# Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

# Prognostische Bedeutung von Rb und p53 in Ovarialkarzinomen

Ergebnisse einer retrospektiven Analyse der in der Frauenklinik des UKE Hamburg primär operierten Ovarialkarzinome von 1985 - 2001

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Tina Anke Margit Osterholz aus Hoya/Weser

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin Der Universität Hamburg:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß: der/die Vorsitzende

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in

# <u>Inhaltsverzeichnis</u>

1.	Einle	itung_		7		
2.	Theoretische Grundlagen					
	2.1	Tumorsuppressorgene und ihre Produkte				
		2.1.1	.1 Übersicht			
		2.1.2	Das Retinoblastom (Rb)-Gen	9		
		2.1.3	Rb-Protein_	10		
		2.1.4	p53-Gen_	12		
		2.1.5	p53-Protein	13		
	2.2	Das (	Ovarialkarzinom	17		
		2.2.1	Epidemiologie	17		
		2.2.2	Risikofaktoren	17		
		2.2.3	Histologische Klassifikation	18		
		2.2.4	Das histopathologische Grading	18		
		2.2.5	Die Stadieneinteilung	20		
		2.2.6	Diagnostik	21		
		2.2.7	Die operative Therapie des Ovarialkarzinoms_	23		
		2.2.8	Chemotherapie	25		
		2.2.9	Mögliche Ansätze weiterer Therapien	27		
3.	Frag	estellur	ng	28		
4.	Mate	erialien	und Methoden	29		
	4.1	Liste	Liste der verwendeten Labormaterialien			
		4.1.1	Schnittpräparate	29		
		4.1.2	Trocknung	29		
		4.1.3	Entparaffinisierung	29		
		4.1.4	Hitzeinduzierte Demaskierung (=Mikrowellenvorbehandlung)	30		
		4.1.5	Immunhistochemie	30		
		4.1.6	Gegenfärbung	31		
		4.1.7	HE-Färbung	31		

		4.1.8	Eindeckung	)		31	
	4.0					32	
	4.2	Histologische Arbeitsweise					
		4.2.1	Einführung in die Immunhistochemie				
		4.2.2	Die HE-Färbung			35	
		4.2.3	Methodik der Bearbeitung und Auswertung der Histologie			35	
	4.3	Patie	ntenkollektiv	und N	Methoden	36	
		4.3.1	Information	squell	e und Datenbasis	36	
		4.3.2	Beschreibur	ng wic	chtiger Merkmale	40	
			4.3.2.1	Tumo	orstadium	41	
			4.3.2.2	Histo	logischer Typ	43	
			4.3.2.3	Das I	nistologische Grading	44	
			4.3.2.4	Nach	nbeobachtungszeit	45	
			4.3.2.5	Alter		45	
		4.3.3	Dokumento	ation u	nd Datenverarbeitung	46	
		4.3.4	Überblick über die verwendeten Verfahren4				
		4.3.5	Überblick über die verwendeten statistischen Testverfahren4				
		4.3.6	Hinweise zu		tischen Symbolik	48	
5.	Erge	bnisse_				49	
	5.1	lmmu	unhistochemi	e		49	
		5.1.1	Retinoblasta	oma-A	Auswertung	49	
		5.1.2	p53-Auswer	tung_		54	
	5.2	Überleben5					
		5.2.1	5.2.1 Einfluss von Rb auf die Überlebenswahrscheinlichkei von Patientinnen mit Ovarialkarzinom6				
					ıng des Kollektivs in Abhängigk	eit 61	
			5.2.1.1		Histologie	61	
			5.2.1.	1.2	Grading	61	
			5.2.1.1	1.3	Tumorstadium	62	

			r	63		
				präoperative Wert des ormarker Ca 125	63	
			5.2.1.6 Der postoperative Wert des			
				ormarkers Ca 125	63	
				berlebenszeit	64	
		5.2.2		Rb bei gleichzeitiger g bekannter Faktoren	66	
		5.2.3	•	auf die Überlebenswahrschein- entinnen mit Ovarialkarzinom	68	
				oung des Kollektivs in Abhängig	keit <u></u> 68	
			5.2.3.1.1	Histologie	68	
			5.2.3.1.2	Grading	68	
			5.2.3.1.3	Tumorstadium	68	
			5.2.3.1.4	Alter	70	
			5.2.3.1.5	Der präoperative Tumormarkerwert CA 125	70	
			5.2.3.1.6	Der postoperative Tumormarkerwert CA 125	 70	
			5.2.3.1.7	Überlebenszeit	71	
		5.2.4		o53 bei gleichzeitiger g bekannter Faktoren	72	
6.	Disku	ussion			74	
	6.1	Betra	chtung allgemeir	ner Merkmale des Kollektivs	74	
		6.1.1	Alter		74	
					74	
					75	
				p	75	
					76	
	6.2		Betrachtung der ermittelten unabhängigen Prognosefaktoren			
		6.2.1	T ( '' ''	der makroskopischen	76	

	6.2.2	Der Rb-I	Nachweis	78
		6.2.2.1	Die Bedeutung von Rb	78
		6.2.2.2	Mögliche Erklärungen für den Rb- Nachweis_	80
	6.2.3	Der p53	-Nachweis	82
		6.2.3.1	Die Bedeutung von p53	82
		6.2.3.2 6.2.3.3	Mögliche Erklärungen für den p53- Nachweis Möglicher klinischer Nutzen	86 87
7.	Zusammenf	assung_		88
8.	Literaturverz	zeichnis_		89
9.	Danksagun	g		100
10.	Lebenslauf_			101
11.	Eidesstattlic	he Erklär	ung	103

# 1. Einleitung

Nach dem Endometriumkarzinom ist das Ovarialkarzinom der zweithäufigste maligne Genitaltumor der Frau.

Die Inzidenz dieses Malignoms liegt bei ca. 17/100.000 Frauen pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 61 Jahre.

Beim überwiegenden Teil der Patientinnen (70%) wird die Erkrankung erst in den späten Stadien FIGO III und IV erkannt, da der Verlauf zunächst recht symptomarm ist und Screeningverfahren mit ausreichend hoher Sensitivität und Spezifität nicht vorliegen (1).

Auch im Hinblick auf geeignete Prognosefaktoren oder Marker, die eine Aussage über die Notwendigkeit und Art einer postoperativen Chemotherapie zulassen, sind noch viele Fragen offen. In der Literatur diskutierte Prognosefaktoren sind beispielsweise das Tumorstadium, der histopathologische Zelltyp, das histopathologische Grading und der Tumormarker Ca 125 (2, 3), vor allem aber Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrestes (4, 5).

Das Rb-Gen ist das erste Tumorsuppressor-Gen, das beim Menschen beschrieben wurde. Die Expression beeinflusst nicht nur die Prolieferation und Differenzierung von Zellen, sondern spielt ebenso eine Rolle beim sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose). Verlust oder Mutation sind somit unter Umständen bedeutend für die Tumorentstehung (6;7;8).

Das p53-Tumorsuppressor-Gen hat ebenfalls eine wichtige Funktion in der Unterdrückung von Tumorwachstum. Normalerweise führt das p53-Protein zu einer Aktivierung von Genen, die den Zellzyklus inhibieren und die Apoptose herbeiführen. Auf diese Weise kommt es zu einer Unterbindung der Weitergabe von DNA-Defekten in späteren Zellgenerationen. Die vorliegende Arbeit soll zum einen hinterfragen, ob in unserem Kollektiv Zusammenhänge zwischen dem p53- bzw. Rb-Nachweis und den in der Literatur beschriebenen Prognosefaktoren Tumorstadium, postoperativer Tumorrest, histopathologischer Zelltyp, histopathologisches Grading, Tumormarker Ca 125 vorliegen und ob zum anderen eine gezielte

Untersuchung von Ovarialkarzinomen auf die Expression von p53- bzw. Rb-Protein richtungsweisend bei der Prognose des Krankheitsverlaufes ist.

#### 2. Theoretische Grundlagen

# 2.1 Tumorsuppressorgene und ihre Produkte

#### 2.1.1 Übersicht

Bei der Tumorentstehung spielen genetische Veränderungen eine wichtige Rolle

Es lassen sich grundsätzlich zwei genetische Veränderungen in Tumoren unterscheiden.

Durch Mutation oder Fehlregulation können Gene zum einem aktiv an der malignen Transformation beteiligt sein. Zum anderen tragen Gene durch Verlust eines oder beider Allele zur malignen Transformation bei. Die Gene, die aktiv an der malignen Transformation beteiligt sind, wurden zuerst in Retroviren gefunden und als Onkogene bezeichnet, wobei der Begriff Onkogen eine dominante Wirkung auf die maligne Transformation implizieren soll.

Die an zweiter Stelle genannten Gene werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet, auch wenn ihre physiologische Funktion nicht primär in der Unterdrückung des Tumorwachstums liegen muss. Ein Spezialfall der Tumorsuppressorgene sind solche Gene, bei denen das Produkt eines mutierten Allels das Produkt des nicht-mutierten Allels ausschaltet. Derartige Mutationen werden als dominant-negativ bezeichnet.

Die Produkte der Tumorsuppressorgene sind die sogenannten Tumorproteine, die im Folgenden ebenfalls behandelt werden.

#### 2.1.2 Das Retinoblastom (Rb)-Gen

Das Retinoblastom ist ein bösartiger Tumor der Netzhaut, der bei kleinen Kindern mit einer Inzidenz von 1:20000 auftritt, und aus Zellen der embryonalen Retina entsteht.

Das Gen, dessen Verlust oder Inaktivierung für die Entstehung von Retinoblastomen verantwortlich ist, wird als Retinoblastom- oder auch Rb-Gen bezeichnet.

Es wird ubiquitär exprimiert. Sein Produkt ist das Phosphoprotein Rb-105, das beim Retinoblastom generell nicht nachzuweisen ist (siehe Kapitel 2.1.3).

In allen bisher untersuchten Retinoblastomen sind beide Allele Loci des Rb-Gens funktionsunfähig. Nach der Theorie der zwei Ereignisse nach A.G. Knudson ("Two Hit Hypothese") sind zwei unabhängige Mutationen für die maligne Entartung der Retinazellen erforderlich. Bei der hereditären Form des Retinoblastoms ist die erste Mutation bereits in der Keimbahn vorhanden. Eine zweite somatische Mutation führt zur Entstehung des Tumors. Bei dieser Form treten die Tumoren daher immer bilateral auf. Bei den Formen ohne genetische Disposition sind dagegen zwei somatische Mutationen erforderlich. Diese Tumoren treten in der Regel unilateral auf (9;10). Zu den somatischen Mutationen, durch die das zweite Rb-Gen ausgeschaltet werden kann, zählen Deletionen im Rb-Locus, der Verlust des gesamten Chromosoms, Punktmutationen und illegitime Rekombinationen, die ebenfalls den Verlust des Wildtyp-Allels zur Folge haben. Diese unterschiedlichen Mutationen haben eine fehlende oder verminderte Expression des Phosphoproteins Rb-105 zur Folge, die sich außer beim Retinoblastom noch in weiteren Malignomen wie z.B. Weichteil- und Knochensarkomen oder auch in dem kleinzelligen Lungenkarzinom nachweisen lässt.

#### 2.1.3 Rb-Protein

Das Rb-Protein ist ein nukleäres Phosphorprotein mit einer relativen Molmasse von 105.000.

Es spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der DNA-Synthese und der Regulierung des Zellzyklus. Während des Zellyklus bzw. durch die S-Phase bis in die G2/M-Phase hinein wird Rb-Protein phoshporyliert. In der späten M-Phase wird Rb-Protein rasch dephosphoryliert. Unphosphoryliertes Rb-Protein stellt die wachstumshemmende Form des Rb-Protein dar und wirkt dahingehend, dass es die Transkription von E2F unterdrückt. Wird

unphosphoryliertes Rb-Protein nicht produziert, führt die Freisetzung von E2F zu einer Aktivierung von E2F-antwortenden Genen, was wiederum zu einem Übergang in die S-Phase des Zellzyklus führt. Veränderungen auf dem Genlokus von Rb führen in der Regel zu einer fehlenden Produktion von Rb-Protein, das in der Lage wäre, E2F zu unterdrücken.

Worin liegen die zellbiologischen Funktionen des Rb-Proteins? Aus Versuchen, in denen Rb-Allele in der Keimbahn ausgeschaltet wurden, ließen sich drei wichtige Schlüsse ziehen.

Zum einen ist das Rb-Protein für das Überleben der Zellen in frühen Differenzierungsphasen nicht essentiell. Die Expression von Rb-Protein nimmt im Laufe der Differenzierung zu und wird in differenzierten Zellen beibehalten. Sein Funktions- und Phosphorylierungsstatus korreliert eng mit dem Zellzyklus.

Das Rb-Expressionsmuster spricht dafür, dass funktionell aktives, unterphosphoryliertes Rb diejenigen Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus stoppt, für die ein Weg in das Differenzierungskompartiment vorgesehen ist. Auf dem weiteren Weg ist Rb erforderlich, um die Zellen im postmitotischen Zustand zu halten.

Weiterhin kann der Verlust der Rb-Funktion zum Untergang von Zellen durch Apoptose führen, wobei hierfür p53 erforderlich ist. Ist kein p53 vorhanden, dann kann der Verlust der Rb-Funktion drittens eine inadäquate Prolieferation bewirken. (11-14)

Die zentrale Bedeutung des Rb-Proteins für die Onkogenese ergibt sich nicht nur aus Verlust oder Inaktivierung in menschlichen Tumoren, sondern auch aus der Bindung und funktionellen Inaktivierung durch Onkoproteine von DNA-Tumorviren. Bei diesen Onkoproteinen handelt es sich um verschiedene Proteine einiger Viren, von denen der überwiegende Teil beim Menschen nicht onkogen wirkt. Eines dieser Proteine ist beim Menschen mit anogenitalen Karzinomen, vor allem dem Zervixkarzinom, assoziiert. Es handelt sich dabei um das E7-Protein humaner Papillomaviren vom Typ 16 und 18. Diese viralen Onkoproteine interagieren mit Rb über ein spezifisches Aminosäuresequenz-Motiv, welches auch in zellulären, Rb-bindenden Proteinen vorkommt.

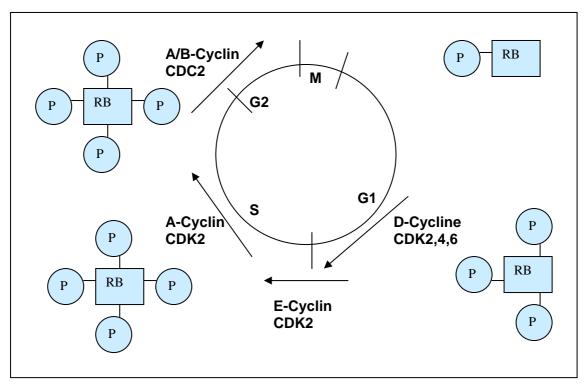


Abb. 1: Aktivität von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen im Verlauf des Zellzyklus

#### 2.1.4 p53-Gen

Bei mehr als 50% der Patienten mit kolorektalem, Mamma- und kleinzelligen Bronchialkarzinom ließen sich mit Hilfe von DNA-Polymorphismen ein Verlust der Heterozygotie auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 nachweisen

Durch eine weitere Feinkartierung wurden die Defekte einem Gen zugewiesen, das bereits zuvor in Zusammenhang mit der Wirkung von DNA-Tumorviren Interesse gefunden hatte. Das Gen kodiert für das Phosphorprotein p53, welches als zelluläres Bindungsprotein des SV40-Tumorvirus entdeckt wurde. Bezogen auf die Gesamtzahl aller menschlichen Tumoren lassen sich in 40 bis 45% Mutationen des p53-Gens finden (15).

Bei den meisten Tumoren überwiegt der Verlust von nur einem Allel. Das Genprodukt ist, anders als bei anderen Tumorsuppressorgene, häufig in erhöhter Konzentration im Tumor zu finden. Dieser Befund lässt sich aber mit einer veränderten Halbwertszeit des Genproduktes erklären, da das verbleibende p53-Allel in der Regel mutiert ist und so dem Genprodukt eine verlängerte Halbwertszeit verleiht.

Bei den Mutationen des p53-Gens handelt sich fast ausschließlich um sogenannte Punktmutationen, die in einem weiten Bereich des Gens vorkommen und im allgemeinen funktionell bedeutsame Regionen des Genproduktes betreffen.

Abhängig von der Tumorart können Mutationen des p53-Gens in allen Tumorstadien auftreten. Mamma-, Bronchial-, Zervixkarzinome sowie Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs sind mit Mutationen bereits in den frühen Stadien assoziiert, bei anderen Tumoren wie Hirntumoren, Schilddrüsen- und Ovarialkarzinomen sind p53-Genmutationen eher in bereits fortgeschrittenen Stadien nachweisbar. Mutationen erst in den späteren Stadien einer Tumorerkrankung sind als prognostisch ungünstig zu werten (16;17).

#### 2.1.5 p53 - Protein

Das p53-Protein ist ein im Zellkern lokalisiertes Phosphorprotein, das aus 393 Aminosäuren besteht. Es lassen sich mindestens drei funktionelle Domänen unterscheiden. N-terminal liegt die durch eine große Dichte saurer Aminosäuren gekennzeichnete transaktivierende Domäne, die mit Proteinen des Transkriptionsapparats interagiert. An diese Domäne binden auch das adenovirale E1B-Protein und das MDM2-Protein. Im mittleren Teil von p53 befindet sich eine unspezifische DNA-Bindungsdomäne. An diese Domäne bindet das große T-Antigen des SV40-Virus. Weiter C-terminal folgt eine Sequenz mit überwiegend basischen Aminosäuren, die eine amphipathische helikale Struktur bilden und so die Oligomerisierung von p53-Monomeren vermitteln.

Normales p53 besitzt mit maximal 20 Minuten eine geringe Halbwertszeit. Die Konzentration des Proteins ist nach der Mitose am geringsten und steigt im Verlauf der G1-Phase des Zellzyklus an. In der S-Phase wird p53 phophoryliert. Die Funktion des p53 wird danach über seine Konzentration und Phosphorylierung reguliert.

Wie bereits unter 2.1.4 erwähnt, wurde das p53-Protein als ein mit dem large T-Antigen von SV-40-Viren assoziiertes zelluläres Protein entdeckt. Wie das

Retinoblastom-Protein wird auch p53 durch Proteine von Adenoviren (E1B) und onkogenen Papillomaviren (E6) inaktiviert. Nach Klonierung der p53-cDNA wurde das Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 kartiert.

Während der Wildtyp des p53 unter bestimmten Bedingungen die Zelltransformation und das Tumorwachstum hemmt, kann mutantes p53 umgekehrt zur Transformation und zum immortalisierten Wachstum von Zellen in-vitro beitragen (18-20). Dies passiert auch dann, wenn noch Wildtypp53 in der Zelle exprimiert wird. Auch der Verlust von p53 trägt zur Entstehung von Tumoren bei, reicht jedoch allein für die Entstehung des vollen malignen Phänotyps, d.h. eines bösartigen Tumors nicht aus (21;22).

Mutantes p53 trägt also zu Transformation und Tumorwachstum bei, auch wenn noch Wildtyp-p53 in der Zelle exprimiert wird. Diese Beobachtung führte zunächst dazu, dass p53 als dominantes Tumorgen angesehen wurde. Es ist jedoch schwer miteinander vereinbar, dass mutiertes p53 einerseits als dominantes Tumorgen wirkt, der Verlust beider p53-Allele jedoch ebenfalls das Tumorwachstum fördert.

Dieser scheinbare Widerspruch wird im folgenden erklärt. Mutante p53-Monomere können in Oligomeren Wildtyp-p53-Monomere in eine mutante Konformation zwingen und auf diese Weise auch die Funktion von Wildtyp-p53 hemmen (dominant negative Wirkung von p53-Mutanten). Wenn die Funktion von mutantem p53 allein darin läge, die Funktion von Wildtyp-p53 zu hemmen, könnte ein Funktionsverlust ebenso durch einen Verlust beider Allele erreicht werden.

Die in menschlichen Tumoren nachgewiesenen Mutationen betreffen nicht die Oligomerisierungsdomäne. Mutierte p53-Proteine können daher untereinander und mit Wildtyp-p53 Oligomere bilden. In Oligomeren aus mutiertem und Wildtyp-p53 ist die Konformation von Wildtyp-p53 verändert und die Interaktion mit der DNA beziehungsweise dem Transkriptionsapparat gestört. Dies erklärt, dass bei Mutation eines Allels das Produkt des nicht mutierten Allels ausgeschaltet wird. Solche Mutationen werden als dominant negativ bezeichnet.

Zwei Gene, deren Transkription durch Wildtyp-p53 aktiviert wird, sind für das Verständnis der p53-Funktion von besonderer Bedeutung. Das eine Gen, dessen Promotor ein p53-Bindungsprotein enthält, kodiert für das p21-Protein, einen universellen Inhibitor von Cyclin-CDK-Komplexen. Die Bedeutung des p21 ergibt sich u.a. aus dem Befund, dass die Inaktivierung von p53 durch das HPV-E6-Onkogen auch die Expression von p21 und seine Assoziation mit Cyclin-CDK-Komplexen hemmt. Da das p21-Gen nur durch Wildtyp-p53, nicht jedoch durch p53-Mutanten aktiviert wird, ist es ein wichtiger Effektor von Wildtyp-p53, der den Zellzyklus in der G1-Phase blockiert und eventuell auch DNA-Reparatur-Mechanismen beeinflusst.

