Aus dem Institut

Für Pathologie

des Marienkrankenhauses Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Saeger

Apoptose in STH-bildenden Hypophysenadenomen: Korrelation zu morphologischen und klinischen Befunden

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Magdalena Krause

aus Gdingen

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Meinem Ehemann und meiner Tochter gewidmet

Inhaltsverzeichniserste Seite

1. **Einleitung** **5**

1.1. Hypophysenadenome 5

1.1 1. Hypophysenadenome mit Produktion von Wachstumshormon 8

1.1.1.a. Dicht granulierte STH-Adenome..... 8

1.1.1.b. Gering granulierte STH-Adenome..... 8

1.1.1.c Gemischte STH/PRL-Zelladenome 9

1.1.1.d. Mammosomatotrophe Adenome..... 9

1.1.1.e. Azidophile Stammzelladenome 9

1.1.1.f. Plurihormonale Adenome..... 10

1.1.2. Hypophysenadenome und Akromegalie 11

1.2. Apoptose..... 13

1.2.1. Nachweismethoden 14

1.2.2. Morphologische Veränderungen der Apoptose in Hypophysenadenomen. 14

1.2.3. Apoptose- Mechanismen..... 16

1.2.3.1. Extrinsischischer/ Todesrezeptor Weg der Apoptose 16

1.2.3.2. Intrinsischer/ Mitochondrialer Weg Der Apoptose 17

1.2.4. Effektoren und Mediatoren der Apoptose..... 17

1.2.4.1. Caspasen..... 17

1.2.4.2. Bcl-2-Familie..... 18

1.2.4.3. p53..... 18

1.2.5. Tumorgenese und Apoptose..... 20

2. Zielsetzung..... 21

3. Material und Methoden 22

3.1. Patienten und Untersuchungsgut 22

3.2. Erhobene Parameter 23
3.3. Untersuchungsmethoden 24
3.3.1. TUNEL-Assay 24
3.3.2. Praktische Durchführung des Assays 25
3.3.3. Detektion und Quantifizierung der Apoptose 26
3.3.4. Fehlerquellen und Störfaktoren 27
3.4. Statistische Methoden 28
3.4.1. Mittelwerte 28
3.4.2. Korrelationen 28
3.4.3. Häufigkeitsunterschiede 29
4. Ergebnisse 30
4.1. Apoptoseindex 30
4.1.1. Korrelationen der Apoptose 31
4.1.2. Mittelwertdifferenzen der Apoptose 35
4.2. Färbeintensität 38
4.2.1. Mittelwertunterschiede 38
4.2.2. Häufigkeitsunterschiede 41
5. Diskussion 42
6. Zusammenfassung 49
7. Literatur 51

Liste der Abkürzungen

ACTH:	Adrenocorticotrophes Hormon
ALI:	Apoptosis Labeling Index (Apoptoseindex)
AP:	Alkalische Phosphatase
CCT:	Schädel Computertomographie
CpG-Insel:	Cytosin/Guanin-reiche Abschnitte der Gen-Promoterregion
CK:	Zytokeratin
DA:	Dopaminagonisten
DAPK:	Death Associated Protein Kinasis
DNA:	Deoxynukleinsäure
DR:	Dopaminrezeptor
FADD:	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (death domaine)
FGF2:	Fibroblast Growth Factor 2
FH:	Follikel Hormon
FPA:	Functioning Pituitary Adenoma (Hormon-sezernierendes Hypophysenadenom)
IGF-1:	Insulin-like Growth Factor 1
LH:	Luteinisierendes Hormon
MAPK:	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase
MRT:	Magnetresonanz Tomographie
NFPA:	Non-Functioning Pituitary Adenoma
OP:	Operation
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC:	Proteinkinase C
PRL:	Prolaktin
PTAG:	Pituitary Tumour Apoptosis Gene
PTTG:	Pituitary Tumour Transforming Gene
SSA, SMS:	Somatostatinanaloga
SSTR (1-5):	Somatostatinrezeptor (Subtypen 1-5)

STH:	Wachstumshormon
TSH:	Thyreotrophes Hormon
TNF:	Tumornekrose Faktor
TUNEL:	Terminal Deoxynucleotide Transferase-mediated dUTP nick-end Labeling
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

.

1.1. Hypophysenadenome

Hypophysenadeome sind benigne Neoplasien, stammend aus einer klonalen Proliferation einer transformierten Zelle der Adenohypophyse mit Aufhebung der alveolären Grundstruktur des Vorderlappengewebes. Kleinalveoläre Proliferate gleichartiger Zellen ohne Destruktion des normalen Aufbaus, werden als Hyperplasien, und nicht als Adenome bezeichnet (Asa et al.,1998, DeLellis et al. 2004). Im Untersuchungsgut des Deutschen Registers der Hypophysentumoren umfassen sie 84,6% aller Hypophysentumoren (Saeger, 2007).

Klinisch relevante Tumoren, welche durch Störungen der Hormonsekretion oder durch Tumordruck- Effekte auffallen, sind selten mit einer Prävalenz von 200/1 000 000 und Inzidienz von 2/ 1 000 000 pro Jahr. Allerdings kleine, inzidentelle Adenome werden in 10-27% der Fälle post mortem entdeckt. Mittels neuroradiologischer Untersuchungen, wie CCT und MRT werden in 3,7-20% der Fälle zufällig Hypophysentumoren diagnostiziert, ohne vorherigen Verdacht auf eine Hypophysen-Läsion.

Die in den letzten Jahren entwickelten neurochirurgischen Techniken und andere Behandlungsmetoden erfordern, zum besseren Patienten- Management, exakte Klassifikation der Hypophysentumoren (Saeger, 2007; Saeger, 2005).

Es existieren unterschiedliche Klassifikationen der Hypophysentumoren, welche an funktionalen, histomorphologischen, immunhistochemischen, biochemischen, neuroradiologischen, chirurgischen und ultrastrukturalen Befunden basieren.

Endokrinologen benutzen vor allem die funktionale Einteilung, welche sich auf die laborchemischen Befunde, wie Hormonspiegel- Bestimmung und die damit assoziierte klinische Symptomatik, wie z.B. Auftreten von Cushing- Syndrom bei ACTH-produzierenden Adenomen oder Akromegalie/ Gigantismus bei GH- produzierenden Adenomen stützt (Asa et al., 1998, DeLellis et al., 2004)

Die neuroradiologische bzw. anatomische Klassifikation erlaubt die Einteilung in Mikroadenome von weniger als 1 cm Größe und Makroadenome von 1 und mehr cm Durchmesser; die sogenannten gigantischen Adenome von mindestens 4 cm Größe sind

sehr selten. Hormonell-aktive Adenome werden in der Regel früher entdeckt, der Anteil von Makroadenomen in dieser Gruppe beträgt 15-86% und in der Gruppe der inaktiven Adenome 95-100% (Saeger, 2007).
Diese Untersuchungsmethoden, wie auch der intraoperative Befund und histologische Beurteilung lassen Hypophysenadenome in expansive, zur Umgebung hin scharf begrenzte und invasive Tumoren einteilen. Die invasiven Adenome (etwa 50%) infiltrieren benachbartes Gewebe, wie Knochen, Dura, Sinus cavernosus, Nasennebenhöhlen. Das Risiko eines invasiven Wuchsmusters steigt mit Tumorgröße und ändert sich bei unterschiedlichen Adenomtypen (Saeger, 2007).
Diese Einteilungen sind von praktischem Nutzen, da sich hieraus Therapieansätze und Prognose ableiten lassen. Kleine, nicht invasive Tumoren lassen sich eher im Gesunden resezieren. Große und/oder invasive Tumoren sind schwerer einer radikalen chirurgischen Therapie zugänglich und haben dadurch höhere Rezidivraten (Saeger, 2005).
In der neuen WHO Klassifikation der Hypophysentumoren aus dem Jahr 2004, ist Invasionsverhalten ein Differenzierungsmerkmal zwischen typischen und atypischen Adenomen: die atypischen Adenome werden als Tumoren der Adenohypophyse mit Invasion des benachbarten Gewebes, gesteigerter mitotischer Aktivität mit Proliferationsindices (bestimmt mittels MiB-1 Markers) von 3 und mehr Prozent sowie einer extensiven intranukleären p-53 Expression definiert WHO (Saeger, 2006; Kontogeorgos, 2005 ; Grossman, 2006).

Hypophysen Carcinome, wie auch bei vielen anderen neuroendokrinen Tumoren, werden erst bei Nachweis von Metastasen (cerebrospinal, systemisch) diagnostiziert; eine Infiltration von Hirngewebe ist als Malignitätskriterium nicht ausreichend.
Die histologische Klassifikation orientierte sich früher, seit Anfang des 20 Jahrhunderts, lediglich am färberischen Verhalten des Zytoplasmas und unterschied azidophile, basophile und chromophobe Adenome. Aufgrund der Tumorarchitektur lassen sich lichtmikroskopisch diffuse, sinusoidale, papilläre und trabekuläre Baumuster erkennen. Im Elektronenmikroskop können dicht granulierte von gering granulierten und gemischten Adenomen unterschieden werden, je nach Anzahl, Größe und Verteilung der vorhandenen Sekretgranula. Diese Entdeckung durch Kovacs in den 70 Jahren des 20 Jahrhunderts revolutionierte die Klassifikation der Hypophysenadenome. In der Routine-Diagnostik setzte sich jedoch die immunologische Detektion von Antigenen im Gewebe durch. Humane Hormone werden durch andere Spezies als Antigene erkannt, dadurch konnten

hochzpezifische Antikörper gegen Hypophysenhormone entwickelt werden. Sie erlauben am Formalin-fixierten Gewebe die Aussage hinsichtlich der Hormonproduktion durch die Tumorzellen und bieten die Grundlage der pathohistologischen Klassifikation (Asa et al.,1998). Die WHO Klassifikation von 2004 (DeLellis et al., 2004) basiert auf strukturellen Ähnlichkeiten mit normalen Parenchymzellen und immunhistochemischer Hormonexpression. Hypophysenadenome können aus einem (monomorph) oder mehreren Zelltypen (plurimorph) aufgebaut sein und ein (monohormonal) oder mehrere Hormone (plurihormonal) produzieren, wobei die Kombinationen monomorph-plurihormonal und bi-/multizellulär-monohormonal möglich sind. Adenome ohne Nachweis einer Hormonproduktion bilden die Gruppe der inaktiven Adenome (Saeger, 2006 ; Kontogeorgos, 2005; Grossman, 2006).

Auf der Basis dieser Faktoren werden Hypophysenadenome wie folgt eingeteilt:

1. Dicht granulierte STH-Zelladenome
2. Gering granulierte STH-Zelladenome
3. Gering granulierte PRL-Zelladenome
4. Dicht granulierte PRL-Zelladenome
5. Gemischte bizelluläre STH/PRL-Zelladenome
6. Mammosomatotrophe Adenome
7. Azidophile Stammzelladenome (Produktion von STH und PRL)
8. Dicht granulierte ACTH-Zelladenome
9. Gering granulierte ACTH-Zelladenome
10. Crooke-Zelladenome (Produktion von ACTH)
11. TSH-Zelladenome
12. FSH/LH-Zelladenome
13. Null-Zell-Adenome inklusive onkozytäre Variante
14. Plurihormonale Adenome, inkl. „stumme“ (silent) Adenome, Subtyp 3

1.1.1 Hypophysenadenome mit Produktion von Wachstumshormon

Adenome, die ausschließlich Wachstumshormon produzieren, sind aus somatotrophen Zellen aufgebaut und umfassen zwei gut voneinander abgrenzbare Typen: das dicht granulierte und das gering granulierte STH-Zelladenom. Gemischte STH/PRL-Zelladenome und die Mammosomatotrophen Adenome produzieren neben Wachstumshormon auch Prolaktin. Azidophile Stammzelladenome zeigen eine immunhistochemische Positivität der Zellen für STH und PRL, sind aber klinisch mit Hyperprolaktinämie vergesellschaftet. Die plurihormonalen Adenome zeichnen sich durch Produktion mehrerer Hormone aus.

1.1.1.a. Dicht granulierte GH-Adenome

Das dicht granulierte STH-Zelladenom umfasst 7,1-9,2% aller Adenome und besteht aus diffus angeordneten, mittelgroßen- bis großen, rundlich-polyhedralen, stark azidophilen Tumorzellen, welche rundliche Zellkerne mit leicht aufgelockertem Chromatin und kleinen- bis mittelgroßen Nukleolen besitzen. Die mitotische Aktivität ist niedrig, weniger als 3% der Zellkerne zeigen eine Markierung mit MiB-1. Intrazytoplasmatisch zeigen sie eine diffuse, uniforme, kräftige Expression von STH. Etwa die Hälfte der Tumorzellen enthält zusätzlich die α-Untereinheit der Glycoprotein-Hormone. Elektronenmikroskopisch zeigt sich gut entwickeltes Golgi-Apparat und Rauhes Endoplasmatisches Retikulum sowie zahlreiche, mittelgroße (300-450 nm) sekretorische Granula. In der Regel handelt es sich um einen langsam wachsenden, gut begrenzten Tumor mit geringer Invasionsrate (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.1.b. Gering granulierte GH-Adenome

Das gering granulierte STH-Zelladenom macht 6,3-7,6% der Adenome aus. Es handelt sich um einen zellreichen, diffus wachsenden Tumor, welcher aus mittelgroßen- bis großen, leicht azidophilen Zellen aufgebaut wird. Die Zellkerne sind pleomorph, z.T. lobuliert und bizarr, chromatinreich. Paranukleär im Zytoplasma vieler Tumorzellen befindet sich eine schwach azidophile spherische Inklusion, sog. „fibrous body“ , welche eine Positivität für niedrig-

molekulare Keratine, wie CK 8, aufweist. Die STH-Immunreaktion ist schwächer und ungleichmäßig. Im Elektronenmikroskop erkennt man wenige, kleine (100-250 nm), pleomorphe Sekretgranula. Das RER ist prominent und bildet z.T. Nebenkerne. Die paranukleären Körper bestehen aus konzentrischen Aggregaten von Typ II Filamenten (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.1.c. Gemischte STH/PRL- Zelladenome

