

Aus der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

**ZUR PROGNOTISCHEN BEDEUTUNG
DES PLASMINOGENAKTIVATORS VOM UROKINASETYP UND
SEINES INHIBITORS TYP 1 BEIM MAMMAKARZINOM**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von Elena Engelhardt
aus Leninabad

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 18. Juli 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr.med. Ch. Lindner

Korreferent: Prof. Dr. F. Jänicke

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
1.1	EPIDEMIOLOGIE DES PRIMÄREN MAMMAKARZINOMS	3
1.2	BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DES MAMMAKARZINOMS.....	4
1.3	KLASSISCHE PROGNOSEPARAMETER DES PRIMÄREN MAMMAKARZINOMS ...	5
1.4	TUMORSTRUKTUR UND TUMORASSOZIIERTE PROTEASEN	9
1.5	PLASMIN UND SEIN AKTIVATOR VOM UROKINASETYP	10
1.6	PLASMINOGENAKTIVATORINHIBITOR TYP 1	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	PATIENTENGUT	14
2.2	BESTIMMUNG VON UPA UND PAI-1 IM TUMORZYTOSOL.....	15
2.2.1	<i>Vorbereitung der Proben</i>	15
2.2.2	<i>Testprinzip</i>	15
2.2.3	<i>Testdurchführung</i>	16
2.3	BESTIMMUNG VON STEROIDREZEPTOREN	18
2.4	ERSTELLEN DES FOLLOW-UP	18
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	19
3	ERGEBNISSE	21
3.1	„KLASSISCHE“ PROGNOSEPARAMETER.....	21
3.2	PLASMINOGENAKTIVATOR VON UROKINASETYP (UPA).....	24
3.3	INHIBITOR DES PLASMINOGENAKTIVATORS, TYP 1 (PAI-1).....	25
3.4	KORRELATIONEN	26
3.5	FOLLOW-UP.....	31
3.6	ÜBERLEBENSANALYSEN IM GESAMTKOLLEKTIV.....	32
3.6.1	<i>Univariate Analyse der uPA- und PAI-1-Werte</i>	32
3.6.2	<i>Univariate Analyse der „klassischen“ Prognoseparameter</i>	35
3.6.3	<i>Multiple Regressionsanalyse der uPA-, PAI-Werten und „klassischen“ Prognoseparameter</i>	43

3.7	PROGNOSTISCHER WERT DES UPAS , PAI-1 UND DER "KLASSISCHEN" PROGNOSEPARAMETER IN DEN PATIENTINNENGRUPPEN MIT EINEM GERINGEN RISIKO	46
3.7.1	<i>Nodalnegative Patientinnen</i>	46
3.7.2	<i>Patientinnen mit Grading I und Grading II</i>	49
3.7.3	<i>Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptor</i>	51
3.7.4	<i>Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptor</i>	54
3.7.5	<i>Patientinnen ohne Angioinvasion</i>	56
3.7.6	<i>Postmenopausale Frauen</i>	59
3.7.7	<i>Patientinnen mit Tumorstadium pT1</i>	61
4	DISKUSSION	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	LITERATURVERZEICHNIS	74
7	DANKSAGUNG	86
8	LEBENS LAUF	87
9	ERKLÄRUNG	88

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des primären Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industrieländern das häufigste Karzinom der Frau (9). In den letzten Jahren ist ein deutlicher Anstieg der Inzidenz des Mammakarzinoms in diesen Ländern zu verzeichnen (2, 3, 4).

Im Jahre 1969 wurde das Risiko einer Amerikanerin, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken mit 6% angegeben (1). 1991 schätzte die *American Cancer Society* die Erkrankungswahrscheinlichkeit auf 11%. Das bedeutet, daß in den letzten 22 Jahren die Inzidenz der Krankheit deutlich zugenommen hat, und nach neueren Analysen ist anzunehmen, daß jede 8. Frau in Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom erkrankt (5). Dieses Phänomen ist zum Teil durch den Anstieg der Lebenserwartung zu erklären.

In Deutschland erkrankt ca. jede 10. Frau an Brustkrebs. Unter den 35- bis 54-jährigen Frauen ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache (6).

Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen sind seit langem die deutlichen Unterschiede zwischen der Erkrankungshäufigkeit in den westlichen Industrieländern und den Entwicklungsländern, oder auch Japan bekannt. Wie Migrantstudien zeigen, spielen ethnische Unterschiede hierbei eine geringe Rolle (10). So steigt die primär niedrige Krankheitsinzidenz bei Japanerinnen bei Emigration in die USA nach einer 40 Jahre dauernden Latenzperiode signifikant an. In der zweiten Generati-

on wird dieselbe Erkrankungshäufigkeit erreicht wie bei der heimischen Bevölkerung (7). Diese Daten zeigen, daß Lebensstil und Ernährung zu den wichtigsten ätiologischen Komponenten für die Krankheitsentstehung gehören. Die Bedeutung diätetischer Faktoren geht auch aus den neueren WHO-Analysen über die Häufigkeitsverteilung in den EG-Ländern hervor. Hier findet sich ein deutlicher Nord-Süd-Gradient mit einer geringeren Erkrankungshäufigkeit in den mediterranen Ländern (11). Die geringe Inzidenzrate in den südlichen Ländern wird neuerdings auch mit der protektiven Wirkung von Vitamin D in Zusammenhang gebracht (8).

Die Unterschiede in der Häufigkeit zwischen westlichen Industrieländern einerseits und Entwicklungsländern und Japan andererseits betreffen nur die Patientinnen in der Postmenopause. Aufgründdessen wird die Frage diskutiert, ob das prämenopausale Karzinom biologisch von dem postmenopausalen unterschieden werden muß. Epidemiologische Daten sind deshalb vor allen Dingen beim postmenopausalen Karzinom relevant, wohingegen beim prämenopausalen Karzinom genetische Faktoren offenbar eine größere Rolle spielen (9).

1.2 Biologische Eigenschaften des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom neigt früh zu lymphogener und hämatogener Metastasierung (13). Ein Befall der regionalen Lymphknoten ist nicht selten mit generalisierter, klinisch meistens occulter Tumorausbreitung verbunden (12).

In Bezug auf den klinischen Verlauf und unabhängig von Tumorausdehnung und Hormonrezeptorenstatus lassen sich grundsätzlich zwei

Tumortypen unterscheiden: Mammakarzinome die durch ausgeprägte Aggressivität, starke metastatische und invasive Potenz gekennzeichnet sind und innerhalb weniger Jahre nach Diagnosestellung zum Tode der Patientin führen. Und Tumoren, bei denen längere Rezidivfreiheit und Überlebenszeit beobachtet werden (12).

Um die Patientinnen für eine weitere postoperative Therapie besser selektieren zu können, werden prognostische und prädiktive Faktoren, die die biologischen Eigenschaften der Tumorzellen widerspiegeln, gesucht (59).

1.3 Klassische Prognoseparameter des primären Mammakarzinoms

Aufgrund einer Reihe anamnestischer, klinischer, morphologischer und biochemischer Parameter werden die Patientinnen mit primärem Mammakarzinom entweder der prognostisch ungünstigeren „*high-risk*“ Kategorie oder der „*low-risk*“ Kategorie mit besseren Überlebenschancen zugeordnet.

Die älteste und noch am meisten verbreitete Methode zur Prognoseeinschätzung bei Mammakarzinom ist das sogenannte *Staging*, oder Ermittlung anatomischer Tumorausdehnung anhand klinischer und pathologischer Befunde (14). Die drei wichtigste Stagingkomponenten, wie Tumordurchmesser, Befall der regionalen Lymphknoten und Präsenz oder Fehlen von Fernmetastasen, sind in die TNM-Klassifikation eingeschlossen. In dieser seit 1988 weltweit anerkannten Klassifikation werden fünf Tumorstadien, darunter in Stadien II und III jeweils zwei Kategorien, unterschieden (15).

Die nach chirurgischer Behandlung der Patientin festgestellte Anzahl

der metastatisch befallenen axillären Lymphknoten der ipsilateralen Seite und die Größe des Primärtumors bestimmen zur Zeit im Wesentlichen das weitere therapeutische Vorgehen (13, 18).

Die Invasion der axillären Lymphknoten ist der Ausdruck der metastatischen Potenz des Primärtumors. Nur 25-30% der Patientinnen ohne Befall der regionalen Lymphknoten haben ein Krankheitsrezidiv binnen 10 Jahren nach Primäroperation. Dagegen erleiden nodalpositive Patientinnen in 75% der Fälle ein Rezidiv in dem gleichen Zeitraum (14).

Um eine präzise Aussage über den axillären Lymphknotenstatus zu erreichen, müssen mindestens 10 Lymphknoten entfernt werden (25). Von prognostischer Relevanz sind die Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten, Größe der intranodalen Metastasen sowie peri- und extranodale Tumordinfiltration (13, 14). Der ermittelte Lymphknotenstatus ist der wichtigste Prognoseparameter und entscheidend für die Indikation einer adjuvanten Therapie (21). Nodalpositive prämenopausale Patientinnen erhalten in der Regel eine adjuvante systemische Chemotherapie, während postmenopausale Frauen von einer adjuvanten Tamoxifen-Therapie profitieren (14).

Neben dem Lymphknotenstatus hängt die Prognose des Mammakarzinoms von der Größe des Primärtumors ab (16). In nodalnegativen Fällen liegt die Wahrscheinlichkeit des Fünfjahreüberlebens bei Tumoren ≤ 2 cm im Durchmesser bei 96,3% und sinkt auf 82,2%, wenn der Tumordiameter 2-5 cm beträgt (19). Die Größe des Primärtumors korreliert meistens direkt mit der Wahrscheinlichkeit des Lymphknotenbefalls (19, 18). Allein die Größe des Primärtumors spiegelt jedoch nicht dessen metastatische Potenz wider. So sind Fernmetastasen auch bei einer Tumorgöße unter 2 cm in 25% der Fälle vorhanden. Dahingegen weisen etwa 10% der Tumoren mit einem Durchmesser über 8 cm keine

Fernmetastasen auf (21).

Ein ähnliches Phänomen zeigt sich im Verhältnis zwischen Tumorgröße und Befall der axillären Lymphknoten: Selbst Karzinome mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 cm führen in 15 bis 20 % zu regionalen (Mikro)Metastasen, dagegen findet in ca. 30% der größeren Tumoren keine axilläre Metastasierung statt (13, 18, 20).

Die Bestimmung des histologischen Malignitätsgrades des Tumors ist ein weiterer Prognosefaktor (17). Das 1957 von *Richardson* und *Bloom* vorgeschlagene Prinzip zur Bestimmung des Grading beinhaltet eine Beurteilung folgender histopathologischer Merkmale: Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate (22, 23).

Der Differenzierungsgrad wird, der Scoresumme entsprechend, in drei Stufen eingeteilt. Auch histopathologischer Tumortyp und Invasion der Lymph- und Blutgefäße können bei der Zuordnung von Patientinnen zu den jeweiligen Risikogruppen in Betracht gezogen werden (24).

Im Jahre 1896 erkannte *Beatson* die Hormonabhängigkeit des Mammakarzinoms. Er demonstrierte, daß Tumoren nach Ovariectomie kleiner werden können (26). 1971 wurden Östrogenrezeptoren im Brustdrüsengewebe entdeckt (27). In Folge weiterer Untersuchungen wurde die Lokalisation der Östrogenrezeptoren an der nukleären Membran festgestellt. Zirkulierende Östrogene bilden an der Kernoberfläche feste Komplexe mit Östrogenrezeptoren, die dann in die Zellkerne transloziert werden. Von dort aus stimulieren diese Komplexe die DNA zur Produktion von Wachstums- und Proliferationsfaktoren (14, 28).

Abhängig vom Östrogen und seinem Rezeptor und unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren wie den *Insulin-like-growth factors* (IGF) 1 und 2, den *Transforming-growth-factors* (TGF) α und β , dem *Epidermal-*

growth-factor (EGF) werden die Progesteronrezeptoren synthetisiert (35). In Deutschland spricht man von Rezeptorpositivität, wenn bei biochemischer Technik das lösliche Zytosolprotein ≥ 20 fmol/mg beträgt; bei immunhistochemischer Untersuchung bei einem Score von $>4-6$ (13). Der Östrogenrezeptor ist in 50-85% der Fälle nachweisbar (29). Seine Konzentration korreliert mit dem menopausalen Status der Patientinnen. Der Anteil der östrogenrezeptorpositiven Fälle erreicht nach der Menopause 80%, dagegen weisen prämenopausale Patientinnen in 50-60% Östrogenrezeptoren auf. Der mittlere Östrogenrezeptorgehalt ist postmenopausal dreimal so hoch wie vor der Menopause. In Gegensatz dazu besteht kein Zusammenhang zwischen dem Progesteronrezeptor und Menopausenstatus (36, 37).

Der Nachweis von Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren in Tumorgewebe ist mit anderen Prognosefaktoren assoziiert. So weisen östrogenrezeptorpositive Karzinome meistens einen hohen Differenzierungsgrad, keine Tumornekrosen und keine Tendenz zur Gefäßinvasion auf (30, 31). Und wie zytometrische Analysen zeigen, sind die östrogenrezeptorpositive Tumorzellen eher diploid als anaploid (32).

Die Präsenz von Östrogenrezeptoren und besonders von beiden Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren zusammen im Tumorgewebe dient als Indikator des Ansprechens der postmenopausalen Patientinnen auf eine adjuvante Hormontherapie, und findet bei der Therapieplanung für diese Patientinnengruppe Verwendung (14, 25). Frauen mit positivem Hormonrezeptorenstatus zeigen einen besseren Krankheitsverlauf auch ohne adjuvante Therapien im Gegensatz zu hormonrezeptornegativen Fällen (33).

In den gegenwärtigen wissenschaftlichen Publikationen erscheinen verschiedene andere Faktoren, deren prognostische Relevanz bei primärem Mammakarzinom zum jetzigen Zeitpunkt unterschiedlich bewertet wird (38). Dazu gehören z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF,

TGF α (18), Thrombospondin (39), Onkogene wie HER-2 (40) und das mutierte p-53 Gen (25).

1.4 Tumorstruktur und tumorassoziierte Proteasen

Die Malignität solider Tumoren hängt von ihrer Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung ab. Die Tumorzellen verfügen über ein großes Arsenal an Substanzen, die Strukturen ihrer unmittelbaren Umgebung aufbauen und wieder auflösen. Durch Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran können maligne Zellen in die Gefäße einbrechen und sich in das den Tumor umgebende Gewebe ausbreiten (59). Die wichtigen Baukomponenten der extrazellulären Matrix sind Fibrin, Fibronectin, Elastin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Das Basalmembran ist hauptsächlich aus Lamelin, Elastin und Kollagenase IV zusammengesetzt (57). Die extrazelluläre Matrix bildet zusammen mit Basalmembran und Zellen, die für die Aufbau dieser Matrix verantwortlich sind (Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Histozyten und Lymphozyten), das Tumorstroma, das für Anlieferung von Energieträgern und Sauerstoff, für Abtransport von Stoffwechselprodukten und als Matrix für die Tumorausbreitung dient (57).

Von *Dvorak* wurde die Hypothese formuliert, daß die zu Fibrinbildung und zu Fibrinolyse führende Vorgänge in Tumoren selbst sowie im umgebenden Gewebe von auslösender Bedeutung für Tumorwachstum seien (57). Das Wachstum z.B. menschlicher Ovarialtumoren steht in Zusammenhang mit der Bildung einer provisorischen Fibrin-Fibronectin-Gelmatrix, die den Tumor umgibt und im weiteren Verlauf durch ein reifes Tumorstroma ersetzt wird (58). Proteasen (Enzyme, die Gerinnung

und Fibrinolyse steuern) und deren Inhibitoren tragen wesentlich zu diesem Vorgang bei (59, 60).

An der Dissemination und Infiltration der malignen Tumoren sind hauptsächlich vier Proteasentypen beteiligt:

1. Metalloproteasen (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysin);
2. Cysteinproteasen (Kathepsin B, H, L)
3. Aspartylproteasen (Kathepsin D)
4. Serinproteasen (Plasmin und seine Aktivatoren).

1.5 Plasmin und sein Aktivator vom Urokinasetyp

Plasmin, das bei Gesunden an der Fibrinolyse und Thrombolyse beteiligt ist, wirkt direkt destruierend auf die Baukomponenten der extrazellulären Matrix von Tumorzellen wie Fibronectin und Proteoglykane (46). Mittels Aktivierung der Prokollagenase Typ IV ist Plasmin indirekt an der Zerstörung des Hauptbestandteiles der Zellmembran, des Kollagens Typ IV, beteiligt (41, 43). Seine fibrinolytische Aktivität erreicht Plasmin dank spezifischen Aktivatoren (PA), die die Plasminvorstufe Plasminogen aktivieren. Es sind 2 Typen von PA bekannt: *tissue-type* PA (tPA) und *urokinase type* PA (uPA).

Die beiden Substanzen weisen unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Eigenschaften auf (44). Der tPA wird von Endothelzellen gebildet und spielt eine wichtige Rolle in intravasaler Fibrinolyse. Der ursprünglich im Urin identifizierte uPA wird von verschiedenen normalen und malignen Zellen synthetisiert und ist an einer Reihe physiologischer Vorgänge wie Makrophagenmigration, Follikelovulation, Implantation der Blastozyste während frühembryonaler Entwicklung und Involution des Mammagewebes nach Laktation beteiligt (76, 77).

1976 berichteten *Alstedt* und *Holmberg* in der Fachzeitschrift „Nature“ zum ersten Mal über die Freisetzung eines Plasminogenaktivators aus dem menschlichen Ovarialkarzinomgewebe und wiesen seine immunologische und funktionelle Identität mit dem Plasminogenaktivator vom Urokinasety (uPA) nach (45). Später wurden erhöhte uPA-Konzentrationen im Tumorgewebe bei Karzinomen des Colons, der Bronchien, des Corpus uteri, der Mamma und Prostatakarzinomen festgestellt (46-53).

Der uPA wird als inaktive Vorstufe (Zymogen) gebildet. Dieses Vorläufermolekül, genannt pro-uPA, wird durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor hoher Affinität auf der Karzinomzelloberfläche aktiviert. Der rezeptorgebundene aktive uPA fördert die Umwandlung des Plasminogens in Plasmin (59).

Eine Reihe von in vitro- und in vivo-Untersuchungen belegen eindeutig, daß uPA beim komplexen Vorgang der Tumordinvasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt (61-64).

Duffy et al. (65) und *Jänicke et al.* (54) haben gezeigt, daß der mittels ELISA in Tumorgewebeextrakt bestimmte uPA-Gehalt ein unabhängiger Prognosefaktor für rezidivfreies und Gesamtüberleben bei Mammakarzinom ist. Erhöhte uPA-Werte zeigen eine signifikante Korrelation zu einer schlechteren Prognose. Patientinnen mit metastatisch befallenen regionalen Lymphknoten haben signifikant höheren Gehalt an uPA-Antigen in ihrem Tumorgewebe (66).

Auch andere Untersucher bestätigen, daß hohe uPA-Konzentration oft mit Befall regionaler Lymphknoten assoziiert ist (43, 67). Besonders bei Patientinnen ohne Befall der regionalen Lymphknoten erlaubt die Berücksichtigung dieses Parameters eine bessere Einschätzung des Rezidiv- und Metastaserisikos (55, 56).

1.6 Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1

Die Aktivität des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp untersteht der Kontrolle spezifischen Inhibitoren. Bisher sind mindestens 4 Typen des Plasminogenaktivatorinhibitors (PAI) beschrieben worden: PAI-1, PAI-2, PAI-3 und Nexin (68). PAI-1, der von Endothelzellen, Thrombozyten und Zellen der glatten Muskulatur der Blutgefäße produziert wird, bildet kovalente Komplexe mit t-PA und uPA, und auf diese Weise inhibiert er beide Enzyme (43).

Für PAI-1 wurde in mehreren Studien eine direkte Korrelation einerseits zum Befall der regionalen Lymphknoten und andererseits auch zu erhöhten uPA-Werten nachgewiesen. Der PAI-1 wird zusammen mit uPA zu den neuen unabhängigen prognostischen Markern bei Mammakarzinom gerechnet (43, 46, 55, 56, 68, 69, 70).

Der Wirkungsmechanismus des PAI-1 bei Tumorinvasion und Metastasierung ist bis jetzt nicht genau geklärt. Wie immunhistochemische Untersuchungen an Mammakarzinomgewebe zeigen, ist PAI-1 im Nest der epithelialen Karzinomzellen, in Endothelzellen und im normalen Duktalepithel in großen Mengen vorhanden. Im Gegensatz dazu produzieren Stromafibroblasten wenig PAI-1 (126). Das invasive Lewis-Karzinomgewebe in Tierexperimenten weist hohe Konzentrationen an uPA-Protein auf. Dagegen ist PAI-1 überwiegend in nicht invasiven Arealen repräsentiert (72). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß PAI-1 von malignen Zellen als ein protektives Mittel gegen die indirekte destruiende Wirkung des uPA gebildet wird (69).

Eine andere Hypothese verbindet das Freisetzen von PAI-1 mit der Fähigkeit der zirkulierenden Tumorzellen zu Reimplantation und Metastasenbildung: Die Entwicklung und das Wachstum der Metastasen gehen mit Bildung einer neuen Tumorstroma einher. Die Blockade des auf Tumormatrix destruiierend wirkenden uPAs ist dafür von großer Be-

deutung (55). Die Zellmigration erfordert eine balancierte Proteolyse, wobei das Zusammenspiel zwischen Proteasen und deren Inhibitoren zur Einschränkung der Matrixdestruktion führt (69). Diese Hypothese wird durch Studienergebnisse unterstützt, die eine verminderte uPA-Aktivität in Metastasengewebe im Vergleich zu Primärtumor belegen (73-75).

Bei Mammakarzinomen werden höhere PAI-1-Konzentrationen in Metastasen als in Primärtumoren bei gleichem u-PA-Gehalt in beiden Lokalisationen beschrieben (66).

Die PAI-1-Konzentration im Tumorgewebeextrakt wird auch als Parameter für die Ausbreitung der Neovaskularisation betrachtet (71). Der PAI-1 weist auch eine signifikante negative Korrelation zu den Hormonrezeptoren auf (55).

Die erhöhte Werte von Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 2 (PAI-2) sind dagegen mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert (43, 70,78). Die Bestimmung von PAI-2 soll bei postmenopausalen Patientinnen die prognostische Aussagekraft der uPA und in nodalnegativen Fällen des PAI-1 verstärken (70).

Auch andere Proteasetypen, wie Cysteinproteasen Kathepsin B und L (79, 80, 81, 82) und Aspartylprotease Kathepsin D (79, 82, 83, 84, 85), sind mit erhöhter metastatischer und Proliferationspotenz des Mammakarzinoms verbunden.

Das **Ziel** der vorliegenden Arbeit war, anhand eines Patientenkollektives von 291 Fällen den prognostischen Wert von uPA und PAI-1 beim primären Mammakarzinom für das rezidivfreien Intervall nachzuvollziehen und Korrelationen zu anderen relevanten Prognoseparametern darzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

In diese Studie wurden 291 Patientinnen, welche in dem Zeitraum vom Dezember 1991 bis Juli 1994 auf Grund eines primären Mammakarzinoms in der Frauenklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf therapiert wurden, einbezogen. Nach der Diagnosestellung wurden bei diesen Patientinnen entweder eine modifizierte radikale Mastektomie oder ein brusterhaltendes operatives Verfahren im Sinne einer *wide excision*, Segmentresektion oder einer Quadrantektomie und in allen Fällen eine axilläre Lymphnodektomie mittels subtotaler Axillausräumung durchgeführt. Es wurden in jedem Fall mindestens 10 Lymphknoten entfernt. Die histologische Einteilung der Tumoren erfolgte nach der WHO-Klassifikation, die Bestimmung des Grading nach der Methode von *Richardson* und *Bloom*. Bei allen Patientinnen wurde auch der Hormonrezeptorenstatus im Tumorgewebe bestimmt. Die Grenze für Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorenpositivität lag bei 20 fmol/mg Zytosolprotein.

