52, 1996

Zidar N, Gale N, Cor A, et al.: Expression of Ki-67-Antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *J Laryngol Otol* 110:440-5, 1996

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der Hornkugel eines Plattenepithelkarzinomes der Mundhöhle (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin) .....	8
Abb. 2:	Darstellung von DNA-Kernmitosen durch die Anfärbung mit MIB-1 (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin) Pfeil: proliferierende Tumorzelle.....	20
Abb. 3:	Akkumulation des Proliferationsmarkers MIB-1 um das Chromatin (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin) Pfeil: proliferierende Tumorzelle.....	21
Abb. 4:	Lichtmikroskopische Darstellung der MIB-1-positiven Zellkerne (braun, Pfeil) an der Tumorfront des Plattenepithelkarzinoms (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin).....	27
Abb. 5:	Detailaufnahme der Zählung von MIB-1-positiven/-negativen Zellkernen (ABC-AEC-Methode, Kerngegenfärbung mit Haematoxylin) .....	29
Abb. 6:	Alters- und Geschlechtsverteilung.....	34
Abb. 7:	Hauptlokalisation der Tumormanifestation bei 248 Patienten .....	35
Abb. 8:	Patientenverteilung im Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Plattenepithelkarzinome .....	36
Abb. 9:	Patientenverteilung in Abhängigkeit von der Tumorgrosse cT ....	37
Abb. 10:	Patientenverteilung in Abhängigkeit von der Tumorgrosse pT ....	38
Abb. 11:	präoperativer Lymphknotenbefall cN bei 248 Patienten.....	39
Abb. 12:	postoperativer Lymphknotenbefall pN .....	40
Abb. 13:	Verteilung der Patienten in den klinischen Stadien nach UICC... ..	42
Abb. 14:	Therapiearten.....	43
Abb. 15:	Umfang der lokoregionalen Lymphknotenausräumung.....	44
Abb. 16:	Verteilung der Gesamtzellkernanzahl in fünf Gesichtsfeldern.....	46
Abb. 17:	Verteilung der MIB-1-positiven Zellkerne in fünf Gesichtsfeldern	46
Abb. 18:	Verteilung von MIB-1-positiven Zellkerne pro mm <sup>2</sup> in den fünf Gesichtsfeldern .....	47

Abb. 19:	Verteilung der optischen Dichte (OD) der MIB-1-positiven Zellkerne in den fünf Gesichtsfeldern.....	48
Abb. 20:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad G49	
Abb. 21:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgröße cT ...	50
Abb. 22:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgröße pT ...	51
Abb. 23:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus cN53	
Abb. 24:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus pN54	
Abb. 25:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom klinischen Stadium nach UICC .....	55
Abb. 26:	Gesamtüberlebenszeit der 248 untersuchten Patienten.....	56
Abb. 27:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter der Patienten.....	57
Abb. 28:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall .....	58
Abb. 29:	Todesursache bis zum Abschluss der Nachsorge .....	59
Abb. 30:	Klinischer Nachbeobachtungszeitraum .....	60
Abb. 31:	Überlebenszeit der Patienten nach Auftreten eines Lokalrezidivs	61
Abb. 32:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MIB-1-Färbeindexmedian von 17.4%.....	62
Abb. 33:	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne .....	63

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM-Klassifikation für Lippen-, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome .....	31
---------	---	----

Tab. 2:	Stadieneinteilung der Lippen-, Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinome auf Grundlage der TNM-Klassifikation der UICC .....	31
Tab. 3:	Auftreten von Fernmetastasen .....	41
Tab. 4:	Rezidivverteilung .....	42
Tab. 5:	Verteilung der MIB-1-positiven und -negativen Zellkerne sowie der Gesamtzellkernzahl.....	45
Tab. 6:	Verteilung der optischen Dichte der MIB-1-pos. Zellk. ....	47
Tab. 7:	Differenzierungsgrad G in Abhängigkeit vom relativen Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl .....	49
Tab. 8:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgrosse cT ...	51
Tab. 9:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit von der Tumorgrosse pT ...	52
Tab. 10:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus cN52	
Tab. 11:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus pN54	
Tab. 12:	Relativer Anteil der MIB-1-positiven Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl in Abhängigkeit vom klinischen Stadium nach UICC .....	55
Tab. 13:	Gesamtüberlebenszeit .....	56
Tab. 14:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Alter der Patienten.....	57
Tab. 15:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall .....	58
Tab. 16:	Überlebenszeit nach Eintreten eines Rezidivs .....	60
Tab. 17:	Überlebenszeit in Abhängigkeit vom MIB-1-Färbeindexmedian von 17.4%.....	63
Tab. 18:	Überlebenszeit in Abhängigkeit von der optischen Dichte der MIB-1-positiven Zellkerne .....	64

## 9.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abh.	Abhängigkeit
Bp	Basenpaare
BRDU	Bromedeoxyuridin
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DÖSAK	Deutsch- Österreichisch- Schweizer Arbeitskreis für Tumoren in Kiefer- und Gesichtsbereich
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
k. Lymphknotenausr.	keine Lymphknotenausräumung
Labeling Index/ LI	Färbeindex
LIM	Labeling Index Median
M. omohyoideus	Musculus omohyoideus
ND	Neck-dissection
OD/ Opt. Dichte	optische Dichte
Pos. Zellk.	positive Zellkerne
UICC-Klassifikation	Union Internationale Contre le Cancer



## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Dr. J. Hoffmann, der das Thema dieser Arbeit vorschlug und zur Verfügung gestellt hat. Er stand mir während des Verlaufs der gesamten Arbeit mit seiner Erfahrung und mit seinem Wissen hilfreich und kompetent zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei Adelheid Munz ganz herzlich bedanken für ihre schnelle und unkomplizierte Hilfe und Mühe. Danke für die Unterstützung!

Frau Dr. Barbara Pietsch-Breitfeld danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Mein spezieller Dank geht an meinen Mann und meine Familie, die mich durch jedes Hoch und Tief begleitet haben und mich seelisch unterstützt und mich immer wieder motiviert haben.

## **L e b e n s l a u f**

### **Zur Person**

Sandra Rohleder, geb. Thomas

geboren am 20. November 1977  
in Riesa

verheiratet

deutsch

### **Schulische und berufliche Ausbildung**

1984 – 1986

Grundschule Riesa Gröba

1987 – 1992

Pestalozzi-Oberschule –Riesa

1993 – 1997

Werner-Heisenberg-Gymnasium Riesa

Abschluss: Abitur

### **Hochschulausbildung**

1998 – 2003

Eberhard Karls Universität in Tübingen

17.11.2003

Staatsexamen

Abschluss: Zahnärztin

seit 2004

Tätigkeit als Zahnärztin