Gemischte STH/PRL-Zelladenome haben eine Häufigkeit von 3,5-5,2%. Es handelt sich um bizelluläre- bihormonale Adenome. Die Tumoren bestehen aus zwei, variabel vermischten azidophilen und chromophoben Zelltypen mit dichter oder geringer Granulierung, entsprechend somatotrophen und lactotrophen Zellen, die ultrastruktural Eigenschaften von STH-Adenom- und PRL-Adenomzellen aufweisen. Die gering granulierten STH-Zellen entsprechen morphologisch Zellelementen des gering granulierten STH-Adenoms mit „fibrous bodies“. Nur wenige Zellen enthalten beide Hormone (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.1.d. Mammosomatotrophe Adenome

Bei den Mammosomatotrophen Adenomen (1,1%) handelt es sich um monozelluläre-bihormonale Adenome, welche aus polyhedralen, mittelgroßen- bis großen, stark azidophilen, diffus wachsenden Zellen aufgebaut sind. Die Zellen entsprechen ultrastruktural Zellelementen des dicht granulierten STH-Adenoms; die sekretorischen Granula sind größer und irregulärer. Immunhistochemisch zeigt sich eine starke Positivität für STH und schwächer, in der gleichen Tumorzelle, für PRL (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.1.e. Azidophile Stammzelladenome

Das Azidophile Stammzelladenom ist selten (<1%) und meist monohormonal mit Sekretion von PRL. Seltener ist es bihormonal mit Sekretion von PRL und im geringen Ausmaß auch STH. Die leicht pleomorphen, schwach azidophilen Tumorzellen wachsen diffus und weisen intrazytoplasmatische große Vakuolen und paranukleäre Inklusionen (fibrous bodies) auf. Ultrastruktural entsprechen die beschriebenen Vakuolen akkumulierten- und

Riesenmitochondrien. Sekretgranula sind selten und klein (150-200nm). Dieser Adenom-Typ zeigt aggressiveres Verhalten, ist meist invasiv und häufig Therapie-resistent (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.1.f. Plurihormonale Adenome

Die plurihormonalen Adenome (1,3%) zeichnen sich durch die gleichzeitige Produktion mehrerer Hormone aus, die neben Wachstumshormon und/oder Prolaktin noch mindestens ein Glycoprotein und/oder α-Untereinheit exprimieren. Dabei werden die gemischten, mammosomatotrophen, azidophilen, gonadotropen und corticotropen Adenome, trotz Produktion von mehr als einem Hormon, nicht dieser Gruppe zugerechnet. Das plurihormonale Adenom Typ I erinnert lichtmikroskopisch an das dicht granulierte STH-Adenom, produziert , neben STH, auch TSH, α-Untereinheit, PRL, FSH, LH. Das plurihormonale Adenom Typ II hat eine Ultrastruktur ähnlich, wie die gonadotropen Adenome, exprimiert aber nicht nur LH und FSH, sondern auch α-Untereinheit oder TSH, STH, PRL. Das „stumme“ Subtyp 3 Adenom erinnert ultrastruktural an Glycoprotein-produzierende Adenome und enthält reichlich Raues und Glattes Endoplasmatisches Retikulum, prominenete Golgi-Felder und spärlich kleine (100-200 nm) sekretorische Granula, die in den Zellausläufern akkumulieren. Immunhistochemisch zeigt sich eine positive Reaktion für GH, PRL, TSH und andere Hormone. Dieser Adenomtyp zeichnet sich durch ein biologisch aggressives Verhalten aus; alle bisher untersuchten Tumoren dieser Gruppe waren invasive Makroadenome mit einer hohen Rezidivrate. Die Patienten haben erhöhte Serum-Prolaktin Werte (Saeger 2007; DeLellis et al., 2004; Asa et al., 1998).

1.1.2 Hypophysenadenome und Akromegalie

Hypophysenadenome mit exzessiver Wachstumshormon-Produktion sind, abhängig vom Alter der Patienten mit Gigantismus (vor Schluss der Epiphysenfugen) oder Akromegalie vergesellschaftet. Die Leitsymptome der Akromegalie im Erwachsenenalter sind vielfältig und entwickeln sich langsam, sodass zwischen Krankheitsbeginn und Diagnosestellung oft mehr als 10 Jahre vergehen. Durch Neuformation von periostalen Knochen kommt es zur Prognathie, Verbreitung der Zahnzwischenräume, Überbiss, Verbreitung der Nasenwurzel, prominenten Orbitalwülsten. Die Weichteilvermehrung und Hautverdickung führt zur Zunahme der Fingerbreite, Schuh- und Kopfgröße, Makroglossie, zum Schlaf-Apnoe-Syndrom, Karpaltunnelsyndrom. Durch lokales Wachstum kommt es häufig zu Kopfschmerzen, Gesichtsfeldausfällen und Hypophyseninsuffizienz. STH-Exzesse können zur gestörten Glucosetoleranz und zum Diabetes mellitus vom Typ II führen. Gehäuft kommt es zur Entwicklung von Neoplasien, wie Colonadenome (in 50% der Fälle) und Coloncarcinome (in 7% der Fälle). Die Mortalität von Patienten mit Akromegalie ist etwa auf das 3fache erhöht- häufig sterben die Patienten an kardiovaskulären und respiratorischen Erkrankungen (Lehnert et al., 2003; Asa et al., 1998; Stalla et al., 2007).

Bei Verdacht auf Akromegalie sollte zunächst die Bestimmung von IGF-1/Somatomedin C und basaler GH-Werte durchgeführt werden. Als Bestätigungstest eignet sich oraler Glukosetoleranztest: eine fehlende Supression des GH-Spiegels auf <1,0 µg/l ist pathologisch; in etwa 10% der Fälle werden paradoxe Anstiege der GH-Werte beobachtet. Nach laborchemischer Diagnosestellung ist zur weiteren Diagnostik ein MRT zur Beurteilung der Tumorgröße- und Ausdehnung notwendig.

Das Ziel der Therapie ist es, die laborchemischen Befunde zu normalisieren und die Tumormasse/-progression zu kontrollieren. Als Therapie der Wahl gilt die transsphenoidale Hypophysenoperation. Die vollständige Tumorresektion stellt das wichtigste prognostische Kriterium dar. Bei ausbleibendem Erfolg der Operation und präoperativ, besonders bei Makro- oder invasiven Adenomen, wird eine medikamentöse Therapie mit Somatostatinanaloga (z.B. Octreotid) oder Dopaminagonisten (z.B. Bromcriptin) durchgeführt. Die konventionelle Radiatio ist aufgrund eines langsam einsetzenden therapeutischen Effekts (Normalisierung des IGF-1 in 35-55% nach 10 Jahren) und der Nebenwirkungen (Hypophyseninssufizienz, erhöhte zerbrovaskuläre Mortalität,

Zweitneoplasien) keine Therapieoption der 1. oder 2. Wahl. Die stereotaktische Radiochirurgie ist schneller- innerhalb von 1-2 Jahren- wirksam, führt jedoch nur in etwa 35% der Fälle zur Normalisierung des IGF-1 (Lehnert et al.. 2003; Stalla et al., 2007).

Somatostatin inhibiert die STH-Sekretion, reduziert die Tumorgröße in 40-50% der Fälle. Histologisch zeigen behandelte Tumoren eine perivaskuläre und interstitielle Fibrose, stärkere STH-Immunreaktion, vermehrte Zytoplasmaazidophilie sowie eine niedrigere Proliferationsrate. Sie bindet an Somatostatinrezeptoren (SSTR Subtypen 1-5), insbesondere an SSTR2, 3, 5.(Cap et al., 2003; Saeger 2007; Stalla et al., 2007)

Die Erfolgsrate einer Bromcriptin-Therapie der STH-Zelladenome ist mit 10-30% relativ niedrig. Die Therapie-sensitiven Adenome zeigen eine deutliche Schrumpfung sowie Reduktion des Zellplasmas, Verminderung von Zellorganellen, wie RER und Golgi-Apparat neben Vermehrung von Einzelzelluntergängen und Fibrose. Die Wirkung wird ebenfalls durch eine Rezeptorbindung entfaltet (Yin et al., 1999; Saeger 2007).

1.2. Apoptose

Apoptose stellt einen essentiellen, ubiquitären, in der Evolution konservierten Prozess dar, welcher notwendig ist, um Funktion und Entwicklung multizellulärer Organismen zu erhalten. Dabei handelt es sich um einen strikt regulierten, aktiven, programmierten Zelltod mit besonderen morphologischen Merkmalen (Crocker et al., 2003). Apoptotische Stimuli können physiologischer oder pathologischer Natur sein; physiologisch dienen sie der Elimination von überschüssigen- (z.B. während der Embryogenese) oder schädlichen Zellen (wie z.B. selbstreaktive T-Lymphozyten im Thymus). Pathologische Stimuli, wie chemische, mikrobiologische, radiologische oder genetische Faktoren können eine adäquate (z.B. Elimination von maligne transformierten Zellen) oder schädliche (Zelltod bei Ischämie) Reaktion hervorrufen. Die zytotoxische Wirkung einiger Chemotherapeutika, wie cis-platin oder zytotoxischer T-Lymphozyten kommt durch Induktion der Apoptose zustande (Pollard et al., 2004).

Dieser Prozess verläuft in mehreren Phasen: (a) in der Initialphase erhält die Zelle einen apoptotischen Stimulus, (b) in der Effektor/Dezisionsphase wird der Zelltod aktiviert, ist aber noch reversibel, (c) mit der Degradations-/Exekutionsphase kommt es zu einer irreversiblen Zellschädigung, (d) in der Abräumphase werden die Zellreste phagozytiert (Crocker et al., 2003).

Kerr et al. (1972) haben als erste die morphologischen Veränderungen der Degradationsphase beschrieben. Zunächst kommt es zur Kontraktion der Mikrovilli, Verlust der interzellulären Verbindungen, Kondensierung des Chromatins entlang der Kernmembran mit Fragmentation der DNA in 180-200 bp große Fragmente und schließlich zur Karyorrhexis. Die Zelle schrumpft und wird zu Membran-bedeckten apoptotischen Körpern umgewandelt; während des gesamten Prozesses bleiben die Zellmembran und die Membran der apoptotischen Körper intakt, sodass es zu keiner Freisetzung der lysosomalen Enzyme kommt. Innerhalb von 30-60 min wird die apoptotische Debris phagozytiert ohne Entwicklung einer entzündlichen Umgebungsreaktion (Crocker et al., 2003; Pollard et al., 2004).

1.2.1 Apoptose- Nachweismethoden

Obwohl manche dieser Veränderungen lichtmikroskopisch sichtbar sind, können einzelne apoptotische Zellen übersehen werden. Zur besseren Darstellung kann die Elektronenmikroskopie oder sog. Vitalfärbungen, wie Acridinorange-Kernfärbung, benutzt werden. Andere Nachweismethoden, wie ISEL und TUNEL, basieren auf Markierung und visueller Darstellung der intranukleosomalen DNA-Fragmente auf einem formalinfixierten Gewebsschnitt. Immunhistochemisch kann man die Proteasen der Caspase-Familie, Einzelstrang-DNA oder auch Spaltprodukte, z.B. des Zytokeratins-Subtyps 18, darstellen (Crocker et al., 2003).

1.2.2. Morphologische Veränderungen der Apoptose in Hypophysenadenomen

Die morphologischen Veränderungen der Apoptose in Hypophysenadenomen sind ähnlich, wie in anderen Gewebwarten (Kapranos et al., 2004;Vidal et al., 2001).

In der frühen Degradationsphase des programmierten Zelltodes kommt es vor allem zu Kernveränderungen: das Chromatin verklumpt, kondensiert und lagert sich an der Kernmembran an; dabei akkumuliert es an einem Kernpol. Die zytoplasmatischen Organellen bleiben weitgehend erhalten, es kann aber zur Dilatation des Endoplasmatischen Retikulums kommen. Sekretorische Granula sind in jedem Zelltyp erhalten und zeigen eine normale Morpholgie bezüglich der Größe, Dichte, Gestalt und Lokalisation. Das Zytoplasma erscheint dichter. Die Zellen zeigen einen Kohäsionsverlust.
In der späteren Phase bricht der Zellkern in mehere kleine dichte Partikel (Karyorrhexis), die stark kondensiertes Chromatin enthalten. Die Zellen runden sich ab, das Zytoplasma zeigt eine deutliche Vakuolisierung auf Grund von Zerfall des Zytoskeletts. Eine geringe Anzahl von Mitochondrien und sekretorischen Granula erscheint noch intakt. Die Zelle entfernt sich von der Basalmembran und von angrenzenden Zellen, die Zellkontur wird irregulär und formt Ausläufer, welche, von Zellmembran umgeben, vom Rest der Zelle getrennt werden und

Apoptosekörper bilden. Diese bestehen aus Kernmaterial, welches vom schmalen Zytoplasmasaum umgeben ist.
Schließlich werden die Apoptosekörper durch Makrophagen und Stellate-Zellen phagozytiert. Selten werden sie nicht durch Phagozytose sondern sekundäre Nekrose eliminiert.

Hypophysenadenome, besonders mit Dopaminagonisten behandelte PRL-Adenome, können einen von Apoptose distinkten Zelltod aufweisen. Das Hauptmerkmal dabei ist die wachsende Dichte und später erhebliche Vakuolisierung der zytoplasmatischen Matrix der Zelle, die das Aussehen einer “dunklen” Zelle annimmt. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es aber nicht zur Kernfragmentation.

1.2.3. Apoptose- Mechanismen

Der Prozess der Apoptose ist sehr komplex, abhängig vom Stimulus und Zelltyp und wird durch Promoter und Inhibitoren reguliert. Zwei der wichtigsten Wege werden hier kurz dargestellt.

1.2.3.1. Extrinsischer/ Todesrezeptoren Weg der Apoptose

Zellen exprimieren mindestens 6 Zelloberflächenmoleküle, welche die Funktion sog. Todesrezeptoren haben. Eins davon, Fas (CD 95, APO 1), gehört zur Gruppe der TNF-Rezeptoren. Seine zytoplasmatische Domäne enthält eine sog. Todesdomäne, welche allen Todesrezeptoren eigen ist. An der Oberfläche anderer Zellen, z.B. zytotoxischer T-Lymphozyten, befindet sich eine Rezeptor-Bindungsstelle, Fas-Ligand. Durch die Rezeptor-Ligand-Bindung kommt es zur Initiierung der Apoptose. Drei zytoplasmatische Todesdomänen bilden eine Bindungsstelle für das Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne (FADD/MORT1). Der Fas-FADD-Komplex bindet Procaspase 8, welche sich proteolytisch aktiviert; ihre aktive Form aktiviert die Caspasen-Kaskade (Caspasen 3,6,7) und führt dadurch zum Zelltod. Allerdings exprimieren die Zellen das FLIP Protein, welches vom Aufbau inaktiver Procaspase 8 entspricht, an FADD bindet und dadurch einer Autoaktivierung der Procaspase 8 vorbeugt. Durch Export von Fas und Fas-Ligand an die Oberfläche der gleichen Zelle kommt es zum Zelltod, auf diese Weise wird die Lebensdauer von Gewebs- T- und B-Lymphozyten reguliert. Manche Beispiele der p53 Wirkung funktionieren nach diesem Prinzip (Pollars et al., 2004; Tannock et al., 2005; Kapranos et al, 2004).