In der normalen Zelle bewirken schädigende Einflüsse wie eine Bestrahlung der Zelle mit UV-Licht oder DNA-schädigenden Substanzen eine Hochregulation von p53, die zu einem G1-Arrest führt. Die Pause im Zellzyklus kann dann zu einer Reparatur von DNA-Defekten genutzt werden. P53 kann allerdings auch nach Einwirkung DNA-schädigender Einflüsse die Apoptose vermitteln, wie einige In-vitro-Untersuchungen gezeigt haben (23;24). Ob es zur Apoptose oder zur Reparatur der DNA kommt, ist abhängig von Zellart und Bedingungen.

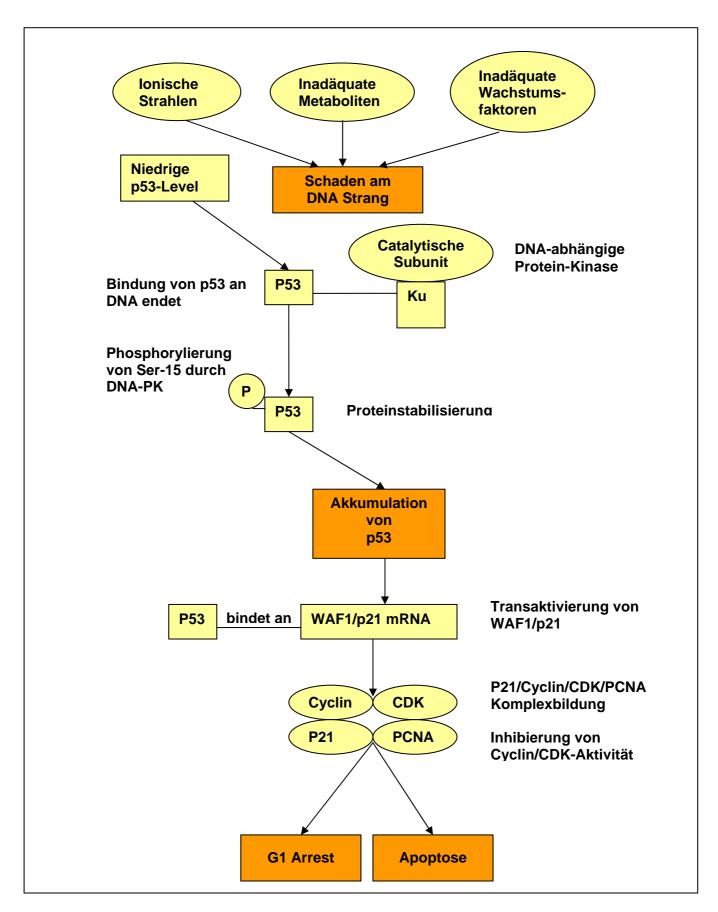


Abb. 2: p53-vermittelter Zellzyklus-Stop oder Apoptose nach DNA-Schaden

#### 2.2 Das Ovarialkarzinom

#### 2.2.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste maligne Genitaltumor der Frau.

Es steht an erster Stelle der gynäkologischen Krebstodesursachen.

Für Deutschland sind keine exakten Inzidenzzahlen verfügbar, es wird aber geschätzt, dass jährlich 8200 Neuerkrankungen bei 42 Millionen Frauen auftreten, das sind 4,7% aller weiblichen Krebserkrankungen pro Jahr. Das statistische Bundesamt ermittelte für das Jahr 1998 6027 Todesfälle infolge eines malignen Ovarialtumors. (25-27)

Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 61 Jahre. Die mittlere Überlebenszeit liegt bei 2,4 Jahren. Die Zehnjahresüberlebensrate (Gesamtüberleben) beträgt 29,1% und das mittlere Sterbealter 70,1 Jahre. Laut Angaben des Tumorregisters München hat sich insgesamt das Fünf- und Zehnjahresüberleben seit 1998 geringfügig, aber signifikant gebessert (relatives Fünfjahresüberleben vor und nach 1998: 39,2% und 46,1%; relatives Zehnjahresüberleben vor und nach 1988: 31,8 und 34,1%) (28).

Mindestens 75% weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium auf (FIGO III und IV). Die fehlenden Vorsorge- und Früherkennungsmöglichkeiten sind hierfür ursächlich.

#### 2.2.2 Risikofaktoren

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weitgehend unklar. Zu den wenigen bekannten Risikofaktoren zählen Alter, Nulliparität, refraktäre Infertilität, hohe Zahl ovulatorischer Zyklen und medikamentöse Ovulationsauslösung, sowie Umwelt- und Ernährungsfaktoren.

Ca. 5 bis 10% der Fälle scheinen genetisch bedingt zu sein. Hierbei ist die Mutation des BRCA 1 oder BRCA 2 Suppressorgens auf dem Chromosom

17q beziehungsweise 13q mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Mammaoder Ovarialkarzinom verbunden (29).

Auch eine Hormonersatztherapie scheint einen Risikofaktor darzustellen. In einer Kohortenstudie der American Cancer Society, in der über 21000 Frauen über 14 Jahre nachbeobachtet wurden, findet sich ein relatives Risiko von 2,2 (KI 1,52 bis 3,17) (30).

Als protektive Faktoren gelten Multiparität, orale Kontrazeptiva, Tubenligatur und Hysterektomie (31).

# 2.2.3 Histologische Klassifikation

Unter dem Begriff der malignen Ovarialtumoren wird eine Vielzahl verschiedener Tumoren zusammengefasst.

Bis zu 90% der malignen Tumoren sind Oberflächen-Stroma-Tumoren, zu denen die serösen, muzinösen, endometroiden, klarzelligen, transitionalzelligen, Plattenepithel-, undifferenzierte und Mischtumoren zählen (32;33).

Des weiteren gibt es Keimstrangstroma-Tumoren, die unter den malignen Ovarialtumoren einen Anteil von bis zu 3% ausmachen, sowie die Keimzelltumoren, die mit einer Häufigkeit von 1 bis 3% auftreten. Seltene Tumoren sind die Gonadoblastome, die Keimzell-Keimstrangtumoren, die Tumoren des Rete ovarii und mesothelialen Tumoren.

Da in dieser Arbeit nur Patientinnen untersucht wurden, die an einem malignen epithelialen Tumor erkrankt waren, wird auf eine ausführliche Klassifikation der nicht epithelialen Tumoren verzichtet.

#### 2.2.4 Das histopathologische Grading

1998 wurden von Silverberg erstmals gut definierte Kriterien für das Grading von Ovarialkarzinomen vorgeschlagen. Diese Kriterien können unabhängig vom histologischen Typ angewendet werden.

Der Differenzierungsgrad wird nach der Zellarchitektur, der Kernpleomorphie und der Mitosezahl beurteilt (34; 35). Es werden dabei 4 verschiedene Differenzierungsgrade unterschieden. Man unterteilt in G1 (hoch differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 bis G4 (gering differenziert oder undifferenziert). G3 und G4 werden häufig auch in einer Gruppe zusammengefasst.

# 2.2.5 Die Stadieneinteilung

Der intraoperativ erhobene makroskopische Befund und seine histologische Bestätigung sind entscheidend für die Stadieneinteilung. Deshalb ist eine größere Anzahl von Biopsien auch noch aus scheinbar nicht befallenen Arealen erforderlich. Hier ist eine Standardisierung des operativen Vorgehens mit entsprechender Dokumentation empfehlenswert.

TNM	FIGO	Befundsituation	
	1	Tumor begrenz auf Ovarien	
	la 	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars	
T1	lb lc	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien; keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	
		Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur und/oder Tumor an der Ovaroberfläche und/oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	
	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus	
	lla	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	
T2	Ilb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; keine malignen Zellen in	
	IIc	Aszites oder Peritonealspülung Ausbreitung im Becken (Ila oder Ilb) und maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung	
	Ш	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	
Т3	Illa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens	
	IIIb	Peritonealmetastasen mit größter Ausdehnung < 2cm	
	IIIc	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen	
M1	IV	Fernmetastasen (ausgeschlossen hiervon Peritonealmetastasen)	
	Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteil werden	
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	
	N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen	

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinom (nach UICC (1997) TNM Classification of malignant tumors. Sobin LH, Wittekind Ch (eds). Wiley-Liss, New York)

Für eine adäquate Absicherung des Lymphknotenstatus müssen mindestens zehn regionäre Lymphknoten gewonnen und histologisch untersucht werden.

Leberkapselmetastasen sind als T3 beziehungsweise FIGO III zu klassifizieren. Leberparenchymmetastasen jedoch als M1 beziehungsweise FIGO IV.

Ein Pleuraerguß darf erst nach positivem zytologischen Nachweis von Tumorzellen als M1 beziehungsweise FIGO IV klassifiziert werden (36).

# 2.2.6 Diagnostik

Diagnosesicherung und Stadieneinteilung von Ovarialtumoren erfolgt im Regelfall intraoperativ.

Dennoch ist es natürlich wünschenswert, wenn man präoperativ möglichst viele Informationen sammeln kann, um eine unzureichende Primärresektion zu vermeiden bzw. eine gute Operationsplanung möglich zu machen. Neben einer allgemeinen Anamneseerhebung und einer sorgfältigen klinischen Untersuchung ist die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 erforderlich, um damit einen zusätzlichen Parameter zur Therapieverlaufskontrolle zur Verfügung zu haben. Da sich bei muzinösen Karzinomen nur in etwa der Hälfte aller Fälle erhöhte CA 125-Werte finden, sollte bei negativem CA 125-Wert die Bestimmung der Marker CA 72-4 oder CA 19-9 ergänzt werden.

Ratsam ist zudem die Asservierung von präoperativen Serumproben, um nach Vorliegen der endgültigen Histologie gegebenenfalls weitere Laborparameter bestimmen zu können.

Eine präoperative Sonographie sollte ebenfalls erfolgen, um die Tumorgröße bestimmen zu können. Zudem erlaubt die Sonographie eine Aussage darüber, ob es sich überwiegend um einen zystischen, soliden oder mehrkammerigen Tumor handelt.

Weiterhin erlaubt diese Untersuchung die Abschätzung von Aszitesmenge, Pleuraerguß, intrahepatischer Metastasierung, sowie Stauung des Nierenhohlsystems.

Die farbcodierte und gepulste Dopplersonographie zur Untersuchung von benignen und malignen Adnexprozessen kann zur Zeit noch nicht für das Screening empfohlen werden (37).

Im Rahmen der anästhesiologischen Vorbereitung ist die Thoraxaufnahme bzw. wegen der möglichen Ausdehnung des Eingriffs zur Abschätzung der OP-Fähigkkeit eventuell eine präoperative Lungenfunktionsdiagnostik bzw. Echokardiographie erforderlich.

Bei nachgewiesenem Pleuraerguß kann durch eine zytologische Untersuchung geklärt werden, ob ein Tumorstadium IV vorliegt, da sich hieran das Ausmaß der operativen Radikalität orientieren kann.

Eine Zystoskopie und Rektoskopie sollen Auskunft über eine Blasen- und Rektumbeteiligung geben. Eine Koloskopie kann bei fortgeschrittenen Karzinomen sowie bei gastrointestinalen Beschwerden zum Ausschluss einer Darmbeteiligung hilfreich sein.

Nur bei Unklarheiten sollte die Diagnostik durch Schnittbildverfahren erweitert werden. Durch den Einsatz von CT oder MRT lassen sich Läsionen, die als nicht optimal resezierbar angesehen werden, z. B. Herde von mehr als zwei Zentimeter Größe, wie sie beispielsweise an der Zwerchfelloberfläche, an der Pleura, im Mesenterium oder als Lymphknotenkonglomerate vorkommen können, gut darstellen. Diese Patientinnen können dann eventuell an ein operatives Zentrum überwiesen werden, um auch bei schwierigem Situs eine erfolgreiche Tumorresektion zu erreichen.

Die operative Diagnosesicherung über eine Laparoskopie ist bei Tumoren sinnvoll, die aufgrund des präoperativen Stagings als inoperabel oder zumindest als nicht tumorfrei operabel gelten. In diesen Fällen können möglicherweise die primäre präoperative Chemotherapie zum "Downstaging"

des Tumors und die anschließende Operation eine Prognoseverbesserung erzielen. (38)

Ein allgemeines Screening, um die prognostisch günstigeren, in der Regel jedoch symptomlosen frühen Tumorstadien, zu erkennen, ist zur Zeit wegen fehlender nachgewiesener Effektivität nicht sinnvoll und nicht zu rechtfertigen. Vielmehr ist zu bedenken, dass die niedrige Prävalenz, die rasche Krankheitsprogression auch bei nur mikroskopisch diagnostiziertem Ovarialkarzinom, sowie die Ängste und die sekundäre Morbidität bei falsch positiven Befunden den möglichen Nutzen eines Screenings in Frage stellen (39).

#### 2.2.7 Die operative Therapie des Ovarialkarzinoms

Die Größe des postoperativ verbliebenen Tumorrestes stellt einen wichtigen Prognoseparameter für das Überleben beim Ovarialkarzinom dar. Der Sinn einer radikalen Primärchirurgie konnte sowohl hinsichtlich der Verlängerung der Überlebenszeit als auch der daraus resultierenden verbesserten Lebensqualität in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (40-43).

Die möglichst vollständige Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes schafft die Voraussetzung für eine bestmögliche Wirkung der Chemotherapie.

Die operative Behandlung des Ovarialkarzinoms erfordert große Erfahrung und ist in der Regel bei fortgeschrittenen Befunden nur im interdisziplinären Ansatz adäquat durchführbar.

Jeder Adnextumor, der zyklusunabhängig nachweisbar ist, sollte bis zum Beweis des Gegenteils als malignitätsverdächtig eingestuft werden. Die Einschätzung der Dignität und der Ausbreitung des Tumors sollte in der Regel bereits präoperativ erfolgen.

Die Eröffnung des Abdomens erfolgt über einen Längsschnitt, der, wenn erforderlich, bis zum Xyphoid verlängert werden kann.

Nach Eröffnung des Bauchraumes sollte Peritonealflüssigkeit oder Aszites zur zytologischen Untersuchung asserviert werden.

Anschließend erfolgt die Exploration des Abdomens entsprechend dem typischen Ausbreitungsmuster des Ovarialkarzinoms (kleines Becken, Kolonrahmen, parakolische Rinnen, Dünndarm mit Mesenterium, paraaortale und pelvine Lymphknotenregionen, Oberbauch mit Leber, Milz und Zwerchfell beidseits). Von beiden Zwerchfellhälften sollten Abstriche mit einem Holzspatel entnommen werden. Jede noch so kleine Auffälligkeit muss biopsiert werden.

Ist die Exploration des Bauchraumes erfolgt, muss darüber entschieden werden, ob der Allgemeinzustand der Patientin eine komplette Tumorreduktion in adäquater Zeit zulässt.

Ist das der Fall, dann wird in der Regel mit der Omentektomie oder der Tumorreduktion im kleinen Becken begonnen.

Obligate Bestandteile der Operation sind die beidseitige Adnektomie und die Hysterektomie. Es empfiehlt sich ein retroperitonealer Zugang zum kleinen Becken von kranial zur besseren Übersicht und zur Darstellung beider Ureteren.

Die Ovarialgefäße sollen hoch abgesetzt werden. Liegt ein Konglomerattumor aus Uterus, Adnexen, Sigma und Rektum vor, so ist eine sogenannte "en bloc"-Resektion dieser Organe von Vorteil.

Es werden die infragastrische und die infracolische Omentektomie unterschieden, wobei die infracolische Omentektomie in der Regel nur in den frühen Stadien durchgeführt werden sollte.

Ist das Peritoneum des kleinen Beckens und der Blase befallen, so wird dieses ebenfalls reseziert. Es sollte ohnehin überall dort entfernt werden, wo Tumorabsiedelungen auffallen. Daher ist es auch in vielen Fällen der bereits fortgeschrittenen Stadien erforderlich, die Zwerchfellkuppeln zu deperitonealisieren. Bei Infiltration in die Muskulatur des Zwerchfells oder beim Einwachsen in die Pleurahöhle muss eine Resektion des Zwerchfells

erfolgen. Ist die Leberkapsel diffus mit Tumorinfiltrat übersät, so kann auch diese Kapsel en bloc wie das Peritoneum entfernt werden.

In den frühen Stadien ist die Entfernung der pelvinen Lymphknoten im Sinne eines adäquaten Stagings obligat. In den späten Stadien wird eine Lymphonodektomie konträr diskutiert (44), es sollten jedoch in jedem Fall suspekt erscheinende Lymphknoten im Sinne einer optimalen Tumorreduktion entfernt werden.

Mitunter sind noch weitere Eingriffe wie Darmresektionen, eine Splenektomie oder eine Pankreasschwanzteilresektion oder Magenteilresektion erforderlich. Ebenso werden Segmentresektionen der Leber beschrieben.

Komplikationsrate und Mortalität steigen mit Zunahme der Radikalität, so dass das Ausmaß des Eingriffs einer sorgfältigen Indikationsstellung bedarf (45;46).

Die operative Behandlung des Ovarialkarzinoms stellt für den gynäkologischen Chirurgen eine große Herausforderung dar, so dass eine interdisziplinäre Planung mit einem Abdominalchirurgen und gegebenenfalls mit einem Urologen ebenso unabdingbar erscheint wie eine gute Zusammenarbeit mit der Anästhesie und der Intensivmedizin.

#### 2.2.8 Chemotherapie

Effektivität und Ansprechrate einer Chemotherapie sind im Wesentlichen von Tumorbiologie, Größe des postoperativ belassenen Tumorrestes und Art der Chemotherapie sowie Intervall zwischen erster und zweiter Chemotherapie abhängig.

Die Effektivität der Chemotherapie nimmt mit Reduktion der Tumorgröße nicht linear sondern exponentiell zu.

Man unterscheidet zwischen der adjuvanten Chemotherapie (nach Entfernung aller sichtbaren Tumorauflagerungen), der Chemotherapie mit kurativem Ansatz (nach sog. optimalen Debulking mit postoperativen Tumorresten <= 1

cm), der präoperativen Chemotherapie und der palliativen Chemotherapie als Ansätze für die systemische Primärbehandlung.

Der Versuch, die Tumormassen beim epithelialen Ovarialkarzinom zu reduzieren, schließt seit ungefähr 40 Jahren neben der Operation eine zytostatische Behandlung mit ein.

Während dieser Zeit hat das chemotherapeutische Regime einen bedeutenden Wandel erfahren. Zunächst erfolgte der Einsatz von Alkylantien im Rahmen einer Monotherapie, seit Ende der siebziger Jahre wird jedoch eine Kombinationstherapie favorisiert, da diese mit einer Verlängerung der Überlebenszeit verbunden ist.

Die Einführung von Cisplatin führte zur Erzielung weiterer Fortschritte. Die Überlegenheit dieser Substanz wurde in randomisierten Studien, in denen eine cisplatinhaltige Kombinationstherapie mit der Gabe von Alkylantien verglichen wurde, gezeigt. Cisplatin wurde daher in den achtziger Jahren als neuer Therapiestandard etabliert.

Mittlerweile hat Carboplatin das Cisplatin ersetzt, da Carboplatin eine geringere Oto-, Neuro- und Nephrotoxizität besitzt. (47-49)

In den frühen neunziger Jahren wurde dann mit den Taxanen eine neue Substanzklasse eingeführt. Zwei große prospektiv randomisierte Studien konnten die Überlegenheit taxanhaltiger Schemata nachweisen. In einer randomsierten GOG-Studie wurde bei Patientinnen im Stadium III/IV und suboptimaler Tumorreduktion Cisplatin/Cyclophoshamid mit Cisplatin/Paclitaxel verglichen. Mit der taxanhaltigen Kombination konnte die mittlere Überlebensdauer auf 38 Monate gegenüber 24 Monate verlängert werden. Allerdings ging die bessere Wirksamkeit mit einer höheren Toxizität einher (50).

Derzeit gilt die Kombination Taxan plus platinhaltiges Agens daher als Standard in der Therapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom.

Jedoch muss auch dieser Standard nach Vorliegen der Daten der ICON-3-Studie erneut diskutiert werden (Paclitaxel/Carboplatin versus Carboplatin mono versus Cyclophosphamid/Doxorubicin/Cisplatin), da hier eine

Platinmonotherapie vergleichbar mit einer taxanhaltigen Kombination erscheint, allerdings eine geringere Toxizität aufweist.

Spricht man von einem Chemotherapiestandard, so ist des weiteren beim Ovarialkarzinom zwischen den frühen und den späten Stadien zu unterscheiden.

