

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt - der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Friese

**Prognostische Bedeutung der Expression
von p53, KI67, HER2, Topoisomerase II α ,
nm23 und EGFR sowie Disseminierter
Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM) bei
Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maryam Zerzer

aus Teheran
im Jahre 2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Harald Sommer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Nelson

Priv. Doz. Dr. Florian May

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2008

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Harald L. Sommer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und die Möglichkeit in der immunhistologischen Abteilung der I. Frauenklinik der Ludwig Maximilians Universität diese Arbeit erstellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Schindlbeck, für ausführliche Beratung und hervorragende Betreuung, sowie Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Peer Hantschmann möchte ich für die Beurteilung der immunhistologischen Präparate danken.

Allen Mitarbeitern des immunhistologischen Labors der I. Frauenklinik danke ich für die Hilfe bei der Bereitstellung der Präparate in einer sehr freundlichen Atmosphäre, und vor allem bei Frau C. Kühn, die mit ihrer beispielhaften Fleiß und Engagement mich unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Ovarialkarzinom	5
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Risikofaktoren	6
1.1.3	Klinik	7
1.1.4	Diagnose	8
1.1.5	Histologie und Stadieneinteilung	8
1.1.6	Prognostische Parameter	10
1.1.7	Therapie des Ovarialkarzinoms	11
1.1.7.1	Operative Therapie	11
1.1.7.2	Chemotherapie	12
1.1.7.3	Hormontherapie	12
1.1.7.4	Strahlentherapie	12
1.2	Tumorcharakterisierung / Theorien zur Entstehung des Ovarialkarzinoms	13
1.3	Metastasierung und hämatogene Disseminierung der Tumorzellen	14
1.3.1	Tumorassoziierte Antigene	16
1.3.1.1	MIB-1 (Ki-67)	16
1.3.1.2	p53	17
1.3.1.3	Topoisomerase II α	18
1.3.1.4	HER-2/neu	19
1.3.1.5	nm23	21
1.3.1.6	EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	22
1.4	Zielsetzung	25
2	Methodik und Material	28
2.1	Patientenkollektiv und Follow-up	28
2.2	Das Tumormaterial	29
2.3	Immunhistochemische Untersuchung des Ovarialgewebes	29
2.3.1	Theoretische Grundlagen:	29
2.3.2	Die immunhistochemischen Nachweismethoden	30
2.3.2.1	Direkte Methode	30
2.3.2.2	Indirekte Methode	30
2.3.2.3	Doppelt indirekte Methode	31
2.3.2.4	ABC-Methode	31
2.3.3	Herstellung der histologischen Schnitte	32
2.3.4	Praktische Durchführung der ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Ki-67 (MIB-1), p53, Topoisomerase II sowie HER-2/neu	33
2.3.5	Praktische Durchführung der ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von EGFR und nm23	35
2.3.6	Die Materialien	36
2.4	Knochenmarkaspiration	38
2.5	Aufbereitung des Knochenmarkspirates und Detektion Zytokeratin-positiver Zellen.	38
2.5.1	Herstellung der Zytospins	39
2.5.2	Die immunzytochemische Färbung	40
2.6	Beurteilung immunhistologischer Ovarialkarzinom-Schnitte	42
2.7	Statistik	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Patientencharakteristika	45

3.2	Tumorcharakteristika	45
3.3	Ergebnisse der histologischen Auswertung	47
3.3.1	Histologie	47
3.3.2	Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen	48
3.3.2.1	MIB-1 (Ki-67)	48
3.3.2.2	p53	52
3.3.2.3	Topoisomerase II α	57
3.3.2.4	HER-2/neu	60
3.3.2.5	nm23	63
3.3.2.6	EGFR	66
3.3.3	Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark	68
3.3.4	Korrelationsanalyse	73
3.4	Follow-up Analyse.....	75
3.4.1	Ergebnisse der Rezidiventwicklung (Disease free survival - DFS).....	75
3.4.2	Ergebnisse der Fernmetastasenentwicklung (Distant disease free survival - DDFS).....	76
3.4.3	Ergebnisse der Überlebensanalyse (Overall survival - OS)	77
4	Diskussion.....	80
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis.....	101

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist das gynäkologische Malignom mit der ungünstigsten Prognose und höchsten Letalität (*Wenham et al., 2002*).

Das Ovarialkarzinom steht nach den Karzinomen der Mamma, der Lunge, des Kolons bzw. Rektums und des Uterus an fünfter Stelle der Häufigkeit maligner Tumoren der Frau (*Meden et al., 1996*). Der Anteil der Ovarialkarzinome an allen malignen Tumoren der Frau beträgt 4,5% im Vergleich zu dem häufigsten Tumor, dem Mammakarzinom, mit 25% (*Kaufmann et al., 2002*). Diese Häufigkeit der Neuerkrankungen hat sich in den letzten Jahrzehnten kaum geändert. In einzelnen Entwicklungsländern und ländlichen Regionen Japans beträgt die Inzidenz 2-4/100.000. In Europa existiert ein Nord-Südgefälle mit der größten Häufigkeit in Skandinavien (13,9-15,3/100.000), gefolgt von England, Frankreich, der Schweiz und Deutschland (7,8-13,2/100.000). Die niedrigste Inzidenz in Europa findet sich im Mittelmeerraum (5,4-11,7/100.000) (*Meden et al., 1996*).

Ein Prozent aller weiblichen Todesfälle ist auf das Ovarialkarzinom zurückzuführen. Jährlich versterben 7000 Frauen in Deutschland an einem Ovarialkarzinom (*Kaufmann et al., 2002*).

Die Erkrankung manifestiert sich zumeist zwischen dem 40. und 70. Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter lag im Jahr 1996/97 bei 62,3 Jahren (*Kuhn et al., 2001*).

1.1.2 Risikofaktoren

Ovarialkarzinome treten zu 95% sporadisch auf. (*Kaufmann et al., 2002*).

Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom sind hohes Alter, medikamentöse Ovulationsauslösung und gestörte endokrine Funktionen. Frauen mit Infertilitätsanamnese, Nulliparität, geringer Anzahl an Schwangerschaften und positiver Familienanamnese haben ein höheres Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken (*Kaufmann et al., 2002*).

Bei max. 5-10% der Ovarialkarzinome liegt eine genetische Ursache der Erkrankung zugrunde. Eine genetische Basis für die familiäre Disposition zeigt sich durch Genmutationen auf den Chromosomen 17 (17q21) und 13 (13q12-13). Die Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA 1 (Breast cancer gen 1, Chromosom 17) und BRCA 2 (Chromosom 13) sind mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Mamma- oder Ovarialkarzinom verbunden. Das Risiko für Trägerinnen der BRCA-1-Gendefekte, bis zum 70. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 44% und 17% bei Trägerinnen eines BRCA-2-Gendefekts (*Kaufmann et al., 2002*).

Protektive Faktoren, die das Risiko des Ovarialkarzinoms reduzieren, sind eine hohe Anzahl an Schwangerschaften und die Dauer der Einnahme oraler Kontrazeptiva.

1.1.3 Klinik

Aufgrund der anatomischen Lage der Ovarien und ihrer nur geringen ligamentären Fixierung werden klinische Symptome in der Regel erst bei sehr großen Tumormassen hervorgerufen (*Meden et al., 1996*).

Klinisch gibt es keine spezifischen Symptome des Ovarialkarzinoms, insbesondere nicht innerhalb der Stadien I und II. Wenn sich Symptome manifestieren, liegt meist ein Ovarialkarzinom im Stadium III und IV vor (*Meden et al., 1996*).

Ovarialtumore bereiten selbst bei beträchtlicher Größe oft nur geringe Beschwerden. Initialsymptom ist häufig erst eine Zunahme des Leibesumfangs. Uterine Blutungen treten bei 25% aller Ovarialkarzinome auf, was in etwa zwei Drittel durch hormonelle Stimulation und in einem Drittel durch direkte Tumoreinwirkung (Infiltration, Metastasen) bedingt ist. (*Kaufmann et al., 2002*).

Die häufigste und früheste Form der Ausbreitung von Ovarialkarzinomzellen erfolgt über die Ablösung von Tumorzellen aus der Ovarialoberfläche, die durch Zirkulation der Peritonealflüssigkeit in der Bauchhöhle verteilt werden und sich auf dem Peritoneum implantieren können. (*Kaufmann et al., 2002*). Die Tumorausdehnung in die Lymphbahnen des Diaphragmas führt zu einer Obstruktion der Drainagewege der intraperitonealen Zirkulation und sekundär zu Aszites (*Kaufmann et al., 2002*).

Die lymphatische Ausbreitung in die pelvinen und paraaortokavalen Lymphknoten ist der zweite typische Weg (*Kaufmann et al., 2002*).

Bei frühzeitig diagnostizierten Karzinomen liegt die Lymphknotenmetastasierung in einer Größenordnung von 10-20%. Bei fortgeschrittenen Karzinomen steigt sie auf 60-70% an (*Stauber et al., 2001*).

Die hämatogene Ausbreitung in ferne Organe kann in jedem Tumorstadium auftreten und ist bei bis zu 38% der Patientinnen im Stadium IV nachweisbar (*Dauplat et al., 1987*).

1.1.4 Diagnose

Jeder Adnextumor, der zyklusunabhängig nachweisbar ist, sollte bis zum Beweis des Gegenteils als malignitätsverdächtig angesehen werden. Die Einschätzung der Dignität und der Ausbreitung des Tumors sollte in der Regel bereits präoperativ möglich sein. Hier kommt den apparativen und klinischen Untersuchungen große Bedeutung zu (*Tumormanual, 2001*).

In Ergänzung zur klinischen Untersuchung hat die Sonographie – insbesondere in Form der Vaginalsonographie – als apparative Methode zur Diagnostik des Ovarialkarzinoms innerhalb der letzten Jahre eine besondere Bedeutung erlangt (*Meden et al., 1996*).

Weder die klinischen Symptome noch die Befunde der bildgebenden Verfahren (Sonographie, Computertomographie) erlauben eine zuverlässige Dignitätsbeurteilung (*Kaufmann et al., 2002*). Bei jedem nachgewiesenen Ovarialtumor sollte laparoskopiert oder laparotomiert werden, da die Dignität des Tumors nur durch den operativen Aspekt bzw. die Histologie festgelegt werden kann (*Stauber et al., 2001*).

1.1.5 Histologie und Stadieneinteilung

Embryonal entwickelt sich das Ovar aus der Genitalleiste des verdickten Zölomepithels. Das Zölomepithel hat eine multipotente Differenzierungskapazität und kann sich zu serösem, muzinösem und endometrioidem Epithel entwickeln, was in

der entsprechenden Histologie von Ovarialkarzinomen zum Ausdruck kommt (*Meden et al., 1996*).

Grundlage einer Klassifizierung der Ovarialtumoren nach WHO-Einteilung sind Hinweise auf die Histogenese. Ausgehend von drei Populationen ovarieller Zellelemente unterscheidet man zunächst epitheliale Tumoren (Etwa 90% der Ovarialmalignome), die sich vom Deckepithel des Ovars herleiten. Die zweite Gruppe bilden die Stromatumoren, hier proliferieren spezialisierte Stromazellen (Granulosa-, Theka-, Sertoli- und Leydig-Zellen). Ausgehend von Oozyten bilden sich, als dritte Entität, die Keimzelltumoren (*Feige et al., 2001*).

Die serösen Karzinome stellen mit 75% den größten Anteil epithelialer Ovarialkarzinome dar. An der zweiten Stelle stehen die muzinösen Karzinome mit einem Anteil von etwa 20%. Weitere 2% sind endometrioide Karzinome. Sehr seltene histologische Subtypen epithelialer Ovarialkarzinome (jeweils Inzidenz <1%) sind Klarzell-, Brenner- und undifferenzierte Karzinome (*Kaufmann et al., 2002*).

Die Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms erfolgt nach den Kriterien des FIGO-Systems. Im Stadium FIGO I (entspricht TNM1) ist der Tumor auf ein oder beide Ovarien begrenzt. Im Stadium FIGO II (entspricht TNM2) befällt der Tumor ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus. Im Stadium FIGO III (entspricht TNM3) befällt der Tumor ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen. Im Stadium FIGO IV bestehen Fernmetastasen, ausgenommen Peritonealmetastasen. (*Tumormanual des Tumorzentrums München, 2004*).

Für das Grading von Ovarialkarzinomen mit prognostischer Aussagekraft schlug Silverberg 1998 erstmals gut definierte Kriterien vor, die unabhängig vom histologischen Typ angewendet werden können. In diesem System werden

Parameter wie Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl der Tumorzellen berücksichtigt und in drei Grade eingeteilt: G1 entspricht gut differenzierten, G2 mäßig differenzierten und G3 schlecht differenzierten Zellen.

1.1.6 Prognostische Parameter

Die wichtigsten Prognoseparameter beim Ovarialkarzinom sind Tumorstadium, histologischer Typ, histologischer Differenzierungsgrad und die Größe des Tumorrests am Ende der operativen Primärtherapie (*Meden et al., 1996*).

Innerhalb der Karzinome weisen die serösen gegenüber den muzinösen Tumoren eine höhere Malignität auf, endometrioide und klarzellige Karzinome nehmen eine Mittelstellung ein. Die hochmalignen Keimzelltumoren sind heute oft gut behandelbar (*Thomas et al., 1993*).

Durch zahlreiche Studien konnte aufgezeigt werden, dass nicht allein die oben genannten Parameter für die Prognose der Patientin relevant sind, sondern auch das Alter der Patientin sowie weitere Faktoren, die mit der sogenannten „Tumorbiologie“ assoziiert sind. Parameter, die auf der Proliferationsrate der Tumorzellen basieren, sind der Anteil der Zellen in der S-Phase, der DNS-Gehalt der Tumorzellen (Ploidität) sowie das immunhistochemisch bestimmbare Proliferations-Antigen Ki-67 (MIB1). Der Nachweis des Onkogens Her-2/neu (c-erb B2) oder von Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 sind mit einer erhöhten Proliferationsrate und schlechteren Prognose verknüpft (*Stone et al., 2003*).

Neue Daten aus der Prognoseforschung zum Ovarialkarzinom deuten darauf hin, dass auch beim Ovarialkarzinom bereits frühzeitig eine hämatogene Metastasierung einsetzt. Der positive Tumorzellnachweis im Knochenmark scheint mit einer ungünstigen Prognose einherzugehen (*Tumormanual, 2001*).

Nach heutigen Erkenntnissen ist die am Ende der operativen Primärtherapie verbleibende Tumormasse der wichtigste Prognosefaktor (*Meden et al., 1996*). Patientinnen mit Tumorrest < 2 cm haben speziell eine bessere Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei Patientinnen im Stadium I bei etwa 80%, im Stadium II bei etwa 55% und im Stadium III bei 25% (*Stauber et al., 2001*).

Aufgrund des in der Regel symptomarmen Verlaufs des Ovarialkarzinoms werden etwa 70% der Ovarialkarzinome erst in den fortgeschrittenen Stadien, mit Tumormanifestation außerhalb des kleinen Beckens, diagnostiziert. Dies ist der wesentliche Grund für die niedrige Fünfjahres-Überlebensrate von 20-30% (*Kaufmann et al., 2002*).

1.1.7 Therapie des Ovarialkarzinoms

1.1.7.1 Operative Therapie

Ziel der Operation ist die vollständige Tumorentfernung, denn die möglichst vollständige Entfernung von makroskopisch sichtbarem Tumorgewebe schafft die Voraussetzung für eine bestmögliche Wirkung der Kombinations-Chemotherapie (*Tumormanual, 2004*).

Hysterektomie, beidseitige Adnektomie, infragastrische Omentektomie, sowie pelvine und paraaortale Lymphonodektomie sofern eine R0 - Resektion möglich ist, sind bei gegebener Operabilität obligate Bestandteile der Gesamtoperation (Ausnahme Organerhaltung bei jungen Frauen mit Kinderwunsch).

1.1.7.2 Chemotherapie

Die Ansprechrate und Effektivität der Chemotherapie bei malignen Ovarialtumoren sind im Wesentlichen von drei Faktoren abhängig:

1. Tumorbiologie (Grading und histologischer Tumortyp)
2. Tumorgröße (Durchmesser des größten Tumorrests postoperativ)
3. Art der ersten Chemotherapie und Zeitintervall zwischen erster und zweiter Chemotherapie

1.1.7.3 Hormontherapie

Eine Hormontherapie, z. B. mit Gestagenen, Tamoxifen und GnRH Analoga kommen aufgrund der erreichbaren Remissionsraten (bis 20%) vor allem als Salvage-Therapie nach zytostatischer Vorbehandlung in Betracht. Angesichts des günstigen Nebenwirkungsprofils sind insbesondere Patientinnen mit reduziertem Allgemeinzustand und platinrefraktärem Karzinom geeignet für eine solche Therapie.

1.1.7.4 Strahlentherapie

Die Wirksamkeit adjuvanter Strahlentherapie ist nachgewiesen. 10-Jahres-Rezidivfreiheitsraten von 30-60% bei Patientinnen in den Tumorstadien I-III mit makroskopischem Tumorrest nach Primäroperation können erreicht werden. Dennoch wird die Strahlentherapie im Vergleich zur Chemotherapie nur selten eingesetzt. Das Zielvolumen muss beim Ovarialkarzinom meist das gesamte Abdomen erfassen. Die Nachteile liegen vor allem in der Erschwerung von operativen Folgeeingriffen, bedingt durch Adhäsionen, und strahleninduzierte Gewebsveränderungen. Akute Nebenwirkungen sind Diarrhöe, Nausea und

Meteorismus, Leukopenie und/oder Thrombopenie, Als Spätreaktionen sind besonders revisionsbedürftige Dünndarmkomplikationen (<5%) sowie die Neigung zur chronischen Diarrhöe (10-15%) zu nennen (*Tumormanual, 2004*).

1.2 Tumorcharakterisierung / Theorien zur Entstehung des Ovarialkarzinoms

Um die Frage der Entstehung von Ovarialkarzinomen zu beantworten, sind verschiedene Theorien entwickelt worden. Eine der überzeugendsten dieser Theorien besagt, dass Ovulation die Entstehung genetischer Mutationen im Epithel des Ovars zu Folge hat. Zur Entstehung benötigen beide Formen des Ovarialkarzinoms, die familiäre und auch die sporadische, Akkumulation genetischer Veränderungen. Bei den meisten Tieren mit geringer Ovulationsanzahl, wie Ratten und Mäusen, ist die Inzidenz des epithelialen Ovarialkarzinoms niedrig. Im Gegensatz dazu ist die wiederholte Ovulation bei Menschen und Hühnern mit einer wesentlich höheren Inzidenz des Ovarialkarzinoms vergesellschaftet. Die Tatsache, dass Schwangerschaft und orale Kontrazeptiva eine protektive Wirkung hinsichtlich Entstehung der Ovarialkarzinome besitzen, bestärkt die Theorie, wonach die Ovulation die Hauptursache für die Entwicklung genetischer Schäden an den Ovarien ist. Ein Punkt, der auch diese Ansicht unterstützt, ist die Tatsache, dass zwischen der Anzahl ovulatorischer Zyklen und DNA-Schäden bei Genen wie z.B. Tumorsuppressorgen p53 eine positive Korrelation besteht (*Wenham et al. 2002*).

Wie die wiederholte Ovulation zu diesen Schäden führt, ist noch unklar. Möglicherweise bilden sich während der DNA-Synthese bei Reparatur einer Ovulationswunde Mutationen im Epithel des Ovars. Diese Fehler entstehen normalerweise nicht in den ruhenden, sondern in den proliferierenden Zellen (*Smith*

et al., 2002). Es wird geschätzt, dass während jedes Replikations-Zyklus spontane Fehler, etwa Eins in eine Million Basenpaare entstehen, die sich den DNA-Reparaturmechanismen entziehen und im Genom fixiert werden können (*Wenham et al. 2002*).

Man hat sich darüber geeinigt, dass sechs Veränderungen in der Zellphysiologie die Voraussetzungen für Entwicklung der Malignome sind:

1) Selbständigkeit bei den Wachstumssignalen, 2) Unempfindlichkeit gegen Wachstumshemmende Signale, 3) Befreiung vom programmierten Zelltod, der Apoptose, 4) grenzenloses Replikationspotential, 5) anhaltende Angiogenese, 6) Gewebsinvasion und Metastasierung (*Gabriel et al., 2002*).

1.3 Metastasierung und hämatogene Disseminierung der Tumorzellen

Der Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße ist der erste Schritt zur Metastasierung, die das entscheidende Merkmal maligner Tumoren darstellt. Über die Lymphabflusswege bzw. infiltrierte Blutgefäße gelangen Tumorzellen in die Blutbahn. Dies kann über eine Embolisierung der Endstrombahn oder durch Adhärenz der Tumorzellen an das Endothel geschehen. Die Tumorzellen durchdringen das Endothel mit der endothelialen Basalmembran, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen heran (*Wagener Ch. 1999*). Bei Einbruch von Tumorpartikeln in den venösen Kreislaufschlenkel meist als Lungenmetastase, von der Vena Portae aus meist als Lebermetastase und bei arterieller Ausbreitung ist Befall aller Organe möglich. Bei der lymphogenen Metastasierung gelangt der Tumorpartikel über die Lymphbahnen, bei deren Block

evtl. auch retrograd, in regionale oder entfernte Lymphknoten, eventuell auch mit Überspringen von Stationen (*Roche Lexikon, 1999*). Die Abtrennung der Tumorzellen vom Primärtumor kann entweder passiv geschehen, indem die Tumorzellen sich einfach vom Primärtumor ablösen oder sich aktiv an einer direkten Migration beteiligen (*Condeelis et al. 2003, Wyckoff et al., 2004*). Wenn täglich pro Gramm des Primärtumors bis zu ca. 4×10^6 Zellen in den Kreislaufsystem eindringen, ist die Entstehung der Metastase unabwendbar (*Butler et al., 1975, Wong et al., 2006*).

Die disseminierten Tumorzellen (DTZ), benannt als „minimal residual disease“, sind von Mikrometastasen abzugrenzen. Von einer Mikrometastase spricht man, wenn ein Zellverband eine Größe von 0,2 bis 2 mm erreicht hat (*Wikipedia Enzyklopädie*). Zahlreiche Studien unterstützen die Hypothese, dass die Disseminierung isolierter Tumorzellen ins Knochenmark mit einer höheren Metastasierung und verkürztem Überleben der Patienten korreliert ist (*Coombes et al. 1986, Mansi et al. 1999, Gebauer et al. 2001, Wiedswang et al. 2004, Janni et al. 2005*). Diese hämatogene Disseminierung kann in sehr frühen Stadien stattfinden (*Schmidt et al., 2003, Schardt et al., 2005*) und die DTZ werden im Knochenmark bei 20-40% der Karzinompatienten ohne klinische oder histopathologische Merkmale der Metastasierung nachgewiesen (*Pantel et al., 2005*). Nicht aus jeder disseminierten Tumorzelle entsteht eine Metastase. Diese isolierten Tumorzellen befinden sich als Einzel- oder Zweizellen bis hin zu Zellclustern (Abbildung 3) in einem inaktiven Zustand, der G₀-Phase des Zellzyklus. Dennoch reifen einige zu Metastasen heran und beeinflussen damit deutlich die Prognose für das Überleben des Patienten (*Wikipedia Enzyklopädie*). Das Gewebe des Knochenmarks bietet den Tumorzellen eventuell die Überlebenschancen und/oder die Zellen disseminieren später in ein anderes Organ (*Pantel et al., 2004*).

1.3.1 Tumorassoziierte Antigene

1.3.1.1 MIB-1 (Ki-67)

In der Fachliteratur hat sich der MIB-1 Antikörper mittlerweile als monoklonaler Referenz-Mausantikörper zum Nachweis von Ki-67 Antigen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben sowohl in normalen als auch in neoplastischen Zellen etabliert (*Firma Dako, Spec. Sheet, 2000*).

Der monoklonale MIB-1 Antikörper reagiert mit dem Ki-67 Antigen. Das Ki-67 ist ein nukleares Protein, das beim Immunoblot zwei Banden (345 und 395 kDa Molekulargewicht) aufweist und durch seine Reaktionsfähigkeit mit monoklonalen Antikörpern vom Ki-67-Klon charakterisiert wird. Die komplette Primärstruktur des Proteins wurde durch Klonen und Sequenzierung der vollständigen cDNA bestimmt. Exprimiert wird das Ki-67-Antigen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phasen), in ruhenden Zellen (G0-Phase) tritt es jedoch nicht auf. Während der Interphase lässt sich das Antigen ausschließlich innerhalb des Zellkerns nachweisen, während bei der Mitose der Großteil des Proteins zur Oberfläche der Chromosomen transportiert wird. Das Antigen wird rasch abgebaut, wenn die Zelle in die nicht-proliferative Phase eintritt. Während der DNA-Reparaturprozesse scheint keine Ki-67-Expression stattzufinden.

Der MIB-1 Antikörper erkennt natives Ki-67-Antigen und rekombinante Fragmente des Ki-67-Moleküls (*Firma Dako, Spec. Sheet, 2000*).

Das Ki-67-Antigen ist ein Proliferationsmarker. Damit ermöglicht der gegen Ki-67-Antigen verwendete Antikörper MIB-1 das Monitoring der proliferativen Fraktion der normalen und neoplastischen Zellen (*Firma Dako, Spec. Sheet, 2000*).

1.3.1.2 p53

p53 ist ein Tumorsuppressorgen, lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 17, das für ein nukleares Phosphoprotein mit 53 Kilodalton Molekulargewicht kodiert (*Lee et al., 2003*). Dieses nukleare Phosphoprotein funktioniert wie ein Transkriptionsregulator. Sein Produkt, das p53-Protein, kontrolliert den Zellzyklus und verhindert damit die Mutationen anderer Gene wie bei der Karzinogenese. Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein kritisches Protein und stellt selbst das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Karzinomen dar. Durch Mutation verändert sich die Tumorsuppressoraktivität des p53-Gens und der Tumor kann sich weiter entwickeln (*Lee et al., 2003*). Das mutierte p53-Protein ist biologisch stabiler und besitzt damit eine längere Halbwertszeit als der Wildtyp. Diese Eigenschaft erlaubt den Nachweis des Proteins durch immunhistochemische Verfahren (*Lee et al., 2003*).

Das nukleare p53-Phosphoprotein aktiviert normalerweise als Reaktion auf bestimmte Formen der DNA-Schädigung den G1 Zellzyklusarrest, bevor die S-Phase beginnt. Auf diesem Weg verlängert p53 die verfügbare Zeit zur DNA-Reparatur und dient als „Hüter des Genoms“ in der Zelle. p53 kann auch die Apoptose als Antwort auf die Zellschädigung in Gang setzen (*Chen et al., 2003*).

Wegen der kurzen Halbwertszeit des p53-Proteins, die abhängig ist vom Zellzyklus, in dem sich das Protein befindet (zwischen 5-40 Minuten), und dem schnellen Abbau des Proteins, ist der Wildtyp p53 konstitutionell in niedrigen Mengen exprimiert. Das Protein kann jedoch infolge von verschiedenen Stressfaktoren akkumulieren, wie DNA-Schädigung, Hypoxie, Verlust der normalen Wachstums- und Überlebenssignale, Übersäuerung und entzündlichen Prozessen, die in verschiedenen physiologischen oder auch pathologischen Situationen wie bei der

Tumorgenese vorkommen. Wenn seine intrazelluläre Konzentration zunimmt, kommt der Zellzyklus in der G1- oder seltener in der G2/M-Phase zum Stillstand. Dieser Zeitgewinn erlaubt der Zelle, die Schädigung zu reparieren. Ist die Reparatur nicht mehr möglich, tritt die Apoptose ein (*Bazan et al., 2002*).

Beim Ovarialkarzinom ist auf molekularer Ebene die Veränderung des p53 Tumorsuppressorgens das am häufigsten auftretende Ereignis.

1.3.1.3 Topoisomerase II α

Mitte der 80er Jahre wurde das nukleare Enzym Topoisomerase I identifiziert. Inzwischen sind vier Topoisomerasen I, II, III und IV bekannt, die unterschiedliche Funktionen aufweisen (*Verweij et al., 1996*). DNA-Moleküle können sich spiralisieren und im Raum krümmen, was zu Veränderungen ihrer Topologie führt. Dazu gehört auch die Bildung von Superhelix-Windungen (*Lodisch et al., 2001*). Topoisomerase ist ein nukleares Enzym, das die Topologie von DNA-Molekülen verändert (*Verweij et al., 1996*). Die Enzyme, die die Topologie der DNA regulieren, sind bei verschiedenen Schritten der DNA-Replikation aktiv. Topoisomerase entfernt Superhelix-Windungen, ohne dass im DNA-Molekül Einzelstrangbrüche zurückbleiben. Nachdem sich das Enzym an die DNA gebunden und einen der beiden Stränge durchtrennt hat, wird das freie 5'-Phosphatende der DNA über einen Tyrosinrest kovalent mit dem Enzym verknüpft. Das freie 3'-Hydroxylende der DNA hält das Enzym nichtkovalent gebunden. Der nicht geschnittene DNA-Strang wird dann durch den Einzelstrangbruch gezogen und der geschnittene Strang verknüpft sich wieder, so dass eine Struktur mit denselben chemischen Bindungen wie vor der Reaktion entsteht, wobei jedoch in der DNA nun eine Superhelix-Windung weniger vorhanden ist. Durch diesen Mechanismus entfernt das Enzym eine Superhelix-

Windung pro Zyklus (*Lodisch et al., 2001*). Jedes Enzym, das nur einen Strang in einem DNA-Doppelhelix-Strang schneidet und dann wieder verknüpft, bezeichnet man als Topoisomerase I. Sie kann nacheinander alle Superhelix-Windungen aus einem DNA-Molekül entfernen (*Lodisch et al., 2001*).

