

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

**Detailanalyse der Expression neuroendokriner Marker bei  
invasiven Mammakarzinomen im Hinblick auf die Definition  
des neuroendokrinen Mammakarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Andreas Johannes Sonnewald

aus Dortmund

2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. M. Forsting

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. K.W.Schmid

2. Gutachter: Herr PD. Dr.med. M. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2010

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>I Zielsetzung:</b> .....	<b>6</b>
<b>II Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>II.1 Das Mammakarzinom</b> .....	<b>7</b>
II.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	7
II.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms .....	7
II.1.2.1 Alter.....	7
II.1.2.2 Familiäre Belastung/Genetische Risikofaktoren .....	8
II.1.2.3 Alter bei Menarche und Menopause.....	9
II.1.2.4 Alter bei der ersten Schwangerschaft .....	9
II.1.2.5 Hormonelle Kontrazeptiva .....	9
II.1.2.6 Hormontherapie in Peri- und Postmenopause .....	10
II.1.2.7 Vorherige benigne Erkrankungen der Brust.....	10
II.1.2.8 Umweltfaktoren.....	11
<b>II.2 Prognose- und prädiktive Faktoren der Mammakarzinomerkrankung</b> .....	<b>11</b>
II.2.1 Prognosefaktoren .....	11
II.2.1.1 Axillärer Lymphknotenbefall .....	11
II.2.1.2 Tumorgroße .....	12
II.2.1.3 Grading.....	12
II.2.1.4 Peritumorale Gefäßinfiltration.....	12
II.2.1.5 Alter bei Diagnose.....	12
II.2.2 Prognostisch und prädiktiv bedeutsame Faktoren .....	13
II.2.2.1 Hormonrezeptorstatus.....	13
II.2.2.2 HER2/neu Status .....	13
II.2.2.3 uPA/PAI-1 .....	14
II.2.2.4 Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut.....	14
II.2.2.5 Proliferationsmarker .....	15
<b>II.3 Typisierung von Mammakarzinomen</b> .....	<b>15</b>
II.3.1 Histologische Typen des Mammakarzinoms laut WHO-Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003.....	15
<b>II.4 Das neuroendokrine Mammakarzinom</b> .....	<b>16</b>
II.4.2 Neuroendokrine Mammakarzinome laut WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003.....	16
II.4.3 Definition neuroendokriner Zellen und neuroendokriner Tumoren.....	16
II.4.4 Diagnose neuroendokriner Tumoren .....	17
II.4.5 Diagnose neuroendokriner Mammakarzinome .....	18
II.4.6 Neuroendokrine Marker.....	18
II.4.7 In der vorliegenden Studie untersuchte neuroendokrine Marker im Detail.....	18
II.4.7.1 Synaptophysin .....	18
II.4.7.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE).....	19
II.4.7.3 Chromogranin A.....	19
II.4.7.4 CD56 (NCAM).....	20
II.4.8 Morphologie der neuroendokrinen Mammatumoren.....	20
II.4.8.1 Solide neuroendokrine Karzinome .....	20
II.4.8.2 Kleinzelliges Karzinom .....	21
II.4.8.3 Großzelliges neuroendokrines Karzinom .....	22
<b>III Material &amp; Methoden</b> .....	<b>23</b>
<b>III.1 Das untersuchte Kollektiv</b> .....	<b>23</b>
<b>III.2 Herstellung von Tissue Microarrays</b> .....	<b>23</b>

<b>III.3 Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....</b>	<b>24</b>
III.3.1 Technik der Färbungen.....	24
III.3.1.1 Vorbehandlung der zu färbenden Schnittpräparate .....	24
III.3.1.2 Färbeprotokolle .....	25
III.3.1.2.1 Anfärbung von NSE, Chromogranin, Synaptophysin, CD56.....	25
III.3.1.2.2 Anfärbung von Östrogen-, Progesteronrezeptoren.....	25
III.3.1.2.3 Anfärbung von Her2/neu.....	25
III.2 Auswertung der Immunhistochemischen Untersuchungen .....	26
<b>III.4 Statistische Auswertung.....</b>	<b>27</b>
III.4.1 Festlegung von Cutoff Werten, Youden Index.....	27
III.4.2 Kombination mehrerer Tests .....	28
III.4.3 Statistische Zusammenhangsmaße .....	28
III.4.3.1 Chi Quadrat Test .....	28
III.4.3.2 Exakter Test nach Fisher .....	29
<b>IV Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
<b>IV.1 Morphologie neuroendokriner Mammakarzinome in der HE-Färbung .....</b>	<b>31</b>
<b>IV.2 Darstellung neuroendokriner Karzinome mit Hilfe der Immunhistochemie .....</b>	<b>32</b>
<b>IV.3 Häufigkeit der neuroendokrinen Histologien im untersuchten Kollektiv.....</b>	<b>33</b>
<b>IV.4 Häufigkeit neuroendokriner Markerexpression im untersuchten Kollektiv .....</b>	<b>33</b>
IV.4.1 WHO-kompatible Expression neuroendokriner Marker in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp .....	33
<b>IV.5 Definition neuer Cutoff Werte der untersuchten neuroendokrinen Marker.....</b>	<b>35</b>
IV.5.1 Daten der einzelnen Färbungen .....	35
IV.5.1.1 Synaptophysin als Einzelmarker .....	35
IV.5.1.2 NSE als Einzelmarker .....	36
IV.5.1.3 Chromogranin A als Einzelmarker .....	36
IV.5.1.4 CD56 als Einzelmarker .....	36
IV.5.2 Berücksichtigung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen.....	37
<b>IV.6 Veränderungen zwischen Cutoff der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und   der weiblichen Geschlechtsorgane 2003 und den neu definierten Cutoff Werten .....</b>	<b>39</b>
<b>IV.7 Kombination mehrerer neuroendokriner Marker .....</b>	<b>40</b>
<b>IV.8 Neuroendokrine Differenzierung und etablierte Prognosemarker.....</b>	<b>42</b>
<b>V Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>V.1 Neuroendokrine Marker und neuroendokrine Morphologie .....</b>	<b>44</b>
V.1.1 Neuroendokrin – eine schwierige Definition?.....	44
V.1.2 Ursprung der neuroendokrinen Zellen der Mamma .....	44
V.1.3 Neuroendokrin differenzierte Karzinome entsprechend der Definition der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003.....	45
<b>V.2 Definition der Cutoff Werte für die neuroendokrinen Marker.....</b>	<b>46</b>
V.2.1 Neuronenspezifische Enolase .....	46
V.2.2 Synaptophysin .....	46
V.2.3 Chromogranin A .....	47
V.2.4 CD56.....	47
V.2.5 Fazit: Synaptophysin und die Neuronenspezifische Enolase (NSE) stellen geeignete Marker dar, um die neuroendokrine Differenzierung beim Mammakarzinom nachzuweisen	47
<b>V.3 Berücksichtigung der Intensität .....</b>	<b>48</b>

<b>V.4 Veränderung zwischen Cutoff der WHO Definition und den neuen Cutoff Werten ...</b>	<b>49</b>
<b>V.5 Kombination mehrerer neuroendokriner Marker .....</b>	<b>49</b>
<b>V.6 Repräsentativität des untersuchten Kollektivs.....</b>	<b>50</b>
<b>V.6.1 Vergleich der klinischen und pathologischen Parameter des untersuchten Kollektivs mit Literaturdaten.....</b>	<b>50</b>
V.6.1.1 Altersmedian .....	51
V.6.1.2 Tumortyp .....	51
V.6.1.3 Tumorgroße .....	52
V.6.1.4 Nodalstatus .....	53
V.6.1.5 Grading.....	53
V.6.1.6 Östrogenrezeptorstatus .....	53
V.6.1.7 Progesteronrezeptorstatus.....	54
V.6.1.8 Her2/neu-Status .....	54
V.6.1.9 Vergleich der klinischen und pathologischen Parameter des untersuchten Kollektivs mit Literaturdaten, ein Fazit .....	54
<b>V.6.2 Vergleich der Expression neuroendokriner Marker im untersuchten Kollektiv mit Literaturangaben .....</b>	<b>54</b>
V.6.2.1 Synaptophysin .....	55
V.6.2.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE).....	55
V.6.2.3 Chromogranin A.....	56
V.6.2.4 CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule/NCAM).....	57
V.6.2.5 Expression neuroendokriner Marker im untersuchten Kollektiv im Vergleich zu Literaturangaben, ein Fazit.....	57
<b>V.7 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung.....</b>	<b>57</b>
V.7.1 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung in anderen Karzinomen .....	57
V.7.2 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung beim Mammakarzinom .....	59
V.7.2.1 Therapie und Prognose des neuroendokrinen Mammakarzinoms.....	59
<b>V.8 Expression neuroendokriner Marker bei invasiven Mammakarzinomen im Hinblick auf die Definition des neuroendokrinen Mammakarzinoms, ein Fazit.....</b>	<b>60</b>
<b>VI Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>VII Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>IX Anhang .....</b>	<b>78</b>
<b>IX.1 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>IX.2 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>IX.3 Abbildungsverzeichnis: .....</b>	<b>80</b>
<b>X Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>XI Lebenslauf .....</b>	<b>82</b>

---

**I Zielsetzung:**

Laut der aktuellen Definition der WHO von 2003 sind neuroendokrine Mammakarzinome invasive maligne epitheliale Tumoren der weiblichen Brust, die in mehr als 50% ihrer Zellen bestimmte Proteine, sogenannte neuroendokrine Marker, exprimieren. Dieser zumeist bei älteren Patientinnen in 2-5% aller invasiven Mammakarzinome vorkommende Tumortyp wurde bislang nur an kleineren Kollektiven untersucht, die keine prognostische oder therapeutische Relevanz dieses Tumortyps herausarbeiten konnten und Fragen hinsichtlich der korrekten Definition dieses Tumortyps offen lassen. Es wurde das im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen archivierte formalinfixierte und paraffineingebettete Tumorgewebe von 490 primären invasiven Mammakarzinomen aus den Jahren 2001 bis 2004 für immunhistochemische Untersuchungen in Tissue Microarrays eingebracht. Diese Multi-Tumor-Blöcke wurden sowohl im Hinblick auf ihre Morphologie als auch auf ihre immunhistochemisch analysierte Expression der neuroendokrinen Marker Chromogranin A, Synaptophysin, neuronenspezifischer Enolase (NSE) und CD56 analysiert.

Erstens galt es zu klären, wie gut die immunhistologischen Kriterien der WHO mit der Morphologie neuroendokriner Mammakarzinome übereinstimmen. In einem zweiten Schritt wurden die Schwellenwerte der immunhistochemischen Untersuchungen so modifiziert, dass eine optimale Übereinstimmung des immunhistochemischen Profils mit der Histomorphologie der neuroendokrinen Karzinome erreicht wird.

---

## II Einleitung

### II.1 Das Mammakarzinom

Bei den invasiven Mammakarzinomen handelt es sich um maligne epitheliale Tumoren, die von einer intraduktalen Neoplasie ausgehen und die die Myoepithelzellschicht sowie die Basalmembran des Drüsenepithels der Brustdrüse durchbrochen haben und sich infiltrativ im Läppchenstroma, im interlobulären Stroma und im umgebenden Fettgewebe ausbreiten. Hier können die Tumorzellen Anschluss an Blut- oder Lymphgefäße erlangen, was dem Tumor die Möglichkeit zur Metastasierung eröffnet. Die hämatogene Metastasierung erfolgt vor allem in Knochen, Lunge, Leber und Gehirn. Lymphogen metastasiert das Mammakarzinom in die axillären, supraklavikulären und retrosternalen Lymphknoten.

Neben den primären Mammakarzinomen können sich in der Brust auch andere maligne Tumoren wie Sarkome, maligne phylloide Tumoren, maligne Kombinationstumoren oder maligne Lymphome entwickeln. Schließlich kommen auch Metastasen von außerhalb der Brust gelegenen Primärtumoren vor.

#### II.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau [Parkin, D.M. et al. 2005]. Das Erkrankungsrisiko beträgt zurzeit 7-10%. In Deutschland erkranken jährlich etwa 45.000-50.000 Frauen an einem Mammakarzinom [Schmidt-Matthiesen, H. et al. 2004].

#### II.1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms

Die Ätiologie von Brustkrebs ist immer noch wenig verstanden. Die bisher bekannten Risikofaktoren erklären nur einen kleinen Teil der Brustkrebsfälle [Dumitrescu, R.G., Cotarla, I. 2005]. Einige Risikofaktoren lassen sich dennoch im Einzelnen benennen und in ihrer Bedeutung einschätzen.

##### II.1.2.1 Alter

Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs ist das Lebensalter [Ataseven, A., Eiermann, W. 2006]. Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt mit dem Alter. Bis zur

Menopause verdoppelt sich das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken alle zehn Jahre. Ab dem Einsetzen der Menopause nimmt der Risikoanstieg deutlich ab [McPherson, K. et al 2000].

#### II.1.2.2 Familiäre Belastung/Genetische Risikofaktoren

Bis zu 10% der Brustkrebsfälle in westlichen Ländern sind durch genetische Disposition bedingt [McPherson, K et al. 2000], [Ataseven, A, Eiermann, W. 2006]. Die meisten Daten liegen diesbezüglich zu Veränderungen in den Genen BRCA1 („BRCA1“) und BRCA2 („BRCA2“) vor [Ataseven, A., Eiermann, W. 2006]. BRCA1 wurde erstmals 1990 auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert. Es handelt sich um ein Tumorsuppressorgen mit autosomal-dominanter Vererbung. Mutationen im BRCA1 Gen sind ausschließlich bei Frauen mit autosomal-dominant vererbten Mamma- und Ovarialkarzinomen beobachtet worden [Hall, J.M. et al. 1990]. Bei nicht hereditären Mammakarzinomen wurden bisher keine BRCA1 Mutationen beschrieben [Nathanson, K.N. et al. 2001]. BRCA2, lokalisiert auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q12-13), bewirkt ein ähnlich hohes Brustkrebsrisiko wie Mutationen im BRCA1 Gen. Es besteht jedoch nur ein mäßig erhöhtes Ovarialkarzinomrisiko. Allerdings haben auch männliche Mutationsträger ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken [Easton, D.F. et al. 1994]. BRCA1 und BRCA2 Mutationen sind für 20-60% der familiären und damit 2-6% aller Mammakarzinome verantwortlich [Nathanson, K.N. et al. 2001]. Mutationsträgerinnen haben ein Lebenszeitrisiko von 55-85% ein Mammakarzinom zu entwickeln. In dieser Gruppe beginnt das Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms bereits mit 25 Jahren [Verhoog, L.C. et al. 1999]. Inzwischen wurden über 1.000 verschiedene Mutationen in BRCA1 und BRCA2 entdeckt [Walsh, T. et al. 2006]. Es sind eine Reihe weiterer Gene bekannt, die zu einem gesteigerten Brustkrebsrisiko führen. Fünf Gene (TP53, PTEN, LKB1, ATM, CHEK2) können zum jetzigen Zeitpunkt als gesicherte Prädispositionsgene für Brustkrebs angesehen werden [Antoniou, A.E., Easton, D.F. 2006]. Angeborener Brustkrebs manifestiert sich üblicherweise in jüngerem Alter und tritt oftmals multifokal oder bilateral auf. Sporadisch auftretender Brustkrebs ist in der Regel einseitig und zeigt einen späteren Erkrankungsbeginn [Rebbeck, T.R. 1999]. Weibliche Verwandte von Mammakarzinompatientinnen haben grundsätzlich ein deutlich erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Dies gilt auch dann, wenn sich keine der bisher bekannten



---

molekular-pathologischen Veränderungen nachweisen lassen [Claus, B.C. et al 1994]. Das Risiko erhöht sich mindestens um den Faktor zwei, wenn erstgradige weibliche Familienangehörige vor dem 50. Lebensjahr an einem Mammakarzinom erkrankt sind [McPherson, K. et al. 2000].

#### II.1.2.3 Alter bei Menarche und Menopause

Frauen, die eine frühe erste Regelblutung und eine späte Menopause erleben, haben ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken [McPherson, K. et al. 2000]. Dies wird dadurch erklärt, dass mehr Monatszyklen durchlaufen werden, was die Exposition des Brustgewebes gegenüber Östrogenen und Progesteron erhöht [Collins, J.A. et al. 2005] und somit zu häufigeren zyklischen Veränderungen des Gewebes führt.

#### II.1.2.4 Alter bei der ersten Schwangerschaft

Das Alter einer Frau bei der ersten Schwangerschaft hat ebenfalls einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko. Sowohl Nulliparität als auch eine späte erste Geburt erhöhen das Lebenszeitrisiko für Brustkrebs [McPherson, K. et al. 2000].

#### II.1.2.5 Hormonelle Kontrazeptiva

Eine zusammenfassende Analyse von 54 epidemiologischen Studien, veröffentlicht 1996 in der Zeitschrift The Lancet, ergab ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko nach Einnahme hormoneller Kontrazeptiva, abhängig vom Zeitpunkt der letzten Einnahme: Das relative Risiko lag für Frauen mit laufender Medikation bei 1,24, (d.h. das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken ist 24 % größer als für Frauen, die nie orale Kontrazeptiva eingenommen haben), für Frauen nach Absetzen der Medikation vor einem bis vier Jahren bei 1,116 (d.h. ca. 12% höheres Risiko als Frauen, die nie orale Kontrazeptiva eingenommen haben) und nach Absetzen vor fünf bis neun Jahren bei 1,07 (7% erhöhtes Risiko). Zehn oder mehr Jahre nach Ende der Einnahme konnte kein erhöhtes Risiko mehr festgestellt werden [Collaborative Group Hormonal Factors in Breast 1996]. Eine prospektive Studie, begonnen 1991/1992, deren Ergebnisse im Jahre 2002 veröffentlicht wurden, kam zu ähnlichen Ergebnissen. Es handelt sich um die „Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study“ an 103.027 Frauen in Schweden und Norwegen. Auch im Rahmen dieser Studie konnte bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen oder in der Vergangenheit eingenommen hatten, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko

festgestellt werden. (relatives Risiko =1,6) [Kumle, M. et al. 2002]. Es gibt aber auch anders lautende Studienergebnisse. Die „Women’s Contraceptive and Reproductive Experiences (Woman’s CARE)“ Studie aus dem Jahre 2002 an 4.575 neu diagnostizierten Mammakarzinompatientinnen und 4.682 Kontrollprobandinnen ergab kein gesteigertes relatives Brustkrebsrisiko für Frauen die aktuell oder in der Vergangenheit orale Kontrazeptiva einnahmen [Marchbanks, P.A. et al 2002]. Warum die Ergebnisse so unterschiedlich ausfallen, lässt sich noch nicht abschließend beantworten. Bis jetzt werden allein Unterschiede im Studiendesign als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse herangezogen [Bernstein, L. 2006].

#### II.1.2.6 Hormontherapie in Peri- und Postmenopause

Für den längerfristigen Einsatz von Oestrogen oder Progesteron enthaltenden Hormontherapien gilt inzwischen als gesichert, dass sie das Risiko an Brustkrebs zu erkranken erhöhen. [Clarke, C.A. et al. 2006a] Das relative Risiko einer Östrogen und Progesteron enthaltenden Hormonersatztherapie liegt dabei in der Women’s Health Initiative(WHI) Studie bei 1,26. Dies entspricht acht zusätzlichen invasiven Mammakarzinomen pro 10.000 Frauen pro Anwendungsjahr einer Östrogen und Progesteron enthaltenden Hormontherapie [Rossouw J.E. et al. 2002].

Als größte randomisiert-kontrollierte Studie zu dieser Frage hat die WHI gezeigt, dass die reine Östrogentherapie das Brustkrebsrisiko nach einer mittleren Anwendungszeit von 7,1 Jahren nicht erhöht [Rossouw J.E. et al. 2002]. Metaanalysen, die Beobachtungsstudien und randomisiert-kontrollierte Studie einbezogen haben, zeigten eine Steigerung des Brustkrebsrisikos durch eine Östrogentherapie. Der Effekt war schwächer ausgeprägt als der einer östrogen- und progesteronhaltigen Therapie [Albring, E. et al. 2009].

#### II.1.2.7 Vorherige benigne Erkrankungen der Brust

Frauen mit atypischen Hyperplasien haben ein vier- bis fünffach erhöhtes Risiko, eine Brustkrebserkrankung zu entwickeln, als Frauen, die keine proliferativen Veränderungen in ihrer Brust aufweisen. Bei Frauen mit diesen Veränderungen und zusätzlich familiärer Vorbelastung verneunfacht sich das Risiko sogar [Dupont W.D., Page D.L. 1985].

