

Immunhistochemischer Nachweis von Lymphgefäßinvasion
mittels D2-40 bei Patientinnen mit primärem
Mammakarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Manuel Willi Debald

Wittlich

2010

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Walther Kuhn**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eva Wardelmann**

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.05.2010

**Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. Kuhn

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1 Einleitung | 8 |
| 1.1 Das Mammakarzinom | 8 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Bedeutung | 8 |
| 1.1.2 Risikofaktoren und genetische Prädisposition | 9 |
| 1.1.3 Histopathologische Klassifikation, Stadieneinteilung und Grading | 12 |
| 1.1.4 Prädiktion und Prognose | 14 |
| 1.1.4.1 Klassische Prognosefaktoren | 14 |
| 1.1.4.2 Moderne Prognosefaktoren | 18 |
| 1.2 Rolle des Lymphsystems bei der Tumormetastasierung | 19 |
| 1.2.1 Entwicklung des Lymphgefäßsystems | 19 |
| 1.2.2 Struktur und Funktion des Lymphgefäßsystems | 20 |
| 1.2.3 Entwicklung spezifischer Lymphgefäßmarker | 20 |
| 1.2.4 Tumorinduzierte Lymphangiogenese beim Mammakarzinom | 22 |
| 1.2.5 Rolle der Lymphgefäße bei der Metastasierung des Mammakarzinoms | 24 |
| 1.3 Zielsetzung | 26 |
| 2 Patienten, Material und Methoden | 27 |
| 2.1 Patienten | 27 |
| 2.2 Material und Methoden | 28 |
| 2.2.1 Material, Fixation und histologische Standardfärbung | 28 |
| 2.2.2 Immunhistochemie | 28 |
| 2.2.2.1 Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode | 28 |
| 2.2.2.2 Primäre Antikörper | 30 |
| 2.2.2.3 Ermittlung des Hormonrezeptorstatus von Östrogen und Progesteron | 31 |
| 2.2.2.4 Bestimmung der Überexpression des HER2/neu-Onkoproteins | 31 |
| 2.3 Histologische Beurteilung und Arbeitsgänge | 32 |
| 2.4 Statistik | 33 |
| 3 Ergebnisse | 34 |
| 3.1 Analyse des Patientenkollektivs | 34 |
| 3.1.1 Alter der Patientinnen | 34 |
| 3.1.2 Menopausenstatus | 34 |
| 3.1.3 Histopathologische Charakteristika | 35 |
| 3.1.4 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status | 36 |
| 3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung | 37 |
| 3.3 Auswertung der routinediagnostischen HE-Färbung | 39 |
| 3.4 Korrelation von D2-40 positiver LVI und klinisch-pathologischen Faktoren | 40 |
| 3.4.1 Alter und Menopausenstatus | 40 |
| 3.4.2 Tumorbezogene Faktoren | 40 |
| 3.4.3 Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem Nodalstatus | 41 |
| 3.4.4 Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem Hormonrezeptor- sowie dem HER2/neu-Status | 42 |

| | | |
|------------|--|---------|
| 3.5 | Multivariate Analyse zur Prädiktion des axillären Nodalstatus | -----43 |
| 3.5.1 | Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren- | -----43 |
| 3.5.2 | Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren bei Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1)----- | 45 |
| 3.5.3 | Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren bei Tumoren $\leq 5\text{cm}$ (pT1/2)----- | 45 |
| 3.5.4 | Prädiktion des Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre) ----- | 46 |
| 3.5.5 | Korrelation von Nodalstatus und D2-40 LVI bei älteren Patientinnen mit Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1) ----- | 46 |
| 3.5.6 | Korrelation von Nodalstatus und D2-40 LVI bei jungen Patientinnen -- | 47 |
| 3.6 | Indikation zur Postmastektomie-Bestrahlung | -----47 |
| 4 | Diskussion | -----48 |
| 5 | Zusammenfassung | -----56 |
| 6 | Anhang | -----57 |
| 6.1 | Abbildungsverzeichnis | -----57 |
| 6.2 | Tabellenverzeichnis | -----58 |
| 7 | Literatur | -----59 |
| 8 | Danksagung | -----70 |
| 9 | Lebenslauf | -----71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ACS | American Cancer Society |
| ALND | Axilläre Lymphonodektomie |
| ALNM | Axilläre Lymphknotenmetastasen |
| BMI | Body Mass Index |
| BRCA 1/2 | Breast Cancer Gene 1/2 (Tumorsuppressorgene) |
| CLIS | Carcinoma lobulare in situ |
| DCIS | Duktales Carcinoma in situ |
| DEGRO | Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EBCTCG | Early Breast Cancer Trialists' and Collaborative Group |
| ER | Östrogenrezeptor |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| G | Grading |
| HCl | Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin-Eosin (Histologische Standardfärbung) |
| IHC | Immunhistochemie |
| IRS | Immunreaktiver Score |
| J | Jahre |
| JÜR | Jahres-Überlebensrate |
| Lfd-Nr. | Laufende Nummer |
| LVI | Lymphatic vessel invasion (Lymphangi invasion) |
| M | Metastasierung |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin (Proteinkinase) |
| N | Nodalstatus |
| n.s. | Nicht signifikant |
| NSABP | National Surgical Adjuvant Breast Project |
| PP | Prozentsatz positiver Kerne |
| PR | Progesteronrezeptor |
| R | Resektionsgrad |
| RKI | Robert Koch Institut |
| SI | Staining Intensity (Färbeintensität) |
| SLND | Sentinel-Lymphonodektomie |
| T | Tumorgroße |
| UICC | Union internationale contre le cancer |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor (Wachstumsfaktor) |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Bedeutung