Dieser Weg ist auch in STH- und PRL-sezernierenden Hypophysenadenomen konserviert, wie die Studie von (Candolfi et al, 2006) belegt. Dabei wurden adenovirale Vektoren, die TNF und Fas kodieren in die Zellen eingebracht, was zur Apoptose führte.

1.2.3.2 Intrinsischer/ mitochondrialer Weg der Apoptose

Die Initialschritte dieser Route sind noch nicht vollständig entschlüsselt; meist kommt es durch Bindung von bid (Mitglied der bcl 2-Familie) an Mitochondrien und unter Einfluß von bak oder bax (ebenfalls Mitglieder der bcl 2-Familie), zur Öffnung der Kanäle und Freisetzung von Cytochrom c, wie auch anderer Proteine ins Zytoplasma. Dort bindet Cytochrom c an das Apaf-1 Protein (apoptotische Protease aktivierender Faktor); dieser Komplex bindet und aktiviert Procaspase 9, welche dann die Procaspase 3 spaltet, die wiederum weitere Effektorcaspasen aktiviert. Zusätzlich spalten aktive Caspasen bid, was zu einer noch effizienteren Bindung von bid an Mitochondrien führt (Pollard et al., 2004; Tannock et al., 2005; Kapranos et al, 2004).

1.2.4 Effektoren und Mediatoren der Apoptose

1.2.4.1 Caspasen

Caspasen (Cystein Proteasen) gehören somit zu Proteinen, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind. Sie spalten selektiv Proteine im Zellplasma, wie Aktin, CK 18, Retinoblastom-Protein, mdm-2, aktivieren Proteinkinasen und führen zur Aktivierung der DNase durch Spaltung von ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) (Kapranos et al, 2004)

1.2.4.2 Bcl-2- Familie und Apoptose

Eine andere, an der Apoptosenregulation beteiligte Proteingruppe, ist die bcl-2 Familie. Sie umfasst sowohl Apoptose-Inhibitoren (bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bfl-1, mcl-1, A1), wie auch Promotoren (bax, bak, bid, bad, bik, bcl-xS, Puma, Noxa). Die Promotoren wirken häufig auf dem mitochondrialen Weg mit Freisetzung von Cytochrom c und konsekutiv Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Apoptose-Inhibitoren Verhindern diesen Mechanismus durch Bindung an das Apaf-1 Protein. Bcl-2 kann, den durch unterschiedliche Stimuli, wie Chemotherapeutika, oxidativer Streß, virale Infektionen, Hormonentzug-/Überschuß, p53, iniziierten Zelltod verhindern. Seit Entdeckung der t(14;18) Translokation bei Follikelzentrum B-Zell-Lymphomen, wird bcl-2 als Onkogen betrachtet. Dabei führt die Überexpression von bcl-2 nicht zur Steigerung der Proliferationsaktivität, sondern zum Überleben von Tumorzellen; bcl-2 hat sogar eine antiproliferative Wirkung aufgrund eines verzögerten Überganges in die Synthese-Phase des Zellzyklus, durch Hochregulation von p27-Proteins. Ein anderes Mitglied dieser Familie, bax, ein Apoptose- und Zellproliferation-Promoter, dessen Expression durch p53 reguliert wird, gehört zu den Tumorsuppressoren; bax-Mutationen konnten in Coloncarcinomen nachgewiesen werden (Nikiforos et al., 2000).

1.2.4.3. p53 und Apoptose

Im Prozeß der Apoptose spielt noch ein anderes Protein, p53, sogenannter Wächter des Genoms, eine große Rolle. Im Falle einer DNA-Schädigung stoppt p53 in der späten G1-Phase den Zellzyklus , u.a. durch Aktivierung von p21, eines Inhibitors der Cyklin-abhängigen Kinasen und indirekt durch Blockade von Rb. Da es in hohen Konzentrationen für die Zellen toxisch ist, wird seine Funktion negativ durch ein Partnerprotein, mdm-2, beeninflusst. Im Zytoplasma führt mdm-2 zur Degradation von p53. Nach einer DNA-Schädigung werden p53 und mdm-2 durch Proteinkinasen (z.B. DNA-abhängige Proteinkinase) phosphoryliert. Dieser Zustand verhindert die Degradation von p53 durch mdm-2, was zur Transkription der p53-regulierten Gene führt. Dazu gehören Apoptose-Promoter bax, Fas (CD 95/Apo 1), Apaf-1. Störung der Zellzykluskontrolle durch Aktivierung von Onkogenen stimuliert p19, ein Tumorsuppressorprotein, welches mdm-2 inaktiviert; es kommt zur Akkumulation von p53 im Zellkern und schließlich zum Zelltod. Am G2/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus ist p53 zur Verlängerung des Zyklusarrestes

notwendig; auch hier entfaltet es seine Wirkung durch Aktivierung von p21 und zusätzlich führt es zur Transportblockade der CDK1-Cyklin B1-Komplexe in den Zellkern (Pollard et al., 2004; Soini et al., 1998).

1.2.5. Tumorgenese und Apoptose

Mutationen der Gene, die eine Rolle im programmierten Zelltod spielen, z.B p53 und bcl-2, führen zur Entwicklung von Neoplasien, u.a. durch das Überleben maligne transformierter Zellen. Eine somatische p53-Mutation ist bei zahlreichen Neoplasien nachweisbar. Keimbahnmutation des p53 Gens ist mit Li-Fraumeni-Syndrom vergesellschaftet. Eine t(14;18) Translokation, welche den bcl-2 Gen betrifft, tritt beim B-Zell Follikelzentrum-NHL auf (Tannock et al., 2005). Nicht nur genetische sondern auch epigenetische Veränderungen können zur Störung der Apoptose führen, wie z. B. Deletion oder Hypermethylierung der CpG-Inseln (Bello et al, 2006).
In der Regel zeigen maligne Tumoren einen erhöhten Apoptoseindex, wahrscheinlich auf Grund von Zell-Zell und Zell-Matrixkontaktverlust oder Hypoxie. Bei malignen Lymphomen, hormonabhängigen epithelialen Tumoren sind ein hoher Apoptoseindex und eine niedrige bcl-2 Expression mit geringer Tumordifferenzierung vergesellschaftet. Andererseits weisen gering differenzierte Prostatacarcinome eine Überexpression von bcl-2 auf, was zum Überleben des Hormon-unabhängigen Zellklones führt. Andere epitheliale Neoplasien wiederum zeigen eine höhere apoptotische Aktivität in dysplastischen Läsionen (mit Ausnahme von Carcinomen des Magens und Dickdarmes) als in invasiven Tumoren (Soini et al, 1998).

Der Widerstand gegenüber dem programmierten Zelltod stellt ein häufiges Merkmal von Neoplasien dar, weil die Apoptose das Risiko, dass abnormale Zellen überleben, senkt. Aus diesem Grunde werden Tumoren nicht nur als Folge einer unkontrollierten Zellproliferation, sondern auch als Akkumulation transformierter Zellen betrachtet, besonders im Fall langsam proliferierender Neoplasien (Spurgers et al, 2006), wie z. B. Hypophysenadenome. Der Apoptoseindex allein zeigt für unterschiedliche Tumortypen keine Assoziation mit Überlebensraten (Soini et al, 1998).

2. Zielsetzung

Viele Faktoren beeinflussen das Wachstum von Hypophysenadenomen: Angiogenese, Apoptose, Proliferationsaktivität, Onkogene, Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren und Hormonrezeptoren. Histologische Merkmale allein lassen nicht zwischen benignen, invasiven und malignen Hypophysentumoren unterscheiden. Allerdings kann kein der o.g. Parameter n alleine das biologische Verhalten dieser Tumoren vorhersagen. Nach wie vor bleiben die vollständige chirurgische Resektion und das Ansprechen auf medikamentöse Therapie die wichtigsten prognostischen Faktoren des biologischen Verhaltens (Saeger et al., 2005; Kontogeorgos et al., 2006).

Das Ziel der Arbeit war einen weiteren, möglichen prognostischen Faktor, nämlich den Apoptoseindex der Wachstumshormon-produzierenden Adenome, insbesondere nach Therapie mit Somatostatinanaloga, näher zu untersuchen.
Wir wollten außerdem herausfinden, ob der Apoptoseindex mit folgenden Faktoren korreliert:

-Geschlecht
-Patientenalter bei Operation
-Adenomtyp
-Tumorgröße im MRT
-Tumorstadium (T1-T4)
-Invasionsstadium (E, I1-I3)
-Invasionslokalisation
-Färbeintensität der TUNEL-Reaktion
-Maximale Serumspiegel von Wachstumshormon, IGF-1 und Prolaktin bei Diagnosestellung
-Medikationsart (Dopaminagonisten, Somatostatinanaloga)
-Medikationsdauer
-Tages-/-kumulativ Dosis
-Maximale präoperative Serumspiegel von Wachstumshormon und IGF-1
-Veränderung der Tumorgröße direkt vor OP
-OP-Ergebnis (kurativ- nicht kurativ)

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Untersuchungsgut

Zur Auswertung für diese Arbeit kamen die Daten von 56 Akromegalie-Patienten, die in den Jahren 1994 und 1995 an einem Wachstumshormon-produzierenden Tumor der Hypophyse in der Universitätsklinik Hamburg operiert wurden, dabei handelte sich ausschließlich um Hypophysenadenome. In allen Fällen wurde der transnasale/transsphenoidale Zugang gewählt. Das operativ gewonnene Tumormaterial wurde in gepuffertem 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Zu diagnostischen Zwecken wurden konventionelle histologische Färbungen (HE, PAS) und breitgefächerte immunhistochemische Untersuchungen zur Hormonexpression-Bestimmung durchgeführt. Alle Adenome zeigten eine Expression des Wachstumshormons: in 33 Fällen (60%) zeigte sich ausschließlich eine STH-Produktion, davon fielen 16 Fälle (29,1%) auf das dicht granulierte STH-Adenom und 17 Fälle (30,9%) auf das gering granulierte STH-Adenom. Bei 10 Patienten (18%) wurde ein gemischtes STH/PRL-Adenom und in 12 Fällen (21,8%) ein plurihormonales Adenom diagnostiziert. Das Ziel war, bei allen in der Studie vorkommenden Patienten den Apoptoseindex am Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe mittels TUNEL-Assays zu bestimmen. In einem Fall war das Gewebe flächenhaft nekrotisch verändert und dadurch nicht beurteilbar; zur statistischen Auswertung gelangten nur die eindeutigen Ergebnisse.

Die der Studie zugrunde liegenden klinischen Daten stammen aus den Krankenakten der Neurochirurgischen Klinik der Universität Hamburg. In die Datenerfassung gingen die klinischen Befunde ein, wie Ergebnisse der laborchemischen, radiologischen und intraoperativen Untersuchungen, stattgehabte medikamentöse Therapie und das Ansprechen auf die Medikation. Ausgewählt wurden die basalen STH- und PRL-Werte sowie IGF-1/Somatomedin C-Spiegel bei Diagnosestellung, prä- und postoperativ. Es wurden Angaben über die medikamentöse Therapie analysiert, insbesondere das verabreichte Medikament (Somatostatinanaloga oder Dopaminagonisten), Therapiedauer und Tagesdosis; daraus wurde die Kumulativdosis errechnet. Ferner fand eine Überprüfung des Therapieerfolges anhand der laborchemischen (Normalisierung der Hormonspiegel) und radiologischen Befunde (Tumorverkleinerung) statt.

Die neuroradiologischen Untersuchungen lieferten Informationen über die Tumorgröße und Ausdehnung (intra-, extrasellär) vor- und während bzw. nach medikamentöser Therapie. Des weiteren wurden aus den Operationsberichten die Angaben über Tumorinvasivität und Radikalität der Operation festgehalten.

19 Patienten waren weiblich, 37 Patienten männlich. Der Altersmittelwert der Patienten zum Operationszeitpunkt lag bei 46,8 ± 13,8 Jahren, der jüngste Patient war 7 Jahre alt, die älteste Patientin 76 Jahre.

In der Zeit zwischen Diagnose und Operation wurden 53 Patienten medikamentös mit der Intention der Normalisierung der Hormonspiegel und Größenreduktion des zu operierenden Tumors behandelt, bei 11 Patienten wurden Dopaminagonisten (DA) eingesetzt und bei 42 Patienten Somatostatinpräparate (SMS) gegeben. Die mittlere Medikationsdauer betrug 6,9 ± 7,5 Monate, die mittlere Tagesdosis für die Dopaminagonisten (DA) lag bei 11,5 ± 4,9 mg und für die Somatostatinpräparate (SMS) bei 375,0 ± 322,3 mg.

3.2. Erhobene Parameter

Zur weiteren Auswertung wurden folgende Parameter registriert:

- Geschlecht
- Patientenalter bei Operation
- Adenomtyp
- Apoptoseindex in Prozent
- Färbeintensität
- Tumorgröße im Magnetresonanztomogramm
- Tumorstadium (T1 - T4)
- Invasionsstadium (E, I1 - I3)
- Invasionslokalisation (E, Sinus cavernosus, Periost, Sella turcica)
- maximaler Wachstumshormon-Spiegel (HGH-Spiegel) bei Diagnosestellung
- maximaler IGF-1-Spiegel bei Diagnosestellung
- maximaler Prolaktinspiegel bei Diagnosestellung
- Medikationsart (Dopaminagonisten (DA), Somatostatinpräparate (SMS)

- Medikationsdauer
- Tagesdosis
- kumulative Dosis der präoperativen Medikation
- maximaler Wachstumshormon-Spiegel (HGH-Spiegel) direkt vor OP
- maximaler IGF-1-Spiegel direkt vor OP
- Veränderung der Tumorgröße direkt vor OP (bezogen auf den Ausgangsbefund)
- OP-Ergebnis (kurativ – nicht kurativ)

3.3. Untersuchungsmethoden

3.3.1. TUNEL-Assay

Zur Detektion und Quantifizierung der Apoptose wurde der In Situ Cell Death Detection Kit, AP der Firma Roche verwendet.