### II.1.2.8 Umweltfaktoren

Vergleicht man die altersadjustierte Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms in verschiedenen Ländern, zeigen sich große Unterschiede. So liegen Inzidenz und Mortalität in den westlichen Industrienationen fünfmal höher als in Ländern des Fernen Ostens. Wandern Angehörige dieses Kulturkreises jedoch in westliche Länder aus, so haben die Nachkommen binnen ein bis zwei Generationen das Erkrankungsrisiko der westlichen Bevölkerungen erreicht. Dies wird als Hinweis für den wichtigen Einfluss von Umweltfaktoren angesehen [Ataseven, A., Eiermann, W. 2006]. Es wurde eine Verdopplung des Brustkrebsrisikos bei Frauen beobachtet, die als Teenager im Zweiten Weltkrieg radioaktiver Strahlung ausgesetzt waren [McPherson, K. et al 2000]. Adipositas führt maximal zu einer Verdopplung des Risikos, ein Mammakarzinom zu entwickeln [McPherson, K. et al. 2000],[Lahmann, P.H. et al. 2003]. Alkoholkonsum stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar [Clarke, C.A. et al. 2006b].

## **II.2 Prognose- und prädiktive Faktoren der Mammakarzinomerkkrankung**

Ideale Prognosefaktoren geben zum Zeitpunkt der Diagnose Informationen über den Krankheitsverlauf (rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben), unabhängig von der Therapie. Sie repräsentieren somit die Fähigkeit des Tumors zur Proliferation, Invasion und Metastasierung. Prädiktive Faktoren sagen die Wahrscheinlichkeit voraus, mit der ein Tumor auf eine bestimmte Therapie anspricht. Internationale und nationale Leitlinien stimmen in der Beurteilung der klinisch relevanten Prognosefaktoren für das nicht fernmetastasierte „frühe Mammakarzinom“ überein [Decker, T. et al. 2009].

### II.2.1 Prognosefaktoren

#### II.2.1.1 Axillärer Lymphknotenbefall

Der bedeutsamste unabhängige Prognosefaktor des nicht primär fernmetastasierten Mammakarzinoms ist der axilläre Lymphknotenbefall [Kendal, W.S. 2006]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben in dem Maße abnehmen, wie die Zahl befallener Lymphknoten zunimmt. Die klinische Bedeutung von Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen in Lymphknoten ist bis heute noch umstritten. Es scheint sich aber abzuzeichnen, dass Mikrometastasen mit einer geringen,

aber signifikanten Abnahme des krankheitsfreien und des Gesamtüberlebens einhergehen [Ellis I.O. et al. 2003c].

#### II.2.1.2 Tumorgröße

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Größe eines primären Mammakarzinoms einen Einfluss auf die Metastasierungswahrscheinlichkeit und auf die Überlebensrate von Brustkrebspatientinnen hat. Abner et al. stellten folgende Korrelation fest: Unter Patientinnen ohne Lymphknotenbefall und ohne systemische adjuvante Chemotherapie zeigte sich ein rezidivfreies Überleben von 96% für Tumoren mit einem Durchmesser kleiner/gleich 1cm, wohingegen die Rate bei Tumoren mit einem Durchmesser von 1,1-2,0cm nur 72% beträgt [Abner A.L. et al. 1998]. Die genaue Assoziation zwischen Tumorgröße und Gesamtüberleben wird noch kontrovers beurteilt. Fest steht, dass die Gesamtüberlebensrate mit zunehmender Größe des Primärtumors abnimmt.

#### II.2.1.3 Grading

Auch der Malignitätsgrad (Grading) eines Tumors stellt einen bedeutenden unabhängigen Prognosefaktor dar. Der Malignitätsgrad beschreibt den Differenzierungsgrad und damit die Ähnlichkeit der zytologischen und architektonischen Eigenschaften des Tumors im Vergleich zum normalen Ursprungsgewebe. Routinemäßig werden alle invasiven Tumoren der Brust anhand ihrer Bildung von Tubulus- und Drüsenstrukturen, Kernpleomorphie, und Zahl der beobachteten Mitosen in einem definierten mikroskopischen Gesichtsfeld eingeteilt [Ellis I.O. et al 2003d]. Eine hohe (gute) Differenzierung wird als Malignitätsgrad I beziffert und ist in der Regel mit langsamem Wachstum und einer guten Prognose assoziiert. Mit zunehmender Entdifferenzierung (Malignitätsgrad II und III) verschlechtert sich die Prognose [Ellis, I.O. et al. 1992], [Elston C.W., Ellis, I.O. 1991].

#### II.2.1.4 Peritumorale Gefäßinfiltration

Lymph- und Blutgefäßinvasion sind Indikatoren für ein höheres Risiko von Lokal- und Fernrezidiven [Goldhirsch, A. et al. 2007].

#### II.2.1.5 Alter bei Diagnose

Das Auftreten eines Mammakarzinoms vor der Menopause, vor allem aber bei Frauen unter 35 Jahren („early onset cancer“), spricht für eine schlechte Prognose [Goldhirsch, A.

et. al. 2007]. Mit günstigen Verläufen ist am ehesten bei einem Erkrankungsalter zwischen 45 und 49 Jahren zu rechnen [Park, B.W. et al. 2002].

## II.2.2 Prognostisch und prädiktiv bedeutsame Faktoren

### II.2.2.1 Hormonrezeptorstatus

Laut des “Konsensusmeeting St. Gallen 2009” zur Primärtherapie des frühen Mammakarzinoms ist, sobald Östrogenrezeptoren auf einzelnen Tumorzellen nachweisbar sind, eine adjuvante antihormonelle Therapie des frühen Mammakarzinoms stets indiziert. Entgegen vorheriger Empfehlungen wird die Einteilung in niedrige, mittlere und hohe endokrine Empfindlichkeit (basierend auf der Zahl hormonrezeptorexprimierender Tumorzellen) nicht mehr zur Entscheidungsfindung für oder gegen eine antihormonelle Therapie benutzt. Die endokrine Empfindlichkeit ist aber für die Entscheidung, ob zusätzlich eine zytostatische Therapie indiziert ist, weiterhin von Bedeutung [Goldhirsch, A. et al 2009].

### II.2.2.2 HER2/neu Status

Für das Mammakarzinom ist das HER2/neu Protoonkogen (Human Epidermal growth factor Receptor 2) von herausragender Bedeutung. Das HER2/neu-Gen ist auf dem Chromosomen 17q21 lokalisiert. Es codiert ein 185 kDa großes transmembranöses Protein, welches zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität gehört.

Die Funktion der Familie von Rezeptortyrosinkinasen, der unter anderem Her2/neu angehört, besteht in normalen Zellen darin, ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden zu steuern, welche für normales Zellwachstum, Differenzierung, Motilität und Zelladhäsion in etlichen verschiedenen Zellabstammungslinien verantwortlich sind. Im Normalgewebe wird die Aktivität der Signalkaskaden genau reguliert. In Krebszellen mit gesteigerter HER2/neu Expression (vor allem Brustkrebs) ist eine Dysregulation dieses Netzwerkes beschrieben worden. Hier verschafft die HER2/neu Überexpression den Zellen einen Wachstumsvorteil [Menard, S. et al. 2003].

Gefunden wurde HER2/neu im Brustgewebe in normalen duktalem Epithelzellen, in Fibroadenomen und bei Mastopathien im Bereich der basolateralen Zellmembran der Epithelzellen [Tauchi, K. et al. 1989]. Bei den verschiedenen Formen des

Mammakarzinoms lassen sich je nach Typ des Karzinoms unterschiedlich häufig Amplifikationen des Her2/neu Gens nachweisen [Allred, D.C. et al 1992]. Der Nachweis einer Überexpression des HER2/neu Proteins geht in 90-95% der Fälle direkt mit einer Genamplifikation des Her2/neu Gens einher [Pauletti, G. et al.1996], [ Slamon, D.J., et al 1989].

Die besondere Bedeutung der Her2/neu Rezeptorüberexpression beim Mammakarzinom besteht darin, dass ein gegen die extrazelluläre Domäne des Her2/neu Proteins gerichteter Antikörper zu therapeutischen Zwecken zur Verfügung steht. Es handelt sich bei dem therapeutisch eingesetzten Antikörper um einen monoklonalen humanisierten Antikörper namens Trastuzumab [Tokunaga, E. et al. 2006]. Der monoklonale Antikörper ist in der Behandlung des HER2-überexprimierenden metastasierten Mammakarzinoms mittlerweile Standard und seit Mai 2006 für die adjuvante Therapie in Europa zugelassen [Untch, M. et al. 2006]. Trastuzumab (Handelsname: „Herceptin“) stellt damit eine der ersten klinisch angewandten und bisher erfolgreichsten, gegen ein spezifisches Molekül gerichteten, Therapien dar [Tokunaga, E. et al 2006].

Der HER2/neu Status eines Mammakarzinoms dient auch der Einschätzung der Prognose der Tumorerkrankung [Dybdal, N. et al 2005]. Eine Her2-Genamplifikation und eine Proteinüberexpression gehen in univariaten Analysen mit einer schlechten Prognose einher. Dies bedeutet ein kürzeres krankheitsfreies und Gesamtüberleben, sowohl in Fällen mit, als auch in Fällen ohne Lymphknotenbefall [Dybdal, N. et al. 2005]. Allerdings korreliert die HER2/neu Überexpression mit einem hohen Malignitätsgrad und stellt damit keinen unabhängigen Prognosemarker dar.

#### II.2.2.3 uPA/PAI-1

Die Aktivität des Urokinase-Plasminogen-Aktivators und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ 1 (uPA/PAI-1) besitzt keine unabhängige prognostische Relevanz. Es existiert jedoch eine hohe Evidenz für ihre prädiktive Bedeutung [Decker, T. et al. 2009]. Sie sind zur Stratifizierung von nodal negativen Patientinnen mit G2-Tumoren hinsichtlich adjuvanter Chemotherapie geeignet [Jänicke, F. et al. 2001], [Euler, U. et al. 2006].

#### II.2.2.4 Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark [Naume, B. et al. 2004] bzw. zirkulierender Tumorzellen im Blut ist kann als Indikator für ein erhöhtes

Metastasierungsrisiko gewertet werden, ist aber wegen bislang uneinheitlicher Testmethoden noch nicht als Standard etabliert [Decker, T. et al. 2009].

#### II.2.2.5 Proliferationsmarker

Ebenso sind Marker der Tumorzellproliferation wie der Thymidinlabelingindex [Colozza, M. et al. 2005], Ki67, ein nukleäres nicht-histon Protein [Urruticoechea, A. et al. 2005] und die Bestimmung der Ploidie der Tumorzellen und der in der S-Phase befindlichen Tumorzellen [Chassevent, A. et al. 2001] noch nicht geeignet, um evidenzbasiert klinische Therapieentscheidungen zu begründen [Decker, T. et al 2009].

### **II.3 Typisierung von Mammakarzinomen**

Die Mehrzahl der Diagnosen in der Brustpathologie wird allein auf Grundlage der Beurteilung von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten gestellt. Trotzdem führen die Komplexität der Histologien, variierende Morphologie und sich überschneidende Eigenschaften verschiedener gut- und bösartiger Läsionen oft zu Problemen in der Diagnostik. Epitheliale Proliferationen verursachen dabei die meisten Probleme [Lerwill, M.F. 2004].

#### II.3.1 Histologische Typen des Mammakarzinoms laut WHO-Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003

70-80 % der invasiven Mammakarzinome fallen in die Gruppe der invasiv-duktalem Mammakarzinome. Hierbei handelt es sich um eine inhomogene Gruppe invasiver Karzinome, die keine speziellen histologischen Differenzierungsmerkmale aufweisen [Ellis I.O. et al 2003g]. Häufig findet sich eine in Relation zum invasiven Anteil ganz unterschiedlich ausgedehnte in situ-Komponente, zumeist unter dem Bild eines duktalem Carcinoma in situ (DCIS), seltener auch einer lobulären intraepithelialen Neoplasie. Zweithäufigster Tumortyp ist das invasiv-lobuläre Mammakarzinom, das 5-15 % aller Mammakarzinome ausmacht. Charakteristisch ist hier der Verlust der interzellulären Adhäsion durch das Fehlen der E-Cadherin Bildung, sowie ein häufig multifokales Auftreten mit gänsemarschartigem oder schießscheibenartigem Wachstumsmuster. Häufig ist das invasiv-lobuläre Mammakarzinom mit einer lobulären intraepithelialen Neoplasie vergesellschaftet [Ellis I.O. et al 2003h]. Alle übrigen histologisch unterscheidbaren

Formen des Mammakarzinoms, wie zum Beispiel das tubuläre, medulläre, (mikro-) papilläre, apokrine, adenoid-zystische oder muzinöse Mammakarzinom kommen vergleichsweise selten vor.

#### **II.4 Das neuroendokrine Mammakarzinom**

Einer der seltenen histologischen Typen des Mammakarzinoms ist das sogenannte neuroendokrine Mammakarzinom, mit dessen Definition sich die vorliegende Arbeit voranging befasst.

##### II.4.2 Neuroendokrine Mammakarzinome laut WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003

Die aktuell gültige Definition eines neuroendokrin differenzierten Mammakarzinoms liefert die WHO Klassifikation von 2003. Sie berücksichtigt das morphologische Erscheinungsbild der Tumoren, sowie die Expression sogenannter neuroendokriner Marker. Laut Definition der WHO von 2003 gilt ein Mammakarzinom als neuroendokrin differenziert, wenn sich in mehr als 50% seiner Zellen sogenannte neuroendokrine Marker nachweisen lassen und es morphologische Features neuroendokriner Karzinome zeigt. Karzinome mit unspezifischer, nicht neuroendokriner Histologie mit einzelnen Zellen, welche neuroendokrine Marker exprimieren, gehören laut der WHO Klassifikation von 2003 [Ellis I.O. et al 2003a] nicht zu den neuroendokrinen Mammakarzinomen. Sie werden als Karzinome mit neuroendokriner Differenzierung bezeichnet. Diese Differenzierung ist je nach Definition und Untersuchungsmethode in 10-50% aller Mammakarzinome nachweisbar [Miremadi, A. et al. 2002].

##### II.4.3 Definition neuroendokriner Zellen und neuroendokriner Tumoren

Was genau bezeichnet der Begriff „neuroendokrin“? In der Literatur lassen sich verschiedene Definitionen für den Begriff neuroendokriner Zellen und entsprechend neuroendokriner Tumoren finden.

Die Bezeichnung “neuroendokrin” definiert Zellen über ihre sekretorischen Produkte sowie einige zytoplasmatische Proteine, nicht so sehr über ihre Lokalisation oder ihren embryologischen Ursprung. Das neuroendokrine Zellsystem enthält alle endokrinen und



neuronalen Zellen, die einen gemeinsamen Phänotyp aufweisen. Dieser wird bestimmt durch die gleichzeitige Expression bestimmter Markerproteine und zelltypspezifischer hormoneller Produkte [Lamberts, S.W.J. et al. 2001]. Die Zellen, die diesem diffusen neuroendokrinen System angehören, sind zwar morphologisch und embryologisch heterogen, haben aber ein gemeinsames „neuroendokrines Programm“, welches durch ihre Fähigkeit charakterisiert ist, biologisch aktive Neuramine, Neuropeptide und verwandte Substanzen zu bilden [Gould, V.E. et al. 1987]. Idealerweise ist eine neuroendokrine Zelle definiert als neuronale oder epitheliale Zelle, die alle, oder die meisten der folgenden Kriterien erfüllt:

- die Zelle enthält sekretorische Granula
- die Sekretion der Zelle ist unbedingt in Richtung Blut gerichtet
- die sekretorischen Granula enthalten Peptidhormone und / oder biogene Amine.
- die Zelle ist „argyrophil“ (durch Versilberung anzufärben)
- die Zelle ist immunoreaktiv gegenüber Antiseren gegen NSE, Chromogranin A oder anderen sogenannten neuroendokrinen Markern  
[Abrahamsson, P.A. et al. 1986]
- Neuroendokrine Zellen bilden potente Neuropeptide die als Mediatoren auf verschiedene biologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Transformation und Invasion wirken  
[Nelson, E.C. et al. 2007]

#### II.4.4 Diagnose neuroendokriner Tumoren

Tumoren, die sich auf diese Zellen zurückführen lassen, bilden eine heterogene Gruppe von Neoplasien unterschiedlicher Dignität, die bestimmte gemeinsame lichtmikroskopische und zytologische Eigenschaften aufweisen. Diese sind aber wenig spezifisch, so dass die exakte Identifizierung neuroendokriner Tumoren zusätzlich zur lichtmikroskopischen Untersuchung von HE Schnitten oft die Heranziehung weiterer Techniken erfordert [Makretsov, N. et al. 2003]. Dazu gehören der Nachweis argyrophiler Zellen mit Hilfe der Versilberungstechnik nach Grimelius, der elektronenmikroskopische Nachweis elektronendichter Vesikel (dense core granules) und der immunhistochemische Nachweis spezifischer Proteine, sogenannter neuroendokriner Marker [Makretsov, N. et al 2003]. Sowohl die Versilberungstechnik als auch die Elektronenmikroskopie, anfangs die einzigen Instrumente zum Nachweis neuroendokriner Differenzierung, haben sich als recht unspezifisch erwiesen, weshalb sie in neueren Studien von immunhistochemischen

Techniken abgelöst worden sind. Die Grundlage der immunhistochemischen Techniken sind gegen die als neuroendokrine Marker bezeichneten Proteine gerichtete Antikörper, die farblich markiert werden und so indirekt den Nachweis der Proteine im histologischen Schnittpräparat erlauben.

#### II.4.5 Diagnose neuroendokriner Mammakarzinome

Die Diagnose neuroendokriner Tumoren der Brust ruht, wie auch bei neuroendokrinen Tumoren in anderen Organen, auf dem Nachweis neuroendokriner Marker sowie der Beschreibung einer typischen Morphologie.

#### II.4.6 Neuroendokrine Marker

Bei den sogenannten neuroendokrinen Markern handelt es sich um Proteine, die vor allem in neuronalen oder neuroendokrinen Zellen nachweisbar sind. Die Marker für neuroendokrine Differenzierung lassen sich in vier Klassen einteilen [Capella, C. et al. 1995]:

- zytosolische und membranassoziierte Marker (NSE, CD56)
- mit kleinen Vesikeln assoziierte Marker (Synaptophysin)
- mit sekretorischen Vesikeln assoziierte Marker (Chromogranin A)
- spezifische Peptidhormonmarker (Serotonin, Somatostatin, Gastrin, PPP, VIP, Insulin, Glucagon) [Williams, G.T. 2007]

#### II.4.7 In der vorliegenden Studie untersuchte neuroendokrine Marker im Detail

Im Folgenden werden der Ursprung, die Funktion sowie spezielle Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten neuroendokrinen Marker näher beleuchtet.

##### II.4.7.1 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein mit kleinen Vesikeln assoziierter Marker. Es ist ein glykosiliertes transmembranöses Protein, welches sowohl in neuronalen Zellen wie auch in neuroendokrinen Zellen und Tumoren nachweisbar ist [Miremedi, A. et al. 2002]. Es zeigt eine höhere Sensitivität für den Nachweis neuroendokriner Zellen als NSE oder CD56, weist aber trotzdem eine hohe Spezifität auf. Da es unabhängig von sekretorischen Granula

neuroendokriner Zellen auftritt, ist es vor allem nützlich, um schwach granulierte Tumoren zu erkennen [Williams, G.T. 2007].

#### II.4.7.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

Bereits 1978 wurde von Schmechel et al. der Beweis geführt, dass NSE einen Marker für neuroendokrin differenzierte Zellen darstellt [Schmechel, D. et al. 1978]. NSE ist damit einer der ersten immunhistochemischen Marker, die für Untersuchungen am neuroendokrinen Mammakarzinom eingesetzt wurden. NSE ist Mitglied einer Familie dimerer Enolasen. Diese liegen in verschiedenen Isoenzymformen vor, welche aus je zwei von drei Untereinheiten bestehen: alpha, beta, gamma. In verschiedenen Geweben finden sich die Untereinheiten in unterschiedlichen Kombinationen. Das gamma-gamma Dimer wird als neuronenspezifisch beschrieben und kommt in hohen Konzentrationen in zentralen und peripheren Neuronen sowie in neuroendokrinen Zellen vor. Bis heute sind viele Antikörper produziert worden, die NSE-spezifisch reagieren sollen, aber viele davon zeigen Kreuzreaktionen mit anderen Enolasen. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen empfiehlt sich im Allgemeinen die Verwendung monoklonaler Antikörper [Miremadi, A. et al. 2002]. NSE gehört zu den sogenannten zytosolischen Markern, die sich durch hohe Sensitivität aber niedrige Spezifität auszeichnen [Williams, G.T. 2007]. Trotzdem wird NSE aber bis heute als ein Standardmarker für neuroendokrine Differenzierung eingesetzt.

#### II.4.7.3 Chromogranin A

Chromogranin A wird ebenfalls als Marker für neuroendokrine Differenzierung angesehen. Das Protein ist ein Mitglied der Chromograninfamilie die sich in den neurosekretorischen Granula endokriner Gewebe finden lassen. Die Reaktion eines entsprechend markierten Antikörpers mit Chromogranin A weist neuroendokrine Tumoren mit hoher Spezifität aber niedriger Sensitivität nach [Williams, G.T. 2007]. Die Färbereaktion ist typischerweise granulär und ihre Verteilung ähnlich der in der Versilberung nach Grimelius beobachteten Reaktion. Die Intensität der Färbereaktion steht im Zusammenhang mit der Konzentration an neurosekretorischen Granula in der Zelle, je mehr Granula vorliegen, desto stärker ist die Anfärbung [Miremadi, A. et al. 2002].