Neben Erkrankungen des kardiovaskulären Systems zählen Malignome zu den Hauptursachen von Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen (Ries et al., 2008). Dabei stellt das Mammakarzinom die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar (Jemal et al., 2008).

Laut der American Cancer Society ACS erkrankten im Jahr 2007 weltweit ca. 1.3 Millionen Frauen an einem Mammakarzinom, wobei 465.000 Frauen daran verstarben. Für Europa geht man im Jahr 2006 von 429.900 Neuerkrankungen aus, denen 131.900 Sterbefälle gegenüberstanden (Ferlay et al., 2007).

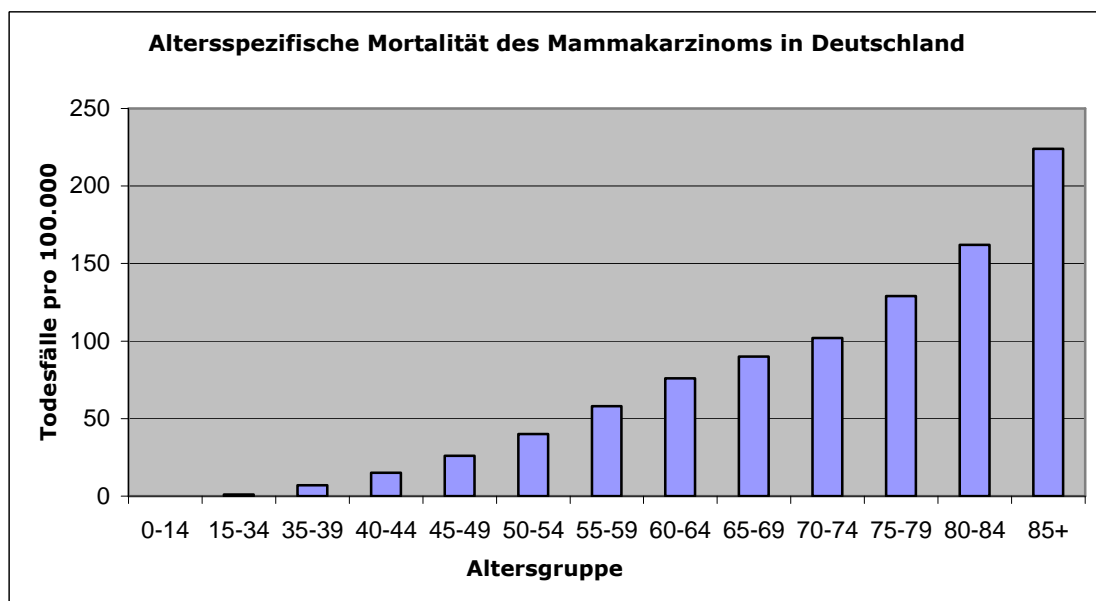


Abbildung 1: Schätzung der altersspezifischen Mortalität des Mammakarzinoms in Deutschland 2006 (RKI)

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken nach Angaben des Robert Koch Instituts (RKI) derzeit jährlich ca. 57.000 Frauen an Brustkrebs. Das mittlere Lebenszeitrisko beträgt 9.2%. Somit erkrankt durchschnittlich jede elfte Frau im Laufe ihres Lebens an dieser Tumorentität.