Kit-Inhalt bestand aus:

1. Blaue Phiole	Enzymlösung	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase aus Kalbthymus, rekombiniert in E. coli in Lagerungspuffer
2. Violette Phiole	Markierlösung	Nukleotid-Mischung in Reaktionspuffer
3. Gelbe Phiole	Converter-AP	Antifluoreszein Antikörper, Fab-Fragment vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase

Weitere benötigten Reagenzien (kein Kit-Inhalt):

- Xylol und Alkohol (absolut, 95%, 90%, 80%, 70%)
- Destilliertes Wasser
- Waschpuffer: PBS
- Proteinase K 10-20µg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4-8
- Substratlösung (Fast Red, Sigma)
- Rekombinierte DNase I
- Tris/HCl-Puffer
- Magnesiumchlorid

3.3.2. Praktische Durchführung des Assays

Entparaffinieren der Schnitte wurde durch Erhitzen auf 60°C und anschließende Waschung in Xylol (3 mal 3 Min) erreicht. Zum Rehydrieren wurden die Proben in absteigender Alkoholreihe (je 2 mal 3-5 min.) und in destilliertem Wasser gewaschen.

Daraufhin wurde das Gewebe mit Proteinase K 20 Min. bei 30°C inkubiert und 2 mal mit PBS bei 15-25°C gewaschen.

Die Vorbereitung der TUNEL-Reaktion Mischung erforderte, nach Hersteller Angaben, eine Vermischung der Enzymlösung (50µl) mit der Markierlösung (450µl); 50µl der TUNEL-Mischung wurden auf die Gewebsschnitte aufgetragen und in einer dunklen, feuchten Kammer 60 min. bei 37°C inkubiert und danach 3 mal 5 min. in PBS gewaschen.

Der Objektträger wurde um das Gewebe herum trocken gewischt und danach mit 50 µl Converter-AP benetzt und mit Parafilm bedeckt sowie anschließend 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach 3maliger Waschung mit PBS wurde die Substratlösung hinzugefügt; die Schnitte wurden in Dunkelheit 10 min. bei 15-25°C inkubiert und danach wieder 3mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate gedeckelt und lichtmikroskopisch untersucht.

Kontrolle

Zur Überprüfung einer korrekten Ausführung des Assays wurden gleichzeitig Positiv- und Negativ-Kontrollen aus Paraffin-einebetteten Gaumenmandelgewebe angefertigt. Für die Negativ-Kontrolle wurden die entparaffinierten Schnitte mit 50µl Markierlösung statt mit TUNEL-Mischung inkubiert.

Die entparaffinierten Schnittpräparate für die Positiv-Kontrolle wurden mit rekombinierter DNase I vorbehandelt, um Brüche der DNA-Stränge zu induzieren. Hinzu wurden 3000 U/ml des Enzyms mit 50mM Tris/HCl-Puffer, 10mM Magnesiumchlorid 10 min. bei 15-25°C und pH 7,5 inkubiert und danach dem gleichen Procedere, wie das Tumorgewebe ausgesetzt.

Nur bei positiver Reaktion der Positiv-Kontrolle und negativer Reaktion der Negativ-Kontrolle wurde das Ergebnis ausgewertet.

3.3.3 Detektion und Quantifizierung der Apoptose

Alle Tumorzellkerne, die eine rote Färbung aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Zur Quantifizierung der Apoptose wurde der Apoptoseindex (ALI) bestimmt: dazu wurde die Prozentzahl der positiven Zellkerne pro Tausend Tumorzellen errechnet; dabei wurde auch die Intensität der Färbereaktion beurteilt (+ schwach bis +++ stark).

3.3.4. Fehlerquellen und Störfaktoren

Trotz Gebrauch standardisierter Kits kann es gelegentlich zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommen (Tannock et al., 2005; Crocker et al., 2003)

Faktoren, die die Markierung der nukleosomalen DNA beeinflussen:

Faktor	Wirkung
Gewebeaustrocknung	Erhöht die falsch positive Rate
Fixierung zu lang	Erhöht die falsch negative Rate
Fixierung zu spät	Erhöht die falsch positive Rate
Fixierung nicht ausreichend	Erhöht die falsch positive Rate
Nähe zum Gewebsrand	Färbefehler (sog. Randphänomene)
DNA-Risse beim Schneiden	Erhöht die falsch positive Rate
Vorbehandlung mit Mikrowelle	Erhöht die Zahl der markierten Kerne
Inkubationsdauer	Zu lang: falsch positive Rate erhöht Zu kurz: falsch negative Rate erhöht
Dauer und Konzentration der Transferase-Reaktion	Beeinflusst die Zahl der markierten Kerne
Brüche der DNA-Stränge	Nicht nur bei Apoptose

3.4. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde das Programm StatView 5.0 der Firma SAS verwendet (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina 27513, USA).

3.4.1. Mittelwerte

Zur Beschreibung der kontinuierlichen Variablen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und als solche angegeben (Mittelwert ± Standardabweichung).

Bei unabhängigen Stichproben wird zur Bestimmung der Signifikanz von Mittelwertunterschieden zwischen mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-H-Test durchgeführt. Zeichnen sich hierbei signifikante Mittelwertunterschiede für eine Variable ab (p-Wert kleiner 5%), so kann der Paarvergleich zwischen den einzelnen Gruppen stattfinden (Bortz und Lienert, 1998).

Zur Bestimmung von Mittelwertunterschieden zweier Gruppen und der statistischen Signifikanz dieser Unterschiede kam der verteilungsfreie (nonparametrische) Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz. Für die Bestimmung der statistischen Signifikanz von Mittelwertunterschieden abhängiger Stichproben wurde der verteilungsfreie (nonparametrische) Wilcoxon-Signed-Rank-Test angewandt (Bortz 1999a).

3.4.2. Korrelationen

Als Zusammenhangsmaß der erhobenen Parameter wurde bei kontinuierlichen Variablen der Pearson-Korrelationskoeffizient (r, mögliche Werte zwischen 1 und -1, 0 bedeutet keinerlei Zusammenhang) bestimmt und der Signifikanztest nach Fischer durchgeführt (Bortz 1999b).

3.4.3. Häufigkeitsunterschiede

Für die Bestimmung von Häufigkeitsunterschieden verschiedener Gruppen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt (Ramm und Hofmann, 1982).

4. Ergebnisse

4.1. Apoptoseindex

Die mittels TUNEL-Assays angefertigten Präparate wurden lichtmikroskopisch untersucht, zuerst wurde anhand der HE-Schnitte sichergestellt, dass nur Adenomgewebe erfasst wurde. Als positiv wurde jegliche, auch schwache Rotfärbung der Zellkerne gewertet. Dabei konnten die leuchtend rot-markierten Zellkerne sicher vom übrigen, blassen Adenomgewebe abgegrenzt werden. Zur Quantifizierung der Apoptose wurde der Apoptoseindex (ALI) als Prozentsatz der positiven Zellkerne pro Tausend Tumorzellen bestimmt, dabei wurde auch die Intensität der Färbung beurteilt (+ schwach bis +++ stark). Trotz der blassen Anfärbung des Adenomgewebes konnten die Tumorzellen und ihre Konturen problemlos beurteilt werden.

Eine Apoptose ließ sich bei 55 Patienten auswerten, bei einem Patienten konnten nicht genug vitale Tumorzellen isoliert werden, um eine sichere Ermittlung der Apoptoserate zu gewährleisten. Nur bei 20 Patienten (36,4%) konnte der Effekt der Apoptose im Tumorgewebe nachgewiesen werden; dabei fielen schon lichtmikroskopisch in der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) Apoptosekörper auf. Im TUNEL-Assay konnte in diesen Zellen eine leuchtend rote Kernanfärbung beobachtet werden, die als positiver Reaktionsausfall gewertet wurde. Der Apoptoseindex lag im Mittel bei 3,6 ± 6,5% mit einem Maximum von 30% und einem Minimum von 0%.

11 Tumoren (20%) wiesen Apoptoseindizes von 10 und mehr Prozent auf; in diesem Kollektiv waren 3 Patienten mit DA und 8 Patienten mit SSA behandelt. Dabei zeigten nur 3 Adenome klinisch positive Therapieeffekte, wie Tumorschrumpfung und Normalisierung der Hormonspiegel im Serum.

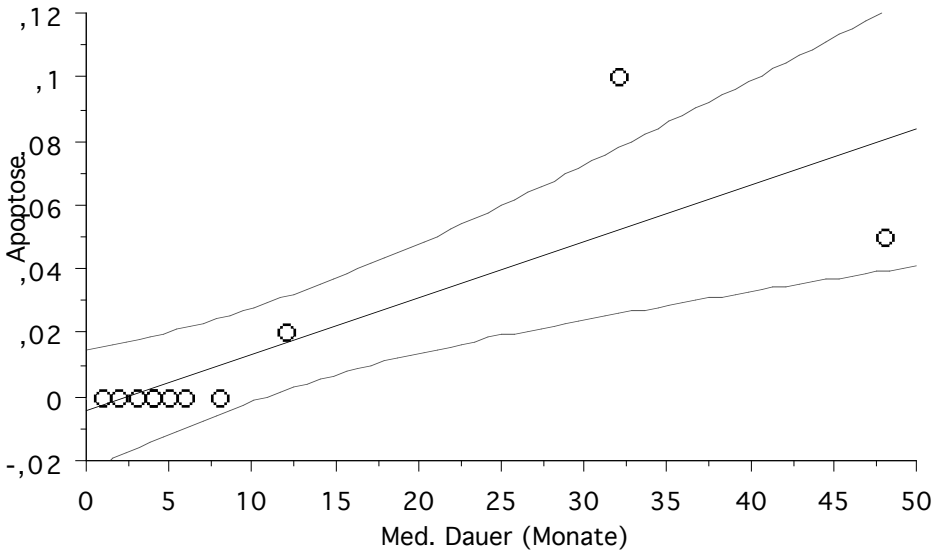
4.1.1. Korrelationen der Apoptoserate

Das Patientenalter mit einem Mittelwert von 46,8 ± 13,8 Jahren korrelierte nicht mit der Apoptoserate (r=0,070, p=0,612)

Der Mittelwert der Tumorgröße bei Diagnosestellung konnte mit 16,4 ± 6,7 mm aus den MRT-Aufnahmen ermittelt werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen Tumorgröße und Apoptoserate war negativ und mit r=-0,178 und p=0,199 statistisch nicht signifikant. Im Rahmen der Medikation veränderte sich die Tumorgröße und nahm im Mittel um 1,6 ± 4,9 mm ab. Für diese Abnahmen konnte ebenfalls kein Zusammenhang mit der Apoptoserate gefunden werden (r=-0,063, p=0,827).

Die Medikationsdauer von 6,9 ± 7,6 Monaten korrelierte positiv, jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant mit der Apoptoserate (r=0,144, p=0,337). Bestimmt man die Korrelation der Medikationsdauer mit der Apoptoserate für jedes Medikament getrennt, so ergibt sich für die Medikationsdauer mit Somatostatinpräparaten (SMS) keinen signifikanten Zusammenhang mit der Apoptoserate (r=0,115, p=0,508), jedoch für die Dopaminagonisten (DA) mit einem sehr hohem Korrelationskoeffizienten (r=0,818, p=0,001). Wie Abbildung 1 zeigt, basiert diese Bestimmung allerdings nur auf wenigen Wertepaaren.

Abb. 1: Regressionsgerade der Apoptoserate und der Medikationsdauer mit DA



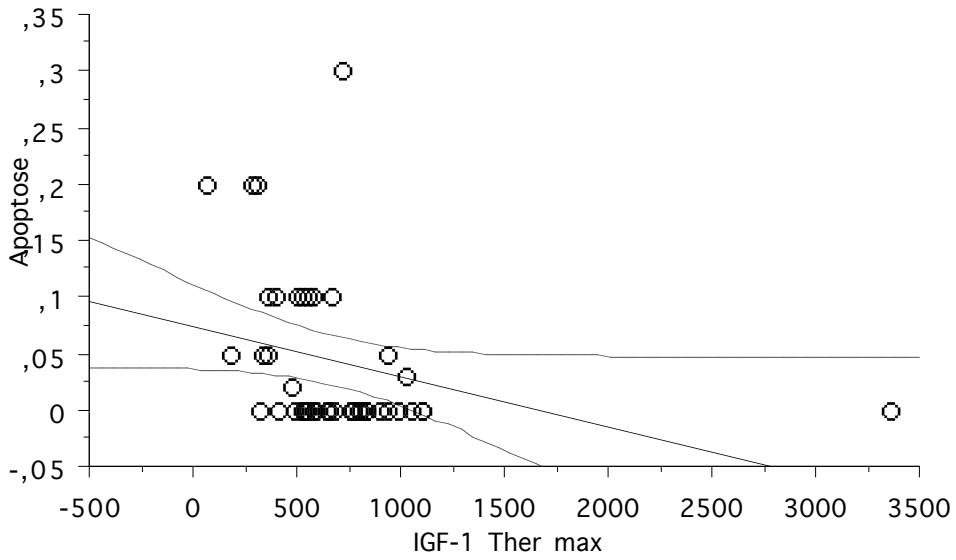
Bei der kumulativen Medikamentendosierung ergibt sich für die Somatostatinpräparate (SMS) sogar ein negativer Korrelationskoeffizient von r=-0,112, während für die kumulative Dopaminagonistenmedikation (DA) ein positiver Korrelationskoeffizient von r=0,270 bestimmt wurde. Beide Werte sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Auch die Beziehung der Apoptoserate zu den Hormonspiegeln von Wachstumshormon (HGH), IGF-1 und Prolaktin bei Diagnosestellung ist nicht statistisch signifikant. Es ergibt sich für das Wachstumshormon ein Mittelwert von 36,7 ± 37,4 µg/dl und ein Korrelationskoeffizient von r=-0,201 (p=0,142), für IGF-1 ein Mittelwert von 1106 ± 563 µg/dl und ein Korrelationskoeffizient von r=-0,060 (p=0,678) und für Prolaktin ein Mittelwert von 24,9 ± 39,9 µg/dl bei r=0,230 (p=0,095).