#### II.4.7.4 CD56 (NCAM)

Bei CD56 auch als neural cell adhesion molecule (NCAM) bezeichnet, handelt es sich um ein von neuronalen und neuroendokrinen Tumoren exprimiertes Adhäsionsmolekül [Jin, L. et al. 1991]. Es gehört zu den membranassoziierten Markern und weist laut Literaturangaben eine hohe Sensitivität bei niedriger Spezifität auf [Williams, G.T. 2007]. CD56 moduliert das Wachstum, die Migration und Differenzierung neuroendokriner Zellen [Christofori G. 2003]. In Lungenkrebstumoren stellt CD56 einen sehr sensitiven und spezifischen Marker neuroendokriner Differenzierung dar [Brambilla, E. et al. 1992].

#### II.4.8 Morphologie der neuroendokrinen Mammatumoren

Die Erstbeschreibung der heute als neuroendokrin bezeichneten Mammakarzinome lieferten Feyrter und Hartmann 1963 als sie zwei Brustkrebstumoren mit „carcinoidem Wachstumsmuster“ beschrieben [Feyrter, F., Hartmann, G. 1963]. Die aktuelle WHO Klassifikation der Mammatumoren von 2003 [Ellis I.O. et al 2003e] unterscheidet beim neuroendokrinen Mammakarzinom die folgenden Morphologien:

##### II.4.8.1 Solide neuroendokrine Karzinome

Die soliden neuroendokrinen Karzinome der Brust zeigen drei verschiedene Wachstumsmuster. Es gibt ein insuläres, solid-papilläres und ein alveoläres Wachstumsmuster, die alle drei charakteristisch für solide neuroendokrine Karzinome sind. Das insuläre Wachstumsmuster ist gekennzeichnet durch zellreiche und zumeist kleine ballenförmige Zellverbände in einem zellarmen sklerosierten Stroma. Dieser Phänotyp findet sich auch bei den Karzinoiden des Gastrointestinaltraktes [Sapino A. et al. 2001a]. Die Beschreibung eines solid-papillären Karzinoms mit häufiger neuroendokriner Differenzierung lieferten Maluf und Koerner 1994 [Maluf H.M., Koerner, F.C. 1994]. Der Tumor ist durch zellreiche aber plumpe, scharf begrenzte Ballen und Stränge von Tumorzellen in einem sklerosierten Stroma charakterisiert. Innerhalb der Ballen lassen sich feine fibrovaskuläre Septen (Papillenstöcke) nachweisen. Häufig ist eine Palisadenstellung der peripheren Zellkerne, gelegentlich finden sich aber auch abgeflachte und tangential orientierte Zellkerne in der Peripherie, die an eine Myoepithelzellschicht denken lassen. Es können auch Pseudorosetten vorkommen, die von einem kribriformen Wachstumsmuster abgegrenzt werden müssen [Nassar, H. et al. 2006].

Letztlich findet sich ein alveoläres Muster, welches an das Bild einer alveolären Variante lobulärer Mammakarzinome erinnert. Hier liegen ballenförmige und alveoläre Verbände größerer Zellen mit einem hellen feingranulären Zytoplasma vor [Sapino A. et al. 2001a]. Daneben kommen uncharakteristische solide und kohäsive Wachstumsmuster vor. Die Wachstumsmuster liegen nicht immer in Reinform vor, sondern finden sich z.T. auch nebeneinander im selben Tumor. Die Zellen des soliden neuroendokrinen Mammakarzinoms zeichnen sich oft durch einen plasmazytoiden oder spindelzelligen Aspekt aus. Das Zytoplasma ist häufig eosinophil und feingranulär. Die Kerne sind ansonsten rund und relativ monomorph. Mit Hilfe von Versilberungstechniken nach Bodian oder Grimelius lassen sich argyrophile neurosekretorische Granula zur Darstellung bringen. Am Elektronenmikroskop lässt sich der Nachweis elektronendichter Granula führen. Die Mehrheit der soliden neuroendokrinen Tumoren zeigt eine starke Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren [Sapino, A. 2001a et al.]. Die Häufigkeit einer HER2/neu-Überexpression wurde noch nicht systematisch untersucht, ist aber so weit bekannt, extrem selten [Yamamoto, J. et al. 2004].

#### II.4.8.2 Kleinzelliges Karzinom

Die Zellen liegen dicht zusammengelagert und sind extrem zytoplasmaarm, ihre Zellkerne sind unregelmäßig und hyperchromatisch, abschnittsweise finden sich Quetschartefakte. Gelegentlich zeigen sich kleinfleckige Nekrosen mit pyknotischen Kernen. Lymphgefäßeinbrüche sind häufig, müssen aber von artefiziellen Spaltbildungen um die Tumorzellverbände abgegrenzt werden [Ellis I.O. et al. 2003]. In mehr als 50% der Fälle findet sich eine Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression [Shin, S.J. et al. 2000]. Dieser Tumortyp kann leicht mit kleinzelligen neuroendokrinen Tumoren der Lunge oder anderer Lokalisationen verwechselt werden. Die morphologische Unterscheidung gelingt nur dann, wenn eine zumeist ebenfalls kleinzellige intraduktale Tumorkomponente oder eine richtungweisende Hormonrezeptorexpression vorliegt. Eine Expression von TTF-1 kann nicht zur Abgrenzung eines kleinzelligen Mamma- und Lungenkarzinoms herangezogen werden, da auch die sehr seltenen kleinzelligen neuroendokrinen Tumoren der Mamma diesen für Lungen- und Schilddrüsenkarzinome typischen Transkriptionsfaktor exprimieren.

#### II.4.8.3 Großzelliges neuroendokrines Karzinom

Große polygonale Zellen mit hoher Kernpleomorphie und eine sehr hohe Mitosefrequenz sind die Merkmale dieser gering differenzierten Karzinome. Das Wachstumsmuster ist solide und die Tumoren weisen nur wenig Stroma auf. Ein zystischer nekrotischer Tumorzerfall kann sehr ausgeprägt vorliegen [Sapino, A. et al. 2001b].

---

## III Material & Methoden

### III.1 Das untersuchte Kollektiv

Um die Expression neuroendokriner Marker beim primären invasiven Mammakarzinom zu analysieren, wurden 490 konsekutive primäre invasive Mammakarzinome aus den Jahren 2001 bis 2004 aus dem Archiv des Institutes für Pathologie am Universitätsklinikum Essen ausgewählt. Es handelte sich dabei ausschließlich um Primärtumoren. Rezidive, Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen fanden keinen Eingang in die Untersuchung. Die Präparate waren entsprechend dem im Institut üblichen Verfahren mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Tumoren kleiner als 5 mm wurden nicht untersucht, um das Tumormaterial für eventuelle spätere patientenrelevante Nachuntersuchungen zu erhalten. Das Alter, die Tumorgöße und der Lymphknotenstatus, sowie der Östrogen/Progesteronrezeptor- und HER2/neu Status der untersuchten Mammakarzinome wurden aus dem Pathologiebefund der Tumoren entnommen. Das histologische Typing der Tumoren entsprechend der WHO Klassifikation der Tumoren der Mamma und der weiblichen Genitalorgane aus dem Jahre 2003 [Ellis I.O. et al 2003f], wurde an Hand von HE Schnitten vorgenommen. Das Grading entsprechend dem in der S3-Leitlinie für die Behandlung des Mammakarzinoms angegebenen Score nach Elston und Ellis. [Ellis, I.O. et al.1992], [Elston, C.W., Ellis, I.O. 1991] erfolgte an den Tissue Mikroarrays.

### III.2 Herstellung von Tissue Microarrays

Aus den in Paraffin eingebetteten Präparaten primär invasiver Mammakarzinome wurden Stanzzyylinder entnommen, von denen je 22 in neue, sogenannte Multitumorblöcke oder Tissue Microarrays, gegossen wurden. Die Herstellung der Multitumorblöcke erfolgte in Anlehnung an eine von Kononen et al. beschriebene Methode [Kononen, J. et al. 1998]. Die Festlegung des zu stanzenden Bereichs der in Paraffin eingebetteten Tumoren erfolgte an Hand des HE-Schnittes am Lichtmikroskop. Der Biopsiezyylinder wurde manuell an der entsprechenden Stelle aus dem eingebetteten Tumor entnommen. Die Entnahme des Stanzzyinders erfolgte mittels einer 3 mm dicken, dünnwandigen, scharfen Hohnadel zur Hautstanzbiopsie (Fa. pfa Produkte für die Medizin AG, Köln). Jeweils 22 Biopsiezyylinder wurden mit je einem Schilddrüsengewebe und Lebergewebe enthaltendem Stanzzyylinder

als Positivkontrolle für die geplanten immunhistochemische Färbungen zusammen in einen neuen Paraffinblock gegossen. Dazu wurden die Zylinder mit heißem Paraffin übergossen, so dass nach Aushärtung des Paraffins ein neuer, 24 Zylinder enthaltender, sogenannter Tissue Microarrayblock entstand.

### **III.3 Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

#### III.3.1 Technik der Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach dem im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen üblichen Verfahren durchgeführt. Nach dem Schneiden der Tissue Microarrayblöcke am Microtom (3 µm Schnittdicke) und dem Aufziehen auf Objektträger („Super Frost Plus“ geputzt, gebrauchsfertig, geschliffen von R. Langenbrink, Labor und Medizintechnik Teningen, Deutschland), sowie der Entparaffinierung und Rehydrierung, erfolgte die Vorbehandlung der Präparate.

##### III.3.1.1 Vorbehandlung der zu färbenden Schnittpräparate

Die Vorbehandlung der Schnitte an denen Chromogranin A, NSE, CD56 markiert werden sollten, bestand aus einer 20 minütigen Inkubation in Citratpuffer (pH 6,0) (DCS Innovative Diagnostik Systeme Hamburg) in einem 97°C warmen Wasserbad. Die Vorbehandlung der mit Östrogenrezeptorantikörpern zu färbenden Schnitte, bestand aus einer 30minütigen Inkubation in Citratpuffer (pH 6,0) (DCS Innovative Diagnostik Systeme Hamburg) ebenfalls in einem 97°C warmen Wasserbad. Nach der Vorbehandlung kühlten alle Präparate im Pufferbad 20 min bei Raumtemperatur ab. Für die HER2/neu Immunhistochemie erfolgte das Vorgehen entsprechend der Angaben des Herstellers (HercepTest™ for the DakoCytomation Autostainer, DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark). Für die Färbung mit gegen Synaptophysin gerichteten Antikörpern war keine Vorbehandlung notwendig.



### III.3.1.2 Färbeprotokolle

Tabelle 1: Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primärantikörper

Antikörper gegen	Hersteller	Klon	Verdünnung
Synaptophysin	DCS {1}	SP11, Kaninchen IgG	1:400
Chromogranin A	Novocastra {2}	monoklonal, Maus	1:100
NSE	Dako {3}	polyklonal, Kaninchen	1:3.000
CD56	DCS {1}	123c3.d5, Maus	1:150
ER	DCS {1}	SP1, monoklonal, Kaninchen	1:600
PR	DCS {1}	SP2, monoklonal, Kaninchen	1:400
Her2/neu	Dako {4}	polyklonal, Kaninchen	laut „HercepTest™“

{1} DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland

{2} Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, Grossbritannien

{3} Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

{4} Dako Denmark A/S, ehemals DakoCytomation, Glostrup Dänemark

Die Färbungen wurden automatisch mit Hilfe des Färbeautomaten „DAKO Autostainer plus“ (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) vorgenommen. Dabei wurden die oben genannten Primärantikörper (Tabelle 1) verwendet, sowie die im Folgenden aufgeführten Detektionssysteme die dazu dienen die an die entsprechenden Proteine im Präparat gebundenen Primärantikörper farbig zu markieren. Nur so wird die lichtmikroskopische Auswertung ermöglicht. Alle Arbeitsschritte im Autostainer erfolgten bei Raumtemperatur.

#### III.3.1.2.1 Anfärbung von NSE, Chromogranin, Synaptophysin, CD56

Detektionssystem: ChemMate Dako EnVision Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Code K5007) (DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)

#### III.3.1.2.2 Anfärbung von Östrogen-, Progesteronrezeptoren

Detektionssystem: ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland) und DAB Substrate Kit. (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)

#### III.3.1.2.3 Anfärbung von Her2/neu

HercepTest Detektionssystem: „HercepTest™ for the DakoCytomation Autostainer (Kode-Nr. K5207). Nach der Bearbeitung der Schnitte im Färbeautomaten erfolgte eine Spülung

in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und abschließend in Xylol. Danach wurden die Schnitte mit Pertex Eindeckmedium (Meditate GmbH, Deutschland, Burgdorf) im Promounter RCM 2000 Eindeckautomaten von Mediate (Meditate GmbH, Deutschland, Burgdorf) eingedeckt.

### III.2 Auswertung der Immunhistochemischen Untersuchungen

Zwei Untersucher beurteilten unabhängig voneinander am Lichtmikroskop die Präparate, Diskrepanzen wurden am Diskussionsmikroskop beigelegt. Bei der Beurteilung der Expression von Chromogranin A, Synaptophysin, NSE wurde nur eine zytoplasmatische, bei CD56 eine membranständige Immunreaktion beurteilt

Die semiquantitative Beurteilung der Färbereaktion für diese Antikörper erfolgte nach dem in den europäischen Leitlinien für das Mammographie-Screening bezüglich der Hormonrezeptoranalyse empfohlenen Allred-Score [Phillips, T. et al. 2007], wobei sich der Score-Wert aus der Addition der Punktwerte von prozentualem Anteil gefärbter Zellen und der Färbeintensität ergibt.

Tabelle 2: Allred-Score

Anteil gefärbter Zellen	Punktwert	Intensität der Färbereaktion	Punktwert
0	0	schwach	1
<1 %	1	mäßig	2
2-10 %	2	stark	3
11-33 %	3		
34-66 %	4		
67-100 %	5		

Die Fälle welche eine neuroendokrine Marker-Expression zwischen 50 und 66% zeigen, fallen nach eigener Erfahrung kaum ins Gewicht, weshalb für die folgenden Vergleiche die Kategorie 5 (66-100% der Zellen zeigen neuroendokrine Markerexpression) mit der WHO-Definition >50% neuroendokrinreaktiver Zellen gleichsetzen.

Bei der Auswertung der HER2/neu Analyse werden nur membrangebundene Reaktionen gewertet. Die Auswertung erfolgt wie in Tabelle 3 ausgeführt.

Tabelle 3: Auswertung des Herzeptests zur Beurteilung der Her2/neu Expression

Färbemuster	Punktwert	Her2/neu Überexpression
Keine Färbung oder <10% der Tumorzellen zeigen Membranreaktion	0	Nicht vorhanden
Schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung in >10% der Tumorzellen, unvollständige Membranfärbung	1+	Nicht vorhanden
Schwache bis moderate komplette Membranfärbung in >10% oder starke Färbung in <30% der Tumorzellen	2+	Schwach
Starke, die gesamte Membran umfassende Färbung in 30% der Zellen	3+	Stark

### III.4 Statistische Auswertung

Entsprechend der Häufigkeit und Intensität der Expression neuroendokriner Marker in den untersuchten Mammakarzinomen wurden, in Anlehnung an die Kategorien des Allred-Scores Gruppen gebildet. Es wurde jeweils berechnet mit welcher Sensitivität und Spezifität ein Marker bei einem bestimmten Schwellenwert (Cutoff Wert) die neuroendokrine Morphologie nachweist.

Ab diesem Schwellenwert gilt ein Mammakarzinom als neuroendokrin differenziert. Als Referenz (Goldstandard) diente dabei die am Lichtmikroskop am HE-Schnitt diagnostizierte neuroendokrine Morphologie (s.o.).

#### III.4.1 Festlegung von Cutoff Werten, Youden Index

Die Güte eines Tests wird durch seine Sensitivität und Spezifität beschrieben. Die Sensitivität beschreibt in diesem Fall den Anteil an Tumoren die ein positives Testergebnis haben und korrekt als neuroendokrin erkannt werden. Die Spezifität beschreibt den Anteil, an Tumoren, deren Testergebnis korrekt negativ ausfällt. Ein perfekter diagnostischer Test hat sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von 100%. Dies wird in der Realität jedoch selten erreicht [Bewick, V. et al. 2004]. Deshalb ist es wünschenswert denjenigen Cutoff Wert zu finden, der die bestmögliche Kombination aus hoher Sensitivität und Spezifität liefert. Dazu dient die Berechnung des Youden Index:

$$\text{Youden Index (J)} = (\text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1)$$

Der Cutoff, dessen Sensitivität und Spezifität den maximalen Youden Index liefert, stellt den Wert dar, an dem die Kombination aus Sensitivität und Spezifität ein besonders aussagekräftiges Testergebnis erwarten lässt [Bewick, V. et al. 2004].

#### III.4.2 Kombination mehrerer Tests

Weist ein Test alleine nicht die gewünschte Sensitivität oder Spezifität auf, so kann man verschiedene Tests kombinieren, um entweder Sensitivität oder Spezifität zu steigern. Im vorliegenden Fall bedeutet die Kombination von Tests die Auswertung nicht nur einer, sondern mehrerer immunhistochemischer Färbungen. Es gibt zwei mögliche Vorgehensweisen:

- Serielles Testen

Folgt der „Believe-the-negative“ Regel: Falls einer der Einzeltests negativ wird, ist die Testentscheidung des kombinierten Vorgehens ebenfalls negativ. Dies führt zu einer Abnahme der Sensitivität und einer Zunahme der Spezifität [Hilger, R.-D. 2007].

- Paralleles Testen

Folgt der „Believe-the-positive“ Regel: Falls einer der Einzeltests positiv wird, ist die Testentscheidung des kombinierten Vorgehens ebenfalls positiv. Dies führt zu einer Zunahme der Sensitivität und einer Abnahme der Spezifität [Hilger, R.-D. 2007].

#### III.4.3 Statistische Zusammenhangsmaße

##### III.4.3.1 Chi Quadrat Test

Als Zusammenhangsmaß zwischen verschiedenen kategorialen in dieser Studie untersuchten Variablen wurde bei ausreichend hoher Fallzahl (mindestens fünf Fälle pro Feld, d.h. mindestens 20 Fälle insgesamt) ein Chi Quadrattest durchgeführt.

Der Chi Quadrattest dient der Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Mit dem Chi Quadrat Test wird die Hypothese überprüft, ob zwei Merkmale voneinander unabhängig sind [Trampisch, H.J. 2000]. Wie allgemein üblich, wurde ein p-Wert von weniger als 0,05 als "signifikant" angesehen.

#### III.4.3.2 Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher ist ebenso wie der Chi Quadrat Test, ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in einer Kontingenztafel. Er wurde zur Berechnung herangezogen, wenn die Erwartungshäufigkeiten unter 0,05 und/oder die Gesamtzahl der Stichproben unter  $n=20$  lag, da er auch bei wenigen Beobachtungen sein Niveau hält [Sachs, L. 1999]. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS® in der Programmversion 14.0 sowie Microsoft® Excel 2000.