Topoisomerase II hat zwei Isoenzyme, Topoisomerase IIa und Topoisomerase IIb. Topoisomerase IIa mit 170 Kilodalton Molekulargewicht wird von einem Gen kodiert, das auf Chromosom 17 und nah am erbB-2-Gen lokalisiert ist. Sie bildet temporäre Doppelstrangbrüche in DNA und ermöglicht damit die Passage der DNA-Doppel-Segmente durch diese Brüche. Veränderte Expression der Topoisomerase II wurde bei vielen Krebserkrankungen inklusive AML, CLL, kleinzelligem Bronchialkarzinom, Kolon-, Mamma- und Ovarialkarzinom beobachtet (*Oncogen Research Products, Spec. Sheet, 2000*).

Hemmstoffe der Topoisomerase II in Krebszellen führen zu Brüchen im DNA-Strang und leiten den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein. Diese Eigenschaft hat dazu geführt, dass Topoisomerase I und II zum Ziel bei Entwicklung vieler antineoplastischer Medikamente geworden sind (*Oncogen Research Products, Spec. Sheet, 2000*).

1.3.1.4 HER-2/neu

HER-2/neu bzw. erbB-2 gehört zu der Familie der Onkogene. Die Amplifikation des HER-2/neu Onkogens wurde zum ersten Mal von King et al. bei Mammakarzinom identifiziert. Das HER-2/neu Proto-Onkogen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und kodiert ein Glykoprotein mit 185 Kilodalton Molekulargewicht. Dieses Glykoprotein p185 ist ein Transmembranrezeptor, der eine Sequenzähnlichkeit mit dem Epidermal Growth Faktor Rezeptor (EGFR) aufweist

und eine Rezeptorfunktion für Wachstumsfaktoren besitzt (*Meden, Kuhn, 1997*). Von der Familie der EGFR wurden bisher vier Mitglieder gekennzeichnet. Der EGFR (erbB-1), HER-2/neu (erbB-2), HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4). Alle Rezeptorproteine dieser Familie verfügen über eine ähnliche Struktur, bestehend aus einer extrazellulären Domäne mit der Ligand-bindenden Seite, einer hydrophoben Transmembran-Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil mit Tyrosinkinase-Aktivität. Der Mechanismus der transmembranären Signalübertragung ist für alle Mitglieder der Familie identisch. Das Binden des entsprechenden Liganden an den Rezeptor führt zu seiner Dimerisierung und dadurch lassen sich die angrenzenden intrazellulären Abschnitte jeweils gegenseitig durch die charakterisierten Tyrosinreste transphosphorylieren. Diese Tyrosinreste dienen als reversible Andockungsstellen für eine große Anzahl von zytoplasmatischen Signalmolekülen. Die Signalmoleküle, die selbst Enzyme oder Adaptoren der multimolekularen Komplexe sind, werden durch Phosphorylierung oder Anlagerung an der Plasmamembran aktiviert (*Gabriel et al., 2000*). Die onkogene Wirkung des HER-2/neu kann durch Genamplifikation oder eine Punktmutation provoziert werden (*Gabriel et al., 2000*). Mit dem Auftreten einer HER-2/neu-Genamplifikation wird das Gen vermehrt kopiert und das hat meist eine Überexpression der HER-2/neu-mRNA und des HER-2/neu-Rezeptors zur Folge, was zur vermehrten Proliferationsrate der Zelle führt (*Borg et al., 1991*). Die Überexpression des HER-2/neu-Onkogens beim Ovarialkarzinom kann durch immunhistochemische Färbung seines Produkts, des Proteins p185 detektiert werden. Diese Überexpression charakterisiert eine Gruppe mit ungünstiger Tumorbilologie und schlechter Prognose (*Meden et al., 1997, Rosenblum et al., 1999*).

Der HER-2/neu-Rezeptor wurde als Angriffspunkt für die Therapie des Mammakarzinoms benutzt. Trastuzumab ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, der an den HER2- Rezeptor bindet (*Gabriel et al., 2000*).

1.3.1.5 nm23

Von den 23 Genen, die in nichtmetastasierenden Tumoren (nonmetastatic tumors) exprimiert sind, ist nm23 am häufigsten aufgetreten (*Bei et al., 1998*).

Das nm23 Gen wurde zum ersten Mal 1988 von Steeg et al. durch differenzierende Koloniehybridisierung (differential colony hybridization) von cDNAs isoliert, die aus Mäuse-Melanomzelllinien K-1735 mit hohem und niedrigem Malignitätspotential stammen. Das nm23 Gen ist auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert (*Varesco et al., 1992*). Das Maus-nm23 sowie die zwei humanen Gene nm23-H1 und nm23-H2 kodieren Proteine mit 17 Kilodalton Molekulargewicht, die zu 90% identische Aminosäuresequenz und eine unspezifische Nucleosid-Diphosphat-Kinase-Aktivität besitzen (*MacDonald et al., 1993*). Heute sind noch weitere homologe humane Gene, DR-nm23, nm23-H4 und nm23-H5 bekannt (*Bazan et al., 2002*).

nm23 ist ein Metastasierungssuppressorgen. Es kodiert die Untereinheit A der Nucleosid-Diphosphat-Kinase (NDPK), die in der Synthese von Nucleosid-Triphosphat, nicht vermittelt von ATP, beteiligt ist (*Bazan et al., 2002*). NDPK aktiviert den G-Protein-Pathway. Das G-Protein ist in der Signalübertragung vieler Wachstumsfaktoren und Hormone involviert. Es wurde beobachtet, dass die Expression von nm23 auf der mRNA- oder Proteinebene umgekehrt korreliert ist mit dem Stadium und Differenzierungsgrad bei Mammakarzinom (*Bei et al., 1998*). Bei den Tumoren im späteren Stadium mit schlechtem Differenzierungsgrad wurde nm23 mit niedrigerer Expression beobachtet. Gleichzeitig war die Rezidivrate höher und

das Überleben der Patientinnen kürzer (*Bei et al., 1998*). Bei vielen Neoplasien, wie Mamma-, Ovarial-, Zervix- sowie Hepatozellularkarzinomen, wurde niedrige Expression von nm23 im Zusammenhang mit höherem Metastasierungspotential sowie kürzerer Überlebensdauer der Patienten beobachtet (*Bazan et al., 2002*).

Trotz vieler Publikationen, die zur Rolle von nm23 bei der Zellproliferation, Differenzierung, Tumorentwicklung und Metastasierung veröffentlicht wurden, ist der molekulare Mechanismus, durch den nm23 seine Funktion ausübt, noch unklar (*Roymans et al., 2001*).

Zu der Frage der antimetastasierenden Wirkungsweise des nm23 schlagen Charpin et al. 1997 vor, dass dieses Gen eventuell in der Interaktion zwischen den Karzinomzellen und Tumorstroma beteiligt ist, so dass es einerseits die Synthese der Proteasen, die für die Tumorzellprogression durch die Extrazellulärmatrix notwendig ist blockiert, andererseits reduziert es die Promotorfaktoren der Stromalangiogenese.

1.3.1.6 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Der Epidermal Growth Factor Receptor, auch benannt als HER1 oder c-erbB1, ist ein 170 Kilodalton großes, transmembranäres Glykoprotein, dessen Gen auf Chromosom 7q21 lokalisiert ist. Dieser Rezeptor gehört zu der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Er besteht aus einer extrazellulären Domäne, an die EGF (Epithelial Growth Factor) bindet, einer lipophilen transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Protein-Tyrosin-Kinase Domäne mit Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität (*Cadena et al., 1992*). Die EGF-Rezeptor-Familie besteht aus vier Mitgliedern: Der erbB1 (EGFR), erbB2 (HER-2/neu), erbB3 (HER-3) und erbB4 (HER-4) (*Baselga et al., 2002*). Die Mitglieder der EGFR-Familie befinden sich sowohl in allen Epithelien, als auch in zahlreichen benignen und malignen

epithelialen Tumoren, aber auch in vielen Zellen mesenchymalen Ursprungs. Bei einem Drittel der epithelialen Karzinome, wie kleinzellige Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren, Mamma-, Magen-, Prostata-, Ovarial- und Kolorektalkarzinom, sowie Glioblastom ist die Überexpression der EGFR zu beobachten. Die Aktivierung des Rezeptors ist in Folge der Bindung des Liganden, wie EGF, an der extrazellulären Domäne des Rezeptors möglich. Der Rezeptor befindet sich auf der Basalschicht des Epithels (*Firma Dako, Spec. Sheet*).

Über diesen Rezeptor werden Wachstumssignale von der Zelloberfläche in den Nucleus übertragen (EGFR-vermittelte Signaltransduktion). Nach Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle des EGF-Rezeptors dimerisiert der Rezeptor normalerweise mit einem zweiten EGF-Rezeptor. Dadurch wird die intrazelluläre Tyrosin-Kinase aktiviert. Durch Bindung von ATP an das katalytische Zentrum des Enzyms kommt es zunächst zur Autophosphorylierung des Rezeptors und nachfolgend zur Phosphorylierung zytoplasmatischer Substrate, die Teil einer Signaltransduktionskaskade sind. Wenn das Wachstumssignal den Zellkern erreicht, wird hier das Signal zur Mitose ausgelöst (*Raymond et al., 2000*).

Mutationen in dem für EGFR kodierenden Gen können die Aktivität der Rezeptor-Tyrosin-Kinase über unterschiedliche Mechanismen erhöhen und damit die EGFR-vermittelte Signaltransduktion verstärken. Diese Mechanismen sind:

- Die Überexpression von EGFR infolge von Genamplifikation und/oder vermehrter Transkription.
- Die Dimerisation zwischen EGFR und anderen verwandten Wachstumsfaktor-Rezeptoren, also HER-2, HER-3 oder HER-4 (Heterodimerisation). Diese Heterodimeren verstärken die intrazelluläre Signaltransduktion auch dann, wenn der EGF-Rezeptor normal exprimiert wird (*Raymond et al., 2000*).

Die verstärkte EGFR-vermittelte Signaltransduktion stimuliert die Zellproliferation. Dadurch verschiebt sich das zwischen Proliferation auf der einen Seite und Apoptose auf der anderen Seite bestehende Gleichgewicht in Richtung eines unkontrollierten Zellwachstums (Tumorgenese). Dies verstärkt indirekt die Gefäßneubildung (Angiogenese) und Metastasierung der Tumoren (*Raymond et al., 2000*).

1.4 Zielsetzung

Als primär lokoregionäre Erkrankung wird die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom überwiegend durch das Tumorstadium bei Primärdiagnose sowie die operative Primärtherapie bestimmt. Dennoch gibt es unterschiedliche Verläufe innerhalb identischer Prognosegruppen. Ein Teil der Patientinnen erleidet im Verlauf eine Fernmetastasierung, überwiegend der Leber, Pleura oder Lunge. Obduktionsbefunde demonstrieren eine wesentlich höhere Rate klinisch okkulten Fernmetastasen. Neben einer lymphogenen Streuung scheint auch eine hämatogene Tumorzell dissemination, ähnlich wie bei anderen Tumorentitäten, das Risiko einer Metastasierung bei Ovarialkarzinom zu erhöhen.

Das Labor für Tumorummunologie an der I. Frauenklinik der Universität München führt seit mehr als 10 Jahren Untersuchungen zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Patientinnen mit Brustkrebs, aber auch gynäkologischen Tumorentitäten durch. Bisher wurden über 3000 Knochenmarksuntersuchungen durchgeführt. Beim Mammakarzinom zeigte sich die Präsenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger Prognosefaktor für das Rezidiv freie, Metastasen freie und Gesamtüberleben in allen Stadien der Erkrankung (*Braun et al 2000b*). Diese Ergebnisse ließen sich kürzlich in einer „Pooled Analysis“ von 9 Zentren mit 4703 Patientinnen bestätigen (*Braun et al 2005*). Weitere Arbeiten zeigten die Unabhängigkeit dieses Tumorzellnachweises von etablierten Prognosefaktoren (*Schindlbeck et al 2005b*) und bestätigten die prognostische Relevanz (*Schindlbeck et al 2004*). Eine Detektion hämatogen gestreuter Tumorzellen besitzt jedoch nicht nur Bedeutung bei Primärdiagnose, sondern auch bei Persistenz nach Chemotherapie (*Braun et al 2000a*) bzw. im Follow up der Patienten (*Janni et al 2005*).

Wenn auch noch gewisse Unsicherheit bezüglich der verwendeten Methoden herrscht, so ist doch die immunzytochemische Untersuchung des Knochenmarkes das am weitesten verbreitete Verfahren. Neben anderen Faktoren wird Zytokeratin als wesentlicher Bestandteil des Zytoskelettes epithelialer Zellen am häufigsten zur Detektion dieser Zellen in mesenchymalen Organen wie dem Knochenmark, welches unter normalen Bedingungen keine epithelialen Zellen aufweist, eingesetzt. Im Falle einer Präsenz dieser Zellen wird somit eine Abstammung von epithelialen Tumoren angenommen. Genetische Untersuchungen bestätigen das maligne Potential dieser Disseminierten Tumorzellen, welche allerdings eine erhebliche Heterogenität aufweisen können.

Auch beim Ovarialkarzinom ließ sich zeigen, dass die Präsenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose mit einem erhöhten Risiko der Fernmetastasierung und Tumor bedingten Tod assoziiert ist (*Braun et al 2001*)

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Expression der tumorbiologischen Faktoren KI67 (MIB-1), p53, Topoisomerase II α , HER-2/neu, nm23 und EGFR im Tumorgewebe von Ovarialkarzinompatientinnen immunhistologisch zu ermitteln. Im Rahmen der Primäroperation war bereits das Knochenmark dieser Patientinnen auf hämatogen disseminierte Tumorzellen untersucht worden. Die Bestimmung der Korrelation zwischen diesen Faktoren und der Präsenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark soll eine prognostische Einschätzung der Aggressivität und des Metastasierungspotentials des Primärtumors ermöglichen. Es wurde die Korrelation zwischen diesen Faktoren mit der Rezidiventwicklung, Fernmetastasierung, und dem Gesamtüberleben untersucht.

Basierend auf der prognostischen Relevanz und dem prädiktiven Wert einzelner Faktoren könnten Entscheidungen für eine individuelle und zielgerichtete Therapie getroffen werden.

2 Methodik und Material

2.1 Patientenkollektiv und Follow-up

Das Patientinnenkollektiv umfasst 90 Frauen, die im Zeitraum 1991 - 2001 wegen eines Ovarialkarzinoms in der I. Universitätsfrauenklinik einer Operation unterzogen wurden. Als Standardtherapie erfolgte eine bilaterale Adnektomie, Hysterektomie, Omentektomie sowie Lymphonodektomie. Mit der Chemotherapie wurden insgesamt 67 (75%) Patientinnen behandelt, 52 (58%) mit der Kombination aus Carboplatin/Endoxan, 8 (9%) mit Carboplatin/Paclitaxel, 7 (8%) mit anderen Chemotherapeutika und 23 (25%) Patientinnen bekamen keine Chemotherapie. Die klinischen und allgemeinen Patientendaten wurden aus der Knochenmark-Datenbank übernommen. Unter anderem wurden folgende Informationen erfasst: Diagnose, Alter bei der Erstdiagnose, Menopausenstatus, Parität, Primäroperation, Histologie, Stadium, Lymphknotenbefall, Knochenmarkbefall, Rezidive, Fernmetastasen, Hämangiosis carcinomatosa, Lymphangiosis carcinomatosa, Aszites, Peritonealkarzinose und systemische Therapie.

Endpunkte für das rezidivfreie Überleben waren das Auftreten der Lokalrezidive, Fernmetastasen oder der Tod in Folge des Ovarialkarzinoms.

Das Follow-up erfolgte bis zum Tode oder bis zum Endpunkt im Mai 2003 über die Nachsorgeuntersuchungstermine in der I. UFK. Diese Daten wurden aus den Krankenjournalen entnommen. Von Patientinnen, die nicht mehr zur Nachsorgeuntersuchungen in der I. UFK erschienen, wurden Daten über Rezidive, Fernmetastasen und Überleben durch telefonischen Kontakt mit den Hausärzten oder den Patientinnen selbst gewonnen.

2.2 Das Tumormaterial

Das Tumormaterial bestand aus Gewebeblöcken, die in den Jahren 1991 bis 2001 im Rahmen der Primäroperation von den Patientinnen gewonnen, für die histologische Untersuchung formalinfixiert und paraffineingebettet und anschließend archiviert wurden. Zu der immunhistochemischen Bestimmung der Tumorantigene MIB-1 (Ki-67), p53, Topoisomerase, HER-2/neu, nm23 und EGFR wurden die archivierten Gewebeblöcke erneut aufgearbeitet.

2.3 Immunhistochemische Untersuchung des Ovarialgewebes

2.3.1 Theoretische Grundlagen:

Grundsätzlich ist ein Proteinnachweis im Tumorgewebe mit verschiedenen Analysemethoden, wie z.B. ELISA (enzym-linked immunosorbent assay), RIA (Radioimmunoassay) oder immunhistochemischen Verfahren möglich. In der vorliegenden Studie wurde das immunhistochemische Färbeverfahren zur Charakterisierung der Tumorzellen im Ovarialgewebe und zum Nachweis der Tumorzellen im Knochenmark verwendet. Der Vorteil dieses Verfahrens ist im Gegensatz zu den ELISA- und RIA-Analysemethoden die spezifische Lokalisation der Tumorproteine, die durch Einsatz der monoklonalen Antikörper gegen diese Proteine ermöglicht wird.

2.3.2 Die immunhistochemischen Nachweismethoden

2.3.2.1 Direkte Methode

Der spezifische Antikörper ist direkt mit einem Fluorochrom oder einem Markerenzym, z.B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, konjugiert.

Vorteil dieser Methode ist die kurze Bearbeitungszeit. Sie besitzt jedoch mehrere Nachteile. Für jedes nachzuweisende Antigen muss ein spezifisches Konjugat zur Verfügung stehen. Das erzielte Farbsignal ist sehr schwach. Es ist keine längere Archivierung bei Fluorochromen möglich, da das Signal durch Lichteinwirkung verblasst. Der Primärantikörper muss speziell konjugiert werden, was aufwendig und teuer ist. Um zu einer guten Markierung zu gelangen, müssen die Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Dieses Vorgehen verursacht zum einen meist starke Hintergrundfärbung, und zum anderen ist es sehr teuer (*Noll et al., 2000*).

2.3.2.2 Indirekte Methode

Bei dieser Methode bindet ebenfalls ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen der Probe. Im nächsten Schritt gibt man einen so genannten Sekundärantikörper zu einem bereits gebundenen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und ist mit einem Markerenzym oder Fluorochrom konjugiert. Bei Nachweismethoden mit einem Markerenzym benötigt man einen gegen den Sekundärantikörper gerichteten Komplex, welcher das gewünschte Markerenzym trägt. Bei einer anschließenden Enzym-Substrat-Reaktion erhält man ein farbiges Endprodukt.

Vorteil dieser Methode gegenüber der direkten Methode ist die höhere Sensitivität (Noll et al., 2000).

2.3.2.3 Doppelt indirekte Methode

Bei dieser Methode wird ein weiterer gleichartig konjugierter Tertiärantikörper eingesetzt, um z.B. das Farbsignal bei Nachweisen mit Fluorochromen zu verstärken. Zu dieser Methode zählen PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase) und APAP (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) (Noll et al., 2000).

2.3.2.4 ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) macht sich die Affinität von Avidin, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Tetramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin (ein wasserlösliches Vitamin) zunutze, welches sich gut an den Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies (z.B. Maus, Kaninchen usw.) koppeln lässt und somit die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. An den Komplex ist ein Enzym gekoppelt, wobei es sich sowohl um Peroxidase als auch um alkalische Phosphatase handeln kann. Der immunologische Nachweis mit dieser Methode ist sehr sensitiv (Noll et al., 2000).

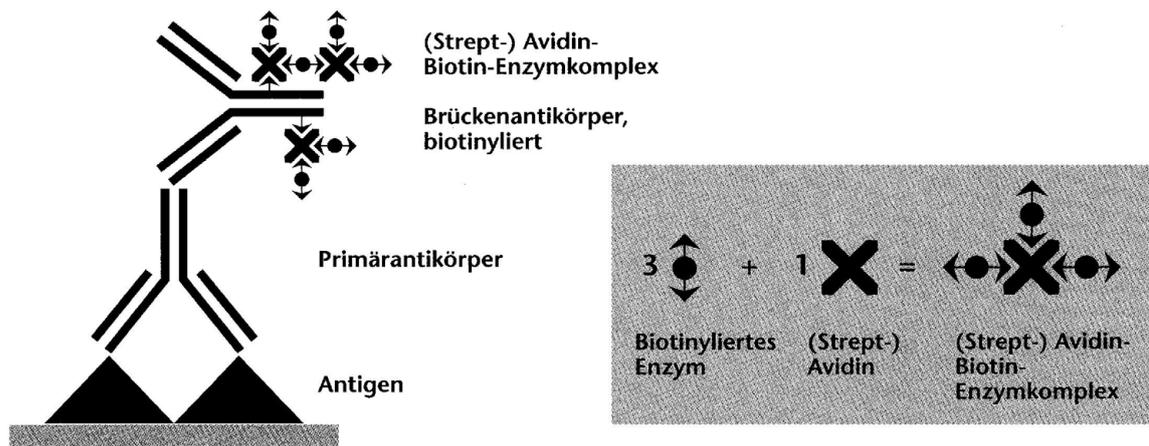


Abbildung 1 – Schema der ABC-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex (Noll, Schaub-Kuhnen, *Praxis der Immunhistochemie*, 2000)

2.3.3 Herstellung der histologischen Schnitte

Ausgangspunkt zur Herstellung der Schnitte sind formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebelöcke eines Ovarialkarzinoms.

Das Operationsmaterial wird sofort in 4%ig gepuffertem Formalin 24 Stunden lang fixiert um eine Zerstörung der Proteine (Antigene) zu verhindern, und danach in Paraffin eingebettet. Dadurch kann man die Gewebelöcke ohne Verlust ihrer Antigenstruktur über Jahre aufbewahren. Für die immunhistochemische Färbung wird anhand der H&E-Schnitte der geeignetste Block für jeden Fall ausgesucht. An einem Schlittenmikrotom werden 2-3 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken gewonnen, auf Superfrost-plus Objektträger (Firma Menzel-Gläser) aufgezogen und über Nacht bei 56 °C getrocknet, um ein gutes Anhaften der Präparate zu gewährleisten.

2.3.4 Praktische Durchführung der ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Ki-67 (MIB-1), p53, Topoisomerase II sowie HER-2/neu

Das Protokoll besteht aus folgenden Schritten:

1.	2-3 µm dicke Gewebeschnitte erstellen und auf Objektträger (OT) aufziehen
2.	<p>Entparaffinisieren der Objektträger in Xylol (10 min) Danach werden die OT in der folgenden Reihe in verschiedenen Medien von Xylol und absteigender Alkoholreihe bis Aqua dest. kurzfristig eingetaucht. Dadurch werden die OT schrittweise von einem fettlöslichen Medium (Xylol) zu einem wasserlöslichen Medium (Aqua dest.) überführt (rehydriert).</p> <p>1 x Xylol 2 x Ethanol 100%ig 2 x Ethanol 96%ig 2 x Ethanol 70%ig 1 x Aqua dest.</p>
3.	<p>Hitzedemaskierung im Dampfdruckkochtopf zum Aufheben der durch Formalin-Fixierung entstandenen Proteinvernetzung in einer kalzium-präzipitierenden Lösung. So kann der Antikörper sein spezifisches Epitop wieder erkennen.</p> <p>In einen handelsüblichen Schnellkochtopf werden die Lösungen A und B in Aqua dest. eingefüllt und die Kochplatte auf die höchste Stufe eingestellt. Wenn der Puffer sprudelnd kocht, werden die OT hineingestellt. Nach 3 Minuten wird die Temperatur auf die mittlere Stufe eingestellt. Nach weiteren 2 Minuten werden die OT aus dem Kochtopf herausgenommen.</p> <p>Lösung A: 0,1M Zitronensäure 21,01g (Merck #244) auf 1 l Aqua dest. Lösung B: 0,1M Na-Citrat 29,41g (Merck #6448) auf 1 l Aqua dest. Puffer: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B + 900ml Aqua dest.</p>
4.	Öffnen des Deckels unter langsam fließendem Leitungswasser
5.	Im Aqua dest. abkühlen (2x10 min)
6.	Waschen im PBS-Puffer (Waschpuffer für Methoden mit Peroxidase, pH 7,2) (2x2min)
7.	Blockierung endogener Peroxidase in 6%igen H ₂ O ₂ , um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden (100ml 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung + 400ml Aqua dest.) (10 min)
8.	Waschen im PBS-Puffer (2x2 min)

9.	Inkubation mit Blockierungsserum von Vectastain Maus-IgG-Kit (Firma DAKO, Dänemark) in der feuchten Kammer (20 min)
10.	Abschütteln der Lösung
11.	Inkubation mit Primärantikörper in der feuchten Kammer für die verschiedenen Färbungen mit jeweils entsprechendem Antikörper MIB-1 monoklonal IgG1 Maus Anti-Human Ki-67 Antigen, Verdünnung 1:50 mit PBS, 30 min bei Raumtemperatur (Rt) P53 monoklonal IgG2 Maus Anti-Human Antigen, Verdünnung 1:100 mit PBS, 45 min bei Rt. Topoisomerase II monoklonal IgG1k Maus Anti-Human Antigen, Verdünnung 1:50 mit PBS, 45 min bei Rt. HER-2/neu IgG1 Maus Klon:CB11, Verdünnung 1:40 mit PBS, 30 min bei Rt.
12.	Waschen im PBS-Puffer (2x2 min)
13.	Inkubation mit Sekundärantikörper in der feuchten Kammer (30 min)
14.	Waschen im PBS-Puffer (2x2 min)
15.	Inkubation mit ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Complex) in der feuchten Kammer (30 min)
16.	Waschen im PBS-Puffer (2x2 min)
17.	Substratfärbung mit DAB (Diaminobenzidin) (8 min)
18.	Waschen im Aqua dest. (2x2min)
19.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin (5min)
20.	Wässern in Leitungswasser (10min)
21.	Aufsteigende Alkoholreihe (umgekehrte Konzentrationsreihenfolge wie im Schritt 2), anschließend Xylol (10min)
22.	Eindeckeln mit Eukitt

Tabelle 1 – Protokollschritte zur immunhistochemischen Färbung des Ovarialgewebes

2.3.5 Praktische Durchführung der ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von EGFR und nm23

Beim immunhistochemischen Nachweis des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) wird der erste und zweite Schritt wie im oben aufgeführten Protokoll durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht im dritten Schritt, währenddessen keine hitzeinduzierte sondern eine enzymatische Vorbehandlung der Objektträger zur Demaskierung der Antigene notwendig wird.

Die antigendemaskierende enzymatische Lösung, die Pronase (Protease gewonnen aus *Streptomyces griseus*), gelagert bei -20 °C, wird aus dem Gefrierfach herausgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. In jedem Eppendorfbehälter befindet sich 0,1 ml Pronase, die mit 1,9 ml TBS-Puffer (pH 7,6) in einem Röhrchen gemischt und gut geschüttelt wird.

Die OT werden 15 Minuten mit der Lösung bei der Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Danach werden die OT 2x 2 Minuten mit Aqua dest. gespült.

Ab Schritt 6 wird wie im Protokoll weiter verfahren.

Der Primärantikörper ist ein monoklonaler IgG1-Mouse Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor Antikörper, Verdünnung 1:100 mit PBS, Inkubationszeit: 45 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

Bei dem immunhistologischen Nachweis der nm23 wird ebenfalls eine enzymatische Lösung, die Trypsin-Lösung zur Demaskierung der nachzuweisenden Antigene verwendet. Die OT werden 15 Minuten mit 0,1%ig Trypsin-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, monoklonaler IgG₁-Maus-Antikörper Verdünnung: 1:30 mit PBS, erfolgt in der feuchten Kammer für 23 Stunden bei 4 °C.

Die folgende Tabelle stellt die Eigenschaften und Färbeverfahren der verwendeten Antikörper dar.