Für die Aufnahme in diese Studie wurde der Ausschluß einer distanten Metastasierung durch eine negative klinische Untersuchung, bzw. negative Bildgebung (Röntgen-Thorax, Knochenszintigramm und Oberbauchsonographie) vorausgesetzt.

Die brusterhaltend operierte Frauen erhielten postoperativ eine Strahlentherapie der betroffenen Brust. In nodalpositiven Fällen wurde bei postmenopausalen Patientinnen eine adjuvante Tamoxifen-Therapie und bei Prämenopausalen eine adjuvante Chemo-, in Einzelfällen eine Zoladextherapie durchgeführt.

2.2 Bestimmung von uPA und PAI-1 im Tumorzytosol

2.2.1 Vorbereitung der Proben

Das gewonnene Tumorgewebe wurde nach Begutachtung durch den Pathologen im flüssigen Stickstoff eingefroren. 300 mg des tiefgefrorenen Gewebes wurden in einem Mikrodismembrator (Fa. Braun, Melsungen) 2x in je 45 Sekunden pulverisiert, dazwischen und danach wieder im flüssigen Stickstoff gekühlt. Dann wurden 200 mg feinpulverisiertes Tumorgewebe in 1800 µl TBS-Puffer (0,2M Tris, 0,125M NaCl, pH 8,5) sorgfältig aufgelöst. 900 µl dieses suspendierten Gewebes versetzte man mit 100 µl 10% TritonX100/TBS-Puffer (1 g Triton, 9 g TBS) in einem 1ml Nalgene Kryoröhrchen. Diese 1% Triton/Zytosol-Lösung wurde innerhalb 16h bei +4°C schonend gerührt und anschließend 60 Minuten mit 25 000 U/min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu separieren. Das Tumorzytosol wurde je 50 µl aliquotiert und bis zur weiteren Untersuchungen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Testprinzip

Die Bestimmung des uPA und PAI-1 im TritonX-100-Tumorzytosol erfolgte mittels eines Enzymimmunassay, ELISA. Dabei wurden IMUBIND Tissue uPA bzw. PAI-1 ELISA Kits #849 für uPA und #821 für PAI-1 von der Firma *American Diagnostica Inc., Greenwich, USA* verwendet. Bei dieser Methode wurden zu primären Komplexen monoklonaler Antikörper gegen humane uPA bzw. PAI-1 und uPA- bzw. PAI-1-Antigene nach einer Inkubationszeit enzymmarkierte Anti-Antikörper zugeführt (sog. Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz konnten die immunkomplexgebundene Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Antigenkonzentration

in der Probe wurde mittels einer photometrischen Bestimmung der immunkomplexgebundenen Markerenzyme und anschließend eines Vergleiches mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt.

2.2.3 Testdurchführung

2.2.3.1 Bestimmung des Proteingehaltes im Tumorzytosol

Die Ermittlung der uPA- und PAI-1-Werten erfolgte in ng/mg Zytosolprotein. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des BCA-Proteinassay (*Bicinchoninic Acid Protein Assay*) gemessen.

In Assayplättchen wurden jeweils 50 µl Blanks (TBS-Triton X-100-Verdünnungspuffer), Standards in Konzentrationen von 20 bis 400 µg/ml, die mit 100%-Albumin und TBS-TritonX-100-Puffer vorbereitet worden sind, zwei Kontrollen und Tumorzytosol in Verdünnung 1:20 nacheinander abpipetiert. Dann wurden in jedes Plättchen 200 µl einer Reagenzmischung aus 20 ml Reagenz A, Pierce Nr. 23223 und 400 µl Reagenz B, Pierce, Nr. 23224 zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde der Proteingehalt der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm (Titertek Multiscan PLUS) gemessen und mit den Standards und den Kontrollen verglichen.

2.2.3.2 uPA- und PAI-1-Bestimmung

Nach der oben erläuterten Vorbereitung der Proben wurden jeweils 100 µl Blanks (TBS-TritonX-100-Puffer), vier Standards in Konzentrationen von 0,1-1,0 ng/ml einkettiges uPA, zwei Kontrollen und 1:20 verdünnter Tumorzytosol in die mit monoklonalen Antikörper be-

schichtete Testplättchen nacheinander pipetiert und bei +4°C für 16 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit PBS-TritonX-100-Pufferlösung vier Mal gewaschen. Dann wurden jedem Plättchen 100 µl Anti-Antikörper (*Detection antibody*) zugegeben und alles wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Desweiteren wurden jeweils 100 µl verdünntes Enzymkonjugators (*Streptavidin-horseradish Peroxidase*) in jedes Plättchen pipetiert, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vier mal mit PBS-TritonX-100-Puffer gewaschen.

Nach Zufuhr von 100 µl 3,3',3,5'-Tetramethylbenzidins (TMB) entwickelte sich in jeder Probe eine blaue Farbe unterschiedlicher Intensität. Die enzymatische Reaktion wurde nach 20 Minuten durch Zugabe von 50 µl von 0.5M H₂SO₄ blockiert. Die Menge des absorbierten Enzyms wurde mit einem Mikrotestleser (Titertek Multiscan PLUS) bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 Minuten abgelesen. Die Auswertung erfolgte mit einem computerunterstützten Programm. Der uPA-Gehalt wurde auf die Proteinkonzentration des Tumorzytosols bezogen.

Die Empfindlichkeit dieser Methode betrug für uPA 10 pg/ml, dabei wurden einkettige uPA-Formen (sc-uPA, pro-uPA), HMB-uPA sowie rezeptorgebundener uPA und uPA-Komplexe mit PAI-1 und PAI-2 erfaßt.

PAI-1 wurde nach derselben Methode mit IMUBIND ELISA Kits#821 (*American Daignostica Inc.*) bestimmt. Die dafür gebrauchte Reagenzien, mit Ausnahme der Standards mit Konzentrationen von 1,0 bis 10,0 ng/ml PAI-1, und der Testvorgang waren mit den bei der Bestimmung des uPA verwendeten identisch.

Die untere Empfindlichkeitsgrenze lag bei 50 pg/ml. Bei PAI-1-Bestimmung wurden latente und aktive Formen dieses Inhibitors und PAI-1-Komplexe gemessen. Das Ergebnis in ng/ml wurde ebenfalls durch mg/ml Zytosolprotein dividiert.

2.3 Bestimmung von Steroidrezeptoren

Die Rezeptorenanalyse wurde nach der DCC (*Dextran-coated-charcoal*)-Methode im Tumorzytosol durchgeführt.

Bei dieser Methode wurden die mit Tritium radioaktiv markierte Steroidhormone in steigenden Konzentrationen (0,4 nMolar bis 8 nMolar) zur Bestimmung der totalen Hormonbindung eingesetzt.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden zu jeder Konzentration des radioaktiv markierten Steroids Paralleluntersuchungen durchgeführt, die zusätzlich zum markierten Hormon einen mindestens 100fachen Überschuß an unmarkiertem Steroid erhalten.

Am Ende der Inkubationszeit wurde das mit Dextran beschichtete Kohle zur Abtrennung des freien Steroids verwendet. Nach Abzentrifugieren der Kohle wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen. Die Proben werden mit Szintillatorlösung aufgefüllt, und dann wurde die Gesamttaktivität in einem β -Szintillationsmeßgerät (Betazinn) gemessen.

Die Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung wird „spezifische Bindung“ oder „Rezeptorenbindung“ genannt, und entspricht dem Rezeptorenhalt im Tumorzytosol. Das Ergebnis wurde in fmol/mg Zytosolprotein angegeben.

Tumoren mit einer Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorenhalt von ≥ 20 fmol wurden als östrogen- bzw. progesteron- rezeptorpositive definiert.

2.4 Erstellen des Follow-up

Zur Darstellung des postoperativen Verlaufes wurden standardisierte Fragebögen an die Haus- bzw. Frauenärzte der Patientinnen verschickt, und die Akten derjenigen Patientinnen durchgesehen, welche sich in

der Nachbehandlung in der Poliklinik und der chemotherapeutischen Ambulanz des UKE befanden. Es wurde versucht, unmittelbar vor der Datenauswertung alle Daten zu aktualisieren.

Die Dauer der Verlaufsbeobachtung wurde in Monaten angegeben. Das berücksichtigte Zeitintervall endete bei Eintritt eines Krankheitsrezidives in Form einer Fernmetastasierung. Der Nachweis einer Metastasierung wurde mit Hilfe nativer Röntgenaufnahmen, Computertomographien, Sonographien und Skelettszintigraphien erbracht.

Wenn innerhalb des beobachteten Zeitraumes kein Rezidiv festgestellt werden konnte, so wurde der letzte Untersuchungstermin als Endpunkt der Verlaufsbeobachtung angesehen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Datenreihen erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS für Windows, Version 1.6.3..

Die Korrelationen zwischen Parametern mit quantitativen Werten, wie uPA- und PAI-1-Gehalt, Konzentration an Östrogen-, Progesteronrezeptoren und Tumordurchmesser, wurden nach *Spearman*-Methode berechnet. Mittels des U-Tests nach *Mann-Whitney* und H-Tests nach *Kruska-Wallis* wurden die Korrelationen zwischen uPA bzw. PAI-1 und klassischen Prognoseparametern wie Lymphknoten-, Menopausenstatus, Angioinvasion und histologischem Malignitätsgrad geprüft. Die quantitative Variablen wurden zu diesem Zweck rangskaliert.

Um den Einfluß der untersuchten Prognoseparameter auf das Risiko eines Krankheitsrezidives beurteilen zu können, wurden Überlebensanalysen eingesetzt.

Die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens bzw. Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von den „klassischen“ Prognoseparametern, uPA- und PAI-1-Werten wurden nach der *Kaplan-Meier*-Methode be-

rechnet und graphisch dargestellt. Das Gesamtkollektiv wurde in Abhängigkeit von dem jeweiligen untersuchten Parameter in die Gruppen mit hohem und niedrigem Risiko für ein Rezidiv geteilt. Für uPA diente der Wert von 3 ng/mg Zytosolprotein als *cut-off level* und für PAI-1 der Wert von 14 ng/mg. Diese Werte entsprechen den Grenzwerten einer zur Zeit in Deutschland laufenden multizentrischen Studie zur Validierung von uPA und PAI-1 als Entscheidungskriterium für eine risikoadaptierte adjuvante Therapie.

In Bezug auf den histologischen Malignitätsgrad wurden Patientinnen mit Grading I und Grading II in einer Gruppe zusammengefaßt und gegen Grading III getestet. Patientinnen mit dem Tumordurchmesser ≤ 20 mm wurden als risikoarm betrachtet im Gegensatz zu den Frauen mit dem Tumordiameter >20 mm. Unter Berücksichtigung des Lymphknotenbefalls und der Angioinvasion wurden die Fälle mit Faktorpräsenz den Risikogruppen zugeteilt. Die in eine Gruppe einbezogene prä- und perimenopausale Patientinnen wurden mit den postmenopausalen verglichen. Mit Hilfe des *Long-rank*-Testes wurde die Signifikanz der Unterschiede der Überlebenwahrscheinlichkeit zwischen diesen Gruppen getestet.

Die Unabhängigkeit eines bestimmten Faktors wurde mittels multipler Regressionsanalyse nach *Cox proportional Hazard*-Modell getestet. In diese Analyse wurde auch das Durchführen der adjuvanten Hormon- oder Chemotherapie als prognostische Kovariable miteinbezogen.

Anschließend wurde die prognostische Bedeutung des uPAs und PAI-1 innerhalb der risikoarmen Gruppen nach *Kaplan-Meier*-Methode und *Long-rank*-Test untersucht.

Für alle Testergebnisse gilt ein Signifikanzniveau mit $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 „Klassische“ Prognoseparameter

In dieser Studie wurden anamnestische, klinische und biochemische Daten, die seit einiger Zeit als sogenannte klassische Prognoseparameter etabliert sind, von 291 Patientinnen mit invasivem primärem Mammakarzinom, ausgewertet.

Der Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Diagnosestellung diente als Kriterium zur Einteilung der Patientinnen in zwei Gruppen. In die erste Gruppe wurden die prä- und perimenopausale Frauen, deren Anteil am Gesamtkollektiv 35,1% (n=102) ausmachte, eingeschlossen. Die zweite Gruppe bildeten 189 (64,9%) postmenopausale Frauen. Die jüngste Patientin war 25 Jahre alt und die älteste 86. Der Altersdurchschnitt betrug 55,6 Jahre, der Medianwert 55,0 Jahre.

In Bezug auf die Art des operativen Vefahrens, das bei jeder Patientinnen dem jeweiligen Krankheitsstadium entsprechend durchgeführt worden war, ergaben sich folgende Verteilungen: Bei 124 Patientinnen (42,3%) wurde das brusterhaltende operative Vorgehen gewählt. Diese Patientengruppe erhielt eine postoperative Bestrahlung der betroffenen Brust. Ablatio Mammae wurde in 166 Fällen (56,7%) durchgeführt. Bei einer Patientin war die Resektion eines Drittels der Brust notwendig. Zwölf der radikal operierten Frauen (4,1% des Gesamtkollektives) erhielten zusätzlich eine supraclavikuläre Bestrahlung.

Der Mittelwert der histologisch festgestellten Tumorgöße lag bei 32 mm bei einer Standarddeviation von +/-16, der Medianwert betrug 28 mm. Es waren 48 Fälle (16,5%) im Stadium pT1 gemäß der TMN-

Klassifikation, 201 (69,1%) in pT2 und 42 (14,4%) in pT3.

Der Anteil der Fälle mit metastatischem Befall der regionalen Lymphknoten (n=140, 48,1%) betrug nahezu die Hälfte des Gesamtkollektives. 151 (51,7%) Patientinnen waren frei von Metastasen der axillären Lymphknoten.

Die Verteilung der Karzinome entsprechend den histologischen Typen ist in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Histologischer Karzinomtyp	n	%
duktal	227	77,7
lobulär	33	11,4
medullär	15	5,1
mischdifferenziert	10	3,4
andere	6	2
Gesamt	291	100

Unter der Berücksichtigung des Malignitätsgrades der Karzinome nach *Bloom* und *Richardson* wurde festgestellt, daß die meisten Tumore ein Grading II (n=133, 45,5%) aufwiesen, gefolgt von Karzinomen mit dem Grading III (n=113, 38,7%). Das Grading I lag in 39 Fällen (13,4%) vor. In 6 Fällen (2,1%) fehlten die Angaben zum histologischen Malignitätsgrad.

Bei der histopathologischen Untersuchung der Gewebsproben wurden auch die Präsenz der Tumorinvasion der Lymph- und Blutgefäßen in Betracht gezogen. Eine Angioinvasion war in 85 Fällen (29,2%) vorhanden.

Der Gehalt an Steroidrezeptoren im Tumorzytosol wurde als wichtiger biochemischer Prognosefaktor herangezogen.

Für die Östrogenrezeptoren ergab sich ein Mittelwert von 154 fmol/mg bei einer Standardabweichung von +/-258. Der Medianwert lag bei 67 fmol/mg. Der niedrigste Wert betrug 0,0 fmol/mg und der höchste 2075 fmol/mg.

Für die Progesteronrezeptoren errechnete sich ein Mittelwert von 225 fmol/mg bei einer Standarddeviation von +/-463. Der Medianwert lag bei 75 fmol/mg, die Variationsbreite zwischen 0 fmol/mg und 5003 fmol/mg.

Die Einteilung der Tumore in Bezug auf den Hormonrezeptorstatus erfolgte bei dem *cut-off level* von 20 fmol/mg. Somit erwiesen sich bei der Berücksichtigung dieses Grenzwertes von 291 Befunden 209 (71,6%) als positiv für Östrogenrezeptoren und 222 (76,0%) als positiv für Progesteronrezeptoren. Es waren 37 Zytosole (12,7%) für beide Rezeptoren negativ, und in 177 Proben (60,6%) konnten sowohl Östrogen- wie Progesteronrezeptoren nachweisen werden.

Tabelle 2 stellt die Verteilung der Steroidrezeptoren im Tumorgewebe und mittlere Östrogen- bzw. Progesteronrezeptorenkonzentration in den jeweiligen Gruppen dar.

Tabelle 2

PSR₁	n	%	MER₂ fmol/mg	MPR₃ fmol/mg
ER+ PR+	177	60,6	233,2	321,4
ER- PR-	37	12,7	4,6	3,3
ER+ PR-	32	11,0	103,4	5,8
ER- PR+	45	15,4	2,9	181,0

¹ PSR-Präsenz von Steroidrezeptoren

² MER-Mittelwert der Östrogenrezeptorenkonzentration

³ MPR-Mittelwert der Progesteronrezeptorenkonzentration

3.2 Plasminogenaktivator von Urokinasetyp (uPA)

In dem Patientenkollektiv dieser Studie wurden im Tumorzytosol uPA-Konzentrationen zwischen 0,02 ng/mg und 21,35 ng/mg gemessen. Die erhobene Werte ergaben einen Mittelwert von 3,48 ng/mg bei einer Standardabweichung von +/-3,08 und den Medianwert 2,68 ng/mg.

Um die prognostische Bedeutung der uPA-Konzentration in Bezug auf Gesamt- und rezidivfreie Überlebenszeit der Patientinnen beurteilen zu können, wurden die quantitativen uPA-Werte qualitativ eingeteilt. Als *cut-off level* diente der Wert von 3,0 ng/mg.

In der vorliegenden Studie wurde in 164 Proben (56,5%) eine uPA-Konzentration $\leq 3,0$ ng/mg gemessen. 127 Gewebeproben (43,5%) wiesen einen uPA-Wert $>3,0$ ng/mg.

3.3 Inhibitor des Plasminogenaktivators, Typ 1 (PAI-1)

Der mittlere PAI-1-Wert betrug 21,11 ng/mg bei einer Standardabweichung von +/-23,4. Der Medianwert war 14,0 ng/mg (Range 0,2 - 193,4 ng/mg).

Als *cut-off level* wurde der Wert von 14,0 ng/mg definiert.

Diesem Grenzwert zufolge war in 146 Zytosolen (40,2%) der PAI-1 Gehalt ≤ 14 ng/mg und in 145 Zytosolen (59,7%) > 14 ng/mg.

Abbildung 1 demonstriert die Verteilung des von uns untersuchten Patientenkollektives nach uPA- und PAI-1-Werten.

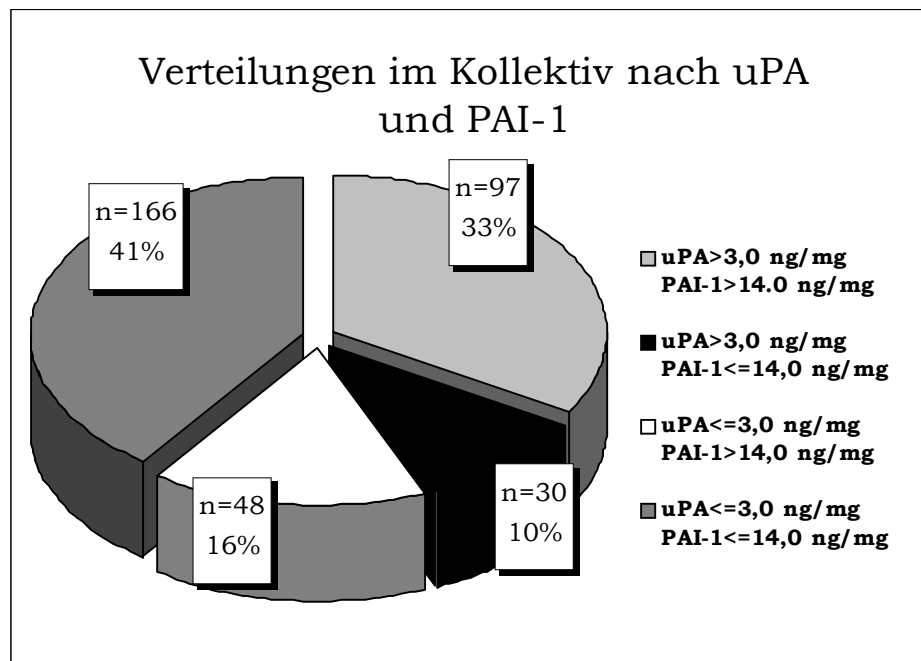


Abb. 1

3.4 Korrelationen

Bei der Suche nach den Zusammenhängen zwischen den erhobenen Parametern wurden mittels des *Spearman*-Testes eine starke positive Korrelation zwischen uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Tumorgewebe ($p=0,000$) festgestellt (Abb. 2).

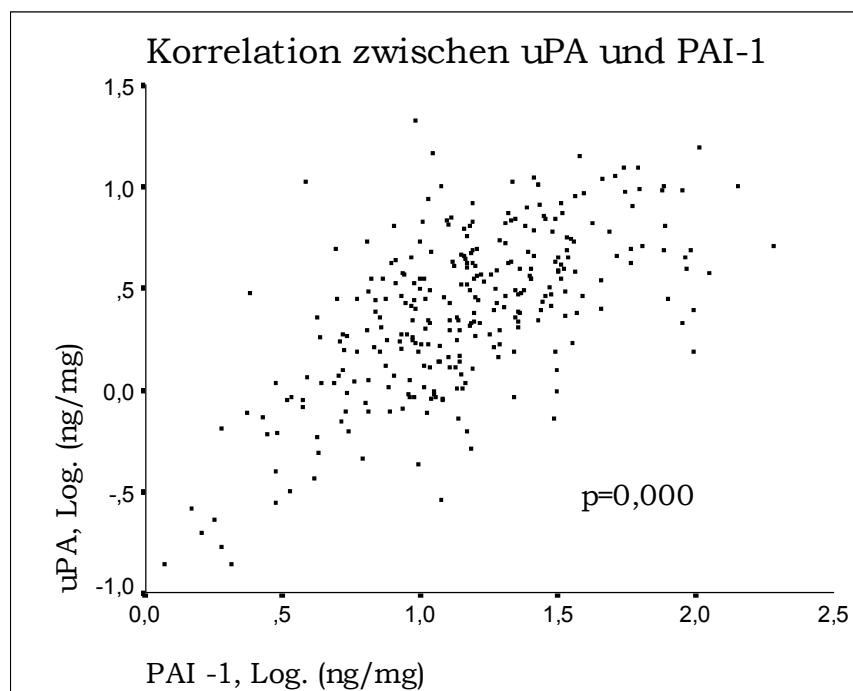


Abb. 2

Eine ebenfalls starke positive Korrelation ergab sich zwischen den Östrogenrezeptorenbefunden dieser Probe und den Progesteronrezeptoren ($p=0,000$) (Abb.3). Für Östrogenrezeptoren konnte auch ein signifikant positiver Zusammenhang ($p=0,000$) mit dem Menopausenstatus der Patientinnen bestätigt werden, für Progesteronrezeptoren dagegen nicht ($p=0,46$)

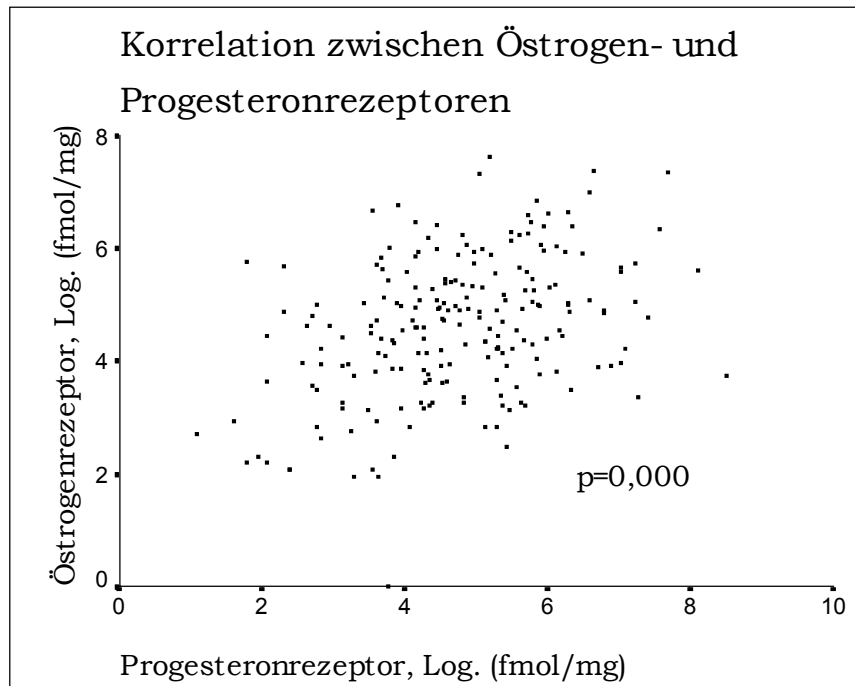


Abb. 3

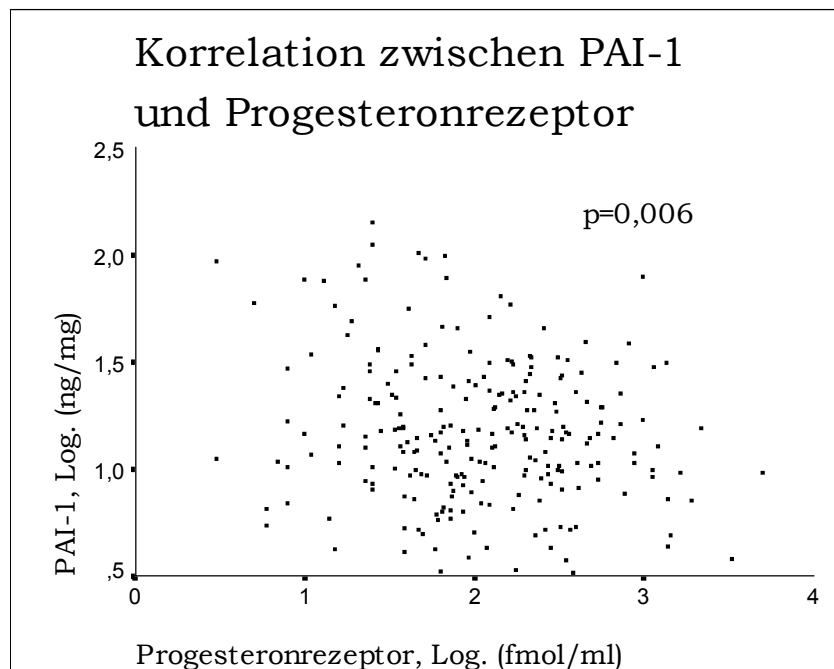


Abb. 4

Beim Vergleich sowohl quantitativer wie rangskalierter Werte bestand ein deutlicher negativer Zusammenhang zwischen PAI-1- und Progesteronrezeptorenbefunden ($p=0,006$ (abb. 4)). Auch für uPA konnte eine ähnliche Korrelation ($p=0,04$) festgestellt werden.