## IV Ergebnisse

Die klinischen und pathologischen Daten des Untersuchungskollektivs aus 490 primär invasiven Mammakarzinomen aus den Jahren 2001-2004 sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Klinische und pathologische Daten der untersuchten Mammakarzinome

Alter	Median Spannweite	61 Jahre 23-99 Jahre	
		Anzahl	%
<b>Geschlecht</b>	weiblich	486	99,2
	männlich	4	0,8
<b>Histologie</b>	duktal	334	68,2
	lobulär	80	16,3
	tubulär	10	2,0
	mikropapillär	10	2,0
	muzinös	9	1,8
	apokrin	14	2,9
	kribriform	1	0,2
	medullär	3	0,6
	neuroendokrin	11	2,2
	glykogenreich	8	1,6
	adenoid-zystisch	1	0,2
	metaplastisch	3	0,6
	andere	6	1,2
<b>Tumorgroße</b>	pT1	232	47,3
	pT2	204	41,6
	pT3	16	3,3
	pT4	37	7,6
	pTx	1	0,2
<b>Lymphknotenstatus</b>	N0	265	54,1
	N1	115	23,5
	N2	49	10,0
	N3	33	6,7
	NX	28	5,7
<b>Grading</b>	G1	83	16,9
	G2	249	50,8
	G3	158	32,3
<b>Östrogenrezeptoren</b>	positiv	379	77,3
	negativ	111	22,7
<b>Progesteronrezeptoren</b>	positiv	308	62,9
	negativ	182	37,1
<b>DAKO-Score</b>	0	164	33,5
	1	128	26,1
	2	99	20,2
	3	99	20,2

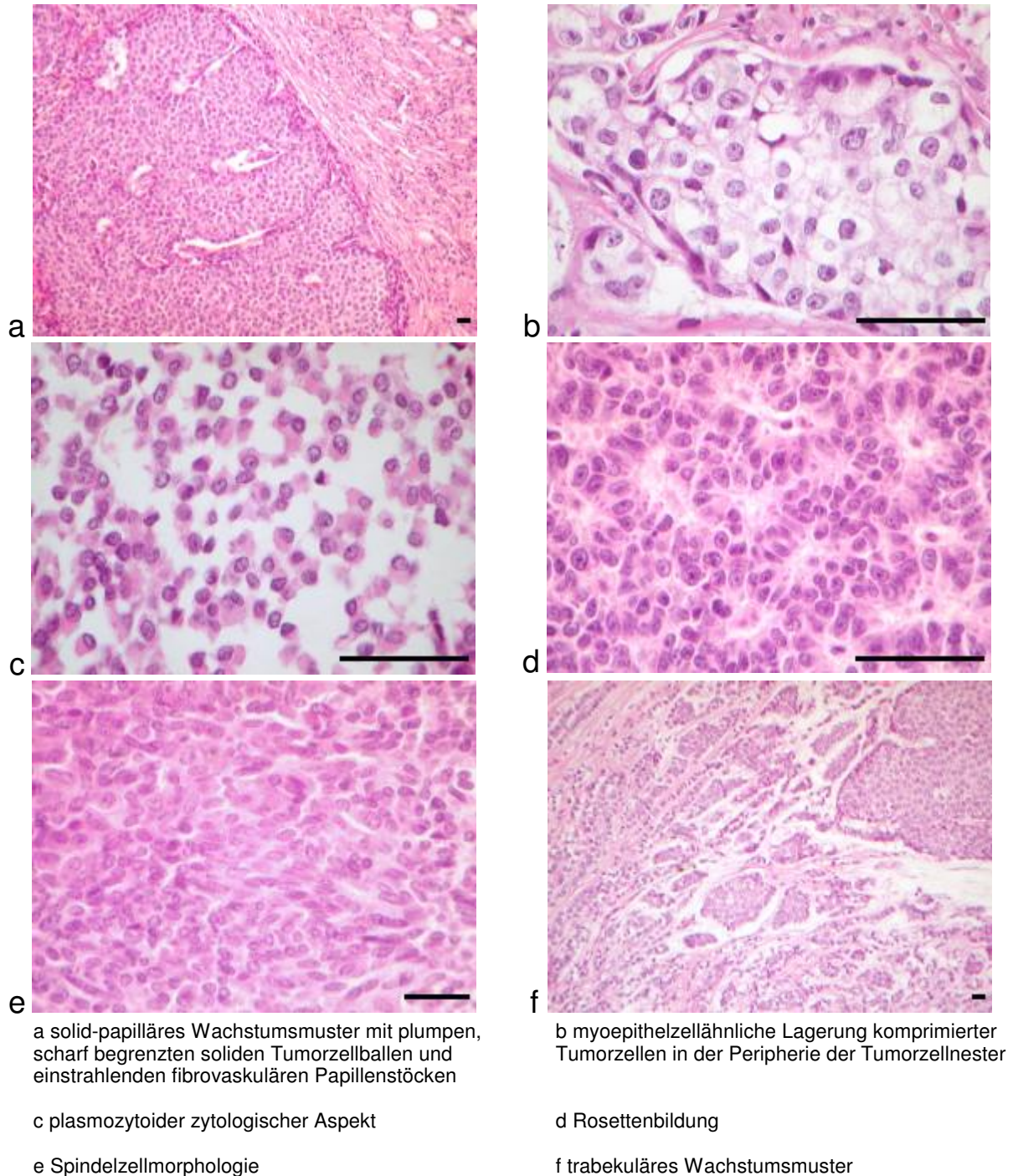
Der Altersmedian lag bei 61 Jahren, (Spannweite: 23-99 Jahre). 436 Tumoren (89,0%) befanden sich im Stadium T1 oder T2. 265 (54,1%) der Tumoren wiesen keinen Befall von Lymphknoten auf. In 379 Fällen (77,3%) ließ sich eine Expression von Östrogenrezeptoren nachweisen (in >10% der Zellen). Progesteronrezeptoren waren in 62,9% der untersuchten

Karzinome nachweisbar (in >10% der Zellen). Histologisch wurden 334 Tumoren (68,2%) als duktal, 80 als lobulär (16,3%), sowie 11 als neuroendokrin (2,2%) charakterisiert.

#### IV.1 Morphologie neuroendokriner Mammakarzinome in der HE-Färbung

Abbildung 1: Morphologische Charakteristika neuroendokriner Mammakarzinome

Eichbalken = 0,1mm

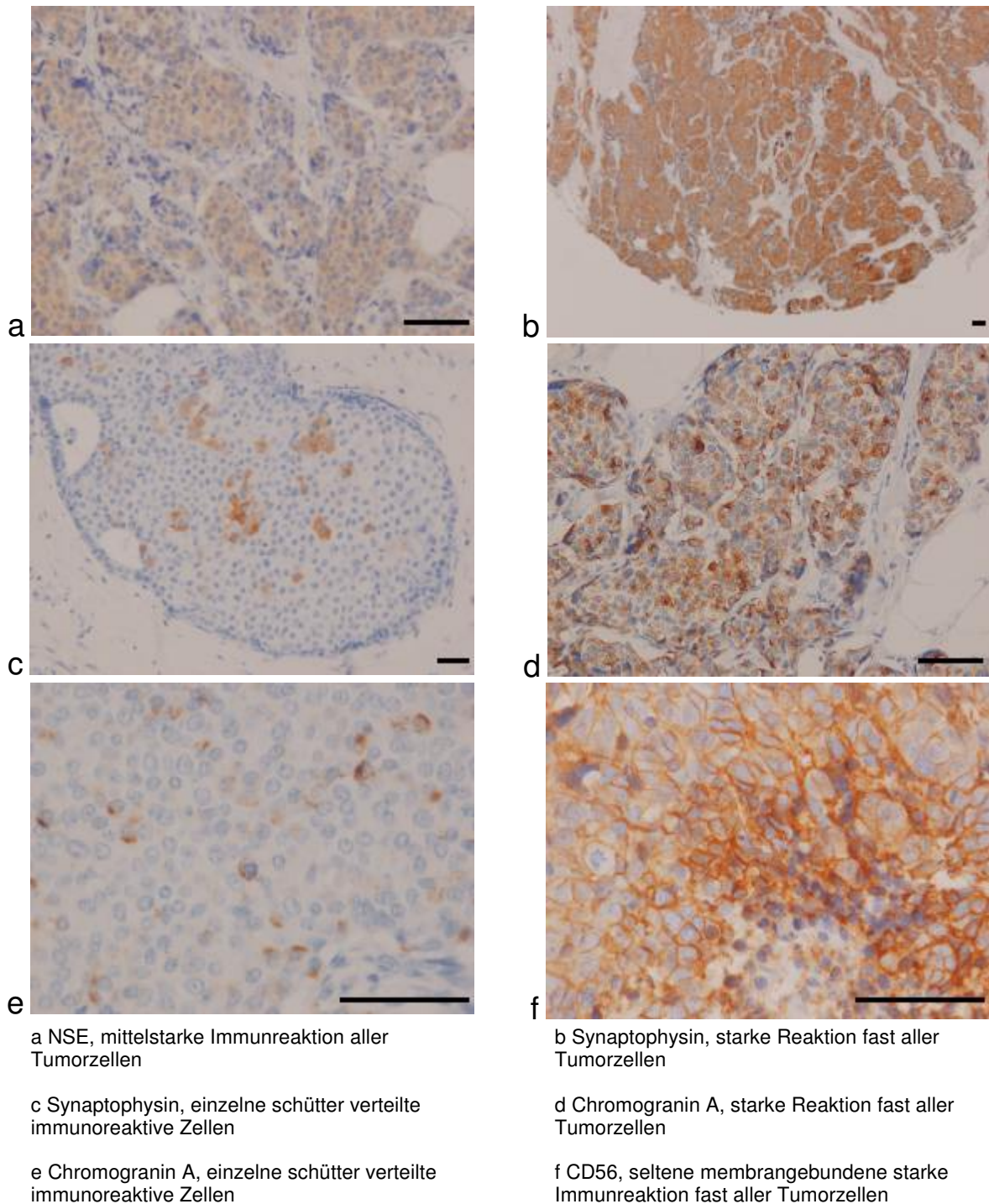


## IV.2 Darstellung neuroendokriner Karzinome mit Hilfe der Immunhistochemie

Die Expression von NSE, Chromogranin A und Synaptophysin fand sich erwartungsgemäß im Zytoplasma, bei CD56 membranebunden. Abbildung 2 liefert Beispiele für die Verteilung der immunreaktiven Zellen.

Abbildung 2: Expression neuroendokriner Marker in invasiven Mammakarzinomen

Eichbalken = 0,1mm



Detailanalyse der Expression neuroendokriner Marker bei invasiven Mammakarzinomen im Hinblick auf die Definition des neuroendokrinen Mammakarzinoms



Bezüglich des Verteilungsmusters der immunoreaktiven Zellen ist somit neben Arealen immunoreaktiver Zellen auch eine schütterere Verteilung einzelner immunoreaktiver Zellen oder Zellcluster häufig anzutreffen.

### IV.3 Häufigkeit der neuroendokrinen Histologien im untersuchten Kollektiv

Im untersuchten Kollektiv fanden sich insgesamt elf morphologisch neuroendokrine Karzinome (vgl. Tabelle 4, Seite 30). Darunter waren zehn solide neuroendokrine Karzinome sowie ein großzelliges neuroendokrines Karzinom. Es fand sich kein kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

### IV.4 Häufigkeit neuroendokriner Markerexpression im untersuchten Kollektiv

Die Häufigkeit der Expression der neuroendokrinen Marker erwies sich als stark abhängig vom verwendeten Cutoff Wert. Unabhängig davon wurde am häufigsten eine Expression von NSE, gefolgt von Synaptophysin gefunden, während Chromogranin A und CD56 nur selten nachgewiesen werden konnten (Tabelle 5).

Tabelle 5: Expression neuroendokriner Marker bei invasiven Mammakarzinomen in Abhängigkeit der verwendeten Cutoff Werte

Cutoff	NSE		Synaptophysin		Chromogranin		CD56	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
>0%	121	24,7	104	21,2	23	4,7	22	4,5
>1%	107	21,8	83	16,9	17	3,5	16	3,3
>10%	82	16,7	17	3,5	6	1,2	5	1,0
>33%	57	11,6	8	1,6	5	1,0	1	0,2
>66%	35	7,1	6	1,2	3	0,6	1	0,2

#### IV.4.1 WHO-kompatible Expression neuroendokriner Marker in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp

Es fanden sich 38 Fälle (7,8%), bei denen jeweils einer oder mehrere neuroendokrine Marker in mehr als 66% (gleichgesetzt mit 50%) der Tumorzellen exprimiert wurden und die somit bezüglich den immunhistochemischen Kriterien der Definition eines neuroendokrinen Mammakarzinoms gemäß WHO Klassifikation entsprechen [Ellis I.O. et al 2003d]. Die Detailanalyse der verschiedenen Tumortypen im Kollektiv ergibt, dass die geringe Spezifität

(93,9%) durch eine neuroendokrine Markerexpression in duktalem, lobulären, muzinösen, glykogenreichen, mikropapillären und metaplastischen Karzinomen entsteht. (Tabelle 6)

Tabelle 6: Expression neuroendokriner Marker entsprechend des Cutoff Wertes der „WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane“ in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp

Histologischer Tumortyp		>66 % der Zellen positiv für mindestens einen neuroendokrinen Marker	
Bezeichnung	Gesamt	Anzahl absolut	Anzahl %
duktal	334	21	6,3
lobulär	80	2	2,5
tubulär	10	0	0,0
mikropapillär	10	1	10,0
muzinös	9	2	22,2
apokrin	14	0	0,0
kribriform	1	0	0,0
medullär	3	0	0,0
neuroendokrin	11	9	81,8
glykogenreich	8	2	25,0
adenoid-zystisch	1	0	0,0
metaplastisch	3	1	33,3
andere	6	0	0,0
Gesamt	490	38	7,8

Daraus ergeben sich folgende Kennzahlen für den Nachweis der neuroendokrinen Tumoren:

Sensitivität	81,80%
Spezifität	93,90%
Youden Index	0,757

Die neuroendokrine Morphologie wird unter Berücksichtigung des WHO Cutoffs von >50% (entsprechend 66%-100%) mit einer Sensitivität von 81,8% (9 von 11 Fällen) erkannt, bei einer Spezifität von 93,9 (450 von 479 Fällen werden korrekterweise als morphologisch nicht-neuroendokrin differenziert erkannt). Daraus errechnet sich ein Youden-Index von 0,757. Die morphologisch nicht-neuroendokrin differenzierten Fälle die in 66-100% der Zellen eine Markerexpression zeigen, verteilen sich wie folgt: 33,3% der metaplastischen Tumoren (1 von 3 Fällen), 25% der glykogenreichen Tumoren (2 von 8 Fällen) 22,2% der muzinösen Tumoren (2 von 9 Fällen) und 10% der mikropapillären Tumoren (1 von 10 Fällen) zeigen in 66-100% der Fälle eine neuroendokrine Markerexpression. Die Expression bei den duktalem Karzinomen (21 von 334 Fällen), beträgt 6,3%, bei den lobulären Karzinomen (2 von 80 Fällen), entsprechend 2,5%.

## IV.5 Definition neuer Cutoff Werte der untersuchten neuroendokrinen Marker

Um festzustellen, welcher Prozentsatz mit neuroendokrinen Markern reagierender Zellen in einem Mammakarzinom am besten die neuroendokrine Morphologie wiedergibt, wurde für jede einzelne Färbung berechnet, mit welcher Sensitivität und Spezifität die morphologisch neuroendokrinen Karzinome aus dem Gesamtkollektiv herausgefiltert werden, wenn als Schwellenwert für die neuroendokrine Differenzierung eine Expression von neuroendokrinen Markern in >0%, >1%, >10%, >33% und 66% der Zellen festgelegt wird. Der jeweilige Schwellenwert wird im Folgenden durch die Bezeichnung „Anteil“ ausgedrückt.

Aus der jeweiligen Sensitivität und Spezifität wurde der zugehörige Youden Index berechnet. Derjenige Cutoff Wert der einzelnen Färbungen, der den maximalen Youden Index erbringt, wurde als optimaler Cutoff Wert für die jeweilige Färbung im untersuchten Kollektiv angenommen.

### IV.5.1 Daten der einzelnen Färbungen

Es folgt eine Übersicht über die vier untersuchten neuroendokrinen Marker: Synaptophysin, NSE, Chromogranin A und CD56.

Tabelle 7: Übersicht über die vier untersuchten Marker, Synaptophysin, NSE, Chromogranin A und CD56 als Einzelmarker.

*Der Grenzwert, der laut Definition der WHO erreicht sein muss um ein Karzinom als neuroendokrin zu klassifizieren (66%) ist mit \* markiert und kursiv gedruckt. Der entsprechend dem maximalen Youden Index bestimmte beste Grenzwert ist fett gedruckt.*

#### IV.5.1.1 Synaptophysin als Einzelmarker

Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
Synaptophysin Anteil >0%	11 von 11	100,0	386 von 479	80,6	0,806
<b>Synaptophysin Anteil &gt;1%</b>	<b>11 von 11</b>	<b>100,0</b>	<b>407 von 479</b>	<b>85,0</b>	<b>0,85</b>
Synaptophysin Anteil >10%	6 von 11	54,5	468 von 479	97,7	0,522
Synaptophysin Anteil >33%	4 von 11	36,4	475 von 479	99,2	0,356
<i>*Synaptophysin Anteil &gt;66%</i>	<i>2 von 11</i>	<i>18,2</i>	<i>475 von 479</i>	<i>99,2</i>	<i>0,174</i>

IV.5.1.2 NSE als Einzelmarker

Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
NSE Anteil >0%	11 von 11	100,0	369 von 479	77,0	0,77
NSE Anteil >1%	11 von 11	100,0	383 von 479	80,0	0,80
NSE Anteil >10%	11 von 11	100,0	408 von 479	85,0	0,852
<b>NSE Anteil &gt;33%</b>	11 von 11	<b>100,0</b>	<b>433 von 479</b>	<b>90,4</b>	<b>0,904</b>
<i>*NSE Anteil &gt;66%</i>	<i>9 von 11</i>	<i>81,8</i>	<i>453 von 479</i>	<i>94,6</i>	<i>0,764</i>

IV.5.1.3 Chromogranin A als Einzelmarker

Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<b>Chromogranin A Anteil &gt;0</b>	<b>7 von 11</b>	<b>63,6</b>	<b>463 von 479</b>	<b>96,7</b>	<b>0,603</b>
Chromogranin A Anteil >1	6 von 11	54,5	468 von 479	97,7	0,522
Chromogranin A Anteil >10	3 von 11	27,3	476 von 479	99,4	0,267
Chromogranin A Anteil >33	3 von 11	27,3	477 von 479	99,6	0,269
<i>*Chromogranin A Anteil &gt;66</i>	<i>1 von 11</i>	<i>9,0</i>	<i>477 von 479</i>	<i>99,6</i>	<i>0,087</i>

IV.5.1.4 CD56 als Einzelmarker

Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<b>CD56 Anteil &gt;0</b>	<b>2 von 11</b>	<b>18,2</b>	<b>459 von 479</b>	<b>95,8</b>	<b>0,14</b>
CD56 Anteil >1	1 von 11	9,0	464 von 479	96,9	0,06
CD56 Anteil >10	1 von 11	9,0	475 von 479	99,2	0,083
CD56 Anteil >33	0 von 11	0,0	478 von 479	99,8	0,002
<i>*CD56 Anteil &gt;66</i>	<i>0 von 11</i>	<i>0,0</i>	<i>478 von 479</i>	<i>99,8</i>	<i>0,002</i>

Synaptophysin erkennt bei geforderten 66% angefärbter Zellen die neuroendokrine Morphologie mit einer Sensitivität von 18,2% und einer Spezifität von 99,2% was einem Youden Index von 0,174 entspricht. Bei einem Grenzwert von mindestens 1% gefärbter Tumorzellen wird die neuroendokrine Morphologie mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 85% erkannt, was einem Youden Index von 0,85 entspricht.

Hält man sich bei NSE an den Grenzwert von 66% positiver Zellen, so werden morphologisch neuroendokrine Tumoren mit einer Sensitivität von 81,8% erkannt. Die Spezifität beträgt 94,6%. Dies entspricht einem Youden Index von 0.764. Wählt man hingegen mindestens 33% angefärbter Zellen als Grenzwert, so steigt die Sensitivität auf 100% an, die Spezifität sinkt auf 90,4% berechnet man den Youden Index, steigt dieser von 0,764 auf 0,904.

Chromogranin A erreicht, wenn man den WHO Grenzwert von 66% zugrunde legt, eine Sensitivität von 9,0% bei einer Spezifität von 99,6%. Dies ergibt einen Youden Index von 0,087. Die besten Werte werden mit Hilfe des Markers Chromogranin erzielt, wenn jegliche Anfärbung von Tumorzellen bereits als positiv gewertet wird. In diesem Fall wird eine Sensitivität von 63,6% erreicht bei einer Spezifität von 96,7%. Daraus berechnet sich ein Youden Index von 0,603.

CD56 erkennt auf Grundlage des WHO-Schwellenwertes 66% keinen Tumor als neuroendokrin. Die höchsten Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht CD56, wenn bereits ein Prozentsatz  $> 0\%$  angefärbter Zellen als positiv angesehen wird. In diesem Fall erreicht CD56 eine Sensitivität von 18,2% bei einer Spezifität von 95,8%, was einem Youden Index von 0,140 entspricht.

#### IV.5.2 Berücksichtigung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen

Nach der Festlegung neuer Cutoff Werte für die Anzahl immunhistochemisch positiver Zellen stellte sich die Frage, ob auch die Intensität der Anfärbung eine Rolle spielt. Die Intensität der Färbungen wurde in fünf Klassen eingeteilt:

- Intensität 1=schwach,
- Intensität 2=mittel
- Intensität 3=stark
- Intensität 1/2=schwach oder mittel
- Intensität 2/3=mittel oder stark.

Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität mit der die vier Marker die morphologisch neuroendokrine Differenzierung nachweisen, wurde für jeden der vier untersuchten Marker in jeder möglichen Kombination mit der Farbintensität berechnet. Angegeben sind nur die jeweils besten Ergebnisse, die sich unter Berücksichtigung der Intensität erreichen ließen.