Bei Patientinnen mit einer sogenannten "low risk" Situation (FIGO Ia/Ib, G1) ist mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von über 90% keine adjuvante systemische Therapie indiziert. Dagegen ist bei Patientinnen in einer "high risk" Situation (FIGO Ia/Ib, G2 und FIGO Ic/IIa, G1-3) mit einer Fünfjahresmortalität von 25 bis 30% eine Chemotherapie sinnvoll (51). Diese Empfehlung konnte erstmals durch den ICON-1 und ACTION Trial bei 925 prospektiv untersuchten Patientinnen mit einer Verbesserung des rezidivfreien Überlebens nach fünf Jahren von 65 auf 76% und des 5-Jahres-Überlebens von 75 auf 82% bestätigt werden (52).

In den späteren Stadien (FIGO IIb bis IV) werden 6 Zyklen Paclitaxel in einer Dosierung von 175mg/m² KOF (3h) in Kombination mit Carboplatin nach AUC 5 (1h) alle 21 Tage als derzeitiger Therapiestandard empfohlen (AGO 2002).

#### 2.2.9 Mögliche Ansätze weiterer Therapien

Weitere therapeutische Möglichkeiten sind die Hormontherapie, sowie die gentherapeutischen und immuntherapeutischen Ansätze. Auf die Hormontherapie sowie auf die immuntherapeutischen Ansätze soll in dieser Arbeit im Weiteren nicht eingegangen werden. Für die Erläuterung der gentherapeutischen Ansätze wird auf Kapitel 6.2.3.3 in der Diskussion verwiesen.

# 3. <u>Fragestellung</u>

Prognostische Bedeutung von Rb und p53 in Ovarialkarzinomen:
Immunhistochemische Untersuchung von Tumorgewebe der in der
Frauenklinik des UKE Hamburg primär operierten epithelialen
Ovarialkarzinome im Zeitraum 1985 bis 2001 und Korrelation der gefundenen
Ergebnisse mit einer retrospektiven Analyse des Krankheitsverlaufs dieses
Kollektivs.

- 1. Ist der Rb- bzw. p53-Nachweis hilfreich in Hinblick auf die Verwendung als Prognosefaktor bezogen auf das Gesamtüberleben dieses Kollektivs?
- 2. Ist die makroskopische Tumorfreiheit ein unabhängiger prognostischer Faktor in dem untersuchten Kollektiv?
- **3.** Wie verhalten sich die gefundenen Ergebnisse im Vergleich zur internationalen Literatur?

#### 4. <u>Materialien und Methoden</u>

#### 4.1 Liste der verwendeten Labormaterialien

# 4.1.1 Schnittpräparate

Objektträger: Superfrost (Menzel-Gläser; Artikelnr. 041300)

Deckgläschen: Deckgläser 24x46mm No.1 (Marienfeld; Artikelnr. 6350)

Microtom: Microm (Heidelberg; Gerätenummer 63701)

Messerklingen: Microtome Blade S35 (Feather; Ref-Nr. 02.075.00.000)

Wasserbad: Wasserbad (UKE; Gerätenummer 02675)

Trockenpapier: Block Nr. 556 zum Trocknen gefärbter Objektträger

(Schleicher+Schüll GmbH; Bestellnummer 309 003)

# 4.1.2 Trocknung

Wärmeschrank: Wärmeschrank (UKE; Gerätenummer 05942)

# 4.1.3 Entparaffinisierung

Xylol: Xylene Melange d'Isomeres 2,5l (SDS; Lot-Nr. 02120201)

Ethanol 100%: Ethanol absolut (Apotheke UKE)

Ethanol 96%: Ethanol 96% (Apotheke UKE)

Ethanol 80%: Ethanol 80% (Apotheke UKE)

Leitungswasser

**Entionisiertes Wasser** 

Färbeschiffchen

# 4.1.4 Hitzeinduzierte Demaskierung (= Mikrowellenvorbehandlung)

Mikrowelle: Mikrowelle "Compact" (Sharp; Gerätenummer 164)

TEC-Puffer (1fach): 2,5 g Tris (Trishydroxymethylaminomethane)

(Merck; Artikelnummer 108 382)

5 g EDTA (Ethylenedinatrilotetraacetic acid)

(Merck; Artikelnummer 108 417)

3,2 g Tri-Na-Citrat (Merck)

Aqua dest auf 1 Liter auffüllen

PH 7,8

**Entionisiertes Wasser** 

**Destilliertes Wasser** 

#### 4.1.5 Immunhistochemie

Gerät: DAKO-Cytomation Autostainer (DAKO; Gerätenummer

62995)

Primärantikörper: p53 (DAKO; Artikelnummer: H 7123)

Rb (DAKO; Artikelnummer: 14991A)

Verdünnung des Primärantikörpers: ChemMate Antibody Diluent (DAKO;

Artikelnummer: S2022)

Sekundärantikörper: ChemMate Link, Biotinylated Secondary Antibodies =

biotinylierte Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobuline (DAKO Chem Mate Detection Kit –

Peroxidase/DAB; Artikelnummer: K 5001)

Farbstoff: DAB+ Chromogen = 3,3' Diaminobenzidine-

Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel (DAKO

Chem Mate Detection Kit -Peroxidase/DAB;

Artikelnummer: K 5001)

Enzymblockade: Wasserstoffperoxid (DAKO Chem Mate Peroxidase

Blocking-solution; Artikelnummer: S2023)

Tertiäres Reagenz: ChemMate Streptavidin Peroxidase (HRP) (DAKO Chem

Mate Detection Kit -Peroxidase/DAB;

Artikelnummer: K 5001)

Waschpuffer: Wash buffer (DAKO, Artikelnr. S 3006)

#### **Entionisiertes Wasser**

#### 4.1.6 Gegenfärbung

Hämatoxylin: Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie

(Merck; Artikelnummer: 1.09249.0500)

Xylol: Xylene Melange d'Isomeres 2,5l (SDS; Lot-Nr. 02120201)

Ethanol 80%: Ethanol 80% (Apotheke UKE)
Ethanol 96%: Ethanol 96% (Apotheke UKE

Ethanol 100%: Ethanol absolut (Apotheke UKE)

#### 4.1.7 HE-Färbung

Xylol: Xylene Melange d'Isomeres 2,5l (SDS; Lot-Nr. 02120201)

Ethanol 80%: Ethanol 80% (Apotheke UKE)
Ethanol 96%: Ethanol 96% (Apotheke UKE)

Ethanol 100%: Ethanol absolut (Apotheke UKE)

Hämatoxylin: Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie

(Merck; Artikelnummer: 1.09249.0500)

Essigsäure 1% Essigsäure 100% (Riedel-de-Haen; Bestellnr. 27225)

Eosin: Eosin 4-solution 0,5% aquaeous for microscopy

(Merck; Artikelnummer: 109 844)

destilliertes Wasser

#### 4.1.8 Eindeckung

Eindeckmedium: Eukitt (O. Kindler GmbH & Co.; Lot-Nr. C21)

#### 4.2 Histologische Arbeitsweise

### 4.2.1 Einführung in die Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem gezielten Nachweis von verschiedenen Proteinen.

Dieser Nachweis erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die in der Regel der IgG-Klasse entstammen.

Man unterscheidet dabei polyklonale von monoklonalen Antikörpern. Ein polyklonaler Antikörper erkennt mehrere antigene Determinanten, da die Antikörper von verschiedenen B-Zellen im Tier gebildet werden und zudem auch noch oft die Antiseren mehrerer Tiere gemischt ("gepoolt") werden. Diese polyklonalen Antiseren sind daher für Veränderungen an einem Epitop nicht so anfällig wie monoklonale Antikörper, es kann jedoch zu unspezifischen Hintergrundfärbungen kommen.

Im Gegensatz hierzu stehen die monklonalen Antikörper, die – wie der Name impliziert- aus einem Klon entstammen, so daß die Zellen, die diesem Klon entstammen, genetisch völlig identisch sind und daher wiederum identische Antikörper produzieren. Aus diesem Grund sind sie sehr spezifisch, jedoch gegenüber Veränderungen des Epitops wesentlich empfindlicher. Sowohl der Antikörper zum Nachweis von p53 als auch der zum Nachweis von Rb sind monoklonale Antikörper.

Aus der Lokalisation des Antigens ergibt sich das Reaktionsmuster des Antikörpers.

Hierbei werden 3 Reaktionsmuster unterschieden:

- zytoplasmatisch
- nukleär
- membranständig

Für die Beurteilung einer Reaktion ist die Kenntnis dieses Reaktionsmusters von großer Bedeutung, da sich nur so unspezifische von spezifischen Reaktionen unterscheiden lassen.

Bei der Reaktion mit p53 handelt es sich ebenso wie bei der Reaktion mit Rb um eine Reaktion, die im Zellkern lokalisiert ist (nukleäre Antikörper).

Von weiterer Bedeutung ist die Nachweismethode, mit der die Reaktion sichtbar gemacht wird.

Zu unterscheiden ist dabei die direkte von der indirekten Nachweismethode. Bei der direkten Methode wird der spezifische Antikörper direkt mit einem Fluorochrom oder Markerenzym konjugiert.

Bei der indirekten Methode bindet ebenfalls ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen der Probe.

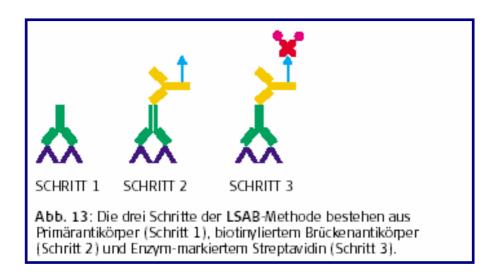
Im nächsten Schritt gibt man einen sogenannten Sekundärantikörper zu dem bereits gebundenen Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörper gerichtet und ist mit einem Markerenzym oder Fluorochrom konjugiert.

Bei der indirekten Nachweismethode unterscheidet man verschiedene Verfahren.

Im folgenden soll jedoch nur kurz die Nachweismethode vorgestellt werden, die in dieser Arbeit zum Nachweis von p53-Protein bzw. Rb-Protein verwendet wurde, die LSAB-Methode.

Bei der Labeled Streptavidin-Biotin-Methode macht man sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Tetramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin. Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, bedient man sich heute eines reineren gentechnisch hergestellten Produktes, dem Streptavidin, das aus dem Bakterium Streptomyces avidinii isoliert wird. Weiterhin verwendet man einen Brückenantikörper, welcher mit Biotin markiert (biotinyliert) ist. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an den Brückenantikörper koppeln läßt und somit die Verbindung zwischen Brückenantikörper und Streptavidin-Enzymkonjugat herstellt.

Die Entstehung dieses Streptavidin-Enzymkomplexes entsteht in einem dritten Schritt durch das Auftragen eines direkt mit einem Enzym (Peroxidase) gebundenen (labeled) Avidins. Hier sind alle vier möglichen Bindungsstellen des Avidins für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin frei.



Das LSAB-System ist derzeit einer der spezifischsten und durch relativ einfache Handhabung eine der bevorzugtesten Methoden.

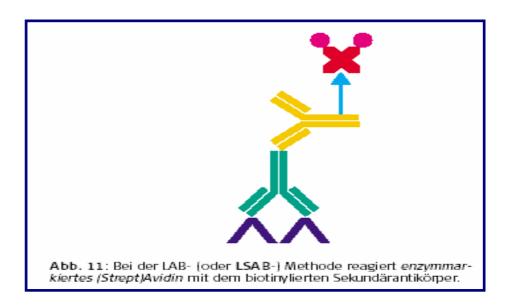


Abb. 3 und 4: Darstellung der LSAB-Methode (aus "Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden", 3. Auflage; DakoCytomation)

# 4.2.2 Die HE-Färbung

Routinemäßig werden histologische Präparate mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, damit gehört diese Methode zu den gebräuchlichen Färbemethoden in der Histologie.

Mit Hämatoxylin werden die Zellkerne gefärbt, die sich dadurch blau darstellen. Ebenso können Bakterien, Kalk und basophiles Zytoplasma zur Darstellung gebracht werden.

Eosin stellt sich rot dar und bringt Zytoplasma und Bindegewebsfasern zur Darstellung.

Die HE-Färbung liefert so eine gute Übersicht über das auszuwertende histologische Präparat.

# 4.2.3 Methodik der Bearbeitung und Auswertung der Histologien

Nach Vorliegen des kompletten Follow-up aller Patientinnen wurden die zugehörigen Paraffinblöcke herausgesucht und jeweils mehrere Schnitte mit einer Dicke von 1µm angefertigt.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Schnitte auch tatsächlich – hinsichtlich Qualität und Quantität- Karzinomgewebe enthielten, wurden zunächst Färbungen mit Hämalaun-Eosin angefertigt und in der Abteilung für Gynäkopathologie befundet.

Nach Vorliegen dieser Ergebnisse wurden dann nur die Paraffinblöcke weiter verwendet, die sicher Karzinomgewebe enthielten.

Es erfolgten dann immunhistochemische Färbungen mit p53 und Rb, wobei jedem Block ein Schnitt zugeordnet wurde.

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte mit Unterstützung der Abteilung für Pathologie/Institut für Gynäkopathologie. Jeder Schnitt wurde jeweils von 2 unabhängig voneinander arbeitenden Personen, nämlich dem Doktoranden und einem Facharzt für Pathologie, ausgewertet. Bei diskordinanten Befunden wurde im Anschluß ein gemeinsamer Befund erhoben.

Bei der Auswertung wurde folgendes zugrunde gelegt:

- Die Signalstärke der immunhistochemischen Färbung. Hierbei wurden drei Wertebereiche unterschieden (schwaches Signal = 1; mittelstarkes Signal = 2, starkes Signal = 3).
- Der Anteil an positiven Tumorzellen bezogen auf den gesamten Tumoranteil innerhalb eines Präparates. Hierbei wurde in 4 Wertebereiche differenziert (<20% positive Tumorzellen = 1; 20 bis 49% positive Tumorzellen = 2; 50-80% positive Tumorzellen = 3; >80% positive Tumorzellen = 4).

Aus Signalstärke und Anteil positiver Tumorzellen wurde dann ein Score durch Multiplikation beider Werte ermittelt, so daß ein Score zwischen 0 und 12 erreicht werden konnte.

#### 4.3 Patientenkollektiv und Methoden

#### 4.3.1 Informationsquelle und Datenbasis

In der Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf wurden im Zeitraum 1985 bis 2001 184 Patientinnen mit einem epithelialen Ovarialkarzinom primär operiert. Ein Teil der erhobenen Patientendaten geht auf Dr. med. Peter Röhlke und Dr. med. Christian Utler zurück und wurde von diesen zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt.

Die Stadieneinteilung erfolgte entsprechend der unter 2.1.5 aufgeführten FIGO-Klassifikation von 1997 und teilte sich wie Abbildungen 5 und 6 zeigen in folgende zusammengefasste Subgruppen auf.

Die Abbildungen zeigen zusätzlich noch die Einteilung des Kollektivs der Jahre 1985 bis 1995, auch als älteres Kollektiv bezeichnet, und die des Kollektivs der Jahre 1996 bis 2001, im weiteren als das jüngere Kollektiv bezeichnet.

Diese Unterteilung erfolgte, da hier zwei Kollektive zusammengefasst wurden, die sich jedoch hinsichtlich der Operationstechnik zumindest in den höheren Stadien von einander unterscheiden. Erst seit Mitte der 90er Jahre wird nach dem sogenannten AGO-Standard (Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie) operiert, der in Kapitel 2.1.7 bereits beschrieben wurde. In früheren Jahren wurden in der Regel keine Oberbaucheingriffe und keine

Lymphonodektomien durchgeführt. Dieses belegen auch die eingesehen Operationsberichte der untersuchten Patientinnen.

		1985-1995	1996-2001	Gesamt
	Median	57,8	60	59
Alter (Jahre)	Minimum	26	24	24
	Maximum	81	84	84
	FIGO I	5	14	19 (10,3%)
Tumorstadium	FIGO II	7	7	14 (7,6%)
Tumorstautum	FIGO III	33	65	98 (53,3%)
	FIGO IV	32	21	53 (28,8%)
	GI	11	12	23 (12,5%)
Grading	GII	26	28	54 (29,3%)
	GIII	40	67	107 (58,2%)
Aszitesmenge	< 500 ml	33	49	82 (44,6%)
Aszitesmenge	> 500 ml	44	58	102 (55,4%)
	R0	0	71	71 (38,6%)
Resektionsstatus	≥ R1	0	35	35 (19%)
	unbekannt	77	0	77 (42,4%)
	serös-papillär	55	90	145 (78,8%)
Histologischer	muzinös	10	8	18 (9,8%)
Тур	endometroid	6	4	10 (5,4%)
. 76	klarzellig	0	1	1 (0,5%)
	entdifferenziert	6	4	10 (5,4%)
Nachbe-	Median	3,2	2,2	2,7
obachtungszeit	Minimum	0,75	0,02	0,02
(Jahre)	Maximum	8	6,03	8

Tabelle 2: Patientinnen- und Tumorcharakteristik

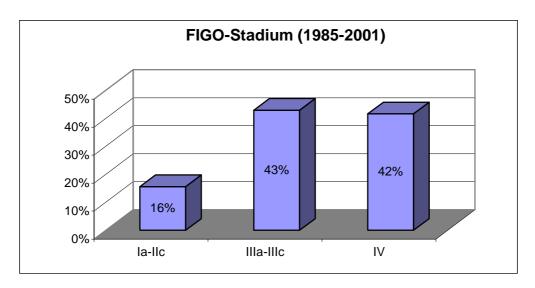


Abb. 5: Überblick über die FIGO-Stadien über den gesamten Zeitraum

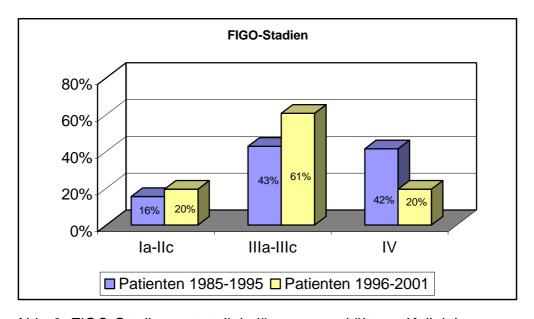


Abb. 6: FIGO-Stadien unterteilt in jüngeres und älteres Kollektiv

Die histologische Befundung und die Beurteilung des Malignitätsgrades erfolgte am Institut für Pathologie/Abteilung für Gynäkopathologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf.

Nichtepitheliale Malignome des Ovars und Borderline-Tumoren sind in diesem Kollektiv nicht berücksichtigt.

Die Patientinnen, bei denen keine Paraffinblöcke auffindbar waren (n=2) oder in den Blöcken kein oder nicht mehr ausreichend Tumorgewebe nachweisbar

war (n=23), sowie Patientinnen, deren Paraffinblöcke durch beispielsweise zu starke Nekrosen und Hämorraghien nicht sicher beurteilbar waren (n=5 [davon 3 Patientinnen mit Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie]), wurden nicht zur statistischen Auswertung herangezogen.

Bei der Operation wurde bei dem jüngeren Kollektiv nach der unter 2.1.7 beschriebenen Technik vorgegangen. Ziel war die vollständige Tumorentfernung beziehungsweise ein adäquates Staging. Zur Erreichung der möglichst kompletten Tumorresektion waren teilweise sehr radikale Operationen bis hin zum ausgedehnten Oberbaucheingriff mit zum Beispiel Lebersegmentresektion, Milz- und Pankreasschwanzresektion erforderlich. Stomata wurden wenn möglich im Hinblick auf die Lebensqualität vermieden. Darüber hinaus erfolgte die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie regelhaft, sofern dies der intraoperative Zustand der Patientin erlaubte.

Die Operationen wurden in der Regel interdisziplinär durch ein gleichbleibendes Team aus in der gynäkoonkologischen Op-Technik erfahrenen Gynäkologen, Abdominalchirurgen und Anästhesisten vorgenommen.

Das ältere Kollektiv wurde nicht nach der unter 2.1.7 beschriebenen standardisierten Technik operiert. Größere Oberbaucheingriffe und die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie wurden nicht durchgeführt, so daß bei diesem Kollektiv wesentlich seltener von einer makroskopischen postoperativen Tumorfreiheit auszugehen ist.

Postoperativ wurde in den frühen Stadien eine Chemotherapie individuell, gemäß den Empfehlungen einer interdisziplinären onkologischen Konferenz der Frauenklinik, in der jede Patientin vorgestellt wurde, angeschlossen. Diese Empfehlungen stehen weitgehend mit den unter 2.1.8 beschriebenen Ausführungen in Einklang.

In den Stadien III/IV wurde im Allgemeinen gemäß den Empfehlungen der AGO eine platinhaltige Therapie (Carboplatin oder Cisplatin) durchgeführt, sofern keine Kontraindikationen vorlagen.

Nach Abschluss der Primärtherapie wurde ein großer Teil der Patientinnen regelmäßig im Rahmen der Nachsorge in der Poliklinik der Frauenklinik gesehen. Die Nachsorge der übrigen Patientinnen wurde von niedergelassenen Kollegen übernommen. Ebenso wurden die meisten der Patientinnen mit Rezidiv kontinuierlich im Rahmen der palliativen Chemotherapie beziehungsweise supportiven Therapie tagesklinisch und stationär weiter betreut.