Faktor	Reagenz	Antikörper	Firma	Verdün.	Inkub.-zeit	Inkub.-temp.	Cutoff
MIB-1	Maus IgG1	Ki 67, Klon MIB-1	Dako	1:50	30 Min	RT	>50%
P53	Maus IgGg2	P53, Klon DO-1	Oncogene	1:100	45 Min	RT	>50%
Topo	Maus IgG1	Klon SWT 3D1	Oncogene	1:50	45 Min	RT	>50%
HER-2	Maus IgG1	NCL-CB11	Novocastra	1:40	30 Min	RT	≥2 +
nm23	Maus IgG1	Klon NM301	Oncogene	1:30	23 h	4 °C	>50%
EGFR	Maus IgG1	Klon H11	Dako	1:100	45 Min	RT	≥1%

Tabelle 2 – Eigenschaften und Färbeverfahren der verwendeten Antikörper

Verdün., Verdünnung; Inkub.zeit, Inkubationszeit; Inkub.temp., Inkubationstemperatur; Topo, Topoisomerase II; HER-2, HER-2/neu.

2.3.6 Die Materialien

Die Tabellen 3 bis 5 beschreiben die Herstellung der drei benötigten Lösungen.

Schritt Nr.	Zusammensetzung
1	29,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ Dinatriumhydrogenphosphat und 4,90 g KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat in 500 ml H_2O Aqua dest. lösen
2	160 g NaCl Natriumchlorid zugeben
3	mit Aqua. dest. auf 1000 ml auffüllen
4	mit 1 N Natronlauge (NaOH) auf pH-Wert 7,2 einstellen

Tabelle 3 – PBS-Puffer Stammlösung (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) 1 Molar pH 7,2

Schritt Nr.	Zusammensetzung
1	60,5 g Trizma-Base in 700 ml Aqua dest. lösen
2	mit 2 N Salzsäure auf pH-Wert 7,6 einstellen
3	mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
4	pH -Wert nochmals überprüfen und darin 90 g NaCl lösen

Tabelle 4 – TBS-Puffer (Tris-Buffer-Saline) Stammlösung 0,01 pH 7,6

Schritt Nr.	Zusammensetzung
1	0,100g Trypsin (Sigma T-8128)
2	0,134g CaCl ₂ (Sigma C-4901)
3	Auf 100ml TRIS-Puffer

Tabelle 5 – Trypsinlösung

2.4 Knochenmarkaspiration

Die Knochenmarkpunktion wird an der I. Frauenklinik der LMU München meist im Bereich der Spina iliaca anterior superior durchgeführt.

Die Punktion erfolgt in Intubationsnarkose vor Beginn der Operation oder nach der lokalanästhetischen Vorbehandlung der Punktionsstelle bei der ambulanten Nachsorge. Der Punktionsort wird nach palpatorischer Lokalisation sorgfältig desinfiziert. Um die Gefahr einer Kontamination des Präparates durch die Epithelzellen zu vermindern, wird eine kleine Schnittinzision an der Haut durchgeführt. Danach wird eine Aspirationsnadel in den Beckenknochen eingeführt. Es wird 3-5 ml Knochenmark aus beiden Beckenkämmen entnommen und mit 0,5-1 ml Natrium-Heparin versetzt. Für die Aufarbeitung des Knochenmarkspirates werden die Proben sofort in das tumorimmunologische Labor gebracht.

2.5 Aufbereitung des Knochenmarkspirates und Detektion Zytokeratin-positiver Zellen

Die Aufbereitung des Knochenmarks und die Detektion der Zytokeratin-positiven Zellen werden weitgehend nach dem von Pantel et al etablierten Protokoll (*Janni J. W., 2002*) durchgeführt. Die Aufbereitung des Knochenmarks besteht aus zwei Schritten:

- Anfertigen von Knochenmarks-zelltragenden Zytospins
- Immunzytochemische Färbung der Zytospins

2.5.1 Herstellung der Zytospins

Zur Herstellung der Zytospins wird das Knochenmark zunächst unter sterilen Bedingungen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wird mit Hankscher Lösung (Biocrom, Berlin) auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei $r = 16$ (entsprechend 160g) in einer Hettich Zentrifuge Universal 30F bei 21 °C Temperatur zentrifugiert (Auslauf ungebremst). Dadurch werden Fettpartikel, Plasma und Detritus aus der Probe entfernt. Der obere Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Dichte 1,077 g/mol) überschichtet. Es folgt die Dichtegradientenzentrifugation bei 900 g (2300 rpm, 21 °C) über 30 Minuten (Auslauf ungebremst). Dadurch werden Knochenmarkszellen, Tumorzellen und eine leukozytäre Fraktion aus der peripheren Blutbeimengung in der Interphase angereichert. Erythrozyten und Granulozyten gelangen zum größten Teil in das Pellet.

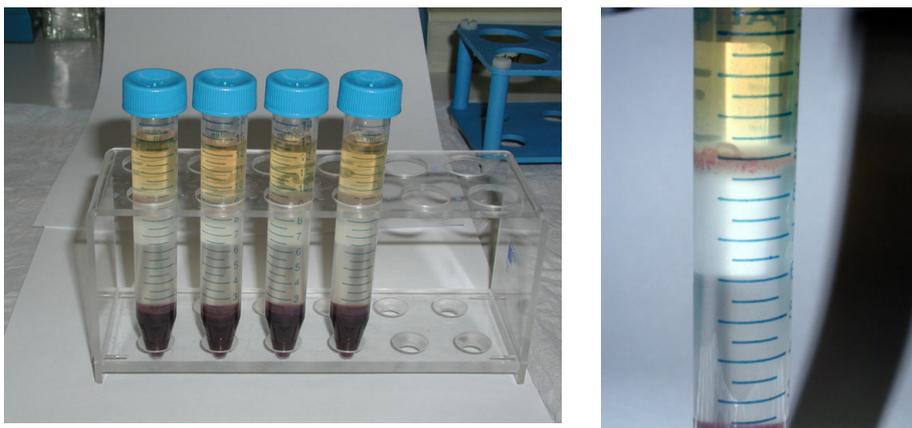


Abbildung 2 – Zentrifugationsröhrchen nach Zentrifugation mit Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts)

Der weiße Ring im rechten Bild ist die leukozytäre Fraktion

Die Interphase und die obere Phase werden mit einer Pipette aufgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit Phosphatpuffer (PBS, pH =7,4) auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend zentrifugiert man das Röhrchen 10 min lang bei 4 °C und 1600rpm (Auslauf gebremst). Der Überstand wird verworfen und das Sediment in PBS und auf 2-3 ml resuspendiert. Das Gesamtvolumen der Suspension wird mit der Pipette bestimmt. Danach stellt man eine Mischung aus 10 µl Suspension und 10 µl Trypanblau her. Diese Farbsuspension wird zur mikroskopischen Vitalitätsprüfung der Zellen und Bestimmung der Zelldichte verwendet. Die Zellen werden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Dabei wird ein Sollwert von 50-300 Zellen pro Quadrat angesetzt. Um die geschätzte Zellzahl von 10^6 Zellen pro Zytospin zu erreichen, berechnen wir das Aspirationsvolumen mit der folgenden Formel:

$$Volumen = \frac{10^6 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Formel 1 – benötigtes Aspirationsvolumen

Das Volumen wird in eine 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit PBS auf 4 ml aufgefüllt, über 3 Minuten bei 1000 rpm und Raumtemperatur auf einer Hettich Universal 30F zentrifugiert (Auslauf gebremst). Zum Schluss werden die Zytospins 12-24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5.2 Die immunzytochemische Färbung

Es werden mindestens vier Präparate mit dem monoklonalen Antikörper A45/B/B3 und der APAAP-Technik (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase), Verdünnung: 1:10 mit PBS, Inkubationszeit: 45 min gefärbt. Der murine monoklonale Antikörper A45-B/3 Isotyp: IgG 1 (Firma Micromet, Martinsried) erkennt ein gemein-

sames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK 19. Sie werden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit dem Rabbit-Mouse Brückenantikörper ZO2593 Isotyp: IgG1, IgG2a, IgG3 (Firma Dako, Dänemark) inkubiert. Es folgt wieder ein dreimaliges Waschen mit PBS und Inkubation mit dem APAAP-System (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1 (kappa).

Lösung Nr.	Zusammensetzung
1	90mg Levamisole [L-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phnylimidazo 2,1-b thiazole] 62,5ml 0,2-molare Trislösung (Firma Sigma, Deisenhofen) 250ml destilliertem H ₂ O
2	50mg NaNO ₂ (Firma Merck, Darmstadt) in 1250 µl Aqua dest. 500 µl 5% Neufuchsin (Firma Serva, Heidelberg) in 2-molarer Salzsäure [Firma Merck, Darmstadt]
3	125mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Firma Sigma, Deisenhofen) gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid (Firma Sigma, Deisenhofen)

Tabelle 6 – Komponenten des APAAP-Systems

Die Lösungen werden der Reihe nach gemischt und anschließend filtriert. Die Präparate verbleiben 20 Minuten in dieser Substratlösung. Nach dem Waschen werden die Präparate feucht mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex (Firma Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen bedeckt. Die mikroskopische Detektion der angefärbten Zytokeratin-positiven Zellen wird durch systematisches, manuelles Screening mit dem Durchlichtmikroskop durchgeführt.

Um eine potenzielle Positivfärbung der Zelle als Zytokeratin-positiv und damit die Zelle als isolierte Tumorzelle (Abbildung 3) zu klassifizieren, müssen alle der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- nachgewiesene Zellintegrität bei der Vitalitätsprüfung der Zellen (durchgehende Zellmembran)

- Zellen gleichmäßig angefärbt (darf intrazelluläre Granula haben)
- im Phasenkontrast Bestätigung der Färbung und gut erkennbarer Zellkern
- Positivfärbung in gleicher Ebene mit den umgebenden Zellen

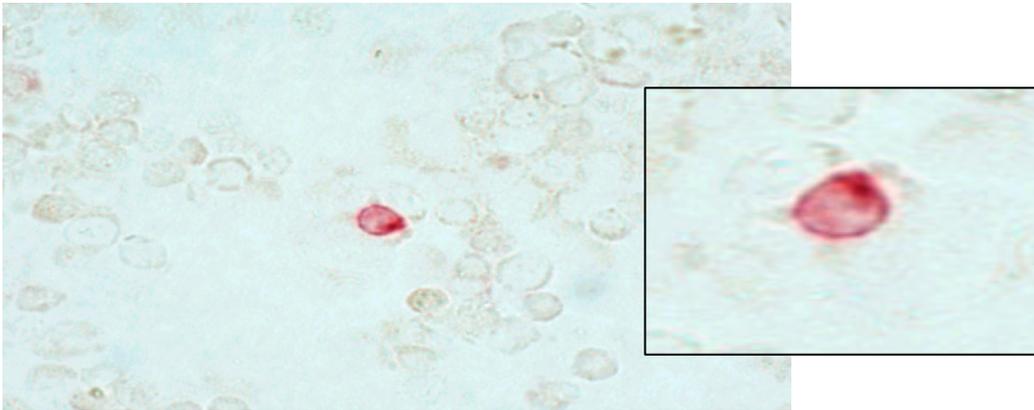


Abbildung 3 - Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat (mit Detailansicht)

Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle mit dem Antikörper A45B/B3 und der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik; zu beachten ist vor allem die fehlende Anfärbung der im Hintergrund erkennbaren Knochenmarkszellen

Diese Kriterien gelten für alle isolierten Tumorzellen, von einzelnen bis hin zu Zellclustern, bestehend aus zwei, meist mehreren positiven Zellen. Die Präparate werden immer von zwei Gutachtern beurteilt, die jedoch nicht den Status der Patientin kennen. Nur wenn beide zu einem einstimmigen und positiven Urteil kommen, sind die gefärbten Zellen als Tumorzellen zu klassifizieren.

2.6 Beurteilung immunhistologischer Ovarialkarzinom-Schnitte

Alle Färbungen wurden von einem erfahrenen Untersucher ohne Kenntnis der klinischen und immunohistochemischen Daten lichtmikroskopisch in standardisierter Weise beurteilt. Die Ki67-Expression wurde nur nach Prozentsatz gefärbter Zellen beurteilt. Die Färbungen von p53, Topoisomerase II α , nm23 und EGFR wurden nach

dem Immuno-Reaktiven Score nach Remmele und Stegner beurteilt. Hierbei bedeutet: "0" = keinerlei Färbung, "1" = schwache, "2" = moderate, "3" = starke Färbung. Dieser Score wird mit dem Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (0 = keine gefärbten Zellen, 1 = < 10% gefärbte Zellen, 2 = 11-50% gefärbte Zellen, 3 = 51 – 80% gefärbte Zellen, und 4 = > 81% gefärbte Zellen) multipliziert.

$$IRS = \text{Prozentsatz}_{\text{gefärbter Zellen}} * \text{Färbeintensität}$$

Formel 2 – IRS Berechnung

IRS kann einen Wert zwischen 0-12 annehmen.

Die HER-2-Expression wurde semiquantitativ nach dem 0-3+ Score aus dem Anteil positiv gefärbter Zellen und der Färbeintensität nach folgenden Kriterien beurteilt: (0=keinerlei Färbung, "1+" = positiv gefärbte Zellenmembran <10% oder inhomogene schwache Membranfärbung, "2+"= moderate homogene Färbung, "3+"= starke homogene Membranfärbung).

2.7 Statistik

Alle benötigten Daten wie die Patienten- und Knochenmarkdaten, Daten über Tumorcharakteristika, sowie Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen wurden in einer Microsoft[®] Excel Tabelle gespeichert. Die Diagramme wurden mit Hilfe von Microsoft[®] Excel und Vierfeldertafel dargestellt. Statistische Analysen wurden mit dem Softwarepaket SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Korrelationen zwischen Tumor-, Knochenmark- und immunhistologischen Daten wurden mit Hilfe des X²-Tests bei einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ ermittelt. Der Zusammenhang zwischen Rezidiv freien (DFS) und Metastasen freien (DDFS)

Intervall, sowie Gesamtüberleben (OS) der Patientinnen mit histologischen, immunhistologischen Parameter und Knochenmarkergebnisse wurde mit der Kaplan-Meier Analyse (log-rank test, univariate) und Cox Regressionsanalyse (multivariate) überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Das mittlere Alter der Patientinnen bei der Diagnosestellung betrug 61,2 Jahre (Median 62 Jahre), die jüngste Patientin bei Diagnosestellung war 33, die Älteste 79 Jahre alt. Von den 90 Patientinnen waren 10 (11%) in der Prämenopause und 80 (89%) in der Postmenopause. 66 (76%) Frauen hatten eine oder mehrere Geburten, 21 (24%) waren kinderlos und bei drei Frauen fehlen die Angaben.

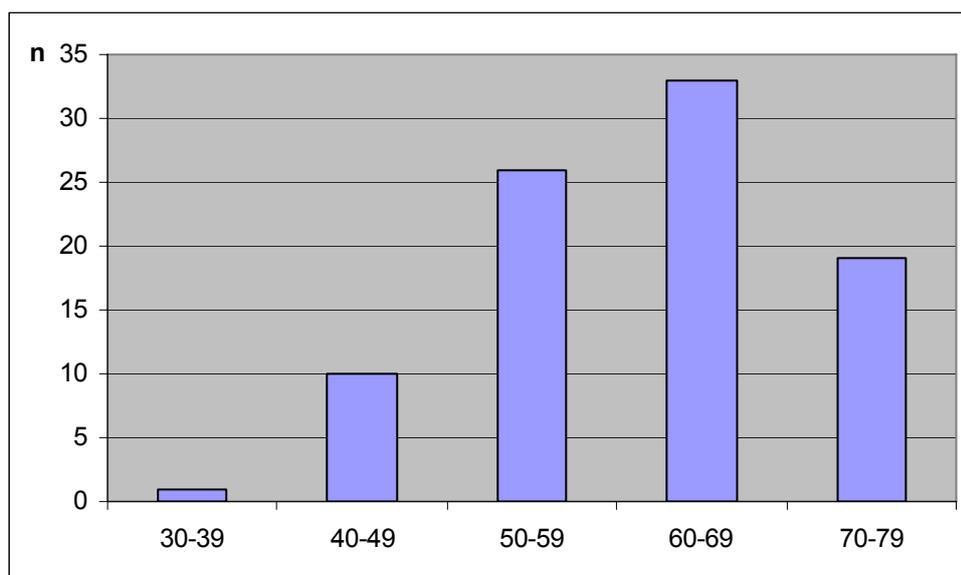


Abbildung 4 - Verteilung des Alters bei Diagnosestellung

3.2 Tumorcharakteristika

Bei dieser Untersuchung befanden sich 9 Patientinnen (10%) im FIGO Stadium I, 8 (9%) im FIGO Stadium II, 58 (65%) im FIGO Stadium III und 13 (14%) im FIGO Stadium IV. Über 2 Patientinnen fehlen die Angaben zum Tumorstadium.

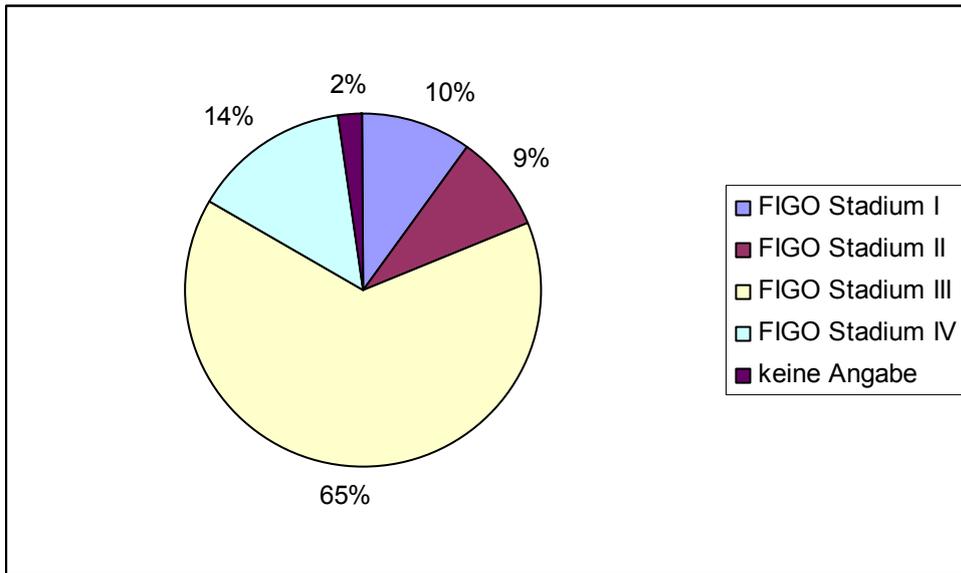


Abbildung 5 - Verteilung der Tumorstadien (n=90)

Der histologische Karzinomtyp war bei 60 Patientinnen (67%) ein papillär-seröses Karzinom, bei 12 (13%) ein Adenokarzinom, bei 7 (8%) ein endometrioides Karzinom, bei 3 (3%) ein Klarzellkarzinom und bei 8 (9%) sonstige Karzinomtypen.

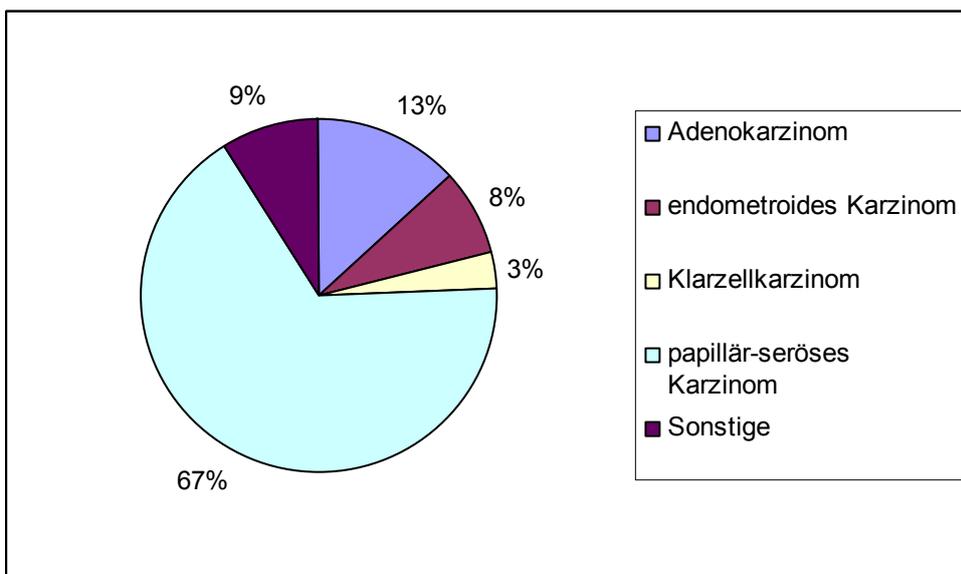


Abbildung 6 - Verteilung der histologischen Karzinomtypen (n=90)

3.3 Ergebnisse der histologischen Auswertung

3.3.1 Histologie

Das histologische Tumorgrading zeigte bei 14 (18%) Fällen ein gut differenziertes (G I), bei 27 (35%) ein mäßig differenziertes (G II) und bei 37 (47%) ein schlecht differenziertes (G III) Karzinom. Bei 12 Patientinnen fehlen die Angaben zum Tumorgrading.

Von den 48 (54%) lymphonodektomierten Patientinnen hatten 32 (36%) Lymphknotenmetastasen und bei 16 (18%) waren die Lymphknoten nicht befallen. Postoperativer Tumorrest (makroskopisch oder mikroskopisch) wurde bei 65 Patientinnen angegeben. Bei 39 (60%) Patientinnen war der Tumorrest nachweisbar, 26 (40%) hatten keinen Tumorrest.

Eine Lymphangiosis carcinomatosa war bei 25 (28%) Patientinnen vorhanden, 64 (72%) hatten keine. Über eine Patientin fehlt die Angabe. Im Bezug auf Hämangiosis carcinomatosa gab es 7 (8%) positive und 83 (92%) negative Fälle.

51 (56,7%) Patientinnen hatten Aszites und 39 (43,3%) keinen Aszites. Peritonealkarzinose war bei 70 (80%) Patientinnen vorhanden und bei 17 (20%) hatte sich keine entwickelt. Bei drei Patientinnen liegen keine Angaben vor. Bei 22 (25%) Patientinnen wurde eine Chemotherapie durchgeführt.

3.3.2 Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen

3.3.2.1 MIB-1 (Ki-67)

Die Färbung des Tumorgewebes ist bei allen 90 Fällen gelungen. Alle Präparate zeigten eine Kernfärbung. Der Prozentsatz der gefärbten Zellen in den Präparaten lag zwischen 5 – 95%.

Bei der MIB-1 Färbung lag der Mediane Prozentsatz bei 30%. Es gab insgesamt 53 positive (Anzahl gefärbter Tumorzellen > 30%) und 47 negative (Anzahl gefärbter Tumorzellen ≤ 30%) Fälle.

Anteil positiver Zellen	Anzahl	Prozent
0%	0	0%
1 – 20%	17	19%
21 - 50%	54	60%
51 – 75%	13	14%
> 75%	6	7%

Tabelle 7 - Verteilung des Anteils der MIB-1 positiven Zellen (n=90)

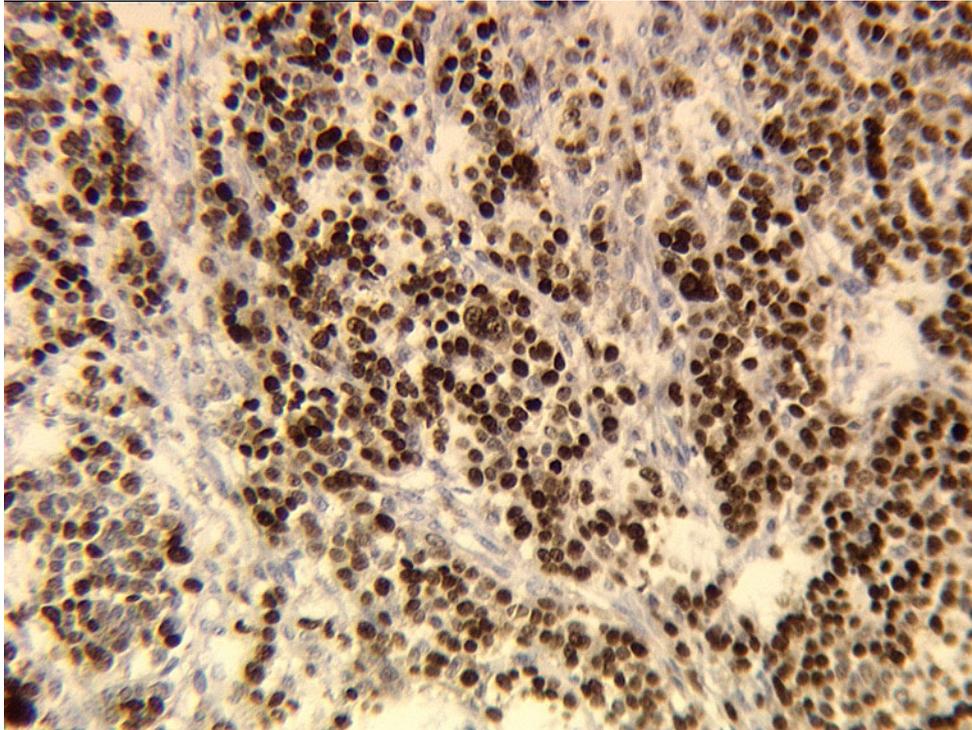


Abbildung 7 - MIB-1 Färbung eines papillär serösem Ovarialkarzinoms FIGO-Stadium IIIc

Eine signifikante Korrelation wurde zwischen dem Anteil gefärbter Zellen und Tumorgröße beobachtet ($p=0,014$). Bei den positiven MIB-1 Fällen wurde signifikant häufiger (31) Tumorgrößen $pT>2$ beobachtet als bei negativen Fällen (25).

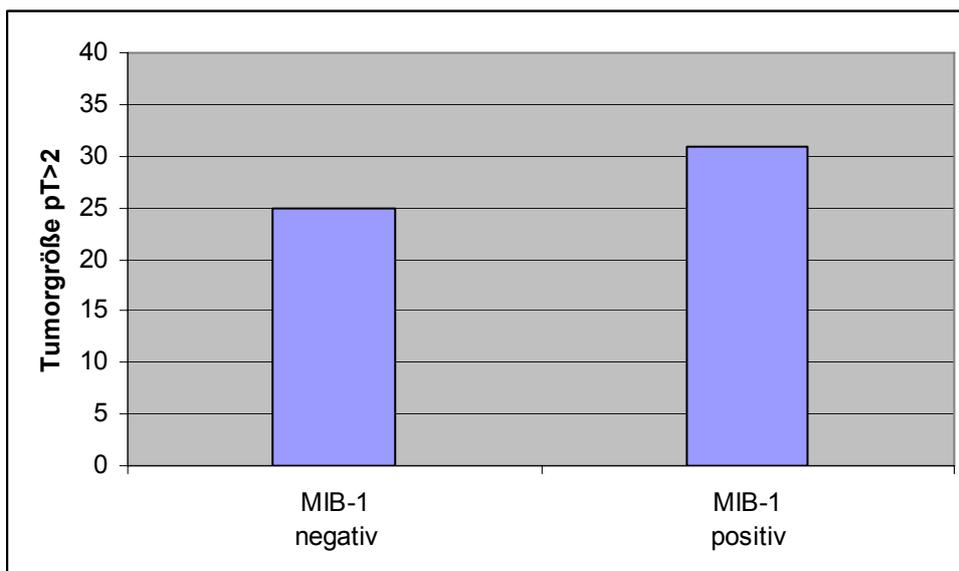


Abbildung 8 - Diagramm für Tumorgröße ($pT>2$) in Abhängigkeit von Anzahl MIB-1 gefärbter Zellen. Signifikant häufiger Tumorgröße ($pT>2$) bei MIB-1 positiven Fällen $p=0,014$, ($n=78$).

Eine Tendenz wurde zwischen dem Anteil gefärbter Zellen und Tumorrest beobachtet ($p=0,07$). Es gab häufiger Patientinnen mit postoperativem Tumorrest bei den MIB-1 positiven Fällen (24) als bei den Negativen (15).