In Bezug auf die Spiegel der Hormone direkt vor der Operation zeigt sich allerdings ein signifikanter inverser Zusammenhang mit IGF-1 mit r=-0,304 (p=0,047), während der Korrelationskoeffizient für das Wachstumshormon (HGH) und die Apoptoserate zwar ebenfalls negativ, jedoch nicht statistisch signifikant ist (r=-0,208, p=0,166). Abbildung 2

zeigt die Regressionsgerade für IGF-1 und Tabelle 1 gibt einen Überblick über die beschriebenen Werte.

Abb. 2: Regressionsgerade der Apoptoserate und des IGF-1-Spiegels



Tab. 1: Korrelationen der einzelnen Parameter mit der Apoptoserate

		Korrelationskoeffizient	p-Wert
Alter		0,070	0,612
Tumorgröße bei Diagnosestellung		-0,178	0,199
Tumorgrößenabnahme durch Medikation		-0,063	0,827
Medikationsdauer	**DA**	**0,818 *****	**0,001**
	SMS	0,115	0,508
Kumulative Dosis	DA	0,270	0,380
	SMS	0,112	0,520
HGH	Bei Diagnosestellung	-0,201	0,142

	präoperativ	-0,208	0,166
IGF-1	Bei Diagnosestellung	-0,060	0,678
	präoperativ	**-0,304 ***	**0,047**
Prolaktin	Bei Diagnosestellung	0,230	0,095

4.1.2. Mittelwertdifferenzen der Apoptose

In Bezug auf das Geschlecht der Patienten zeigten sich geringe Mittelwertdifferenzen hinsichtlich der Apoptoserate von 2,2 ± 6,5% bei den Frauen versus 4,3 ± 7,1% bei den Männern, die statistisch nicht signifikant waren (p=0,296).

Auch beim Vergleich der T-Stadien der Tumore waren signifikante Mittelwert Unterschiede der Apoptoserate nicht nachweisbar (T1: 4,1 ± 7,3%, T2: 4,1 ± 7,2%, T3 2,3 ± 4,2%, T4 kam nur bei einem Patienten vor, p=0,813). Bezogen auf die Invasivität der Tumore ergaben sich wiederum geringe Mittelwertdifferenzen (E: 2,6 ± 3,5%, I1: 7,1 ± 9,6%, I2: 3,1 ± 6,7% und I3: 1,8 ± 3,4%, p=0,459), die jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant waren. Ähnlich verhielt es sich mit der Gruppierung nach Adenomtyp. Auch hier waren geringe Mittelwertdifferenzen der Apoptoserate zu berechnen, die nicht statistisch signifikant wurden (dicht granuliertes GH-Adenom: 2,7 ± 5,6%, gering granuliertes GH-Adenom: 2,6 ± 3,5%, gemischtes GH/PRL-Adenom: 8,0 ± 11,4% und plurihormonales Adenom: 2,7 ± 4,3%, p=0,818). Die Ansprechbarkeit des Tumors auf die medikamentöse Therapie im Sinne einer Tumorverkleinerung ergab wiederum geringfügige nicht signifikante Unterschiede (Tumorverkleinerung: 5,9 ± 9,2%, Tumor nicht verkleinert: 3,2 ± 5,9%, p=0,412).

Im Vergleich der beiden Medikationen sind die Unterschiede der Apoptoserate nicht signifikant (DA: 1,5 ± 3,2%, SMS: 4,8 ± 7,5%, p=0,315).

Unterschiede in der Apoptoserate im Vergleich der Tumoren, bei denen die hormonellen Veränderungen durch die Medikation reduziert wurden, gegenüber den Tumoren, bei denen dies nicht der Fall war, konnten ebenfalls nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden. Für das Wachstumshormon ergab sich eine Apoptoserate von 5,8 ± 7,3% für die auf

die medikamentöse Therapie mit Hormonspiegelreduzierungen reagierenden Tumoren und 3,1 ± 6,6% für die nicht reagierenden Tumoren (p=0,164). Für IGF-1 wurde die mittlere Apoptoserate mit 5,6 ± 6,8% bei den Tumoren mit Hormonspiegelverringerung nach Medikation und 3,4 ± 6,9% für die übrigen Tumoren bestimmt (p=0,194).

Selbst im Vergleich der Tumore, die erfolgreich operiert wurden mit denen, bei denen dies nicht so war, gab es nur gering, statistisch nicht signifikante Unterschiede der Apoptoserate (kurativ: 4,2 ± 7,1%, nicht kurativ: 1,4 ± 3,2%, p=0,245).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Tab. 2: Mittelwertunterschiede der Apoptoserate

		Mittelwerte und Standard-abweichungen der Apoptoserate	p-Wert
Geschlecht			
	Weiblich	2,2 ± 6,5%	0,296
	Männlich	4,3 ± 7,1%	
T-Stadien der Tumore			
	T1	4,1 ± 7,3%	0,813
	T2	4,1 ± 7,2%	
	T3	2,3 ± 4,2%	
	T4	-	
Invasivität des Tumors			
	E	2,6 ± 3,5%	0,459
	I1	7,1 ± 9,6%	
	I2	3,1 ± 6,7%	
	I3	1,8 ± 3,4%	
Tumortyp			

	Dicht granuliert STH	2,7 ± 5,6%,	0,818
	Gering granuliert STH	2,6 ± 3,5%,	
	Gemischt STH/PRL	8,0 ± 11,4%	
	Plurihormonal	2,7 ± 4,3%,	
Ansprechbarkeit des Tumors auf Medikation			
	Ja	5,9 ± 9,2%	0,412
	Nein	3,2 ± 5,9%,	
Medikation			
	DA	1,5 ± 3,2%	0,315
	SMS	4,8 ± 7,5%	
HGH nach Medikation			
	Verringert	5,8 ± 7,3%	0,164
	Nicht verringert	3,1 ± 6,6%	
IGF-1 nach Medikation			
	Verringert	5,6 ± 6,8%	0,194
	Nicht verringert	3,4 ± 6,9%	
Operationserfolg			
	Kurativ	4,2 ± 7,1%,	0,245
	Nicht kurativ	1,4 ± 3,2%,	

4.2. Färbeintensität

Die Färbeintensität ließ sich bei den Präparaten der gleichen 55 Patienten erheben, bei denen die Apoptose zu ermitteln war. Die Bestimmung der Färbeintensität erfolgte als Zuordnung zu einer von 4 Gruppen: bei den Präparaten der 35 Patienten mit 0% Apoptoserate lag die Färbeintensität naturgemäß bei 0, 4 Patienten (7,3%) wiesen eine Färbeintensität von +1 auf, 9 Patienten (16,4%) eine Färbeintensität von +1 bis +3 und 7 Patienten (12,7%) eine Färbeintensität von +2.

4.2.1. Mittelwertunterschiede im Vergleich der 4 Gruppen untereinander

Hinsichtlich des Patientenalters, der bei Diagnosestellung ermittelten Hormonspiegel für Wachstumshormon, IGF-1 und Prolaktin sowie hinsichtlich der Tumorgröße bei Diagnosestellung gab es keine signifikanten Mittelwertunterschiede im Vergleich der 4 Gruppen untereinander. Das gleiche galt für die Dauer der Medikation und die kumulativen Dosen der Dopaminagonisten (DA) bzw. Somatostatinpräparaten (SMS). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Einzig für das Wachstumshormon (HGH) und für IGF-1 direkt vor OP, also nach der Medikation, ließen sich Mittelwertdifferenzen zwischen den 4 Gruppen zeigen (Wachstumshormon (HGH): p=0,001, IGF-1: p=0,002). Dabei lagen die Gruppen 0 und +2 jeweils deutlich höher als die Gruppe +1 und die Gruppe +1 bis +3. In den Abbildungen 3 und 4 sind die Verteilungen der Werte für die 4 Gruppen getrennt als Box-Plot dargestellt.

Tab. 3: Mittelwerte der einzelnen Parameter für jede Gruppe

	Gruppe				Kruskal-Wallis-Test p-Wert
	0	+1	+1 bis +3	+2	
Alter (Jahre)	45,9 ± 12,6	53,3 ± 8,4	49,3 ± 20,6	44,0 ± 13,3	0,527
HGH pre (µg/dl)	43,6 ± 43,5	13,1 ± 6,5	32,3 ± 22,6	20,7 ± 14,4	0,138
IGF-1 pre (µg/dl)	1130 ± 501	798 ± 261	1216 ± 969	1034 ± 121	0,397
PRL pre (µg/dl)	22,4 ± 24,7	8,3 ± 4,8	45,5 ± 83,9	20,5 ± 20,7	0,231
Tumorgröße (mm)	17,2 ± 7,4	17,0 ± 3,7	16,3 ± 5,6	12,1 ± 5,3	0,398
Medikationsdauer (Monate)	5,8 ± 3,3	6,8 ± 4,6	9,4 ± 9,5	14,4 ± 18,8	0,794
Kumulierte SMS-Dosis (g)	99,3 ± 141,5	42,5 ± 36,7	52,5 ± 36,4	54,0 ± 25,5	0,643
Kumulierte DA-Dosis (g)	1,48 ± 1,16	2,70 (n=1)	7,05 ± 3,61	10,85 ± 15,20	0,258
HGH post (µg/dl)	**16,4 ± 16,6**	**4,0 ± 2,3**	**4,2 ± 3,3**	**22,0 ± 12,6**	**0,001**
IGF-1 post (µg/dl)	**824 ± 557**	**369 ± 150**	**408 ± 199**	**704 ± 284**	**0,002**

(Abb. 3: Unterschiede der Wachstumshormon-Spiegel zwischen den 4 Gruppen nach medikamentöser Therapie

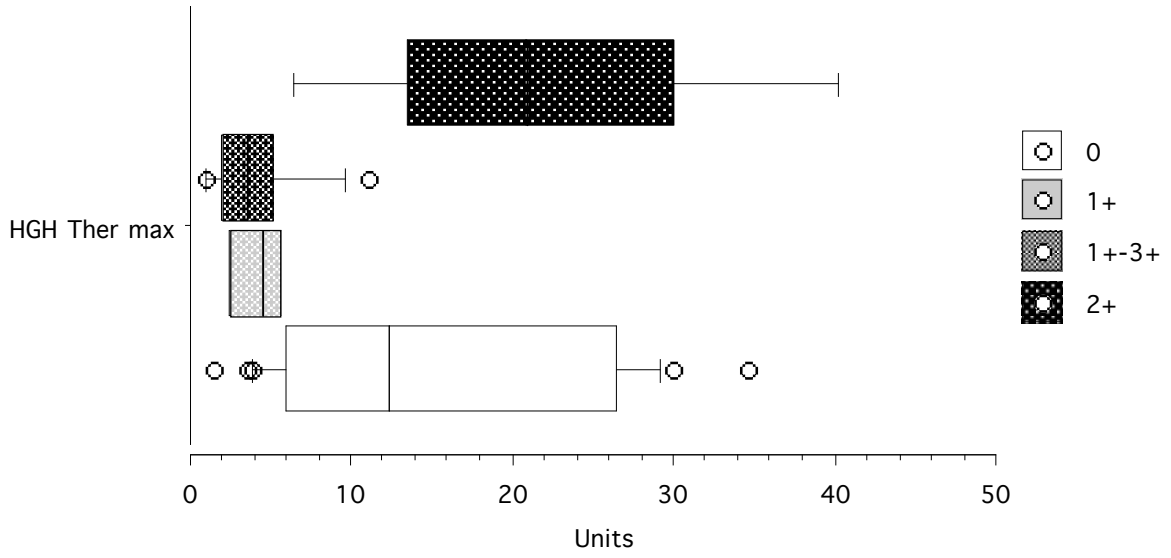
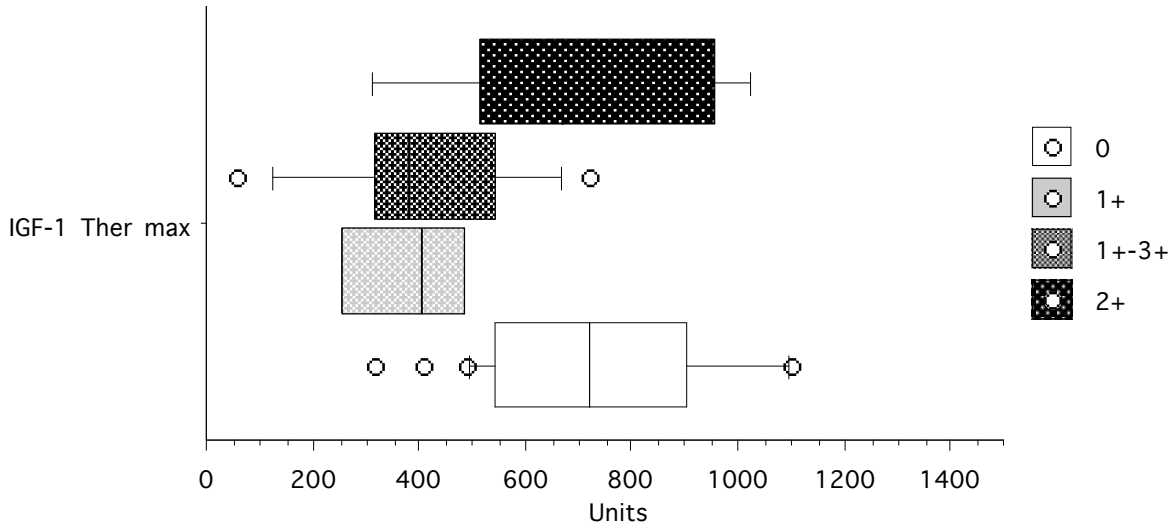


Abb. 4: Unterschiede der IGF-1-Spiegel zwischen den 4 Gruppen nach medikamentöser Therapie



4.2.2. Häufigkeitsunterschiede im Vergleich der 4 Gruppen untereinander

Es gab keine statistisch signifikanten Häufigkeitsunterschiede im Vergleich der 4 verschiedenen Gruppen der Färbeintensität hinsichtlich der Parameter Geschlecht, T-Stadien der Tumore, Invasivität der Tumore, Tumortyp, Tumorverkleinerungen nach medikamentöser Therapie, verabreichter Medikamententyp und auch nicht hinsichtlich des kurativen bzw. nicht kurativen Operationserfolgs.