Bei der Analyse der uPA bzw. PAI-1-Konzentrationen in Abhängigkeit von der der TMN-Klassifikation entsprechend skalierten Tumorgroße stellen sich folgende Zusammenhänge dar: Die Tumoren im Stadium pT2, deren Durchmesser zwischen 20 und 50 mm lag, hatten signifikant höhere uPA- ($p=0,0007$) bzw. PAI-1-Werte ($p=0,0009$) im Gegensatz zu Tumoren mit einem Durchmesser unter 20 mm (pT1). Der uPA-Wert war auch signifikant niedriger bei den Karzinomen im Stadium pT3 im Vergleich zu den pT2-Tumoren ($p=0,0009$) (Abb. 5 und 6).

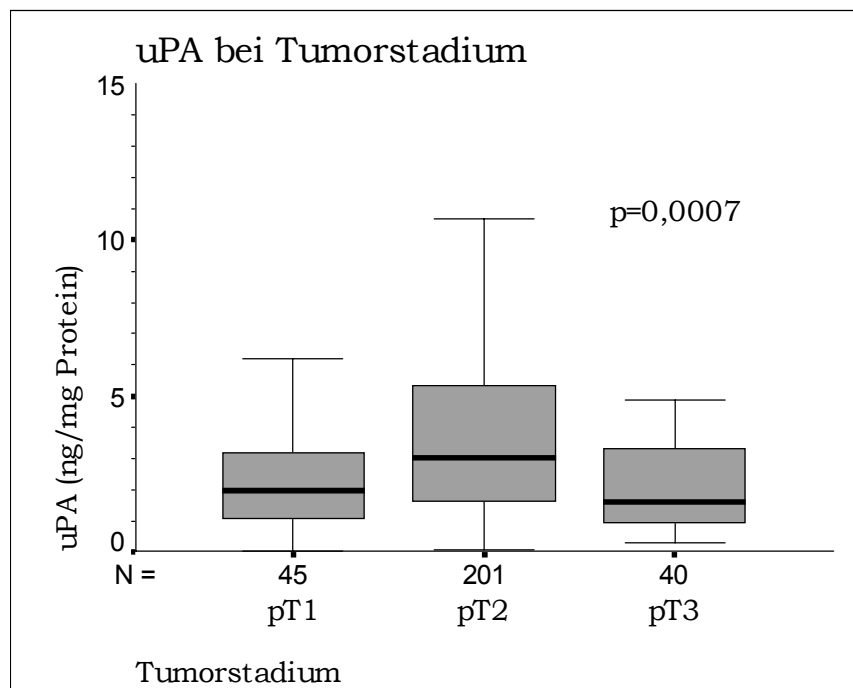


Abb. 5

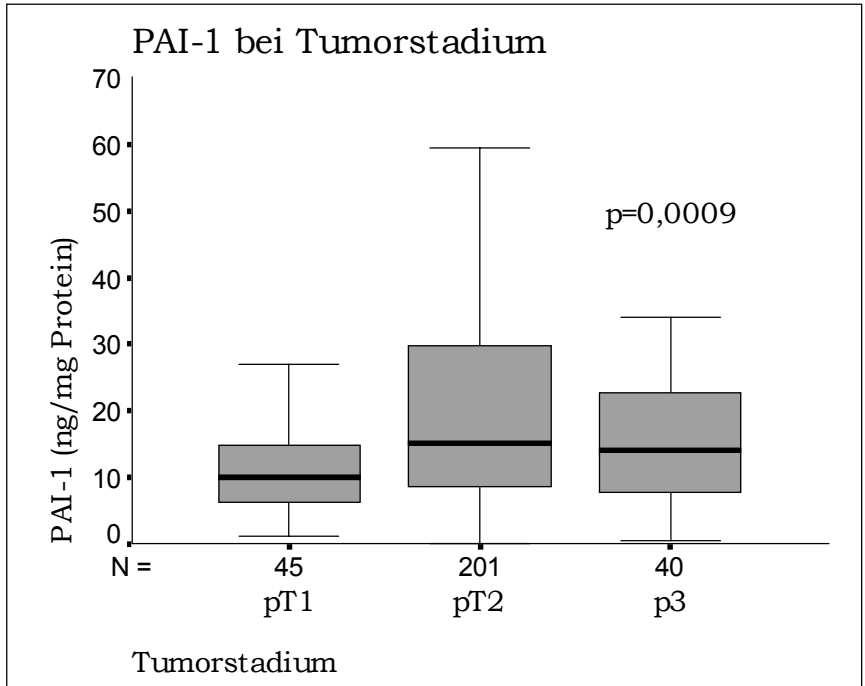


Abb. 6

Es wurde eine direkte Korrelation von hoher Signifikanz zwischen uPA ($p=0,002$) bzw. PAI-1 ($p=0,000$) und dem histologischen Malignitätsgrad der Karzinome beobachtet. In Abbildungen 7 und 8 ist eine deutliche Zunahme der medianen uPA-/PAI-1- Werte bei steigendem Malignitätsgrad dargestellt.

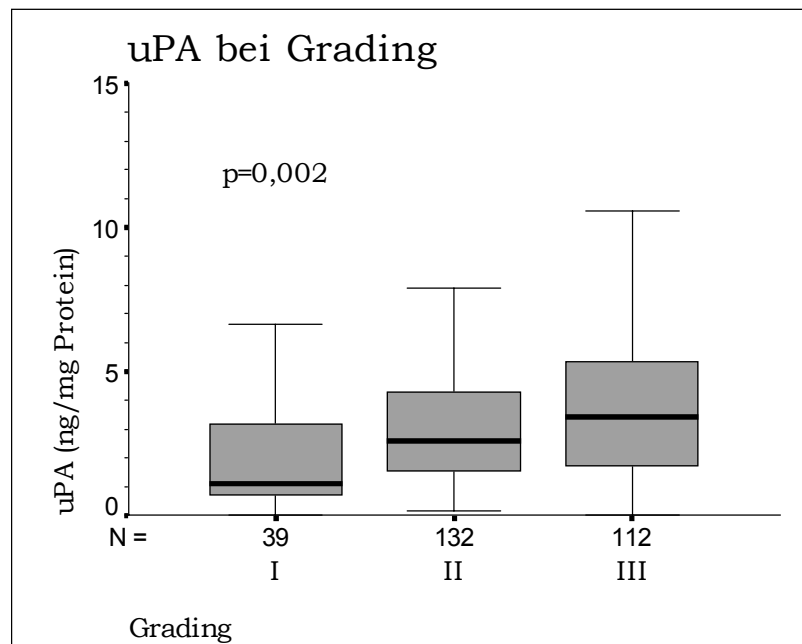


Abb. 7

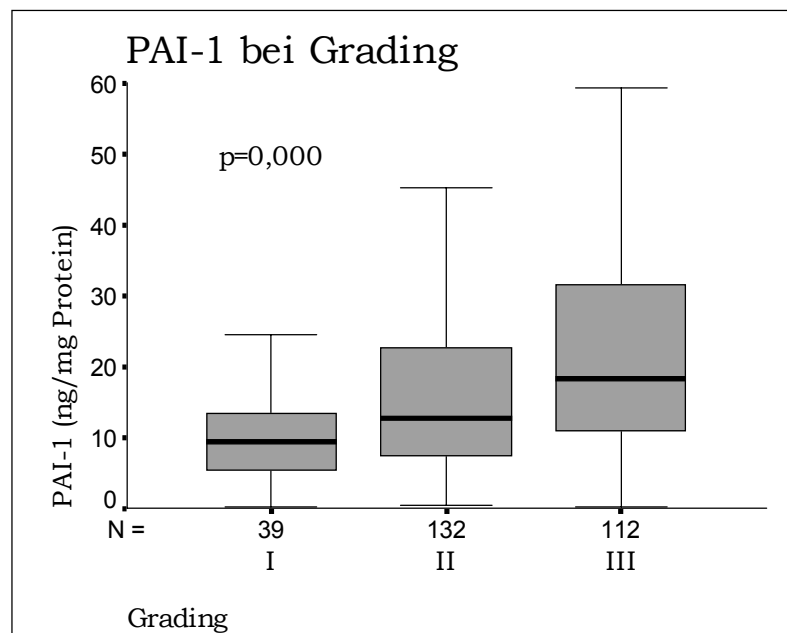


Abb. 8

3.5 Follow-up

Das *follow-up* konnte bei 211 Patientinnen analysiert werden. Das mediane *follow-up* betrug 38 Monate. Die kürzeste Beobachtungszeit wurde beim Auftreten des Krankheitsrezidives nach 2,3 Monaten beendet. Die längste Nachbeobachtungszeit betrug 64 Monaten.

Während der Beobachtungszeit erlitten 41 Patientinnen ein Rezidiv in Form einer Fernmetastasierung, und zwölf Patientinnen verstarben an ihrem Mammakarzinom.

Bei 154 Frauen (73,5%) wurde eine adjuvante systemische Therapie durchgeführt. 83 postmenopausale Patientinnen (39,9%) erhielten eine adjuvante Hormontherapie mit Tamoxifen. Die zweithäufigste Therapieform war die adjuvante Chemotherapie nach dem CMF-Schema (n=46, 21,8%). Bei sieben Patientinnen (3,3%) ergänzte man das CMF-Therapie durch Tamoxifengaben. Eine kleine Gruppe der prä-/perimenopausalen Frauen (n=12, 5,7%) wurde aufgrund des Lymphknotenbefalles mit dem LH-RH-Analoga Zoladex behandelt. Sechs weitere Patientinnen (2,8%) wurden einer adjuvanten Chemotherapie nach verschiedenen Schemata (FEC, FAC, EC, EC/CMF) unterzogen.

3.6 Überlebensanalysen im Gesamtkollektiv

3.6.1 Univariate Analyse der uPA- und PAI-1-Werte

Die Konzentration des uPAs im Tumorgewebe der untersuchten Stichprobe zeigte, unter Berücksichtigung des Grenzwertes von 3,0 ng/mg Zytosolprotein, einen signifikanten Einfluß sowohl auf das rezidivfreie (p=0,0002) wie das Gesamtüberleben (p=0,0014) (Abb. 19 und 20).

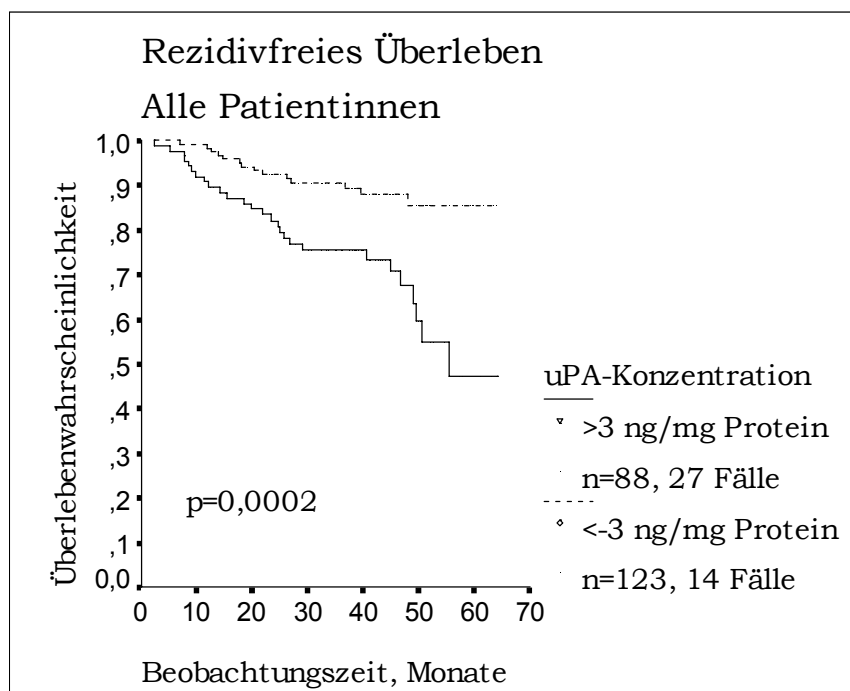


Abb. 19

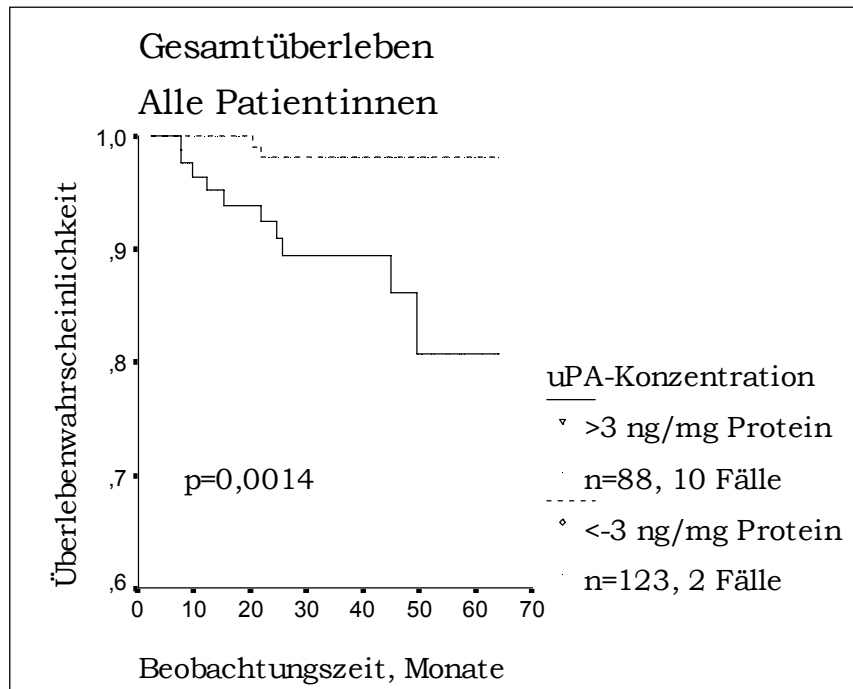


Abb. 20

Bei den Patiententinnen mit PAI-1-Werten ≤ 14 ng/mg Protein war eine deutlich geringere Rezidivrate im Vergleich zu der Patientengruppe mit PAI-1-Werten oberhalb des *cut-off level* zu verzeichnen ($p=0,003$) (Abb. 21). Die Beziehung des PAI-1 zum Gesamtüberleben war nicht statistisch signifikant ($p=0,056$), zeigte aber einen Trend der größeren Überlebenwahrscheinlichkeit für Frauen mit PAI-1-Konzentration unterhalb des Grenzwertes (Abb. 22).

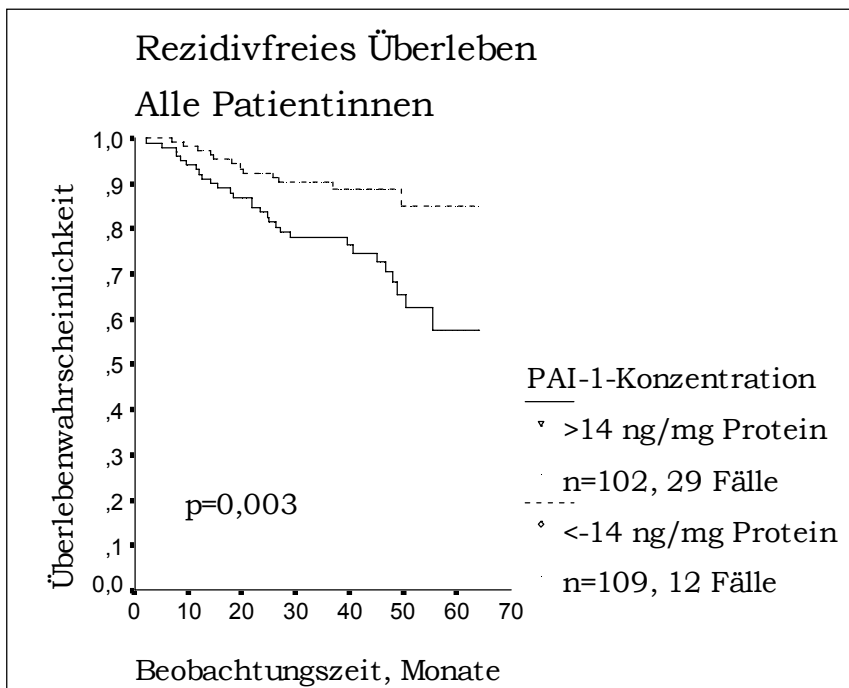


Abb. 21

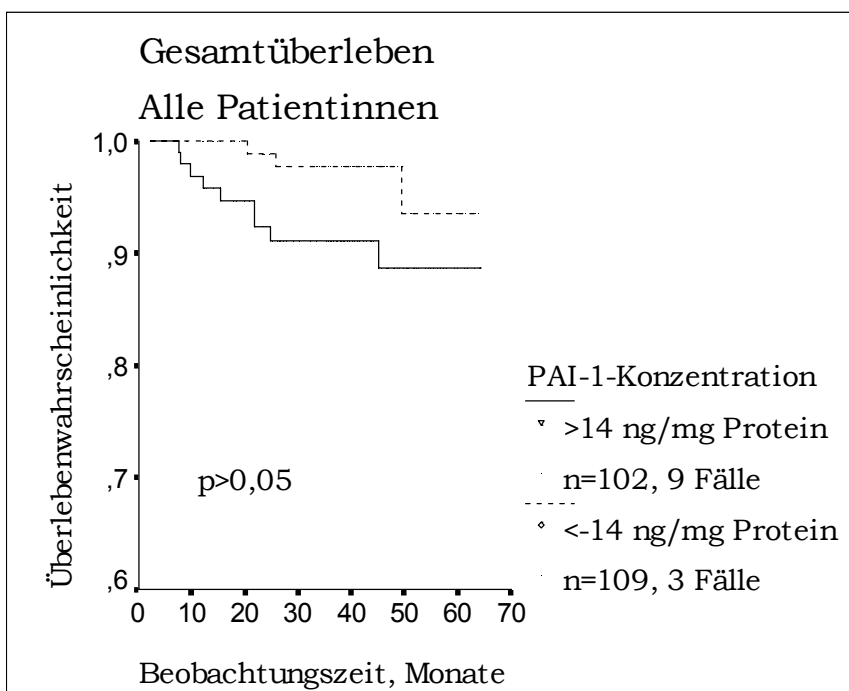


Abb. 22

3.6.2 Univariate Analyse der „klassischen“ Prognoseparameter

Bei der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich in der untersuchten Population ein signifikanter Unterschied für das rezidivfreie (p=0,0001) und das Gesamtüberleben (p=0,006) zwischen den Patientinnen mit positivem und negativem Progesteronrezeptorenbefund (Abb. 9 und 10).

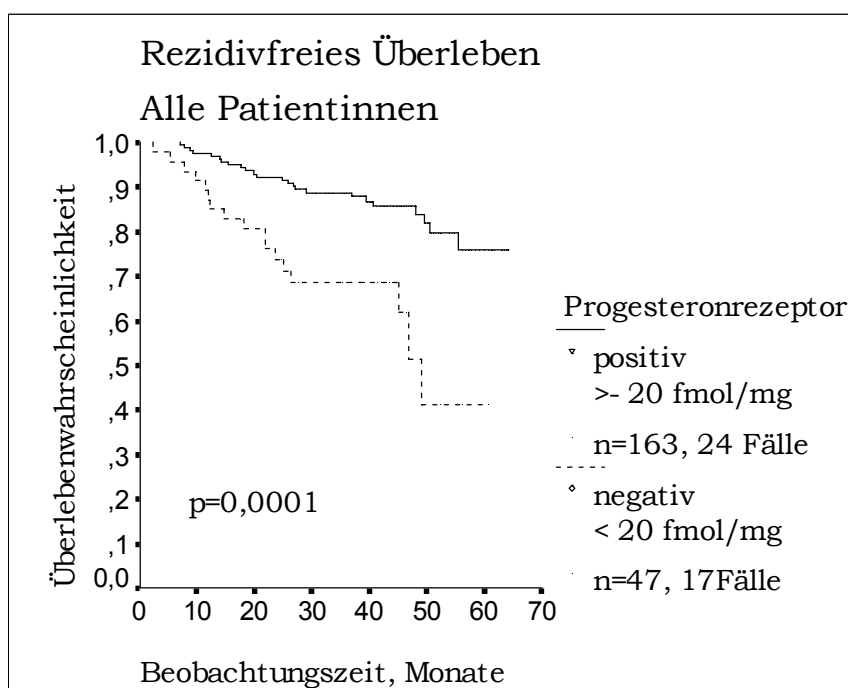


Abb. 9

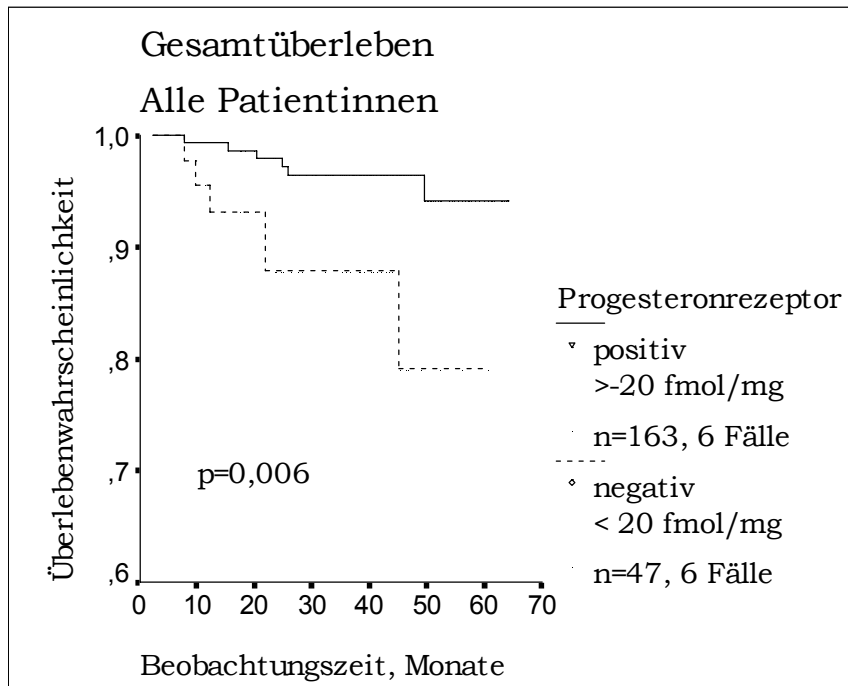


Abb. 10

Für die Östrogenrezeptoren konnte keine statistisch signifikante Beziehung zur Rezidivwahrscheinlichkeit ($p=0,23$) belegt werden. Es war aber ein Trend zu verzeichnen: In der Gruppe der Rezeptornegativen traten die Rezidive im Laufe des ersten postoperativen Jahres häufiger auf als in der Gruppe mit dem positiven Rezeptorbefund. Dieser Trend verlor jedoch mit der Zeit an Bedeutung (Abb. 11). Der Östrogenrezeptorenstatus hatte keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben der Patientinnen (Abb. 12).