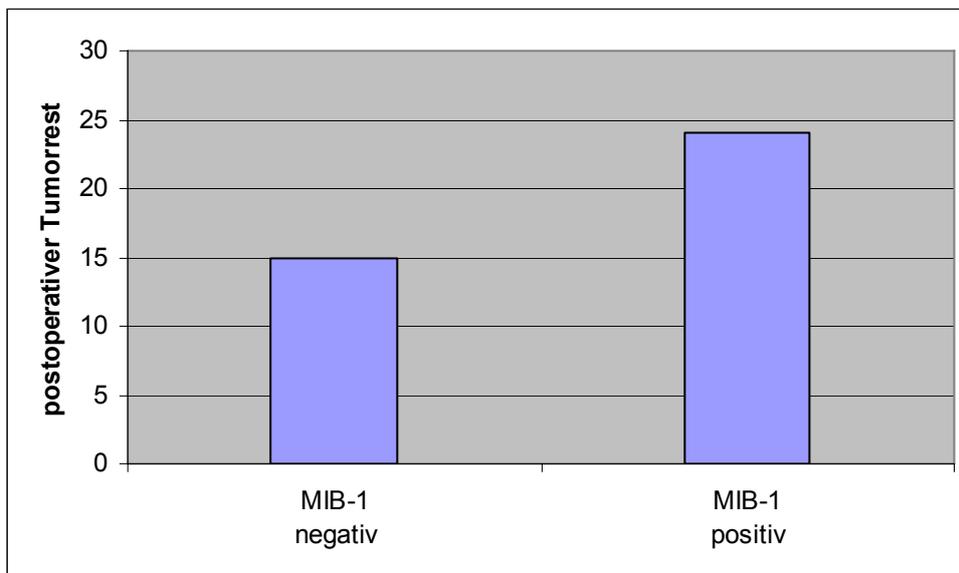


Abbildung 9 - Diagramm für Anzahl MIB-1 gefärbter Zellen in Abhängigkeit vom Tumorrest. Häufiger postoperativer Tumorrest bei MIB-1 positiven Fällen $p=0,07$, ($n=65$).

Es wurde auch signifikant häufiger Peritonealkarzinosen im Bezug auf den Anteil gefärbter Tumorzellen beobachtet. Bei den positiven MIB-1 Fällen gab es 40 und bei den negativen Fällen 30 Patientinnen mit Peritonealkarzinose ($p=0,013$).

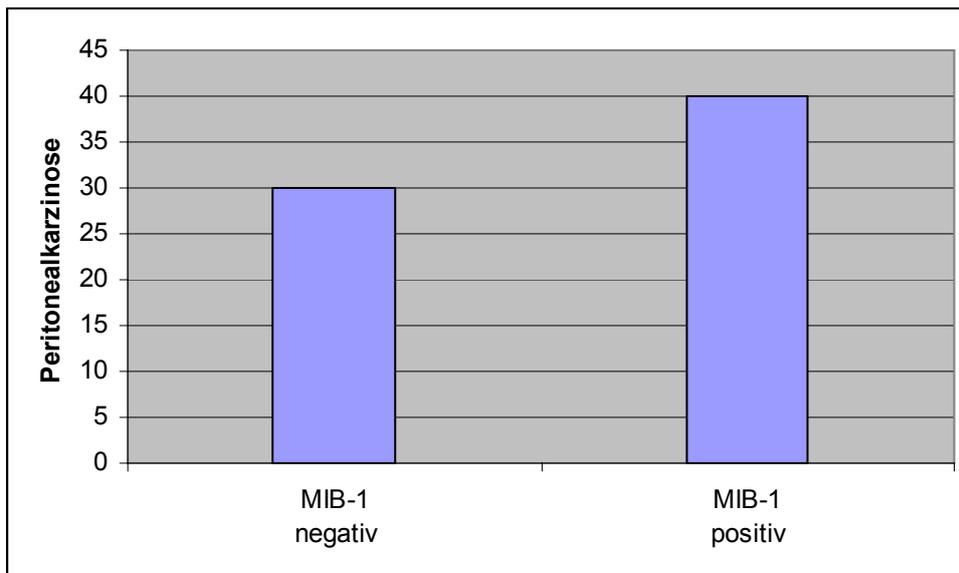


Abbildung 10 - Diagramm für Peritonealkarzinose in Abhängigkeit von Anzahl MIB-1 gefärbter Zellen. Signifikant häufiger Peritonealkarzinose bei MIB-1 positiven Fällen $p=0,013$, (n=78).

Es fand sich häufiger Aszites bei den positiven MIB-1 Fällen. Eine signifikante Korrelation bestand aber nicht.

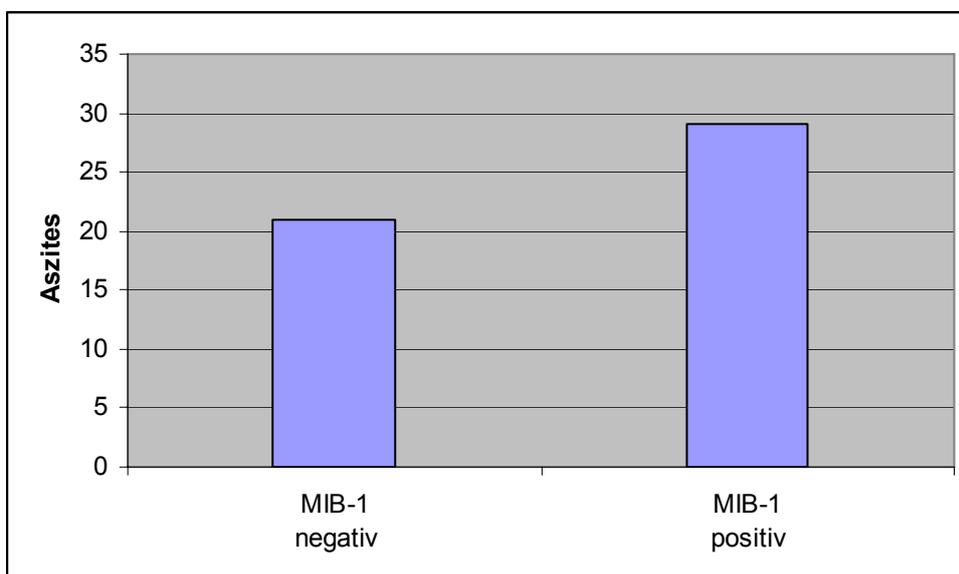


Abbildung 11 - Diagramm für Aszites in Abhängigkeit von Anzahl MIB-1 gefärbter Zellen (n=89).

Zu den anderen histologischen und klinischen Parametern wie Tumorgrading, Lymph- und Hämangiosis carcinomatosa, oder Lymphknotenbefall bestand keine signifikante Korrelation.

3.3.2.2 p53

Die Färbung des Tumorgewebes ist bei allen 90 Fällen gelungen. Der Prozentsatz der gefärbten Zellen in den Präparaten lag zwischen 0 – 100%. Zwei Präparate (2,22%) waren komplett negativ für p53. Gefärbte Karzinome zeigten eine Kernfärbung, die bei 20 (22%) schwach, bei 48 (53%) mittel und bei 20 (22%) stark ausgeprägt waren.

Anteil positiver Zellen	Anzahl	Prozent
0%	2	2%
1 – 20%	14	16%
21 - 50%	31	34%
51 – 75%	11	12%
> 75%	32	36%

Tabelle 8 - Verteilung des Anteils der p53- positiven Zellen (n=90)

Intensität	Anzahl	Prozent
0	2	3%
schwach	20	22%
mittel	48	53%
stark	20	22%

Tabelle 9 - Verteilung der Intensität der p53- Färbung (n=90)

Bei dieser Färbung lag der Median des IRS Wertes bei 5. Es gab insgesamt 45 positive ($IRS \geq 6$) und 45 negative ($IRS < 6$) Fälle.

IRS	Anzahl	Prozent
0	2	2%
1 – 5	43	48%
5-8	27	30%
> 8	18	20%

Tabelle 10 - Verteilung des IRS-Wertes der p53- Färbung (n=90)

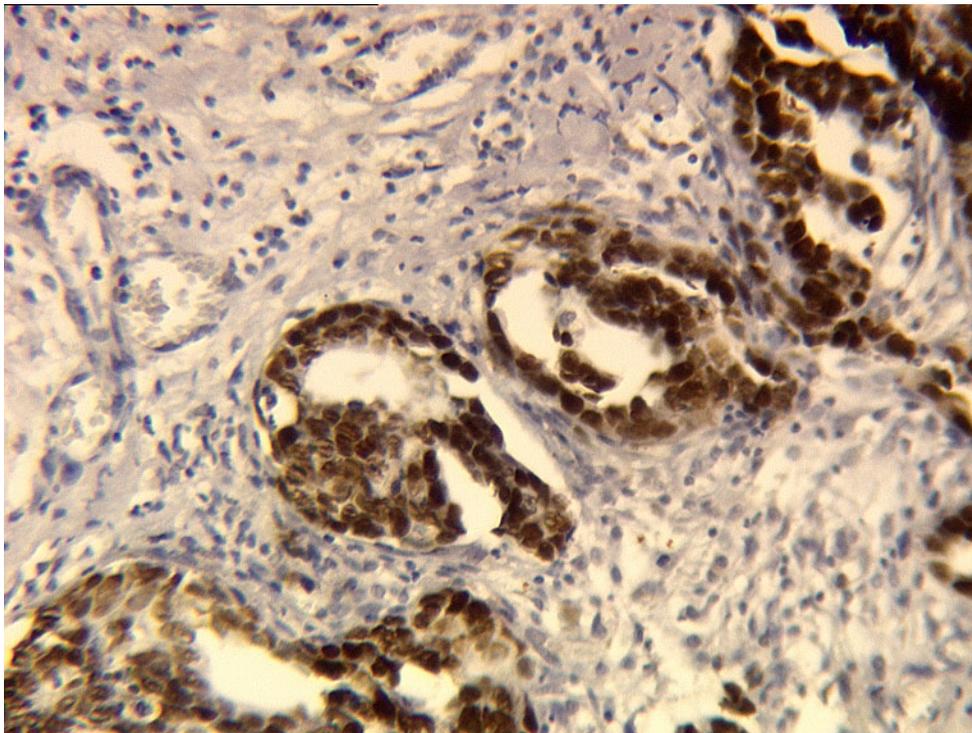


Abbildung 12 - p53 Färbung eines papillär serösem Ovarialkarzinoms FIGO-Stadium IIIc

Der IRS-Mittelwert der Tumorzellen des Grading I lag bei 5,14, der von Tumorzellen Grading II bei 6,11 und der Tumorzellen Grading III bei 4,91. Zwischen Grading der Tumorzellen mit dem IRS-Mittelwert bestand keine signifikante Korrelation.

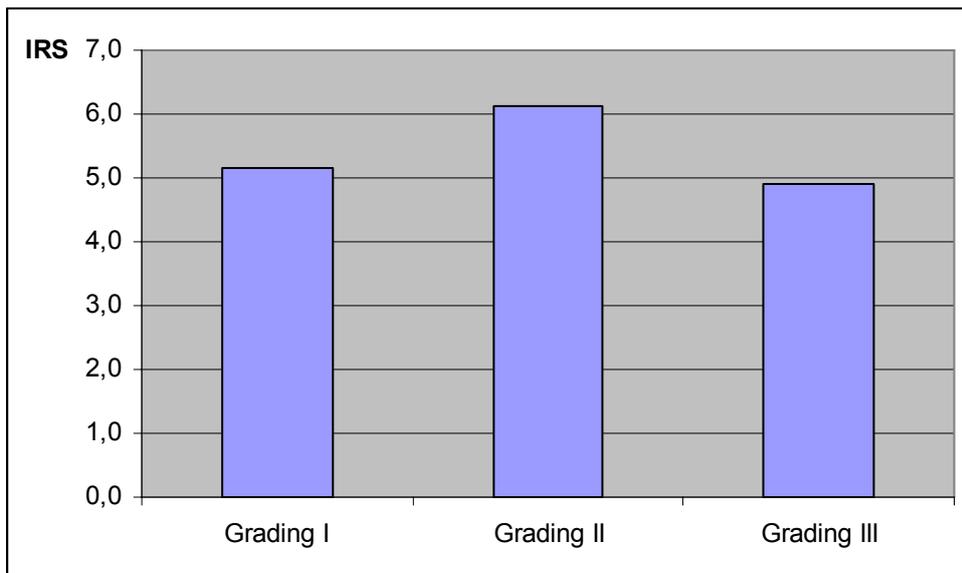


Abbildung 13 - Diagramm für p53-IRS in Abhängigkeit von Grading der Tumorzellen (n=78)

Größeren Tumoren ($pT>2$) wurden häufiger bei den p53 negativen Fällen beobachtet. Der Unterschied in der Größe des Tumors war bei den p53 negativen und den p53 positiven Fällen statistisch nicht signifikant.

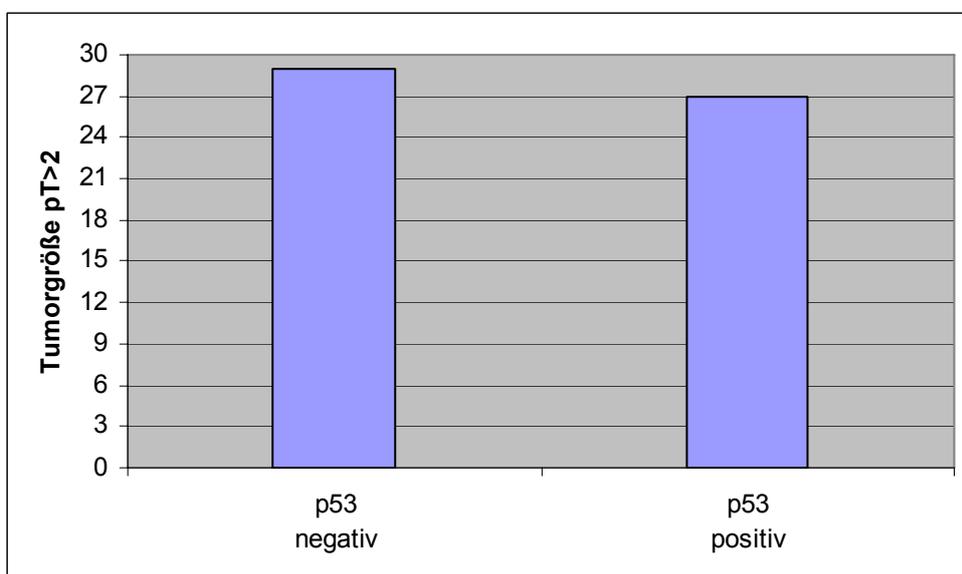


Abbildung 14 - Diagramm für Tumorgroße ($pT>2$) in Abhängigkeit von p53-IRS (n=78)

Die Patientinnen mit positivem p53 hatten häufiger Lymphknotenmetastasen als die mit negativem p53. Dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

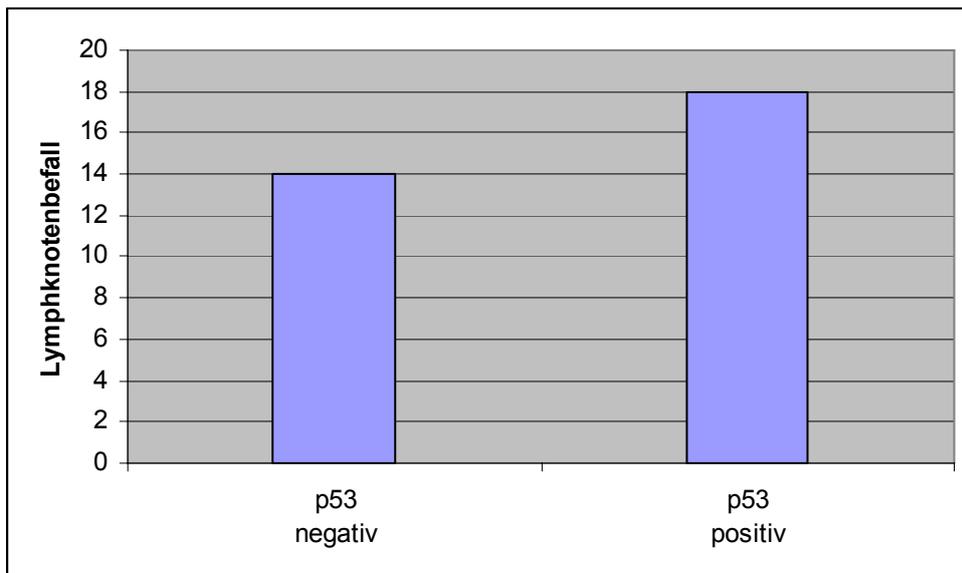


Abbildung 15 - Diagramm für Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von p53-IRS (n=48)

Es wurde häufiger ein postoperativer Tumorrest bei Patientinnen mit positivem p53 beobachtet. Der Unterschied zwischen p53 positiven und negativen Patientinnen war statistisch nicht signifikant.

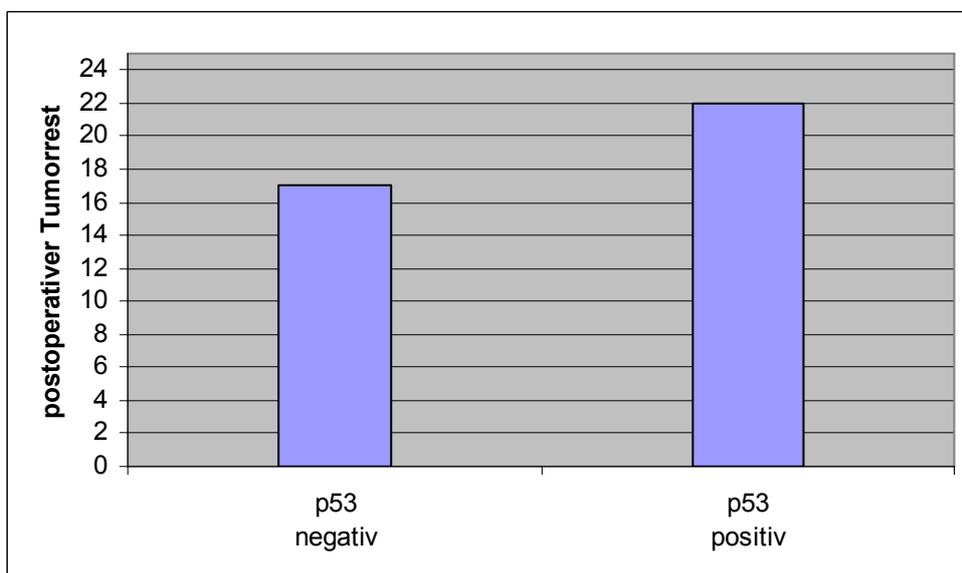


Abbildung 16 - Diagramm für Tumorrest in Abhängigkeit von p53-IRS (n=65)

Die Anzahl der Patientinnen mit Aszites und positivem p53 war höher als bei negativen p53 Fällen. Es bestand aber kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientinnengruppen.

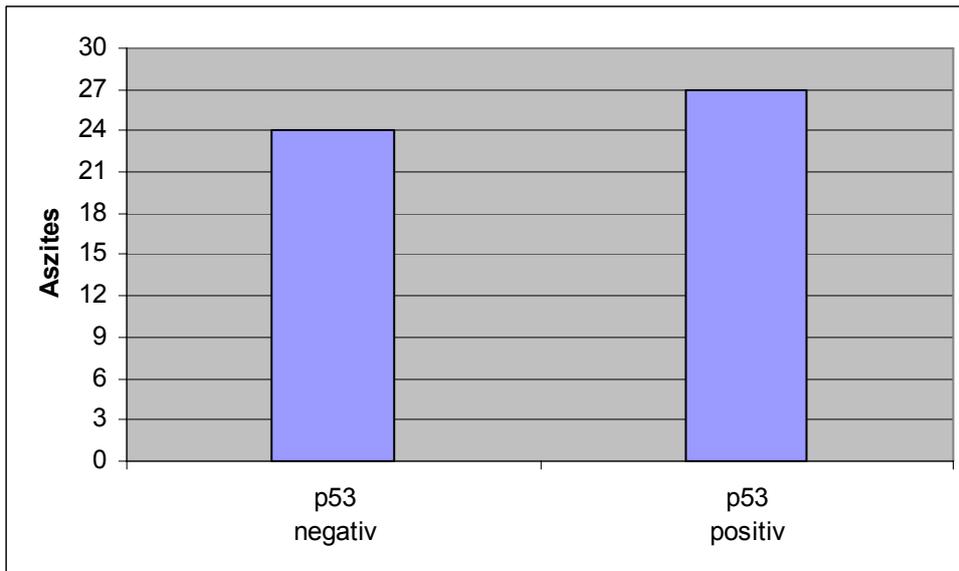


Abbildung 17 - Diagramm für Aszites in Abhängigkeit von p53-IRS (n=89)

In Bezug auf eine Peritonealkarzinose war die Anzahl der Patientinnen mit negativem p53 höher als die mit positivem p53. Dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant.

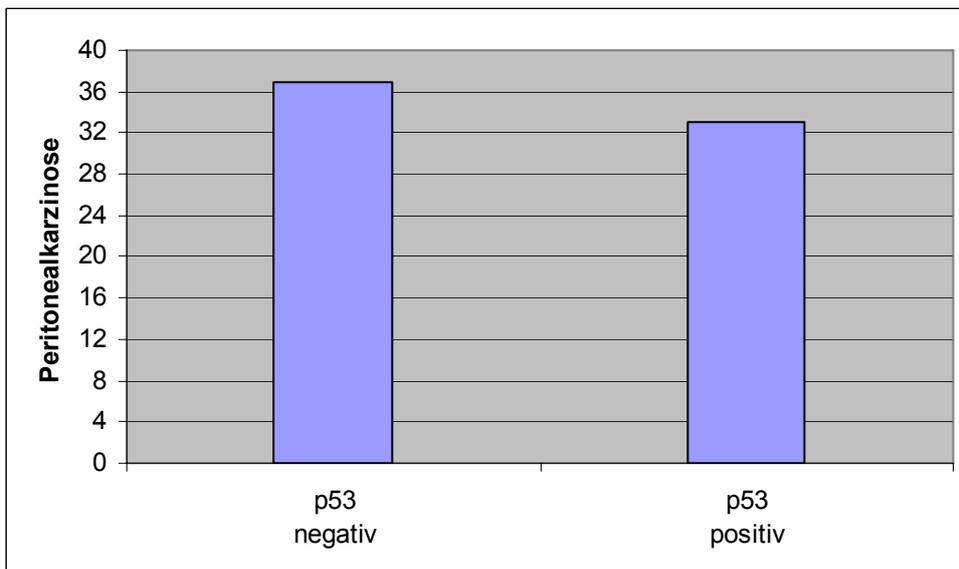


Abbildung 18 - Diagramm für Peritonealkarzinose in Abhängigkeit von p53-IRS (n=87)

Bei der Lymph- und Hämangiosis carcinomatosa waren die negativen p53 Fälle häufiger betroffen als die Positiven, das aber ohne statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 19 und 20).

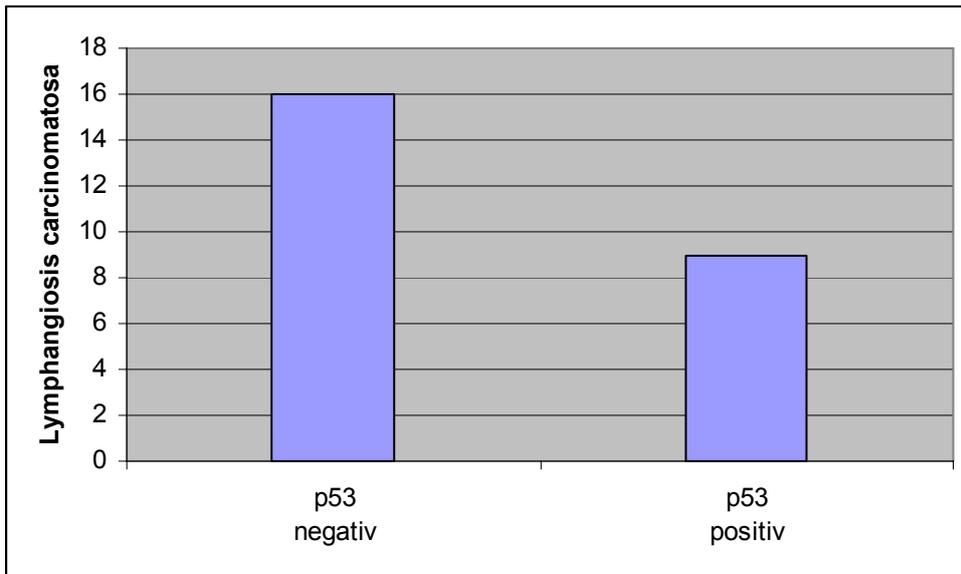


Abbildung 19 - Diagramm für Lymphangiosis carcinomatosa in Abhängigkeit von p53-IRS (n=89)

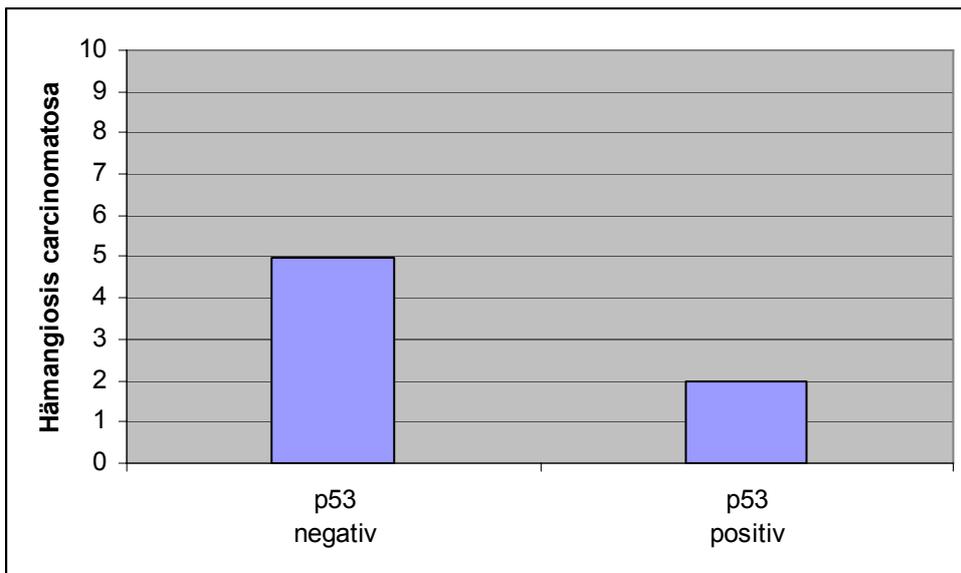


Abbildung 20 - Diagramm für Hämangiosis carcinomatosa in Abhängigkeit von p53-IRS (n=89)

3.3.2.3 Topoisomerase II α

Bei der Topoisomerase-Färbung wurden alle 90 Präparate gefärbt. Die Anzahl gefärbter Tumorzellen lag zwischen 1-100%. Gefärbte Tumorzellen zeigten eine

Kernfärbung, die bei 5 Präparaten (6%) schwach, bei 65 (72%) mittel und bei 20 (22%) stark ausgeprägt war.

Anteil positiver Zellen	Anzahl	Prozent
0%	0	0%
1 – 20%	18	20%
21 - 50%	34	38%
51 – 75%	13	14%
> 75%	25	28%

Tabelle 11 - Verteilung des Anteils der Topoisomerase II α positiven Zellen (n=90)

Intensität	Anzahl	Prozent
1	5	6%
2	65	72%
3	20	22%

Tabelle 12 - Verteilung der Intensität der Topoisomerase II α - Färbung (n=90)

Der Median des IRS-Wertes lag bei 4. Es gab insgesamt 43 positive (IRS \geq 5) und 47 negative (IRS < 5) Fälle.

IRS	Anzahl	Prozent
1-4	47	52%
5-5	22	24%
> 6	21	24%

Tabelle 13 - Verteilung des IRS-Wertes der Topoisomerase II α - Färbung (n=90)

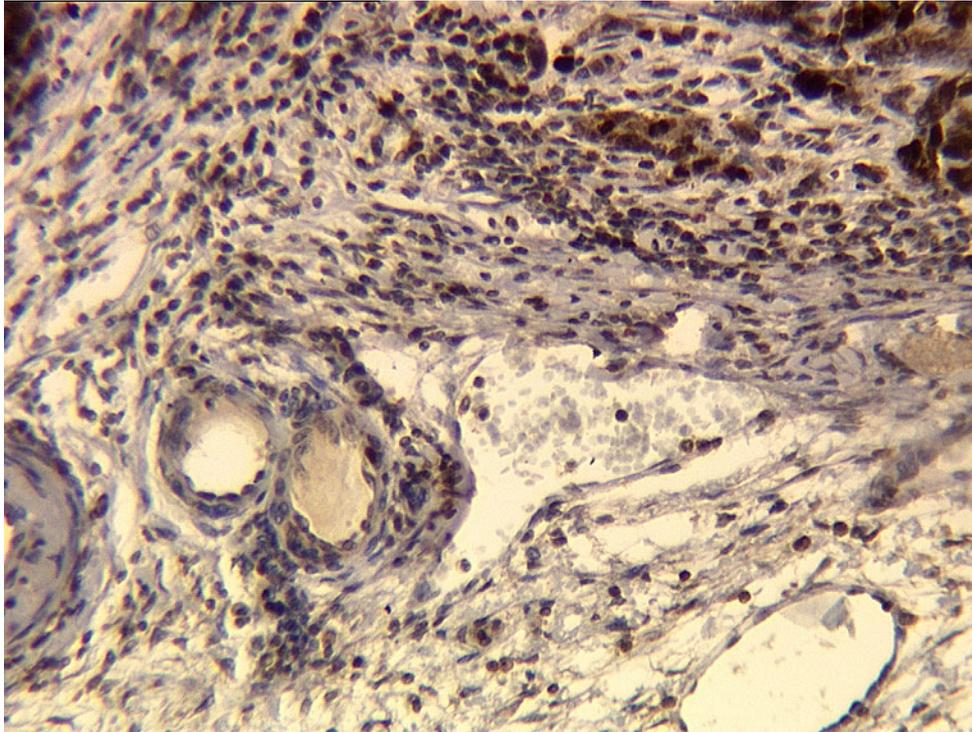


Abbildung 21 - Topoisomerase II Färbung eines papillär serösem Ovarialkarzinoms FIGO-Stadium IVa

Zwischen IRS-Wert und Grading der Tumorzellen bestand keine Korrelation. Der IRS-Mittelwert der Tumorzellen mit Grading I war 6,14, Grading II 5,33 und Grading III 5,81.