Nach wie vor ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 35. und 54. Lebensjahr. Dennoch zeichnet sich eine Entwicklung ab, wonach die Mortalität durch die Wahrnehmung von Früherkennungsuntersuchungen sowie verbesserte Therapieoptionen in den letzten Jahren konstant abnimmt (Smigal et al., 2006).

1.1.2 Risikofaktoren und genetische Prädisposition

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bisher nicht vollständig geklärt. Zahlreiche epidemiologische Studien haben jedoch gezeigt, dass es sich hierbei um ein multifaktorielles Geschehen handelt, welches kaskadenartig im Sinne einer Mehrschrittkarzinogenese abläuft (Calaf und Hei, 2000).

Dabei gelten die folgenden Risikofaktoren als gesichert:

| Endogene hormonelle Faktoren | Relative Risiko |
|-------------------------------------|------------------------|
| Frühe Menarche (<12 J.) | + |
| Späte Menopause (>55 J.) | + |
| Nullipara | + |
| Alter bei Erstgeburt (>35 J.) | ++ |
| Externe hormonelle Faktoren | |
| orale Kontrazeptiva | + |
| Hormonersatztherapie | ++ |
| Ernährung/Lebensstil | |
| postmenopausaler BMI > 27 | + |
| Alkohol | + |
| Sonstige Faktoren | |
| BRCA1/BRCA2-Mutation | ++++ |
| positive Familienanamnese | +++ |

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Harris et al., 2004)

Hormone

Endokrine Faktoren spielen eine fundamentale Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms. Vor allem den Steroidhormonen wird, neben der Funktion einer physiologischen Wachstumsstimulation in der Pubertät, ein deutlicher Einfluss bei der karzinogenen Entartung der Brust zugeschrieben (Clemons und Goss, 2001; Greenstein und Raue, 1996). So besteht eine positive Korrelation zwischen einer Mammakarzinomerkrankung und früher Menarche, später Menopause, hohem Alter bei der ersten Schwangerschaft und Kinderlosigkeit (Colditz und Rosner, 2000; Hsieh et al., 1990; Kelsey et al., 1993a; MacMahon et al., 1982). Dabei werden die zahlreichen menstruellen Zyklen infolge einer frühen Menarche, späten Menopause und die gehäuften Stimulationen des Brustepithels durch Östrogen und Progesteron als Risikofaktoren gewertet.

Kinderlose Frauen haben im Vergleich zu Frauen mit mindestens einem Kind ein um 50% höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Multiparität und ein junges Alter (<35 Jahre) zum Zeitpunkt der Erstgravidität werden dahingegen als risikomindernd eingestuft. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt darin, dass eine Schwangerschaft nicht nur zur Stimulation des Brustgewebes führt, sondern auch die Differenzierung der epithelialen

Stammzellen fördert, wodurch diese gegen potentielle DNS-Noxen möglicherweise resistent werden (Bastert, 1996).

Die exogene Zufuhr von Hormonen in Form der oralen Kontrazeption wird kontrovers diskutiert und gilt derzeit nicht als unabhängiger Risikofaktor (Marchbanks et al., 2002). Dahingegen wird der postmenopausalen Hormonsubstitution mit Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparaten erst bei einer längerfristigen Einnahme von mehr als fünf Jahren eine direkte Erhöhung des Brustkrebsrisikos um das 1.5-fache zugeschrieben (Beral et al., 2003; Harbeck und Heywang-Köbrunner, 2006).

Soziokulturelle Faktoren und Adipositas

Weltweite epidemiologische Studien bezüglich der Häufigkeit des Mammakarzinoms haben bereits 1975 gezeigt, dass die Inzidenz in westlichen Industrienationen deutlich höher liegt als in Entwicklungsländern und Japan (De Waard, 1975). Dabei spiegeln sich die großen ethnologischen und geographischen Erkrankungsunterschiede laut Kelsey, Sellers und Grabrick in der Lebensführung und den nutritiven Gewohnheiten wider (Kelsey, 1993b; Sellers und Grabrick, 2002). Hier konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei postmenopausalen Frauen mit Adipositas ein bis zu 3-fach höheres Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms besteht. Die Erklärung hierfür liegt in der gesteigerten Konversion von Androstendion zu Östrogen in den Fettzellen. Auch das Metabolische Syndrom als Wohlstandserkrankung wird neuerlich mit einer Risikoerhöhung in Bezug auf Brustkrebs assoziiert und ist ebenfalls mit einem negativen prognostischen Einfluss vergesellschaftet (Vona-Davis et al., 2007).