### 4.3.2 Beschreibung wichtiger Merkmale

In der vorliegenden Arbeit wurden 184 Patientinnen untersucht. Die 184 Patientinnen wurden zum besseren Verständnis in Bezug auf den postoperativ verbliebenen Tumorrest zwei Kollektive (älteres und jüngeres Kollektiv) unterteilt, da seit dem Jahr 1996 (Wechsel des Direktors der Frauenklinik) bei den fortgeschrittenen Stadien der Grundsatz makroskopische Tumorfreiheit durch radikale Tumorchirurgie (Oberbaucheingriff, Zwerchfelleingriff, wenn nötig Darmanastomosen ) gilt. In der statistischen Analyse wurde dies unter Einbeziehung des Zeitraums beachtet.

#### 4.3.2.1 Tumorstadium

Wie aus Abbildung 7 und Tabelle 3 hervorgeht, war der überwiegende Anteil der Patientinnen bei Diagnosestellung bzw. Operation bereits in einem fortgeschrittenen Stadium.

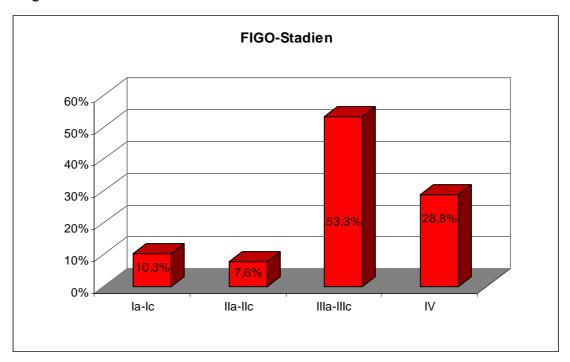


Abb. 7: Überblick über die Verteilung der Tumorstadien im Gesamtkollektiv (n=184)

Stadium	Anzahl Patientinnen	%
la bis Ic	19	10,3
Ila bis Ilc	14	7,6
IIIa bis IIIc	98	53,3
IV	53	28,8

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen in allen FIGO-Stadien (n=184)

Bei der statistischen Analyse wurden die Patientinnen der einzelnen FIGO-Stadien drei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Da relativ wenig Patientinnen die Tumorstadien I und II aufwiesen, wurden diese beiden Gruppen zu einer zusammengefaßt und gemeinsam ausgewertet. Dieses Vorgehen ist in der Literatur beschrieben und üblich, da auch in großen Kollektiven wenig Fälle mit weniger fortgeschrittenen Tumorstadien zu finden sind.

Die folgende Tabelle zeigt diese Gruppierung.

Stadium	Anzahl Patientinnen	%
la bis IIc	33	18
IIIa bis IIIc	98	53
IV	53	29

Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der Patientinnen in den gruppierten Tumorstadien (n=184)

# 4.3.2.2 Histologischer Typ

Der häufigste histologische Typ war der serös-papilläre. Dies spiegelt Abbildung 8 wieder. Der beurteilende Pathologe ist seit 1985 derselbe.

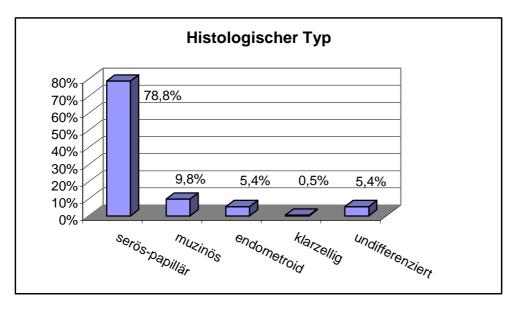


Abb. 8: Überblick über den histologischen Typen

Histologie	Anzahl Patientinnen	%
Serös-papillär	145	78,8
Muzinös	18	9,8
Endometroid	10	5,4
Klarzellig	1	0,5
undifferenziert	10	5,4

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der histologischen Typen (n=184)

Zur Auswertung des Kollektiv wurden die Karzinome vom muzinösen, endometroiden und klarzelligen Typ bei sowie die Gruppe der undifferenzierten und serös-papillären Ovarialkarzinome zusammengefasst (55).

# 4.3.2.3 Das histologische Grading

Der Blick auf die Häufigkeitsverteilung beim Differenzierungsgrad der Karzinome zeigt eine Zunahme vom gut differenzierten zum schlecht differenzierten Karzinom.

Dies zeigt die Abbildung 9.

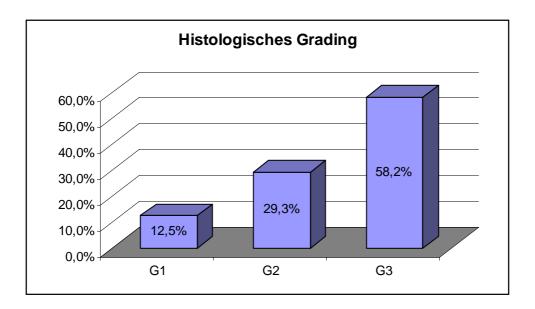


Abb. 9: Überblick über die prozentuale Verteilung der Gradings

Grading	Anzahl Patientinnen	%
G1	23	12,5
G2	54	29,3
G3	107	58,2

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung beim Grading (n=184)

### 4.3.2.4 Nachbeobachtungszeit

Die mediane Nachbeobachtungszeit liegt bei beim jüngeren Kollektiv bei 3,14 Jahren für die FIGO-Stadien I und II(Follow-up zwischen 0,39 Jahren (Minimum) und 6,03 Jahren (Maximum) und für die FIGO-Stadien III und IV liegt sie bei 1,75 Jahren (Follow-up zwischen 0,02 Jahren (Minimum) und 5,96 Jahren (Maximum). Das ältere Kollektiv wurde im Median 3,2 Jahre nachbeobachtet (Minimum 0,75 Jahre bis Maximum 8 Jahre).

	Kollektiv 1996-2001 FIGO I & II FIGO III & IV		Kollektiv (1985-1995)
			FIGO I - IV
Mediane Nachbeobachtungszeit	3,14 Jahre	1,75 Jahre	3,2 Jahre

Tabelle 7: Mediane Nachbeobachtungszeiten der Kollektive

#### 4.3.2.5 Alter

Das Alter aller Patientinnen bei Operation betrug im Median 59 Jahre mit einem Minimum bei 24 Jahren und einem Maximum von 84 Jahren.

	Alter der Patientinnen
Minimum	24
1. Quartil	50
Median	59
3. Quartil	67
Maximum	84

Tab. 8: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Primäroperation (n=184)

#### 4.3.3 Dokumentation und Datenverarbeitung

Zur genauen Datenerfassung standen Computermasken zur Verfügung mit deren Hilfe die patientenrelevanten Angaben über Operation, FIGO-Stadium, Histologie, postoperativem Verlauf, Chemotherapie und ähnliches erfasst wurden (OV.CA-Programm Version 5.0, Betriebssystem MS-DOS 5.0, Datenbanksystem Fax Pro 2.0 EXE, Programm D:/OVCA/PRG/OVCA; © 1996: Prochaska DP, Jänicke F., Kuhn W.)

Die Daten konnten durch die Patientenakten einschließlich Operations- und histopathologischem Befundbericht, durch die Nachsorgeakten der Poliklinik und durch den direkten telefonischen Kontakt mit den niedergelassenen Kollegen beziehungsweise mit den Patientinnen komplett erfasst werden, so dass ein Follow-up des Zeitraums 01.01.2002 bis 01.04.2002 für das jüngere Kollektiv und ein Follow-up über einen Zeitraum zwischen 9 bis 96 Monaten für das ältere Kollektiv vorliegt.

Um die Daten besser handhaben zu können wurden die Rohdaten aus dem OV.CA-Programm in eine Excel-Datenbank übertragen, von der aus die relevanten Daten in die Statistik-Software übertragen wurden.

Die statistischen Berechnungen wurden mittels SPSS 11.5 durchgeführt, während der vorliegende Bericht in WinWord erstellt ist.

Eine Liste aller Basis- und Rohdaten liegt in einem gesonderten Ausdruck vor und gibt die vollständige in der Datenbank enthaltene Information wieder.

#### 4.3.4 Überblick über die verwendeten Verfahren

Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurden –je nach Fragestellung- die folgenden Kennwerte angegeben:

 Bei Häufigkeitsdaten waren dies die absoluten und relativen Häufigkeiten (%-Werte)  Bei metrischen Daten waren dies das arithmetische Mittel, als Maß für die Variabilität die Standardabweichung, das Minimum und Maximum, die Fallzahl, sowie die Perzentile. Perzentile, zu denen auch der Median zählt, können als Eckpunkte einer Werteverteilung bezeichnet werden. Beispielsweise charakterisiert der Median den Wert, der die Stichprobe in der Mitte teilt.

### 4.3.5 Überblick über die verwendeten statistischen Testverfahren

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verwendeten statistischen Rechenverfahren. Ohne Ausnahme werden alle statistischen Tests rein explorativ eingesetzt. In sofern haben alle Befunde keinen "beweisenden" oder "konfirmativen" Charakter.

Test	Zielsetzung
Chi <sup>2</sup> -Test, Fisher-Yates- Test (53)	Prüfung von Unterschieden bei Häufigkeitsdaten (z.B. Prüfung, ob Unterschiede in Prozentwerten bestehen)
Wilcoxon-Test (53)	Vergleich und Bewertung von Unterschieden zweier Meßpunkte in Parametern, die stetige Daten enthalten
Regression nach Cox (54)	Multivariates Verfahren zur Prädiktion eines Risikos aus mehreren Parametern, wobei zeitliche Auftretenslatenzen berücksichtigt werden. Aus einer Liste von Parametern können prädiktive Parameter extrahiert werden.
Methode nach Kaplan und Meier (54)	Ein Verfahren zur Analyse von Latenzen eines Ereignisses (Tod, Progression) und Beschreibung des Ereignisverlaufes. Das Ereignis kann nur zusammen mit dem zeitlichen Aspekt (der Auftretenslatenz des Ereignisses) interpretiert werden.

Tabelle 9: Überblick über die explorativ verwendeten statistischen Verfahren

# 4.3.6 Hinweise zur statistischen Symbolik

Explorativ berechnete statistische Signifikanzen werden stets mittels sogenannter p-Werte<sup>1</sup> gekennzeichnet. Die folgende Tabelle zeigt einen Bewertungsmaßstab für die p-Werte.

Symbol	Irrtumswahr- scheinlichkeit	Bedeutung
n.s.	p > 0.05	nonsignifikanter Unterschied zwischen Gruppen
n.s.	p = 0.05 bis 0.10	nonsignifikanter Unterschied, die Signifikanz- schwelle wurde nur geringfügig verfehlt (insgesamt liefert dies einen starken Hinweis auf einen möglichen Unterschied, siehe SACHS 1992)
*	p ≤ 0.05	signifikanter Unterschied
**	p ≤ 0.01	hochsignifikanter Unterschied
***	p ≤ 0.001	hochsignifikanter Unterschied (gleiche Formulierung wie bei p≤0.01)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Das "p" steht für "probability". Der p-Wert bezieht sich auf eine Nullhypothese (z.B. "kein Zusammenhang" oder "kein Unterschied"). Diese vermutet man vorerst als wahr. Geringe p-Werte führen zur Ablehnung der Nullhypothese und machen eine Alternative ("signifikanter Zusammenhang", "signifikanter Unterschied") plausibel

Tabelle 10: Kennzeichnung der explorativen Signifikanzen

# 5. <u>Ergebnisse</u>

#### 5.1. Immunhistochemie

### 5.1.1 Retinoblastoma-Nachweis

Bei der Auswertung der Immunhistochemien zeigten sich zwei ungefähr gleich große Kollektive, wobei in der Gruppe Rb Score 0 bis 4 die Karzinome enthalten sind, die keine oder nur eine schwache Expression aufweisen und in der Gruppe Rb Score 6,8,9 und 12 die Karzinome enthalten sind, die eine starke bis sehr starke Expression haben. In nur einem Fall konnte die Rb-Expression nicht ermittelt werden.

Die Abbildung 10 und die Tabelle 11 zeigen diese Einteilung.

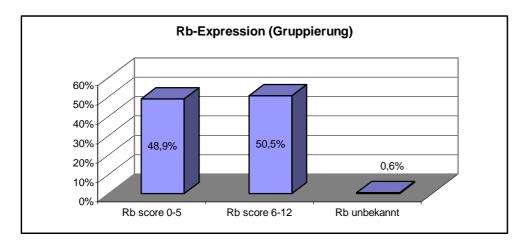


Abb. 10: Expression von Retinoblastom, gruppiert

Rb-Expression	Anzahl Patientinnen	%
0-4	90	48,9
6,8,9,12	93	50,5
unbekannt	1	0,6

Tab. 11: Häufigkeitsverteilung der Rb-Expression (Patientenkollektiv n=184; fehlend n=1)

Da die Abbildung 10 und Tabelle 11 zur besseren Auswertungsmöglichkeit das betrachtete Kollektiv bereits in zwei ungefähr gleich große Gruppen unterteilt hat, werden in Tabelle 12 und Abbildung 11 noch einmal die Basisdaten und die prozentuale Verteilung der einzelnen Gruppen getrennt für das ältere und das jüngere Kollektiv gezeigt.

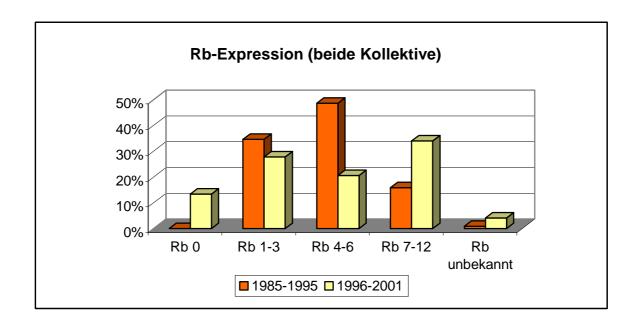


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Rb-Expression für beide Kollektive

Rb- Expression	Patientinnen (1996-2001)	% (1996-2001)	Patientinnen (1985-1995)	% (1985-1995)
0	0	0	13	16,8
1-3	37	34,58	27	35,1
4,6	52	48,60	20	26
8,9,12	17	15,88	17	22,1
unbekannt	1	0,90	0	0

Tab. 12: Patientenkollektiv für die Rb-Expression (n=184, fehlend n=1)

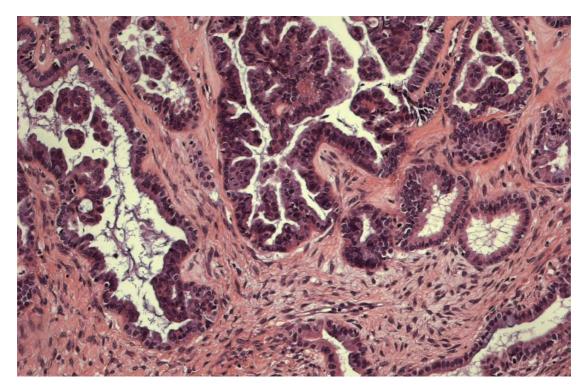


Abb. 12: Ovarialkarzinom mit Hämalaun-Eosin-Färbung, 100fache Vergrößerung

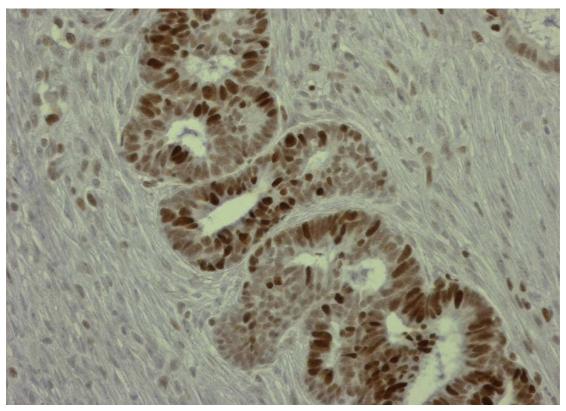


Abb. 13: Ovarialkarzinom mit Rb- Score 6 (Signalstärke 2, Tumoranteil 3), 200fache Vergrößerung

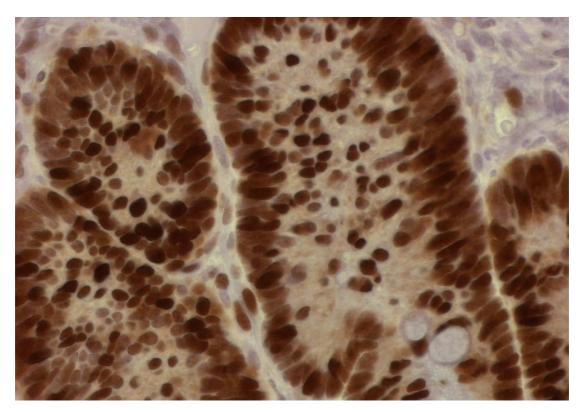


Abb. 14: Ovarialkarzinom mit Rb-Score 12 (Signalstärke 3, Tumoranteil > 80%), 400fache Vergrößerung

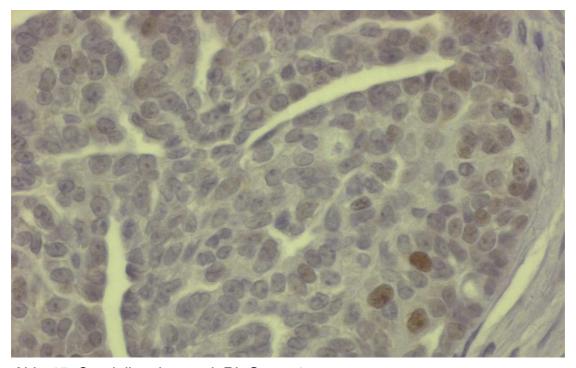


Abb. 15: Ovarialkarzinom mit Rb-Score 1 (Signalstärke 1, Tumoranteil < 20%), 400fache Vergrößerung

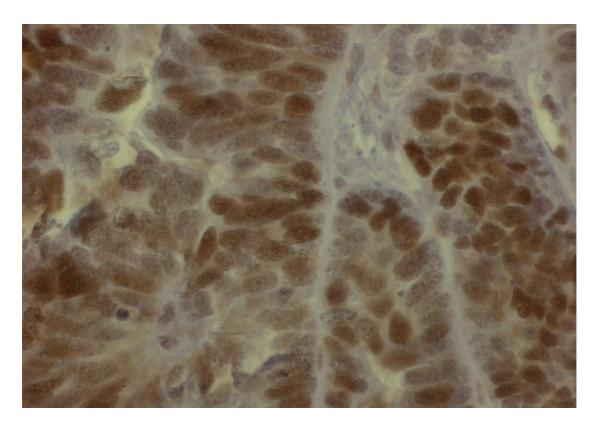


Abb. 16: Ovarialkarzinom mit Rb- Score 8 (Signalstärke 2, Tumoranteil > 80%), 400fache Vergrößerung

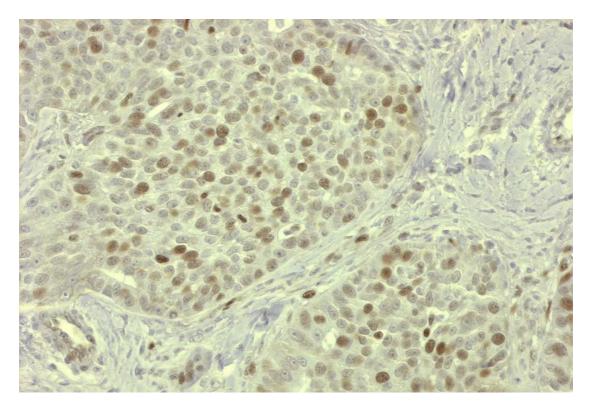


Abb. 17: Ovarialkarzinom mit Rb-Score 6 (Signalstärke 2, Tumoranteil 50-80%), 200fache Vergrößerung

## 5.1.2 p53-Expression

Abbildung 18 zeigt die Verteilung des Kollektivs hinsichtlich der p53-Expression. In 9 Fällen konnte kein p53-Nachweis erfolgen, da nicht mehr genügend Material für alle zu erfolgenden Färbungen vorlag mit Gewährleistung eines ausreichend hohen Tumoranteils im Paraffinblock. Bei der p53-Expression erschien es in Rücksprache mit dem Statistiker günstiger, drei Gruppen zu bilden, die annähernd gleich groß sind.

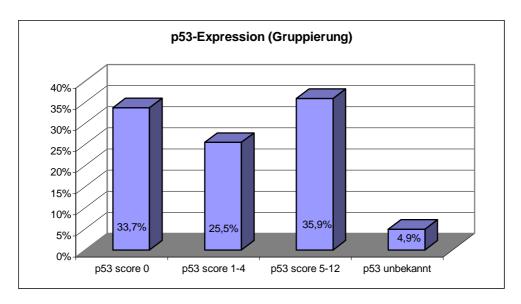


Abb. 18: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der p53-Expression

p53-Expression	Anzahl Patientinnen	%
0	62	33,7
1-4	47	25,5
6,8,9,12	66	35,9
unbekannt	9	4,9

Tab. 13: Häufigkeitsverteilung der Expressionsstärke von p53

In der Abbildung 19 und in der Tabelle 14 sind, wie bereits bei Rb, die einzelnen Gruppen aufgeführt, die jedoch zur statistischen Auswertung in die unter Abbildung 18 und Tabelle 13 benannte Gruppen zusammengefasst wurden.