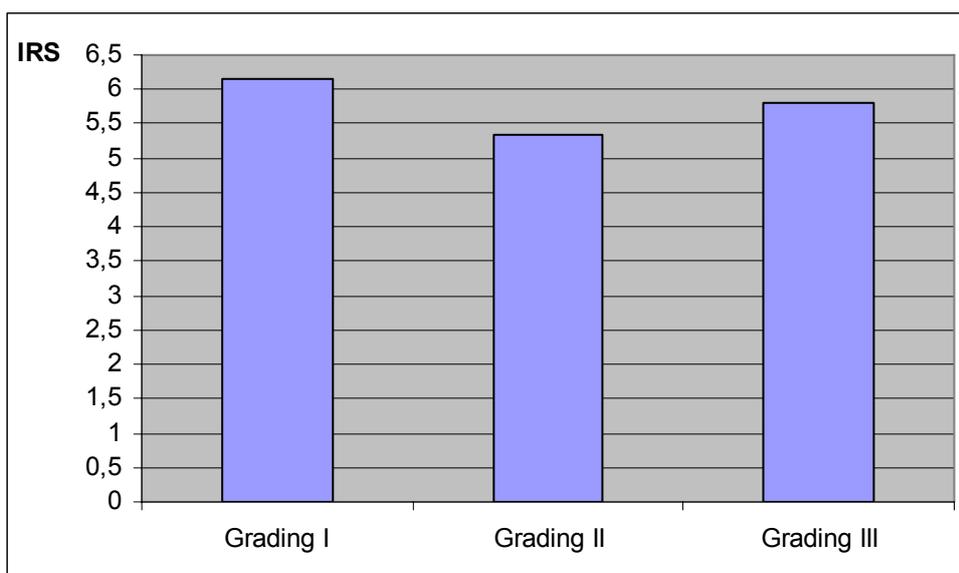


Abbildung 22 - Diagramm für Topoisomerase II α -IRS in Abhängigkeit von Grading der Tumorzellen (n=78)

Eine Lymphangiosis carcinomatosa wurde bei den negativen Topoisomerase II α Fällen häufiger beobachtet als bei den positiven Fällen. Der Unterschied zwischen diesen Fällen war statistisch nicht signifikant.

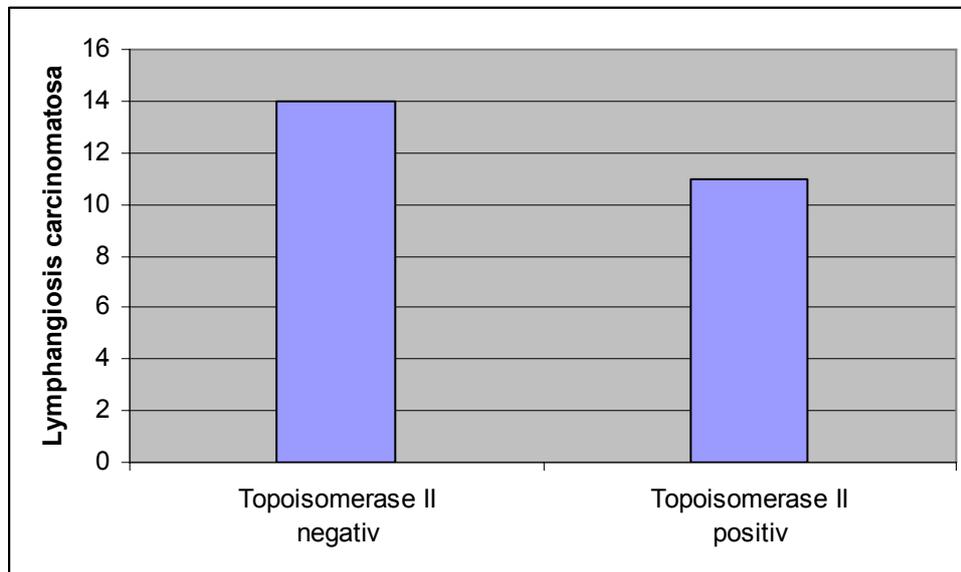


Abbildung 23 - Diagramm für Lymphangiosis carcinomatosa in Abhängigkeit von Topoisomerase II α -IRS (n=89)

Bei der Topoisomerase II α Färbung bestand keine signifikante Korrelation zu den anderen histologischen und klinischen Parametern.

3.3.2.4 HER-2/neu

Bei dieser Färbung wurden 89 Präparate gefärbt. In einem Fall gelang die HER-2/neu Färbung nicht.

13 Fälle zeigten einen Score von „0“, 39 Fälle von „1+“, 18 von „2+“, und 19 von „3+2: Insgesamt waren somit 37 / 89 (41,9%) Fälle HER2-positiv (Färbescore ≥ 2) und 52 / 89 (58,1%) Fälle HER2-negativ (Färbescore < 2).

Score	Anzahl	Prozent
0	13	15%
1	39	44%
2	18	20%
3	19	21%

Tabelle 14 - Verteilung des IRS-Wertes der HER-2/neu-Färbung (n=89)

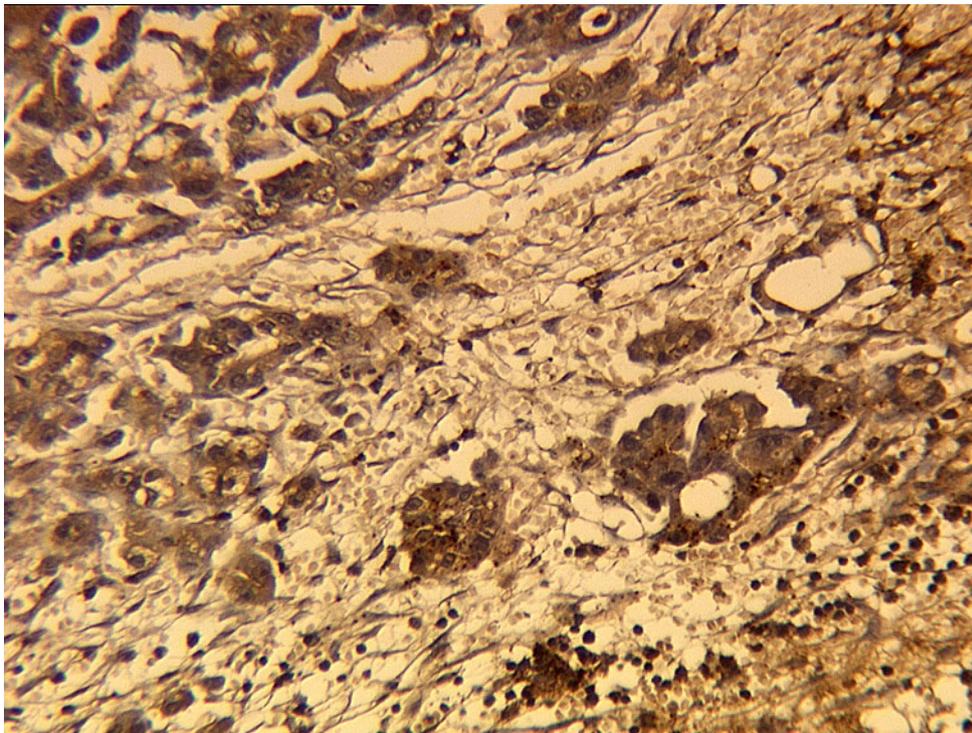


Abbildung 24 - HER-2/neu Färbung eines Adenokarzinoms FIGO-Stadium IIIc

Bei Tumoren mit Grading I war der Mittelwert des HER2-scores 1,54, bei Grading II 1,59 und bei Grading III 1,38.

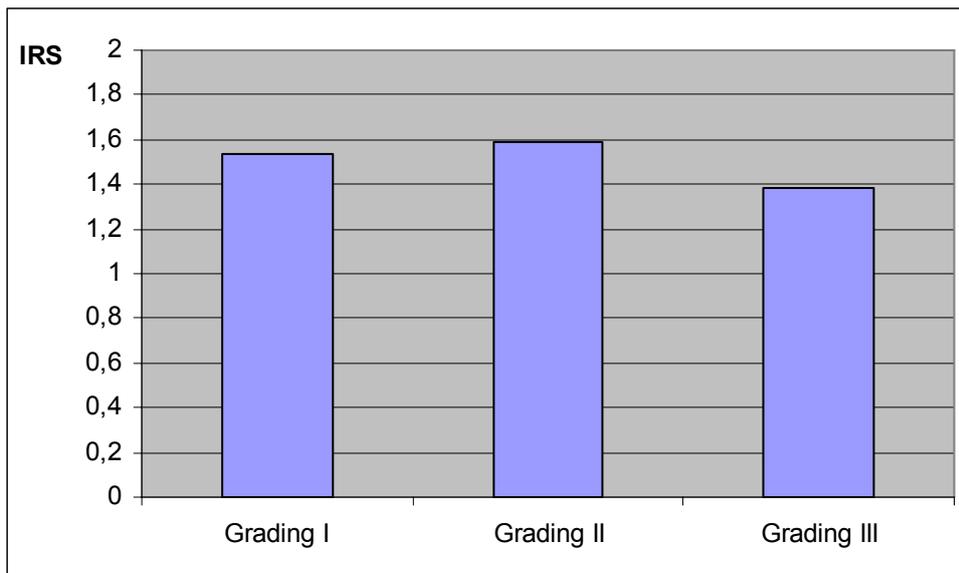


Abbildung 25 - Diagramm für HER-2/neu-IRS in Abhängigkeit von Grading der Tumorzellen (n=77)

Bei den HER-2/neu negativen Fällen gab es häufiger Hämangiosis carcinomatosa.

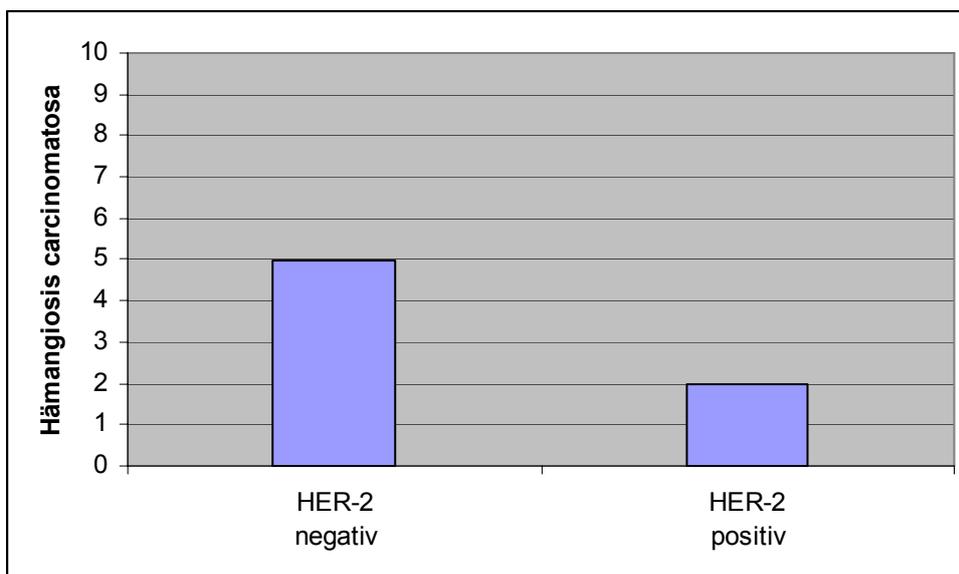


Abbildung 26 - Diagramm für Hämangiosis carcinomatosa in Abhängigkeit von HER-2/neu-IRS (n=89)

Es bestand eine signifikante Korrelation ($p=0,02$) zwischen HER-2- und p53-Expression.

In 54 / 89 (60,6%) Fällen bestand eine gemeinsame Expressions-Positivität bzw. Negativität dieser beiden Faktoren.

Zwischen den anderen histologischen bzw. klinischen Parametern und der HER-2/neu-Färbung bestand keine signifikante Korrelation.

3.3.2.5 nm23

Bei dieser Färbung wurden alle 90 Präparate gefärbt. Der Prozentsatz gefärbter Zellen lag zwischen 0-95%. 15 Präparate waren komplett negativ für nm23. Die positiven Präparate zeigten eine Kernfärbung, davon waren 39 (43%) schwach, 35 (39%) mittel und ein Präparat (1%) stark gefärbt. Der IRS-Wert lag zwischen 0-9.

Anteil positiver Zellen	Anzahl	Prozent
0%	15	17%
1 – 20%	19	21%
21 - 50%	30	33%
51 – 75%	12	13%
> 75%	14	16%

Tabelle 15 - Verteilung des Anteils der nm23 positiven Zellen (n=90)

Intensität	Anzahl	Prozent
0	15	17%
1	39	43%
2	35	39%
3	1	1%

Tabelle 16 - Verteilung der Intensität der nm23-Färbung (n=90)

Der Median des IRS-Wertes lag bei 2. Es gab insgesamt 40 positive (IRS \geq 3) und 50 negative (IRS<3) Fälle.

IRS	Anzahl	Prozent
0	15	17%
1-4	53	59%
> 5	22	24%

Tabelle 17 - Verteilung des IRS-Wertes der nm23-Färbung (n=90)

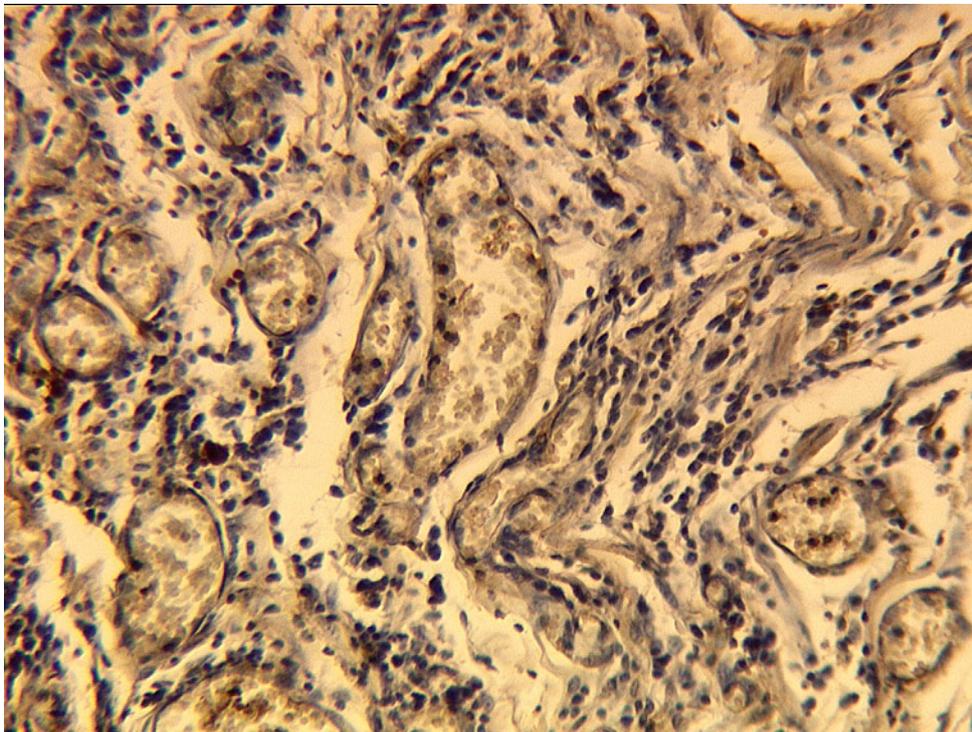


Abbildung 27 - nm23-Färbung eines Müllerschen Mischtumors FIGO-Stadium IIIc

Die nm23 negativen Patientinnen hatten häufiger Lymphknotenmetastasen, es bestand aber kein statistisch signifikanter Unterschied zu den nm23 positiven Patientinnen.

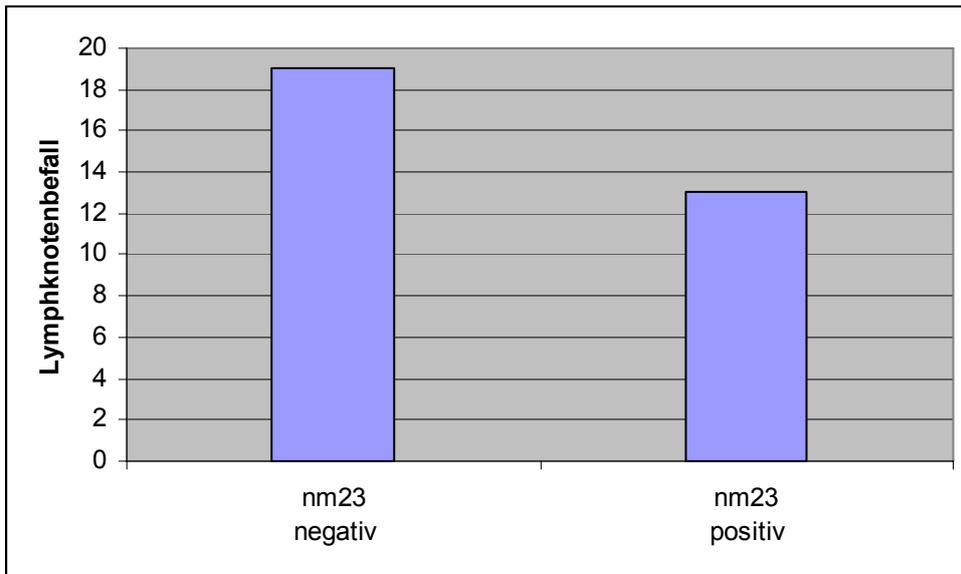


Abbildung 28 - Diagramm für Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von nm23-IRS (n=48)

Bei den nm23 negativen Fällen gab es häufiger Aszites (34) als bei den Positiven (17). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,015$).

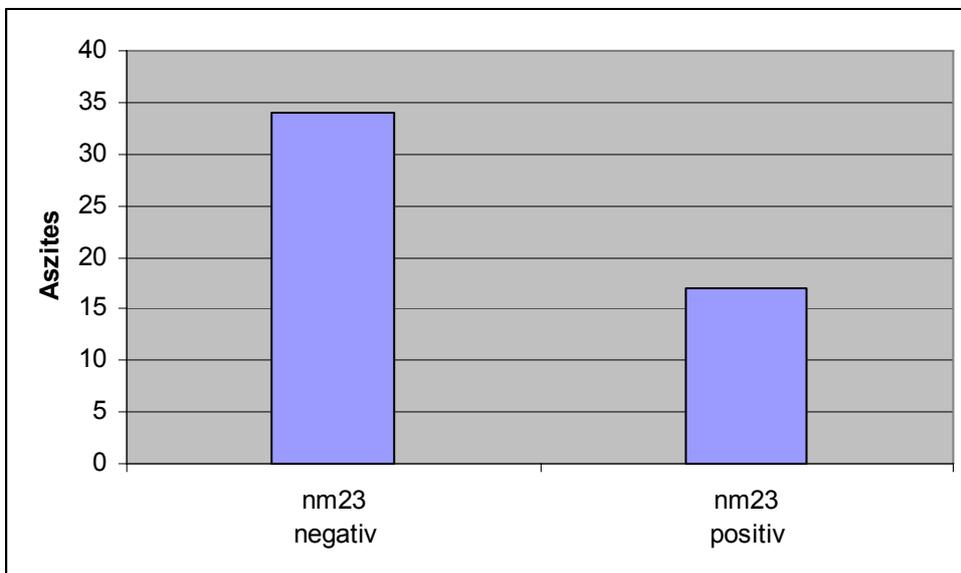


Abbildung 29 - Diagramm für Aszites in Abhängigkeit von nm23-IRS $p=0,015$, (n=48)

3.3.2.6 EGFR

Bei dieser Untersuchung waren insgesamt nur 26 (29%) Präparate gefärbt. Die restlichen 64 (71%) Fälle waren komplett negativ für EGFR. Der Prozentsatz gefärbter Tumorzellen lag zwischen 5-50%. Die Färbeintensität lag zwischen 0-2. Die Färbung der Präparate war bei 19 (21%) schwach und bei 7 (8%) mittel ausgeprägt. Die IRS Werte lagen im Bereich von 0 bis 4. Alle gefärbten Präparate wurden als positiv bewertet.

Anteil positiver Zellen	Anzahl	Prozent
0%	64	71%
1 – 20%	14	16%
21 - 50%	12	13%
51 – 75%	0	0%
> 75%	0	0%

Tabelle 18 - Verteilung des Anteils der EGFR positiven Zellen (n=90)

Intensität	Anzahl	Prozent
0	64	71%
1	19	21%
2	7	8%
3	0	0%

Tabelle 19 - Verteilung der Intensität der EGFR-Färbung (n=90)

IRS	Anzahl	Prozent
0	64	71%
1	10	11%
2	11	12%
3	0	0%
4	5	6%

Tabelle 20 - Verteilung des IRS-Wertes der EGFR-Färbung (n=90)

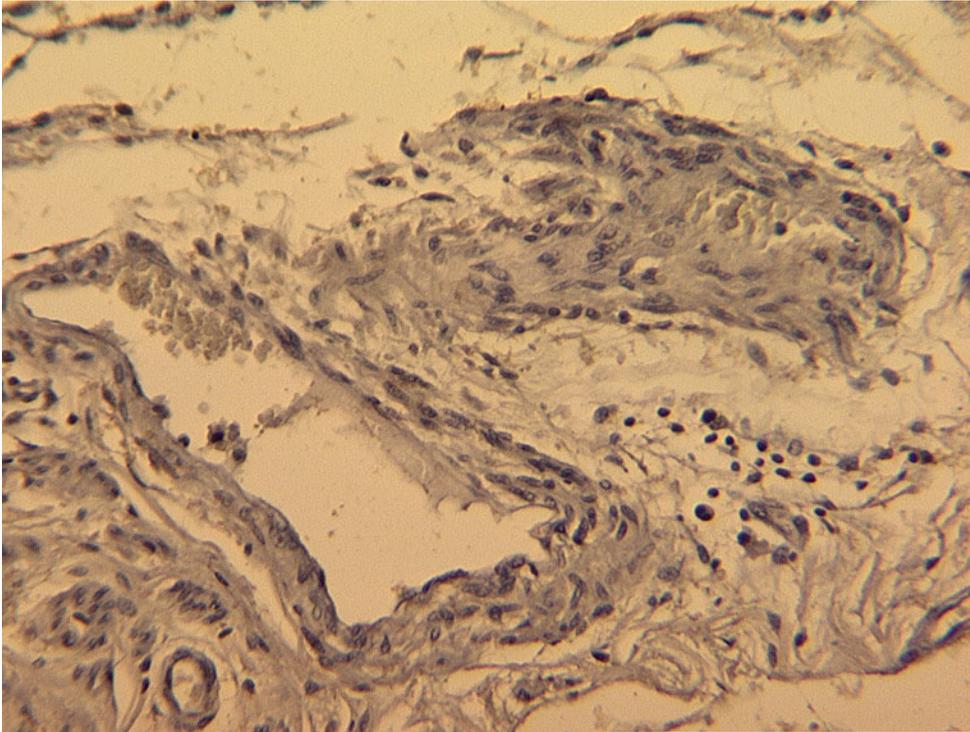


Abbildung 30 - EGFR-Färbung eines Müllerschen Mischtumors FIGO-Stadium IIIc

Bei den negativen EGFR Fällen gab es häufiger größere Tumore ($pT>2$) als bei Positiven. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

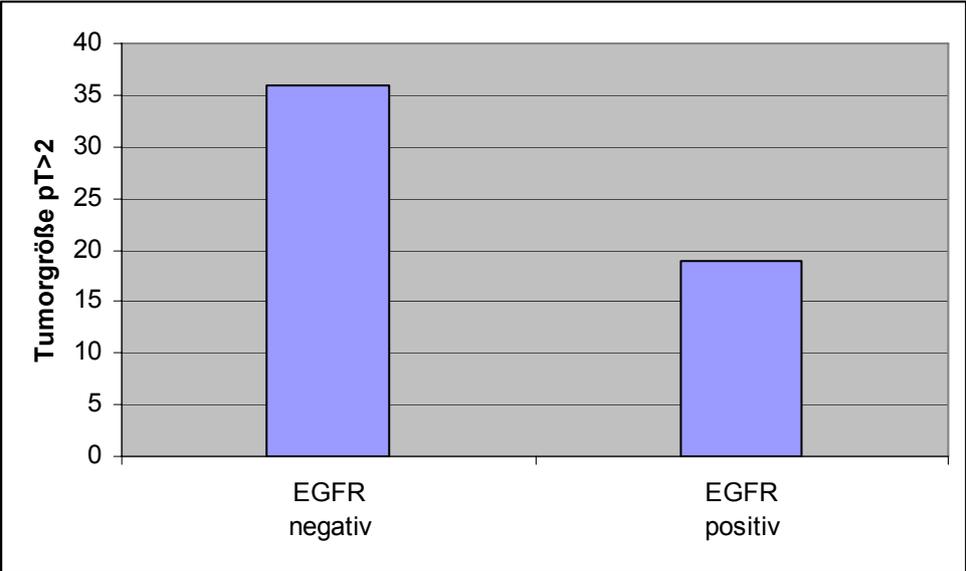


Abbildung 31 - Diagramm für Tumorgroße ($pT>2$) in Abhängigkeit von EGFR-IRS (n=78)

Es hat sich eine Tendenz ($p=0,07$) zwischen Lymphknotenmetastasierung und EGFR-Expression ergeben, wobei es häufiger Lymphknotenmetastasen bei den EGFR-negativen Fällen (17) gab als bei den Positiven (14).

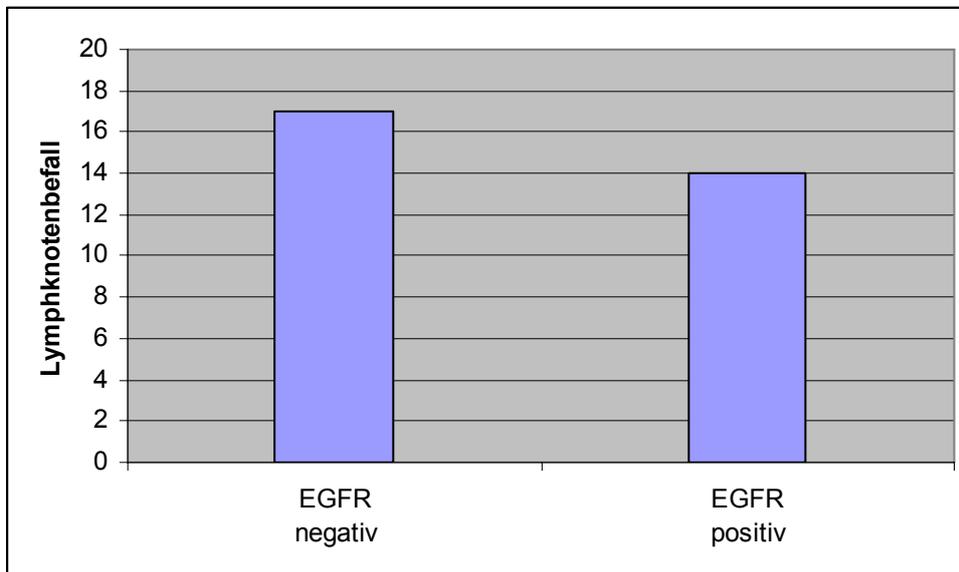


Abbildung 32 - Diagramm für Lymphknotenbefall in Abhängigkeit von EGFR-IRS, $p=0,07$, ($n=48$)

3.3.3 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

Insgesamt fanden sich bei 69 (77%) Patientinnen keine hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark. 21 (23%) Patientinnen hatten einen positiven Befund. Mit dem Medianwert von 2 lag die Anzahl der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zwischen 1 bis 31 pro 2 Millionen Zellen. Es gab keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Befall des Knochenmarks mit Tumorzellen und anderen Parametern außer mit Lymphknotenmetastasen. Hierbei wurde eine negative Korrelation zwischen Lymphknotenmetastasen und Vorhandensein von DTZ im Knochenmark beobachtet. Von den 17 Patientinnen ohne Lymphknotenbefall gab es 7 Fälle (41%) mit positivem Knochenmarkbefall und von 31 Patientinnen mit

Lymphknotenbefall gab es nur 4 (13%) Fälle mit positivem Knochenmarksbefund. Diese Differenz war mit einem $p=0,05$ statistisch signifikant.