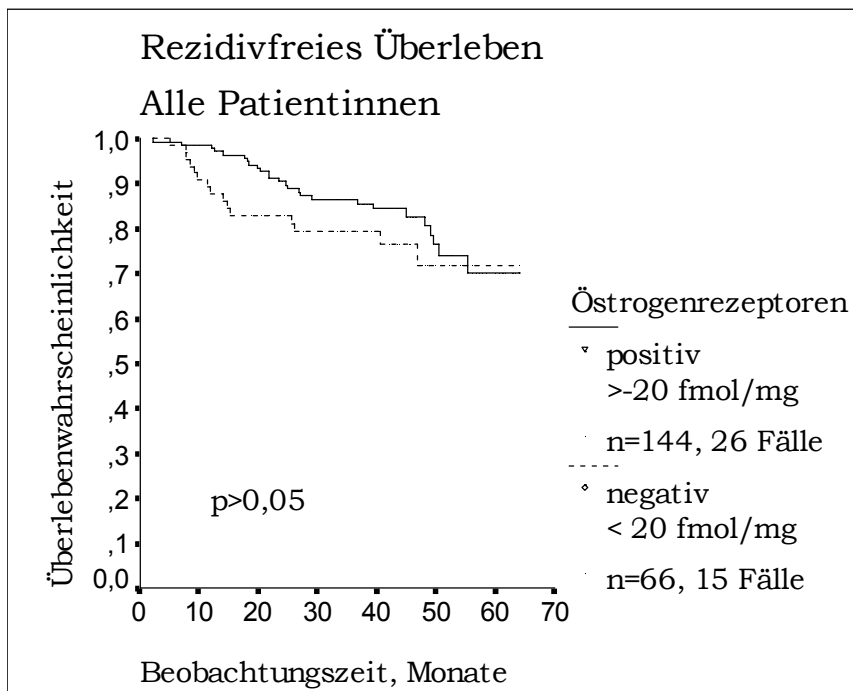


Abb. 11

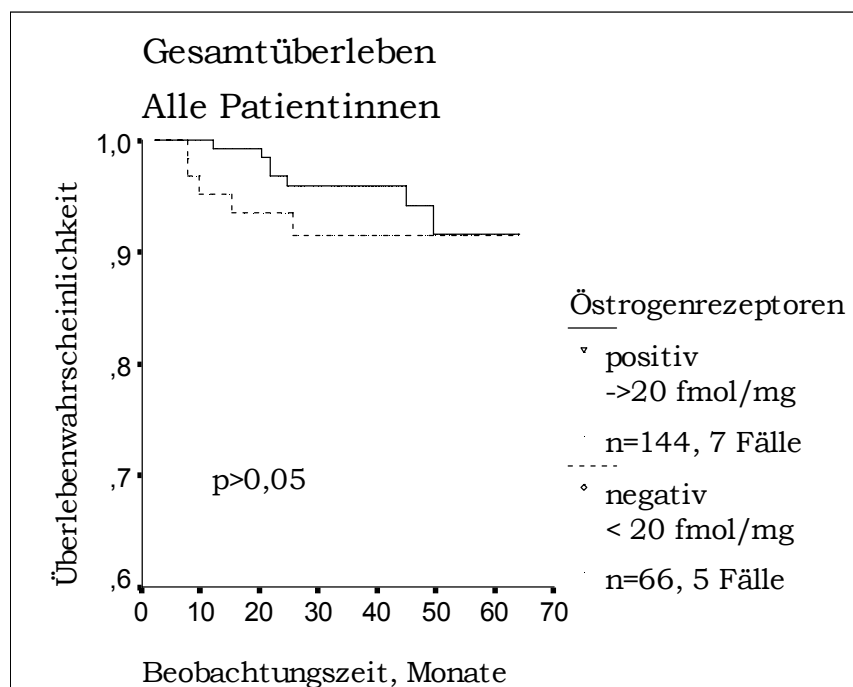


Abb. 12

Die Tumorinvasion in Blut- und Lymphgefäße erwies sich in dieser Stichprobe als ein weiterer prognostisch relevanter Faktor. Patientinnen ohne Angioinvasion hatten eine signifikant längere rezidivfreie Zeit gegenüber Frauen mit Angioinvasion ($p=0,009$) (Abb. 13). Für das Gesamtüberleben wurde keine Abhängigkeit von Angioinvasion festgestellt (Abb. 14).

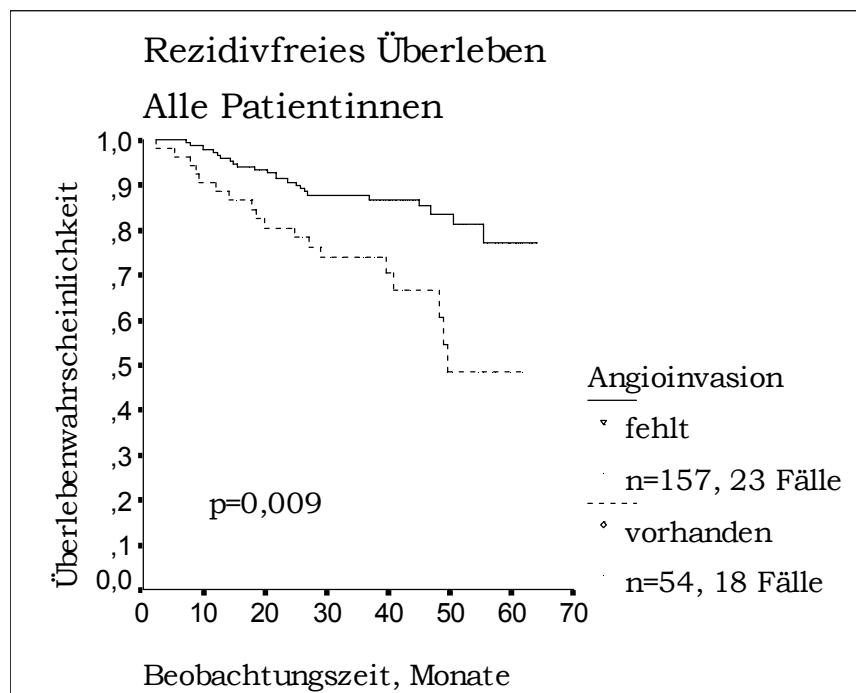


Abb. 13

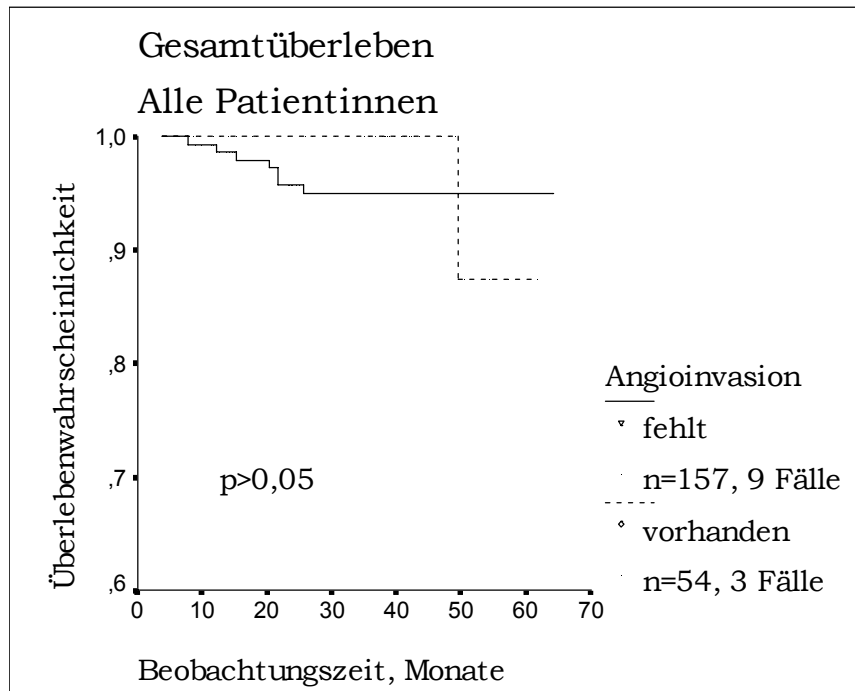


Abb. 14

Patientinnen ohne metastatischen Befall der regionalen Lymphknoten hatten eine signifikant höhere rezidivfreie Überlebenwahrscheinlichkeit ($p=0,023$) im Vergleich zu den Frauen mit einem positiven Lymphknotenbefund (Abb. 15). Der Nodalstatus hatte jedoch keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben im untersuchten Kollektiv (Abb. 16).

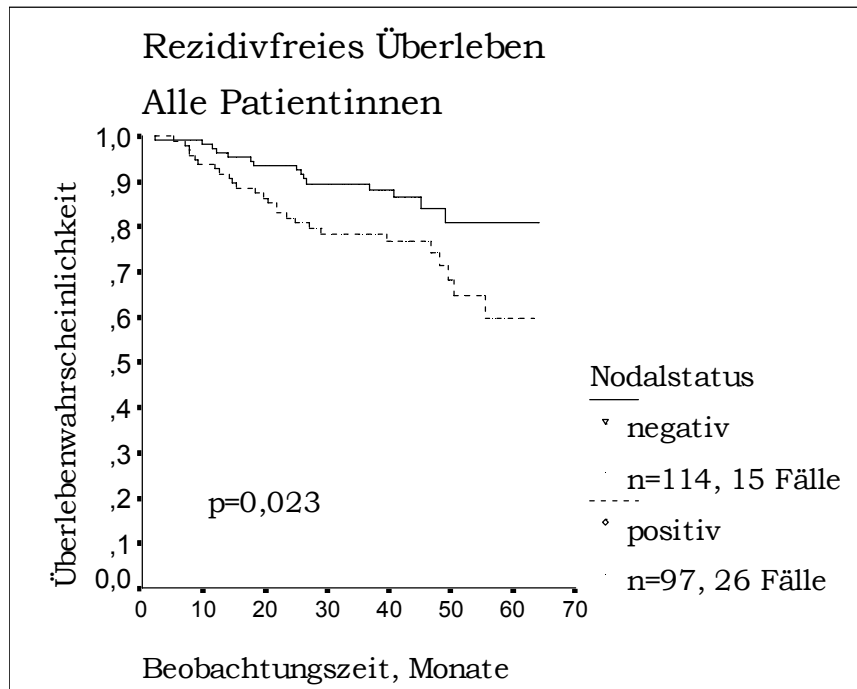


Abb. 15

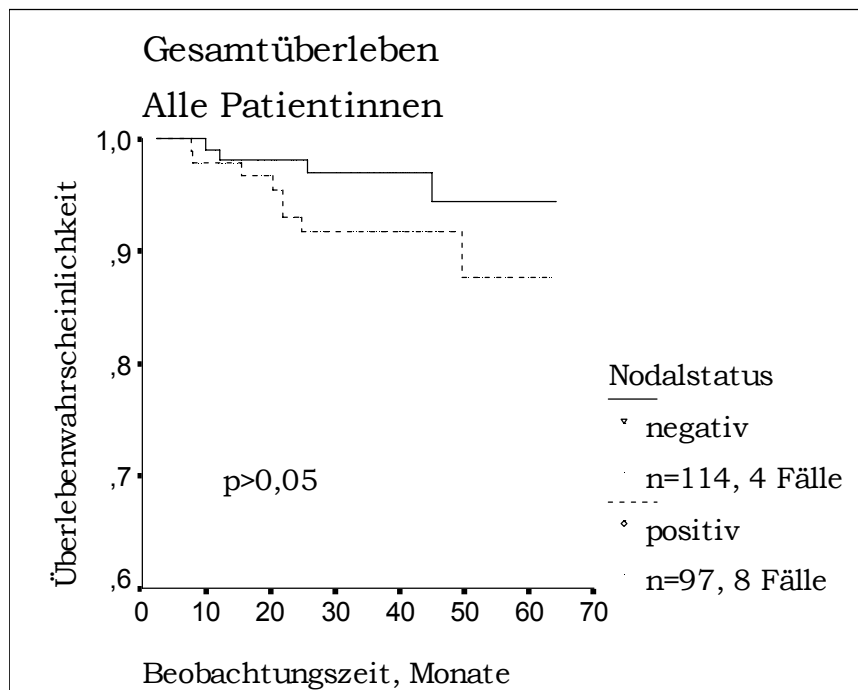


Abb. 16

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit vom histologischen Malignitätsgrad. So hatten Patientinnen, bei deren Tumoren Grading III festgestellt wurde, eine wesentlich größere Wahrscheinlichkeit eines Rezidives im Unterschied zu den Patientinnen mit Grading I und Grading II ($p=0,0025$) (Abb. 17). Der histologische Malignitätsgrad beeinflusste jedoch nicht das Gesamtüberleben (Abb. 18).

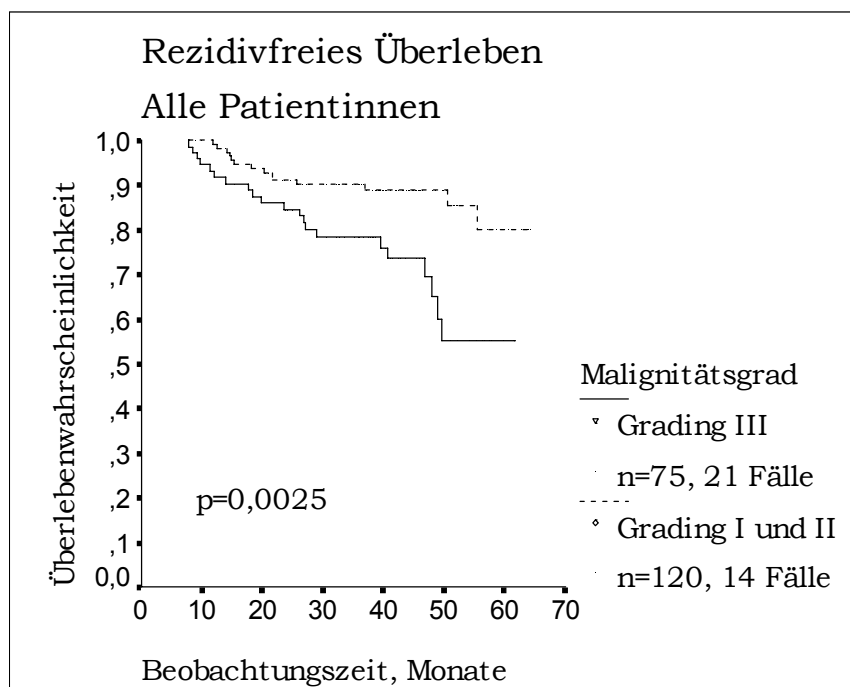


Abb. 17

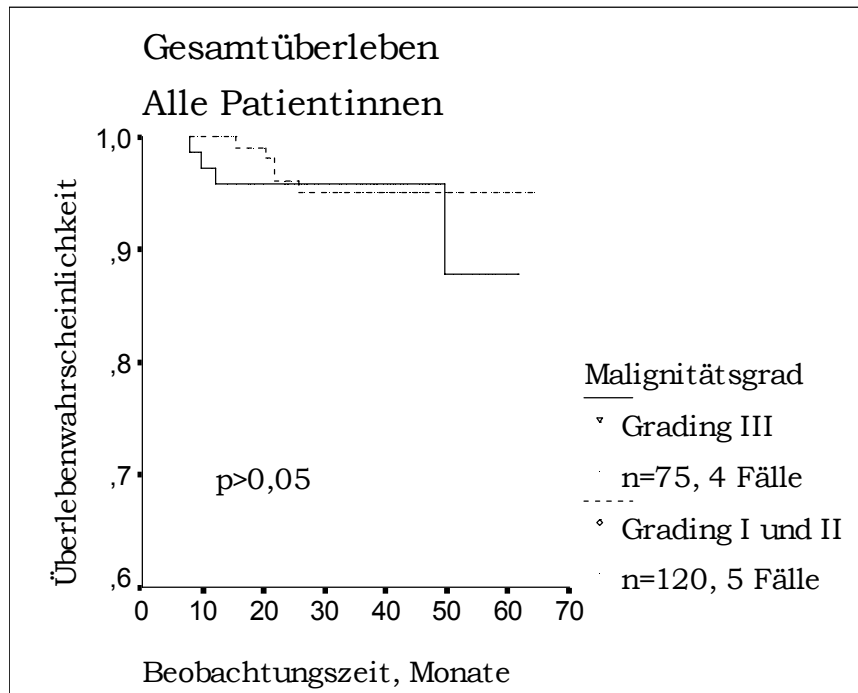


Abb. 18

Andere Prognoseparameter wie Tumordurchmesser ($p > 0,05$) und Menopausenstatus ($p > 0,05$) hatten in der untersuchten Stichprobe keinen Einfluß.

3.6.3 Multiple Regressionsanalyse der uPA-, PAI-Werten und „klassischen“ Prognoseparameter

Bei der multiplen Regressionsanalyse nach dem Cox-Modell wurde der Einfluß der „klassischen“ Prognoseparameter sowie des uPAs und PAI-1 auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben im Patientenkollektiv untersucht. Die Einbeziehung der adjuvanten Therapie als Kovariante in diese Auswertung erlaubte eine Einschätzung der prognostischen Bedeutung der untersuchten Faktoren unabhängig von dieser Therapie. Laut der multivariaten Analyse hatte der histologische Malignitätsgrad die stärkste prognostische Bedeutung ($p=0,003$) hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens. Das relative Risiko für ein Rezidiv war für die Patientinnen mit Grading III 3,2 mal so hoch wie für Frauen mit Grading I und Grading II.

Des weiteren erwies sich der Gehalt an uPA im Tumorzytosol als ein für die Rezidivwahrscheinlichkeit relevanter Faktor ($p=0,002$) mit einem relativen Risiko von 2,7, wenn die uPA-Konzentration 3 ng/mg Protein überschritt.

Auch der Nodalstatus wurde als ein unabhängiger Prognoseparameter für rezidivfreies Überleben in der untersuchten Population bestätigt ($p=0,04$). Das relative Risiko eines Rezidives betrug 1,9 für nodalpositive Frauen im Vergleich zu Nodalnegativen.

Andere Parameter wie PAI-1, Progesteronrezeptoren und Angioinvasion erwiesen sich nicht als unabhängige Faktoren.

Für das Gesamtüberleben wurde die prognostische Bedeutung des uPAs mit einem relativen Risiko von 6,8 ($p=0,0036$) für Patientinnen mit uPA-Konzentration >3 ng/mg Protein, gefolgt vom Progesteronrezeptorstatus mit einem Risiko von 4,1 für rezeptornegative Fälle ($p=0,034$) nachgewiesen.

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse der univariablen und multiplen Regressionsanalysen nach dem Cox-Modell dargestellt.

Anhand der „klassischen“ Prognoseparameter konnten im untersuchten Kollektiv die Untergruppen der Patientinnen mit einem geringen Risiko für ein Krankheitsrezidiv und Tod gebildet werden. Dazu gehören nodalnegative Patientinnen, Patientinnen mit einem histologischen Malignitätsgrad I und II, Patientinnen ohne Angioinvasion und Patientinnen mit einem positiven Progesteronrezeptorenbefund.

Andere „klassische“ Prognoseparameter wie Tumorgröße, Östrogenrezeptorbefund und Menopausenstatus hatten im untersuchten Patientenkollektiv keinen Einfluß auf Überlebenwahrscheinlichkeit. Unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen prognostischen Bedeutung dieser Parameter wurden jedoch drei weitere *low risks* Untergruppen bestimmt.

Weiterhin wurde der prognostische Wert des uPAs und PAI-1 in diesen Patientinnenuntergruppen bewertet.

Tabelle 3.

Variable	Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	Unv. An. 1	Mlv. An. 2	R.R. 3	Unv. An.	Mlv. An.	R.R.
	p	p	(95%CI)	p	p	(95%CI)
uPA ≤3 ng/mg vs. >3 ng/mg	0,0002	0,002	2,7(1,4-5,2)	0,0017	0,003	6,8(1,4-31,5)
PAI-1 ≤14 ng/mg vs. >14 ng/mg	0,0037	0,19	-	0,05	0,64	-
Grading GI und GII vs. G III	0,0001	0,0003	3,2(1,7-6,23)	0,09	0,47	-
Nodalstatus positiv vs. negativ	0,023	0,04	1,9(1,01-3,7)	0,16	0,17	-
PGR 4 positiv vs. negativ	0,0005	0,058	-	0,0056	0,034	3,5(1,1-11,4)
Angioinvasion fehlt vs. vorhanden	0,001	0,28	-	0,87	0,7	-

1 - univariate Analyse nach Cox

2 - multivariate Analyse nach Cox

3 - Relatives Risiko

4 - Progesteronrezeptoren

3.7 Prognostischer Wert des uPAs , PAI-1 und der "klassischen" Prognoseparameter in den Patientinnengruppen mit einem geringen Risiko

3.7.1 Nodalnegative Patientinnen

Bei der univariaten Analyse in dieser Gruppe (n=107) hatte der uPA-Wert eine signifikante prognostische Bedeutung, sowohl für ein Rezidiv (p=0,02) wie für das Gesamtüberleben (p=0,01) (Abb. 23 und 24). Im Hinblick auf die rezidivfreie Zeit war für PAI-1 ein Trend zugunsten der Patientinnen mit einem PAI-1-Wert unterhalb des *cut-off level* zu beobachten. Das Signifikanzniveau lag jedoch oberhalb der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p=0,1) (Abb. 25). PAI-1 zeigte keinen Einfluß auf das Gesamtüberleben (p=0,25) (Abb. 26).