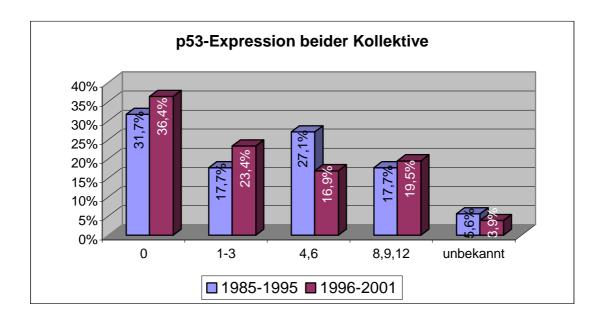


Abb. 19: Häufigkeitsverteilung des p53-Expression beider Kollektive

p53- Expression	Patientinnen (1985-1995)	% (1985-1995)	Patientinnen (1996-2001)	% (1996-2001)
0	28	36,4%	34	31,7%
1-3	18	23,4%	19	17,7%
4,6	13	16,9%	29	27,1%
8,9,12	15	19,5%	19	17,7%
unbekannt	3	3,9%	6	5,6%

Tab. 14: Verteilung der p53-Expression (n=184, fehlend n=9)

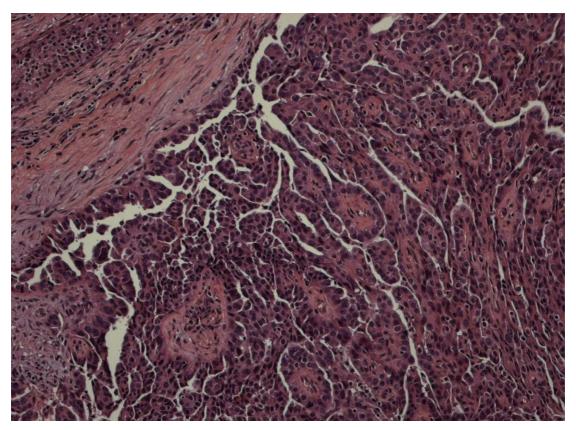


Abb. 20: Ovarialkarzinom mit Hämalaun-Eosin-Färbung, 100fache Vergrößerung

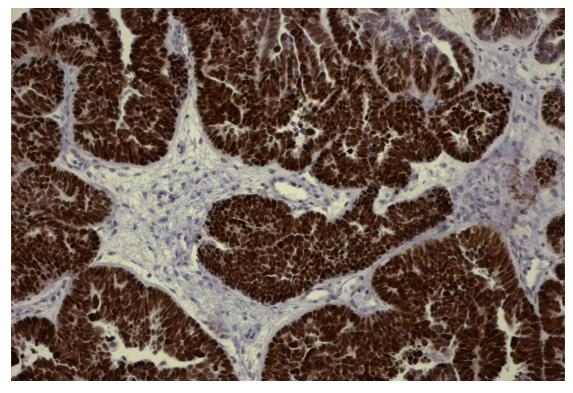


Abb. 21: Ovarialkarzinom mit p53-Score 12 (Signalstärke 12, Tumoranteil > 80%), 100fache Vergrößerung

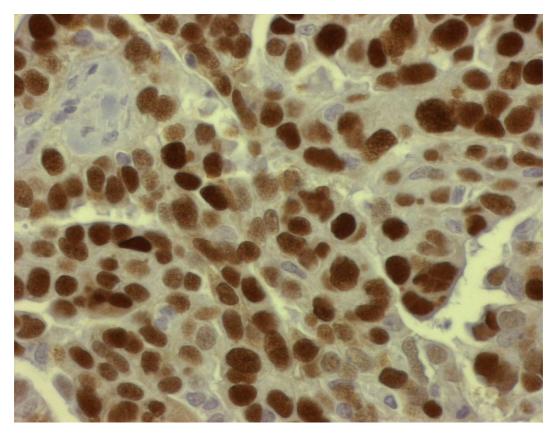


Abb. 22: Ovarialkarzinom mit p53-Score 9 (Signalstärke 3, Tumoranteil 50-80%), 400fache Vergrößerung

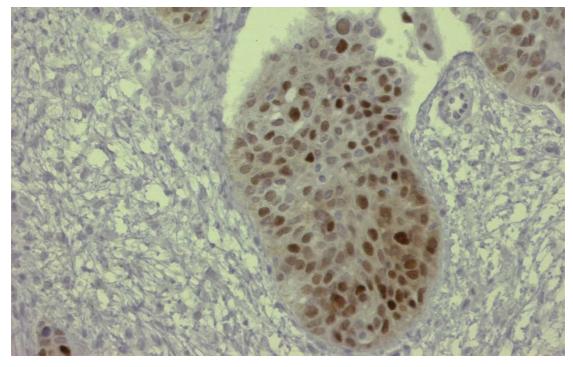


Abb. 23: Ovarialkarzinom mit p53-Score 6 (Signalstärke 2, Tumoranteil 50-80%), 200fache Vergrößerung

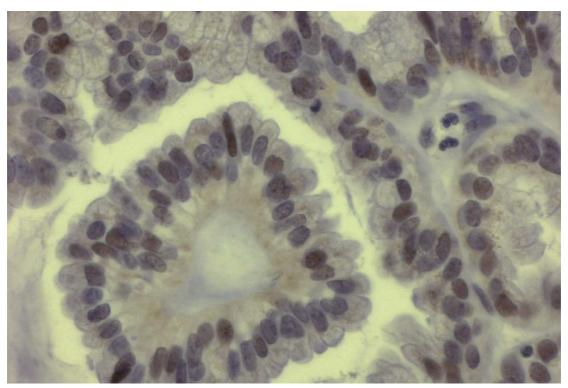


Abb. 24: Ovarialkarzinom mit p53-Score 1 (Signalstärke 1, Tumoranteil <20%), 400fache Vergrößerung

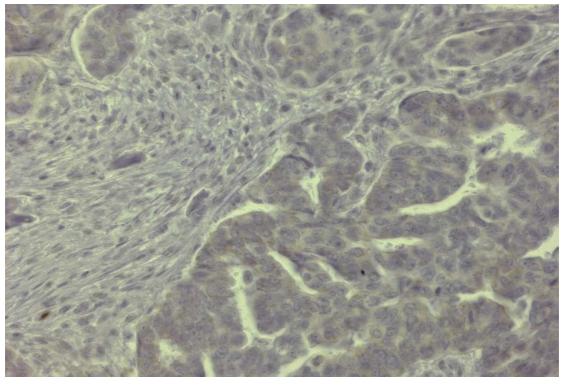


Abb. 25: Ovarialkarzinom mit p53-Score 0 (Signalstärke 0 )100fache Vergrößerung

# 5.2 Überleben

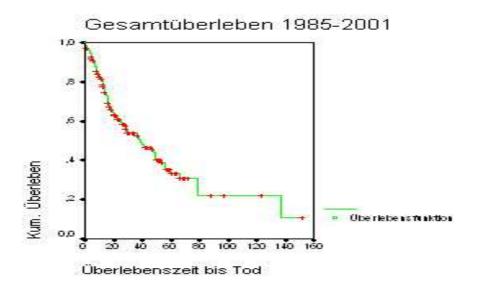


Abb. 26a: Überlebenskurve des Gesamtkollektivs (medianes Überleben 39 Monate)

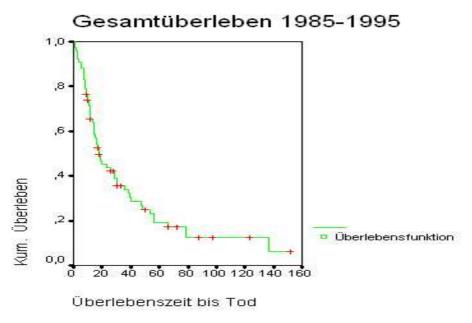


Abb. 26b: Überlebenskurve des älteren Kollektivs (medianes Überleben 18 Monate)

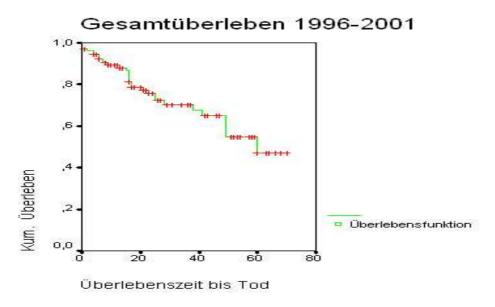


Abb. 26c: Überlebenskurve des jüngeren Kollektivs (medianes Überleben 60 Monate)

Überleben	Anzahl Patientinnen	%
Nein	95	48,4
Ja	89	51,6

Tab. 15: Prozentuale Verteilung bei der Frage nach dem Überleben

In die Auswertungen sind Daten früherer Erhebungen eingeflossen. So wurden die Überlebensdaten des älteren Kollektivs von Dr. P. Röhlke zur Verfügung gestellt, ein Teil der Daten des jüngeren Kollektivs wurden von Dr. Ch. Utler erhoben.

# 5.2.1 Einfluß von Rb auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Die Studienpopulation, die wegen eines Ovarialkarzinoms primär an der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf operiert wurden, besteht aus 184 Patientinnen des Zeitraums 1985 bis 2001.

Das Kollektiv, das im folgenden gemeinsam untersucht wird, besteht aus 77 Patientinnen, die in dem früheren Zeitraum, nämlich 1985 bis 1995, operiert

wurden, und 107 Patientinnen, die in dem späteren Zeitraum operativ behandelt wurden.

Nach der Beschreibung des Kollektivs für beide Zeiträume werden verschiedene Zusammenhänge zwischen den bei der Operation bestimmten, zeitunabhängigen Merkmalen beschrieben, um schließlich zu untersuchen, inwieweit der Rb-Score ein prognostischer Faktor für die verbleibende Lebenszeit nach Operation ist.

# 5.2.1.1 Beschreibung des Kollektivs in Abhängigkeit von Rb

Die Verteilung der Patientinnen in die Subgruppen Rb-score 1-5 und Rb-Score 6-12 ergab zwei fast gleich große Kollektive, in nur einem Fall konnte der Rb-Status nicht erhoben werden.

#### **5.2.1.1.1** Histologie

Die Patientinnen waren an Ovarialkarzinomen erkrankt, die sich histologisch in fünf verschiedene Subgruppen unterteilen ließen, wobei der Anteil der serös-papillären den größten Anteil ausmachte. Diese Gruppen wurde später mit der Gruppe der undifferenzierten Ovarialkarzinome zusammengefasst. Dabei wurde dieses Subkollektiv zwar noch größer, da aber die Prognose bei beiden Typen ähnlich ist, musste diese Zusammenfassung erfolgen. Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so lässt sich erkennen, daß in allen Gruppen die Verteilung in die schwächer und hoch überexprimierenden Karzinome gleich ist.

#### 5.2.1.1.2 Grading

Der größere Anteil der Patientinnen mit einer Überexpression von Rb fällt in die Gruppe der schlecht differenzierten Karzinome. Ein statistischer Zusammenhang wurde nicht belegt.

### 5.2.1.1.3 Tumorstadium

Das Tumorstadium FIGO IIIc ist am häufigsten diagnostiziert worden gefolgt vom fortgeschrittensten Stadium FIGO IV. In den früheren Stadien I und II sind die Kollektive bezogen auf den Rb-Status ungefähr gleich verteilt, bei dem späten Stadium FIGO IV sind mehr Patientinnen mit einer starken Überexpression anzutreffen.

Charakteristika	Histologie	Total	RB Score 1-4	RB Score 6,8,9,12	RB Score unbekannt
Alle Patientinnen		184	90	93	1
Zelltyp	serös-papillär	145	71	74	0
	muzinös	18	10	8	0
	endometroid	10	5	5	0
	klarzellig	1	0	1	0
	undifferenziert	10	4	5	1
Grading	(G I)	23	15	8	0
	(G II)	54	24	30	0
	(G III)	107	51	55	1
FIGO Stadium	la-lc	19	10	9	0
	Ila - Ilc	14	8	6	0
	IIIa - IIIc	98	52	45	1
	IV	53	20	33	0
Zeitraum	Kollektiv 1996-2001	107	55	51	1
	Kollektiv 1985-1995	77	35	42	0

Tabelle 16: Eigenschaften der Patienten nach RB score

#### 5.2.1.1.4 Alter

Alter (Jahre)	Median	Minimum	Maximum
Rb 1-4	58	24	84
Rb 6,8,9,12	60	25	82

Tabelle 17: Alter bei Operation nach RB

### 5.2.1.1.5 Der präoperative Wert des Tumormarker Ca 125

Die Höhe des Tumormarkers zum Zeitpunkt der Operation liegt im Median bei beiden Gruppen bei Werten größer oder gleich 500 kU/l.

CA 12-5 prä-op (iU/ml)	5 prä-op (iU/ml) Median		Maximum
Rb 1-4	500+*	16	500+*
Rb 6,8,9,12	500+*	10	500+*

<sup>\*=</sup>über 499 (Im früheren Zeitraum erfolgte bei höheren Werten keine genauere Eingabe in die Datenbank)

Tabelle 18: Vor Operation bestimmtes CA12-5 nach RB

### 5.2.1.1.6 Der postoperative Wert des Tumormarkers Ca 125

Der Tumormarker CA125, der einige Tage nach Operation bestimmt wurde, lag im Median bei 95 kU/l.

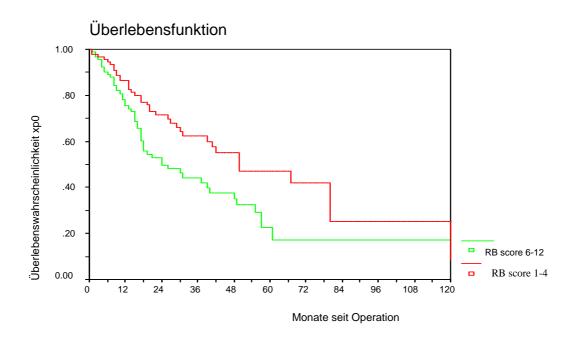
CA 12-5 post-op (iU/ml)	Median	Minimum	Maximum
Rb 1-4	84,6	0	500+*
Rb 6,8,9,12	107	0	500+*

<sup>\*=</sup>über 499 (Im früheren Zeitraum erfolgte bei höheren Werten keine genauere Eingabe in die Datenbank)

Tabelle 19: Nach Operation bestimmtes CA12-5 nach RB score (fehlend n=39)

### 5.2.1.1.7 Überlebenszeit

Die Abschätzung der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit nach KaplanMayer ergibt, dass Patientinnen mit einem RB-Score ≤ 4 eine höhere
verbleibende Lebenszeit nach Operation haben als solche mit einem RBScore, der über 6 liegt. Aus der Abbildung ergibt sich auch, daß für
Patientinnen, deren RB-Score ≤ 4 lag die Wahrscheinlichkeit nach der
Operation 60 Monate zu überleben bei 47% lag. Während dieselbe
Wahrscheinlichkeit für Patientinnen mit einem RB-Score über 6 bei 23% lag.
Das heißt, dass die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit der
Patientinnengruppe mit einem Rb-Score ≤ 4 doppelt so hoch ist im Vergleich
zu der Patientinnengruppe mit einem höheren Rb-Score.
Diese Unterschiede sind signifikant (p=0,0141).



Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit mittels Wilcoxon (Gehan) Methode (p(univariat)=0,0141; D.F. 6.024)

Abb. 27: Überlebenswahrscheinlichkeit nach RB-score (2 Gruppen) für alle Patientinnen

In dieser univariaten Analyse wurden jedoch andere bekannte prognostische Faktoren nicht berücksichtigt, so dass allein aus dieser Analyse Rb nur als prognostischer Faktor hervorgeht. Ob es sich bei Rb auch um einen

unabhängigen prognostischen Faktor handelt, wird anhand des COX-Modells gezeigt.

# 5.2.2 Der Einfluss der Rb-Expression bei gleichzeitiger Berücksichtigung bekannter Faktoren

Wie auch aus der folgenden Tabelle 20 hervorgeht, ist der Tumor bei allen Patientinnen mit FIGO-Stadium I & II ohne Rest entfernt worden. Im Weiteren geht daraus hervor, dass für Patientinnen des älteren Zeitraums der Resektionsstatus unbekannt ist.

		Kollektiv 1	1996-2001		Kollektiv 1985-1995
			Tumorre	est nach OP	
		tumorfrei	unbekannt		
	Stadium la-IIc	21	0	0	12
FIGO- Stadium	Stadium IIIa-IIIc	42	22	1	33
	Stadium IV	8	13	0	32
Gesamt		71	35	1	77

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen FIGO-Stadium, Resektionsstatus und Kalenderzeitraum

Um nun insbesondere dem Zusammenhang zwischen Kalenderzeit und dem Wissen über den Tumorrest und gleichzeitig demjenigen zwischen FIGO-Stadium und dem nach Operation verbliebenem Tumorrest, Rechnung zu tragen, ohne dabei das Patientenkollektiv zu stark zu reduzieren, wird für die folgende Untersuchung nur die Patientin aus dem jüngeren Zeitraum ausgeschlossen, von der nicht bekannt ist, welcher Tumorrest vorlag. Aus Tabelle 21 geht auch hervor, dass im jüngeren Zeitraum weniger Patientinnen dem Stadium IV zugeordnet worden als im älteren Zeitraum. Zudem wird auch ersichtlich, dass insbesondere wenige Patientinnen in Stadium IV nach OP tumorfrei waren.

Die Frage, inwieweit dem RB-Score prognostische Bedeutung bzgl. Überleben zukommt, wenn gleichzeitig auch bekannte prognostische

Faktoren berücksichtigt werden, wurde mittels Coxscher Regressionsanalyse untersucht. Bei der Modellierung wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass für den älteren Zeitraum der Resektionsstatus unbekannt ist und zudem bei FIGO-Stadien I-II der Tumor ohne Rest entfernt werden sollte.In Tabelle 26 ist dargestellt, dass für dieses Kollektiv auch der Rb-Score, aber insbesondere die Tumorfreiheit nach OP und das Wissen um die Tumorfreiheit für die Stadien III-IV prognostische Faktoren für die verbleibende Lebenszeit nach der Operation zu sein scheinen.

prognostischer	Dicikogruppo	Poforonzarunno	relatives	n Wort	95% Konfidenzintervall	
Faktor	Risikogruppe	ppe Referenzgruppe Risiko		p-Wert	Untere Grenze	Obere Grenze
Alter bei OP			1.00	0.797	0.98	1.02
Tumorrest	R1	R0	2.62	0.014	1.22	5.63
bei FIGO III-IV	R unbekannt	R0	3.65	0.000	1.85	7.21
FIGO-Stadium & Tumorrest	Stadium I-II & R0	Stadium III-IV & R0	0.14	0.066	0.02	1.14
	Stadium I-II & R unbekannt	Stadium III-IV & R0	1.17	0.766	0.42	3.20
Grade	G3	G1 – G2	0.88	0.618	0.54	1.44
Zelltyp	serös-papillär/ undifferenziert	muzinös/ endometroid/ klarzellig	1.63	0.214	0.76	3.50
CA12-5	500 und mehr	Unter 500	0.87	0.582	0.52	1.44
Rb	Score 6,8,9,12	Score 1-4	1.63	0.029	1.05	2.53

<sup>-2</sup>ln(LR)=719,98 bei 9 FG

Tabelle 21: Multivariate Regressionsanalyse (COX-Modell) der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit ab Operationsdatum für potentielle prognostische Faktoren (n=184)

# 5.2.3 Einfluß des p53-Nachweises auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

#### 5.2.3.1 Beschreibung des Kollektivs in Abhängigkeit vom p53-Score

Betrachtet man den p53-Nachweis aller Patientinnen, so wird ersichtlich, daß deutlich mehr Patientinnen eine schwächere Expression aufweisen. Bei 9 Patientinnen konnte kein p53-Expressionsstatus erhoben werden, da hier kein ausreichendes Material zur Verfügung stand.

### **5.2.3.1.1 Histologie**

Die histologische Zuordnung zum Ovarialkarzinomtypus entspricht der unter 5.2.2 erwähnten, da diese unabhängig vom Expressionstyp ist.

Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so lässt sich erkennen, daß in allen Gruppen – mit Ausnahme der Karzinome vom undifferenzierten Typ - die

Verteilung zugunsten der schwächer exprimierenden p53-Gruppe ausfällt.

#### 5.2.3.1.2 Grading

Beim Grading ist wiederum nur die Gruppe der schlecht differenzierten Karzinome fast gleich auf beide p53-Kolektive verteilt, bei den höher differenzierten Karzinomen fallen jeweils deutlich mehr Patientinnen in die Gruppe der schwächer p53-exprimierenden Karzinome.