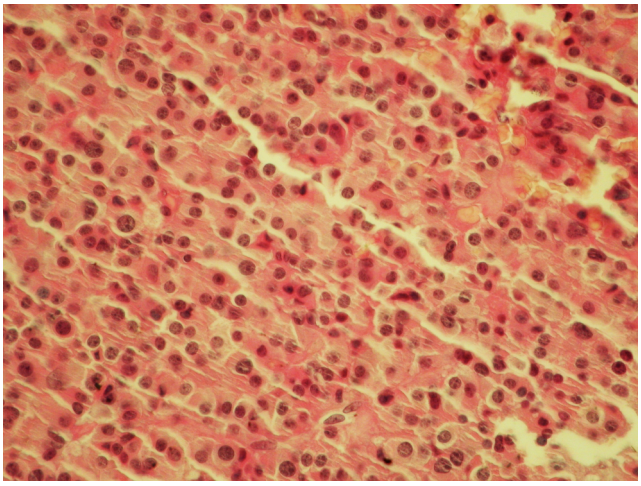


Abb.1 Dicht granuliertes STH-Adenom, HE

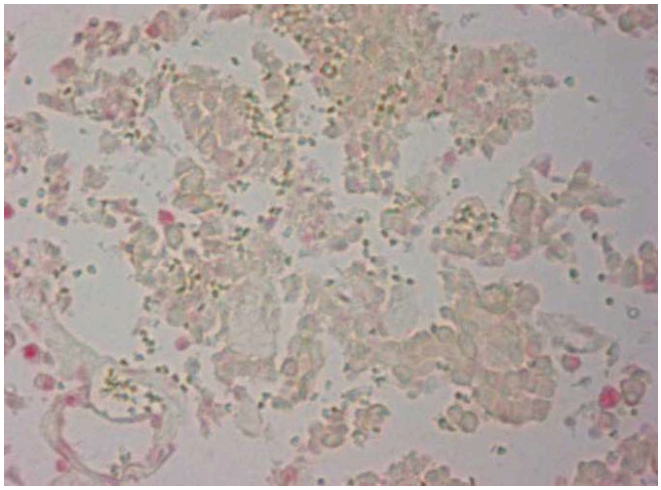


Abb.2 Dicht granuliertes STH-Adenom, TUNEL

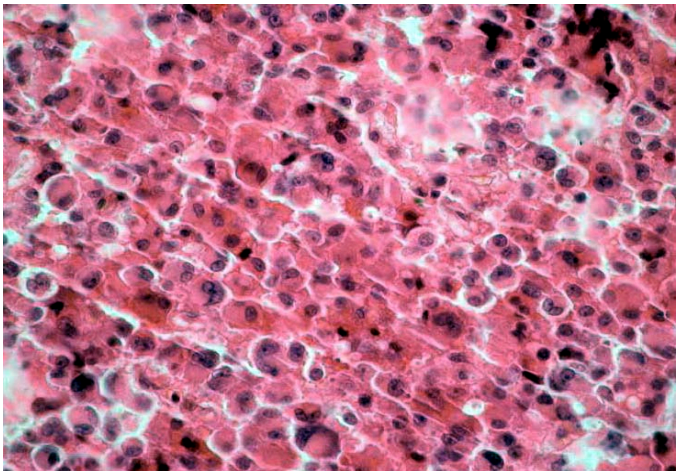


Abb.3 Gering granuliertes STH-Adenom, HE

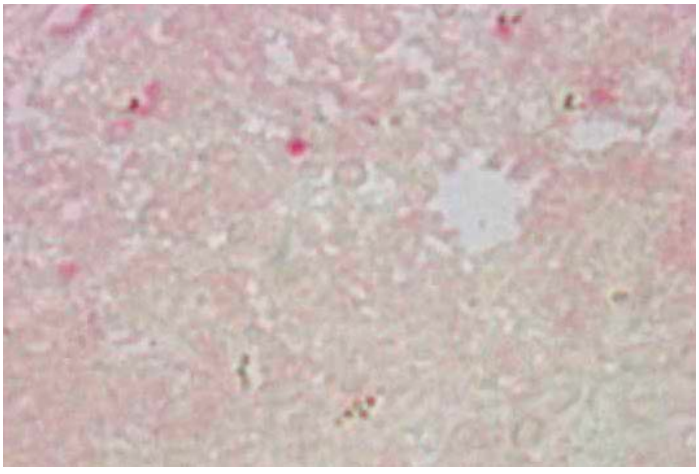


Abb 4 Gering granuliertes STH-Adenom, TUNEL

5. Diskussion

Die vorliegende Studie evaluiert den Apoptoseindex in STH-produzierenden Hypophysendenomen in Korrelation zu klinischen und morphologischen Befunden.

In 36,4% der untersuchten Fälle konnte der programmierte Zelltod nachgewiesen werden. Dabei betrug der Apoptoseindex 3,6± 6,5% mit einem Minimum von 0% und einem Maximum von 30%. Dies entspricht den Ergebnissen von Vidal et al. (2001), die 8.000 Hypophysenbiopsate elektronenmikroskopisch untersuchten. Dabei stellten sie fest, dass die Apoptose im normalen Hypophysengewebe nicht vorkommt und selten in Adenomen zu finden ist, am häufigsten in corticotrophen und thyreotrophen Adenomen. Kontogeorgos (1997) konnte in 54% der Fälle positive Zellkerne mittels ISEL-Methode nachweisen; häufiger in FPA als NFPA. In späteren Untersuchungen entdeckte diese Gruppe und auch Sambaziotis (Kontogeorgos et al. 2002 ; Sambaziotis, Kapranos et al. 2003), dass die Apoptosehäufigkeit mit bcl-2 und bax- Expression korrelierte: höherer ALI der FPA war mit Überexpression von bax und niedriger ALI der NFPA mit hohen bcl-2 Werten vergesellschaftet. Demgegenüber fanden Ozer et al. (2003) und Turner et al. (2000) eine verminderte bcl-2 Expression in NFPA und Rezidivtumoren; laut Turner korrelierte die bcl-2 Anfärbbarkeit mit gesteigerter Vaskularität der Tumoren.

Kulig et al. (1999) berichten ebenfalls über niedrige Apoptoseindizes bei Adenomen; deutliche Steigerungen bis auf das 5-fache beobachteten sie bei schwangeren und postpartalen Frauen, gefolgt von Hypophysencarcinomen mit etwa 4-fachen Erhöhung des Apoptoseindex. In diesen Fällen fanden sie eine statistisch signifikante Verminderung der bcl-2 Expression. Ebenfalls in anderen hormonabhängigen Tumoren, wie bei Mammacarcinomen steigt mit der Dedifferenzierung der Apoptoseindex und die bcl-2 Reaktion wird schwächer.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Apoptosehäufigkeit können darauf beruhen, dass es sich dabei um ein kurz dauerndes Ereignis handelt (bis 80 min. n. Kontogeorgos, bis 3Std. n. Pollard Biology). Dies könnte nur durch Untersuchungen in Echtzeit vermieden werden.

Zum anderen sind die Methoden zum Nachweis der intranukleosomalen DNA, wie TUNEL und ISEL, Schwankungen unterworfen- Gewebefixierung, Konzentration der Enzyme, prolongierte Proteolyse, Randphänomene bei fragmentierten Proben und Nachweis von DNA-Fragmenten nekrotischer Zellen können zu falschen Resultaten führen (Pollard et al., 2004; Tannock et al., 2005). Um diese Fehlerquelle zu reduzieren wären weitere, gleichzeitig

angewandte z.B. immunhistochemische Methoden zum Nachweis von Apoptose, wie Caspase-3, CK18-Spaltprodukte, empfehlenswert. Limitierend ist häufig die kleine Größe der Proben, die mehrere Untersuchungen unmöglich macht, insbesondere, da mehrere Stufenschnitte vom Tumorgewebe für die exakte Diagnose notwendig sind. Ferner werden in manchen Studien nur wenige Fälle untersucht, so dass nicht sicher ist, ob die Kollektive repräsentativ sind.

Die Elektronenmikroskopie kann, trotz exzellenter Darstellung Apoptose-typischer Veränderungen, dieses Problem nicht vollständig lösen; durch eine nur kleine Gewebsmenge und unterschiedliche Schnittebenen werden die absterbenden Zellen teilweise nicht erfasst (Vidal et al., 2001).

Auf der anderen Seite werden die Untersuchungen der Apoptose nicht nur am menschlichen Tumorgewebe, sondern auch an Tieren (Ratten und Mäusen) und an Zelllinien durchgeführt und somit werden die Resultate von heterologen Systemen gewonnen und miteinander verglichen (Melmed 2003). Dabei ist es bekannt, dass Verlust der Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte ein apoptotischer Stimulus ist und zum höheren ALI führt (Pollard et al., 2004; Kulig et al., 1999).

Unsere Studie ergab, dass der Apoptoseindex unabhängig vom Geschlecht, Alter, Tumortyp, Tumorgröße und Invasionsverhalten ist. Nur Kontogeorgos et al. (2002) fanden eine gesteigerte Apoptoserate in hormonsezernierenden Mikro- als Makroadenomen, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Green et al. (1997) konnten keine Korrelation von ALI und p53-Expression zum Tumortyp oder Tumorgröße nachweisen.

Wir stellten fest, dass die präoperative medikamentöse Therapie, trotz des z.T. klinisch fassbaren Erfolges, wie Tumorschrumpfung und/oder Senkung der Hormon-Serumlevels, keine unterschiedlichen Apoptoseindizes im Vergleich zur unbehandelten Patientengruppe hervorrief. Wir beurteilten dabei den Einfluß von Tages- Gesamtdosis und Therapiedauer: für das mit Somatostatinanaloga behandelte Patientenkollektiv konnten wir keine signifikanten Veränderungen von ALI feststellen. In der mit Dopaminagonisten behandelten Patientengruppe zeigte sich eine positive Korrelation mit der Therapiedauer aber nicht mit der Tages- oder Gesamtdosis. Allerdings umfasste diese Gruppe nur drei Patienten. Im Gegensatz dazu beschrieben Yin et al. (1999), dass Bromcriptin die Apoptose Dosis- und Therapiedauer-abhängig induziert, Kontogeorgos et al. (2000) stellten diese Wirkung schon nach einer Kurzzeittherapie von 2-3 Wochen fest.

Bezüglich der Therapie mit Somatostatinanaloga, wie Octreotid, entspricht unser Ergebnis der Studie von Losa et al. (2001), in welcher operativ gewonnenes Adenomgewebe von 39 mit SSA behandelten und 39 unbehandelten Akromegalie-Patienten untersucht wurde- therapiebedingt zeigte sich eine Senkung der Proliferationsrate, gemessen an der MiB1-Zellfraktion, die Häufigkeit der Apoptose war in beiden Gruppen gleich. Kulig et al. (1999) und Cerman et al. (2003) konnten ebenfalls keine Steigerung der Apoptose nach medikamentöser Therapie der Adenome mit SSA und DA feststellen; wie Losa et al. (2001) fanden auch sie eine niedrigere Proliferationsaktivität.
Ähnliche Resultate erzielten Saitoh et al. (1997): die präoperativ mit SSA behandelten STH-Adenome wiesen keine signifikanten ALI Werte im Vergleich zu unbehandelten Tumoren; sie entdeckten jedoch, dass die Bromcriptin-Behandlung eine Erhöhung von ALI zu Folge hatte.

Es gibt Untersuchungen, welche andere Ergebnisse erzielten: die Studie von Wasko et al. (2003) belegte eine Steigerung der Apoptose nach Behandlung mit Somatostatinanaloga. Gruszka et al. (2001) beschrieben im Tiermodell eine deutliche Erhöhung von ALI in Folge einer SSA und DA Therapie, dieser Effekt korrelierte mit Tumorschrumpfung, Senkung der Hormon-Serumspiegel und niedrigerer proliferativer Aktivität; dabei zeigte sich eine Induktion von bax, eines Apoptose-Promoters der bcl-2-Familie (Gruszka et al., 2004).

Somatostatinanaloga führen bei Behandlung von Akromegalie-Patienten in etwa 50% der Fälle zu klinisch fassbaren Therapieeffekten, wie Senkung der Hormon-Serumspiegel und/oder Tumorschrumpfung, welche auch morphologische Korrelate am Tumorgewebe aufweisen. Sie entfalten ihre Wirkung durch Rezeptorbindung, dabei haben sie eine hohe Affinität zu den Rezeptortypen 2,5 und 3 (Corbetta et al., 2001). Nach der Rezeptoraktivierung kommt es zur Verminderung der Aktivität von Adenyl Cyclase, Senkung von cAMP, Induktion der Calcium-Mobilisierung, Aktivierung von Tyrosinkinase und MAP-Kinase und dadurch zur Senkung der Proliferationsrate. Die proapoptotische Wirkung wurde in früheren Arbeiten (Sharma et al., 1996) dem Rezeptortyp 3 zugeschrieben, dabei wurde Induktion von p53 und bax beobachtet. Ferrante et al. (2006) stellten eine Induktion der Apoptose auch über den SSTR2 fest, es fand sich eine dosisabhängige Caspase-3-Aktivierung, Erhöhung der CK18-Spaltprodukte; diese Wirkung war nicht von p53, p63, p73, bcl-2, bax, bid, FADD sondern von Phosphatasenaktivität abhängig. Die Apoptoserate korrelierte mit Therapie-bedingter Tumorschrumpfung, was wir aber nicht belegen konnten.

Mehrere Arbeiten (Corbetta, 2001; Gruszka, 2006; Thodou, 2006; Hofland, 2004; Bronstein, 2006) beschreiben, dass die Unterschiede im Ansprechen auf die SSA-Therapie von Rezeptorsubtypen-Expression im Tumorgewebe, Rezeptordichte abhängig sind. Dem widerspricht die klinische Untersuchung von Oshino et al. (2006) bei der 32 Akromegalie-Patienten 2-3 Wochen präoperativ mit SSA behandelt waren; die Therapieeffekte auf das Tumorvolumen korrelierten nicht mit endokrinen Effekten und auch nicht mit der szintigraphisch bestimmten Rezeptordichte. (Casarini et al., 2006; Oshino et al., 2006)
Einzelne Studien (Corbetta et al., 2001) berichten über Mutationen der Somatostatinrezeptoren, die mit Verlust ihrer Funktion einhergehen.
Hinzu kommt die Entdeckung, dass STH-Adenome, die den Dopaminrezeptor DR2 besitzen, ein deutlich geringeres Ansprechen auf eine SSA-Therapie aufweisen; es kommt zu einer DR2-SSTR5-Dimerbildung (Zatelli et al., 2005), was möglicherweise Therapieerfolge bei der DA-Therapie in etwa 30% der STH-Adenome erklärt. Oshino et al. (2006) beschreiben auch Somatostatin-Dopamin-Chimärenliganden.
Des weiteren können Somatostatinrezeptoren untereinander Homo- und Heterodimere bilden, was zu funktionalen Unterschieden führt. Ren et al. (2003) und Danila et al. (2001) beschrieben eine synergistische Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren. Nicht nur der Rezeptortyp, sondern auch Anwesenheit von intrazellulären Effektor-Molekülen, wie Phosphotyrosin Phosphatase, können beim Therapieansprechen eine Rolle spielen (Florio et al., 1999). Die nicht hormonsezernierenden Adenome besitzen häufig den Somatostatinrezeptor Typ 2, eine Therapie mit SSA ist jedoch wirkungslos.
Ferner weisen Hypophysenadenome mit einer gsp-Mutation, die in 40% der GH-Adenome vorkommt, eine höhere Sensitivität auf SSA-Therapie auf (Corbetta et al., 2001; Lopes 2007).