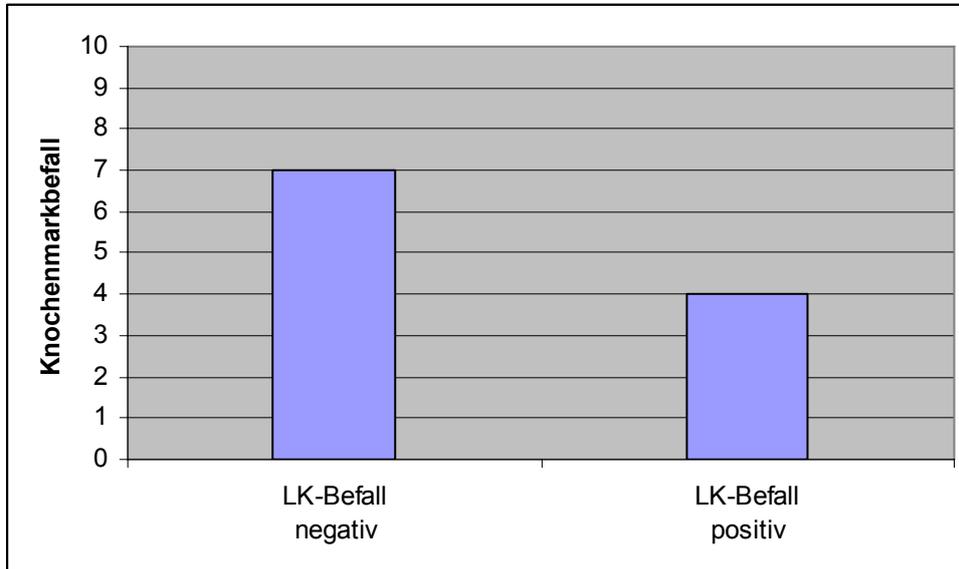


Abbildung 33 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von Lymphknotenmetastasen $p=0,05$, (n=48)

In diesem Zusammenhang wurde das Vorhandensein definierter Tumorantigene im Tumorgewebe und deren Korrelation mit dem Vorkommen der Tumorzellen im Knochenmark analysiert. Bei den negativen MIB-1 Fällen gab es häufiger hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark als bei den positiven Fällen. Eine signifikante Korrelation bestand aber nicht.

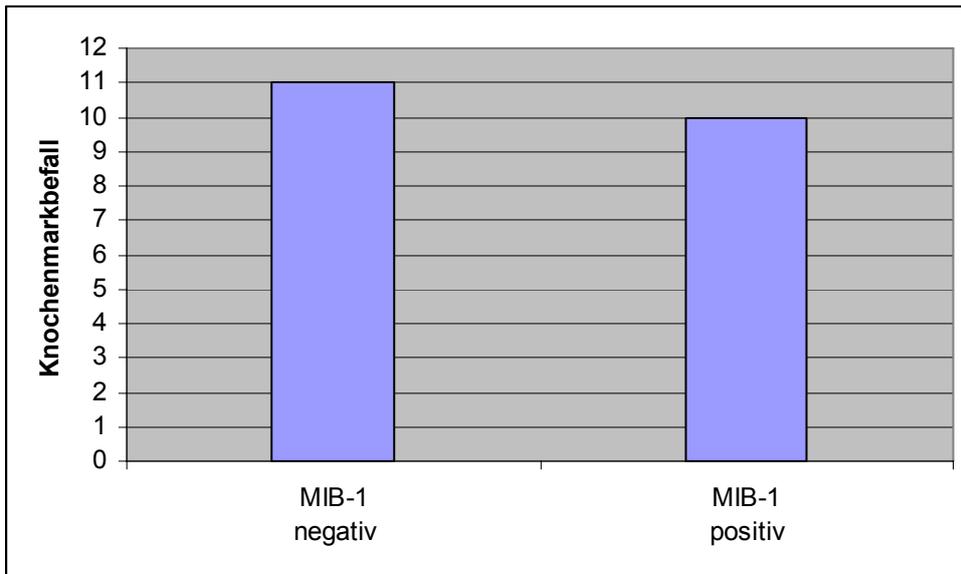


Abbildung 34 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von Anzahl MIB-1 gefärbter Zellen (n=90).

Die Disseminierung der Tumorzellen in das Knochenmark war bei den Fällen mit negativem p53 niedriger als bei den positiven Fällen, eine signifikante Korrelation bestand nicht.

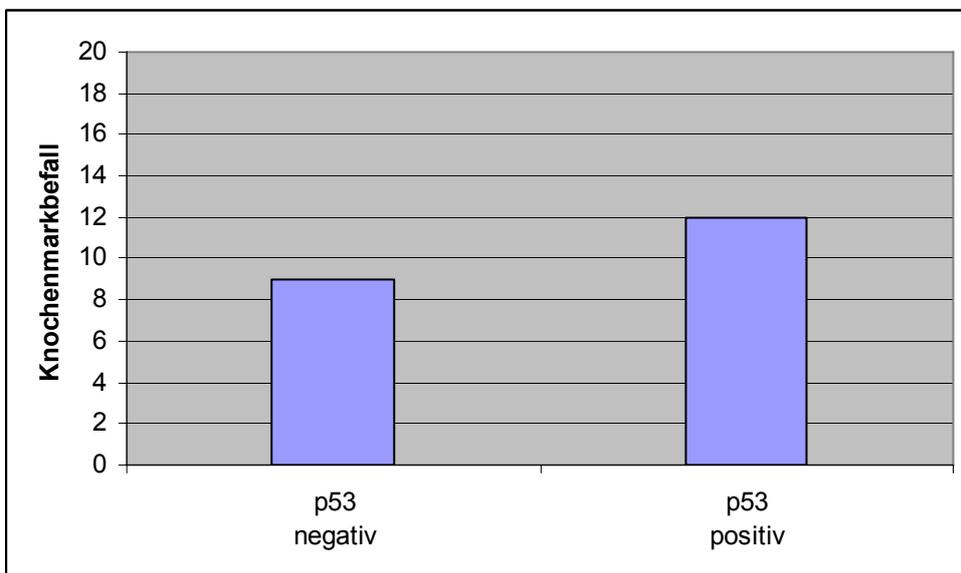


Abbildung 35 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von p53-IRS (n=90)

Bei den Topoisomerase II α negativen Fällen ist die Anzahl der Patientinnen mit Knochenmarkbefall höher als bei Topoisomerase II α positiven Fällen. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

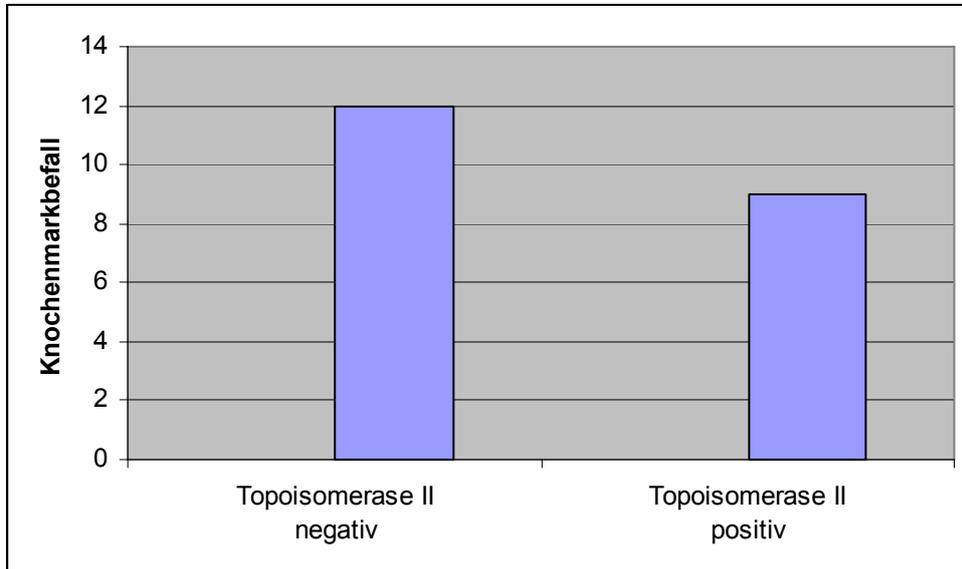


Abbildung 36 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von Topoisomerase II α -IRS (n=90)

Bei HER-2/neu positiven Fällen ist die Häufigkeit des Knochenmarkbefalls mit hämatogen disseminierten Tumorzellen niedriger. Der Unterschied zu den HER-2/neu negativen Fällen ist nicht statistisch signifikant.

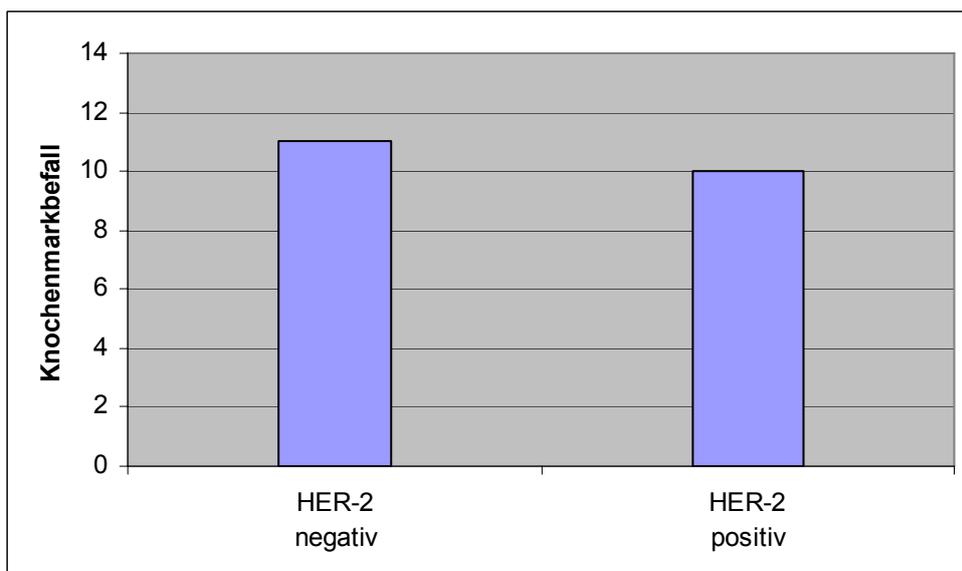


Abbildung 37 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von HER-2/neu-IRS (n=89)

Bei den nm23 negativen Fällen ist die Anzahl der Patientinnen mit Knochenmarkbefall höher als bei positiven Fällen, der Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

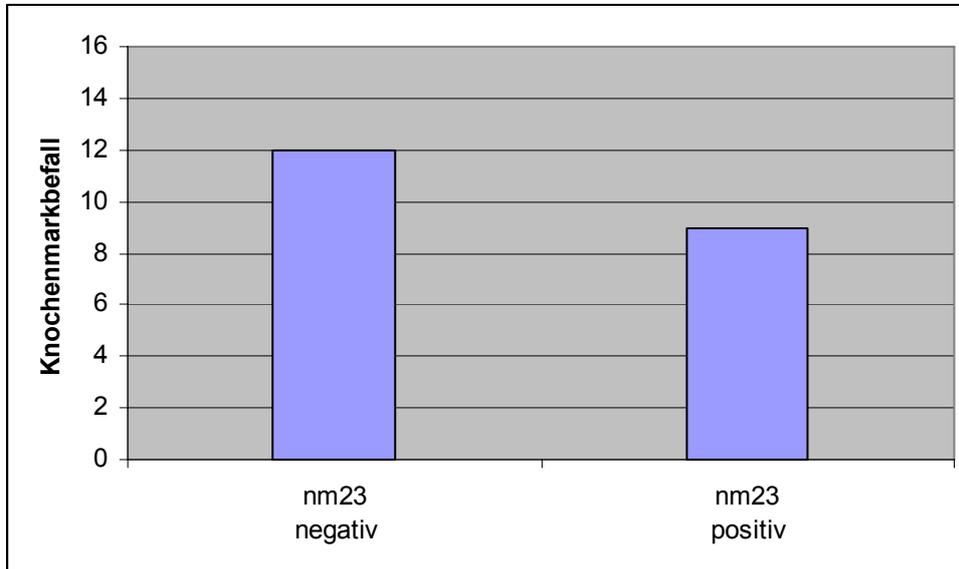


Abbildung 38 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von nm23-IRS (n=90)

Bei den EGFR negativen Fällen ist die Anzahl der Patientinnen mit Knochenmarkbefall höher als bei positiven Fällen, es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in den zwei Gruppen.

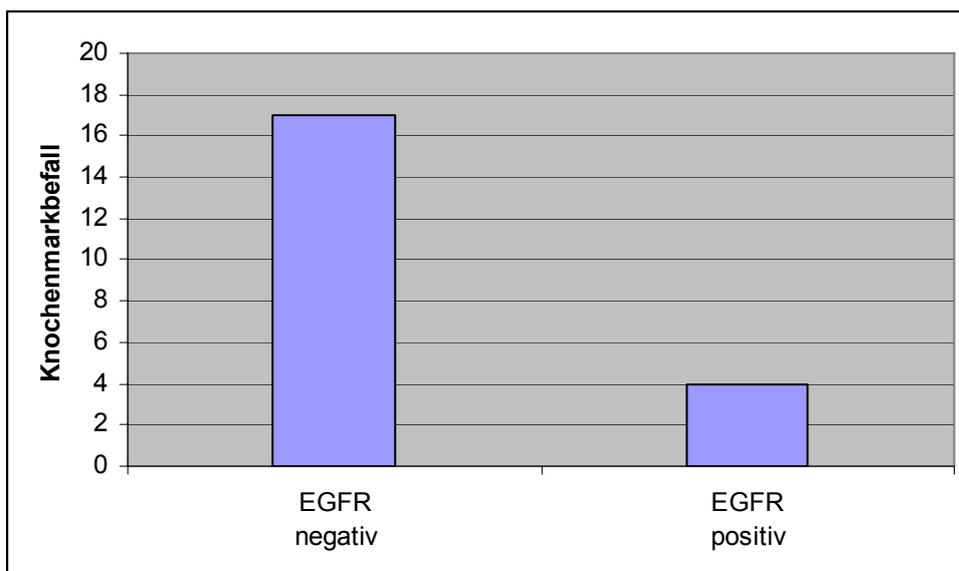


Abbildung 39 - Diagramm für Knochenmarkbefall mit Tumorzellen in Abhängigkeit von EGFR-IRS (n=90)

3.3.4 Korrelationsanalyse

Zwischen den histologischen und klinischen Parametern gab es signifikante Korrelationen. Tumorgröße war mit Grading ($p=0,008$) sowie postoperativem Tumorrest ($p<0,0001$), Aszites ($p<0,0001$), Peritonealkarzinose ($p<0,0001$), Lymphangiosis ($p=0,016$) und positivem Ki-67 ($p=0,014$) korreliert. Die Lymphknotenmetastasen waren mit Tumorgrading ($p=0,04$), Tumorrest ($p=0,04$), Aszites ($p=0,002$), Peritonealkarzinose ($p=0,056$) und negativ mit Knochenmarkbefall ($p=0,05$) assoziiert. Es gab auch signifikante Korrelationen zwischen Tumorgrading und Peritonealkarzinose ($p=0,015$) sowie Tumorrest ($p=0,015$). Zwischen Aszites und Peritonealkarzinose ($p<0,0001$) sowie Tumorrest ($p=0,04$), bzw. Lymphangiosis mit Aszites ($p=0,04$), Peritonealkarzinose ($p=0,02$) und Hämangiosis ($p<0,0001$) bestand eine signifikante Korrelation.

Bei den immunhistologischen Färbungen gab es ebenso signifikante Korrelationen. Ki-67-Positivität war mit Peritonealkarzinose ($p=0,013$) und nm23 mit Aszites signifikant korreliert. ($p=0,04$) Es gab eine negative Tendenz zwischen EGFR mit Lymphknotenmetastasen ($p=0,07$) sowie positive Tendenz zwischen Ki-67 und Topoisomerase II α ($p=0,06$). Eine signifikante Korrelation ($p=0,02$) hat sich zwischen p53- und HER-2-Expression ergeben.

	pT>2	pN	G	Rest	Asz	Pkar	LA	HA	KM	Ki67	p53	Top	HER	nm23	EGFR
pT>2	/	,122	,008	,000	,000	,000	,016	,111	,885	,014	,32	,46	,41	,26	,79
pN	,122	/	,04	,04	,002	,056	,59	,58	,015	,18	,64	,13	,90	,57	,07
G	,008	,04	/	,015	,33	,015	,30	,59	,80	,50	,11	,51	,12	,69	,96
Rest	,000	,04	,015	/	,04	,000	,41	,81	,41	,07	,84	,22	1,0	,36	,83
Asz	,000	,002	,33	,04	/	,000	,04	,15	,58	,14	,52	,88	,43	,015	,71
Pkar	,000	,056	,015	,000	,000	/	,02	,85	,49	,013	,19	,83	,24	,52	,59
LA	,016	,59	,30	,41	,04	,02	/	,000	,29	,48	,14	,55	,23	,38	,80
HA	,11	,58	,59	,81	,15	,85	,000	/	,55	,31	,31	,60	,45	,44	,81
KM	,88	,015	,80	,41	,58	,49	,29	,55	/	,80	,45	,61	,52	,87	,26
Ki67	,014	,18	,50	,07	,14	,013	,48	,31	,80	/	,14	,06	,76	1,0	1,0
p53	,32	,64	,11	,84	,52	,19	,14	,31	,45	,14	/	,29	,02	,67	,16
Top	,46	,13	,51	,22	,88	,83	,55	,60	,61	,06	,29	/	,36	,42	,46
HER	,41	,90	,12	1,0	,43	,24	,23	,45	,52	,76	,02	,36	/	,79	,93
nm23	,26	,57	,69	,36	,015	,52	,38	,44	,87	1,0	,67	,42	,79	/	,47
EGFR	,79	,07	,96	,83	,71	,59	,80	,81	,26	1,0	,16	,46	,93	,47	/

Tabelle 21 - Korrelationen der histologischen, klinischen und tumorbiologischen Faktoren

PT, TumorgroÙe; PN, Lymphknoten; G, Grading; Rest, Postoperativer Tumorrest; Asz, Aszites; Pkar, Peritonealkarzinose; LA, Lymphangiosis carcinomatosa; HA, Hämangiosis carcinomatosa; KM, Knochenmark; Top, Topoisomerase II α ; HER, HER-2/neu.

3.4 Follow-up Analyse

Bei einem durchschnittlichen Beobachtungszeitraum von 37 Monaten betragen die Mindestbeobachtungszeit zwei und die maximale 105 Monate.

3.4.1 Ergebnisse der Rezidiventwicklung (Disease free survival - DFS)

Das Rezidiv freie Intervall der Patientinnen lag zwischen einem und 105 Monaten (Median 15). Während der Beobachtungszeit haben insgesamt 63 (70%) Patientinnen nach zwei bis 88 Monaten (Median 12) ein Rezidiv entwickelt, Von denen 30 (33%) nur von einem lokoregionären Rezidiv und 33 (37%) von Fernmetastasen oder beiden Formen betroffen waren. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen Rezidiv freiem Überleben und folgenden Faktoren beobachtet (Tabelle 22).

Tumorgröße ($p < 0,001$), Lymphknotenmetastasen ($p = 0,044$), postoperativer Tumorrest ($p < 0,001$), Aszites ($p = 0,009$), Peritonealkarzinose ($p = 0,008$) und Hämangiosis carcinomatosa ($p = 0,008$)

In der multivariaten Analyse, waren die Tumorgröße ($p = 0,028$) und postoperativer Tumorrest signifikante unabhängige Variablen. Das relative Risiko für ein

Tumorrezidiv betrug für Patientinnen mit Tumorstadium $>$ FIGO II 2,62 (95% CI: 1,11 – 6,19), und für Patientinnen mit postoperativem Tumorrest 2,91 (95% CI: 1,36 – 6,22).

3.4.2 Ergebnisse der Fernmetastasenentwicklung (Distant disease free survival - DDFS)

Während eines Beobachtungszeitraums von zwei bis 69 Monaten (Median 14) haben 33 (37%) Patientinnen Fernmetastasen entwickelt. Von den untersuchten Parametern haben einige eine signifikante Korrelation mit der Entwicklung der Fernmetastasen gezeigt (Tabelle 22). Diese Faktoren sind Tumorgröße (PT>2) (p=0,002), Lymphknotenmetastasen (p=0,04), postoperativer Tumorrest (p=0,04), Aszites (p=0,01), Peritonealkarzinose (p=0,02) und Lymphangiosis carcinomatosa (p=0,03). Von den untersuchten tumorbiologischen Faktoren war Ki-67 (p=0,02) mit der Entwicklung von Fernmetastasen signifikant korreliert.

Eine signifikante Korrelation wurde ebenfalls zwischen dem Befall des Knochenmarks mit Tumorzellen (DTZ-KM) und Fernmetastasenentwicklung (p=0,04) beobachtet. Von 69 Patientinnen ohne Knochenmarkbefall hatten 22 (32%) Fernmetastasen. Bei 11 (52%) von 22 Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefall traten Fernmetastasen auf.

In der multivariaten Analyse war keiner der untersuchten Faktoren signifikant mit der Entstehung von Fernmetastasen assoziiert.

Metastasen-freies Überleben in Abhängigkeit vom KM-Status

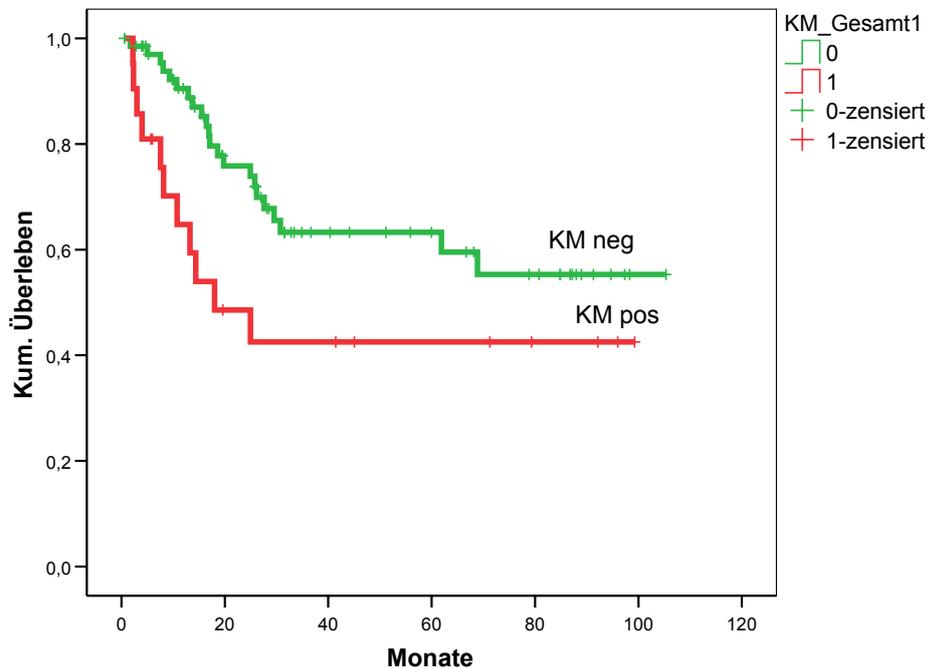


Abbildung 40 – Abhängigkeit des Fernmetastasen freien Intervalls mit hämatogen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM) ($p=0,04$)

3.4.3 Ergebnisse der Überlebensanalyse (Overall survival - OS)

Während des Beobachtungszeitraums sind 51 Patientinnen (57%) in Folge des Ovarialkarzinoms verstorben. Der Median der Überlebenszeit (2-105) war 27,5 Monate. Parameter, die mit dem tumorassoziierten Tod signifikant verbunden waren, sind die folgenden: Tumorgröße ($p=0,02$), Lymphknotenmetastasierung ($p=0,003$), Grading der Tumorzellen ($p=0,05$), postoperativer Tumorrest ($p<0,0001$), Aszites ($p=0,05$) und Peritonealkarzinose ($p=0,02$). Wie bei den Ergebnissen zu sehen ist, stellt der postoperative Tumorrest den bedeutendsten Faktor beim Überleben der Patientinnen dar. Von 39 Patientinnen mit postoperativem Tumorrest verstarben 28 (72%) in Folge des Ovarialkarzinoms. Dagegen starben von den 26 ohne Tumorrest nur 6 Patientinnen (23%).

Von den tumorbiologischen Faktoren war Ki-67 der Einzige, der eine signifikante Korrelation mit der verkürzten Überlebenszeit der Patientinnen darstellte (p=0,05). Dabei hat sich der Befall des Knochenmarks im Bezug auf Überleben wie die anderen restlichen Faktoren als nicht signifikanter Faktor herausgestellt (Tabelle 22).

	DFS	DDFS	OS
PT>2	0,0003	0,002	0,02
PN	0,044	0,04	0,003
G	0,15	0,12	0,05
Tumorrest	0,0004	0,006	0,0000
Asz	0,009	0,01	0,05
Pkar	0,008	0,02	0,02
LA	0,29	0,03	0,64
HA	0,008	0,15	0,32
KM	0,46	0,04	0,64
KI67 (med)	0,09	0,02	0,05
P53 (med)	0,42	0,99	0,16
Top (med)	0,71	0,78	0,51
HER2	0,96	0,33	0,87
Nm23 (med)	0,78	0,42	0,77
EGFR (med)	0,87	0,97	0,84

Tabelle 22 - Korrelationen zwischen histologischen, klinischen und tumorbiologischen Parametern mit Rezidiv freien Intervall (DFS, Disease Free Survival), Metastasen freien Intervall (DDFS, Distant Disease Free Survival) und Gesamtüberleben (OS, Overall Survival), univariat, log-rank-test

Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom postoperativem Tumorrest

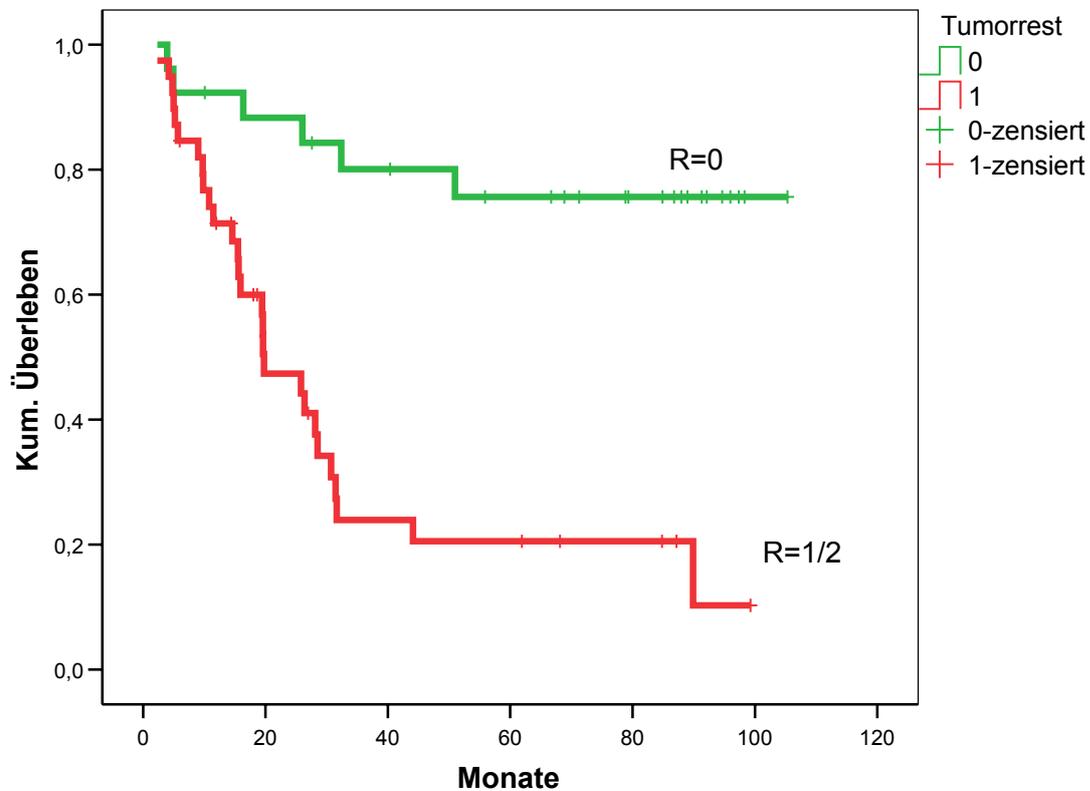


Abbildung 41 – Abhängigkeit des Überlebens (OS) vom postoperativen Tumorrest

Bei der multivariaten Analyse war der postoperative Tumorrest der einzige signifikante unabhängige Parameter für reduziertes Gesamtüberleben ($p=0,021$). Das relative Risiko für Tumor bedingten Tod war um den Faktor 4,61 (CI 1,262 – 16,85) erhöht, falls keine R0 Resektion erreicht werden konnte.