### 5.2.3.1.3 Tumorstadium

In allen Tumorstadien finden sich mehr Patientinnen in der Gruppe mit den niedrigeren P53-Scores.

Betrachtet man den Zeitraum, dann sind wiederum in beiden Kollektiven, d.h. im Älteren und Jüngeren, in der schwächer exprimierenden Gruppe mehr Patientinnen anzutreffen.

Auch bei der Frage nach einem Rezidiv, erleiden mehr Frauen mit einem niedrigen p53-Score ein Rezidiv als mit einem hohen p53-Score. Aber auch in

der Gruppen der Frauen, die kein Rezidiv erleiden, finden sich mehr Frauen mit einer schwächeren Expression als mit einer stärkeren.

Charakteristika	Histologie	Total	p53 Score 0,1-4	p53 Score 6,8,9,12	p53 Score unbekannt
Alle Patientinnen		184	109	66	9
Zelltyp	serös-papillär	145	81	57	7
	muzinös	18	15	1	2
	endometroid	10	9	1	0
	klarzellig	1	1	0	0
	undifferenziert	10	3	7	0
Grading	(G I)	23	18	3	2
	(G II)	54	42	10	2
	(G III)	107	49	53	5
FIGO Stadium	la-lc	19	17	2	0
	Ila - IIc	14	9	5	0
	Illa - Illc	98	51	39	8
	IV	53	32	20	1
Zeitraum	Kollektiv 1996- 2001	107	62	39	6
	Kollektiv 1985- 1995	77	47	27	3
Rezidiv	ja	81	50	26	5
	nein	103	63	36	4

Tabelle 22: Eigenschaften der Patienten nach P53-Score

#### 5.2.3.1.4 Alter

Blickt man auf die Gruppe, die einen negativen bis schwachen p53-Score enthält, dann liegt das Alter im Median bei 56 Jahren und damit unter dem Alter von 62 Jahren in der p53-Gruppe mit höherem Score.

Tabelle 23 stellt diese Angaben noch einmal etwas genauer dar.

Alter	Median	Minimum	Maximum	p-Wert
p53 0-4	56	24	83	0,014
p53 6,8,9,12	62	37	84	0,014

Tabelle 23: Alter bei Operation nach p53-Score (p=0,014 mit Wilcoxons Test für unabh. Stichproben)

## 5.2.3.1.5 Der präoperative Tumormarkerwert CA 125

CA 12-5 prä-op (iU/ml)	Median	Minimum	Maximum	p-Wert
p53 0-4	315	10	20880	0,426
p53 6,8,9,12	503	10	22617	0.426

Tabelle 24: Vor Operation bestimmtes CA125 nach p53-Score (p=0,426 mit Wilcoxon Test)

# 5.2.3.1.6 Der postoperative Tumormarkerwert CA 125

CA 12-5 post-op (iU/ml)	Median	Minimum	Maximum	p-Wert
p53 0-4	68	0	5969	0,709
p53 6,8,9,12	88,8	0	8596	0,709

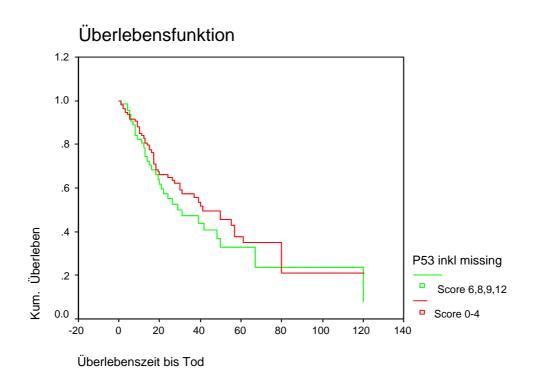
Tabelle 25: Nach Operation bestimmtes CA125 nach p53-Score (p=0,709 nach Wilcoxon Test)

### 5.2.3.1.7 Überlebenszeit

Die Abbildung 28 suggeriert nun, dass Patientinnen mit einem p53-Score zwischen 0 und 4 eine höhere verbleibende Lebenszeit nach Operation haben als solche mit einem p53-Score, der über 4 liegt.

Allerdings können diese Unterschiede bei Vorgabe einer Wahrscheinlichkeit von 5% für den Fehler 1. Art nicht mit dem Wilcoxon-Test nachgewiesen werden (p=0,35).

Bei dieser Untersuchung wurden auch keine anderen prognostischen Faktoren berücksichtigt.



Comparison of survival experience using the Wilcoxon (Gehan) statistic (p=0.3475; D.F. 0.882)

Abb. 28: Überlebenswahrscheinlichkeit nach p53-score für alle Patientinnen

# 5.2.4 Der Einfluss von p53 bei gleichzeitiger Berücksichtigung bekannter Faktoren

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit der p53-Score ein prognostischer Faktor für die verbleibende Lebenszeit nach der Operation ist, wenn gleichzeitig auch bekannte prognostische Faktoren berücksichtigt werden, wurde wie bei der Auswertung des Rb-Scores ein sogenanntes Cox-Modell benutzt.

Aus Tabelle 26 ergibt sich dann, dass für dieses Kollektiv nur auf den ersten Blick der p53-Score diesen Prognosefaktor darstellt. Das relative Risiko liegt zwar bei 1,11; dieser Wert erreicht aber keine Signifikanz (P=0,686). Auch hier sind aber wieder die Tumorfreiheit nach OP und das Wissen um die Tumorfreiheit für die Stadien III-IV im Sinne von prognostischen Faktoren für die verbleibende Lebenszeit nach der Operation entscheidend.

prognostischer Faktor	Risikogruppe	Referenzgruppe	relatives Risiko	p-Wert	95% Konfidenz- intervall	
		rtororon <b>zg</b> rappo			untere Grenze	obere Grenze
Alter bei OP			1.00	0.808	0.98	1.02
Tumorrest bei	R1	R0	2.41	0.029	1.09	5.29
FIGO III-IV	R unbekannt	R0	3.59	0.000	1.82	7.06
FIGO-Stadium & Tumorrest	Stadium I-II & R0	Stadium III-IV & R0	0.15	0.066	0.02	1.14
	Stadium I-II & R unbekannt	Stadium III-IV & R0	1.19	0.738	0.43	3.24
Grade	G3	G1-G2	0.91	0.718	0.54	1.53
Zelltyp	serös-papillär/ undifferenziert	muzinös/ endometroid/ klarzellig	1.51	0.322	0.67	3.41
CA12-5	500 und mehr	unter 500	0.92	0.749	0.55	1.54
p53	p53 Score 6,8,9,12	Score 0-4	1.11	0.686	0.68	1.79

<sup>-2</sup>ln(LR)=677,52 bei 9 FG

Tabelle 26: Multivariate Regressionsanalyse (COX-Modell) der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit ab Operationsdatum für potentielle prognostische Faktoren (n=175)

Dies zeigt neben Tabelle 26 auch die Tabelle 27.

		Kollektiv 1	1996-2001	Kollektiv 1985-1995	
		Tumorrest nach OP			
		tumorfrei	nicht tumorfrei	unbekannt	
EICO Stadium	Stadium la-IIc	0,15		1,19	
FIGO Stadium	Stadium III-IV	1,00	2,41	3,59	

Tabelle 27: Geschätzte relative Risiken für FIGO-Stadium, Resektionsstatus und Kalenderzeitraum (wenn alle anderen Faktoren gleich sind)

#### 6. <u>Diskussion</u>

# 6.1 Betrachtung allgemeiner Merkmale des Kollektivs

#### 6.1.1 Alter

Das Ovarialkarzinom ist bei Frauen das fünfthäufigste Malignom und nimmt unter den Todesursachen bei Frauen, die an einem gynäkologischen Karzinom erkrankt sind, den ersten Platz ein. Der überwiegende Teil (mehr als 90%) der primären Ovarialkarzinome entsteht aus epithelialen Zellen und bei den meisten Patientinnen wird die Erkrankung erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 61,9 Jahren und liegt damit etwas über dem Erkrankungsalter unseres Kollektivs(medianes Erkrankungsalter ermittelt an Alter zum Zeitpunkt der Operation 59 Jahre). Möglicherweise ist daher bei unserem Kollektiv die Komorbidität als etwas geringer einzuschätzen als die Komorbidität der Kollektive im Literaturvergleich. Letztlich kann jedoch dieser recht kleine Altersunterschied nicht verantwortlich gemacht werden für die deutlich besseren Überlebensraten und die hohe Wahrscheinlichkeit, auch in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eine makroskopische Tumorfreiheit zu erreichen (56).

#### 6.1.2 Überleben

Entsprechend der Entdeckung in den späten Stadien ist auch die mittlere Überlebenszeit sehr gering. Sie liegt, wiederum nach Angaben des Tumorregisters München, bei 2,4 Jahren für alle Stadien. Die Überlebensrate unseres Kollektivs liegt nach einer medianen Beobachtungszeit von 3,5 Jahren bei knapp 52%. Damit haben unsere Patientinnen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit als andere Kollektive. Ein wesentlicher Faktor ist hierbei sicherlich die in den späteren Jahren zunehmend erreichte postoperative Tumorfreiheit (57-59).

#### 6.1.3 Tumorstadium

Von den 184 Patientinnen, die an der Frauenklinik des UKE primär therapiert wurden, befanden sich knapp über 80% in einem bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadium.

Bei mehr als 50% wurde ein Tumorstadium FIGO III diagnostiziert, bei fast 30% das fortgeschrittenste Stadium FIGO IV. Das prognostisch günstigste Stadium, FIGO I, wurde lediglich bei ungefähr 10% gefunden, bei weniger als 8% konnte ein FIGO Stadium II festgestellt werden.

Vergleicht man diese Zahlen nun mit denen der Literatur, so findet sich in unserem Kollektiv eine Verschiebung zu den höheren Stadien um je circa 10 Prozentpunkte, bei Stadium II zeigen sich kaum Unterschiede und das Stadium I lässt sich in allgemeinen Krebsregistern in fast 30% d. F. nachweisen (60).

Diese Verschiebung zu den höheren Stadien ist möglicherweise dadurch erklärt, dass frühere Stadien häufiger Zufallsbefunde darstellen, die in ambulant in Praxiskliniken durchgeführten Operationen aufgrund beispielsweise einer refraktären Ovarialzyste inzidentiell gefunden werden und die dadurch seltener in unsere Klinik kommen, da die Frauenklinik des UKE eine Schwerpunktklinik darstellt, in der eher ausgedehnte, gut geplante Operationen aufgrund verschiedener weiblicher Malignome gemacht werden.

# 6.1.4 Histologischer Typ

In unserem Kollektiv ist der am häufigsten vorkommende Typ das seröspapilläre Karzinom mit über 75% der Fälle und damit häufiger als in der Literatur beschrieben. Dennoch ist auch in anderen Kollektiven dieser histologische Typ immer der dominierende, so dass hier eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen untersuchten Kollektive gegeben ist. Das Ovarialkarzinom vom muzinösen Typ fanden wir ebenfalls in knapp 10% d.F., etwas weniger häufig als in der Literatur beschrieben fanden wir den endometroiden Typ (5,4% vs. 10%), was sich aber bei einer Betrachtung des kompletten Hamburger Kollektivs möglicherweise wieder relativieren würde und in unserem Fall keine Rolle spielt, da auch eine Population mit einem

Anteil von 10% bei der uns vorliegenden Patientenzahl ebenso ungeeignet zur Einzelgruppenanalyse wäre wie die in dieser Arbeit verwendete. Die restlichen Typen liegen dahingegen wieder im Bereich der Angaben aus der Literatur (61).

	Serös	Muzinös	Endometroid	Klarzellig	Undifferenziert
UKE	78,8%	9,8%	5,4%	0,5%	5,4%
1	40-50%	10-15%	10-15%	2-6%	5-10%
2	52,5%	7%	8,5%	1,2%	3,1%

- 1 aus Praxis der gynäkologischen Onkologie, Thieme Verlag,
  - 2. Auflage 2000, S. 225
- aus Tumormanual Maligne Ovarialtumoren, W. Zuckschwerdt Verlag,
   6. Auflage 2001, S. 5

Tabelle 28 : Häufigkeitsverteilung der histologischen Typen im Vergleich

#### 6.1.5 Grading

Fast zwei Drittel der untersuchten Patientinnen hatten einen schlecht beziehungsweise entdifferenzierten Tumor, das sogenannte Grading 3. Auch die anderen Zahlen zum gut und mäßig differenziertem Tumor sind nahezu identisch mit denen des Tumorregisters der Stadt München (60).

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv entspricht überwiegend den Daten, die sich bei Recherchen in den Krebsregistern verschiedener Bundesländer (Krebsregister des Land Saarland und Bayern) finden.

So bieten anhand dieser Patientinnen gefundene Ergebnisse die Möglichkeit, diese Daten auch auf andere Kollektive zu übertragen und Rückschlüsse auf Prognose und Verlauf der Erkrankung zu ziehen.

## 6.2 Betrachtung der ermittelten unabhängigen Prognosefaktoren

#### 6.2.1 Die Bedeutung der makroskopischen Tumorfreiheit

Das hier untersuchte Kollektiv wies eine recht gleichmäßige Verteilung in die Gruppe der nicht bis schwach Rb-exprimierenden Karzinome und in die stark exprimierende Gruppe auf. Diese Verteilung zeigte sich bei genauerer

Betrachtung bei allen Erkrankungsstadien und unabhängig vom Zelltyp gleichermaßen.

Die Analyse mittels des Cox Modells lässt erkennen, dass eine starke Rb-Expression mit einem erhöhten relativen Risiko (1,63) für die Patientinnen für die verbleibende Lebenszeit nach Operation im Vergleich zum Kollektiv mit schwacher bis nicht vorhandener Rb-Expression einhergeht. Dieser Unterschied ist signifikant (p=0,029). Bei weiterer Betrachtung stellt sich die Frage des Resektionsstatus als erheblicher prognostischer Faktor dar. Die postoperativ erzielte makroskopische Tumorfreiheit zeigt sich als signifikanter Überlebensvorteil für die Patientinnen, während Patientinnen mit einem verbliebenen Tumorrest im Vergleich zur tumorfrei operierten Gruppe ein relatives Risiko von 2,62 haben früher zu versterben. Dies Unterschied ist signifikant (p=0,014). Vergleicht man die vollständig resezierten Patientinnen mit den Patientinnen, deren Resektionsstatus unbekannt ist bzw. die zu einem Zeitpunkt operiert wurden, als Operationsmethodik und die Frage des Tumorrestes noch nicht genauer definiert bzw. die Notwendigkeit dazu noch ungeklärt war, dann zeigt sich hierbei noch ein deutlicherer Vorteil für die tumorfrei operierten Frauen. Dieser Unterschied ist dazu noch hochsignifikant (relatives Risiko 3,65; p=0,000).

prognostischer Faktor	Referenzgruppe	Vergleichsgruppe	relatives Risiko	p-Wert
Tumorrest	R0	R1	2.62	0.014
bei FIGO III-IV	R0	unbekannt	3.65	0.000
Rb	Score 1-4	Score 6,8,9,12	1.63	0.029

Tabelle 29 : Signifikante prognostische Faktoren im Cox-Modell (siehe auch Kapitel 5.2.3)

Dieser Unterschied ist besonders interessant, da viele in der Literatur untersuchte Kollektive über einen unbekannten oder ungenau definierten Resektionsstatus verfügen. So sind oft Patientinnen als optimal operiert eingestuft, obwohl der verbliebene Tumorrest nur kleiner als 1 cm war. So definieren in einer Umfrage von Eisenkop und Spiritos von 640 befragten

Gynäkologen nur 12,5% die makroskopische Tumorfreiheit als optimal wohingegen 60,8% ein Operationsergebnis mit einem Tumorrest kleiner als 1 cm als optimal (62;63).

Die Bedeutung des maximalen Zytoreduktion im Vergleich zu anderen prognostischen Faktoren konnte in der Arbeit von Utler sehr deutlich belegt werden. Wird eine makroskopische Tumorfreiheit in 58% erreicht, so liegt die mediane Überlebenszeit bei 48 Monaten in dem von Utler und Osterholz untersuchten Kollektiv während Kohorten mit einem optimalen Operationsergebnis in lediglich 25% der Fälle nur eine mediane Überlebenszeit von 23 Monaten haben (64).

In Zahlen ausgedrückt bedeutet eine Steigerung der Rate der makroskopisch tumorfrei operierten Patientinnen um 10% mindestens einen Anstieg von 5,5% im medianen Überleben (65;66).

Alle anderen untersuchten Faktoren (Tumorstadium im Kombination mit dem Resektionsstatus; Grading und Zelltyp sowie prä- und postoperativer Tumormarker CA 125) zeigten in dieser Untersuchung zwar Unterschiede, diese waren allerdings nicht signifikant, so dass auf eine weitere Erörterung verzichtet werden soll.

#### 6.2.2 Der Rb-Nachweis

## 6.2.2.1 Die Bedeutung von Rb

In unserer Kohorte zeigen sich daher nach dem Cox-Modell zur Untersuchung von proportionalen Risiken der Resektionsstatus sowie die Rb-Expression als statistisch signifikante Prognosefaktoren. Auch an diesem Kollektiv konnte erneut gezeigt werden, dass der postoperative Rest entscheidende Bedeutung für die Überlebenszeit der Patientinnen hat. Die Frage stellt sich nun nach der Bedeutung der Rb-Expression für die Gesamtprognose der Patientinnen. Es gibt bisher sehr wenige Veröffentlichungen, in denen Ovarialkarzinome auf die Expression von Retinoblastoma-Protein untersucht wurden.

In einer Arbeit von 2003 konnte Tachibana et al. den Rb-Status als prognostischen Faktor (p=0,0072) zeigen. Bei Untersuchung der Rb-Expression im multivariaten Cox-Modell konnte die Expression jedoch nicht

als unabhängiger Prognosefaktor dargestellt werden, so dass in dieser Arbeit der Rb-Status letztlich nicht als zusätzlicher Faktor zu Aussagen über das Überleben von Patientinnen herangezogen werden konnte (67).

	Univariate	Relatives	Multivariate	Relatives
	Analyse	Risiko	Analyse	Risiko
Rb-Status	0,0072	1,419	ns	-

Tabelle 30: Regressionsanalyse nach Cox, Tachibana (67)

Tachibana und seine Arbeitsgruppe untersuchten 73 primäre

Ovarialkarzinome mittels Immunhistochemie. Die Auswertung der

Immunhistochemien in der Tachibana-Kohorte unterschied sich jedoch, da

Tachibana lediglich in drei verschiedene Expressionsgruppen unterteilte, die
nur den Anteil der positiven Tumorzellen berücksichtigten und nicht die Stärke
des Signals.

Die Patientinnengruppe mit einer starken Rb-Expression wies in der univariaten Analyse nach Cox eine schlechtere Prognose auf als die Patientinnen mit einer schwachen Expression. So hatten Patientinnen mit einer starken Rb-Expression die kumulative Wahrscheinlichkeit des 5-Jahresüberlebens von 23,08% und die mit einer sehr schwachen Expression eine 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 52,38%. Dieses Ergebnis entspricht fast dem Ergebnis unserer Untersuchung (schwache Expression 5-JELZ-Wahrscheinlichkeit 47%; starke Expression 5-JELZ-Wahrscheinlichkeit 23%). Warum jedoch in der Arbeit von Tachibana der Rb-Status keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, bleibt zu mutmaßen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das gewählte Kollektiv noch zu klein gewesen ist, um zu einem aussagefähigen Ergebnis zu kommen. Eine andere Erklärung ist in der Verwendung verschiedene Antikörper zu suchen, da diese zu jeweils unterschiedlichen Ergebnissen führen können und dass der in dieser Arbeit gewählte nicht der Optimale war. Da in dieser Arbeit mit einem einzigen Antikörper gegen Rb gearbeitet wurde, können hier nur Vermutungen über Ergebnisse mittels anderer Antikörper angestellt werden. Auch im Hinblick darauf, dass in Bezug auf das Ovarialkarzinom und seine

Expression von Rb noch nicht allzu viele Daten und Erfahrungsberichte vorliegen, erscheint dies als ein recht wahrscheinlicher Erklärungsansatz. Die Arbeitsgruppe um Milde-Langosch untersuchte ein Kollektiv, das 77 Patientinnen umfasste. Hierbei fanden sich ähnliche Ergebnisse wie in unserer Untersuchung. Zu bedenken ist bei diesem Vergleich jedoch, dass ein Teil des Kollektivs von Milde-Langosch in diese Arbeit miteingeflossen ist. In dieser Arbeit stellte sich die Rb-Überexpression als unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres Gesamtüberleben heraus (p= 0,006) (68). Da die Methodik der Auswertung und auch der verwendetete Antikörper gegen Retinoblastom-Protein in beiden Untersuchungen gleich waren, lassen sich beide Arbeiten gut miteinander vergleichen. Das von Milde-Langosch untersuchte Kollektiv war noch nicht nach den Leitlinien der AGO Ovarialkarzinom operiert worden, so dass hier weder eine vereinheitlichte Operation noch ein optimales Operationsergebnis vorlag. Das hier untersuchte Kollektiv war in den späteren Jahren jedoch leitliniengerecht und in der Regel optimal operiert worden. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind daher umso interessanter, als dass die Rb-Expression trotz verbesserter Op-Technik ein starker Prognosesfaktor bleibt.