Die neueren Arbeiten über Hypophysenadenome befassen sich nicht nur mit Proliferation oder Apoptose allein, sondern auch mit Veränderungen auf der Protein/Enzym- oder genomischer Ebene.
Bahar et al. (2004) et al. entdeckten den auf Chromosom 22 lokalisierten PTAG (Pituitary Tumor Apoptosis Gene): in 79% der Hypophysenadenome und in 73% der GH-Adenome kommt es zu einer Gendeaktivierung auf Grund von Hypermethylierung der CpG-Inseln, was zur Erniedrigung vom Apoptoseindex und Tumorzellüberleben- sowie Proliferation führt. In diesen Fällen wirkt Bromcriptin dosisabhängig über Caspasenaktivierung als Apoptosemediator; Apoptose ist auch in Tumorzellen ohne dieses Gen in sehr geringer Frequenz feststellbar (Farell et al., 2006).

Die Studie von Bello et al. (2006) an 35 Adenomen entdeckte, dass Hypermethylierung von CpG-Inseln und nicht Mutationen zur Gendeaktivierung führt; dabei kommt es auf diesem Wege häufig zur Deaktivierung der DAP-Kinase und Caspase-8 (Apoptosemediators- und effektors) und dadurch zur Verhinderung des programmierten Zelltodes.
DAP-Kinase (Death Ass. Protein Kinase) reguliert den G1/S-Kontrollpunkt des Zellzyklus, ist ein positiver Mediator der Apoptose über Induktion von Interferonγ; Verlust der Expression durch Hypermethylierung oder Deletion der CpG-Inseln (Simpson et al., 2002) ist häufig bei Hypophysenadenomen, besonders invasiven, nachweisbar.

PTTG (Pituitary Tumor Transforming Gen), ein auf Chromosom 5 lokalisiertes Onkogen, wird im Tumor- aber nicht im Normalgewebe nachgewiesen. Es spielt die Rolle von Securin, eines Anaphase-Inhibitors, welches Chromosomenseparation verhindert und dadurch zur Aneuploidie führt; etwa 50% der Adenome sind aneuploid. Des weiteren aktiviert es Wachstumshormone, wie FGF2, VEGF und den FGFR1. PTTG induziert Apoptose auf p53 abhängigem und unabhängigem Wege; auf Grund der bereits beschriebenen Wirkmechanismen überwiegt jedoch die Zell- und Gefäßproliferation (Tfelt-Hansen et al., 2006).

Hypophysenadenome zeigen Expressionen unterschiedlicher Proteine, die den programmierten Zelltod beeinflussen, wobei nicht sicher ist, ob es sich um Ursache der Tumorentstehung oder um Epiphänomene handelt (Melmed 2003).
Gutartige Hirntumoren, auch Hypophysenadenome, weisen eine Produktion von Survivin auf. Survivin kommt im fötalen, embryonalen aber nicht im Normalgewebe vor. Es wirkt als Apoptoseinhibitor ohne dabei die Expression von p21 oder p53 zu stören. Überexpression von Survivin ist häufig mit Versagen von medikamentöser Therapie vergesellschaftet (Hassounah et al., 2004; Wasko et al., 2005).
Eine inhibitorische Wirkung auf Apoptose üben auch Seladin und BAG1-Protein aus. Seladin kommt im Normalgewebe der Hypophyse, Nebennierenrinde, des Ovars und Hodens vor, ist häufig in Tumoren anzutreffen und blockiert Caspase-3. Therapie mit SSA ruft über eine p53-Induktion eine Steigerung des ALI, jedoch nur bei GH-sezernierenden und nicht bei NFPA, trotz ähnlicher Ausstattung der Adenome mit SSTR 2 und 5. Sogenannte Therapieversager haben nicht selten eine starke Seladin-Positivität (Luciani et al., 2005).
BAG1-Protein kommt gehäuft in Adenomen vor, es reguliert die Zellproliferation, Stressantwort und blockiert die Apoptose über bcl-2 Überexpression (Morris et al., 2005).

Einen Einfluß auf den programmierten Zelltod übt auch Zac1-Protein aus, welches normalerweise im Hypophysen-, Ovar- und Mammagewebe vorkommt; es induziert die Apoptose und Zellzyklusstopp. Hypophysenadenome weisen eine stark reduzierte Expression des Proteins auf. Octreotid induziert die Sezernierung dieses Proteins, allerdings führt das Ausschalten des ZAC-Tumorsuppressorgens zur Resistenz gegenüber der SSA-Therapie (Theodoropoulou et al., 2006; Pagotto et al., 2000).
Hypophysenadenome zeichnen sich durch eine höhere Expression von Proteinkinase C aus; eine Inhibition von PKC, z.B. durch Hypericin, führt dosisabhängig zur Apoptose (Kulig et al., 1999).
Andererseits induziert Caveolin-1 den programmierten Zelltod auf Grund der Blockade von Signaltransduktion in der Zelle. Dopaminagonisten erhöhen Caveolin-1 Spiegel und führen durch Caspase-8 Aktivierung zum Zelltod (Jiang et al., 2007).

Dysregulation des Zellzyklus, welche in Hypophysenadenomen beschrieben wurde (Musat et al., 2004), kann ebenfalls eine Störung der Apoptose hervorrufen, z.B. eine zytoplasmatische Akkumulation von p21, eines G1/S-Phasen Kontrollproteins, verursacht eine Inhibition der Apoptose und indirekt Resistenz gegen medikamentöse Therapie (Hiyama et al., 2002). Ein weiteres Protein des G1/S-Kontrollpunktes, p27, kann Apoptose induzieren; SSA erhöhen die p27-Expression (Hubina et al., 2006). Manche Tumorzellen sind in der Lage, das zytoplasmatische p27 zu spalten und auf diesem Wege den Zelltod zu verhindern (Musat et al., 2004). Dieser Mechanismus wurde in Hypophysenadenomen noch nicht erforscht.

Die vorliegende Arbeit ergab eine negative Korrelation der Apoptose und des präoperativen IGF-1 Serumspiegels, aber nicht des Wachstumshormon- oder Prolaktin-Spiegels. Laut der Studien von Colao et al. (2006) stellt der IGF-1-Level nach Behandlung den besten prädiktiven Wert einer Tumorschrumpfung nach Langzeittherapie mit Somatostatinanaloga dar. Lucas et al. (2003) stellten fest, dass hohe IGF-1 Werte bei Diagnosestellung, zusammen mit einer Sinus cavernosus-Infiltration, am besten mit Tumorpersistenz korrelierten. Obwohl IGF-1 die Wirkung eines Wachstumshormons ausüben kann, konnte in vitro weder IGF-1 noch STH eine Stimulation von Zellproliferation hervorrufen (Clausen et al., 2004). Allerdings zeigen hohe IGF-1 Serumspiegel eine Assoziation mit Entwicklung von malignen Tumoren, wie Brust-, Prostata-, Bronchial- und colorektalen Carcinomen (Pavelic et al., 2007). Akromegalie Patienten haben ein erhöhtes Risiko an einem Colonadenom- oder Carcinom zu erkranken (Asa et al., 1998; Lehnert et al., 2003). 83% der GH-Adenome

exprimieren IGF-1 und IGF-1-Rezeptor (Beuschlein et al., 2005). Die Signalwege des IGF-1-Rezeptors umfassen u.a. die Aktivierung der MAP-Kinase, Akt und PI3-Kinase, welche einen Einfluß auf Proliferation, Zelldifferenzierung, Angiogenese (positiv) und Apoptose (negativ) haben (Dupont et al.,2003). IGF-1 verhindert die Apoptose in Neuroblastomzellen durch fehlende Depolarisierung des Potentials der Mitochondrien Membran (Leinninger et al., 2004); zum anderen wirkt es auch auf dem Todesrezeptorweg der Apoptose: auf Grund der Akt-Aktivierung inhibiert es die Bindung von Fas und FADD (Rohn et al.,1998).

Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass die Untersuchung der Apoptose allein, auch in Korrelation zu mehreren klinischen und morphologischen Parametern, keine Aussage über die Prognose oder das Ansprechen auf die medikamentöse Therapie erlaubt.
Zum einen liegt es an zahlreichen Mechanismen der Tumorzellen, die den programmierten Zelltod, auch während der Behandlung, verhindern; ein Phänomen, welches auch in vielen anderen Neoplasien vorkommt (Spurgers et al., 2006). Zum anderen hängt die Wirkung der Chemotherapeutika von der Proliferationsgeschwindigkeit der Tumoren ab. Zellen in der G0-Phase sind relativ resistent gegenüber apoptotischen Stimuli (Zinkel et al., 2006). Da Somatostatinanaloga die Proliferationsrate senken, verringern sie die Zahl der sich teilenden Zellen.

6. Zusammenfassung

Hypophysenadenome kommen häufig vor, sie werden in 10-25% unselektierter Sektionsfälle entdeckt und machen etwa 10-15% aller intracranialen Neoplasien aus. Sie wachsen in der Regel langsam, haben eine niedrige Proliferationsaktivität (Ki67-Index unter 3%), selten werden sie groß. Allerdings zeigen sie in 50% der Fälle ein invasives Wuchsmuster und Neigung zu Rezidiven, insbesondere bei großen, invasiven und unvollständig resezierten Tumoren. Die wichtigsten prognostischen Faktoren sind die Radikalität des chirurgischen Eingriffs und das Ansprechen auf die medikamentöse Therapie.

Das biologische Verhalten dieser Tumoren und die Tatsache, dass nur ein Teil der Akromegalie- Patienten ein Ansprechen auf die Therapie aufweist (50% bei Somatostatinanaloga- und 30% bei Dopaminagonisten-Behandlung), führte zu Untersuchungen der Apoptose, als einen möglichen Faktor bei der Tumorgenese, Prognose oder Wirkmechanismus der nicht-operativen Therapie.

Unsere Studie untersuchte mittels Darstellung der intranukleosomalen DNA (TUNEL-Assay), die Apoptose in STH-sezernierenden Hypophysenadenomen. Es handelte sich um transsphenoidal gewonnenes Adenomgewebe von 56 Akromegalie Patienten, welche in den Jahren 1994 und 1995 in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Hamburg operiert wurden. In der TUNEL-Reaktion wurden die DNA-Fragmente der z.T. histologisch erkennbaren apoptotischen Zellen mit einem roten Farbstoff (Fast Red) markiert und konnten dadurch als eine intranukläere Rotfärbung visualisiert und lichtmikroskopisch dargestellt werden. Wir stellten fest, dass die Apoptose in STH-sezernierenden Adenomen in nur 36,4% der Fälle vorkam.

Wir untersuchten den programmierten Zelltod im Zusammenhang mit zahlreichen klinischen und morphologischen Parametern, die wir aus den Krankenakten sowie aus der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung des Adenomgewebes gewannen.

Wir entdeckten erstmalig einen inversen Zusammenhang zwischen hohen präoperativen IGF-1 Serumspiegel und dem Apoptoseindex.

Allerdings konnten wir keine signifikante Korrelation des Apoptoseindex oder der Färbeintensität der TUNEL-Reaktion zum Adenomtyp, Tumorgröße, Invasionsverhalten, Geschlecht, Alter der Patienten oder Radikalität der Operation feststellen. Ebenfalls fand sich in unserem Kollektiv kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den mit Somatostatinanaloga behandelten (42 Patienten) und unbehandelten STH-Adenomen

(4 Patienten), obwohl Einzelfälle (8 Fälle; 13,75%) eine deutliche Steigerung des ALI, auf 10 und mehr Prozent, aufwiesen.

Unsere Arbeit belegte eine Korrelation des Apoptoseindex (ALI 20%), und der Dauer der Behandlung mit Dopaminagonisten (12, 33 und 46 Monate), jedoch nicht mit der Bromcriptin-Kumulativdosis.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass die Untersuchung von Apoptose als einen unabhängigen Faktor in STH-sezernierenden Hypophysenadenomen keinen prädiktiven Wert auf das Therapieansprechen oder Tumorprogression darstellt.

In klinischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen hohen IGF-1 Serumspiegel und Tumorpersistenz beschrieben: nach unseren Ergebnissen kann dieser Korrelation u.a. eine Hemmung der Apoptose zu Grunde liegen.

In unserem Kollektiv zeigten 20% der medikamentös vorbehandelten Adenome auf 10 und mehr Prozent erhöhte Adenomindizes, die gesamt nicht statistisch signifikant waren. Weitere Untersuchung dieser Tumoren, besonders im Hinblick auf Gen- oder Proteinveränderungen, könnte mehr Informationen über die Ursachen bieten.

Vielversprechend erscheinen die neuen Arbeiten über Hypophysenadenome, die DNA oder microRNAs mittels Microarrays untersuchen.

7. Literatur

Asa, SL. (1998). "Tumours ot the Pituitary Gland.", Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), Third Series, Washington DC: 47-151

Bahar, A., D. J. Simpson, et al. (2004). "Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene." Mol Endocrinol **18**(7): 1827-39.

Bello, M. J., J. M. De Campos, et al. (2006). "Promoter CpG methylation of multiple genes in pituitary adenomas: frequent involvement of caspase-8." Oncol Rep **15**(2): 443-8.