Tabelle 8: Berücksichtigung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen

Bester Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
Synaptophysin Anteil >1%	11 von 11	100	407/479	85,0	0,85
Synaptophysinanteil >1% und Intensität 2/3	11 von 11	100	429/479	89,6	0,896
NSE Anteil >33%	11 von 11	100	433/479	90,4	0,904
NSE Anteil >33% und Intensität 1/2	11 von 11	100	435/479	90,8	0,908
Chromogranin A Anteil >0%	7 von 11	63,6	463/479	96,7	0,603
Chromogranin A Anteil >0% und Intensität 2/3	7 von 11	63,6	472/479	98,5	0,621
CD56 Anteil > 0%	2 von 11	18,0	459/479	95,8	0,138
CD56 Anteil >0% und Intensität 1	2 von 11	18,0	471/479	98,3	0,163

Die Berücksichtigung der Intensität führt bei jeder Färbung zu einer Steigerung der Spezifität, während die Sensitivität mit der die neuroendokrine Morphologie erkannt wird, in allen Fällen konstant bleibt. Bei der Auswertung von Synaptophysin bringt die Berücksichtigung nur mittel und stark angefärbter Zellen eine Steigerung um 4,6% von 85% auf 89,6% mit sich. Bei NSE kommt es zur Steigerung der Spezifität von 90,4% auf 90,8%, wenn nur die schwach und mittel stark angefärbten Tumoren berücksichtigt werden. Im Falle von Chromogranin lässt sich die Spezifität von 96,7% auf 98,5% steigern, wenn nur mittel und stark angefärbte Tumoren berücksichtigt werden. Berücksichtigt man bei CD56 nur die schwach angefärbten Zellen, so steigt die Spezifität, mit der die neuroendokrine Morphologie erkannt wird, um 2,5% von 95,8% auf 98,3%.

## IV.6 Veränderungen zwischen Cutoff der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003 und den neu definierten Cutoff Werten

Tabelle 9: Veränderungen zwischen der WHO-Klassifikation und den neu definierten Cutoff Werten

*Es ist für jede Färbung und den jeweiligen Cutoff Wert die Häufigkeit der positiven Karzinome in % angegeben.*

Histologie	NSE		Synaptophysin		Chromogranin A		CD56	
	>33% (neu)	>66% (WHO)	>1% (neu)	>66% (WHO)	>0% (neu)	>66% (WHO)	>0% (neu)	>66% (WHO)
duktal	10,2	5,7	16,5	1,2	2,7	0,3	4,5	0,3
lobulär	6,3	2,5	5,0	0	5,0	0	0	0
tubulär	10,0	0	0	0	10,0	0	40,0	0
mikropapillär	10,0	10	50,0	0	0	0	0	0
muzinös	22,2	22,2	33,3	0	11,1	0	0	0
apokrin	7,1	0	7,1	0	0	0	0	0
kribriform	0	0	0	0	0	0	0	0
medullär	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>neuroendokrin</i>	<i>100</i>	<i>81,8</i>	<i>100</i>	<i>18,2</i>	<i>63,6</i>	<i>9,1</i>	<i>18,2</i>	<i>0</i>
glykogenreich	12,5	12,5	25,0	0	12,5	12,5	0	0
adenoid-zystisch	0	0	0	0	0	0	0	0
metaplastisch	33,3	33,3	33,3	0	0	0	0	0
andere	0	0	16,7	0	0	0	16,7	0

Nach Festlegung neuer Cutoff Werte für die vier untersuchten immunhistochemischen Marker erfolgt nun ein Vergleich der neuen Cutoff Werte mit den etablierten Werten laut der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane [Ellis I.O. et al. 2003e]. Die Intensität der Anfärbung bleibt dabei unberücksichtigt.

Generell lässt sich erkennen, dass durch die neuen (niedrigeren Grenzwerte) mehr Karzinome eine positive Markerexpression aufweisen. Bei einigen histologischen Erscheinungsformen kommt es jedoch zu keiner Veränderung. So bei den kribriformen, medullären und adenoid-zystischen Karzinomen.

Bei den duktaalen Karzinomen kommt es zahlenmäßig zur größten Veränderung:

- Anhand des Markers NSE sind 10,2% statt 5,7% der Karzinome neuroendokrin
- Laut Synaptophysin sind es 16,5 statt 1,2% der Karzinome.

Bei den morphologisch neuroendokrinen Karzinomen ergeben sich folgende Veränderungen:

- Die Rate der NSE positiven Karzinome steigt von 81,8 auf 100%.
- Die Rate der Synaptophysin positiven Karzinome steigt von 18,2 auf 100%.
- Bei Chromogranin A kommt es zu einer Steigerung von 9,1 auf 63,1%.
- Bei CD56 wächst die Rate der positiven Karzinome von 0 auf 18,2%.

Ein isolierter Anstieg der für Synaptophysin positiven Fälle findet sich bei den mikropapillären, muzinösen, glykogenreichen und metaplastischen Karzinomen.

Durch das Absenken des Grenzwertes für Chromogranin A kommt es bei den tubulären und muzinösen Karzinomen zu einem Anstieg der positiven Fälle, jeweils von 0 auf 10% bzw. um 11,1%.

CD56 erreicht bei den tubulären Karzinomen nach Absenken eine Rate von 40% sowie bei den morphologisch neuroendokrinen Karzinomen eine Rate von 18,2%.

#### IV.7 Kombination mehrerer neuroendokriner Marker

Entsprechend dem Ansatz des seriellen Testens (s.o. Seite 28) wurden je zwei Färbungen miteinander kombiniert, wobei für jede Färbung jeweils der Schwellenwert gewählt wurde, der bei der Untersuchung der einzelnen Marker den besten Youden Index aufwies.

**Tabelle 10: Kombination von je zwei Markern**

Bestes Ergebnis fettgedruckt

Bester Grenzwert	Sensitivität		Spezifität		Youden Index
	Anzahl	%	Anzahl	%	
<b>NSE Anteil &gt;33% und Synaptophysin Anteil &gt;1%</b>	<b>11 von 11</b>	<b>100</b>	<b>466 von 479</b>	<b>97,3</b>	<b>0,973</b>
NSE Anteil >33% und CD56 Anteil >0%	2 von 11	18,0	477 von 479	99,6	0,180
NSE Anteil >33% und Chromogranin A Anteil >0%	7 von 11	63,6	474 von 479	99,0	0,626
Synaptophysin Anteil >1% und CD56 Anteil >0%	2 von 11	18,0	476 von 479	99,0	0,17
Synaptophysin Anteil >1% und Chromogranin A Anteil >0%	7 von 11	63,6	472 von 479	98,5	0,621
CD56 Anteil >0% und Chromogranin A Anteil >0%	2 von 11	18,0	478 von 479	99,8	0,178



Es zeigt sich, dass eine Steigerung der Spezifität erreicht wird, wenn Tumoren die sowohl in über 1% der Zellen Synaptophysin wie auch in >33% der Zellen NSE aufweisen als neuroendokrin differenziert bezeichnet werden. Die Spezifität beträgt dann 97,3% bei einer Sensitivität von 100%, was einem Youden Index von 0.973 entspricht. In der folgenden Tabelle 11 sind die so erkannten Tumoren noch einmal im Detail dargestellt.

Tabelle 11: Bester Cutoff für die Identifikation neuroendokriner Mammakarzinome im Detail NSE Anteil >33% und Synaptophysin Anteil >1%

Histologischer Tumortyp		>33% der Zellen positiv für NSE und >1% der Zellen positiv für Synaptophysin	
Bezeichnung	Gesamt	Anzahl absolut	Anzahl %
duktal	334	11	3,3
lobulär	80	0	0
tubulär	10	0	0
mikropapillär	10	1	10
muzinös	9	1	11,0
apokrin	14	0	0
kribriform	1	0	0
medullär	3	0	0
neuroendokrin	11	11	100,0
glykogenreich	8	0	0
adenoid-zystisch	1	0	0
metaplastisch	3	0	0
andere	6	0	0
Gesamt	490	24	4,9

Daraus ergeben sich folgende Kennzahlen für den Nachweis der neuroendokrinen Tumoren:

Sensitivität	100%
Spezifität	97,3%
Youden Index	0,973

Durch die Kombination von NSE und Synaptophysin werden entsprechend der neu definierten immunhistochemischen Cutoff Werte 24 von 490 Tumoren als neuroendokrin klassifiziert (4,9%). Die neuroendokrine Morphologie wird mit einer Sensitivität von 100% (11 von 11 Fällen) und einer Spezifität von 97,3% (466 von 479, d.h. es wurden 13 Tumoren fälschlicherweise als neuroendokrin klassifiziert) erkannt. Es ergibt sich ein Youden Index von 0,973. Die übrigen für Synaptophysin in >1% der Zellen und für NSE in >33% der Zellen positiven Tumoren weisen folgende Histologie auf: 11 duktales (3,3% der duktales Karzinome), sowie je ein muzinöses (11% der muzinösen) und mikropapilläres Karzinom (10% der mikropapillären Karzinome).

### IV.8 Neuroendokrine Differenzierung und etablierte Prognosemarker

Die Karzinome (n=11), die sowohl die neuroendokrine Morphologie aufweisen, als auch Synaptophysin-Expression in >1% und NSE-Expression in >33% der Zellen zeigen, werden im Folgenden als neuroendokrin differenziert bezeichnet. Es wurde nach einem möglichen statistischen Zusammenhang zwischen der neuroendokrinen Differenzierung und etablierten Prognosefaktoren gefahndet. Zur Berechnung des p-Wertes diente der Chi Quadrat Test, bzw. bei zu geringer Fallzahl der exakte Test nach Fisher. Für die folgenden Faktoren wurde untersucht ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen neuroendokrinen und nicht neuroendokrinen Mammakarzinomen nachweisbar ist:

- Alter
- Tumorgöße (pT Stadium)
- Lymphknotenstatus (pN Stadium)
- Grading
- Östrogenrezeptorstatus
- Progesteronrezeptorstatus
- Her2/neu Rezeptorstatus

Es zeigt sich, das nur in Bezug auf das Alter bei Erkrankungsbeginn ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar ist (p-Wert < 0,05).

Tabelle 12: Alter bei Diagnose vs. neuroendokrine Differenzierung

		<=65 Jahre	>65 Jahre	Gesamt
nicht neuroendokrin differenziert	Anzahl	307	172	479
	%	64,1%	35,9%	100%
neuroendokrin differenziert	Anzahl	1	10	11
	%	9,1%	90,9%	100%
Gesamt	Anzahl	308	182	490
	%	62,9%	37,1%	100%

Die neuroendokrin differenzierten Karzinome treten fast nur im Alter über 65 Jahre auf. 90,9% der neuroendokrin differenzierten Tumoren finden sich in dieser Altersgruppe. In der Gruppe der nicht neuroendokrin differenzierten Karzinome sind es nur 35,9%, die Mehrzahl der nicht neuroendokrinen Mammakarzinome tritt hingegen im Alter unter 65 Jahren auf.

---

## V Diskussion

Die Untersuchung eines Mammakarzinoms durch den Pathologen wird aufgrund neuer Entwicklungen im Bereich der pathologischen Diagnostik immer differenzierter möglich. War die Festlegung des jeweiligen Tumortyps lange nur mittels der Untersuchung der Morphologie möglich, so gibt es inzwischen weitere Möglichkeiten zur detaillierten Beschreibung und Klassifikation eines individuellen Mammakarzinoms.

Immer mehr Mammakarzinome werden heute nicht nur durch eine bestimmte Histologie, sondern auch durch ein ihnen eigenes immunhistochemisch erstelltes oder genetisches Profil definiert. So gehört die Untersuchung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie die Bestimmung des Her2/neu Status inzwischen zur Routine bei der pathologischen Diagnostik von Mammakarzinomen [Moriya, T. et al. 2006]. Lässt sich bezüglich der Morphologie per HE-Färbung keine eindeutige Diagnose festlegen, so werden zusätzlich immunhistochemische oder molekularpathologische Verfahren eingesetzt, um zu einer korrekten Diagnose zu gelangen. Diese Verfahren bieten vor allem in Zweifelsfällen oder bei seltenen Tumorentitäten den Vorteil, weniger von der Erfahrung des Untersuchers abhängig zu sein und so eine größere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Voraussetzung ist aber eine optimale Fixierung des Tumormaterials, eine qualitätsgesicherte technische Durchführung der Untersuchung und die Kenntnis möglicher Fallstricke bei der mikroskopischen Beurteilung.

Es gibt mehrere Gründe, warum eine eindeutige Tumortypisierung beim Mammakarzinom unverzichtbar ist. Erstens sind die möglichen Tumorcharakteristika elementar für die Entscheidung, ob überhaupt ein maligner Tumor vorliegt. Zweitens ist es für das Erkennen möglicher Zusammenhänge zwischen Tumortyp und Prognose oder dem Ansprechen auf bestimmte Therapien wichtig, einen Tumor exakt zu typisieren.

Eine korrekte, reproduzierbare Diagnose kann aber nur gestellt werden, wenn eindeutige objektive Kriterien vorliegen, anhand derer histologische Mammakarzinompräparate beurteilt werden. Besonders wichtig ist dies natürlich auch in Hinsicht auf die Vergleichbarkeit verschiedener Untersuchungen. Man kann verschiedene Studienkollektive oder Forschungsergebnisse nur dann sinnvoll vergleichen, wenn Einigkeit darüber herrscht, wie die untersuchten Tumoren klassifiziert werden.

---

## V.1 Neuroendokrine Marker und neuroendokrine Morphologie

### V.1.1 Neuroendokrin – eine schwierige Definition?

Die Definition des Begriffes neuroendokrin bzw. neuroendokriner Tumor ist problematisch. Es finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. So wird einmal die Morphologie in unterschiedlichem Maße berücksichtigt und zum anderen werden verschiedene Grenzwerte definiert, ab welchem Prozentsatz markerexprimierender Zellen ein Tumor als neuroendokrin differenziert bezeichnet wird. Z.T. hängt dies damit zusammen, dass die Morphologie der Tumoren mit dem Ergebnis immunhistochemischer Untersuchungen in Einklang gebracht werden muss, wobei in der Vergangenheit nicht in allen Studien die gleichen Grenzwerte zugrunde gelegt wurden. (s.u. Kapitel

V.6.2 Vergleich der Expression neuroendokriner Marker im untersuchten Kollektiv mit Literaturangaben)

### V.1.2 Ursprung der neuroendokrinen Zellen der Mamma

Nicht endgültig geklärt ist der Ursprung der neuroendokrinen Karzinome der Mamma. Die neuroendokrin differenzierten Neubildungen der Mamma nehmen einen Sonderstatus unter den neuroendokrinen Tumoren ein. In anderen Organen weisen neuroendokrine Tumoren in der Regel einen unvorhersehbaren Verlauf auf und sind nur im Falle einer nachgewiesenen lymphogenen oder hämatogenen Metastasierung als Karzinome zu typisieren. In der Mamma sind nur intraduktale (neuroendokrines duktales Carcinoma in situ) oder invasive neuroendokrine Karzinome bekannt. Anders als in der Lunge oder im Gastrointestinaltrakt wurden nie hyperplastische oder gutartige neuroendokrine Läsionen in der Brust beobachtet. Auf der anderen Seite sind keine intraepithelialen Vorläuferläsionen von neuroendokrinen Tumoren in Lunge, Gastrointestinaltrakt oder anderen Organen beschrieben. Eine zumeist starke Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren wird ebenfalls nur in neuroendokrinen Karzinomen der Mamma gefunden. Es herrscht keine Einigkeit, ob neuroendokrine Zellen im normalen Mammagewebe vorliegen, oder ob die neuroendokrine Differenzierung erst im Rahmen neoplastischer Umwandlung der Zellen auftritt. Das Vorkommen neuroendokriner Zellen im normalem Brustgewebe war nicht in allen zu dieser Frage durchgeführten Studien nachweisbar [Miremadi, A. et al. 2002]. Nur einige Studien haben einen Nachweis Chromogranin A positiver und agyrophiler Zellen im normalen Brustgewebe erbracht [Bussolati, G. et al. 1985], [Nesland, J.M. et al. 1987]. Weil das Erscheinungsbild

neuroendokriner Mammakarzinome dem intestinaler oder pulmonaler Carcinoide ähnelt, aber fast nie gleicht [Maluf H.M., Koerner, F.C. 1994], wurde schon vorgeschlagen, die neuroendokrine Differenzierung nicht als eigenständigen Tumortyp aufzufassen, sondern vielmehr als eine mögliche Differenzierung in anderen Tumortypen. [Maluf H.M., Koerner, F.C. 1994] Die diesbezügliche Diskussion scheint also noch nicht beendet.

### V.1.3 Neuroendokrin differenzierte Karzinome entsprechend der Definition der WHO

#### Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane 2003

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, lautet die derzeit angewandte Definition neuroendokriner Mammakarzinome in der WHO Klassifikation der Tumoren der Brustdrüse und weiblichen Geschlechtsorgane aus dem Jahre 2003 [Ellis I.O. et al 2003f] so, dass Mammakarzinome die in mehr als 50% ihrer Zellen neuroendokrine Marker exprimieren und eine entsprechende Morphologie zeigen, als neuroendokrin differenziert angesehen werden.

Betrachtet man die Unterschiede in der Funktion und Lokalisation der verschiedenen neuroendokrinen Marker in der Zelle, so muss man sich die Frage stellen, ob es tumorbiologisch sinnvoll sein kann, für so verschiedene Proteine einen einheitlichen Grenzwert von mindestens 50% positiver Zellen eines Tumors festzulegen.

Wegweisend für die Notwendigkeit einer Revision der immunhistochemischen Grenzwerte für die Diagnose eines neuroendokrinen Mammakarzinoms ist die häufige praktische Erfahrung, dass Mammakarzinome zwar eine neuroendokrine Morphologie aufweisen, aber nur in weniger als 50% ihrer Zellen neuroendokrine Marker exprimieren. Nach der morphologischen Klassifizierung des untersuchten Kollektivs wurde deshalb die Expression der neuroendokrinen Marker bei den verschiedenen histologischen Typen des Mammakarzinoms bestimmt. Auf diese Weise war es möglich, durch Veränderungen der Grenzwerte ein immunhistochemisches Profil zu erstellen, welches die neuroendokrine Morphologie deutlich besser repräsentiert als die bisherige Definition der WHO Klassifikation [Ellis I.O. et al 2003f].

Bei der Untersuchung des vorliegenden Kollektivs entsprechend den immunhistochemischen Kriterien der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane [Ellis I.O. et al 2003f] fanden sich 38 Fälle (7,8%), bei denen jeweils einer oder mehrere neuroendokrine Marker in mehr als 66 % der

Tumorzellen exprimiert wurden und die somit laut der immunhistochemischen Untersuchung den WHO-Kriterien eines neuroendokrinen Mammakarzinoms entsprechen. Dies ist ein erheblich höherer Anteil an neuroendokrinen Karzinomen als anhand der Literaturdaten zu erwarten wäre. Die Tatsache, dass nur 2,2% der Fälle des vorliegenden Kollektivs histomorphologische Charakteristika eines neuroendokrinen Mammakarzinoms aufwiesen, spricht für eine geringe Spezifität der Markerexpression. Die weitere Detailanalyse der verschiedenen Tumortypen im Kollektiv ergibt, dass diese geringe Spezifität durch eine neuroendokrine Markerexpression in duktafen, lobulären, muzinösen, glykogenreichen mikropapillären und metaplastischen Mammakarzinomen entsteht, (Tabelle 6, Seite 34). Die morphologisch neuroendokrinen Karzinome exprimieren in 81,8% (9 von 11 Fällen) einen oder mehrere neuroendokrine Marker in >66%(>50%) ihrer Zellen.

## **V.2 Definition der Cutoff Werte für die neuroendokrinen Marker**

Der Festlegung neuer Grenzwerte liegt folgende Überlegung zu Grunde: Durch Festlegung eines niedrigeren Grenzwertes erhöht sich die Sensitivität eines Testverfahrens, dadurch kommt es aber zur Abnahme der Spezifität. Aus Gründen der Praktikabilität wurde deshalb zusätzlich den Youden Index berechnet, der beide Werte berücksichtigt.

### V.2.1 Neuronenspezifische Enolase

Der anhand der maximalen Sensitivität und Spezifität für den Nachweis neuroendokriner Morphologie bestimmte beste Grenzwert für NSE lag bei mindestens 33% positiver Zellen. Durch die Herabsetzen des Grenzwertes von mindestens 66% positiver Zellen auf mindestens 33% positiver Zellen steigt die Sensitivität von 81,8 % auf 100% also um 18,2%. Die Spezifität sinkt aber nur um 4,6% von 94,6% auf 90,4%. Der Youden Index steigt von 0,764 auf 0,904 also um 0,14.

### V.2.2 Synaptophysin

Bei der Untersuchung von Synaptophysin ließen sich ebenfalls große Veränderungen durch die neue Festlegung der Grenzwerte erkennen. Beim besten gefundenen Schwellenwert, der bei mehr als 1% positiver Zellen lag, wurde die neuroendokrine Morphologie mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 85% erkannt. Die Sensitivität stieg damit um 81,8%, während die Spezifität um 14,2% sank. Der Youden Index stieg von 0,174 auf 0,85. In diesem Fall wird der Anstieg der Sensitivität mit einem deutlicheren Verlust an

Spezifität erkaufte. Als einzelner Marker ist Synaptophysin zum Erkennen neuroendokriner Morphologie nicht geeignet.