# 6.2.2.2 Mögliche Erklärungen für den Rb-Nachweis

Ein möglicher Erklärungsansatz für die offensichtlich paradoxen Ergebnisse, nämlich die häufig stärkere Expression von Zell-Zyklus-Inhibitoren in malignen Tumoren als in normalen Zellen, ist die Tatsache, dass derartige Proteine häufig eine längere Halbwertszeit haben und daher schlichtweg akkumulieren. Dies hat Ruas et al. in einer Untersuchung über p16 und seine Verwandten dargelegt (69).

Der Zusammenhang zwischen Rb-Expression und kürzerem Überleben ist überraschend und erscheint widersprüchlich. Eine verminderte Rb-Expression hervorgerufen durch Mutation, Deletion oder Neuanordnung von Genen liegt in vielen malignen Erkrankungen vor, so z.B. beim Retinoblastom, in einigen Sarkomen, und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. In anderen Tumorerkrankungen findet sich eine Inaktivierung von Rb-Protein durch Komplexbildung mit viralen Onkoproteinen (z.B. humanes Papilloma-Virus-

Protein E7 im Zervixkarzinom) oder durch verstärkte Phosphorylierung nach Überexpression von Zyklinen oder zyklin-abhängigen Kinasen (70;71). Andere Studien wiederum sprechen von einer möglichen Abhängigkeit zwischen Tumortyp und Rb. So führte z.B. die Abwesenheit vom Rb-Gen im Maus-Modell nicht zu einer verstärkten Ausbildung von Mamma-Karzinomen und auch die Rb-Überexpression führte nicht zu einer Blockierung des Zellzyklus (72;73).

Vielmehr ging mit einer erhöhten Expression von Rb in Non-Hodgkin Lymphomen und Nierenzellkarzinomen eine schlechtere Prognose einher wie die Arbeitsgruppen um Haitel und Korkolopoulou darstellten (74;75). Welche Bedeutung ist nun der Überexpression von Rb zuzuweisen? Der häufige Verlust des Rb-Allels in Ovarialkarzinomen ist bereits mehrfach berichtet worden (76-78) und der Funktionsverlust des RB geht häufig mit einer schlechte Prognose bei verschiedenen Karzinomerkrankungen einher. So in der Arbeit von Cote et al. eine schwache Rb-Expression negativ assoziiert mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufs bei Ovarialkarzinom. Interessanterweise war auch in einigen Fällen eine erhöhte Rb-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert (79). Auch in unserer Arbeit, sowie auch in der Arbeit von Tachibana, zeigte sich,

Auch in unserer Arbeit, sowie auch in der Arbeit von Tachibana, zeigte sich dass eine Überexpression von Rb mit der schlechtesten Prognose für den Krankheitsverlauf der Patientinnen einherging.

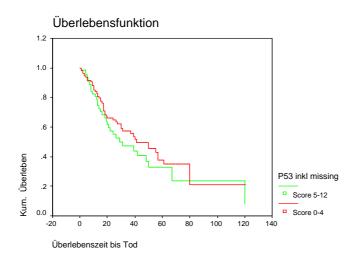
Der Zusammenhang zwischen verstärkter Rb-Expression und Prognose ist bis heute nicht geklärt, es gibt jedoch mehrere Erklärungsansätze für dieses Ergebnis. Phoshoryliertes Rb entlässt E2F und stimuliert so die DNA-Synthese und Tumorgenese, während nicht phosphoryliertes Rb Tumorsuppressor-Effekte durch Inhibierung der DNA-Synthese aufweist und den Transkriptionsfaktor E2F sequestriert. Das überexprimierte Rb mag nun wiederum eine hyperphosphorylierte Form darstellen, die wiederum den sequestrierten Transkriptionsfaktor E2F entlässt und so die DNA-Synthese initiiert. Hyperphoshporyliertes Rb konnte wiederum z.B. in Fällen von akuter myeloischer Leukämie mit schlechter Prognose in der Arbeitsgruppe um Kornblau nachgewiesen werden (80).

#### 6.2.3 Der p53-Nachweis

# 6.2.3.1 Die Bedeutung von p53

Zur Auswertung des Kollektivs wurden zwei Gruppen gebildet, von der die erste Gruppe knapp 6/10 umfasste, die zweite den Rest. Nach Aufsplittung der Gruppen in das ältere und neuere Kollektiv zeigte sich auch hier ähnlich der Rb-Gruppe eine zeitraumunabhängige gleichmäßige Verteilung der p53-Expression, so dass beide Gruppen zusammen auswertbar waren.

Betrachtet man das Kollektiv nun zunächst in der Analyse nach Wilcoxon, so erscheint sich eine bessere Überlebensprognose für die Gruppe der schwächer exprimierenden Karzinome zu ergeben. Bei Betrachtung der Signifikanz, muss dieser Unterschied jedoch in Frage gestellt werden, da sich bei dieser Untersuchung keine Signifikanz ergab.



Comparison of survival experience using the Wilcoxon (Gehan) statistic (p=0.3475; D.F. 0.882)

Abb. 29 : Überlebenswahrscheinlichkeit nach p53-score für alle Patientinnen

Auch die Untersuchung des p53-Scores bezüglich des relativen Risikos bei stärkerer p53-Expression früher zu versterben in der multivariaten Analyse nach Cox erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Der Trend lässt jedoch vermuten, dass Patientinnen mit einer höheren p53-Expression früher versterben. Um diese Frage genauer beantworten zu können, müsste eine längere Nachbeobachtungszeit erreicht werden oder die Zahl der Patientinnen erhöht werden.

Aber auch hier zeigte sich ein optimales Operationsergebnis als entscheidender prognostischer Faktor für die höheren Tumorstadien, der umso stärker wiegt, wenn er mit einem unbekannten Resektionsstatus verglichen wird.

prognostischer Faktor	Referenzgruppe	Vergleichsgruppe	relatives Risiko	p-Wert
Tumorrest bei	R0	R1	2.41	0.029
FIGO III-IV	R0	unbekannt	3.59	0.000
p53	Score 0-4	Score 6,8,9,12	1.11	0.686

Tabelle 31: Signifikante prognostische Faktoren im Cox-Modell (siehe auch Kap. 5.3.3)

Die Bedeutung des p53-scores wird in der Literatur sehr unterschiedlich bewertet. Mehrere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der Bedeutung von p53 im Ovarialkarzinom beschäftigt. Für einige Arbeitsgruppen stellt die p53-Expression einen eindeutigen prognostischen Faktor dar, andere widerlegen diese Theorie. Auf diese Arbeiten soll im Folgenden eingegangen werden. Veränderungen von p53 werden in ca. 50% aller Ovarialkarzinome entdeckt, je nach Art der Studie werden in 26-62% aller untersuchten Ovarialkarzinome Mutationen und gefunden. Expression Einige Autoren größerer Untersuchungen weisen in der univariaten Analyse eine Korrelation zwischen p53-Expression und kürzerem Überleben nach, gleichzeitig kann aber selten in der multivariaten Analyse dieser Zusammenhang bestätigt werden. (81-83).

p53	Univariate Analyse p-Wert	Relatives Risiko	Multivariate Analyse p-Wert	Relatives Risiko
Eltabbakh et al	0,0498	na	0,16	-
Hartmann et al	0,04	na	ns	-
Levesque et al	0,06	-	0,72	-
Klemi et al	0,002	na	0,008	1,8
Tachibana et al	0,00021	1,395	0,0108	1,322

Tabelle 32: Uni- und multivariate Analyse der p53-Expression in der Literatur

Hartmann, der mit 284 untersuchten Ovarialkarzinomen eines der größten Kollektive besitzt, stellt jedoch die Vermutung an, dass die Untersuchung in den frühen Erkrankungsstadien auf eine p53-Expression einen Hinweis auf das Rezidivrisiko geben kann, da in seiner univariaten Analyse die p53-Positivität mit einer verminderten Gesamtüberleben einherging (p=0,04 für Tumostadium III und IV). In der multivariaten Analyse konnte p53 aber nicht als unabhängiger Faktor nachgewiesen werden. Nur Klemi et al. sowie die Gruppe um Tachibana (67) konnten eine statistische Signifikanz für diese Fragestellung nachweisen. Klemi et al untersuchten ein Kollektiv von 136 Patientinnen, von denen 44% eine p53-Expression aufwiesen. Seine Arbeitsgruppe fand eine klare Assoziation mit dem serösen Typ (p=0,0006) und mit dem Differenzierungsgrad (p=0,04), hingegen nicht mit dem Tumorstadium. In der multivariaten Analyse fand sich eine Korrelation zwischen schlechter Prognose und p53-Expression (RR of death 1,8, 95% CI-Intervall, 1,2-2,9; p=0,008)(84).

Tachibana untersuchte ein recht kleines Kollektiv mit 73 Patientinnen, in der sich sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse der p53-Status als unabhängiger prognostischer Faktor erwies. Beachtenswert ist hierbei jedoch, dass Tachibana et al. insgesamt fünf verschiedene Antikörper gegen p53 verwendeten, von denen nur einer in der multivariaten Analyse als unabhängiger und signifikanter Antikörper übrig blieb.

Zu bedenken ist weiterhin, dass man statistisch gesehen bei wiederholter Betrachtung desselben Problems ein signifikantes Ergebnis rein zufällig erhalten kann und so ein Stichprobenfehler entsteht. Hier wäre die sogenannte Bonferronikorrektur von Nutzen, die letzlich eine Division des p53-Wertes durch die Anzahl der Versuche bzw. eine Multiplikation des pWertes mit der Anzahl (in diesem Fall die verschiedenen Antikörper) vornimmt. Der p-Wert wäre damit deutlich über 0,05 und ein signifikantes Ergebnis damit nicht mehr zu erhalten.

p53-Ak	Univariate Analyse p-Wert	Relatives Risiko	Multivariate Analyse p-Wert	Relatives Risiko
DO-1(α11-25m)	0,00021	1,395	0,0108	1,322
Fab1801 (α32-79m)	ns	-	-	-
DO-7(α19-26m)	0,0269	1,391	ns	-
RSP53-12 (α54-69 P)	ns	-	-	-
Bp53-12(αfull m)	0,0154	1,416	ns	-

Tabelle 33: Regressionsanalyse nach Cox; Tachibana (67)

Die Arbeitsgruppen um Marks, Herod, Niwa und Kohler konnten dagegen bereits in der univariaten Analyse keine Korrelation nachweisen. Allerdings wurden hier jeweils deutlich kleinere Kollektive mit Patientinnenzahlen zwischen 52 (Minimum) und 107 (Maximum) untersucht (Mittelwert 74) und es ist anzumerken, dass die Gruppe um Marks Gewebe 38 ihrer 107 ausgewerteten Fälle während der Second-look-Operation bzw. der zweiten zytoreduktiven Operation entnahmen. Kohler et al haben mit 52 Fällen die kleinste Gruppe ausgewertet, hierbei handelte es sich jedoch ausschließlich um frühe Tumorstadien. Bedenkenswert ist jedoch gerade in diesem Fall die relativ kurze Nachbeobachtungszeit von 3 Jahren, da die frühen Stadien eine deutlich bessere Prognose haben (85-88).

Die Arbeitsgruppen um Eltabbakh, Geisler, Hartmann, Klemi und Niwa haben noch nach einem Zusammenhang von p53-Status zu Tumorstadium, Grading und Histologie erfragt, wobei eine Korrelation nachgewiesen wurde (81;82;84;87;89).

Unsere Analyse hat sich zwar nicht direkt mit dieser Fragestellung befasst, sieht man sich jedoch einmal die prozentuale Verteilung der beiden p53-Kollektive bei Tumorstadium und Grading an, so lässt sich ein zunehmend höherer Prozentanteil von stärker exprimierenden Ovarialkarzinomen in den hohen Tumorstadien und beim Grading finden (FIGO I: 10% p53-Score 5-12; FIGO II: 28%; FIGO III: 39%; FIGO IV: 37%; Grading I: 13% p53-Score 5-12; Grading II: 18%; Grading III: 49%). Da in dem von uns untersuchten Kollektiv der überwiegende Teil der Ovarialkarzinome vom serös-papilären Typ ist, erschien hier eine nähere Betrachtung in Hinblick auf die verschiedenen histologischen Typen nicht sinnvoll, da die restlichen Fallzahlen zu klein sind, um eine aussagekräftige Analyse durchführen zu können.

Eine Untersuchung von 1994 der Arbeitsgruppe um Reles, in der 126 epitheliale Ovarialkarzinome untersucht wurden, kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Hier fand sich in ¼ der Karzinome eine p53-Expression, die mit fortgeschrittenem Stadium und schlechter Differenzierung korrelierte (90). Ebenso wie in meiner Untersuchung fand sich hier eine mäßige, jedoch nicht signifikant verkürzte Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass im Vergleich zu der Anzahl von p53-Mutationen der Prozentsatz der immunhistochemisch nachweisbaren Proteinexpression in ihrem und möglicherweise auch in meinem Kollektiv geringer ist. Mutationen im p53-Gen haben sich jedoch in anderen Arbeiten (91) als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben gezeigt.

# 6.2.3.2 Mögliche Erklärungen für den p53-Nachweis

Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Teil der p53-Mutationen in Ovarialkarzinomen sogenannte "Missense"-Mutationen sind, in Folge derer eine Aminosäure durch eine andere ersetzt wird, was zu einer Strukturalteration und Akkumulation des p53-Proteins führt (92-95). Es sind jedoch nur 80 Prozent so genannte "Missense"-Mutationen "Nonsense"-Mutationen, die zum Auftreten eines Stop-Codons oder eines "frame-shift" führen, können nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden, da das

Protein entweder fehlt, als Bruchstück vorhanden oder instabil ist und daher keine verlängerte Halbwertszeit hat. Darüberhinaus führen nicht alle Punktmutationen zu einer Alteration des Proteins (96). Als weitere gründe sind zu nennen, dass es durch die Formalin-Fixierung zu einem Verlust der Antigenität im Gewebe kommen kann und dass die verwendeten Antikörper nur mit einem bestimmten Epitop des Proteins reagieren (97).

## 6.2.3.3 Möglicher klinischer Nutzen dieser Ergebnisse

Der klinische Wert aus der p53-Überexpression als prognostischer Faktor bleibt weiterhin unklar. Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sind ebenfalls schwer zu erklären. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Verwendung verschiedener Antikörper gegen p53. Eine Übersichtsarbeit von Kmet wies auf, dass die Prävalenz der p53-Expression auch von der Verwendung bestimmter Antikörper bestimmt wird. Hier lagen die Unterschiede zwischen 30% bis hin zu 50% in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper (98).Auch mögen Enzyme und Mikrowellenvorbehandlung des Gewebes die Färbeergebnisse erheblich beeinflussen genauso wie die Verfahren zur Fixation des Gewebes. Möglicherweise beeinflusst auch die Art der Behandlung die Wertigkeit von p53 als prognostischen Faktor. So ist das hier untersuchte Kollektiv groß (184 Patientinnen), jedoch beeinflusst die optimale Chirurgie, d.h. die möglichst vollständige Entfernung aller sichtbaren Tumormassen (siehe auch Kapitel 2.2.7), das Überleben sehr stark. Daher beinhaltet es relativ wenige Todesfälle (Ereignisse), deren Anzahl für eine statistische Beurteilung sehr erheblich werden kann.

Da aber einige Studien die Wertigkeit von p53 als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom, beim Bronchialkarzinom und beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen haben, besteht weiterhin die Möglichkeit, in erneuten Analysen diese Wertigkeit auch für das Ovarialkarzinom zu belegen oder endgültig zu entkräften.

Ein möglicher Ansatz in der Nutzung des Wissens um p53 besteht im Ansatz der Gentherapie, auch wenn diese nach wie vor experimentellen Charakter haben. Methodische Basis ist der zielgerichtete Transfer von

makromolekularen Erbinformationsträgern in somatische Zellen. geschieht mit dem Ziel, entweder einen Gendefekt zu korrigieren (Neo-Gene) oder die Zielzelle abzutöten (Suizid-Gene). Dieser- auch Transfektion genannte Einschlussvorgang von Fremdgenen erfolgt gekoppelt an sogenannte Vektoren, wofür vor allem Retroviren eingesetzt werden. Noch ungelöste Probleme des Gentransfers sind die geringe Transfektionseffizienz (nur etwa 10% der Zielzellen werden duch Retroviren erreicht) und die So die fehlende Zellspezifität. besteht u.a. Gefahr, dass repliaktionskompetente Viren unkontrolliert in den Organismus gelangen, wodurch u.a. maligne Lymphome induziert werden können.

Die gentherapeutischen Konzepte im onkologischen Bereich basieren auf dem Versuch, in die Steuerung der für die Kanzerogenese verantworlichen Gene einzugreifen. Einer der derzeit beschriebenen Wege ist das Einfügen eines Wildtyp-Tumorsuppressor-Gens. Ein geeignetes Target ist das p53-Gen, von dem bei mehr als 50% aller soliden Tumoren Missense-Mutationen vorkommen. Dies geht einher mit einer verminderten Zytostatikawirkung, dementsprechend konnte gezeigt werden, dass durch einen p53-Wildtyptransfer in Kombination mit einer Carboplatin- oder Paclitaxeltherapie synergistische Effekte zu erzielen sind (99).

Weitere Studien sollten folgen, um diesem Effekt weiter nachgehen zu können.

## 7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit versuchte zu klären, ob eine gezielte Untersuchung der Expression von p53-Protein und Retinoblastom-Protein als prognostischer Faktor bei der Erkrankung an einem Ovarialkarzinom verwendet werden kann. Beide Gene spielen bei der Tumorentstehung auf unterschiedliche Weise eine Rolle. Mehrere Arbeiten haben sich bis heute mit der Bedeutung der p53-Status im Ovarialkarzinom beschäftigt, hingegen liegen so gut wie keine Arbeiten vor, die der prognostischen Bedeutung der Rb-Expression nachgegangen sind.

Für die Auswertung wurde das formalin-fixierte und in Paraffin gebettete Gewebe von 184 Patientinnen, die an einem epithelialen Ovarialkarzinom erkrankt waren, immunhistochemisch auf die Expression von p53- und Rb-Protein untersucht und mittels eines Scores bestehend aus Signalstärke und Anteil positiver Tumorzellen ausgewertet. Die Ergebnisse wurden danach auf die Nachbeobachtung dieser Patientinnen bezogen. In dieser Arbeit konnte die Bedeutung des Rb-Status als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde die Bedeutung der maximalen Zytoreduktion während der Operation eindrücklich dargelegt. Dieser Faktor ist in meiner Analyse noch vor dem Rb-Status entscheidend für das Überleben der erkrankten Frauen.

Die Bedeutung des p53 als Prognosefaktor bleibt weiterhin unklar. Durch diese Arbeit konnte dargestellt werden, dass die p53-Proteinexpression mit einem Trend zu kürzeren Überlebenszeiten assoziiert ist. Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch nicht erreicht. Auch in dieser Analyse ist für die Prognose der Patientinnen der Resektionsstatus post operationem entscheiden.

Weitere Untersuchungen sollten erfolgen, um zum einen die Wertigkeit von p53 endgültig darlegen zu können, zum anderen erscheint eine genauere Beschäftigung mit Rb lohnenswert, um diesen neuen Prognosefaktor bei der Therapie des Ovarialkarzinoms etablieren zu können. Hierzu könnte beispielsweise eine Analyse eines optimal und standardisiert operiertem Kollektivs mit langen Follow-up dienen.

#### 8. <u>Literaturverzeichnis</u>

- Beel R, Petticrew M, Sheldon T (1998): The performance of screening tests for ovarian cancer: results of a systematic review.
   British Journal of Obstetrics and Gynaecology 105: 1136-1147
- (2) Brun J L, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C (2000): Longterm results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecologic Oncology 78 (1): 21-27
- (3) Meier W (1997): Sinnvoller Einsatz der Tumormarker beim Ovarialkarzinom.Gynäkologe 30: 133-140
- (4) Bristow R E, Rafael S, Tomacruz D K et al. (2002): Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma during the Platinum Era. Journal of clinical Oncology 20 (5): 1248-1259
- (5) Utler C (2003): Die operative Therapie des Ovarialkarzinoms: Ergebnisse der Frauenklinik der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf von 1996 bis 2001; Dissertationsschrift. Medizinische Fakultät der Universität Hamburg
- (6) Gu W, Schneider J W, Condorelli G, Kaushal S, Mahdavi B, Nadal Ginard (1993): Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. Cell 72; 309
- (7) Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenberry D, Korsmeyer P, White E (1992): The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the W1B 19-kDa and Bcl-2 proteins.

  Proceedings of the National Academy of Science USA 89, 7742
- (8) White E, Cipriani R, Sabbatini P, Denton A (1991): Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins.

  Journal of Virology. 65, 2968
- (9) Wagener C (1996): Einführung in die molekulare Onkologie. Thieme Verlag: 97
- (10) Hamel P A, Gallie B L, Philips R A (1992): The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. Trends. Gent. 8; 180
- (11) Bookstein R, Shew J Y, Chen P L, Scully P, Lee W H (1990): Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene.