4 Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist in Bezug auf die Überlebenschance eines der ungünstigsten Malignome der Frau. In Deutschland sterben jährlich 7000 Frauen an den Folgen dieser Erkrankung. Trotz Fortschritten in der Diagnostik und Therapie ist die Mortalität während der letzten zwei Jahrzehnte nur minimal zurückgegangen. Die Fünfjahres-Überlebensrate der Patientinnen hat sich von 36% im Jahr 1975 auf 39% im Jahr 1990 erhöht und wird laut Statistik auf 40% im Jahr 2003 geschätzt (*Stone et al., 2003*). Ursachen für die schlechte Prognose des Ovarialkarzinoms sind erstens die Tatsache, dass es noch keine etablierte Screeningmethode zur Früherfassung dieser Erkrankung gibt, und zweitens das Fehlen klinischer Frühsymptome. Dies führt dazu, dass das Ovarialkarzinom bei 75-80% der Patientinnen erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III und IV diagnostiziert wird (*Meden et al., 1996*).

Nach dem heutigen Wissensstand sind die wichtigsten Prognoseparameter beim Ovarialkarzinom das Tumorstadium, die Größe des postoperativen Tumorrests, der histologische Typ, der Differenzierungsgrad der Tumorzellen und das Alter bei der Diagnosestellung. Dennoch gibt es unterschiedliche Verläufe innerhalb identischer Prognosegruppen. Aufgrund dieser Problematik wird ergänzend zu den bereits etablierten Prognosefaktoren nach weiteren Parametern bezüglich der Aggressivität und Metastasierungspotentials von Ovarialkarzinomen gesucht.

Obwohl Patientinnen mit Ovarialkarzinom meist an den Folgen des lokoregionären Tumorwachstums sterben, haben Autopsiestudien eine häufige hämatogene Metastasierung in ferne Organe nachgewiesen (*Braun et al., 2001*). Dauplat et al. haben 1987 die Inzidenz der Fernmetastasierung bei einem Kollektiv von 255 Patientinnen mit epitheliale Ovarialkarzinom untersucht. In dieser Studie wurden

bei 62% der Patientinnen intraabdominelle und bei 38% Fernmetastasen in der Pleura (24,7%), Leber (9,4%), Lunge (7,1%), Lymphknoten (7,1%), Haut (3,5%), Perikard (2,4%), ZNS (2,0%) und Knochen (1,6%) nachgewiesen. Noch teilweise höhere Metastasierungsraten in diesem Zusammenhang wurde von Bonnefoi et al. 1999 mit Fernmetastasierungen in Pleura (33%), Leber (26%), Lymphknoten (14%) und Lunge (3%) sowie multiplen Metastasenlokalisationen bei einem Viertel bis Hälfte der Patientinnen im FIGO Stadium IV angegeben. Metastasen können in jedem Tumorstadium auftreten. Die mediane Überlebensdauer der Patientinnen mit Pleurametastasen beträgt 6 Monate ab dem Zeitpunkt der Diagnose, mit Lebermetastasen 5 Monate, Lungenmetastasen 8 Monate, Lymphknotenmetastasen 9 Monate, subkutanen Metastasen 12 Monate, Perikardmetastase 2,3 Monate, ZNS-Metastasen 1,3 Monate und Knochenmetastasen 4 Monate (*Dauplat et al., 1987*).

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom metastasiert im weiteren Verlauf etwa ein Drittel der nodal-negativen Patientinnen, obwohl zum Zeitpunkt der Primärdiagnose kein Tumorbefall der axillären Lymphknoten nachgewiesen werden kann (*Gerber et al., 2001*). Der Ursprung dieser Metastasierung wird von einer frühzeitig in der Erkrankung auftretenden, okkulten hämatogenen Streuung von Tumorzellen vermutet. Hämatogene Tumorzell dissemination ist definitionsgemäß ein Auftreten von Zellen des Primärtumors über den Systemkreislauf in tumorfernen Körperkompartimenten. Diese disseminierten Tumorzellen sind dann z.B. in einem Lymphknoten immunhistochemisch nachweisbar. Auf dem hämatogenen Weg finden sich DTZ im Knochenmark wieder, hier sind sie ebenfalls immunhistochemisch nachweisbar (*Janni et al. 2004*).

Seit Mitte der achtziger Jahre können einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark über den immunzytochemischen Nachweis des epithelialen Zytokeratins auch bei klinisch metastasen-freien Patienten gefunden werden (*Kufer,*

2000). Da epitheliale Zellen im Knochenmark natürlicherweise nicht vorkommen, ist ihr Nachweis ein Indikator einer hämatogenen Streuung des Primärtumors. Die Genfamilie der Zytokeratine (CK), die als Marker für disseminierte Karzinomzellen im Knochenmark, Blut und Lymphknoten eingesetzt werden, besteht aus mehr als 20 Mitgliedern (*Janni et al., 2004*). In der vorliegenden Studie wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3, der unter anderem gegen Heterodimere aus CK-8/18 und CK-8/19 gerichtet ist, eingesetzt. In umfangreichen Kontrollexperimenten an Knochenmarkproben von fast 200 Patienten ohne nachweisbares Karzinom wurde belegt, dass normale Knochenmarkzellen zu 99 Prozent nicht mit A45-B/B3 reagieren (*Janni et al., 2004*).

Beim Mammakarzinom wurde ein Zusammenhang zwischen isolierten Tumorzellen im Knochenmark mit der Tumorgröße, dem axillären Lymphknotenbefall, dem Tumorgrading (*Braun et al., 2000*), einer Hämangiosis carcinomatosa und zum Teil negativem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen, also ungünstigen Eigenschaften des Primärtumors (*Janni et al., 2004*). Ebenso wurde ein Zusammenhang mit Progesteronrezeptoren, aber keine Korrelation zu Östrogenrezeptoren festgestellt (*Diel et al., 1992*). Die Präsenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark gilt als unabhängiger Prognosefaktor für das Rezidiv freie, Metastasen freie und Gesamtüberleben in allen Stadien dieser Erkrankung (*Braun et al., 2000b*).

Während die prognostische Relevanz des Nachweises isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose mit der späteren Metastasierung des Tumors als gesichert gilt (*Braun et al., 2001, Solomayer et al., 2001, Janni et al., 2004, Fehm et al., 2006*), wird die klinische Relevanz dieser Befunde bei anderen Karzinomentitäten wie dem Ovarialkarzinom noch untersucht.

Obwohl gynäkologische Malignome wie Zervix- oder Ovarialkarzinom ein vorwiegend lokoregionäres Wachstumsmuster aufweisen, ist bei Patientinnen, bei denen DTZ im Knochenmark nachgewiesen wurden, eine kürzere Überlebenszeit beschrieben (*Braun et al., 2001, Janni et al., 2003*). Dadurch, dass diese Malignome relativ selten ins Knochenmark metastasieren, ist die Persistenz von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarial- (37%), Zervix- (26%) und Endometriumkarzinom (17%) ein Hinweis dafür, dass die Tumorzeldissemination ein generalisiertes Phänomen bei epithelialen Tumoren darstellt (*Fehm et al., 2006*).

Auch bei anderen Karzinomentitäten wie Ösophagus- sowie Lungenkarzinom ist der Nachweis von DTZ im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose für die Patienten korreliert (*Passlick et al., 2000*).

Ebenso legt das Auftreten von Rezidiven trotz kurativer lokoregionärer Therapie bei gleichzeitiger Abwesenheit von Fernmetastasen in über 30% beim Magenkarzinom (*Kerner et al., 2004*) und 44% beim Ovarialkarzinom, von denen über 40% extraperitoneal lokalisiert sind (*Rubin et al., 1991*), nahe, dass eine generalisierte okkulte Tumorzeldissemination und dementsprechend eine systemische Tumorerkrankung schon zum Zeitpunkt der Operation vorliegen kann.

Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko zum Zeitpunkt der Primärdiagnose durch Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu identifizieren.

In unserem Patientinnenkollektiv war das Auftreten von Fernmetastasen signifikant mit der Präsenz von DTZ korreliert. Während nur 32% der Patientinnen ohne DTZ eine Fernmetastasierung erlitten, war der Anteil bei Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefall mit 52% signifikant höher.

In der vorliegenden Studie waren alle Patientinnen im Rahmen der Primäroperation auf hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark untersucht worden. Die

Präsenz dieser Zellen könnte als ein Prognoseindikator im Bezug auf Krankheitsverlauf sowie Metastasierungspotential des Primärtumors eine klinische Relevanz finden.

Eine wesentliche Fragestellung hierbei ist, welche Faktoren des Primärtumors eine hämatogene Streuung begünstigen. Aus diesem Grunde wurden die Primärtumoren auf verschiedene biologische Faktoren untersucht.

Die immunhistochemische Färbung der Präparate mit dem MIB-1 Antikörper zeigte Expressionsraten zwischen 5-95%. Bei der MIB-1 Färbung, die die Zellen in der Proliferationsphase gegenüber der Ruhephase nachweist, ist die Intensität der Färbung kein aussagekräftiges Merkmal. Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung der Präparate die Färbeintensität nicht berücksichtigt.

Bei einem Medianwert von 30%, der als cut-off übernommen wurde, gab es bei der MIB-1 Färbung insgesamt 53 positive Fälle. Dieser Wert liegt im Bereich anderer Studien, wie Garzetti et al. mit 27% und Schindlbeck et al. 2005 mit 28% MIB-1 Positivitätsrate zeigten.

Im Vergleich mit den tumorbiologischen Parametern zeigte sich eine Korrelation zwischen MIB-1 Expression und Tumorgroße sowie Peritonealkarzinose. Die Patientinnen mit negativem MIB-1 Tumorgewebe hatten tendenziell öfters einen Knochenmarkbefall als Patientinnen mit positivem MIB-1 Tumorgewebe. Der Unterschied des Knochenmarkbefalls in den zwei Gruppen war statistisch nicht signifikant. Wie einleitend erwähnt, ist MIB-1 ein monoklonaler Antikörper, der das nukleare Ki-67 detektiert, welches nur in der proliferativen Phase der Zelle expremiert ist. Dieses Antigen hat sich in zahlreichen Studien als Proliferationsmarker erwiesen. In einer Studie, die 80 Patientinnen mit benignem, Borderline- sowie malignem Ovarialtumor umfasste, haben Darai et al. 1998 gezeigt,

dass die MIB-1 Expression dem Anteil an wachsenden Tumorzellen entspricht. Sie registrierten proliferative Aktivität (Ki-67 Expression) bei 12% der benignen Tumore. Der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen der Borderline Tumore war mit 40% nicht signifikant höher als bei den Benigen, wohl aber signifikant niedriger als bei Karzinomen mit 70% Ki-67 positiven Zellen. Dieses Ergebnis wurde auch von Garzetti et al. berichtet.

Hinsichtlich des Metastasen freien Intervalls sowie Gesamtüberlebens ergaben sich signifikante Korrelationen zur KI-67 Expression. Dieses Ergebnis stimmt mit der Studie von Layfied et al. 1997 überein, in der bei den Ovarialkarzinompatientinnen in fortgeschrittenem Tumorstadium mit hoher MIB-1 Expression ($\geq 15\%$) das Median der Überlebenszeit 16 Monate und mit niedriger MIB-1 Expression ($< 15\%$) 30 Monate betrug. Das kürzere Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen mit MIB-1 Überexpression wird auch in der Studie von Terlikowski et al. 1999 präsentiert.

Die Mutation des p53-Gens trägt zur Entstehung von 50-60% aller menschlichen Malignome bei (*Nijman et al., 1999*), und Veränderungen des Tumorsuppressorgens p53 sind das am häufigsten erforschte molekulare Ereignis beim Ovarialkarzinom. Studien zeigten den positiven Einfluss des Wildtyps von p53 bei Reduktion des metastatischen Potentials und Invasionsfähigkeit vieler Tumore und Tumorzelllinien. Chen et al. haben 2003 in einem Versuch gezeigt, dass die Induktion von endogenem oder Injektion von exogenem p53-Protein in die Tumorzellen mit Reduzierung des Metastasierungspotentials verschiedener Tumore korreliert ist. Sie berichten, dass die Akkumulation des Wildtyp-p53 im Magenkarzinom mit niedrigerer Metastasierung vergesellschaftet ist und die Applikation von p53 als Aerosol das Wachstum der Metastasen in der Lunge verhindern kann. Im Gegensatz dazu gibt es auch Veröffentlichungen über den negativen Effekt des mutierten p53 bei der

Tumorprogression und Metastasenbildung (*Patel et al., 1997, Nijman et al., 1998, Yang et al., 2001*).

Wenham et al. haben 2002 in einem Versuch gezeigt, dass die Häufigkeit der Überexpression von mutiertem p53 in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomstadien III/IV mit 40-60% signifikant höher ist im Vergleich zu dem Stadium I mit 10-20%. Diese Korrelation der p53-Überexpression hat sich in unserer Studie nicht bestätigen lassen. Die p53-Färbung konnte bei allen Präparaten durchgeführt werden. Zwei Präparate waren bei dieser Färbung komplett negativ. Skirnisdottir et al., berichten 2004 über eine p53-Expression von 36% der Fälle beim Ovarialkarzinom und Coronado et al., 2007 von 25%. Dieser Wert variiert zum vorliegenden Patientinnenkollektiv, in dem nur zwei Präparate keine Färbung darstellten. Der Medianwert der IRS lag bei 6, womit 50% der Präparate als positiv zur Geltung kamen und die Ergebnisse mit einer Positivitätsrate von 50% ausgewertet wurden. Bei anderen Studien, z.B. von Lee et al. zum Magenkarzinom, wird eine p53-Positivität bei einer Expression von über 15% gefärbter Zellen angenommen. Bei der Studie von Schindlbeck et al. werden die immunhistologischen Präparate von Mammakarzinomen abgesehen von der Färbeintensität und nur nach dem Kriterium „Median der positiven Zellzahlen“ für p53, Ki-67 und Topoisomerase II α ausgewertet. Die Ergebnisse vieler Veröffentlichungen über die schlechtere Prognose der Patienten mit p53-Überexpression wie bei Ovarialkarzinom- (*Becker et al., 2006, Levesque et al., 1995*) oder Magenkarzinompatienten (*Lee et al., 2003*) haben sich in unserer Studie nicht bestätigen lassen. Es hat sich keine signifikanten Korrelationen zwischen p53-Expression mit histologischen und klinischen Parameter wie Tumorstadium sowie Gesamtüberleben der Patientinnen ergeben. Die Anzahl von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark war bei den positiven p53-Fällen

höher, eine signifikante Korrelation zwischen p53-Expression mit DTZ im Knochenmark bestand aber nicht.

Die Topoisomerase II α -Färbung war problemlos auswertbar. Bei einem IRS-Median von 4 gelten insgesamt 47% der Präparate als positiv. Depowsky et al. berichten 2000 von einer Topoisomerase II α -Positivitätsrate von 32% bei Mammakarzinompatientinnen und signifikante Korrelationen zwischen Topoisomerase II α -Überexpression mit reduziertem Gesamtüberleben, fortgeschrittenem Tumorstadium, positivem Nodalstatus sowie einer HER-2/neu-Genamplifikation. Diese Korrelationen wurden auch von Rosenthal et al. 2000 berichtet, die sich jedoch in unserer Patientinnenkollektiv nicht bestätigten. Topoisomerase II α spielt eine Schlüsselrolle bei der DNA-Replikation. Veränderte Expression der Topoisomerase II α wurde bei vielen Krebserkrankungen wie AML, CLL, kleinzelligem Bronchialkarzinom, Kolon-, Mamma- und Ovarialkarzinom beobachtet (*Oncogen Research Products, spec. Sheet, 2000*).

In der Studie von Rosenthal et al. mit 184 Mammakarzinompatientinnen war die Topoisomerase II-Expression mit Verkürzung des Überlebens sowie fortgeschrittenem Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen korreliert. In der Studie von Costa et al. 2000 sowie Schindlbeck et al 2005 bei einer Kollektiv von 265 Mammakarzinompatientinnen wurde eine Korrelation zwischen Topoisomerase II mit MIB-1 und Tumor S-Phasenfraktion beobachtet. In dem vorliegenden Kollektiv haben wir eine Tendenz zur gemeinsamen Expression von MIB-1 und Topoisomerase II ($p=0,06$) beobachtet. Da Topoisomerase II in der Replikationsphase der Zelle vorhanden ist, kann man die beiden Faktoren als prognostisch relevante Proliferationsmarker für mitotische Aktivität der Tumorzellen bezeichnen.

Topoisomerase II α -Überexpression ist in einer Bandbreite von 30% - 70% der epithelialen Ovarialkarzinome nachweisbar (*Mano et al. 2004*). Diese Autoren

berichten in ihrer Studie von 21,4% Positivitätsrate und einem cut-off von 10% gefärbter Zellen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Da in dieser Studie von Topoisomerase IIa-Genamplifikationen und Protein-Überexpression in ausschließlich fortgeschrittenem Tumorstadium (FIGO III/IV) berichtet wird, könnte dieses Ergebnis laut den Autoren so interpretiert werden: Topoisomerase II hat eine prognostische Signifikanz beim Ovarialkarzinom und die Ansprechrate von Topoisomerase II-Inhibitoren sollte bei Patientinnen in diesen Karzinomstadien höher sein.

Obwohl die Gene von Topoisomerase II und HER-2/neu beide auf dem Chromosom 17 und nahe beieinander lokalisiert sind (*Oncogen Research Products, Spec. Sheet, 2000*) und bei vielen Studien (*Rosenthal et al., 2000, Depowski et al., 2000, Cardoso et al., 2004*) auf eine signifikante Korrelation zwischen HER-2/neu -Amplifikation und erhöhter Topoisomerase II-Expression hingewiesen wird, hat sich diese Korrelation in der vorliegenden Studie nicht bestätigen lassen.

Die HER-2/neu-Färbung war bei 89 Präparaten gelungen. Ein Präparat war nicht auswertbar. In der Literatur wird die HER-2/neu-Expression in einer Bandbreite von 5-66% beobachtet (*Crijns et al., 2006*). Slamon et al. berichteten 1989 von einer Überexpression des HER-2/neu Proto-Onkogens in maximal 30% der Mamma- und Ovarialkarzinome. Bei Auswertung nach dem 0- 3+ Score berichten Bookman et al. 2003 über 66% 2+positive und 34% 3+positive HER-2 Fälle. Coronado et al. berichten 2007 von einer HER2-Färbung in 24,2% der Fälle beim Ovarialkarzinom. In dem vorliegenden Patientinnenkollektiv war die HER-2-Überexpression in 37 / 89 (41,9%) der Fälle zu beobachten.

HER-2/neu hat sich inzwischen beim Mammakarzinom als ein prognostischer Faktor bewährt, aber seine Rolle bei anderen Karzinomen wird noch diskutiert. Meden et al. berichten, dass in vielen Studien zum Ovarialkarzinom sich die Überexpression des p185 Proteins als ein neuer Prognosefaktor bewiesen hat. In dieser Studie haben die

statistischen Analysen gezeigt, dass die Überexpression von p185 mit einer ungünstigen Tumorbiologie verbunden ist und diese Fälle eine signifikant schlechtere Prognose gegenüber den normalen Fällen aufweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Studien von Slamon et al. sowie Berchuck et al. überein. Im Gegensatz dazu haben Haldane et al. keinen statistisch signifikanten Unterschied ermittelt. Coronado et al. bezeichnen 2007 HER-2 als einen unabhängigen Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom.

In der Studie von Chuang et al. 2002 wurde die Progression des Malignoms und die Metastasierung infolge einer HER-2/neu-Überexpression in vivo und in vitro dargestellt. Außerdem haben die klinischen Daten gezeigt, dass die Überexpression des HER-2/neu-Gens mit der Reduktion des Östrogen-Rezeptors korreliert ist. Patientinnen mit HER2-Überexpression sprachen weniger auf die Therapie mit Tamoxifen an (*Gabriel et al. 2002*). In der Studie von Lee et al. bei Magenkarzinompatienten wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Fünfjahres-Überlebensrate von HER2-neu positiven (62,9%) und negativen (68,9%) Fällen beobachtet.

In unserer Studie hat sich zwischen HER-2/neu- und p53-Überexpression eine signifikante Korrelation ($p=0,02$) ergeben, was den Ergebnissen vieler Studien in dieser Hinsicht entspricht (*Tomic et al., 2003, Yamashita et al., 2004*). Caduff et al. haben bei 7% der Ovarialkarzinome und Wenham et al. bei 20% eine Überexpression von HER-2/neu beobachtet.

Der höhere HER2-score bei den gut differenzierten (G I) im Vergleich zu den schlecht differenzierten (G III) Tumorzellen in unserem Kollektiv widerspricht den Ergebnissen der Studien von Tomic et al. 2003 und Coronado et al. 2007, bei denen eine HER-2-Überexpression mit höherem Grading der Tumorzellen assoziiert war. Zwischen anderen histologischen und klinischen Parameter und diesem Faktor hat

sich keine signifikante Korrelation ergeben. Ebenso war der Befall des Knochenmarks nicht mit einer HER-2-Überexpression korreliert.

Die Färbung der Präparate gegen das nm23-Antigen gestaltete sich am sensibelsten. Die Präparate mussten sehr sorgfältig und präzise bearbeitet werden. Die gefärbten Präparate waren zu 43% schwach, 35% moderat und nur ein einziges Präparat war stark gefärbt. Von den insgesamt 90 untersuchten Gewebeschnitten waren 83% nm23-positiv, wobei in anderen Studien von einer nm23-Expression von 29% bei Ösophaguskarzinom (Patel et al., 1997) oder 48% beim Mammakarzinom (Gonzales et al., 1995) berichtet wird. Baekelandt et al. haben 1999 bei immunhistochemischer Färbung des Ovarialkarzinoms eine Expressionsrate von 72%, mit 41% moderaten und 31% stark gefärbten Gewebeschnitten, erzielt. Mit einem IRS-Median von 2 gab es in dem vorliegenden Patientinnenkollektiv 40% nm23-positive Fälle.

Es wurde beobachtet, dass die Expression von nm23 auf der mRNA- oder Proteinebene beim Mammakarzinom umgekehrt korreliert ist mit dem Stadium und Differenzierungsgrad des Primärtumors (Bei et al., 1998). Bei Tumoren im späteren Stadium mit schlechtem Differenzierungsgrad wurde nm23 mit niedrigerer Expression beobachtet. Gleichzeitig war die Rezidivrate höher und das Überleben der Patientinnen kürzer (Bei et al., 1998). Bei vielen Neoplasien wie Mamma-, Ovarial-, Zervix- sowie Hepatozellularkarzinom wurden niedrige Expression von nm23 im Zusammenhang mit höherem Metastasierungspotential sowie kürzerem Gesamtüberleben der Patienten beobachtet (Bazan et al., 2002). Gonzalez et al. haben 1995 gezeigt, dass die Transfektion der nm23-H1 Gene in Mammakarzinom- und Melanomzellen mit einer signifikant niedrigeren Metastasierungs-kapazität in den transfizierten Tumorzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe verbunden ist. Nach der Transfektion des nm23 Gens in die metastasierenden MDA-MB-435

Mammakarzinomzelllinie konnten die Tumorzellen die Bildung von duktalem Strukturen, die Synthese der Basalmembran und der Sialomucine reaktivieren. Ebenso zeigte ein Versuch von Charpin et al. 1997, dass die Transfektion der nm23-1 cDNA in die Maus K-1735-Melanomzellen bzw. humane nm23-H1 cDNA in die MDA-MB-435-Mammakarzinomzelllinie, ein reduziertes Metastasierungspotential der Tumorzellen in vivo zur Folge hat und die Migrationsfähigkeit der Zellen als Antwort auf verschiedene Zytokine abnimmt. Li et al. haben 2006 über teilweise andere Ergebnisse als die bisherigen berichtet. In ihrer Studie zum Ovarialkarzinom setzten sie andere Nachweismethoden wie RT-PCR, Northern Blot und In-situ-Hybridisierung ein und wiesen eine höhere nm23-mRNA Konzentration in den ovariellen Tumoren nach als in normalem Gewebe. Die Expression in den frühen Tumorstadien war aber höher als in den fortgeschrittenen Stadien. Dieses Ergebnis entspricht den meisten Studien, die nm23 als einen Antimetastasierungsfaktor identifizierten. In den frühen Stadien war die nm23-Expression mit der Differenzierung der Tumorzellen korreliert, wobei die gut differenzierten Zellen eine höhere Expression dargestellt haben.

Die antimetastatische Wirkung des nm23 Faktors wurde von Gao et al. 2004 in einem Experiment nachgewiesen. Nach der subkutanen Transplantation von humanen Ovarialkarzinomzelllinien mit unterschiedlich hohem Metastasierungspotential in die Flanken von Versuchsmäusen wurde die Entwicklung der fokalen Lungenmetastasen in verschiedenen Zeitintervallen untersucht. Hohe Expressionslevel der nm23-mRNA und des Proteins in den transplantierten Ovarialkarzinomzellen war mit niedrigerer Metastasenbildung in den Versuchsmäusen korreliert.

In der vorliegenden Studie haben wir eine signifikante inverse Korrelation zwischen nm23-Expression und Aszitesbildung beobachtet. Der IRS-Mittelwert der Fälle mit Aszitesbildung war signifikant niedriger (2,70) als derjenige ohne Aszites (3,44).

Dieses Ergebnis kann die positive Wirkung von nm23 auf die Tumorcharakteristik bestätigen. In zahlreichen Studien wurde nm23 als ein Antimetastasierungsfaktor nachgewiesen (*Granberg et al., 2000, Tomic et al., 2003*). Im Gegensatz zu der Studie von Gonzales et al. beim Mammakarzinom hat jedoch in unserem Kollektiv die nm23-Expression keinen positiven Einfluss auf die Lymphknoten- oder Fernmetastasierung ergeben. Eine signifikante Korrelation der nm23-Expression zu anderen histologischen oder klinischen Faktoren, sowie zur hämatogenen Disseminierung der Tumorzellen in das Knochenmark haben wir nicht beobachtet.

Zahlreiche Studien unterstützen die Hypothese, dass das p53-Protein einen regulatorischen Effekt auf die nm-23-Expression hat und die Änderung seines Expressionslevels abhängig vom p53-Protein ist. Mammakarzinomzellen mit hohem P53-Protein-Level haben auch eine höhere nm23-Expression dargestellt (*Chen et al., 2003, Gonzales et al., 1995, Kim et al., 1995*). Chen et al. fanden einen positiven regulatorischen Effekt von p53-Protein auf das nm23-Gen. In unserem Patientinnenkollektiv wurde diese Korrelation nicht bestätigt. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte, wie von Chen et al. auch erwähnt, daran liegen, dass nur der Wildtyp-p53 ein Upregulator für nm23 darstellt. Dadurch, dass in unserer Studie der immunhistochemische Nachweis des Tumorgewebes mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper sowohl den Wildtyp als auch den mutierten p53-Protein mit seiner wesentlich längeren Halbwertszeit zur Darstellung brachte, haben wir keine Korrelation zwischen den beiden Faktoren nachweisen können.

Bei einem Drittel der epithelialen Karzinome, wie kleinzelligem Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren, Mamma-, Magen-, Prostata-, Ovarial- und Kolorektalkarzinom, sowie Glioblastom ist eine Überexpression von EGFR zu beobachten (*Firma Dako, Spec. Sheet*).

In einer Studie von De Jong et al. 1998 wurden Patienten mit primärem Leberzellkarzinom sowie Lebermetastasen auf EGFR untersucht. Eine positive EGFR-Expression wurde in 30% der primären Lebertumore und 13% der Lebermetastasen registriert. Keine signifikanten Korrelationen wurden zwischen immunhistologischen Ergebnissen von EGFR mit anderen Parametern beobachtet. In der Studie von Berchuck et al. mit 79% positiven Fällen (58/73) war die Überlebensdauer der Ovarialkarzinompatientinnen mit positivem EGFR signifikant kürzer als die mit EGFR-negativen Tumoren. Crijns et al. berichten 2006 auch von der Verkürzung der Fünfjahres-Überlebensrate der EGFR-positiven Fälle im Vergleich zu den negativen Fällen. Meden und Kuhn haben in ihrer Studie mit 266 Ovarialkarzinompatientinnen keine signifikante Korrelation zwischen EGFR positiven und negativen Fällen im Hinblick auf die Überlebensdauer nachweisen können. Sie haben auch berichtet, dass nur in 3% der Fälle eine gemeinsame Überexpression von EGFR (HER-1) und HER-2/neu zu finden ist. In der vorliegenden Studie bestand zwischen den Expression der genannten Rezeptoren keine Korrelation.