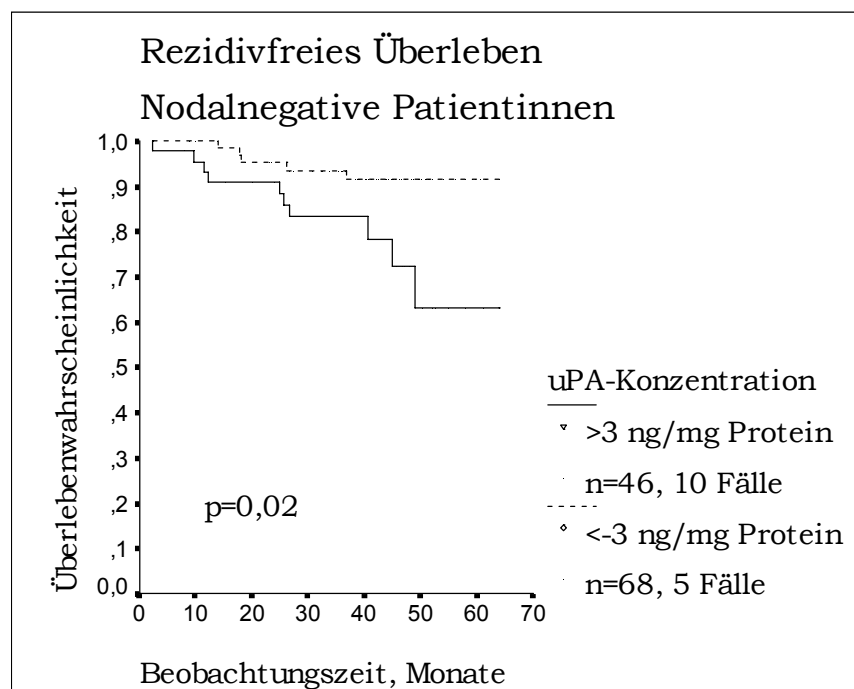


Abb. 23

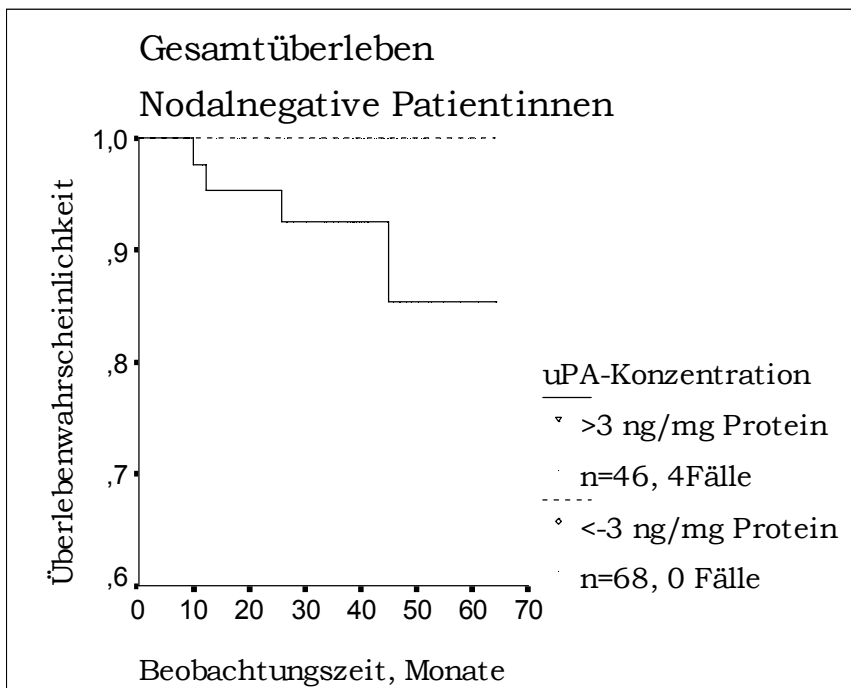


Abb. 24

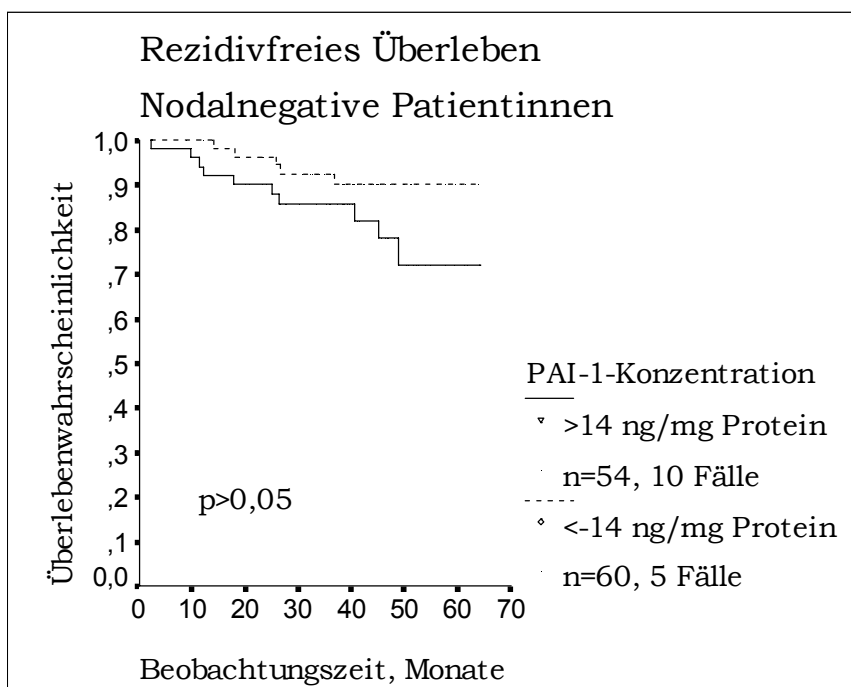


Abb. 25

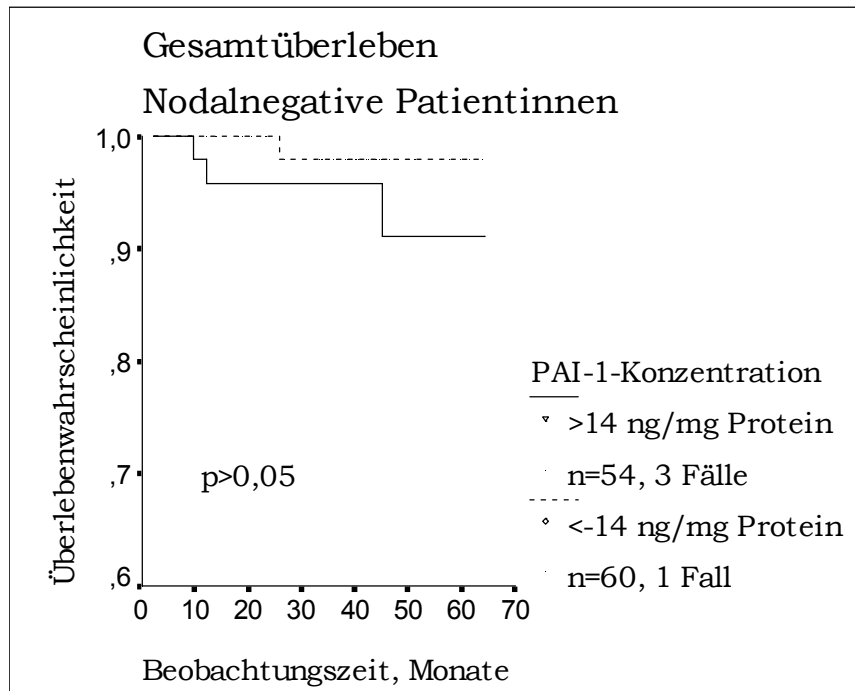


Abb. 26

Mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse nach dem Cox-Modell, bei der andere prognostische Variablen wie Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus, histologischer Malignitätsgrad, Angioinvasion, Tumorgröße, Menopausenstatus und adjuvante Therapie miteinbezogen wurden, wurde festgestellt, daß der Progesteronrezeptorstatus ($p=0,01$) und der histologische Malignitätsgrad ($p=0,007$) das Rezidivrisiko in dieser Patientinnengruppe am stärksten beeinflussen. Der Progesteronrezeptor hatte auch eine signifikante Bedeutung für das Gesamtüberleben ($p=0,047$).

3.7.2 Patientinnen mit Grading I und Grading II

In dieser Patientinnengruppe (n=126) konnte weder für uPA noch für PAI-1 eine signifikante Beziehung zum rezidivfreien oder Gesamtüberleben (Abb. 27, 28, 29 und 30) festgestellt werden.

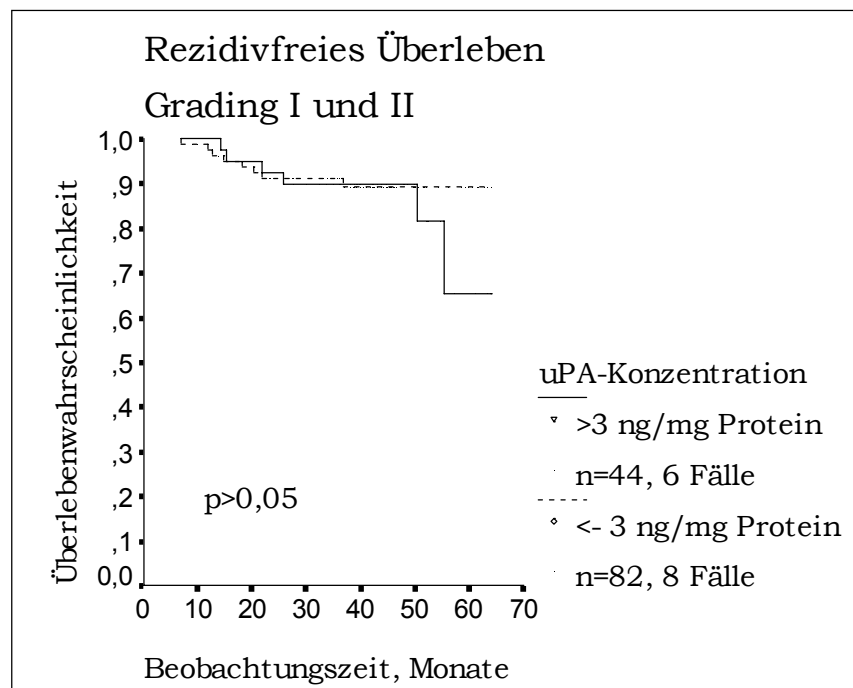


Abb. 27

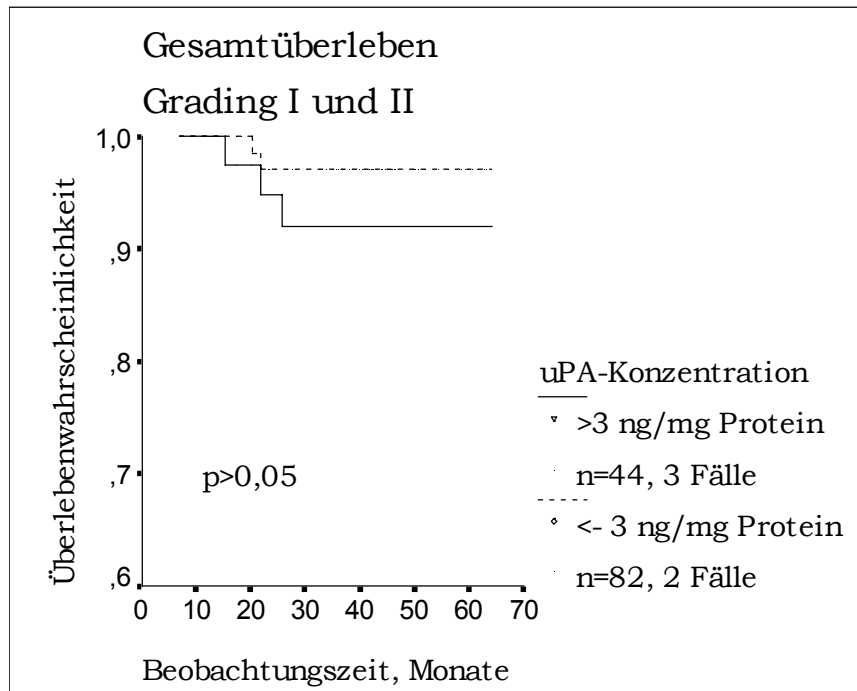


Abb. 28

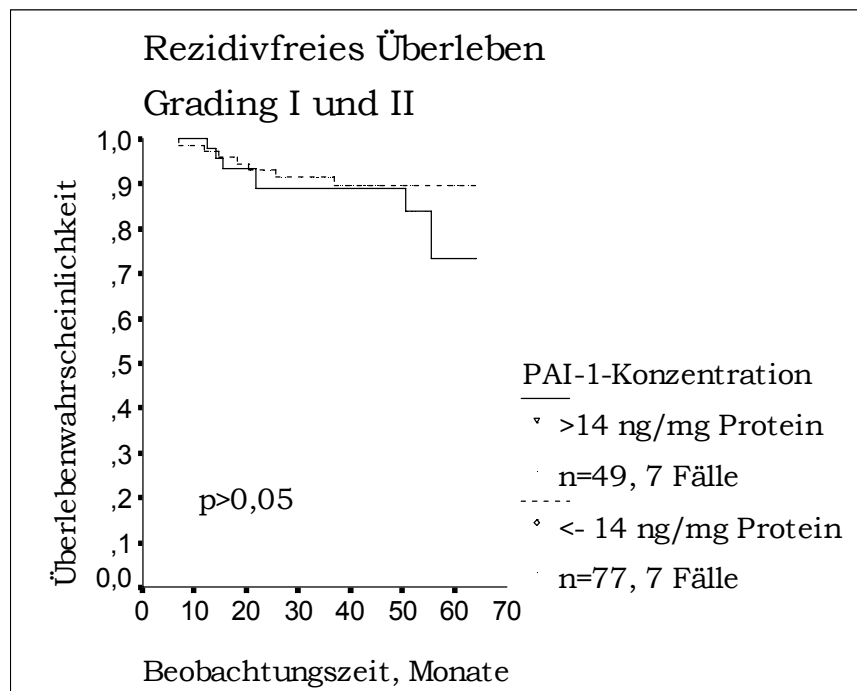


Abb. 29

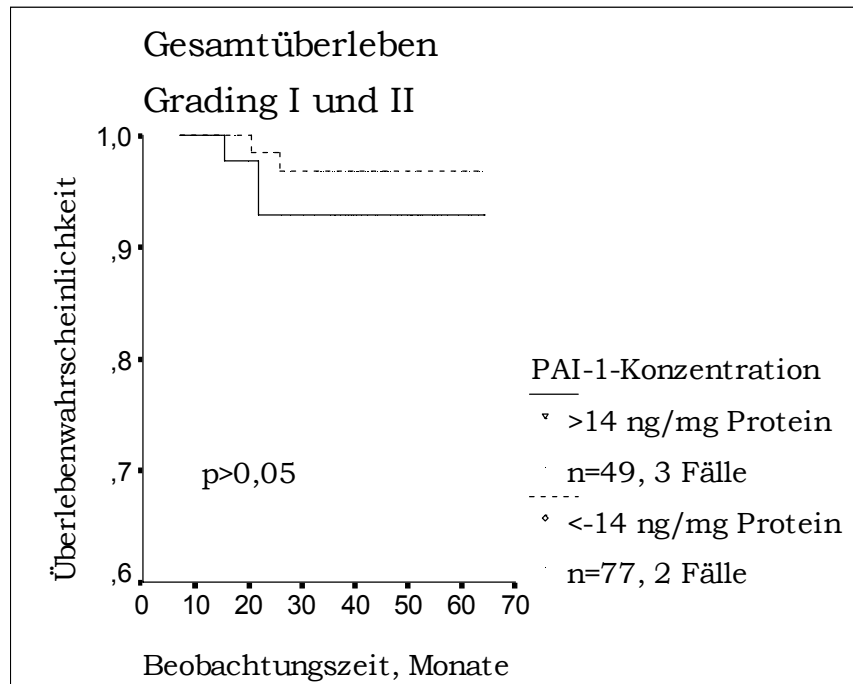


Abb. 30

Laut der multivariaten Analyse war das Risiko eines Rezidives in dieser Untergruppe deutlich von dem Nodalstatus ($p=0,01$) und von dem Progesteronrezeptorstatus ($p=0,01$) abhängig. Das Gesamtüberleben hatte keinen Bezug zu den untersuchten Faktoren.

3.7.3 Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptor

Für die 157 Frauen dieser Gruppe wurde bei der univariaten Analyse sowohl für uPA ($p=0,005$) wie für PAI-1 ($p=0,02$) eine deutliche prognostische Bedeutung in Bezug auf Rezidivrate bestätigt (Abb. 31 und 33). Der uPA-Wert zeigte im Gegensatz zu PAI-1 ($p=0,8$) auch einen Einfluß auf das Gesamtüberleben in dieser Gruppe ($p=0,02$) (Abb. 32 und 34).

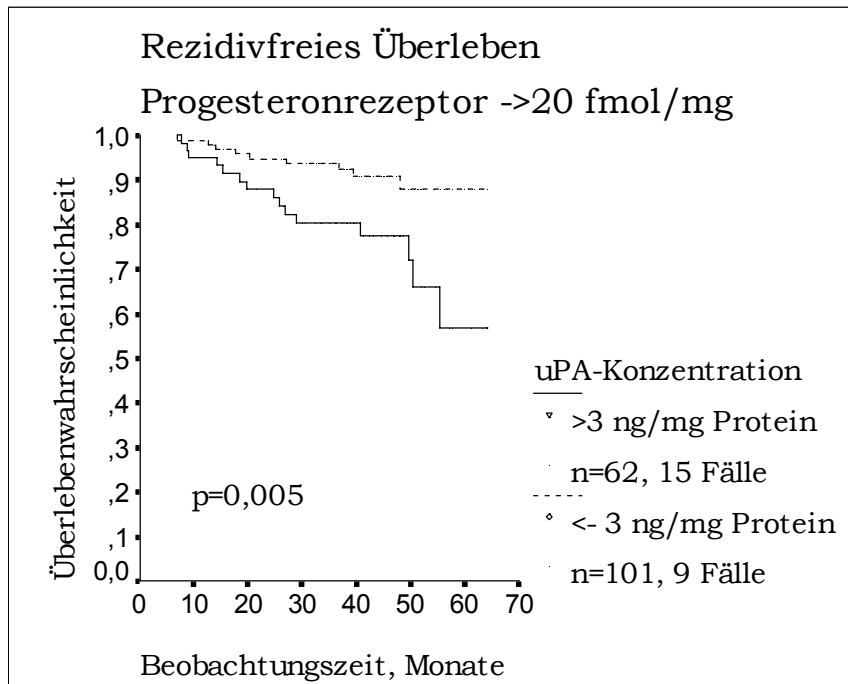


Abb. 31

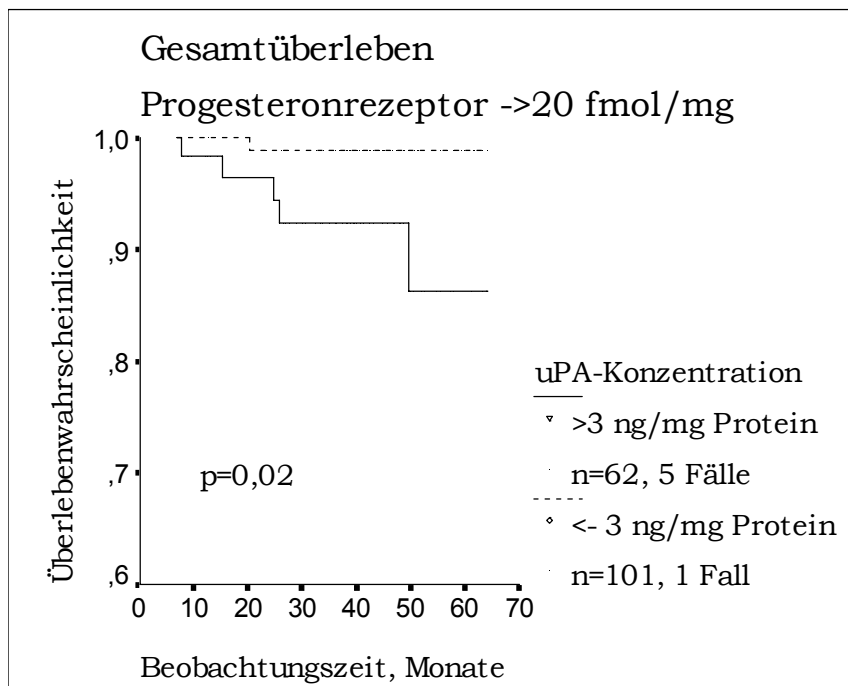


Abb. 32

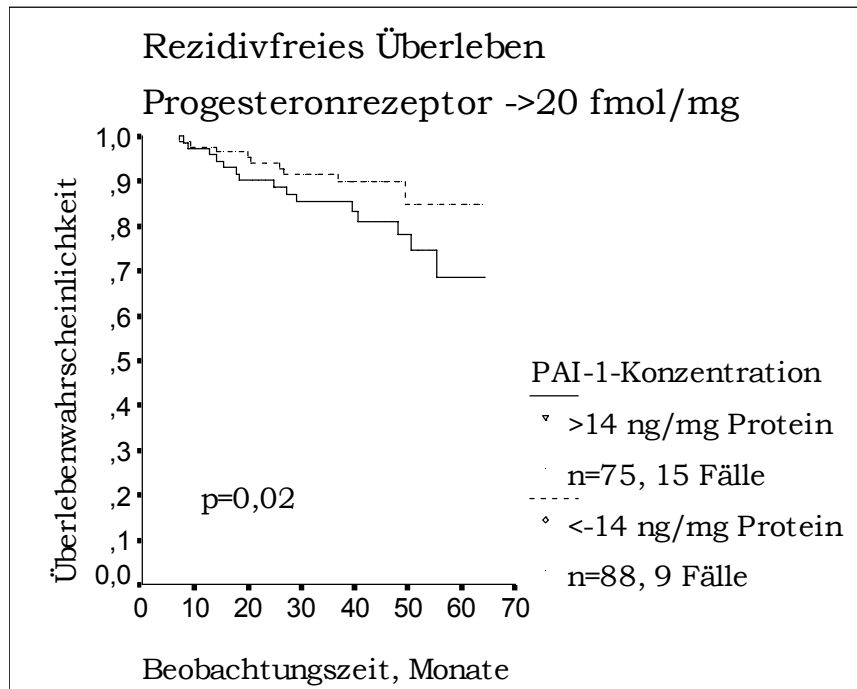


Abb. 33

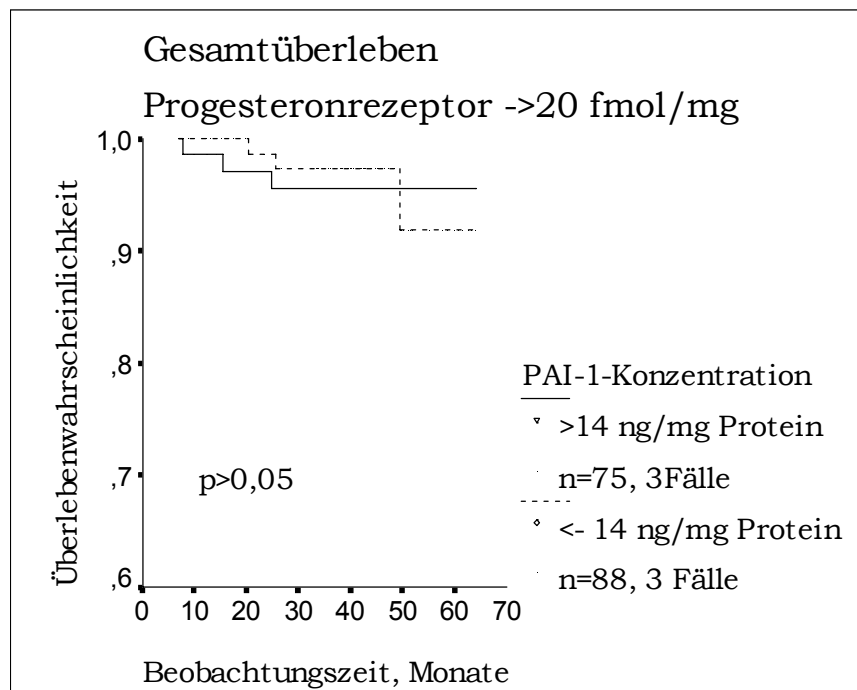


Abb. 34

Auch unter der Berücksichtigung der anderen Faktoren blieb uPA als einer der stärksten Prognoseparameter für die rezidivfreie Zeit ($p=0,007$) und als einziger Indikator für das Gesamtüberleben ($p=0,02$) dieser Patientinnen. Das Risiko eines Rezidives wurde auch durch den Nodalstatus ($p=0,04$) und den histologischen Malignitätsgrad ($p=0,006$) beeinflusst.