  Science 247; 712

- (12) Sumegi J, Uzvolgyi E, Klein G (1990): Expression of the Rb gene under the control of MuLV-LTR suppresses tumorigenicity of WERI-Rb-27 retinoblastoma cells in immunodefective mice. Cell Growth and Differentiation 1; 247
- (13) Goodrich D W, Wang N P, Qian Y W, Lee E Y, Lee W H (1991); The retinoblastoma product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. Cell 67: 293
- Qin X Q, Chittenden T, Livingston D M, Kaelin W G J (1992):
   Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product.
   Genes. Dev. 6; 953
- (15) Soussi T, Legros Y, Lubin R, ory K, Schlichtholz B (1994): Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review.

  International Journal of Cancer 57;1
- (16) Greenblatt M S, Bennett W P, Hollstein M, Harris C C (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 54; 4855
- (17) Harris C C, Hollstein M (1993): Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene.New England Journal of Medicine 329; 1318
- (18) Finlay C A, Hinds P W, Levine A J (1989): The protooncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57; 1083
- (19) Martinez J, Georgoff I, Levine A J (1991): Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. Genes. Dev. 5; 151
- (20) Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1990): Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature sensible mutant of p53. Cell 62; 671
- (21) Bischoff F Z, Strong L C, Yim S O, Pratt D R, Siciliano M J, Giovanella B C, Tainsky M A (1991): Tumorigenic transformation of spantoneously immortalized fibroblasts from patients with a familiar cancer syndrome. Oncogene 6; 183

- (22) Bischoff F Z, Strong L C, Yim S O, Pratt D R, Siciliano M J, Giovanella B C, Tainsky M A (1990): Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization.

  Cancer Research 50;7979
- (23) Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig R W (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.
  Cancer Research 51; 6304
- (24) Maltzman W, Czyzyk L (1984): UV irridation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. Molecular Cell Biology 4; 1689
- (25) RKI (2000): Krebskrankheiten. Robert-Koch-Institut: htttp://www.rki.de, Berlin 2000
- (26) Statistisches Bundesamt Fachserie 12 (Gesundheitswesen) (1997), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Dtl. Metzler Poeschel, Stuttgart
- (27) Statistisches Bundesamt Fachserie 12 (Gesundheitswesen) (1998), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Dtl. Metzler Poeschel, Stuttgart
- (28) Engel J, Schmidt M, Schubert-Fritschle G, Tretter W, Hölzel D (2000): Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Kerbsregisters am Tumorzentrum München-Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York
- (29) Eeles RA. (2000): Future possibilities in the prevention of breast cancer: intervention strategies in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Breast Cancer Research 2:283-290
- (30) Rodrigez C., Patel A.V., Calle E.E et al.: Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. JAMA 2001; 285: 1460-1465
- (31) Holschneider C H, Berek J S (2000): Ovarian Cancer: epidemiology, biology, and prognostic factor. Seminar of Surgical Oncology 19(1):3-10
- (32) Scully R E, Sobin L H (1999): World Health Organization (WHO). International histological classification of tumours. Histological typing of ovarian tumours. Springer, Berlin Heidelberg
- (33) Scully R E, Young R H, Clement Ph B (1998): Atlas of tumor pathology: Tumors of ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament.

  AFIP, Washington D.C.

- (34) Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg S G (1998): Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: Testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up.

  Cancer 82:893-901
- (35) Mayr D, Diebold J (2000): Grading of ovarian carcinomas. International Journal of Gynecologic Pathology 19:348-353
- (36) Dettmar P., Diebold J., Mayr D., Nathrath W.: Histologische Klassifikation. Manual Tumorzentrum München, Maligne Ovarialtumoren 2001: 16-20.
  W. Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York
- (37) Tekay A, Joupilla P (1996): Controversies in assessment of ovarian tumors with transvaginal color Doppler ultrasound.

  Acta of Obstetrics and Gynecology in Scandinavia 75(4): 316-29
- (38) Schelling M., de Waal J.C.: Präoperative Diagnostik, Diagnosesicherung. Manual Tumorzentrum München, Maligne Ovarialtumoren 2001: 14-15.
  W. Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York
- (39) Bell R., Petticrew M., Sheldon T.: The performance of screening tests for ovarian cancer: results of a systematic review.
   British journal of Obstertics and Gynecology 1998; 105: 1136-1147
- (40) Hacker N F, Berek J S, Lagasse L D, Nieberg R K, Elashoff R M (1983): primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. Obstetrics and Gynecology 61: 413-420
- (41) Hoskins W J, Bundy B N, Thigpen J T, Omura G A (1992): The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epeithelial cancer: A Gynecologic oncology Group Study. Gynecologic Oncoolgy 47:159-166
- (42) Kuhn W, Jänicke F, Pache L, Hölscher M, Schattemann G, Schmalfeldt B, Anderl H, Schüle G, Dettmar P, Siewert J R, Graeff H (1993): Entwicklungen in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms FIGO III.
  Geburtshilfe und Frauenheilkunde 53:293-302
- (43) Scarabelli C, Gallo A, Franceschi S, Campagnutta E, De Piero G, Giorda G, Visentin M C, Carbone A (2000): Primary cytoreductive surgery with rectosigmoid colon resection for patients with advanced epithelial ovarian carcinoma.

  Cancer 88: 389-397

- (44) Benedetti-Pancini P, Landoni F, Scarabelli C, Winter R, Maggioni A, Ackermann S, Favalli G, Monaghan J M, Grassi R, Greggi S, Amoroso M, Giannarelli D, Torri V, Mangioni C, Hacker N (1999): Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy (SAPL) vs resection of any bulky nodes (RBN) only for optimally debulked advanced ovarian cancer (AOC): preliminary report from an international randomized trial. Seventh Biennal Meeting of the international Gynecologic cancer society September 26-30, Rome Italy.
  International Journal of Gynecologgic Cancer 9 (suppl 1): A 132 und persönliche Mitteilung
- (45) Kuhn W, Florack G, Roder J, Schmalfeldt B, Pache L, Rust M, Ulm K, Späthe K, Jänicke F, Siewert J R, Graeff H (1998): The influence of upper abdominal surgery on perioperative morbidity and mortality in patients with advanced ovarian cancer FIGO III and FIGO IV. Internatinal Journal of Gynecologic Cancer 8: 56-63
- (46) Schneider A., Köhler C., Possover M., Diebolder H.: Operative Therapie des Ovarialkarzinoms.
   Gynäkologische Praxis 2002; Heft 2:293-304
- (47) Meta-analysis Group (2000): Chemotherapy for advanced ovarian cancer. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. Cochrane Database Systemic Review 2: CD001418
- (48) McGuire W P, Hoskins W J, Brady M F, Kucera P R, Partridge E E, Look K Y, Clarke-Pearson D L, Davidson M (1996): Cyclophosphamide and Cisplatin compared with Paclitaxel and Cisplatin I patients with stage III and stage IV ovarian cancer. New England Journal of Medicine 334: 1-6
- (49) Du Bois A, Neijt JP, Thigpen J T (1999): First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer- a new standard of care?

  Annuals in Oncology 10 (suppl 1): 35-41
- (50) Piccart M J, Du Bois A, Gore M E, Neijt J P, Pecorelli S, Pujade-Laura E (2000): A new standard of care for treatment in ovarian cancer. Europian Journal of Cancer 36(1):10-2
- (51) Deppe G, Baumann P (2000): Advances in ovarian cancer chemotherapy.Current Opinion in Oncololgy 12:481-491
- (52) Vergote I B, Trimbos B J, Vermorken J (2001): Results of a randomized trial in 923 patients with high-risk early ovarian cancer, comparing adjuvant chemotherapy with no further treatment following surgery. Procedings ASCO 20:802

- (53) Bortz J (2004): Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. Springer Verlag, Berlin
- (54) Bull K, Spiegelhalter D (1997): Tutorial in Biostatistics Survival Analysis in Observational Studies. Statistic in Medicine 16: 1041-1074
- (55) Friedrich M, Felberbaum R, Tauchert S, Diedrich K (2004): Manual Gynäkologische Onkoligie.
  Springer Verlag, Berlin
- (56) Kuhn W (Herausgeber): Maligne Ovarialtumoren-Tumormanual des Tumorzentrums München: S. 5.
   W. Zuckschwerdt Verlag München; 6. Auflage 2001
- (57) Utler C (2003): Die operative Therapie des Ovarialkarzinoms: Ergebnisse der Frauenklinik der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf von 1996 bis 2001; Dissertationsschrift. Medizinische Fakultät der Universität Hamburg
- (58) Osterholz T, Utler C, Thomssen C, Jänicke F (2002): Ergebnisse der Radikaloperation bei Ovarialkarzinom.
   118. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Hamburg
- (59) Osterholz T, Utler C, Thomssen C, Jänicke F (2002): Ergebnisse der Radikaloperation bei Ovarialkarzinom.
   54. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in Düsseldorf
- (60) Engel J, Schmidt M, Schubert-Fritschle G, Tretter W et al:
  Jahresbericht 1999 des klinisch epidemiologischen Krebsregisters am
  Tumorzentrum München-Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. W.
  Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York
- (61) Chen L M, Berek J S (2004): Diagnosis and staging of ovarian cancer.Review.Up To Date online 12.1: S. 4
- (62) Eisenkop S M, Spirtos N M (2001): What are the current surgical objectives, strategies and technical capabilities of gynecologic oncologists treating advanced epithelial ovarian cancer? Gynecologic oncology 82: 489-497
- (63) Spirtos N M, Gross G M, Freddo J L et al. (1995): Cytoreductive surgery in advanced epithelial cancer of the ovary: The impact of aortic and pelvic lymphadenectomy. Gynecologic Oncology 56: 345-352

- (64) Utler C, Osterholz T, Thomssen C, Jänicke F (2003): Complete Cytoreductive Surgery but Not Aggressive Tumor Biology is the Strongest Prognostic Factor in Advanced Ovarian Cancer: An Analysis of 99 Patients. ASCO Program Proceedings Book
- (65) Kuhn W, Rutke S, Späthe K et al. (2001): Neoadjuvant chemotherapy followed by tumordebulking prolongs survival for patients with poor prognosis in international federation of gynecology and obstetrics stage IIIc ovarian carcinoma.

  Cancer 92: 2585-2591
- (66) Bristow R E, Rafael S, Tomacruz D K et al. (2002): Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: A meta-analysis. Journal of clinical oncology 20, 5 (March 1): 1248-12559
- (67) Tachibana M, Watanabe J, Matsushima Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fujimura M, Shiromizu K (2003): Independence of the prognostic value of tumor suppressor protein expression in ovarian adenocarcinomas: A multivariate analysis of expression of p53, retinoblastoma and related proteins.
  International Journal of Gynecologic Cancer 13: 598-606
- (68) Milde-Langosch K, Hagen M, Bamberger A M, Löning T (2003): Expression and prognostic value of the cell-cycle regulatory proteins, Rb, p16, p21, p27, cyclin E, cyclin D2, in ovarian cancer. International Journal of gynaecological pathology 22: 168-174
- (69) Ruas M, Peters G (1998): The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochimistry Biophysical Acta 1378: F115-177
- (70) Weinberg R A (1995): The Retinoblastoma protein and cell cycle control.Cell 81: 323-330
- (71) Slebos R J C, Lee M H, Plunkett B S et al. (1994): p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papilloma virus 16 E7 oncoprotein. Proceedings of the National Acadamy of Science USA 91: 5320-5324
- (72) Robinson G W, Wagner K U, Henningshausen L (2001): Functional mammary gland development and oncogene induced tumor dormation are not affected by the absence of the retinoblastoma gene.

  Oncogene 20: 7115-7119

- (73) Muncaster M M, Cohen B L, Phillips R A et al (1992): Failure of RB1 to reverse the malignant phenotype of human tumor cell lines.

  Cancer Research 52: 654-661
- (74) Haitel A, Wiener H G, Neudert B et al (2001): Expression of the cell-cycle proteins p21, p27 and pRb in clear cell renal cell carcinoma and their prognostic significance.

  Urology 58: 477-481
- (75) Korkolopoulou P A, Comerford J, Silverberg S G et al (1990): An analysis of abnormalities of the retinoblastoma gene in human ovarian and endometrial carcinoma.

  Cancer 66: 2150-2154
- (76) Li S, Schwartz P E, Lee W-H, Yang-Feng T L (1991): Allele loss at the retinoblastom locus in human ovarian cancer. Journal of the National Cancer Institut 83: 637-640
- (77) Yang-Feng T L, Li S, Ha H, Schwarzt P E (1992): Frequent loss of heterozygosity on Chrmosome Xp and 13q in human ovarian cancer. International Journal of Cancer 52-575-580
- (78) Liu Y, Heyman M, Wang Y (1994): Molecular analysis of the retinoblastoma gene in primary ovarian cancer cells. International Journal of Cancer 58: 663-667
- (79) Cote R J, Dunn M D, Chaterjee S J (1997): Elevated and absens pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53.
  Cancer Research 58: 1090-1094
- (80) Kornblau S M, Xu H-J, Zhang W, Benedict W F, Deisseroth A B (1994): Levels of retinoblastoma protein expression in newly diagnosed acute myelogenous leukaemia. Blood 84:256-261
- (81) Hartmann L C, Podratz K C, Keeney G L, Kamel N A, Edmonson J H, Grill J P, Su J Q, Katzmann J A, Roche P C (1994): Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer. Journal of Clinical Oncology 12: 64-69
- (82) Eltabbakh G H, Belinson J L, Kennedy A W, Biscotti C V, Casey G, Tubbs R R, Blumenson L E (1997): p53 overexpression is not an independent prognostic factor for patients with primary ovarian epithelial cancer. Cancer 80: 892-898

- (83) Levesque M A, Kantsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, Diamandis E P (1995): Mutant p53 overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderate differentiated ovarian carcinoma.
  - Cancer 75: 1327-1338
- (84) Klemi P J, Pylkkanen L, Kiilholma P, Kurvinen K, Joensuu H (1995): p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer.

  Cancer 76: 1201-1208
- (85) Marks J R, Davidoff A M, Kerns B J, Humphrey P A, Pence J C, Dodge R K, Clarke-Pearsson D L, Iglehart J D, Bast R C, Berchuck A (1991): Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. Cancer research 51: 2979-2984
- (86) Herod J J, Eliopoulous A G, Warwick J, Niedobitek G, Young L S, Kerr D J (1996): The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma.
  Cancer Research 56: 2178-2184
- (87) Niwa K, Itoh M, Murase T, Morishita S, Itoh N, Mori H, Tamaya T (1994): Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance.

  British Journal of Cancer 70: 1191-1197
- (88) Kohler M F, Kerns B J, Humphrey P A, Marks J R, Bast R C, Berchuck A (1993): Mutation and overexpression of p53 in early stage epithelial ovarian cancer. Obstetrics and Gynecology 81: 643-650
- (89) Geisler J P, Geisler H E, Wiemann M C, Givens S S, Zhou Z, Miller G A (1997): Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer. Gynecologic Oncology 66: 435-438
- (90) Reles A, Press M F, Schönborn I, Lichtenegger W, Strohmeyer T (1995): p53 Proteinüberexpression in Ovarialkarzinomen: Korrelation mit histopathologischen Daten und klinischem Verlauf. Gynäkologisch Geburtshilfliche Rundschau
- (91) Wen-Hsiang W, Reles A, Runnebaum I B, Sullian-Halley J, Bernstein L, Jones L A, Felix J C, Kreienberg R, El-Naggar A, Press M F (1999): p53 Mutations ans expression in ovarian cancers: Correlation with overall survival.
  International Journal of Gynecological Pathology 18: 29-41
- (92) Harris C C, Hollstein M (1993): Clinical implications of the p53 tumorsuppressor gene.New England Journal of Medicine 329: 1318-1327

- (93) Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas J, Rejthar A, Kovarik J, Midgley C A, Gannon J V, Lane D P (1991): Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 6: 1699-1703
- (94) Banks L, Matlashewski G, Crawford L (1986): Isolation of human-p53specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. European Journal of Biochemistry 159: 529-534
- (95) Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merrit V, Edgerton S M, Bell D A, Yandell D W (1993): p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer.
  Proceedings of the National Acadamy of Science USA 90: 4961-4965.
- (96) Halevy O, Michalovitz D, Oren M (1990): Different tumor derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. Science 250: 113-116
- (97) Fisher C J, Gillett C E, Vojtesek B, Barnes D M, Millis R R (1994): Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation.

  British Journal of Cancer 69: 26-31
- (98) Kmet L M, Cook L S, Magliocci A M (2003): A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors.

  Cancer 97/ Nummer 2:390-404
- (99) Santoso J T, Tang D C, Lane S B, Hung J, Reed D J, Muller C Y, Carbone D P, Lucci J A, Miller D S, Mathis J M (1995): Adenovirus-based p53 gene therapy in ovarian cancer.

  Gynecologic Oncology 59:171-178

#### 9. <u>Danksagung</u>

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Thomssen möchte ich für die mir gegebene Möglichkeit zur Promotion und Überlassung des Themas sowie für die Betreuung danken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning und Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für die Bereitstellung von Materialien und Räumlichkeiten in der Abteilung für Gynäkopathologie, sowie für die Einarbeitung und Hilfestellung bei Erstellung des experimentellen Teils der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Bianca Kelp für ihre Hilfe und Unterstützung bei dem histopathologischen Teil der Promotion.

Herrn Dr. med. Christian Utler möchte ich für die Hilfe bei der Erfassung der erforderlichen Daten der Patientinnen-Nachbeobachtung danken und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Meinen Eltern Karin und Dieter Osterholz möchte ich ganz besonders danken, weil sie mich immer in allen meinen Taten bestärkt haben und insbesondere bei meinem Promotionsprojekt keinen erdrückenden, doch kontinuierlich sanften Druck ausgeübt haben.

Ebenfalls besonders danken möchte ich meinem Ehemann Olgierd Zaleski, der für alle meine Sorgen und Nöte jederzeit ein offenes Ohr hat und niemals müde wird, mich in meinen Plänen und Wünschen zu bestärken und zu unterstützen.

# 10. Lebenslauf

Name: Tina Anke Margit Osterholz

Anschrift: Classenstieg 15

D-22391 Hamburg Tel.: 040/ 652 52 70

**Email:** osterholz.gyn@marienkrankenhaus.org

**Geburtsdatum:** 21. November 1974

Geburtsort: Hoya/Weser
Familienstand: verheiratet

# **Schulbildung**

1981-1985 Grundschule Müssenredder in Hamburg1985-1994 Gymnasium Hummelsbüttel in Hamburg

17. Juni 1994 Abitur (Gesamtnote 1,2)

# **Hochschulausbildung**

1994-1996 Vorklinisches Studium an der Universität Hamburg

1996-1999 Klinisches Studium an der Universität Hamburg

SoSe 1999 Studium an der Tulane University in New Orleans, USA

2000-2001 Praktisches Jahr

Chirurgie: Allgemeines Krankenhaus Barmbek in

Hamburg

Innere Medizin: Centre Hospitalier Universitaire

Vaudois in Lausanne, Schweiz

Gynäkologie: Universitätsklinikum Hamburg-

Eppendorf in Hamburg

29. Mai 2001 Abschluss des Studiums (Gesamtnote "Gut")

#### Studiumsbezogene und studienbegleitende Tätigkeiten

Feb./März 1995 Krankenpflegepraktikum in der geriatrischen Abteilung

des Krankenhauses Bethanien in Hamburg

Feb. 1997 Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe am

St. Joseph Krankenhaus in Regensburg

Juli 1998 Praxisfamulatur in der Tagesklinik Altona in Hamburg

Sep. 1998 Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe am

Louisiana State University Medical Center in New

Orleans, USA

WiSe 1999 Teilnahme am Sonographie-Kurs für Studenten

SoSe 1998 Teilnahme am EKG-Grundkurs für Studenten

April 1995 - Sept. 1998 Studentische Aushilfe im Pflegedienst des KH

Bethanien in Hamburg

**Berufserfahrung** 

Juli 2001 - Dez. 2002 Ärztin im Praktikum in der Gynäkologie und

Geburtshilfe an der Frauenklinik des

Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter

der Leitung von Prof. Dr. med. F. Jänicke

Feb. 2003 – Nov. 2004 Assistenzärztin in der Gynäkologie und

Geburtshilfe an der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter

der Leitung von Prof. Dr. med. F. Jänicke

Seit Dezember 2004 Assistenzärztin in der Frauenklinik am

Marienkrankenhaus in Hamburg unter der Leitung

von Prof. Dr. med. H.-P. Scheidel

**Fortbildung** 

Oktober 2003 Teilnahme am Kursus Reanimation des Neugeborenen in

Hamburg

Winter 2002/2003 Teilnahme am Kursus Psychosomatische

Grundversorgung in Hamburg

Mai 2004 Teilnahme am Kursus Kolposkopie-Training in

Philadelphia, USA

November 2004 Erwerb des Fachzertifikats/Fachkunde

Ernährungsmedizin

# 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Stelle des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.