Nielsen et al. berichteten 2004 in einer Studie mit 783 Ovarialkarzinomen von einer EGFR-Expressionsrate von 62% der Fälle im Vergleich zu 67% bei Borderlinetumoren. Sie fanden keine Korrelation zwischen der EGFR-Überexpression und dem Gesamtüberleben der Patientinnen. Skirnisdottir et al. dagegen berichten 2004 in ihrer Studie mit 226 Ovarialkarzinompatientinnen im Tumorstadium FIGO IA-IIIC von einer EGFR-Überexpression in über 50% der Fälle und des onkogenen Effekts von EGFR mit Induktion der DNA-Synthese, vermehrtem Zellwachstum, Invasion und Metastasierung des Tumors. Dieser Effekt hat eine signifikante Korrelation zwischen EGFR und schlechterer Prognose für die Patientinnen zur Folge. Sie berichten auch von einer signifikanten Korrelation der EGFR-Überexpression und erhöhter Rezidivrate bei diesen Patientinnen sowie

Verkürzung des metastasierungsfreien Überlebens. Eine signifikante Korrelation zwischen EGFR und p53 bestand nicht, aber die Kombination von p53- und EGFR-Überexpression, die in 15,6% der Fälle zu beobachten war, war mit einem signifikant reduzierten Überleben der Patientinnen verbunden und der Anteil rezidivfreier Patientinnen war von 67,4% auf 39,4% gesunken.

In unserer Studie haben wir lediglich bei 26 (29%) Gewebeschnitten eine positive Färbung von EGFR beobachtet. Die Färbeintensität der Gewebeschnitte war entweder moderat oder schwach. Keine der Präparate hatte eine starke Färbung. Dieses Färbeergebnis entspricht etwa der Studie von Stadlmann et al. Sie berichten von einer positiven EGFR-Immunexpression bei 28% der primären und 33% der Rezidivtumore bei Ovarialkarzinompatientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium. Bei unserem Patientinnenkollektiv hat sich eine Tendenz ($p=0,07$) zwischen hoher EGFR-Expression und negativem Lymphknotenbefall ergeben. Dieses Ergebnis widerspricht den Studien, wie auch oben genannt von Skirnisdottir et al. im Hinblick auf den metastasierungsfördernden Effekt von EGFR. Im Hinblick auf den Einfluss von EGFR auf den Knochenmarkbefall oder anderen Tumorcharakteristika hat sich in unserer Kollektiv keine Korrelationen ergeben.

Wie aus den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen festzustellen ist, variieren die Expressionsraten für die einzelnen Biomarker zum Teil stark untereinander. Als Ursache für diese erheblichen Abweichungen der Ergebnisse in der Literatur sind unter anderem die unterschiedlichen Nachweisverfahren zu nennen. Stadlmann et al. haben 2006 die Ergebnisse einer Studie, die 80 seröse Ovarialkarzinome mittels Immunhistochemische- und Fluoreszenz In-situ-Hybridisierung (FISH)-Verfahren untersucht hatte, veröffentlicht. Dabei war die EGFR-Proteinexpression mit 28% im Primärtumor und 33% im entsprechenden Rezidivtumor durch immunhistochemische Nachweisverfahren höher als die Ergebnisse des FISH-Verfahrens mit 20% EGFR-

Genamplifikation im Primärtumor und 22% im Rezidivtumor. Als zweiter wesentlicher Punkt ist die mikroskopische Beurteilung der Präparate zu nennen, die von der Subjektivität des Untersuchenden abhängig ist. Der Positivitätskriterium und Auswertungsmethode sind andere wesentlichste Punkte, die für die starke Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich sind. Stadlmann et al haben z.B. die Präparate als positiv bewertet, wenn $\geq 1\%$ der Tumorzellen EGFR-positiv waren, und Skirnisdttir et al. haben 2004 eine Positivitätsgrenze von $>10\%$ gefärbter Zellen in ihrer Studie festgelegt. Zusätzlich sind das Ausmaß der Antikörperverdünnung, die Inkubationszeit, Temperatur, das Einhalten der Kühlkette, sowie die geringe Fallzahl als weitere Ursachen dieser Diskrepanz zu nennen.

Wie an den Ergebnissen der vorliegenden Studie zu sehen ist, sind die klassischen Prognosefaktoren immer noch die aussagekräftigsten Parameter, die den Krankheitsverlauf, wie das Rezidiv- und Metastasen freie Intervall und das Überleben der Patientinnen beeinflussen.

Von den sechs untersuchten Faktoren haben insgesamt vier Korrelationen mit der Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Aszitesbildung, Peritonealkarzinose, des Metastasen freien Intervalls und dem Gesamtüberleben der Patientinnen aufgewiesen. Der bedeutendste Faktor war MIB-1, der mit Tumorgröße, postoperativem Tumorrest, Peritonealkarzinose, Metastasen freiem Intervall und Gesamtüberleben korreliert war. HER-2/neu war mit p53-Expression korreliert und bei nm23 negativen Fällen gab es häufiger Aszitesbildung. Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefall waren signifikant häufiger von Fernmetastasen betroffen als diejenigen ohne Befall des Knochenmarks mit DTZ und benötigen daher eine strengere Überwachung des Krankheitsverlaufs und entsprechende Therapie.

Auf dem Weg zur Definition neuer Prognoseindikatoren, die das unterschiedliche biologische Verhalten der Ovarialkarzinome erklären könnten, haben wir einige

zusammenhängende Faktoren beobachtet. Diese Ergebnisse rechtfertigen die Entwicklung und Einsatz biologisch aktiver Medikamente in der Karzinomtherapie. Diese neuen Medikamente können anhand des biologischen Verhaltens des Tumors individuell an das Ziel angepasst eingesetzt werden.

Hemmstoffe der Topoisomerase II, wie Etoposide, führen zu Brüchen in beiden DNA-Strängen und haben sich daher als geeignete antineoplastische Chemotherapeutika für die Behandlung des Mammakarzinoms erwiesen. Hemmstoffe der Topoisomerase I brechen einen der beiden DNA-Stränge auf. Topotecan, ein Topoisomerase I Inhibitor, wird zur Therapie des rezidivierenden, metastasierenden Ovarialkarzinoms (*Herzog, 2002*), sowie fortgeschrittenem Zervixkarzinoms eingesetzt (*Fiorica, 2003*). HER-2/neu hat sich zum geeigneten Ziel bei der Behandlung des Mammakarzinoms bewährt. Trastuzumab, ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, ist ein HER-2/neu-Rezeptorenblocker. Genistein, ein Inhibitor der Tyrosin Kinase Aktivität für EGFR, und Gefitinib, ein EGFR-Rezeptorenblocker, werden bei nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge eingesetzt. Außer dem Hormonrezeptorstatus und der HER2-Expression sind bisher als Routineuntersuchung keine weiteren Parameter etabliert, um Patientinnen innerhalb identischer Prognosegruppen zu identifizieren, die von einer systemischen Therapie besonders profitieren können. Die Untersuchungen des Knochenmarks bei Mammakarzinompatientinnen vor und nach der adjuvanten Chemotherapie haben gezeigt, dass bei einem Teil (24%) der Patientinnen keine Elimination der Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark der Patientinnen erfolgt (*Becker et al., 2006*). Da sich die Mehrzahl der DTZ in einer G0 Phase des Zellzyklus befindet, ist der Effekt der üblichen zytotoxischen Chemotherapeutika, die normalerweise auf die Zellen im proliferativen Zustand wirken, auf DTZ fraglich. Dies kann auch zum Teil die ineffektive Wirkung der Standard-Chemotherapeutika auf diese Zellen erklären

(Pantel et al., 1999). Die Suche nach Zellzyklus-unabhängigen Substanzen zur Elimination von DTZ scheint hierzu viel versprechend.

Als primär lokoregionärer Erkrankung besitzen beim Ovarialkarzinom weiterhin die klassischen Prognosefaktoren wie Tumorstadium, postoperativer Tumorrest und Peritonealkarzinose die größte Bedeutung. Die Mehrzahl der Patientinnen versterben im Verlauf an intraabdominellen Komplikationen, wie Ileus, Aszites oder sekundärem Pleuraerguß, so dass das Auftreten von Fernmetastasen klinisch oftmals nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch identifiziert die Präsenz von DTZ-KM unabhängig von Tumorstadium eine Subgruppe von Patientinnen, die ein erhöhtes Fernmetastasenrisiko aufweisen und deshalb möglicherweise einer intensivierten Nachsorge und Therapie bedürfen. Die Untersuchung tumorbiologischer Faktoren einschließlich DTZ-KM könnte somit zur Risikostratifizierung beitragen und die Etablierung zielgerichteter Therapien ermöglichen. Aufgabe zukünftiger Studien wird es sein, diese Zusammenhänge an größeren Fallzahlen unter standardisierten Bedingungen zu bestätigen. Die direkte Charakterisierung von DTZ ist ebenso Gegenstand laufender Forschung und könnte zukünftig die Therapie weiter individualisieren.

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist nach wie vor eines der prognostisch ungünstigsten Malignome der Frau. 70-80% der Frauen überleben ihre Krankheit nicht. Die malignen Erkrankungen kann man bei der Diagnosestellung klinisch in drei Kategorien unterteilen. Die erste Gruppe sind Patienten mit manifesten Metastasen. Die Zweite umfasst Patienten mit okkulten Metastasen und die Dritte sind Patienten ohne Metastasierung. Eine frühzeitige Diagnose und Therapie kann die Anzahl der Patienten zu Gunsten der dritten Gruppe verschieben (*Heimann et al., 2000*).

Viele Autopsiestudien bei Patientinnen, die an fortgeschrittenem Ovarialkarzinom gestorben sind, haben gezeigt, dass okkulte hämatogene Fernmetastasen viel häufiger in fernen Organen wie Leber, Lunge und Knochen auftreten als man es bisher basierend auf den klinischen Rezidivmustern vermutet hat (*Braun et al., 2001*).

Da die verspätete Diagnose und Therapie die Anzahl der Patienten mit früher Tumorzell dissemination und nachfolgender manifester Metastasierung erhöhen kann, ist die Etablierung weiterer Prognosefaktoren, die den Krankheitsverlauf bzw. das Metastasierungspotential des Primärtumors rechtzeitig charakterisieren können von enormer Bedeutung.

Für das Überleben einer malignen epithelialen Erkrankung wie dem Ovarialkarzinom, sind mehrere Faktoren entscheidend. Die radikale Resektion des Tumors mit erweiterter Lymphknotendisektion oder en-bloc Resektion infiltrierter Nachbarorgane spielen hier die wichtigste Rolle. Das Auftreten von Tumorzellen im Knochenmark, teilweise in sehr frühem Tumorstadium, ist ein Hinweis darauf, dass

das Ovarialkarzinom als eine systemische Tumorerkrankung betrachtet werden kann.

Zur individuellen Risikoabschätzung sowie zur Planung adjuvanter Therapien wäre die Kenntnis über die systemischen Komponente dieser malignen Erkrankung notwendig und eine Charakterisierung disseminierter Tumorzellen könnte im Hinblick auf die Expression metastasierungsrelevanter Faktoren zu einem besseren Verständnis tumorbiologischer Vorgänge und einer verbesserten individuellen Therapieplanung beim Ovarialkarzinom führen. Die Effizienz einer systemischen Therapie könnte wiederum durch Analyse der Tumorzell dissemination überprüft werden.

Die vorliegende Studie umfasst 90 Patientinnen, die im Zeitraum 1991 bis 2001 wegen eines Ovarialkarzinoms in der I. Universitätsfrauenklinik der LMU operiert wurden. Von allen Patientinnen wurde im Rahmen der Primäroperation das Knochenmarksaspirat auf hämatogen disseminierte Tumorzellen untersucht und die Ergebnisse in der Knochenmark-Datenbank archiviert. Wir haben in dieser retrospektiven Studie die Expression von sechs Faktoren im Tumorgewebe immunhistologisch untersucht, die das biologische Verhalten der Tumorzellen charakterisieren können. Bei den Faktoren handelt es sich um die zwei Proliferationsmarkern MIB-1 und Topoisomerase II α , die Tumorsuppressor- und Anti-metastasierungsfaktoren p53 und nm23, sowie HER-2/neu und EGFR, die das Zellwachstum beeinflussen. Nachfolgend wurden die Präparate hinsichtlich des Anteils immunhistologisch gefärbter Zellen und Intensität der Färbung semiquantitativ ausgewertet. Darauf hin wurden die Korrelationen zwischen diesen biologischen Markern mit histologischen und klinischen Parametern, Rezidiv- und Metastasen freien Intervall, dem Gesamtüberleben der Patientinnen sowie dem Knochenmarkbefalls mit Tumorzellen ermittelt.

Bei vier von den sechs immunhistologisch untersuchten tumorbiologischen Faktoren wurden signifikante Assoziationen mit den histologischen und klinischen Parametern nachgewiesen. Der Nachweis Zytokeratin-positiver Tumorzellen im Knochenmark der Patientinnen war mit einer Erhöhung der Metastasierungsrate assoziiert.

Die Detektion disseminierter Tumorzellen beschränkt sich nicht nur auf das Knochenmark, sondern auch der Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut und Lymphknoten sind Gegenstand intensiver Untersuchungen (*Pantel et al., 2003*).

Neben den bisher bekannten Prognoseparameter wie Tumorgröße, -stadium, -typ und postoperativer Tumorrest, deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf in unserer Studie nochmals bestätigt wurde, zeigen die resultierenden Ergebnisse, dass der immunhistologische Nachweis bestimmter tumorassoziierte Marker, vor allem MIB-1, und Detektion Zytokeratin-positiver Tumorzellen im Knochenmark einen prognostischen Wert bei Ovarialkarzinompatientinnen haben können. Daher scheinen weitere Untersuchungen mit größerer Patientenzahl in diesem Bereich sinnvoll und hilfreich.

6 Literaturverzeichnis

1. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Corsale S, Calo V. et al. DNA Ploidy and S-phase fraction, but not p53 or nm23-H1 expression, predict outcome in colorectal cancer patients. Result of a 5-year prospective study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:650-658.
2. Baekelandt M, Holm R, Trope C.G, Nesland J.M, Kristensen G.B. The significance of metastasis-related factors cathepsin-D and nm23 in advanced ovarian cancer. *Annals of Oncology.* 1999;10:1335-1341.
3. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positiv cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.* 2006;97:91-6.
4. Becker K, Pancoska P, Concin N, Vanden Heuvel K, Slade N, Fischer M, Chalas E, Moll UM. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol.* 2006;29(4):889-902.
5. Berchuck A, Carney M. Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(5):541-544.
6. Bonnefoi H, A'Hern RP, Fischer C, Macfarlane V, Barton D, Blake P, Sheperd JH, Gore ME. Natural history of stage IV epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology.* 1999;17:767-775.
7. Bookman M, Darcy K, Clark-Pearson D, Boothby R, Horowitz I. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2003; 21(2):283-290.
8. Borg A, Baldetorp B, Fernö M. et al. c-erbB-2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation oncogene. 1991;6:137-143.
9. Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F. Comparativ analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol.* 2001;19(12):3157-8.
10. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapie on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2000;18(1):80-86.
11. Braun S, Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Oncologist.* 2001;6(2):125-132.
12. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000;342:325-333.
13. Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kantenich C, Riethmullr G, Pantel K. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastasis relapse. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):368-375.
14. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled

- analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(8):793-802.
15. Butler TP, Gullino PM. Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1975;35:3512-3516.
 16. Caduff R, Svoboda-Newman S, Ferguson A, Frank T. Comparison of alterations of chromosome 17 in carcinoma of the ovary and of the breast. *Virchows Arch.* 1999;434:517-522.
 17. Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, Sotiriou C, Renard N, Richard V, Piccart MJ, Di Leo A. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol.* 2004;24(1):201-209.
 18. Charpin C, Bouvier C, Garcia S, Martini F, Andrac L, et al. Automated and quantitative immunocytochemical assays of nm23/NDPK protein in breast carcinomas. *Dep. Of Pathology.* 1997;74:416-420
 19. Chen S-L, Shieh H-Y, Yen C-C, Shen J-J, Lin K-H. p53 is a Regulator of the Metastasis Suppressor Gene Nm23-H1. *Molecular carcinogenesis.* 2003;36:204-214.
 20. Chuang T-C, Way T-D, Lin Y-S, et al. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER-2/neu oncogen. *Graduate Institute of Life Science, Dep. of Biochemistry.* 2002;532:135-142.
 21. Condeelis J, Segall J. Intravital imaging of cell movement in tumors. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:921-930.
 22. Coombes RC, Berger U, Mansi J, Redding H, Powles TJ, Neville AM, McKinna A, Nash AG, Gazet JC, Ford HT, et al. Prognostic significance of micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer. *NCI Mongor.* 1986;(1):51-53.
 23. Coronado Martin PJ, Fasero Laiz M, Garcia Santos J, Ramirez Mena M, Vidart Aragon. Overexpression and prognostic value of p53 and HER2/neu proteins in benign ovarian tissue and in ovarian cancer. *Med Clin.* 2007;128(1):1-6.
 24. Costa MJ, Hansen CL, Holden JA, Guinee D Jr. Topoisomerase II alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19(3):248-257.
 25. Crijns A, Duiker E, De Jong S, Willemse P, Van der Zee A, De Vries E. Molecular prognostic markers in ovarian cancer: toward patient-tailored therapy. *Int j Gynecol Cancer.* 2006;(16):152-165.
 26. Darai E, Walker-Combrouze F, Dauge-Geoffroy M C, Vincent Y, Feldman G, Madelenat P, Scoazec J Y. Ki 67 expression in 35 borderline ovarian tumors: relation with clinicopathologic parameters and ploidy. *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology.* 1998;76:175-180.
 27. Dauplat J, Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS, Rose TP, Sagae S. Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer.* 1987;60:1561-1566.
 28. De Jong K P., Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw A S, Slutter W J, Peters P. Clinical Relevance of Transforming Growth Factor α , Epidermal Growth Factor Receptor, p53, and Ki67 in Colorectal Liver Metastases and Corresponding Primary Tumors. *Hepatoologie.* 1998;28:971-979.

29. Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase II α expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol.* 2000;13(5):542-547.
30. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kau S, Bastert G. Detection of tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *Journal of clinical oncology.* 1992;10:1534-1539.
31. Duenas-Gonzales A, Abad-Hernandez M M, Garcia-Mata J, Paz-Bouza JI, Cruz-Hernandez JJ, Gonzales-Sarmiento R. Analysis of nm23-H1 expression in breast cancer. Correlation with p53 expression and clinicopathologic findings. *Cancer Letters.* 1996;101:137-142.
32. Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol.* 2006;103:942-947.
33. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener D, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in the bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer.* 2006;107(5):885-892.
34. Feige A, Rempfen A, Würfel W, Jawny J, Caffier H. *Frauenheilkunde, Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie.* Urban und Fischer Verlag. 2001;588-607.
35. Fiorica J V. The role of topotecan in the treatment of advanced cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* 2003;90:16-21.
36. Firma DAKO, Specification Sheet. Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1. Code No. M7240. Lot 060. Edition 2000, Denmark.
37. Firma Dako, Specification Sheet. Monoclonal Mouse Anti-Human Epidermal Growth Faktor Receptor (EGFR), Clone H11, CODE NO. M3563, USA.
38. Gabriel B, Fischer D-C, Kieback D G. Molecular Mechanisms in Signal Transduction: New Targets for the Therapy of Gynecologic Malignancies. *Onkologie.* 2002;25: 240-247.
39. Gao QL, Ma D, Meng L, Wang SX, Wang CY, Lu YP, Zhang AL, Li J. Association between Nm23-H1 gene expression and metastasis of ovarian carcinoma.. *2004;23(6):650-654.*
40. Garzetti Gioele G, Ciavattini A, Goteri G, Nicolis M, Stramazzotti D, Lucarini G, Biagini G. Ki67 Antigen Immunostaining in Serous Ovarian Tumors: Index of Proliferative Activity with Prognostic Significance. *Gynecol Oncol.* 1995;56:169-174
41. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2001;19(16):3669-3674.
42. Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. *J Clin Oncol.* 2001;19:960-971.
43. Granberg D, Wilander E, Öberg K, Skogseid B. Prognostic markers in patients with typical bronchial carcinoid tumors. *J Clin Endocrinology & Metabolism.* 2000;85:3425-3430.-
44. Heimann R., Hellman S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *European J of Cancer.* 2000;36:1631-1639.

45. Herzog T J. Update on the role of Topotecan in the treatment of recurrent ovarian cancer. *The Oncologist*. 2002;7(5):3-10.
46. Hoskins W J, McGuire W P, Brady M F. et al. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *American J. Of Obstet. Gynecol.* 1994;170:947-980.
47. Janni W. Die unterschiedliche prognostische Bedeutung hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu verschiedenen Zeitpunkten der Brustkrebserkrankung. 2002.
48. Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K. Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2004;51:3496-3502.
49. Janni W, Hepp F, Strobl B, Rack B, Rjosk D, Kentenich C, Schindlbeck C, Hantschmann P, Pantel K, Sommer H, Braun S. Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus. *Cancer*. 2003;97(2):405-411.
50. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer*. 2005;103(5):884-891.
51. Kaufmann M, Costa S, Scharl A. Maligne Ovarialtumoren. *Die Gynäkologie*. Springer Verlag. 2002;454-475.
52. Kerner T, Hauzenberger T, Jauch K-W. Nachweis und Bedeutung der Tumorzell dissemination beim Magenkarzinom. *Journal der Onkologie*. 2004;10:294-300.
53. Kufer P. Biologie und Diagnostik der minimal residualen Tumorerkrankung. Tumorzentrum München. 2000.
54. Kuhn W. Manual Tumorzentrum München, Maligne Ovarialtumoren; Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2001.
55. Lassus H, Sihto H, Leminen A, Joensuu H, Isola J, Nupponen NN, Butzow R. Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. *J Mol Med*. 2006;84(8):671-681.
56. Layfield L J, Saria E, Berchuck A, Dodge R K, Thompson J K. et al. Prognostic Value of MIB-1 in advanced ovarian carcinoma as determined using automated immunohistochemistry and quantitative image analysis. *Journal of surgical oncology*. 1997;66:230-237.
57. Lee K-E, Lee H-J, Kim Y-H et al. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in Gastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 33(4):173-179.
58. Levesque MA, Katsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, Diamandis EP. Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer*. 1995;75(6):1327-1338.
59. Li W, Liu Y, Jin ZJ, Feng YJ, Huang LM, Chen. Study on mRNA expression of the human novel gene NM23-H1B in ovarian tumor. 2006;41(1):48-51.
60. Lodisch H, Berk A, Zipursky S L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J E, *Molekulare Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag. 2001.

61. MacDonald N J, Dela R, Benedict M A, Freie J M, Krutsch H, Steeg P S. A serine phosphorylation of nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastasis. *J of biol. Chemie.* 1993;269:25780-25789.
62. Mano M, Awada A, Di Leo A, Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, Larsimont D, Piccart M, Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplifikation and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004;(92):887-895.
63. Mansi J L, Gogas H, Bliss JM, Gazet J C, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases : a long-term follow-up study. *Lancet.* 1999;354:197-202.
64. Meden H, Kuhn w. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductiv Biology.* 1997;71:173-179.
65. Nielsen J S, Jakobsen E, Holund B, Bertelsen K, Jakobsen A Prognostic significance of p53, HER-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. *Int Gynecol Cancer.* 2004;14:1086-1096.
66. Nijman H, Kenemans P, Poort-Keesom R, Verstraeten R, Mensdorff-Pouilly S, Verheijen R, Melief C, Hilgers J, Meijer C. Influence of chemotherapy on the expression of p53, HER-2/neu and proliferation markers in ovarian cancer. *European J of obstetrics and Gynecology.* 1999;83:201-206.
67. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie.* Urban-Fischer Verlag. 2000.
68. Oncogen Research Products, Topoisomerase II Specification Sheet, Cat# NA14, 2000.
69. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91:1113-1124.
70. Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9:6326-6334.
71. Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumor cells: implications for anti-cancer therapy. *Biochem Biophys Acta.* 2005; 1756(1):53-64.
72. Pantel K, Woelfle U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *Journal of biological regulators and homeostatic agents.* 2004;18:120-125.
73. Passlick B, Pantel K. Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes. *Rec Results Cancer Res.* 2000;157:29-37.
74. Patel D, Bhatavdekar J M, Chikhlikar P R, Patel Y, Shah NG, Ghosh N, Suthar TP, Balar DB. Clinical significance of p53, nm23, and bcl-2 in T3-4N1Mo oesophageal carcinoma: An immunohistochemical approach. *J of surgical oncology.* 1997;65:111-116.
75. Raymond E, Faivre S, Armand J P, Epidermal growth factor receptor tyrosin kinase as a target for anticancer therapie. *Drugs.* 2000;(60)1:15-23.
76. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8(3):138-140.
77. Roche Lexikon Medizin. 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag. München, 1999.
78. Rosenblum M, Shawver L, Marks J, Brink j, Cheung L, Langton-Webster B. Recombinant immunotoxins directed against the c-reb-2/HER2/neu oncogene product: In vitro

- cytotoxicity, Pharmacokinetics and in vivo efficacy studies in xenograft models. *Clin Cancer Res.* 1999;5:865-874.
79. Rosenthal S I, Depowski P L, Brien T P, Stylos S, Johnson B L, Ross J S. Topoisomerase IIa expression in breast cancer: Correlation with outcome variables. *Mod Pathol.* 2000;13(5):542-547.
 80. Roymans D., Vissenberg K., De Jonghe C., Willems R., Engler G., et al. Identification of the Tumor Metastasis Suppressor Nm23-H1/Nm23-R1 as a Constituent of the Centrosome. *Experimental Cell Res.* 2001;262:145-153.
 81. Rubin SC, Hoskins WJ, Saigo PE, Chapman D, Hakers TB, Markman M, Reichman B, Almadrones L, Lewis JL Jr. Prognostic factors for recurrence following negative second-look laparotomy in ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 1991;42(2):137-141.
 82. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA. Genomic analysis of single cytokeratin positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell.* 2005;8:227-239.
 83. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K. Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of the isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;87(1):65-74.
 84. Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Friese K. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):1174-1185.
 85. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Amholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA, From latent disseminated cells to overt metastasis. Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:7737-7742.
 86. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer.* 1998;82(5):893-901.
 87. Skirnirdottir I, Seidal T, Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14:259-270.
 88. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Uirich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244(4905):707-712.
 89. Smith E, Yang D-H, Cohen C, et al. Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *American Cancer Society. Dep. Of Pathologie.* 2002;94:2380-92.
 90. Solomayer EF., Diel IJ., Salanti G., Hahn M., Gollan C., Schutz F., Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):4102-8.
 91. Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, Diener P, Zeimet A, Wight E, Mirlacher M, Sauter G, Mihatsch M, Singer G. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Modern Pathology.* 2006;19:607-610.

92. Stauber M, Weyerstahl T, Beham A. Gynäkologie und Geburtshilfe. Duale Reihe. Thieme Verlag. 2001; 274-305.
93. Stone B, Schummer M, Paley P, Thompson L, Stewart J, Ford M, Crawford M, Urban N, O'Briant, Nelson B. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *Int J Cancer*. 2002;104:73-84..
94. Terlikowski S, Sulkowski S, Lenczewski A, Musiatowicz B, Kulikowski M. Study of borderline and invasive mucinous ovarian tumors using Ki-67 (MIB 1) antibodies and nucleolar organizer region (NOR) staining. *Arch Gynecol Obstet*. 1999;263:29-33.
95. Thomas C, Rüschoff J, Emons G, Gebert G. Weibliches Genitale, Grundlagen der klinischen Medizin. Schattauer Verlag. 1993;48-64.
96. Tomic S, Forko I, Babic D, Sundov D, Kuert S, Andelinovic S. c-erbB-2, p53 and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Croat Med J*. 2003;44:429-434.
97. Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Maligne Ovarialtumoren. Zuckschwerdt Verlag. 2001.
98. Varesco L, Caligon M A, Simi P, Black D M, Nardini V, Casarino L, The nm23 gene maps to human chromosome band 17q22 and shows a restriction fragment length polymorphism with Bg1 II. *Genes chromo cancer*. 1992;4:84-89.
99. Verweij J. New promising anticancer agents in development: what comes next? *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;38(suppl):3-10.
100. Wenham R., Wagener C, Molekulare Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren. Thieme Verlag. 1999;220-223.
101. M., Lancaster J M, Berchuck A, Molecular aspects of ovarian cancer. *Best practice & Research Clin. Obstet. and Gyn*. 2002;4:483- 497.
102. Wiedswang G., Borgen E., Karesen R., Qvist H., Janbu J., Kvalheim G., Nesland JM., Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5342-5348.
103. Wong SY, Hynes RO, Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*. 2006;5(8):812-817.
104. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*. 2004;64:7002-7009.
105. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, Iwasa H. Coexistence of HER-2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2004;6(1):24-30.
106. Yang X, Zhang Z, Jia C, Li J, Yin L, Jiang S. The relationship between express of c-ras, c-erbB-2, nm23 and p53 Gene products and development of throphoblastic tumor and their predictive significance for the malignant transformation of complete hydatidiform mole. *Gynecol Oncol*. 2002;85:438-444.