### V.2.3 Chromogranin A

Chromogranin A erreicht, wenn man den Grenzwert von 66% zugrunde legt, eine Sensitivität von 9,1% bei einer Spezifität von 99,6%. Dies ergibt einen Youden Index von 0,087. Die besten Werte erzielt Chromogranin, wenn jegliche Anfärbung von Tumorzellen also mehr als 0% bereits als positiv gewertet wird. In diesem Fall wird eine Sensitivität von 63,6% erreicht, bei einer Spezifität von 96,7%. Daraus berechnet sich ein Youden Index von 0,603. Bei Chromogranin A fällt somit die hohe Spezifität auf, selbst wenn man jegliche Anfärbung bereits als positiv ansieht. Dies entspricht der oben bereits zitierten Aussage von Williams: Die Reaktion weist neuroendokrine Tumoren mit hoher Spezifität aber niedriger Sensitivität nach [Williams, G.T. 2007]. Auf Grund der vergleichsweise niedrigen Sensitivität erscheint Chromogranin A als Einzelmarker aber ebenfalls nicht geeignet, um die neuroendokrine Morphologie nachzuweisen.

### V.5.4 CD56

CD56 erkennt auf Grundlage des Schwellenwertes von 66% keinen Tumor als neuroendokrin. Die höchsten Werte für Sensitivität und Spezifität erreicht CD56, wenn bereits ein Prozentsatz  $> 0\%$  angefärbter Zellen als positiv angesehen wird. In diesem Fall erreicht CD56 eine Sensitivität von 18,2% bei einer Spezifität von 95,8%, was einem Youden Index von 0,140 entspricht. Eine Sensitivität von nur 18,2% lässt CD56 als Marker ungeeignet erscheinen. Laut Literaturangaben ist dies aber bei kleinzelligen Mammakarzinomen anders, diese exprimieren in bis zu 100% CD56 [Yamamoto, J. et al. 2005], [Shin, S.J. et al. 2000]. Im untersuchten Kollektiv war kein kleinzelliges Mammakarzinom vertreten.

### V.5.5 Fazit: Synaptophysin und die Neuronenspezifische Enolase (NSE) stellen geeignete Marker dar, um die neuroendokrine Differenzierung beim Mammakarzinom nachzuweisen

NSE und Synaptophysin zeigen als einzelne Marker für das Erkennen der neuroendokrinen Morphologie die höchste Sensitivität und Spezifität. Ein Grenzwert von mehr als 33% NSE positiver Zellen im Tumor, ist der Grenzwert, mit dessen Hilfe sich bei Verwendung eines Markers die neuroendokrine Morphologie mit der höchsten Sensitivität (100%) und

Spezifität (90,4%) nachweisen lässt. Allerdings ist er zur präzisen immunhistochemischen Definition neuroendokriner Karzinome mit einer Spezifität von 90,4% zu ungenau.

Synaptophysin erreicht bei einem Schwellenwert von mindestens 1% angefärbter Zellen ebenfalls eine Sensitivität von 100% aber nur eine Spezifität von 85%. Die übrigen untersuchten Marker erreichen alleine schlechtere Ergebnisse und sind somit nicht geeignet um die neuroendokrine Differenzierung nachzuweisen. Allerdings liefert die Untersuchung eines Markers auf Grund der niedrigen Spezifität nur einen Anhalt auf neuroendokrine Differenzierung, ist aber noch nicht aussagekräftig genug.

### V.3 Berücksichtigung der Intensität

Die Intensität der Färbereaktion der neuroendokrinen Marker spielt in der WHO Klassifikation keine Rolle. Es lassen sich aber sehr wohl die Intensitäten „schwach“, „mittel stark“ und „stark“ unterscheiden. Daher liegt es nahe, die Intensität der immunhistochemischen Reaktion mit zu berücksichtigen. Es zeigt sich, dass sich durch Berücksichtigung der Intensität die Anfärbung die Spezifität jeder Färbung steigern lässt. Die Sensitivität wird durch die Berücksichtigung der Intensität nicht beeinträchtigt. Wie zu erwarten, erbrachten die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Schwellenwerte, die den jeweils besten Youden Index ergaben, auch unter Berücksichtigung der Farbintensität die besten Werte.

Am deutlichsten fällt die Steigerung der Spezifität im Falle von Synaptophysin aus. Es lässt sich eine Steigerung von 85% auf 89,6% erzielen, wenn nur mittel stark und stark angefärbte Zellen berücksichtigt werden. Dies mag auf schwachen unspezifischen Reaktionen mit dem Antikörper gegen Synaptophysin beruhen, die so nicht mit berücksichtigt werden. Bei den anderen Markern lässt sich durch Berücksichtigung der Intensität nur geringere Steigerungen der Spezifität erreichen (siehe Tabelle 8, Seite 38). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei NSE die Spezifität am meisten ansteigt, wenn nur schwach und mittelstark angefärbte Zellen berücksichtigt werden. Bei CD56 ließ sich ein ähnliches Phänomen beobachten. Hier erreicht man die höchste Spezifität, wenn nur die schwach angefärbten Zellen berücksichtigt werden. Die Ursache für dieses Phänomen ist unklar. Möglicherweise handelt es sich dabei um Artefakt im Rahmen der Anfärbung. Obwohl die Berücksichtigung der Farbeintensität das Ergebnis verbessern kann, wurde sie in der weiteren Auswertung nicht weiter berücksichtigt, da die Intensität stark von der technischen Durchführung der Färbungen sowie von der Beurteilung durch



den Untersucher abhängt. Damit ist sie zwischen verschiedenen Laboren/Untersuchungen nur schwer vergleichbar.

#### **V.4 Veränderung zwischen Cutoff der WHO Definition und den neuen Cutoff Werten**

Die Veränderungen zwischen dem Cutoff laut WHO-Definition und dem neu festgelegten Cutoff sind in Tabelle 9 auf Seite 39 im Detail dargestellt. Es zeigt sich, dass durch das Absenken der Grenzwerte vor allem viele duktale Karzinome, sowohl durch NSE als auch durch Synaptophysin als neuroendokrin klassifiziert werden. Dies mag ein Hinweis darauf sein, dass neuroendokrine Karzinome mit nicht ganz eindeutig neuroendokriner Morphologie, am ehesten der häufigsten histologischen Subgruppe der duktal invasiven Karzinome zugeordnet werden. Diese bilden eine heterogene Gruppe von Karzinomen die spezielle Charakteristika nicht in ausreichendem Maße aufweisen, um einer spezifischeren Histologie zugeordnet werden zu können [Ellis I.O. et al 2003g]. In Kenntnis der neu erarbeiteten Cutoff Werte lässt sich in Zukunft sicher eine eindeutige Einordnung dieser Karzinome erreichen.

#### **V.5 Kombination mehrerer neuroendokriner Marker**

Laut Williams ist die Bestimmung eines einzelnen Markers nicht ausreichend, um die neuroendokrine Differenzierung eines Tumors zu beweisen oder auszuschließen [Williams, G.T. 2007]. Präzisere Cutoff Werte und somit Ergebnisse lassen sich mittels der Kombination mehrerer Marker festlegen. Bei Betrachtung der oben geschilderten Ergebnisse erscheint es naheliegend, mehrere Marker entsprechend dem Vorgehen beim seriellen Testen und der „believe-the-negative“ Regel zu kombinieren, um eine Steigerung der Spezifität des Testverfahrens zu erzielen. Es müssen nun also mehrere Färbungen (Tests) positiv ausfallen, damit das Gesamtergebnis positiv wird. Wie beim seriellen Testen zu erwarten, steigt die Spezifität an, da die Zahl der falsch positiven Tumoren abnimmt. Die Sensitivität wird jeweils vom weniger sensitiven Marker bestimmt und entspricht damit den bereits oben bei den Einzelmarkern angegebenen Werten. Durch die niedrige Sensitivität von Chromogranin A und CD56 als Einzelmarker bedingt, erreichen diese Marker auch in der Kombination miteinander und mit NSE bzw. Synaptophysin keinen hohen Youden Index. Deshalb erzielt allein die Kombination von NSE und Synaptophysin einen höheren Youden Index als die Neuronenspezifische Enolase (NSE).

Er beträgt 0,973 im Vergleich zu NSE als bestem Einzelmarker mit einem Youden Index von 0,904.

Mit einer Kombination von >1% Synaptophysin positiver Zellen und >33% NSE positiver Zellen lässt sich die neuroendokrine Morphologie mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 97,3% nachweisen. Die Differenz zwischen den immunhistochemisch diagnostizierten neuroendokrinen Tumoren und den morphologisch neuroendokrinen Tumoren beträgt 2,7% (4,9%-2,2%) bzw. 13 Fälle. Die Differenz ist damit um mehr als die Hälfte geringer als der 5,6% große Unterschied zwischen den morphologisch neuroendokrinen Karzinomen und den entsprechend dem Schwellenwert der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane immunhistochemisch nachgewiesenen neuroendokrinen Karzinomen (siehe Tabelle 6, Seite 34). Es wurde mit der Absenkung der Grenzwerte also das Ziel erreicht, eine bessere Übereinstimmung zwischen der neuroendokrinen Morphologie und dem immunhistochemischen Markerprofil zu erreichen.

## **V.6 Repräsentativität des untersuchten Kollektivs**

Ein grundsätzliches Problem einer Typisierung auf der Grundlage einer semiquantitativen Immunhistochemie ist die Uneinheitlichkeit der Patientenkollektive, des Probenmaterials, der Analyseverfahren und der Auswertungsmethoden. Im Folgenden sollen die Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs und die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit anderen Studien verglichen werden, um zu sehen, ob das untersuchte Kollektiv repräsentativ ist.

### **V.6.1 Vergleich der klinischen und pathologischen Parameter des untersuchten**

#### **Kollektivs mit Literaturdaten**

Um beurteilen zu können, ob das untersuchte Kollektiv in Hinblick auf die erhobenen klinisch-pathologischen Daten repräsentativ ist, wurde es mit anderen großen Kollektiven aus der Literatur verglichen. Dafür wurden große Kollektive (ohne Mammographiescreening) herangezogen. Da nicht in jedem Kollektiv alle Parameter untersucht worden sind, erfolgt der Vergleich mit verschiedenen Kollektiven.

- Dabakuyo et al. veröffentlichten 2007 eine Studie zur Prognose und zum Überleben von 3.831 Patientinnen mit invasivem Brustkrebs. Die Daten stammten aus einem

populationsbasierten Brust- und gynäkologischen Krebsregister aus Cote d'Or (Frankreich). Die untersuchten Fälle waren von Januar 1982 bis Dezember 1997 registriert worden [Dabakuyo, T.S. et al. 2007].

- Elston et al. veröffentlichten 1991 eine Studie zum Grading beim primär invasiven Mammakarzinom an 1.830 Patienten der Nottingham/Tenovus Primary Breast Cancer Study. In diese Studie wurden konsekutiv alle von 1973-1989 operierten Mammakarzinome aufgenommen [Elston C.W., Ellis, I.O. 1991].
- Colditz et al. führten 2004 eine Studie durch, um die Beziehung von Risikofaktoren des Mammakarzinoms zum Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Karzinome zu untersuchen. Als Untersuchungsgruppe dienten Mammakarzinome von 2.096 Frauen, die von 1980 bis 2000 an der Nurses' Health Study teilgenommen hatten, und deren Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorstatus bekannt war [Colditz, G.A. et al. 2004].
- Dybdal et al. veröffentlichten 2005 eine Studie zur Expression des Her2/neu Proteins beim Mammakarzinom an 5.998 untersuchten Präparaten [Dybdal, N. et al. 2005].

Im Folgenden werden die einzelnen klinisch sowie pathologisch erhobenen Parameter der genannten Kollektive mit Daten des vorliegenden Kollektives verglichen.

#### V.6.1.1 Altersmedian

Der Altersmedian im untersuchten Kollektives liegt bei 61 Jahren dies stimmt mit dem Altersmedian in anderen Kollektiven überein z.B. Dabakuyo et al. [Dabakuyo , T.S. et al. 2008]

#### V.6.1.2 Tumortyp

Die Verteilung der Fälle auf die verschiedenen histologischen Typen lässt sich schwer vergleichen, da in vielen Studien die weniger häufigen Typen nicht gesondert aufgeführt werden. Den umfassendsten Überblick liefert die WHO Klassifikation von 2003 [Ellis I.O. et al 2003b].

Tabelle 13: Häufigkeit verschiedener Tumortypen des Mammakarzinoms laut „WHO-Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane“

Histologie	Kollektiv 490 (Angaben in %)	WHO Klass. (Angaben in %)
duktal	68,2	70-80
lobulär	16,3	5-15
tubulär	2	<2
mikropapillär	2	<2
muzinös	1,8	2
apokrin	2,9	<4
kribriform	0,2	0,8-3,5
medullär	0,6	1-7
neuroendokrin	2,2	2-5
glykogenreich	1,6	1-3
adenoid-zystisch	0,2	0,1
metaplastisch	0,6	<1
andere	1,2	-

Das untersuchte Kollektiv entspricht in seiner Zusammensetzung der in der WHO-Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane [Ellis I.O. et al 2003b] angegebenen Häufigkeiten, welche auf Grund von Daten verschiedener Studien erhoben worden sind.

#### V.6.1.3 Tumorgröße

Tabelle 14: Die Tumorgröße (T-Stadium) im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Dabakuyo et al.

Tumorgröße	Kollektiv 490 (Angaben in %)	[Dabakuyo, T.S. et al. 2008] (Angaben in %)
pT1	47,3	54
pT2	41,6	32
pT3	3,3	7
pT4	7,6	7
pTx	0,2	1

Im untersuchten Kollektiv befanden sich 47,3% der Tumoren im Stadium pT1, 41,6% im Stadium pT2. Das bedeutet in Summe befanden sich 88,9% im Stadium T1/T2. Im Kollektiv von Dabakuyo et al. [Dabakuyo, T.S. et al. 2008], entfallen 86% also ein vergleichbarer Anteil auf die Stadien T1/T2. Der vergleichsweise höhere Anteil der pT2-Tumoren kann nächstliegend durch die Tatsache erklärt werden, dass es sich um ein Prä-Mammographiescreening-Kollektiv in einem universitären Zentrum mit möglicher Selektionierung lokal fortgeschrittener Tumoren handelt Und das pT1a Tumoren (<0,5cm) aus forensischen Gründen nicht Teil des Studienkollektivs waren.

#### V.6.1.4 Nodalstatus

Tabelle 15: Der Nodalstatus im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Dabakuyo et al.

Lymphknotenstatus	Kollektiv 490 (Angaben in %)	[Dabakuyo, T.S. et al. 2008] (Angaben in %)
N0	54,1	64
N pos	40,2	34
NX	5,7	1

In dieser Studie wiesen 40,2% der untersuchten Mammakarzinome einen Lymphknotenbefall auf. Dabakuyo et al. [Dabakuyo T.S. et al. 2008] wiesen einen Lymphknotenbefall in nur 34% der Fälle nach. Dass mehr Fälle einen Lymphknotenbefall aufweisen, lässt sich ebenfalls durch das selektierte Patientenkollektiv eines universitären Zentrums, an dem ein hoher Anteil an Patienten mit weit fortgeschrittener Brustkrebskrankung behandelt wird, erklären.

#### V.6.1.5 Grading

Tabelle 16: Das Grading im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Elston et al.

Grading	Kollektiv 490 (Angaben in %)	[Elston C.W. et al. 1991] (Angaben in %)
G1	16,9	19
G2	50,8	34
G3	32,3	47

Elston et al. beobachteten in einer Studie an 1.830 Patienten im Jahre 1991 in 19% der Fälle ein Stadium G1, in 34% das Stadium G2 und in 47% das Stadium G3. Im untersuchten Kollektiv finden sich über 50% der Fälle mittelgradig differenziert (G2), bei Elston. nur 34%.

#### V.6.1.6 Östrogenrezeptorstatus

Die Rate der Östrogenrezeptorexpression im vorliegenden Kollektiv sowie im Kollektiv von Colditz et al. ist vergleichbar. Im untersuchten Kollektiv zeigen 77,3% der Tumoren eine Expression von Östrogenrezeptoren. Im Kollektiv von Colditz et al. [Colditz, G.A. et al. 2004] sind es 76,3%.

#### V.6.1.7 Progesteronrezeptorstatus

Im Kollektiv von Kolditz et al. weisen 64,9% der Tumoren eine Expression von Progesteronrezeptoren auf [Kolditz G.A. et al. 2004] im untersuchten Kollektiv sind es 62,9%.

#### V.6.1.8 Her2/neu-Status

Das untersuchte Kollektiv ist bezüglich der Überexpression von Her2/neu gut mit dem von Dybdal et al. [Dybdal, N. et al. 2005] untersuchten Kollektiv vergleichbar.

#### V.6.1.9 Vergleich der klinischen und pathologischen Parameter des untersuchten Kollektivs mit Literaturdaten, ein Fazit

Zwischen großen Mammakarzinomkollektiven lassen sich stets Unterschiede finden, die mit den verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Datenerhebung sowie der jeweils untersuchten Population zusammenhängen. So ist auch das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv in bezug auf einige prognostische Faktoren (s.o. Tumorgröße, Nodalstatus, Grading) nicht mit anderen bereits bekannten Kollektiven identisch. Vor dem Hintergrund der genannten Problematik, ist das Kollektiv insgesamt aber in bezug auf die klinisch sowie pathologisch erhobenen Parameter als repräsentativ anzusehen.

#### **V.6.2 Vergleich der Expression neuroendokriner Marker im untersuchten Kollektiv mit Literaturangaben**

Nach dem Vergleich der klinischen und pathologischen Daten des untersuchten Kollektivs mit Daten aus der Literatur, wird die Expression der neuroendokrinen Marker im Vergleich zu anderen Kollektiven betrachtet. Dabei tauchten verschiedene Probleme beim Vergleich der Expression neuroendokriner Marker des untersuchten Kollektivs mit Angaben aus der Literatur auf:

- Die Häufigkeit der histologischen Typen der Mammakarzinome in anderen Kollektive wird oft nicht detailliert beschrieben.
- Es ließ sich kein großes Kollektiv finden, indem die gleiche Kombination an Markern untersucht worden ist.

- In verschiedenen Studien werden bei der Beurteilung der immunhistochemischen Untersuchungen verschiedene Maßstäbe angelegt. Die Festlegung, welche Tumoren als positiv klassifiziert werden, folgt unterschiedlichen Regeln. Es wird oft nicht angegeben, ab welchem Prozentsatz angefärbter Zellen ein Tumor als positiv erachtet wird.
- Oft wird die Intensität der angefärbten Zellen berücksichtigt, die stark vom Untersucher sowie der Labortechnik abhängt

Eine gewisse Ungenauigkeit entsteht auch auf Grund der Tatsache, dass immunhistochemische Untersuchungen nur semiquantitativ ausgewertet werden können. Trotzdem ist die Festlegung klarer Kriterien unabdingbar, alleine um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu ermöglichen. Diese Studie untersucht ein großes Kollektiv unter Berücksichtigung der wichtigsten klinischen und pathologischen Daten mit objektiven Kriterien zur Expression der untersuchten neuroendokrinen Marker.

#### V.6.2.1 Synaptophysin

Im untersuchten Kollektiv exprimierten 104 von 490 Mammakarzinomen Synaptophysin, entsprechend 21,2%. Makretsov et al. konnten in einer Studie an 334 primären Mammakarzinomen in 17,1% der Fälle eine Expression von Synaptophysin nachweisen [Makretsov, N. et al. 2003]. Die in dieser Arbeit untersuchten Mammakarzinome mit neuroendokriner Histologie exprimierten zu 100% Synaptophysin (11 von 11). Yamamoto kommt in seiner Untersuchung an 7 neuroendokrinen Mammakarzinomen zum selben Ergebnis [Yamamoto, J. et al. 2004]. Papotti konnte die Expression von Synaptophysin in 43 lichtmikroskopisch neuroendokrinen Mammakarzinomen entsprechend der von Cubilla und Woodruff beschriebenen Morphologie nur in 79,1% der Fälle nachweisen [Papotti, M. et al. 1989] allerdings nimmt Papotti als Grenze 10% positiver Zellen an, was den Unterschied in der Expressionsrate erklären könnte. Insgesamt stimmt die Synaptophysinexpressionsrate im untersuchten Kollektiv im wesentlichen mit den Ergebnissen anderer Studien überein.