Zweitmalignome sowie benigne Brustkrankungen in der Eigenanamnese

Neben exogenen Faktoren erhöhen auch vorausgegangene Tumore der kontralateralen Brust sowie Endometrium- und Ovarialkarziome in der Eigenanamnese das relative Risiko einer Brustkrebserkrankung auf das 2 bis 4-fache (Goerke et al., 2003). Ein bereits vorhandenes DCIS oder CLIS erhöht dieses Risiko sogar auf mehr als das 6-fache (Kelsey, 1993b). Die Diagnose einer atypischen duktaalen oder lobulären Hyperplasie stellt ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms dar (Marshall et al., 1997).

Positive Familienanamnese und genetische Prädisposition

Bei etwa 15-20% der Betroffenen kann das Mammakarzinom als genetisch determinierte Brustkrebserkrankung angesehen werden. Dabei ist vor allem bei bilateralen Karzinomen, jungem Erkrankungsalter und der Häufung assoziierter Krebserkrankungen in der Familienanamnese (Ovar, Endometrium, Pankreas, Prostata) von einem hereditären Geschehen auszugehen. Bisher lässt sich allerdings lediglich in ca. 5-6% der Fälle eine

eindeutige Genmutation als Ursache des Mammakarzinoms nachweisen (Harbeck und Heywang-Köbrunner, 2006; Malone et al., 1998; Satagopan et al., 2001).

Bei etwa 50% dieser Fälle liegt eine Mutation in einem der beiden Breast-Cancer-Gene BRCA1 (Chromosom 17q) oder BRCA2 (Chromosom 13q) vor. Beide Genprodukte sind für die DNS-Reparatur und Regulation der Transkription mitverantwortlich. Liegt eine Mutation in BRCA1 vor, haben die Trägerinnen ein durchschnittliches Risiko von 65% bis zum Alter von 70 Jahren an Brustkrebs zu erkranken. Des Weiteren steigt das Risiko eines Ovarialkarzinoms auf 39%. Eine Mutation in BRCA2 führt im Vergleich zum Wildtyp zu einer Risikoerhöhung auf 45% für Brustkrebs und 11% für ein Ovarialkarzinom. Weitere seltene genetische Prädispositionen stellen das Li-Fraumeni-Syndrom (p53), das Cowden-Syndrom (pTEN) und das Ataxia-Teleangiektasie-(AT)-Syndrom dar (Firth und Hurst, 2005).

Alter

Den größten Risikofaktor für eine maligne Erkrankung der Brust stellt das zunehmende Alter dar. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass in den Jahren 2000 bis 2004 über 95% der Neuerkrankungen und 97% der Todesfälle erst nach dem 40. Lebensjahr auftraten (Ries et al., 2008). Dabei ist das relative Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken in der Altersgruppe zwischen 65 und 69 Jahren etwa 17-fach höher als in der Altersgruppe von 30 bis 34 Jahren (Jonat, 2000).