3.7.4 Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptor

Sowohl uPA wie PAI-1 beeinflussten bei den östrogenrezeptorpositiven Frauen die rezidivfreie Überlebenwahrscheinlichkeit ($p=0,02$ für uPA und PAI-1) (Abb. 35 und 37). Dagegen war das Gesamtüberleben dieser Gruppe unabhängig von beiden Faktoren (Abb. 36 und 38).

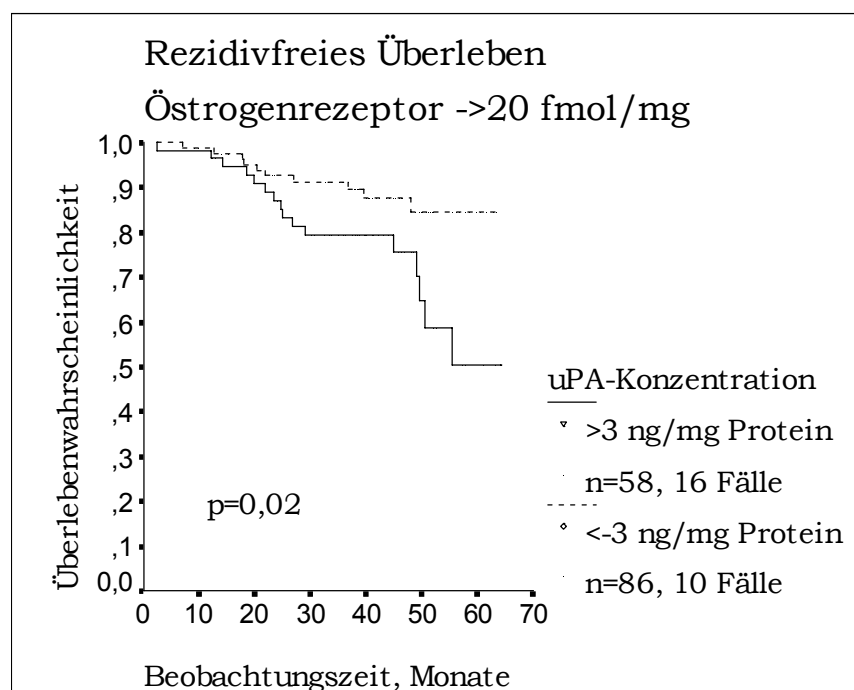


Abb. 35

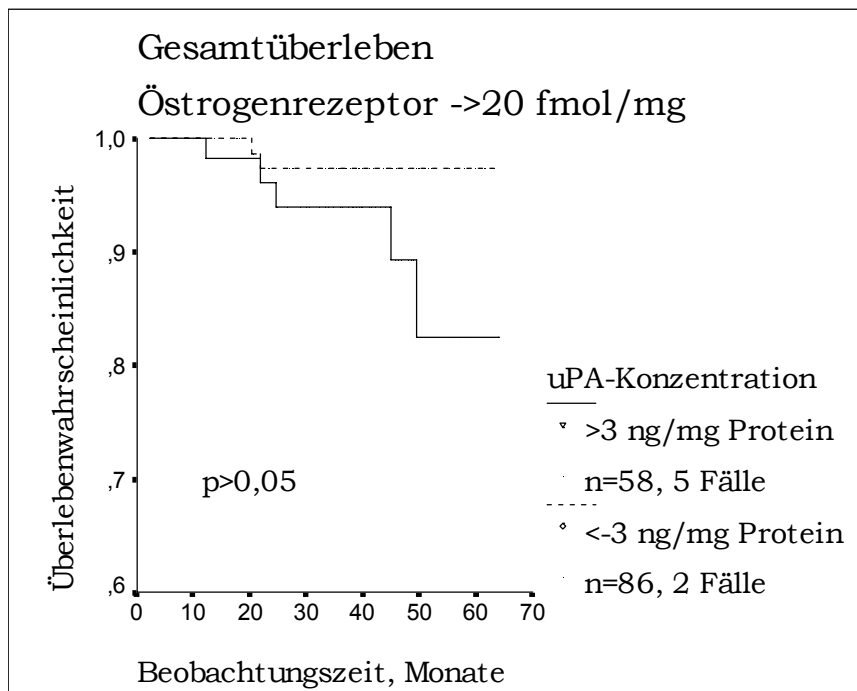


Abb. 36

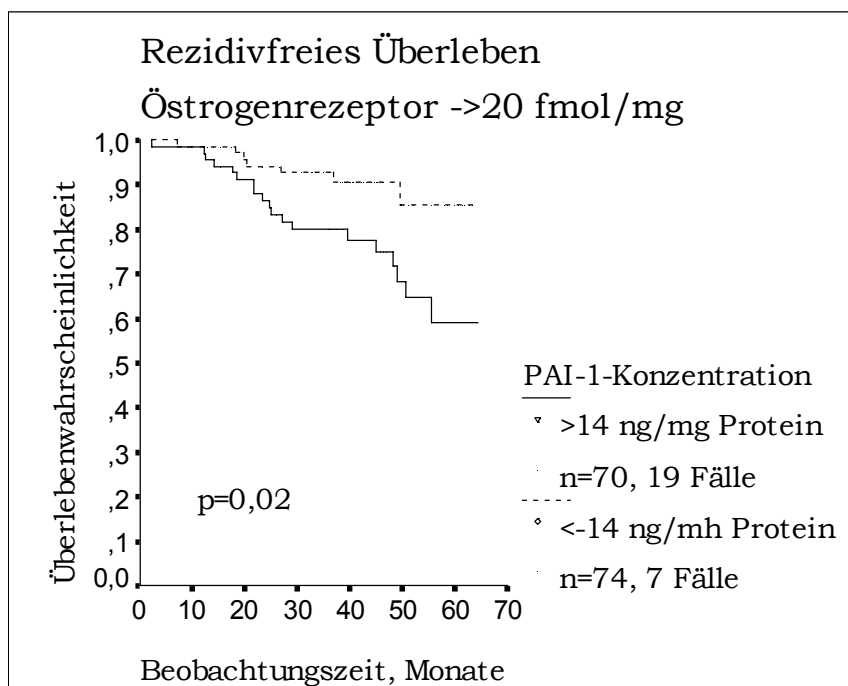


Abb. 37

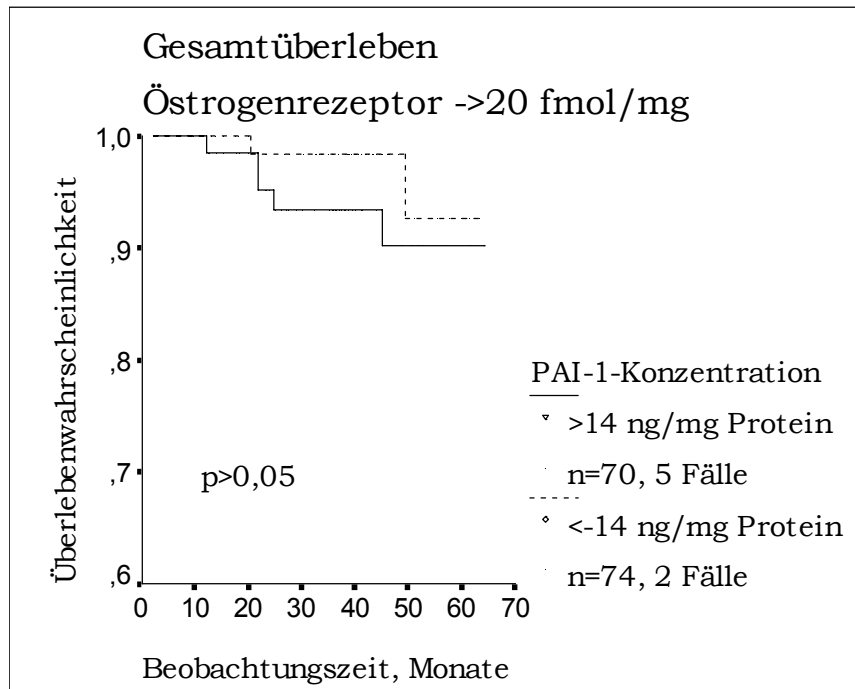


Abb. 38

3.7.5 Patientinnen ohne Angioinvasion

Bei den Patientinnen ohne Angioinvasion mit hohen uPA- und/oder PAI-1-Werten wurde eine niedrigere Überlebenwahrscheinlichkeit für sowohl das rezidivfreie Überleben ($p=0,007$ für uPA, $p=0,02$ für PAI-1) (Abb. 39 und 41) wie das Gesamtüberleben ($p=0,02$ für uPA, $p=0,045$ für PAI-1), nachgewiesen (Abb. 40 und 42).

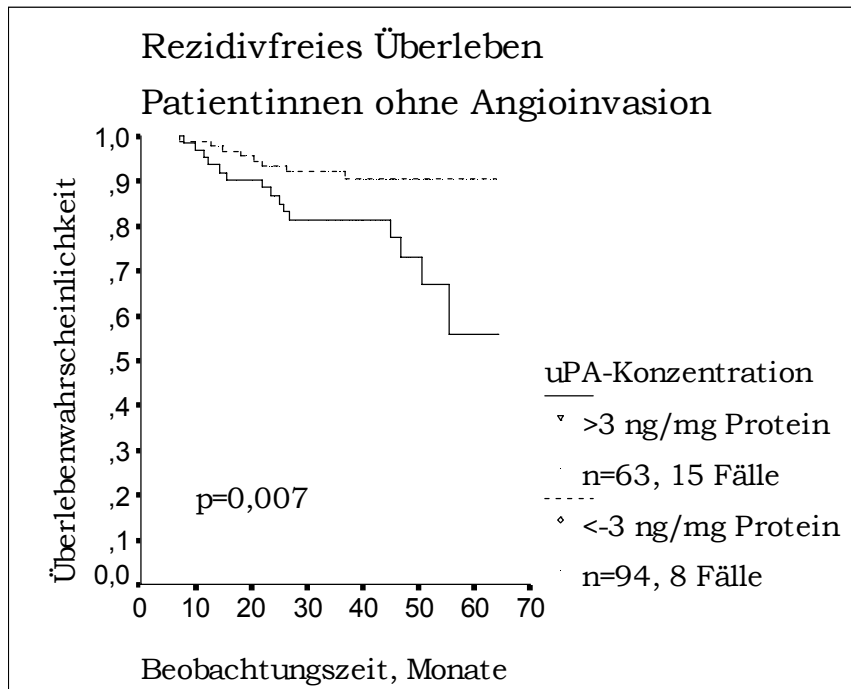


Abb. 39

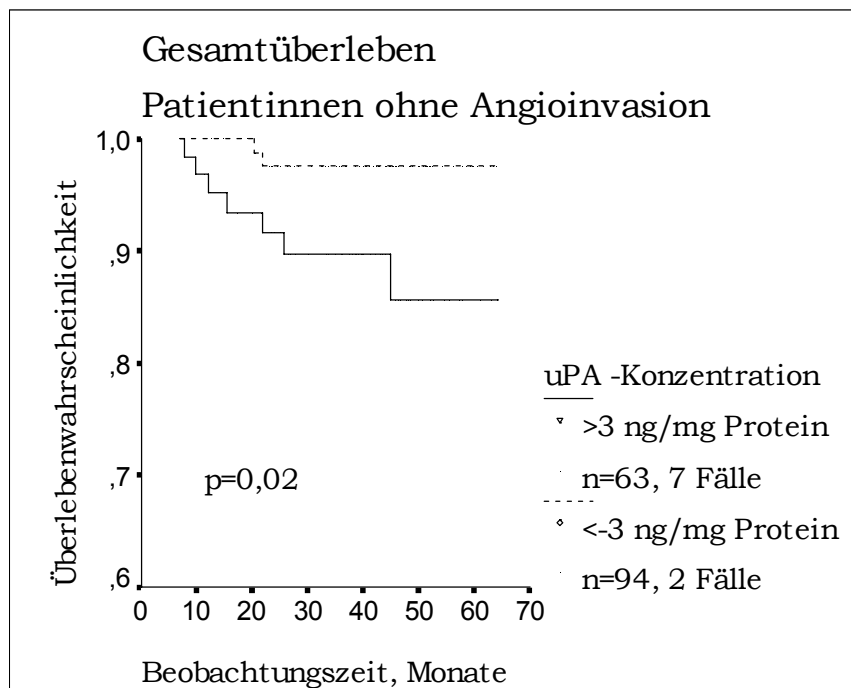


Abb. 40

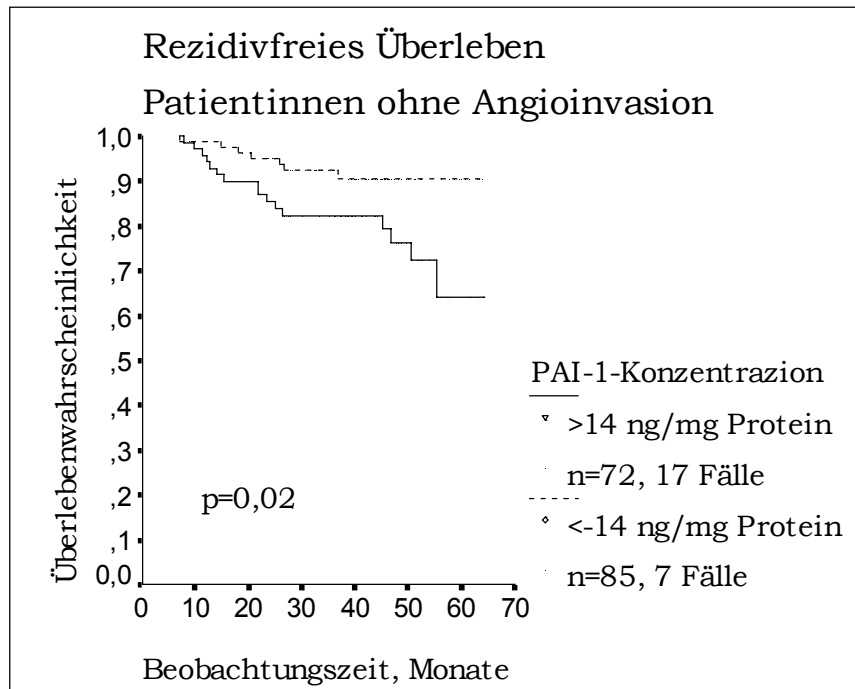


Abb. 41

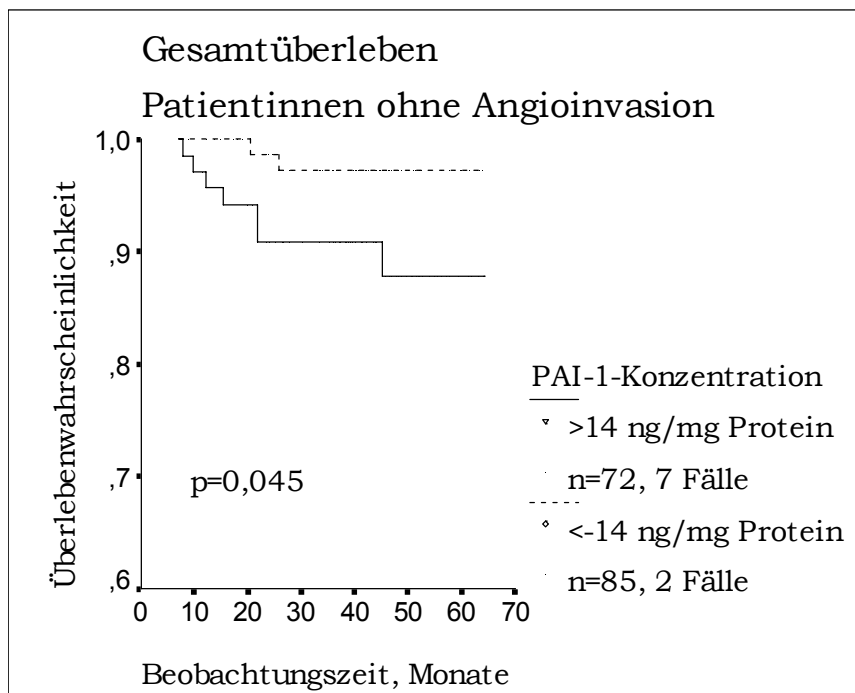


Abb. 42

3.7.6 Postmenopausale Frauen

Beide untersuchten Faktoren, uPA und PAI-1, beeinflussten die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens der postmenopausalen Frauen ($p=0,008$ und $p=0,007$) (Abb. 43 und 45). Auch das Gesamtüberleben in der Gruppe hatte eine signifikante Beziehung zu den uPA- ($p=0,009$) und PAI-1-Werten ($p=0,04$) (Abb. 44 und 46).

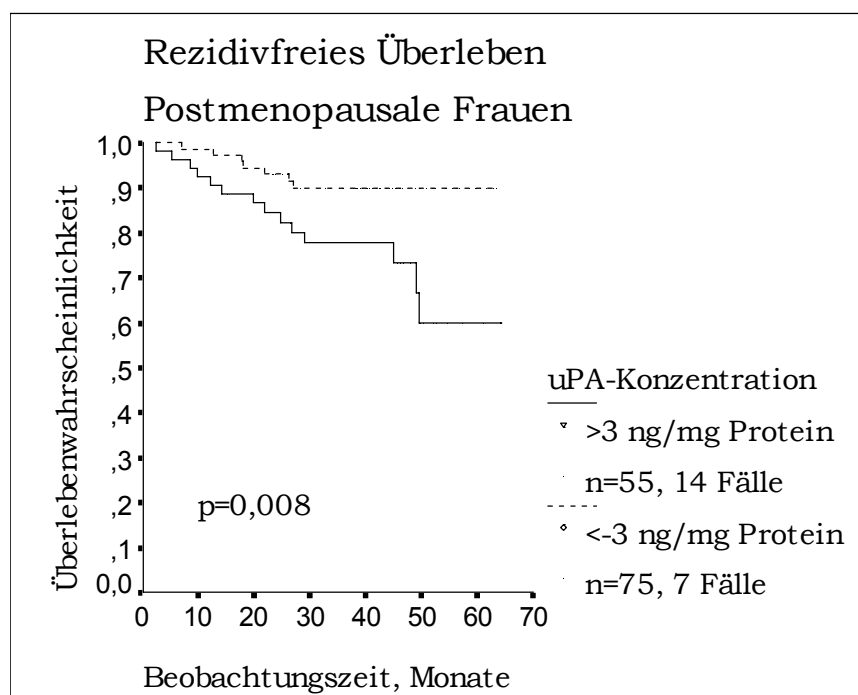


Abb. 43

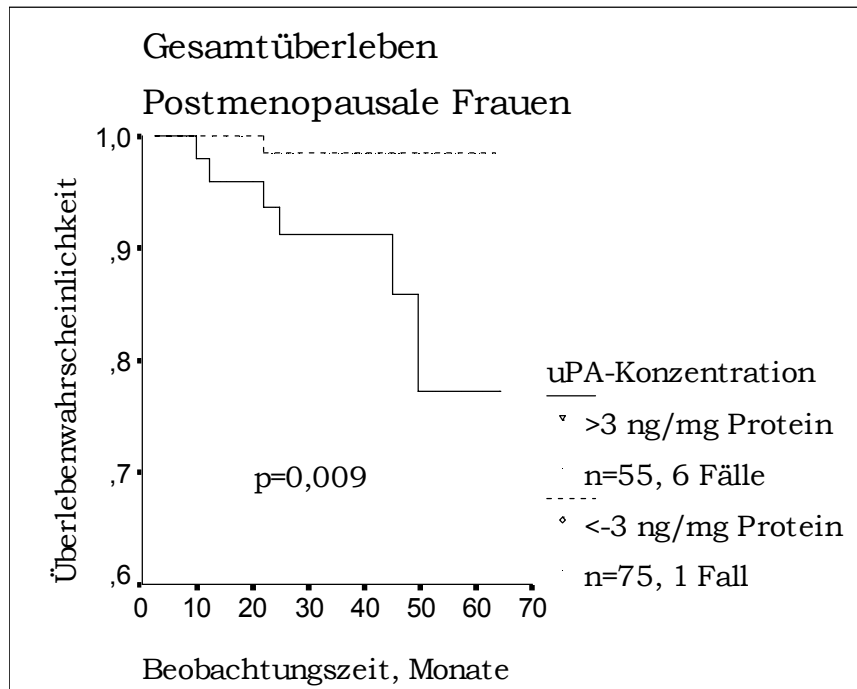


Abb. 44

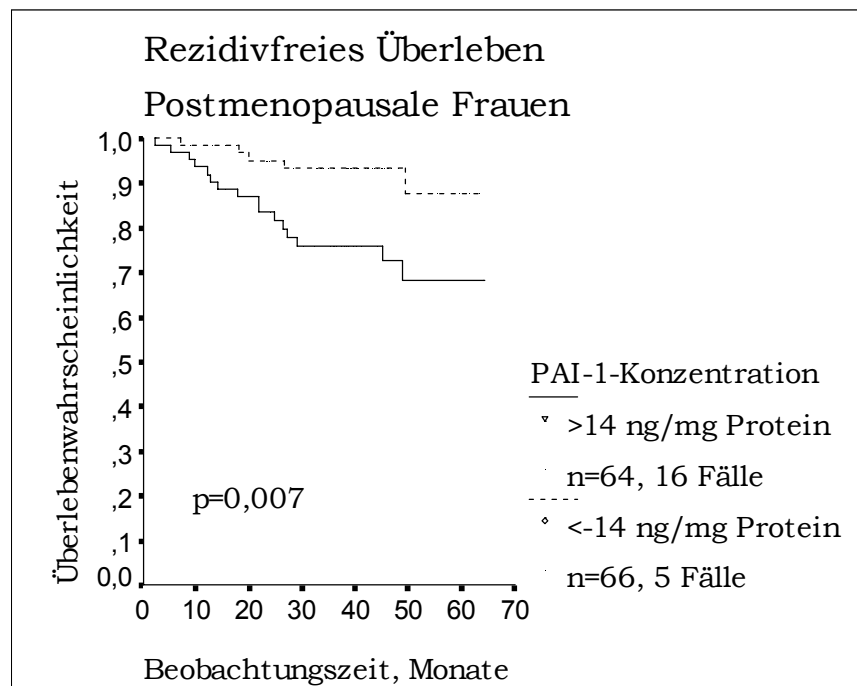


Abb. 45

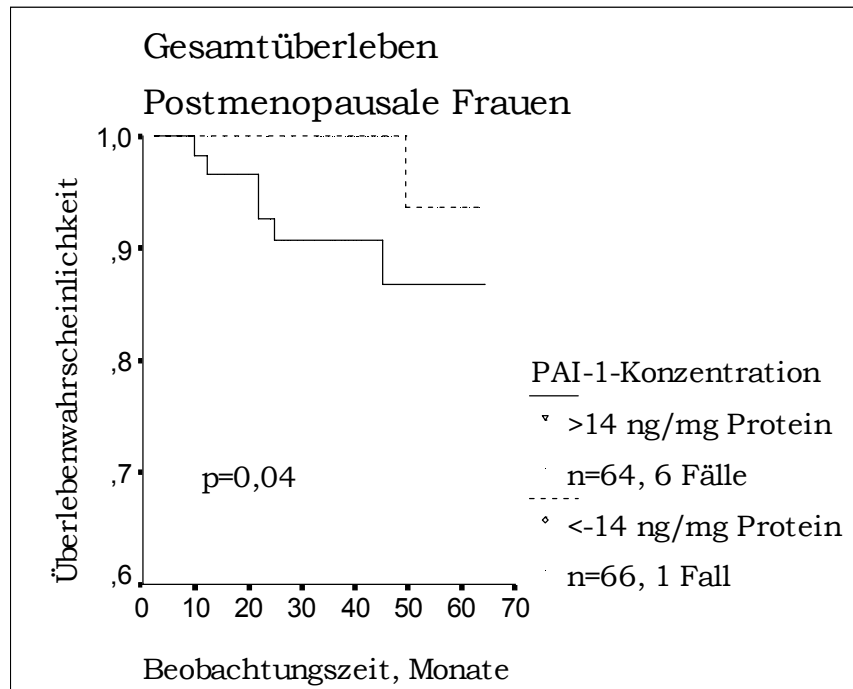


Abb. 46

3.7.7 Patientinnen mit Tumorstadium pT1

Weder das rezidivfreie noch das Gesamtüberleben der Patientinnen mit der Tumorgröße ≤ 20 mm waren von dem Gehalt an uPA und/oder PAI-1 im Tumorcytosol abhängig. Das Signifikanzniveau dieser Tests lag deutlich über 0,05.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Überlebensanalyse in den *low-risk*-Gruppen zusammengefaßt.