#### V.6.2.2 Neuronenspezifische Enolase (NSE)

In untersuchten Kollektiv ließ sich eine Expression von NSE mittels eines polyklonalen Antikörpers in 121 von 490 Fällen nachweisen (24,7%). Die Tumoren mit neuroendokriner Morphologie (11 Fälle) zeigten zu 100% NSE Expression. Yamamoto konnte in einer

Untersuchung an 7 neuroendokrinen Mammakarzinomen ebenfalls in 100% eine NSE Expression nachweisen [Yamamoto, J. et al. 2004]. Die Expression im Gesamtkollektiv deckt sich gut mit Beobachtungen von Monaghan et al., die in einer Serie von 44 Karzinomen in 11 Fällen (25%) eine NSE Expression nachweisen konnten [Monaghan, P. 1984].

Ingelmann-Sundberg et al. [Ingelmann-Sundberg, H. et al. 1989] konnten bei einer Untersuchung an 74 konsekutiven Mammakarzinomen im Jahre 1989 in 20% der Tumoren NSE nachweisen. Ingelmann-Sundberg et al. legten dabei 20% positiver Zellen als Cutoff fest. Miremadi et al. [Miremadi A. et al. 2002] konnten an 99 konsekutiven Mammakarzinomen eine Expression von NSE in 18,2% der untersuchten Fälle nachweisen. Die NSE Expressionsraten entsprechen damit denen anderer in der Vergangenheit untersuchter Kollektive sowohl im Gesamtkollektiv, als auch in der Gruppe der neuroendokrinen Karzinome.

#### V.6.2.3 Chromogranin A

Im Gesamtkollektiv sind 4,7% der Mammakarzinome positiv für Chromogranin A. In anderen Studien finden sich Angaben von 1,8% Chromogranin positiver Tumoren (6 von 334 Fällen) [Makretsov, N. et al. 2003] über 10,1% in 99 Fällen [Miremadi A. et al. 2002] bis zu 11,9% (5 von 42 Fällen) bei Nesland et al. [Nesland, J.M. et al. 1986].

Im vorliegenden Kollektiv sind 63,6% der neuroendokrinen Tumoren (7 von 11 Fällen) positiv für Chromogranin. Papotti konnte die Expression von Chromogranin in 43 lichtmikroskopisch neuroendokrinen Mammakarzinomen entsprechend der von Cubilla und Woodruff beschriebenen Morphologie in 20 Karzinomen also in 46,5% der Fälle nachweisen [Papotti, M. et al. 1982]. Papotti nimmt als Grenze 10% positiver Zellen. Yamamoto konnte die Expression von Chromogranin in 7 von 7 Fällen (100%) neuroendokrin differenzierter Mammakarzinome nachweisen. Die große Spannweite der erhobenen Expressionsraten könnte mit der Assoziation von Chromogranin zu neurosekretorischen Vesikeln zusammenhängen. In verschiedenen Funktionszuständen der Zelle kann die Konzentration an Vesikeln stark variieren. Die Intensität der Färbereaktion steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Konzentration von neurosekretorischen Granula in der Zelle, je mehr Vesikel vorliegen, desto intensiver fällt die Anfärbung aus. [Miremadi, A. et al. 2002]. Die Reaktion mit Chromogranin A weist neuroendokrine Tumoren also wie bereits beschrieben [Williams, G.T. 2007] mit hoher Spezifität aber niedriger Sensitivität nach.



#### V.6.2.4 CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule/NCAM)

Im untersuchten Kollektiv trat die CD56 Expression unabhängig vom histologischen Typ in 4,5% aller Mammakarzinome auf (22 von 490 Fällen). Es ließ sich kein großes vergleichbares Kollektiv finden, um die Expression von CD56 unabhängig vom histologischen Typ vergleichen zu können. Zoltowska et al. konnten in 8 von 18 Fällen (44,4%) invasiver Mammakarzinome ohne Angabe des histologischen Typs CD56 Expression nachweisen [Zoltowska, A. et al. 2001]. Die neuroendokrinen Tumoren im untersuchten Kollektiv exprimieren in 18,2% (2 von 11) CD56. Damit fällt im Vergleich zu anderen Untersuchungen an neuroendokrinen Karzinomen, die CD56 Expression relativ spärlich aus. Es lassen sich jedoch auch kaum Studien finden, die die Expression von CD56 beim Mammakarzinom systematisch untersucht haben. Meist liegen sehr kleine Kollektive vor. In den meisten Fällen wird CD56 wie bei Lungentumoren eingesetzt, um kleinzellige Karzinome nachzuweisen, in denen es häufig exprimiert wird, Yamamoto (2 von 2) 100% [Yamamoto, J. et al. 2004] bzw. Shin (7 von 9) 78% [Shin S.J. et al. 2000]. Die kleinzelligen Mammakarzinome stellen eine der morphologischen Erscheinungsformen des neuroendokrin differenzierten Mammakarzinoms dar. Abgesehen von einzelnen Studien wie bei Shin et al. [Shin S.J. et al. 2000] mit 9 Fällen sind die meisten Karzinome dieser Art in Einzelfallberichten beschrieben worden. Im untersuchten Kollektiv von 490 Fällen findet sich kein kleinzelliges Mammakarzinom. Vor diesem Hintergrund erscheint die relativ niedrige Expressionsrate stimmig.

#### V.6.2.5 Expression neuroendokriner Marker im untersuchten Kollektiv im Vergleich zu Literaturangaben, ein Fazit

Insgesamt sind die Expressionsraten der verschiedenen neuroendokrinen Marker mit den Ergebnissen früherer Studien an anderen Kollektiven vergleichbar. Deshalb sind die Expressionsraten der neuroendokrinen Marker als repräsentativ anzusehen.

### **V.7 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung**

#### V.7.1 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung in anderen Karzinomen

Wenn man versucht, die Diagnostik des neuroendokrinen Mammakarzinoms zu verbessern, stellt sich natürlich die Frage, welche Relevanz die Diagnose eines

neuroendokrinen Tumors der Brust mit sich bringt. Hier muss zum einen nach der prognostischen Relevanz, dem prädiktiven Wert hinsichtlich des Ansprechens auf eine bekannte Therapie und nach neuen tumortypspezifischen Behandlungsmöglichkeiten gefragt werden.

Außerhalb der Mamma gibt es auch in anderen Organen Karzinome, die eine neuroendokrine Differenzierung aufweisen. Die prognostische Bedeutung neuroendokriner Differenzierung bei Karzinomen der Prostata, der Lunge und bei gastrointestinalen Tumoren ist bis heute besonders intensiv untersucht worden [Miremedi, A. et al. 2002]. So stehen neuroendokrine Zellen der Prostata im Verdacht, das Wachstum von Prostatakarzinomen durch parakrine Stimulation neoplastischer Zellen zu fördern [Nelson, E.C. et al. 2007]. Bezüglich neuer therapeutischer Strategien gibt es verschiedene Ansätze, die zellulären Signalwege der neuroendokrinen Zellen zu blockieren, um das Wachstum von Prostatakarzinomen zu hemmen [Nelson, E.C. et al 2007].

Bei Lungentumoren hat die neuroendokrine Differenzierung prognostische und therapeutische Bedeutung. So ist das Überleben nach der Resektion großzelliger neuroendokriner Tumoren ist signifikant schlechter als das nicht neuroendokriner großzelliger Lungentumoren [Garcia-Yuste, M. et al. 2008]. Außerdem zeichnen sich neuroendokrine Lungentumoren durch das Vorhandensein von Neuraminaufnahmemechanismen oder spezieller Peptidrezeptoren auf der Zellmembran aus. Dies bildet die Basis für den klinischen Einsatz spezifischer radiomarkierter Liganden sowohl in der Diagnostik, als auch in der Therapie [Garcia-Yuste, M. et al. 2008].

Auch bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes stellt die neuroendokrine bzw. endokrine Differenzierung einen Prognosefaktor dar. Zu ihrer Diagnostik werden in Ergänzung zu den konventionellen morphologischen Kriterien, als immunhistochemische Marker die Kombination von Synaptophysin, Chromogranin, Zytokeratin (CK8/18) und den jeweils in Frage kommenden Hormonen benutzt, um eine neuroendokrine Differenzierung nachzuweisen [Klöppel, G. 2003]. Die Prognose und weitere Therapie der Tumoren richten sich nach der Einteilung in Risikogruppen, die in der WHO-Klassifikation der endokrinen gastrointestinalen Tumoren festgeschrieben sind [Williams, G.T. 2007].

---

## V.7.2 Bedeutung der neuroendokrinen Differenzierung beim Mammakarzinom

### V.7.2.1 Therapie und Prognose des neuroendokrinen Mammakarzinoms

Laut bisheriger Untersuchungen stellt das histologische Grading den wichtigsten Prognosefaktor bei der Beurteilung neuroendokriner Karzinome der Brust nach bisheriger Definition dar [Sapino, A. et al. 2001a]. Die kleinzellige Variante der neuroendokrinen Mammakarzinome sollte wie ein undifferenziertes Karzinom beurteilt werden. Eine Expression von Progesteron- oder Östrogenrezeptoren geht mit einer besseren Prognose einher. Ebenso verbessert Schleimproduktion die Prognose. [Sapino, A. et al. 2001a]. Der neuroendokrinen Differenzierung wird bisher also keine eigene prognostische Bedeutung beigemessen. Da keine Daten bezüglich des weiteren Krankheitsverlaufs und Überlebens im untersuchten Kollektiv vorliegen, konnte die prognostische Relevanz der morphologisch und nach den neu bestimmten Grenzwerten immunhistochemisch neuroendokrin differenzierten Karzinome nur anhand allgemeiner Prognosefaktoren erhoben werden. Der neuroendokrine Immunphänotyp korreliert im untersuchten Kollektiv signifikant mit einem hohen Alter (über 65 Jahre). Weitere statistisch signifikante Korrelationen sind nicht nachweisbar. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine neuroendokrine Differenzierung einen unabhängigen Prognosemarker beim Mammakarzinom darstellt als extrem gering einzuschätzen. Die Verteilung auf die verschiedenen Altersgruppen mit einem vermehrten Auftreten neuroendokrin differenzierter Karzinome in der Altersgruppe über 65 Jahre, entspricht der in der Literatur angegebenen Altersverteilung [Sapino, A. et al. 2001b]. Möglicherweise stellt das vermehrte Auftreten in höheren Altersgruppen einen Hinweis dar, dass die Entstehung neuroendokriner Karzinome mit der Involution des Mammagewebes im Alter in Zusammenhang steht.

Zur Zeit gibt es noch keine spezifischen Ansätze zur Therapie des neuroendokrinen Mammakarzinoms. Doch, obwohl der Ursprung der neuroendokrinen Tumoren der Brust, sowie eine mögliche Funktion der von ihnen gebildeten Überträgerstoffe für den Verlauf der Erkrankung noch unklar sind, ist im Hinblick auf die oben genannten Therapieansätze bei neuroendokrin differenzierten Karzinomen anderen Ursprungs, sowie dem generellen Trend hin zu zielgerichteten Tumortherapien durchaus mit der Entwicklung eines individuellen therapeutischen Vorgehens bei neuroendokrinen Mammakarzinomen zu rechnen. Vor allem da auch der Tumorbiologie bei der Auswahl von Therapien immer

mehr Bedeutung beigemessen wird, wie auf dem „Konsensusmeeting St. Gallen 2009“ zur Primärtherapie des frühen Mammakarzinoms diskutiert [Goldhirsch, A. et al.2009].

## **V.8 Expression neuroendokriner Marker bei invasiven Mammakarzinomen im**

### **Hinblick auf die Definition des neuroendokrinen Mammakarzinoms, ein Fazit**

Die Definition des neuroendokrinen Mammakarzinoms ist schwierig, da sie einerseits auf einer bestimmten lichtmikroskopisch zu untersuchenden Morphologie und andererseits auf der Untersuchung bestimmter Proteine den sogenannten neuroendokrinen Markern beruht.

Anhand dieser Untersuchung eines großen, mit anderen aus der Literatur bekannten Mammakarzinomkollektiven, im Hinblick sowohl auf klinischen sowie pathologischen Daten wie auch Expression neuroendokriner Marker vergleichbarem Kollektives, lässt sich folgendes festhalten: Die Expression der verschiedenen neuroendokrinen Marker in Mammakarzinomen ist sehr unterschiedlich stark ausgeprägt.

Auf Grund der unterschiedlichen Raten an positiven Zellen, welche sicher nicht zuletzt durch die unterschiedliche Funktion und Lokalisation der untersuchten Proteine in der Zelle zu erklären ist, schlage ich vor, für jeden Marker einen eigenen Grenzwert festzulegen, statt wie laut der WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane pauschal 50% angefärbter Zellen als Grenzwert anzusetzen. Entsprechend den Ergebnissen dieser Untersuchung müssen die Grenzwerte niedriger angesetzt werden, um eine ausreichend hohe Sensitivität zu erreichen und somit die neuroendokrine Morphologie wiederzugeben. Gute Ergebnisse sind zudem wie bereits z.B. von Williams postuliert [Williams, G.T. 2007] nicht mit einem einzelnen Marker, sondern nur mit einer Kombination erreichen.

Es gibt keine genaue Definition, welche Proteine als Marker zur Erkennung neuroendokriner Mammakarzinome eingesetzt werden sollten. In Hinblick auf mögliche neue Entdeckungen auf diesem Gebiet erscheint es auch nicht sinnvoll, eine Liste ausschließlich zu verwendender Markerproteine aufzustellen. Trotzdem lassen sich Empfehlungen bezüglich der Diagnostik des neuroendokrinen Mammakarzinoms geben:

NSE und Synaptophysin sind am besten geeignet, um eine neuroendokrine Differenzierung in Karzinomen der Mamma nachzuweisen. Das Kriterium einer Synaptophysin Expression in mehr als 1% und einer NSE Expression in mehr als 33% der Zellen liefert das mit

---

Abstand beste Ergebnis. Der Nachweis der neuroendokrinen Morphologie gelingt hiermit mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 97,3%. Die Spezifität ließ sich durch die Berücksichtigung der Intensität der Färbungen weiter verbessern, auf Grund der großen Untersucherabhängigkeit und Abhängigkeit von technischen Gegebenheiten wurde dieser Parameter in der weiteren Auswertung jedoch nicht weiter berücksichtigt. Die Tatsache, dass aber auch mit der Kombination von NSE und Synaptophysin keine 100%ige Spezifität erreicht wird, zeigt, wie wichtig weiterhin die Beurteilung der Tumormorphologie durch erfahrene Pathologen ist, um eine korrekte Typisierung zu erreichen.

Allein die Zusammenschau von morphologischem Befund und immunhistochemischem Profil ermöglicht es, die korrekte Diagnose zu stellen.

Ob sich die neuen Grenzwerte bewähren, wird sich erst in Zukunft anhand der Untersuchung weiterer großer Kollektive zeigen lassen.

Erst unter der Voraussetzung einer einheitlichen, korrekten Diagnosestellung werden sich, letztlich unabhängig vom Ursprung der neuroendokrinen Zellen in einem Mammakarzinom, prognostische und mögliche therapeutische Konsequenz der Diagnose eines neuroendokrinen Mammakarzinoms weiter untersuchen lassen.

## VI Zusammenfassung

Das neuroendokrine Mammakarzinom ist ein relativ seltener Typ des invasiven Mammakarzinoms. Die derzeitigen World Health Organisation Kriterien zu seiner Diagnose basieren im wesentlichen auf dem Vorliegen einer bestimmten Morphologie sowie dem Nachweis der neuroendokrinen Marker Chromogranin A oder Synaptophysin in mehr als 50% der Zellen eines Karzinoms. Die Variabilität des histomorphologischen Bildes und der neuroendokrinen Markerexpression führt in der Praxis häufig zu Schwierigkeiten bezüglich einer korrekten Typisierung derartiger Mammatumoren. In der vorliegenden Arbeit wurden durch eine Detailanalyse der neuroendokrinen Markerexpression in Mammakarzinomen morphologisch und immunhistochemisch basierte Charakteristika herausgearbeitet, die eine möglichst hohe Spezifität und Sensitivität für die Erkennung des neuroendokrinen Tumorphänotyps aufweisen.

Es wurde dafür für die bekannten neuroendokrinen Marker NSE (Neuronen spezifische Enolase), Synaptophysin, Chromogranin A und CD56 jeweils der Grenzwert bestimmt, der die neuroendokrine Morphologie am besten widerspiegelt. Es fiel auf, dass die gefundenen idealen Grenzwerte alle niedriger anzusetzen waren, als die bisher geforderten 50% positiver Zellen eines Tumors. Im zweiten Schritt wurden Kombinationen der einzelnen Marker auf ihre Eignung, neuroendokrine Karzinome zu erkennen, getestet. Dabei zeigte sich, dass sich mit Hilfe der Bestimmung von NSE und Synaptophysin die besten Ergebnisse erzielen lassen. Die neu festgelegten Grenzwerte lagen dabei bei mindestens 1% Synaptophysin positiver Zellen und 33% NSE positiver Zellen. Dadurch ließ sich im untersuchten Kollektiv die neuroendokrine Morphologie mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 97,3% erkennen. Demnach stellt das immunhistochemische Panel von Antikörpern gegen Synaptophysin und NSE unter Berücksichtigung der Histomorphologie die beste Methode zum Nachweis eines neuroendokrinen Mammakarzinoms dar. Ob dies prognostische Relevanz hat, muss an anderen Kollektiven überprüft werden. Im Hinblick auf die Entwicklungen der spezifischen Tumordiagnostik und der individualisierten Tumorthherapie kann erwartet werden, dass auch die neuroendokrinen Karzinome der Brust einer zielgerichteten Therapie zugänglich gemacht werden können, wie sie für neuroendokrine Karzinome in anderen Organen bereits verfügbar ist, was die Notwendigkeit einer richtigen und reproduzierbaren Tumortypisierung unterstreicht.

---

**VII Literaturverzeichnis**

- [1] Abner, A.L., Collins, L., Peiro, G., Recht, A., Come, S., Shulman, L.N., Silver, B., Nixon, A., Harris, J.R., Schnitt, S. J., Conolly, J. L.(1998):  
Correlation of Tumor Size and Axillary Lymph Node Involvement with Prognosis in Patients with T1 Breast Carcinoma.  
CANCER 83, 2502-2508
- [2] Abrahamsson, P.A., Waldstrom, L.B., Almmets, J.(1986):  
Peptide-hormone and serotonin-immuno-reactive cells in normal and hyperplastic glands.  
Pathol. Res. Pract.181, 675-683
- [3] Albring, C., Baum, E., Beckermann, M. J., Beckmann, M. W., Blettner, M., Böhm, B., Brucker, C., Dören, M., Emons, G., Foth, D., Geisthövel, F., Gudermann, Th., Hadji, P., Kiesel, L., Klemperer, D., König, K., Lindhoff-Last, A.E., Ludolph, A., Mueck, A.O., Naß-Griegoleit, I., Noss, D., Ortmann, O., Petri, E., Rabe, Th., Regitz-Zagrosek, V., Schulte, H., Siedentopf, F, Strowitzki, Th., Windler, E.(2009):  
Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause (HT), Interdisziplinäre S3-Leitlinie, AWMF 015/062, Langversion mit Quellentexten  
Online-Publikation; [www.dggg.de/fileadmin/public\\_docs/Dokumente/Leitlinien/2-1-4-ht-lang-hp1.pdf](http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Dokumente/Leitlinien/2-1-4-ht-lang-hp1.pdf)
- [4] Allred, D.C., Clark, G.M., Molina, R.(1992):  
Overexpression of Her-2/*neu* and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer.  
Human Pathol 23,974-979.
- [5] Antoniou, A.C., Easton, D.F.(2006):  
Models of genetic susceptibility to breast cancer.  
Oncogene 25, 5898-5905
- [6] Ataseven, A., Eiermann, W.(2006):  
Mammakarzinom. Breast cancer.  
Dtsch Med Wochenschr. 131, 1091-1099

- 
- [7] Bernstein, L.(2006):  
The Risk of Breast, Endometrial and Ovarian Cancer in Users of Hormonal Preparations.  
Basic Clin Pharmacol Toxicol 98(3), 288-96.
- [8] Bewick, V., Cheek, L., Ball, J.(2004):  
Review: Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves.  
Crit Care 8(6), 508-512
- [9] Brambilla, E, Veale, D., Moro, D., Morel, F., Dubois, F., Brambilla, C.(1992):  
Neuroendocrine phenotype in lung cancer: Comparison of immunohistochemistry with biochemical determination of enolase isoenzymes.  
Am J Clin Pathol 98, 88-97
- [10] Bussolati, G., Gugliotta, P., Sapino, A., Eusebi, V., Lloyd, R.V.(1985):  
Chromogranin-reactive endocrine cells in agyrophilic carcinomas ('carcinoids') and normal tissue of the breast.  
Am. J. Pathol. 120, 186-192
- [11] Capella, C., Heitz, P.U., Höfler, H., Solcia, E., Klöppel, G.(1995):  
Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut.  
Virchows Arch. 425, 547-569
- [12] Chassevent, A., Jourdan, M.-L., Romain, S., Descotes, F., Colonna, M., Martin, P.-M., Bolla, M., Spyrtos, F. (2001):  
S-Phase Fraction and DNA Ploidy in 633 T1T2 Breast Cancers: A Standardized Flow Cytometric Study.  
Clin Cancer Res 7, 909-917
- [13] Christofori G.(2003):  
Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression.  
EMBO J 22, 2318–23.