Beuschlein, F., Hancke, K., Petrick, M. et al. (2004). "Growth Hormone Receptor mRNA Expression in Non-Functioning and Somatotroph Pituitary Adenomas: Implications for Growth Hormone Substitution Therapy?". Exp Clin Endocrinol Diabetes **113**:214-218

Bortz J (1999a): Verfahren zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen. In: Bortz J: Statistik für Sozialwissenschaftler, 5. Auflage, Springer, Berlin, 146-149

Bortz J (1999b): Verfahren zur Überprüfung von Zusammenhangshypothesen. In: Bortz J: Statistik für Sozialwissenschaftler, 5. Auflage, Springer, Berlin, 194-211

Bortz J, Lienert GA (1998): Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Ein praktischer Leitfaden für die Analyse von kleinen Stichproben. Springer, Heidelberg

Bronstein, M. D. (2006). "Acromegaly: molecular expression of somatostatin receptor subtypes and treatment outcome." Front Horm Res **35**: 129-34.

Candolfi, M., G. Jaita, et al. (2006). "Adenoviral vectors encoding tumor necrosis factor-alpha and FasL induce apoptosis of normal and tumoral anterior pituitary cells." J Endocrinol **189**(3): 681-90.

Cap, J., J. Cerman, et al. (2003). "The influence of treatment with somatostatin analogues on morphology, proliferative and apoptotic activity in GH-secreting pituitary adenomas." J Clin Neurosci **10**(4): 444-8.

Casarini, A. P., E. M. Pinto, et al. (2006). "Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: preferential expression of somatostatin receptor subtype 3." J Endocrinol Invest **29**(9): 826-30.

Cerman, J., J. Cap, et al. (2003). "The role of apoptosis in pituitary adenomas in the field of conventionally used therapeutic approaches." Ann N Y Acad Sci **1010**: 520-4.

Clausen, L. R., M. T. Kristiansen, et al. (2004). "Growth hormone receptor expression and function in pituitary adenomas." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(5): 576-83.

Colao, A., R. Attanasio, et al. (2006). "Partial surgical removal of growth hormone-secreting pituitary tumors enhances the response to somatostatin analogs in acromegaly." J Clin Endocrinol Metab **91**(1): 85-92.

Colao, A., R. Pivonello, et al. (2006). "Predictors of tumor shrinkage after primary therapy with somatostatin analogs in acromegaly: a prospective study in 99 patients." J Clin Endocrinol Metab **91**(6): 2112-8.

Corbetta, S., E. Ballare, et al. (2001). "Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression." Eur J Clin Invest **31**(3): 208-14.

Crocker, J, Murray, PG (2003): Apoptosis and Cell Senesance. In Crocker, J, Murray, PG: Molecular Biology in Cellular Pathology 2nd edn, Wiley, 153-193

Danila, D. C., J. N. Haidar, et al. (2001). "Somatostatin receptor-specific analogs: effects on cell proliferation and growth hormone secretion in human somatotroph tumors." J Clin Endocrinol Metab **86**(7): 2976-81.

DeLellis, RA, Lloyd, RV, Heitz, PU, Eng, C (WHO 2004): Pathology and Genetics Tumors Of Endocrine Organs, IARC Press, Lyon, 9-40

Dupont,J., Dunn, SE., Barrett, JC. (2003). "Microarray Analysis and Identification of Novel Molecules Involved in Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Signaling and Gene Expression". Endocrine Society: 325-338

Farrell, WE. (2006). "A novel apoptosis gene identified in the pituitary gland". Neuroendocrinology **84**(4): 217-221.

Ferrante, E., C. Pellegrini, et al. (2006). "Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2." Endocr Relat Cancer **13**(3): 955-62.

Florio, T., S. Thellung, et al. (1999). "Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro." Eur J Endocrinol **141**(4): 396-408.

Green, VL., White, MC., Hipkin, LJ. et al. (1997). "Apoptosis and p53 suppressor gene protein expression in human anterior pituitary adenomas." European Journal of Endocrinology 136(4): 382-387

Grossman, A. B. (2006). "The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: is it clinically helpful?" Acta Neuropathol (Berl) **111**(1): 76-7.

Gruszka, A., J. Kunert-Radek, et al. (2004). "The effect of octreotide and bromocriptine on expression of a pro-apoptotic Bax protein in rat prolactinoma." Folia Histochem Cytobiol **42**(1): 35-9.

Gruszka, A., J. Kunert-Radek, et al. (2006). "The effect of selective sst1, sst2, sst5 somatostatin receptors agonists, a somatostatin/dopamine (SST/DA) chimera and bromocriptine on the "clinically non-functioning" pituitary adenomas in vitro." Life Sci **78**(7): 689-93.

Gruszka, A., M. Pawlikowski, et al. (2001). "Anti-tumoral action of octreotide and bromocriptine on the experimental rat prolactinoma: anti-proliferative and pro-apoptotic effects." Neuro Endocrinol Lett **22**(5): 343-8.

Hassounah, M., Lach, B., Allam, A., et al. (2005). "Benign tumors from the human nervous system express high levels of survivin and are resistant to spontaneous and radiation-induced apoptosis" J Neuro-Oncol; **72**(3):203-205

Hiyama, H., O. Kubo, et al. (2002). "Expression of cyclin kinase inhibitor p21/WAF1 protein in pituitary adenomas: correlations with endocrine activity, but not cell proliferation." Acta Neurochir (Wien) **144**(5): 481-8.

Hofland, L. J. and S. W. Lamberts (2004). "Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy." Front Horm Res **32**: 235-52.

Hubina, E., A. M. Nanzer, et al. (2006). "Somatostatin analogues stimulate p27 expression and inhibit the MAP kinase pathway in pituitary tumours." Eur J Endocrinol **155**(2): 371-9.

Jiang, YN., Li YH., et al. (2007). "Caveolin-1 sensitizes rat pituitary adenoma GH3 cells to bromcriptine induced apoptosis". Cancer cell int; 7(0):1

Kapranos, N., G. Kontogeorgos, et al. (2004). "Morphology, molecular regulation and significance of apoptosis in pituitary adenomas." Front Horm Res **32**: 217-34.

Kontogeorgos, N., Sambaziotis D., Piaditis, G. et al. (1997). "Apoptosis in Human Pituitary Adenomas: A Morphologic and In Situ End-Labeling Study". Modern Pathology **10**(9): 921-926.

Kontogeorgos, G. (2005). "Classification and pathology of pituitary tumors." Endocrine **28**(1): 27-35.

Kontogeorgos, G. (2006). "Predictive markers of pituitary adenoma behavior." Neuroendocrinology **83**(3-4): 179-88.

Kontogeorgos, G. and K. Kovacs (2000). "Surgical and Non-Surgical Treatment of Pituitary Adenomas." Surg Technol Int **VIII**: 297-304.

Kulig, E., L. Jin, et al. (1999). "Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries: expression of the Bcl-2 family of proteins." Am J Pathol **154**(3): 767-74.

Lehnert, H. Red. (2003). Dt. Gesellschaft für Endokrinologie (Hrsg.): Rationelle Diagnostik und Therapie in der Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel; 2 Aufl., Thieme, 11-14

Leinninger, GM., Russell JW., Berent, A. et al (2004). "Insulin-like growth factor-1 regulates glucose-induced mitochondrial depolarization and apoptosis in human neuroblastoma." Cell Death and Differentiation **11**: 885-896.

Losa, M., E. Ciccarelli, et al. (2001). "Effects of octreotide treatment on the proliferation and apoptotic index of GH-secreting pituitary adenomas." J Clin Endocrinol Metab **86**(11): 5194-200.

Lucas, T., R. Astorga, et al. (2003). "Preoperative lanreotide treatment for GH-secreting pituitary adenomas: effect on tumour volume and predictive factors of significant tumour shrinkage." Clin Endocrinol (Oxf) **58**(4): 471-81.

Luciani, P., S. Gelmini, et al. (2005). "Expression of the antiapoptotic gene seladin-1 and octreotide-induced apoptosis in growth hormone-secreting and nonfunctioning pituitary adenomas." J Clin Endocrinol Metab **90**(11): 6156-61.

Melmed, S. (2003). "Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary." J Clin Invest **112**(11): 1603-18.

Morris, D. G., M. Musat, et al. (2005). "Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis." Eur J Endocrinol **153**(1): 143-51.

Musat, M., V. V. Vax, et al. (2004). "Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis." Front Horm Res **32**: 34-62.

Nikiforos, K. and G. Kontogeorgos (2000). "Bcl-2 Gene Family in Endocrine Pathology: A Review." Endocr Pathol **11**(3): 205-213.

Oshino, S., Y. Saitoh, et al. (2006). "Short-term preoperative octreotide treatment of GH-secreting pituitary adenoma: predictors of tumor shrinkage." Endocr J **53**(1): 125-32.

Ozer, E., M. S. Canda, et al. (2003). "Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study." Tumori **89**(1): 54-9.

Pagotto, U., T. Arzberger, et al. (2000). "The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas." Cancer Res **60**(24): 6794-9.

Pavelic, J., Matijevic, T., Knezevic, J. (2007). "Biological and physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family." Indian J Med Res **125**: 511-522

Pollard, TD, Earnshaw, WC (2004): Cell Biology, Saunders, Elsevier Science (USA)

Ramm B, Hofmann G (1982): Spezielle medizinische Testverfahren. In: Ramm B, Hofmann G (1982): Biomathematik. Enke, Stuttgart, 157-196

Ren, S. G., J. Taylor, et al. (2003). "Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4239-45.

Rohn, JL., Hueber AO., McCarthy, N. et al. (1998). "The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis." Oncogene **17**: 2811-2818

Saeger, W. (2005). "Pituitary tumors: prognostic indicators." Endocrine **28**(1): 57-66.

Saeger, W. (2006). "Comment to the 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors." Acta Neuropathol (Berl) **111**(1): 64-5.

Saeger, W., D. K. Ludecke, et al. (2007). "Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry." Eur J Endocrinol **156**(2): 203-16.

Saitoh, Y., N. Arita, et al. (1997). "Absence of apoptosis in somatotropinomas treated with octreotide." Acta Neurochir (Wien) **139**(9): 851-6.

Sharma, K., Patel, YC., Srikant, C. (1996). "Subtype specific induction of wild type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3". Mol. Endocrinology **10**: 1688-1696.

Simpson, D. J., R. N. Clayton, et al. (2002). "Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion." Oncogene **21**(8): 1217-24.

Soini, Y., P. Paakko, et al. (1998). "Histopathological evaluation of apoptosis in cancer." Am J Pathol **153**(4): 1041-53.

Spurgers, K. B., N. S. Chari, et al. (2006). "Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy." Cell Death Differ **13**(8): 1360-70.

Stalla, GK.(Hrsg., 2007). "Therapielexikon Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten" Springer: 34-38, 1035-1036.

Tannock, IF, Hill, RP, Bristow, RG (2005): Cell Death. In: Tannock, IF, Hill, RP, Bristow, RG The Basic Science of Oncology, 4th edn, McGraw-Hill, p.194-205

Tfelt-Hansen, J., D. Kanuparthi, et al. (2006). "The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis." Clin Med Res **4**(2): 130-7.

Theodoropoulou, M., J. Zhang, et al. (2006). "Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression." Cancer Res **66**(3): 1576-82.

Thodou, E., G. Kontogeorgos, et al. (2006). "Mapping of somatostatin receptor types in GH or/and PRL producing pituitary adenomas." J Clin Pathol **59**(3): 274-9.

Turner, H. E., Z. Nagy, et al. (2000). "Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour." Br J Cancer **82**(8): 1441-5.

Vidal, S., E. Horvath, et al. (2001). "Ultrastructural features of apoptosis in human pituitary adenomas." Ultrastruct Pathol **25**(2): 85-92.

Wasko, R., A. Jankowska, et al. (2003). "Effects of treatment with somatostatin analogues on the occurrence of apoptosis in somatotropinomas." Neuro Endocrinol Lett **24**(5): 334-8.

Wasko, R., A. Jankowska, et al. (2005). "Survivin expression in pituitary adenomas." Neuro Endocrinol Lett **26**(3): 209-12.

Yin, D., N. Tamaki, et al. (1999). "Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationship to p53 and bcl-2 expression." J Clin Neurosci **6**(4): 326-331.

Zatelli, M. C., D. Piccin, et al. (2005). "Dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtype 5 expression influences somatostatin analogs effects on human somatotroph pituitary adenomas in vitro." J Mol Endocrinol **35**(2): 333-41.

Zinkel, S., A. Gross, et al. (2006). "BCL2 family in DNA damage and cell cycle control." Cell Death Differ **13**(8): 1351-9.

Herrn Prof. Dr. med. W. Saeger gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu dieser Arbeit, seine hervorragende Unterstützung und das Erwecken meines Interesses an Endokriner Pathologie. Danke auch für die Möglichkeit die Ergebnisse dieser Arbeit während des 10 Internationalen Hypophysenpathologie-Treffens in Italien selbst vorzutragen.

Dr. Lüdecke und Dr. Abe aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität Hamburg danke ich für die mir zur Verfügung gestellten klinischen Daten und Frau Iffländer für die Hilfe bei der Aktensuche im Archiv.

Herrn Dr. Kurosaki danke ich sehr für seine Hilfe bei der Methodik.

Dr. Laudahn danke ich für die statistische Auswertung der von mir erhobenen Daten.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Pathologie des Marienkrankenhauses in Hamburg für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name:	Magdalena Krause, geb. Grzela, primo voto Pawilczus
Geburtstag und –ort:	14 Juli 1964 in Gdingen/Polen
1971-1979:	Volksschule in Gdingen/Polen
1979-1983:	Allgemeinbildendes Lyzeum Nr. 3 in Gdingen/Polen
Juni 1983:	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
1983-1987:	Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule in Danzig/Polen
1988-1990:	Erziehungsurlaub
04.1990-10.1991:	Berufliche Tätigkeit als Arzthelferin
10.1991-04.1995:	Medizinstudium an der Universität Hamburg
28.04.1995:	III Staatsexamen
05.1995-10.1996:	Ärztin im Praktikum bei Prof. Dr. med. M. Vierbuchen in der Abteilung für Pathologie, AK St. Georg, Hamburg
November 1996:	Approbation
11.1996-12.2006:	Assistenzärztin bei Prof. Dr. med. M. Vierbuchen, Abteilung für Pathologie, AK St. Georg, Hamburg
08.02.2006:	Facharztprüfung Pathologie vor der Ärztekammer Hamburg
seit 01.2007:	Oberärztin bei Prof. Dr. med. M. Vierbuchen, Abt. für Pathologie, AK St. Georg, Hamburg

Hamburg, 20.10.2007

Eidesstattliche Versicherung:

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