Tabelle 5

UNIVARIATE UND MULTIVARIATE BEDEUTUNG VON uPA UND PAI-1 IN DEN UNTERGRUPPEN MIT EINEM GERINGEM REZIDIVRISIKO

Patientengruppe	uPA						PAI-1					
	Univariate Analyse		Multivariate Analyse				Univariate Analyse		Multivariate Analyse			
	RFÜ ¹	GÜ ²	RFÜ	R.R. ³ (95%CI ⁴)	GÜ (95%CI)	R:R (95%CI)	RFÜ	GÜ	RFÜ	R.R. (95%CI)	GÜ	R:R (95%CI)
Nodalnegative n=114	0,018	0,01	n.s. ⁵	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	-
Angioinvasion negativ n=157	0,007	0,02	n.s.	-	0,04	4,5(0,9-22,6)	0,02	0,04	0,03	2,6(1,1-6,4)	n.s.	-
Progesteronrezeptor positiv n=157	0,005	0,02	0,007	3,9(1,3-7,1)	0,02	8,7(1,0-74,6)	0,02	n.s.	n.s.	-	n.s.	-
Östrogenrezeptor positiv n=143	0,02	n.s.	n.s.	-	n.s.	-	0,02	n.s.	n.s.	-	n.s.	-
Postmenopausale n=130	0,008	0,009	0,04	2,5(1,3-6,4)	n.s.	-	0,07	0,04	n.s.	-	0,01	9,5(1,1-89)
Grading I und II n=143	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	
Tumgröße pT1 n=48	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	-

¹ RFÜ - rezidivfreies Überleben
² GÜ - Gesamtüberleben

³ R.R. - Relatives Risiko
⁴ CI - *confidence interval*

⁵ n.s. - Signifikanzniveau <0,05

Tabelle 6

UNABHÄNGIGE PROGNOSEPARAMETER IN DEN UNTERGRUPPEN MIT GERINGEM REZIDIVRISIKO

Patientengruppe	Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
	Faktor	p ¹	R.R. ² (95%CI) ³	Faktor	p	R.R. (95%CI)
Nodalnegative n=114	PgR-Status	0,01	3,9(1,3-11,5)	PgR-Status	0,047	9,9(1,0-97,1)
	Grading	0,01	5,1(1,4-19,2)			
Grading I und II n=143	PgR-Status	0,01	4,8(1,6-14,8)	-	-	-
	Nodalstatus	0,01	4,3(1,2-15,8)			
PgR-positive n=157	uPA	0,007	3,1(1,3-7,1)	uPA	0,02	8,7(1,0-74,6)
	Grading	0,006	4,1(1,8-9,6)			
	Nodalstatus	0,004	3,6(1,4-9,1)			
ER-positiv n=143	PgR-Status	0,003	4,1(1,7-9,9)	PgR-Status	0,002	12,3(2,9-58,2)
	Nodalstatus	0,03	2,4(1,1-5,5)			
	Grading	0,007	3,0(1,3-6,8)			
Angioinvasion negativ n=157	PAI-1	0,03	2,6(1,1-6,4)	uPA	0,042	4,5(0,9-22,6)
	PgR-Status	0,002				
Postmenopusal n=130	uPA	0,04	2,6(1,0-6,5)	PAI-1	0,01	9,5(1,3-89,3)
	Grading	0,007	3,7(1,4-10,1)			

¹ p-Signifikanzniveau² R.R.-relatives Risiko³ CI-confidence interval

4 Diskussion

Die klinische Bedeutung von Prognosefaktoren liegt darin, daß sie es ermöglichen, das Risiko für ein Rezidiv oder ein Versterben abzuschätzen. Der Befund zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder Primärbehandlung kann also über die Aggressivität des Tumors und damit über die Risiken der Tumorpatientinnen Auskunft geben. In dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der Protease Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und seines Inhibitors vom Typ-1 (PAI-1) anhand eines Patientinnenkollektives mit primärem Mammakarzinom untersucht und mit den sogenannten „klassischen“ Prognoseparameter verglichen.

Die Vorgänge der Invasion von Tumorzellen mit Abbau des Tumorstromas und der Metastasierung mit nachfolgender Bildung eines sekundären Tumorstromas basieren auf einem balancierten Verhältnis der Proteasen, ihrer Rezeptoren und Inhibitoren (102). Proteasen wie Metalloproteasen, Kathepsine, Thrombin, Plasmin, uPA, und ihre Inhibitoren spielen eine Schlüsselrolle bei der Invasion und Metastasierung solider Tumoren (72, 101). Viele experimentelle Studien zur Tumorzellbiologie weisen auf eine bedeutende Rolle des uPA, seines an der Zelloberfläche gebundenen Rezeptors (uPA-R) und des PAI-1 bei diesem Vorgang hin (48, 122, 123, 124). Eine Überexpression des uPA-R an der Oberfläche von Mammakarzinomzellen hat in einem experimentellen Modell eine Zunahme der Tumordinvasion und der metastatischen Potenz zufolge (103). Es wurde auch gezeigt, daß die Überexpression von uPA-R an der Oberfläche der Karzinom- und auch Stromazellen mit einer kürzeren rezidivfreien Zeit assoziiert ist (118). Die Interaktion des uPA mit dem uPA-R führt zur fokalen Proteolyse in der Umgebung der Karzinomzelle

und fördert somit Tumorinvasion und Metastasierung (119). Eine der neusten Studien von *Allgayer et al.* zeigt den im Knochenmark der Magenkarzinompatienten nachgewiesenen uPA-R als einen starken Indikator hinsichtlich einer späteren Metastasierung (120). Die Bedeutung des PAI-1 bei der Tumorinvasion und Metastasierung besteht unter anderem darin, die tumorinduzierte Proteasen zu hemmen und Bildung von neuem Tumorstroma am Ort der Metastasierung zu ermöglichen (104).

Neue Untersuchungen deuten auf weitere Wirkungsmechanismen des PAI-1 bei der Metastasierung hin: So soll PAI-1 die Bindung der uPA-R zu einem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, Vitronektin, fördern (105) und außerdem die Verknüpfung der malignen Zellen mit der Matrix lösen und somit Zellmigration erleichtern (106).

Diese Erkenntnisse betonen den starken Einfluß des PAI-1 auf die Malignität der Tumorzellen und stimmen mit den Beobachtungen überein, daß uPA und PAI-1 fokale Tumorinvasion (102) und Aktivierung der Angiogenesis (107) begünstigen. Mehrere wissenschaftliche Publikationen belegen die Assoziation zwischen den erhöhten uPA- und PAI-1-Werten im Tumorgewebe und der Verkürzung der rezidivfreien Zeit und des Gesamtüberlebens der Mammakarzinompatientinnen (55, 56, 69, 70, 90).

In der vorliegenden Arbeit wurde uPA erneut als unabhängiger Prognosefaktor sowohl für rezidivfreies als auch für Gesamtüberleben der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom bestätigt. Auch für PAI-1 wurde bei der univarianten Analyse ein signifikanter Einfluß auf die Rezidivrate nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den meisten Publikationen zur prognostischen Relevanz von uPA und PAI-1 wurde in der präsentierten Arbeit bewusst auf eine Optimierung der *cut-off* Werte verzichtet. Die verwendeten Grenzwerte von 3,0 ng/mg Protein für uPA und 14,0 ng/mg Protein für PAI-1

entsprechen den von der deutschen multizentrischen Studiengruppe zur adjuvanten Chemotherapie bei nodalnegativem Mammakarzinom (*ChemoNO-Studie*) empfohlenen Werten. Damit wurde ein wichtiges Kriterium einer *Confirmatory Study* erfüllt.

Eine starke Korrelation zwischen uPA und PAI-1, wie sie in den vielen Publikationen zu diesem Thema beschrieben wurde (42, 55, 69, 70, 72), konnten wir ebenfalls anhand des untersuchten Patientenkollektives bestätigen. Weder für uPA noch für PAI-1 bestand im untersuchten Kollektiv, ähnlich wie in den früher publizierten Arbeiten (55, 90, 69), eine Korrelation zum Nodalstatus. In einigen Publikationen wurde auch eine Assoziation zwischen beiden Proteasen und negativem Progesteronrezeptorstatus (69, 90) beschrieben. Im untersuchten Kollektiv war diese Beziehung für uPA wie für PAI-1 signifikant. Die in dem analysierten Patientenkollektiv vorhandene starke Korrelation zwischen beiden Proteasen und dem histologischen Malignitätsgrad wurde bis jetzt nicht beschrieben. *Föckens et al.* wiesen lediglich eine Beziehung zwischen hohen uPA-/PAI-1-Werten und dem hohen Anaplasiegrad für prämenopausale Patientinnen nach (42). Im untersuchten Kollektiv korrelierte der uPA-Wert auch mit der Tumorgroße: Karzinome im pT3-Stadium hatten signifikant niedrigere Konzentrationen an uPA als die im Stadium pT1 und/oder pT2. Da bei allen unseren Patientinnen eine Fernmetastasierung ausgeschlossen wurde, spiegeln die niedrigen uPA-Werte der pT3-Tumoren ihre weniger ausgeprägte Aggressivität im Vergleich zu den kleineren Tumoren wider.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene prognostische Bedeutung des uPA´s im Gesamtkollektiv korreliert mit den Resultaten einer Studie von *Jänicke et al.* (55), bei welcher ein optimierter *cut-off level* von 2,97 ng/mg Protein gebraucht wurde. Die Bestimmung von uPA und von PAI-1 wur-

de bei *Jänicke et al.* ebenfalls in einem mit TritonX-100 behandelten Tumorextrakt und mit dem gleichen ELISA-System durchgeführt. Im Gegensatz zu der erwähnten Publikation wird zum Beispiel von *Duffy et al.* ein optimierter *cut-off level* von 10 ng/mg Protein (56) und von *Foekens et al.* von 1,25 ng/mg Protein (90) verwendet. Der niedrige *cut-off level* in der Arbeit von *Foekens* ergibt sich aus der Anwendung des Tumorzytosols, das routinemäßig für die Bestimmung von Hormonrezeptoren und ohne Einsatz des Detergents TritonX-100 hergestellt wurde. *Jänicke et al.* konnten ferner zeigen, daß der Gehalt an uPA in einem Detergentextrakt deutlich höher ist, als in einem detergentfreien Zytosol, wohingegen die in beiden Tumorextrakten gemessene Konzentrationen an PAI-1 vergleichbar sind (108). Unterschiedliche *cut-off*-Werte ergeben sich auch durch die Verwendung verschiedener Antikörper- bzw. Nachweissysteme (56, 72).

Unter den nodalnegativen Frauen des untersuchten Kollektives waren uPA-Werte oberhalb 3,0 ng/mg Protein, ähnlich wie bei *Jänicke* (55), signifikant mit höherer Rezidivrate und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert. Die multifaktorielle Varianzanalyse innerhalb dieser Gruppe zeigte, daß histologischer Malignitätsgrad und Progesteronrezeptorstatus einen deutlich stärkeren Einfluß auf die Vorhersage von Rezidiven haben und der Progesteronrezeptor auch als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben von Bedeutung ist.

Es ist kritisch anzumerken, daß einige dieser Patientinnen aufgrund ihrer Befundkonstellation einer adjuvanten Therapie unterzogen worden waren. Dagegen erhielt in dem von *Jänicke et al.* untersuchten nodalnegativen Kollektiv keine der Frauen eine adjuvante Therapie (55).

In der Subgruppe der progesteronrezeptorpositiven Patientinnen erwies sich der uPA als unabhängiger Prognoseparameter sowohl für rezidivfreies als für Gesamtüberleben. Im Gegenteil dazu wurde von *Duffy et al.* (56) ein bedeutender Einfluß von uPA für rezidivfreies Überleben in

der Subgruppe der Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorbefund beschrieben.

Die von den oben erwähnten Autoren bereits nachgewiesene Bedeutung des uPA für die Vorhersage eines Rezidives bei den postmenopausalen (55, 56) und prämenopausalen (56, 70) Patientinnen war auch in der vorliegenden Arbeit zu sehen.

Die prognostische Bedeutung des PAI-1 für das rezidivfreie Überleben wurde ebenfalls in unserem Kollektiv bestätigt. Im Gegensatz zu den erwähnten Arbeiten konnte PAI-1 weder im Gesamtkollektiv noch im Kollektiv der nodalnegativen Patientinnen als unabhängiger Prognosefaktor bewertet werden. Dieses hängt möglicherweise mit der noch relativ kurzen Nachbeobachtungszeit zusammen, da der Einfluß eines bestimmten Prognosefaktors sich im Laufe der Beobachtung verändern kann. Und wie es von *Schmitt et al.* mittels eines zeitvariieren Cox-Modells gezeigt wurde, nimmt die prognostische Relevanz von PAI-1 mit der Zeit zu (109). So erreicht PAI-1 bei dem medianen *follow-up* von 52 Monaten seine maximale prognostische Bedeutung ab dem 33. Monat der Beobachtungszeit. Die Patientinnen mit hohen PAI-1-Werten haben ein hohes Rezidivrisiko während des zweiten und dritten postoperativen Jahres (109). Die mediane Beobachtungszeit unserer Stichprobe liegt bei 38 Monaten. Es ist möglich, daß bei längerer Beobachtungszeit auch ein Anwachsen der prognostischen Relevanz des PAI-1 zu verzeichnen ist. Währenddessen könnten andere Faktoren an ihrer Bedeutung abnehmen, wie es von *Schmitt et al.* für den Hormonrezeptorstaus und uPA gezeigt werden konnte (109). In einer Studie von *Mayerhofer et al.* mit der medianen Beobachtungszeit von 33 Monaten konnte ebenfalls keine unabhängige prognostische Relevanz des PAI-1 für das Rezidivrisiko nachgewiesen werden. In einer multivariaten Analyse erwiesen sich lediglich der Progesteronrezeptorstatus, der Lymphknotenstatus und die Tumorgröße als unabhängige Faktoren bezüglich des rezidivfreien

Intervals (121).

Von der klassischen Prognoseparameter haben sich im untersuchten Gesamtkollektiv der histologische Malignitätsgrad und der Nodalstatus als unabhängige Faktoren für das Rezidiv bestätigt. Das Rezidivrisiko für Patientinnen mit einem positiven metastatischen Befall der regionalen Lymphknoten betrug 1,9 (95% CI 1,01-3,7) gegenüber der Frauen ohne Lymphknotenmetastasen. Der Nodalstatus hat sich seit langem als ein hochwertiger Prognosemarker in der Therapie des Mammakarzinoms etabliert. Seine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben nimmt jedoch nach fünf Jahren postoperationem deutlich ab und verliert sich nach 10 Jahren ganz (12).

Bei Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Lymphknotenbefall wird zur Zeit eine adjuvante Therapie durchgeführt, während bei nodalnegativen Frauen eine Indikation zur adjuvanten Therapie unter Berücksichtigung anderer Faktoren, wie des histologischen Malignitätsgrades, Hormonrezeptorenstatus und der Tumorgroße, gestellt wird (25).

In der untersuchten Stichprobe betrug das Risiko eines Rezidives für Patientinnen mit Grading III das 3,2 -fache wie für Frauen mit Grading I und II. Auch in der Gruppe der nodalnegativen Frauen hatte der Grad der histologischen Differenzierung den stärksten Einfluß auf die Rezidivrate, gefolgt vom Progesteronrezeptorstatus.

In der Histopathologie des Mammakarzinoms wurde 1925 erstmals von *Greenough* Untersuchungen über einen dreistufigen Malignitätsgrad unter Berücksichtigung von Überlebenszeiten vorgenommen (91). Später haben sich an diesem Prinzip weitere Studien orientiert, bis 1950 *Bloom* ein Grading als Index zur Prognose vorlegte (92,93), das nach sieben Jahren durch *Bloom* und *Richardson* verbessert und ergänzt

wurde (22). Dieses Modell, das die quantitative Beurteilung der Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoseraten einbezieht und in einem Score eingegeben wird, hat sich seither bewährt. Die prognostische Bedeutung des Grading wurde auch in mehreren aktuellen Studien belegt (94, 95, 96, 97).

Der histologische Malignitätsgrad ist einer der sicheren prognostischen Indikatoren für alle invasive Mammakarzinomtypen mit Ausnahme des medullären Karzinoms (95). Der histologische Differenzierungsgrad steht offensichtlich mit einem hohen Metastasierungsrisiko im Zusammenhang. So wurden bei Frauen mit hohem Grading eine progressive Zunahme der metastatischen Herde sowie einen schnelleren Wachstum dieser Herde beobachtet (21). Auch für nodalnegative Patientinnen erwies sich der Unterschied zwischen gut- und schlechtdifferenzierten Tumoren als ein sicherer prognostischer Indikator (33). Der Grad der histologischen Differenzierung des Mammakarzinoms weist signifikante Korrelationen zu anderen prädikativen und prognostischen Parametern, wie zum Beispiel zum Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorenstatus auf (98).

Der histologische Malignitätsgrad hat sich als praktikabel in der Beurteilung der Prognose des Mammakarzinoms etabliert, da seine Bestimmung keinen methodischen und technischen Aufwand verlangt, kostengünstig ist und auf einer sorgfältigen mikroskopischen Gewebsanalyse basiert. Das Ergebniss hängt jedoch von der subjektiven Bewertung der einzelnen Faktoren ab, worauf sich Probleme in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zurückführen lassen (99, 100).

Die hohe prognostische Signifikanz des Grading im untersuchten Kollektiv läßt sich unter anderem dadurch erklären, daß die Aufbereitung aller Proben im gleichen Labor und die histologische Probenbeurteilung nur von zwei Pathologen erfolgte. Eine Wichtige Rolle spielt auch die Zugehörigkeit der Untersucher zu der gleichen Pathologieschule.

Die prädikative Bedeutung der Hormonrezeptoren für die Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ist seit langem bekannt und findet ihren Einsatz bei Therapieplanung. Patientinnen mit positiven Östrogen- oder Progesteronrezeptoren profitieren deutlich von adjuvanter Hormontherapie (28). Dennoch sprechen nur ca. 59% der Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus auf eine endokrine Therapie an, und die Präsenz vom Progesteronrezeptor ist mit einem viel besseren Therapieerfolg verbunden (110). Da die Entwicklung von Progesteronrezeptoren im Tumorgewebe unter anderem vom Östrogen und seinen Rezeptoren abhängt, resultiert der negative Progesteronrezeptorstaus entweder aus Funktionsstörung der Östrogenrezeptoren oder aus Östrogenmangel (111). Der Progesteronrezeptorstatus hat einen größeren Einfluß auf die Prognose der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom als der Östrogenrezeptor (112). Auch die Dauer des Gesamtüberlebens ist mit einem positiven Progesteronrezeptorstaus assoziiert (113). In der vorliegenden Arbeit wird ein Zusammenhang zwischen negativem Progesteronrezeptorstatus und kürzerem Gesamtüberleben gezeigt. In der multivariaten Analyse des gesamten Kollektives erreichte er jedoch keine Signifikanz ($p=0,058$). Betrachtete man hingegen nur die Untergruppen mit geringem Risikoprofil (Patientinnen mit Grading I und II, negativem Lymphknotenstatus oder fehlender Angioinvasion) so erwies sich der Progesteronrezeptor als ein starker unabhängiger Prognosefaktor. Wegen zeitabhängiger Bedeutung des Hormonrezeptorenstatus mit Verlust prognostischer Aussagekraft von ca. 20% jährlich (114), sollte die in dieser Arbeit nachgewiesene prognostische Relevanz des Progesteronrezeptors bei einem längeren *follow-up* und mit Hilfe einer zeitabhängigen statistischen Analyse überprüft werden.

Die Tumordinvasion der Blut- und Lymphgefäßen wurde bereits als ein unabhängiger Faktor für sowohl Rezidive wie Gesamtüberleben beim

Mammakarzinom beschrieben (115-117). Laut einiger Autoren ist dieser Faktor sogar zuverlässiger als der Nodalstatus, die Tumorgröße oder andere etablierte Parameter (115). Auch im untersuchten Patientenkollektiv wurde die Angioinvasion in der einfaktoriellen Varianzanalyse des Gesamtkollektives als hochsignifikanter Parameter für das Krankheitsrezidiv bestätigt. In der multivariaten Analyse erwies sich die prognostische Bedeutung jedoch nicht als unabhängig. In der Gruppe der Patientinnen, bei denen keine Invasion der Gefäße vorlag, war PAI-1 ein unabhängiger Faktor für die Vorhersage eines Rezidives mit einem Risiko von 2,6 (95%C.I. 1,1 - 6,4). Dies steht möglicherweise mit der Bedeutung von PAI-1 bei der Neoangiogenese der soliden Tumoren in Verbindung (107).

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Invasionsmarker uPA und PAI-1 an dem von uns untersuchten Kollektiv von 211 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom über prognostische Relevanz verfügen. Im Gesamtkollektiv erwies sich uPA als ein unabhängiger Prognosemarker sowohl für das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben. Unter den *low-risk* Patientinnen hatte uPA nach multifaktorieller Varianzanalyse einen signifikanten Einfluß auf die Wahrscheinlichkeit des rezidivfreien Überlebens in den Gruppen der Patientinnen mit einem progesteronrezeptorpositiven Tumor und der postmenopausalen Frauen. Der Tumorgehalt an uPA konnte darüberhinaus als ein unabhängiger Prognoseparameter für das Gesamtüberleben in den Patientinnenuntergruppen mit positivem Progesteronrezeptorbefund und fehlender Angioinvasion bestätigt werden.

Der PAI-1-Gehalt der Mammakarzinome erwies sich als ein unabhängiger Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben bei Patientinnen ohne Angioinvasion und für das Gesamtüberleben der postmenopausalen Frauen. Die klassischen Prognoseparameter wie der histologische Malignitätsgrad, der Nodalstatus und bei nodalnegativen Frauen der Progesteronrezeptorstatus waren jedoch dem PAI-1-Level überlegen.