- 
- [14] Clarke, C.A., Glaser, S.L., Uratsu, C.S., Selby, J.V, Kushi, L.H., Herrinton, L.J.(2006a):  
Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population-based evidence.  
J Clin Oncol, 24, No 33 e49-e50
- [15] Clarke, C.A., Purdie, D.M., Glaser, S.L.(2006b):  
Population attributable risk of breast cancer in white women associated with immediately modifiable risk factors.  
BMC Cancer 6(1), 170
- [16] Claus, B.C., Risch, N., Thompson, W.D.( 1994):  
Autosomal Dominant Inheritance of Early-Onset Breast Cancer. Implications for Risk Prediction.  
Cancer 73, 643-51
- [17] Colditz, G.A., Rosner, B.A., Chen, W.Y., Holmes, M.D., Hankinson, S.E.(2004):  
Risk Factors for Breast Cancer According to Estrogen and Progesterone Receptor Status.  
J Natl Cancer Inst 96, 218 –28
- [18] Collaborative Group Hormonal Factors in Breast(1996):  
Cancer: Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies.  
Lancet 347, 1713-1727
- [19] Collins, J.A., Blakke, M.J., Crosignani, P.G.(2005):  
Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment.  
Hum Reprod Update 11, No.6, 545-560

- 
- [20] Colozza, M., Azambuja, E., Cardoso, F., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart, M.J.(2005):  
Review: Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?  
Ann oncol 16(11), 1723-1739
- [21] Dabakuyo, T.S., Bonnetain, F., Roignot, P., Poillot, M.-L., Chaplain, G., Altwegg, T., Hedelin, G., Arveux, P.(2008):  
Population-based study of breast cancer survival in Cote d'Or (France): Prognostic factors and relative survival.  
Ann Oncol. 19(2), 276-83
- [22] DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg(2000):  
DAKO HercepTest Kurzanleitung
- [23] Decker, T., Hungermann, D., Böcker, W.(2009):  
Prognostische und prädiktive Faktoren invasiver Mammakarzinome.  
Pathologe 30, 49-55
- [24] Dumitrescu, R.G., Cotarla, I.(2005):  
Understanding breast cancer risk- where do we stand in 2005?  
J Cell Mol Med 9, No 1 208-221
- [25] Dupont W.D., Page D.L.(1985):  
Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease.  
N Engl J Med. 312,146-51.
- [26] Dybdal, N., Leibermann, G., Anderson, S., McCune, B., Bajamonde, A., Cohen, R.L., Mass, R.D., Sanders, C., Press, M.F.(2005):  
Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridisation and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab.  
Breast Cancer Res. Treat. 93, 3-11

- 
- [27] Easton, D.F., Narod S.A., Ford D., Steel, M.(1994):  
The genetic epidemiology of BRCA-1.  
*Lancet* 344, 761
- [28] Ellis, I.O., Galea, M., Broughton, N., Locker, A., Blamey, R.W., Elston, C.W.  
(1992):  
Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship  
with survival in a large study with long-term follow-up.  
*Histopathology* 20,479-489.
- [29] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V.,  
Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J.,  
Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-  
Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003a):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of  
Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press; Seite 33
- [30] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V.,  
Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J.,  
Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-  
Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003b):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of  
Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press; Seite 19-48

- 
- [31] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003c):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press; Seite 56
- [32] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003d):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press; Seite 18
- [33] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003e):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press; Seite 32-34
- [34] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003f):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press

- [35] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003g):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press, Seite 19
- [36] Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Sastre-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V., Peterse, J.L., Mukai, K., Tabár, L., Jacquemier, J., Cornelisse, C.J., Sasco, A.J., Kaaks, R., Pisani, P., Goldgar, D.E., Devilee, P., Cleton-Jansen, M.J., Børresen-Dale, A.L., van't Veer, L., Sapino, A. (2003):  
Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli, F.A., Devilee P. (Eds.) (2003h):  
World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.  
Lyon: IARC Press, Seite 23-26
- [37] Elston, C.W., Ellis, I.O. (1991):  
Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up.  
*Histopathology* 19,403-410.
- [38] Euler, U., Annecke, K., Thomssen, C., Harbeck, N.(2006):  
UPA und PAI-1 als Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom.  
*Journal Onkologie* 8, 10-11
- [39] Feyrter, F., Hartmann, G.(1963):  
Über die carcinoide Wuchsform des Carcinoma mammae, insbesondere des Carcinoma solidum (gelatinosum) mammae.  
*Frankfurter Zeitschrift für Pathologie* 73, 24-39
- [40] Garcia-Yuste, M., Matilla, J.M., Gonzalez-Aragoneses, F.(2008):  
Neuroendocrine tumors of the lung.  
*Curr Opin Oncol* 20, 148–154

- 
- [41] Goldhirsch, A., Ingle, J.N., Gelber, R.D., Coates, A.S., Thürlimann, B., Senn, H.-J. & Panel members(2009):  
Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009.  
Ann Oncol 20(8),1319-29
- [42] Goldhirsch, A., Wood, W.C., Gelber, R. D., Coates, A. S.,Thürlimann, B., Senn, H.-J. & Panel Members(2007):  
Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.  
Ann Oncol 18(7), 1133–1144
- [43] Gould, V.E., Wiedenmann, B., Lee, I., Schwechheimer, K., Dockhorn-Dworniczak, B., Radosevich, J.A., Moll, R., Franke, W.W.(1987):  
Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunohistochemistry.  
Am J. Pathol. 126, 243-257
- [44] Hall, J.M., Lee M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson L.A., Huey, B., King, M.C. (1990):  
Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.  
Science 250, 1684-89
- [45] Hilger, R.-D., Bauer, P., Scheiber, V.(2007):  
Einführung in die medizinische Statistik. 2. Auflage.  
Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; S. 89
- [46] Ingelmann-Sundberg, H., Wikström, B., Stormby, N., Sundelin, P., Hjerpe, A.(1989):  
Immunohistochemical reactivity of breast cancer tissue with antibodies to neuron-specific enolase and an adenocarcinoma-associated glycolipid antigen.  
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 415, 539-544

- 
- [47] Jänicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G.J.F., Selbmann, H.-K., Graeff, H., Schmitt, M. (2001):  
Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1.  
J Natl Cancer Inst 93(12), 193-200
- [48] Jin, L., Hemperly, J.J., Lloyd, R.V. (1991):  
Expression of neural cell adhesion molecule in normal and neoplastic human neuroendocrine tissues.  
Am J Pathol 138, 961-969
- [49] Kendal, W.S. (2006):  
Lymph node-based prognostics: limitations with individualized cancer treatment.  
Am J Clin Oncol 29, 298–304
- [50] Klöppel, G. (2003):  
Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts.  
Pathologe 24, 287-296
- [51] Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Schraml P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi, O.P. (1998):  
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.  
Nature Med. 4, 844-847
- [52] Kumle, M., Weiderpass, E., Braaten, T., Persson, I., Adami, H.O., Lund, E. (2002):  
Use of Oral Contraceptives and Breast Cancer Risk: The Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study.  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11(11), 1375-81
- [53] Lahmann P.H., Lissner, L., Gullberg, B., Olsson, H., Berglund, G. (2003):  
A prospective study of adiposity and postmenopausal breast cancer risk: The Malmö diet and cancer study.  
Int J Cancer 103, 246-52

- 
- [54] Lamberts, S.W.J., Hofland, L.J., Nobels, R.E.(2001):  
Neuroendocrine tumor markers.  
*Frontiers in Neuroendocrinology* 22, 309-339
- [55] Lerwill, M.F. (2004):  
Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology.  
*Am J Surg Pathol* 28,8, 1076- 1091
- [56] Makretsov, N., Gilks, C.B., Coldman, A.J., Hayes, M., Huntsman, D.(2003):  
Tissue microarray analysis of neuroendocrine differentiation and its prognostic significance in breast cancer.  
*Hum Pathol* 34,10, 1001-1008
- [57] Maluf, H.M., Koerner, F.C.(1994):  
Carcinomas of the breast with endocrine differentiation: a review.  
*Virchows Arch.* 425, 449-457
- [58] Marchbanks, P.A., McDonald, J.A., Wilson, H.G., Folger, S.G., Mandel, M.G., Daling, J.R., Bernstein, L., Malone, K.E., Ursin, G., Strom, B.L., Norman, S.A., Wingo, P.A., Burkman, R.T., Berlin, J.A., Simon, M.S., Spirtas, R., Weiss, L.K.(2002):  
Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer.  
*N Engl J Med* 346, 2025-32
- [59] McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M.(2000):  
ABC of Breast Diseases. Breast Cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.  
*BMJ* 321, 624-628
- [60] Menard, S., Pupa, S. M., Campiglio, M. Tagliabue, E.(2003):  
Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer.  
*Oncogene* 22, 6570-6578



- 
- [61] Miremadi, A., Pinder, S.E., Lee, A.H.S., Bell, J.A., Paish, E.C., Wencyk, P., Elston, C.W., Nicholson, R. I., Blamey, R.W., Robertson, J.F., Ellis, I.O.(2002):  
Neuroendocrine differentiation and prognosis in breast adenocarcinoma.  
*Histopathology* 40, 215-222
- [62] Monaghan P., Roberts, J.D.B.(1985):  
Immunohistochemical evidence for neuroendocrine differentiation in human breast carcinomas.  
*J Pathol* 147, 281-289
- [63] Moriya, T., Kasajima, A., Ishida, K., Kariya, Y., Akahira, J., Endoh, M., Watanabe, M., Sasano, H.(2006):  
New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions.  
*Med Mol Morphol* 39, 8-13
- [64] Nassar, H., Qureshi, H., Volkanadsay, N., Visscher, D.(2006):  
Clinicopathologic analysis of solid papillary carcinoma of the breast and associated invasive carcinomas.  
*Am J Surg Pathol.* 30(4), 501-7
- [65] Nathanson, K.N., Wooster, R., Weber, B.L.(2001):  
Breast cancer genetics: What we know and what we need.  
*Nat Med* 7, 552-6
- [66] Naume, B., Wiedswang, G., Borgen, E., Kvalheim, G., Kåresen, R., Qvist, H., Janbu, J., Harbitz, T., Nesland, J.M.(2004):  
The Prognostic Value of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow in Breast Cancer Patients: Evaluation of Morphological Categories and the Number of Clinically Significant Cells.  
*Clin Cancer Res* 10, 3091-3097

- 
- [67] Nelson, E.C., Cambio, A.J., Yang, J.C., Ok, J-H., Lara P.N. Jr., Evans, C.P.(2007):  
Clinical Implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer: review.  
Prostate Cancer and Prostatic Diseases 10, 6-14
- [68] Nesland, J.M., Holm, R., Johannessen, J.V.(1986):  
A Study of different markers for neuroendocrine differentiation in breast  
carcinomas.  
Path Res. Pract. 181, 524-530
- [69] Nesland, J.M., Lunde, S., Holm, R., Johannessen, J.V.(1987):  
Electron microscopy and immunostaining of the normal breast and its benign  
lesions. A search for neuroendocrine cells.  
Histol. Histopathol.2, 73-77
- [70] Papotti, M., Macri, L., Finzi, G., Capella, C., Eusebi, V., Bussolati, G.(1989):  
Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the breast: A study of 51 cases.  
Semin Diagn Pathol 6, 174-188
- [71] Park, B.W., Kim, S.I., Kim, E.K., Yang, W.I., Lee, K.S. (2002):  
Impact of patient age on the outcome of primary breast carcinoma.  
J Surg Oncol 80,12-8.
- [72] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P.(2005):  
Global Cancer Statistics, 2002.  
CA Cancer J Clin 55,74-108
- [73] Pausletti, G., Godolphin, W., Press, M.F., Slamon, D.J. (1996):  
Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast  
cancer archival material using fluorescense in situ hybridisation.  
Oncogene 13, 63-72

- [74] Phillips, T., Murray, G., Wakamiya, K., Askaa, J., Huang, D., Welcher, R., Pii, K., Allred, D.C.(2007):  
Development of Standard Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemical Assays for Selection of Patients for Antihormonal Therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15, 3
- [75] Rebbeck, T.R.(1999):  
Inherited Genetic Predisposition in Breast Cancer. A Population-Based Perspective. *Cancer* 86, 2493–2501
- [76] Sachs, L.(1999):  
Angewandte Statistik- Anwendung statistischer Methoden. 9. Auflage  
Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag; Seite 477-480
- [77] Sapino, A., Papotti, M., Righi, L., Cassoni, P., Chiusa, L., Bussolati, G.(2001a):  
Clinical significance of neuroendocrine carcinoma of the breast. *Ann Oncol* 12, Suppl., 115-117
- [78] Sapino, A., Righi, L., Cassoni, P., Papotti, M., Gugliotta, P., Bussolati, G.(2001b):  
Expression of Apocrine Differentiation Markers in Neuroendocrine Breast Carcinomas of Aged Women. *Mod Pathol* 14(8), 768–776
- [79] Schmechel, D., Marangos, P.J., Brightman, M.(1978):  
Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276, 834-836
- [80] Schmidt-Matthiesen, H., Wallwiener, D., von Fournier, D., Hoyme U.B., Licht, P., von Loewenich, V., Schauf, B., Taubert, H.-D.(2004):  
Gynäkologische Onkologie - Mammakarzinom. In: Schmidt.Matthiesen, H., Wallwiener, D.(Hrsg.): Gynäkologie und Geburtshilfe. 10.Auflage. Stuttgart: Schattauer; S.416

- 
- [81] Shin, S.J., DeLellies, R.A., Ying, L., Rosen, P.P.(2000):  
Small cell carcinoma of the breast. A clinicopathologic and immunohistochemical study of nine Patients.  
Am J Surg Pathol 24(9), 1231-1238
- [82] Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt. J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. et al.(1989):  
Studies of the Her2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.  
Science 244, 707-712
- [83] Tauchi, K., Hori, S., Itoh, H. et al.(1989):  
Immunohistochemical studies on oncogene products(c-erb-B-2, EGFR, c-myc) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions.  
Virchows Archiv A Pathol Anat 416,65-73.
- [84] Tokunaga, E., Oki, E., Kojiro, N., Koga, T., Egashira, A., Morita, M., Kakeji, Y., Maehara, Y.(2006):  
Trastuzumab and breast cancer: developments and current status.  
Int. J. Clin. Oncol. 11, 199-208
- [85] Trampisch, H.J., Windeler, J. (Hrsg.), Ehle, Lange, S (2000):  
Medizinische Statistik. 2. Auflage  
Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, usw.: Springer-Verlag, Seite 273-276
- [86] Urruticoechea, A., Smith, I.E., Dowsett, M.(2005):  
Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer.  
J Clin Oncol 2, 7212-7220
- [87] Verhoog, L.C., Brekelmamns, C.T.M., Seynaeve, C., Dahmen, G., van Geel, A.N., Bartels, C.C.M., Tilanus-Linthorst, M.M.A.(1999):  
Survival in Hereditary Breast Cancer Associated With Germline Mutations of BRCA2.  
J Clin Oncol 17, 3396-3402

- [88] Untch, M., Jackisch, C., Thomssen, C., Nitz, U., von Minckwitz, G., Kaufmann, G.(2006):  
Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen.  
Dtsch Arztebl 103(50):A 3406–10
- [89] Walsh, T., Casadei, S., Coats, K.H., Swisher, E., Stray, S.M., Higgins, J., Roach, K.C., Mandell, J., Lee, M.K., Ciernikova, S., Foretova, L., Soucek, P., King, M.C.(2006):  
Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer.  
JAMA 295(12), 1379-88
- [90] Williams, G.T.(2007):  
Endocrine tumours of the gastrointestinal tract-selected topics.  
Histopathology 50, 30-41
- [91] Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., LaCroix A.Z., Kooperberg C., Stefanick M.L., Jackson R.D., Beresford S.A., Howard B.V., Johnson K.C., Kotchen J.M., Ockene J.; Writing Group for the Women’s Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial.  
JAMA. 288, 321-333.
- [92] Yamamoto, J., Ohshima, K., Nabeshima, K., Ikeda, S., Iwasaki, H., Kikuchi, M.(2004):  
Comparative study of primary mammary small cell carcinoma, carcinoma with endocrine features and invasive ductal carcinoma.  
Oncol Rep 11, 825-831
- [93] Zoltowska, A., Stepinski, J., Lewko, B., Serkies, K., Zamorska, B., Roszkiewicz, A., Izycka-Swieszewska, E, Kruszewski, W.J.(2001):  
Neural Cell Adhesion Molecule in Breast, Colon and Lung Carcinomas.  
Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 49, 171-174

## IX Anhang

### IX.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BRCA1	(„BRCA1 Cancer gene 1“)
BRCA2	(„BRCA2 Cancer gene 2“)
bzw.	beziehungsweise
CD56	Cluster of Differentiation 56 (= NCAM)
DCIS	duktales Carcinoma in situ
ER	Östrogenrezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/ <i>neu</i>	Human Epidermal growth factor Receptor 2
NCAM	neural cell adhesion molecule (=CD56)
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
TTF-1	Thyroid Transcription Factor
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
WHI	Women’s Health Initiative
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

**IX.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Primärantikörper.....	25
Tabelle 2: Allred-Score .....	26
Tabelle 3: Auswertung des Herzeptests zur Beurteilung der Her2/neu Expression.....	27
Tabelle 4: Klinische und pathologische Daten der untersuchten Mammakarzinome .....	30
Tabelle 5: Expression neuroendokriner Marker bei invasiven Mammakarzinomen in Abhängigkeit der verwendeten Cutoff Werte.....	33
Tabelle 6: Expression neuroendokriner Marker entsprechend des Cutoff Wertes der „WHO Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane“ in Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp .....	34
Tabelle 7: Übersicht über die vier untersuchten Marker, Synaptophysin, NSE, Chromogranin A und CD56 als Einzelmarker. ....	35
Tabelle 8: Berücksichtigung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen.....	38
Tabelle 9: Veränderungen zwischen der WHO-Klassifikation und den neu definierten Cutoff Werten .....	39
Tabelle 10: Kombination von je zwei Markern.....	40
Tabelle 11: Bester Cutoff für die Identifikation neuroendokriner Mammakarzinome im Detail NSE Anteil >33% und Synaptophysin Anteil >1%.....	41
Tabelle 12: Alter bei Diagnose vs. neuroendokrine Differenzierung.....	42
Tabelle 13: Häufigkeit verschiedener Tumortypen des Mammakarzinoms laut „WHO- Klassifikation der Tumoren der Brust und der weiblichen Geschlechtsorgane“ .....	52
Tabelle 14: Die Tumorgroße (T-Stadium) im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Dabakuyo et al. ....	52
Tabelle 15: Der Nodalstatus im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Dabakuyo et al. ....	53
Tabelle 16: Das Grading im untersuchten Kollektiv im Vergleich zum Kollektiv von Elston et al. ....	53

---

**IX.3 Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1: Morphologische Charakteristika neuroendokriner Mammakarzinome.....	31
Abbildung 2: Expression neuroendokriner Marker in invasiven Mammakarzinomen .....	32



---

## **X Danksagung**

Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Kurt W. Schmid, Direktor des Instituts für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Essen dafür, dass ich an seinem Institut im Rahmen meiner Promotion forschen durfte.

Herrn Dr. med. Friedrich Otterbach, Oberarzt am Institut für Pathologie und Neuropathologie am Universitätsklinikum Essen, der mich zum wissenschaftlichen Arbeiten angeleitet hat und mir vor allem bei allen Fragen zur Pathologie der Mamma sowie bei den mikroskopischen Untersuchungen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dipl. Statistikerin Sabine Hertel, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie am Universitätsklinikum Essen, die mich bezüglich der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse kompetent beraten hat.

Meinen Eltern, die mich, wie immer und wo immer möglich unterstützt haben und die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

**XI Lebenslauf**

Name                                  Andreas Johannes Sonnwald  
wohnhaft in                              Bochum  
Geburtsdatum,-ort                      06.01.1982 in Dortmund

Nationalität                              deutsch  
Familienstand                              ledig

Eltern                                      Dr. med. Karl Heinz Sonnwald, Arzt für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe

    Renate Sonnwald, Erzieherin

Geschwister                              Thomas Sonnwald (geb. 1985), Gesundheits- und Krankenpfleger  
    Franziska Sonnwald (geb. 1988), Studentin: Geschichte, Germanistik

Schule

1988-1992                                  Kirchhörder Grundschule in Dortmund  
1992-2001                                  Stadtgymnasium Dortmund, Abschluss: Abitur

Studium

10.2001-09.2003                          Ruhr Universität Bochum, Humanmedizin, Vorklinik, Abschluss:  
Physikum  
10.2003-04:2009                          Universität Duisburg-Essen, Humanmedizin, Abschluss:  
Staatsexamen

Berufsausbildung

seit 06.2008                                  Assistenzarzt im Marien-Hospital Witten  
Klinik für Frauenheilkunde