6 Literaturverzeichnis

1. Seidman, H.: Cancer of the breast. Statistical and epidemiological data. *Cancer* (1969) 24: 1355-1357
2. Wander, H. E., Nagel, G. A.: Mammakarzinome. Zuckerschwerdt Verlag. (1984)
3. Adami, H. O.: Breast cancer incidence and mortality. *Acta chir. Scand.* (1984) 519:5-14
4. Holford, T. R., Roush, G.C., McKay, L A.: Trends in female breast cancer in Connecticut and the United States. *J. Clin. Epidemiol.* (1991) 44:29-39
5. Feuer E.J., Lup-Ing Wun, Boring, C.C.: The lifetime risk of developing breast cancer. Reports. *J Natl Cancer Inst* (1993) 85: 892-897
6. Engelhardt, Ch., Sauerland, C., Betters, G: Beobachtung einer Zunahme „aggressiver Tumorformen“ bei ansteigender Häufigkeit des Mammakarzinoms. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* (1996) 56:124-127
7. Donegan W.L.: Cancer of the Breast. Saunders, Philadelphia 1979 p.14
8. Kljin J.: How can adjuvant endocrine treatment be improved? 18. International Congress of Chemotherapie, Stockholm 27.6-2.7.1993
9. Maass H.: Epidemiologie des Mammakarzinoms. Gynäkologische Onkologie. „Bonner Woche 1994“. W. Zuckschwerdt Verlag . (s.123)
10. Maas, H.: Mammakarzinom: Epidemiologie. (1994) *Gynäkologie* 27:3-6.
11. Colditz, G.A.: Epidemiology of breast cancer. (1993) *Cancer* 71:1480-1489
12. Kleist von, S.: Prognostic Factors in Breast Cancer: Theoretical and clinical aspects. *Anticancer Res.* (1996) 16: 3907-3912
13. Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, G.: Gynäkologische Onkologie. 5.Auflage. Schattauer Verlag. 1995.
14. William, L., Donegan, M. D.: Prognostic factors: stage and receptor

status in breast cancer. *Cancer Supp.* (1992) 70: 6

15. Hutter, R.V.P.: At last-worldwide agreement on the staging of cancer. *Arch. Surg.* (1987) 122:1235-1239

16. Fisher, B., Slack, N. H., Bross, I.D.J.: Cancer of the breast: Size of neoplasm and prognosis. *Cancer* (1969) 24:1074-80

17. McGuire, W. L., Tandon, A. K., Allred, D. G., Chamness, G.C., Ravdin, P. M., Clark, G. M.: Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. *Cancer Suppl.* (1992) 70:1775-1781

18. Meuret G.: Mammakarzinom: Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Georg Thime Verlag. 1995. s.13

19. Carter, C.L., Allen, C., Henson, D.E.: Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24 740 breast cancer cases. *Cancer* (1989) 63: 181-187

20. Rosen, P. P.: Axillary lymph node metastases in patients with occult noninvasive breast carcinoma. *Cancer* (1980) 46:1298-1306

21. Koscielny, S. M., Tubiana, M., Le, M.G., Valleron, A.J., Mourisse, H., Contesso, G., Sarrazin D.: Breast cancer: Relationship between the size of the primary tumor and probability of metastatic dissemination. *Br. J Cancer* (1984) 49: 709-715

22. Bloom H. J .G., Richardson W. W.: Histologic grading and prognosis in breast cancer. (1957) *Br. J Cancer* 11:359-377

23. Bässler R., Böcker, W., Hermanek, P., Pickartz, H., Prechtel. K., Schauer, A., Schnürich H.,G., Stegner, H.E.: Die gegenwärtige Situation des Gradiings beim Mammakarzinom. *Pathologie* (1992) 13:130-134

24. Rosen, P. P., Saigo, P. E., Braun D. W., Weathers, E., DePalo, A.: Predictors of recurrence in stage 1 (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann. Surg.* (1981) 193:15-25

25. Jonat, W., Eidtmann H., Fridrichs K. Prognosefaktoren bei Mammakarzinom. *Gynäkologie* (1994) 27:37-44

26. Beatson, G. T.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method with illustrative cases. *Lancet* 1896/2, 104.

27. Jensen, E. V., Block, G. E., Smith, S.: Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* (1971) 34:34
28. McGuire, W. L., Hormon receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapie. *Semin. Onkol.* (1978) 5:428-433
29. McGuire, W. L., Pearson, O. H., Segaloff, A.: Predicting hormon responsiveness in human breast cancer. In McGuire, W.L., Carbone, P.P., Vollmer, E.D., editors: Estrogen receptors in human breast cancer. New York: Raven (1975): 17-30
30. Fischer E. R., Redmond, C. K., Hannen, H., Rokette, H., Fischer, B. and Collaborating NSAPB Investigators.: Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer* (1980) 45: 349-353
31. Chua, D. Y. F., Pang, M. W. Y., Rauff, A., Aw, S. E., Chan, S. A.: Correlation of steroid receptor with histologic differentiation in mammary carcinoma: A Singapore experience. *Cancer* (1985) 56:2228-
32. Dressler L. G., Seamer, L. C., Owens, M. A., Clark, G. M., McGuire, W. L.: DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimes. *Cancer.*(1988) 61:402-407
33. Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E. R., Caplan, R. et al.: Relative worth of estrogen or progesteron receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: finding from national surgical adjuvant breast and bowel project protocol B-06. *J Clinic. Oncol.* (1988) 6:1076-87
35. Osborne, K.:. Receptors. In Harris, J.R., Hellmann, S., Henderson, D. W.: Breast Diseases. 2nd ed. Lippincott, Philadelphia 1991, p.301
36. Clark, G. M., McGuire, W. L: Progesteron receptors and human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatm.* (1983) 3:157
37. Clark, G. M., Osborne, C. K., McGurie W. L.: Correlions between estrogen receptor, progesteronreceptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin. Oncol* (1984) 2:1102
38. Schmitt M., Gorezki, L., Jänicke, F., Galvete, J.: Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed. Biochem. Acta* 50 (1991). 731-741
39. Juan, P., Arnoletti. M. D., Daniel Albo, M. D., Mark.: Thrombospon-

din and transforming growth factor-beta1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer* 1995 76(6):998-1005

40. Salmon D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGurie, W. L.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987) 235:177-82

41. Gandolfo, G. M., Conti, L, Vercillo, M.: Fibrinolysis components as prognostic markers in breast cancer and colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* (1996) 16: 2155-2160

42. Grondahl-Hansen, J., Christensen, I. J., Rosenquist, C., Brønner, N., Muoridsen, H. T., Dano, K., Blicher-Toft, M.: High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast cancer are associated with poor prognosis. *Cancer Res.* (1993) 53:2513-21

43. Sumiyoshi, K., Serizawa, K., Urano, T., Tokada, Y., Tokada, A., Baba, S.: Plasminogen activator system in human breast cancer. *Int. J Cancer* (1992) 50:345-348

44. Reilly, D., Andreasen, P., Duffy, M. J.: Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in breast cancer: studies at both protein and mRNA level. *Biochem. Soc. Trans.* (1991) 19(1): 44

45. Astedt, B., Holmberg, L.: Immunohistological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* (1976) 261:565-597

46. Reilly, D., Christensen, L., Duch, M., Nolan, N., Duffy, M.J., Andreasen, A.: Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int. J Cancer* (1992) 50: 208-214

47. Suzumya. J., Hasui, Y., Kohga, S., Somiyoshi,A., Hashida, S., Shikawa, E.: Comparative study of plasminogen activator antigens in colonic carcinomas and adenomas. *Int. J Cancer* 1988. 42:627-632

48. Boyd, D., Florent, G., Kim. P., Brattain, M.: Determination of the levels of urokinase and its receptor in human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res.* (1988) 48:3112-16

49. Sappino, A.P., Busso, N., Belin, D., Vassalli, J-D.: Increase of urokinase type plasminogen activator gene expression in human lung

and breast carcinomas. *Cancer Res.* (1987) 47:4043-4046

50. Nagayama, M., Sato, A., Hayakawa, H., Urano, T., Takada, Y., Takada, A.: Plasminogen activator and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer* (1994) 73:1398-1405

51. Saito, K., Nagashima, M., Iwata, M., Hamada, M., Sumiyoshi K., Takada, Y., Takada, A.: The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues with ovarian and uterin tumors. *Thromb. Res.* (1990) 58:355-366

52. Kirchheimer, J. C., Pfluger, H., Ritschl, P., Hienert, G., Binder, B. R.: Plasminogen activator activity in bone metastasis of prostatic carcinomas compared to primary tumors. *Invas. Matast.* (1985) 5:344-355

53. Kirchheimer, J. C., Wojta, J., Christ, G., Binder, B. R.: Prolifiration of a human epidermal tumor cell line stimulated by urokinase. *FASEB J*, (1987) 1:125-128

54. Jänicke, F., Schmid, M., Ulm, K., Gössner, F., Graeff, H.: Urokinase plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet* 1989 II:1049

55. Jänicke, F., Schmitt, M., Pache, L., Ulm, K., Harbeck, N., Höfler, H., Graeff, H.: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* (1993) 24:195-208

56. Duffy, M. J., Reilly, D., McDermott, E., O'Higgins, N., Fennelly, J.J., Andreasen, P. A.: Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer* (1994) 74:2276-80

57. Dvorak, H. F.: Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor generation and wound healing. *New Engl. J Med.*(1986) 315:1650-1659

58. Wilhelm, O., Hafter, R., Coppenrath; E., Pflanz, M., Schmitt, M., Babic, R., Linke, R., Gössner, W., Graeff, H.: Fibrin-fibrinogen compounds in ovarian tumor ascites and their possible relation to the tumor stroma. *Cancer Res.* (1986) 48:3507-3514

59. Graeff, H., Jänicke, F., Schmitt, M.: Klinische und prognostische Bedeutung tumorassoziierter Proteasen in der gynäkologischen Onkologie. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* (1991) 51:90-99

60. Duffy, M. J.: Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur. J Cancer Oncol.* (1987) 23:583-589
61. Markus, G.: The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. *Enzyme* (1988) 40:158-172
62. Bruin de, P., Griffioen, G., Verspage, T. H., Veheijen, J., Dooijeward, G., Ingh, an den, H., Lamers, C. B.: Plasminogen activator profiles in neoplastic tissues of human colon. *Cancer Res.* (1988) 48:4520-4524
63. Simp, P. S., Stephens, R., Fayle, D., Doe, W.: Urokinase-type plasminogen activaor in colorectal carcinomas und adenomatous polyps: quantitative expression of active and proenzyme. *Int. J Cancer* (1988) 42:483-488
64. Pacheco, M., Brentani, M., Franco, E., Fontelles, J., Chamone D., Marques, L.: Plasminogen activator expression and steroid hormon receptors in femal breast cancer: A multifactorial study. *Int. J Cancer* (1988) 41:798-804
65. Duffy, M. J., Reilly, D., O'Sullivan C., O'Higgins, N., Fennelly, J. J., Andreasen, P.: Urokinase plasminogen activator, a new and indepent prognostic marker in breast cancer. (1990) *Cancer Res.* 50: 6827-6829
66. Jänicke. F., Scmitt, M., Hafter, R., Hollrieder, A., Babic, R., Ulm, K., Gössner, W., Graeff., H.: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. (1990) *Fibrinolysis* 4: 69-78
67. Colombi, M., Barlati,S., Magdelenat, H., Fiszer-Szafarz, B.: Relationship between multiple forms of plasminogen activator in human breast tumors and plasma and the presence of metastasis in lymph nodes. *Cancer Res.* (1984) 44:2971-75
68. Symiyoshi, K., Baba, S., Sakaguchi, S., Urano, T., Takada, Y., Takada. A.: Increase in levels of plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast cancer: Possible roles in tumor progression and metestasis. *Thrombosis Res.* (1991) 63:59-71
69. Foekens, A., Schmitt, M. , van Putten Wimm, L. J., Peters, H. A., Kramer M. D., Jänicke, F., Klijin, G. M.: Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clinic. Onkolgy* (1994) pp 1648-1658
70. Bouchet, C., Spyratos, F., Martin P.M., Hacene, K., Gentile, A., Oglobine, J.: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator

inhibitors PAI-1 und PAI-2 in breast cancer. *Br. J Cancer* (1994) 69:398-485

71. Montesano, R., Pepper, M. R., Mohlesteinlein, U.: Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T-oncogene. *Cell* (1990) 62:435-445

72. Brünner, N., Pyke, C., Hansen, C. H., Romer, J., Grondal-Hansen, J., Dano, K.: Urokinase plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1): Regulators of proteolysis during cancer invasion and prognostic parameter in breast cancer. *Cancer Treat. Res.* (1994) 71:299-309

73. Camiolo, S. M., Markus, G., Pilver, M. S.: Plasminogen activator content of gynecological tumors and their metastasis. *Gynecol. Oncol* (1987) 26:364-373

74. Harvey, S. R., Lawrence, D. D., Madeja, J. M., Abbey, S. J., Markus, G.: Secretion of plasminogen activators by human colorectal and gastric tumor explants. *Clin. Exp. Metastasis* (1988) 6:431-450

75. Markus, G., Camiolo, S. M., Kohga, S., Madeja, J. M., Mittelman, A.: Plasminogen activator secretion in human tumors in short-term organ culture, including a comparison of primary and metastatic colon tumors. *Cancer Res.* (1983) 43:5517-5525

76. Mullins, D. E., Rohrich S. T.: The role of proteases in cellular invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* (1983) 695:177-214

77. Sacsela, O.: Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochem. Biophys. Acta* (1985) 823:35-65

78. Foekens, J. A., Buessecker F., Peters, H. A., Krainick, U., Putten, van, W. L. J., Look, M. P., Klijin J. G. M., Kramer, M. D.: Plasminogen activator inhibitor-2: Prognostic relevance in 1012 patients with primary breast cancer. *Cancer Res* (1995) 55:1423-1431

79. Lah, T., Kokalj-Kunovar, M., Drobnik-Kosorok, M., Babnik, J., Golouh, R., Vrhevec, I., Truk, V.: Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* (1992) 373:595-604

80. Gabrijelcic, D., Svetic, B., Spaic, D., Budihna, J., Turk, V.: Determination of cathepsins B, H, L and kinogenen in breast cancer patients. *Agents. Actions. Suppl.* (1992) 38:350-357

81. Thomssen, C., Schmitt, M., Gorezki, L., Oppelt, P., Pache, L., Dett-

mar. P., Jänicke, F., Graeff, H.: Prognostic value of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* (1995) 1:741-746

82. Lah, T., Calaf, G., Kalman, E., Shinde, B.H., Russo, H., Jarosz, D., Zabrecky J., Somers, R., Daskal, I.: Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells. *Biol. Chem. Hoppe-Seylex.* 376:357-363

83. Rochefort, H.: The prognostic value of cathepsin D in breast cancer. A long road to the clinic. *Eur. J Cancer* (1996) 32A. No1:7-8

84. Ferno, M., Baldetorp, B., Borg, A.: Cathepsin D, both a prognostic factor and a predictive factor for the effect of adjuvant tamoxifen in breast cancer. *Eur. J Cancer* (1994) 30A:3042-2048

85. Spyrtos, F., Maudelonde, T., Brouillet, J.P., Brunet, M., Defrenne, A., Andrieu, C., Hacene, C., Desplaces, A., Rousse, J., Rochefort, H.: Cathepsin D: An independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* (1989) November 11, 8672, 1115-1118.

86. Duffy, M. J., Grady, P., Devaney, L., O'Siorain, Fennelly J. J., Lijnen, H. R.: Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary Report. *Cancer* (1988) 62:531-533

87. Larsson, G., Larsson, A., Alsted, B.: Tissue plasminogen activator and urokinase in normal, dysplastic and cancerous squamous epithelium of the uterine cervix. *Throm. Haemost.* (1987) 58:822-826

88. Layer, G.T., Cederholm-Williams, S.A., Gaffney, P.J., Houlbrook, S., Mahmoud, M., Pattison, M.: Urokinase-the enzyme responsible for invasion and metastasis in human breast carcinoma. *Fibrinolysis* (1987) 1:237-240

89. Markus, G.: The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. Review of recent literature. *Enzyme* (1988) 40:158-172

90. Foekens, J. A., Schmitt, M., van Putten W. L. J., Harry A. P., Bontebal, M., Jänicke, F., Klien, J. G. M.: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res.* (1992) 52:6101-05

91. Greenough, R.B.: Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J Cancer Res.* (1925) 9:453-462

92. Bloom, H. J. G.: Prognosis in carcinoma of the breast. *Br. J Cancer*

(1950) 4:259-288

93. Bloom, H. J. G.: Further studies in prognosis of breast cancer. *Br. J Cancer* (1950) 4:347-367

94. Fisher, E. R., Redmond, C., Fisher, B.: Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu.* (1980) 15:239-251

95. Contesso, G., Mouriesse, H., Friedman, S., Genin, J., Sarrazin, D., Rouesse, J.: The importance of histologic grade in long-term prognosis of the breast cancer: a studie of 1.010 patients, uniformly treated at the institut Gustave-Roussy. *J Clin Onkol* (1987) 5:1378-86

96. Haybittle, J. L., Blamey, R. W., Elston, C. W., Jonson J.: A prognostic index in primary breast cancer. *Br. J Cancer* (1982) 45:361-366

97. Thessig, F., Haroske, G., Kunze, K. D., Meyer, W.: Morphologische Möglichkeiten zur Objektivierung der Prognose des invasiven duktaalen Karzinoms der Mamma. *Zentralbl Patholog* (1991) 137:242-248.

98. Elton, C. W., Blamey, R. W., Jonson, J.: The relationship of oestra-diol receptors (ER) and histological tumor differentiation with prognosis in human primary braest carcinoma. In Mouridsen Palshof (eds): Breast cancer: Experimentals and clinical aspects. *Oxford, Pergamon.* (1980), pp 59-62

99. Delides, G. S., Garas, G., Georgouli, G.: Intralaboratory variations in the grading of braest carcinoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (1982) 106:126-128

100. Stenkivist, B., Westman-Naeser, S., Vegelius, J., Holmquist, J., Nordin, B., Bengtsson, B., Eriksson, O.: Analysis of reproducibility of subjective grading systems for breast carcinoma. *J Clin. Pathol.* (1979) 32: 979-985

101. Schmitt, M., Jänicke, F., Greaff, H.: Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* (1992) 4 (suppl.): 3-26

102. Liu, G., Shumann, M. A., Cohen, R. L.,: Co-expression of urokina-se, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasivness of cultured lung cancer cells. *Int. J Cancer* (1995) 60:501-506

103. Xing, R.H., Rabani, S. A.: Overexpression of urokinase receptor in brast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and me-tastasis. *Int. J Cancer* (1996) 67:423-429

104. Sier, C. M., Vloedgrave, H. J. M., Ganesh, S., Griffionen, G., Quax, P. H., Verheijen J. H., Dooijewaard, G., Welvaart, K., vande Velde, C. J., Lamers, C. B., Verspaget, H. W.: Inactive urokinase and increased levels of its inhibitor type 1 in colorectal cancer liver metastasis. *Gastroenterologie* (1994) 107:1449-56
105. Kanse, S., Kost, C, Wilhelm, O, Andreassen, P. A., Preisner, K. T.: The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* (1996) 244:344-353
106. Stefansson, S., Lawrence, D. A., : The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin $\alpha_5\beta_1$ binding to vitronectin. *Nature* (1996) 389: 441-443
107. Barbareschi, M., Casparini, G., Morelli, L., Forti, S., Della-Palma, P.: Novel methods of the determination of the angiogenic activity of human tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* (1996) 36:181-192
108. Jänicke, F., Pache, L., Schmitt, M., Ulm, K., Thomssen, C., Pechtl, A., Graeff, H.: Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissue are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res.* (1994) 54: 2527-2530
109. Schmitt, M., Thomssen C., Ulm, K., Seiderer, A., Harbeck, N., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H.: Time-varying prognostic impact of tumor biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone status in primary breast cancer. *Br. J Cancer* (1997) 76(3): 306-311
110. Scholl, S. M., Lippman, M. E., Methods and clinical use of receptor assay. In G. Banadonna (ed) : Breast cancer diagnosis and management. Chichester, U.K.: John Wiley and Sons Inc. (1984) Vol. 6, pp. 75-108
111. Clark. G. M., McGuire, W. L., Hubay, C. A, Pearson, O. H., Marshall, J. S.: Progesterone receptors as a prognostic factor in stage II breast cancer. *N Eng. J Med.* (1983) 309:1343-1347
112. Clark, G. M., Mc Guire, W. L.: Progesterone receptor and human breast cancer. *Breast Cancer Res. Traet.* (1983) 3:157-163.
113. Berger, U., McCelland, R. A., Wilson, P., Greene, G. L., Haussler, M. R., Pike, J. W., Colston, K., Easton, D., Coombes, R. C.: Immunohistochemical determination of estrogen receptor, progesteron receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relation to prognosis. *Cancer Res.* (1991) 51: 239-244

114. Pichon, M. F., Broet, P., Magdelenat, H., Delarue, J. C., Spyrtos, F., Basuyau, J. P., Saez, S., Rallet, A., Courriere, P., Millon, R., Asselain, B.: Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *Br. J Cancer* (1996) 73:1545-1551
115. Weidner, N., Folkman, J., Bevilacqua, P., Allred, E. N.: Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator of early-stage breast carcinoma. *JNCI* (1992) 84: 1875-1887
116. Fox, S. B., Leek, R.D., Smith, K., Holleyer, J., Greenal, M.: Tumorangiogenesis in node negative breast carcinomas-relationship with epidermal growth factor, estrogen receptor and survival. *Breast Cancer Res. Treat.* (1994) 29:109-116
117. Bosari, S., Lee, A. K., Delellis, R. A., Wiley, B. D., Heatley, G. J.: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum. Path.* (1992) 23:755-761
118. Kim, S. J., Shiba, E., Taguchi, T., Watanabe, T., Tanji, Y., Kimoto, Y., Izukura, M., Takai, S.-I.: Urokinase type plasminogen activator receptor as a novel prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.* (1997) 17:1373-1378
119. Dano, K., Behrend, N., Brunner, N., Ellis, V., Pyke, C.: The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activator and cancer invasion. *Fibrinolysis* (1994) 8:189-203
120. Allgayer, H. H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Grützner, K.-U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F.W.: Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res.* (1997) 57:1394-1399
121. Mayerhofer K., Stolzlechner, J., Yildiz, Haider, K., Heinzl, H., Jakesz, R., Pecherstorfer, M., Rosen, H., Sevela, P., Zeillinger, R., Speiser, P.: Plasminogenaktivatorinhibitor 1 und Prognose beim Mammakarzinom. *Geburt. u. Frauenheilk.* (1996) 56:23-27
122. Layer, G. T., Gederholm-Williams, S. A., Gaffney, P. J., Houlbrook, S., Mahmoud, M., Pattison, Burnand, K. G.: Urokinase-the enzyme responsible for invasion and metastasis in human breast carcinoma? *Fibrinolysis* (1987) 1:237-240
123. Jankun, J., Merrick, H. W., Goldblatt, P. J.: Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign

breast disease and breast cancer. *J Cell. Biochem.* (1993) 53:135-144

124. Hildebrand, R., Dilger, I., Hörlin, A., Stitte., H. J.: Urokinase plasminogen activator induces angiogenesis and tumor vessel invasion in breast cancer. *Path. Res. Pract.* (1995) 191: 403-409

126.Domjanovich, L., Turzo, C., Adany, R.: Faktor involved in the Plasminogen Activation System in Human Breast Tumors. *Thrombosis and Haemostasis* (1994) 71(6): 684-691

7 Danksagung

Für das Überlassen des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung sowie für Geduld und konstruktive Diskussion bei der Korrektur des Manuskriptes bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Christoph Lindner.

Der medizintechnischen Assistentin des Tumormarkerlabors der Frauenklinik Frau Tanja Zabel danke ich für ihre Hilfe beim Vorbereiten der Untersuchungsproben und Durchführen der Tests.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Björn Lisboa für viele anregende Ratschläge in jeder Arbeitsphase der Dissertation, seine Mitwirkung bei dem Recherchieren der Nachsorgeergebnisse und darüber hinaus für seine Hilfsbereitschaft beim Erstellen und Korrigieren des Manuskriptes.

Ich bedanke mich unter anderem bei meiner Mutter und bei meinem Mann Dimitri, die mich stets unterstützt und mir ermöglicht haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

8 Lebenslauf

Name: Elena Engelhardt
geb. Cerepanova

Geburtsdatum: 19. April 1967

Geburtsort: Leninabad, ehem. UdSSR

Eltern: Vater
Alexander Cerepanov
Arzt in Ruhestand

Mutter
Helene Engelhardt
Ärztin in Ruhestand

Wohnsitz: Rotbergfeld 44
21077 Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung: 09.1974 - 05.1984
Oberschule, Duschanbe, ehem. UdSSR
06.1984 Abitur

Studium: 09.1984 - 09.1990
an dem Staatlichen Medizinischen
Institut, Duschanbe

10.1991 - 09.1994
Universität Hamburg

Approbation: Oktober 1996

Berufstätigkeit: seit 12.1999
als Assistenzärztin der Klinik für An-
ästhesiologie und Intensivmedizin
der FSU Jena

9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens) Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