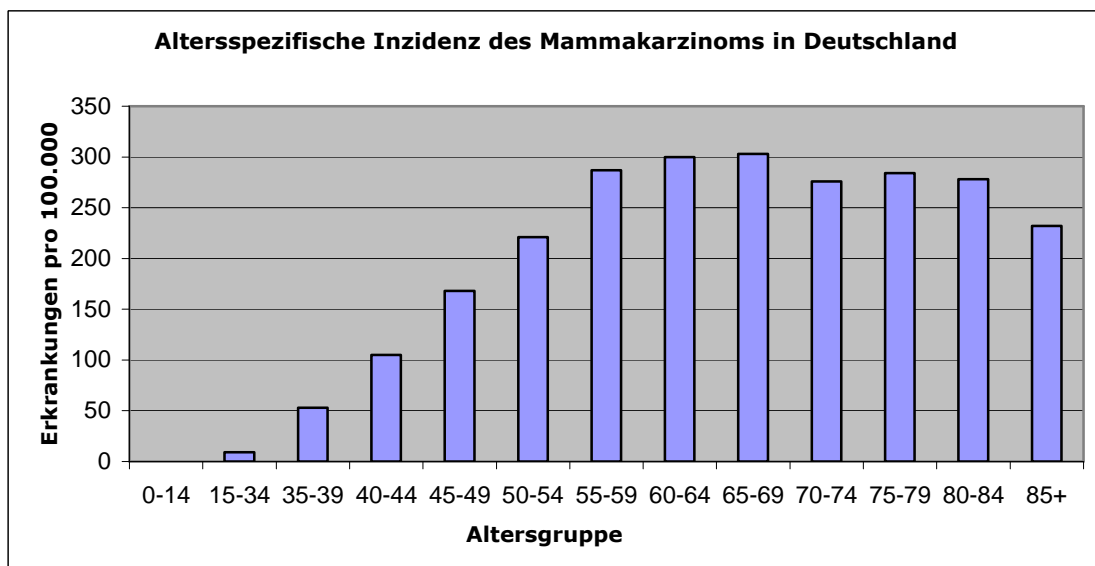


Abbildung 2: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland 2006 (RKI)

Zwischen 35 und 55 Jahren steigt die Inzidenzrate des Mammakarzinoms kontinuierlich an, flacht ab und ist ab einem Alter von 70 Jahren rückläufig (Abbildung 2). Hierdurch unterscheidet sich das Mammakarzinom von nicht hormonabhängigen Tumoren, die auch im höheren Alter steigende Inzidenzraten aufweisen (Jemal et al., 2008).

1.1.3 Histopathologische Klassifikation, Stadieneinteilung und Grading

Die histopathologische Klassifizierung des Mammakarzinoms erfolgt auf Grundlage der modifizierten WHO-Klassifikation von 1981 nach den international anerkannten Empfehlungen des American Registry of Pathology (Rosen und Oberman, 1993):

A Nichtinvasive Karzinome

- Duktales Carcinoma in situ (DCIS)
- Carcinoma lobulare in situ (CLIS)

B Invasive Karzinome

- Invasiv duktales Karzinom (80%)
- Invasiv lobuläres Karzinom (10%)
- Medulläres Karzinom (5%)
- Muzinöses Karzinom
- Invasiv papilläres Karzinom
- Tubuläres Karzinom
- Adenoid-zystisches Karzinom
- Sekretorisches juveniles Karzinom
- Apokrines Karzinom
- Lipidreiches Karzinom
- Invasiv kribriiformes Karzinom
- Glykogenreiches Karzinom

C Morbus Paget der Mamille

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms wird nach der TNM-Klassifikation vorgenommen. Sie beurteilt die Tumorgöße (T) durch Vermessung der invasiven Tumorkomponente, den Nodalstatus (N) an exstirpierten Lymphknoten der Axilla von Level I bis III und die Metastasierung (M) anhand der Identifizierung potentieller Fernmetastasen durch Staginguntersuchungen (UICC, 2002).

Die **Union internationale contre le cancer** (UICC) sieht folgende Einteilung vor:

T-Primärtumor

| | |
|------|--|
| pTis | Carcinoma in situ |
| pT1a | Tumor > 0.1 cm und ≤ 0.5 cm |
| pT1b | Tumor > 0.5 cm und ≤ 1 cm |
| pT1c | Tumor > 1 cm und ≤ 2 cm |
| pT2 | Tumor > 2 cm und ≤ 5 cm |
| pT3 | Tumor > 5 cm |
| pT4a | Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand |
| pT4b | Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Haut |
| pT4c | Kriterien pT4a und pT4b gemeinsam |
| pT4d | Inflammatorisches Karzinom |

N-Regionäre Lymphknoten

| | |
|------------|---|
| pN0 | keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| pN0(i+) Sn | isolierte Tumorzellen im Sentinel-Lymphknoten |
| pN1mi | Mikrometastasen > 0.2 mm und < 2 mm |
| pN1a | Metastasen in 1-3 beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten |
| pN1b | Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna, die klinisch nicht erkennbar waren |
| pN1c | Kriterien pN1a und pN1b gemeinsam |
| pN2a | Metastasen in 4-9 fixierten ipsilateralen axillären Lymphknoten |
| pN2b | Metastasen in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen |
| pN3a | Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder ipsilaterale infraklavikuläre Lymphknotenmetastasen |
| pN3b | Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der Arteria mammaria, die klinisch nicht erkennbar waren |
| pN3c | Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten |

M-Fernmetastasen

| | |
|----|----------------------------------|
| M0 | keine Fernmetastasen nachweisbar |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden |

Grading

Das histopathologische Grading des invasiven Mammakarzinoms erfolgt nach den international anerkannten Richtlinien von Bloom und Richardson (1957). Dazu erfolgt die Beurteilung des Tumors hinsichtlich tubulärer Differenzierung, Kernpolymorphie und Mitoserate. Nach Zuordnung der entsprechenden Scorewerte werden drei Tumordifferenzierungsgrade (G1-G3) unterschieden:

- G1: gut differenziertes Karzinom mit geringer Malignität
- G2: mäßig differenziertes Karzinom mit mittelgradiger Malignität
- G3: schlecht differenziertes Karzinom mit hoher Malignität

1.1.4 Prädiktion und Prognose

Die individuelle Prognose einer Patientin mit invasivem Mammakarzinom hängt von verschiedenen tumorbezogenen Faktoren und deren Interaktion ab. Dabei determinieren zahlreiche Prognosefaktoren den potentiellen Krankheitsverlauf, während prädiktive Faktoren den möglichen Therapieerfolg vorhersagen.

Bis heute gibt es jedoch nur wenige evidenzbasierte Faktoren, die bei der Erstellung von Therapiekonzepten zum Einsatz kommen. Dazu zählen beispielsweise der positive Hormonrezeptorstatus als Voraussetzung für eine endokrine Therapie, der Her2/neu-Status für eine Antikörpertherapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab oder der Menopausenstatus für den Erfolg einer ovariellen Ablation (Rack et al., 2007).

1.1.4.1 Klassische Prognosefaktoren

Im Folgenden werden die klassischen Prognosefaktoren und deren Bedeutung für das Mammakarzinom erläutert:

Tumorgroße

Die Tumorgroße stellt einen unabhängigen Prognosefaktor des Mammakarzinoms dar und ist direkt mit dem Befall axillärer Lymphknoten assoziiert (Cianfrocca und Goldstein, 2004). Zudem steigen mit zunehmender Größe des Primärtumors das Risiko eines frühen Lokalrezidivs und die Wahrscheinlichkeit der metastatischen Absiedlung von Tumorzellen (Koscielny et al., 1984; Rosen et al., 1993). Ausgehend von einer mittleren 5-JÜR von 81% (RKI) zeigt Abbildung 3 die relativen Überlebensraten in Abhängigkeit der Tumorgroße:

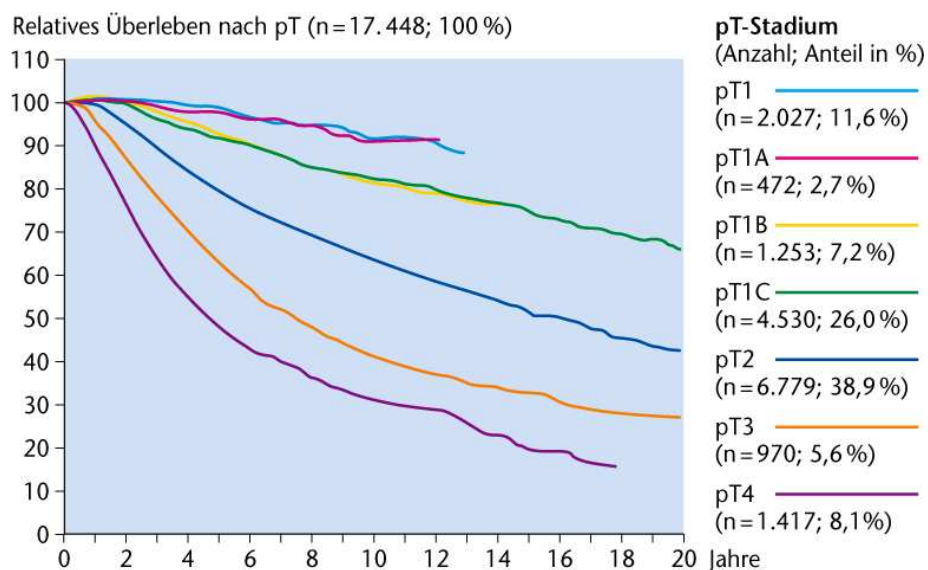


Abbildung 3: Relatives Überleben in Abhängigkeit der Tumorgroße (Engel et al., 2005)

Axillärer Lymphknotenstatus

Der axilläre Lymphknotenstatus ist heute als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren des primären Mammakarzinoms anerkannt und hat direkten Einfluss auf die Indikationsstellung der adjuvanten Therapie. Dabei steht die Zahl der befallenen Lymphknoten im direkten Zusammenhang mit dem Risiko eines Lokalrezidivs (Engel et al., 2005; Saez et al., 1989). Zudem besteht eine umgekehrt proportionale Korrelation von Nodalstatus und Überlebenszeit (Abbildung 4).

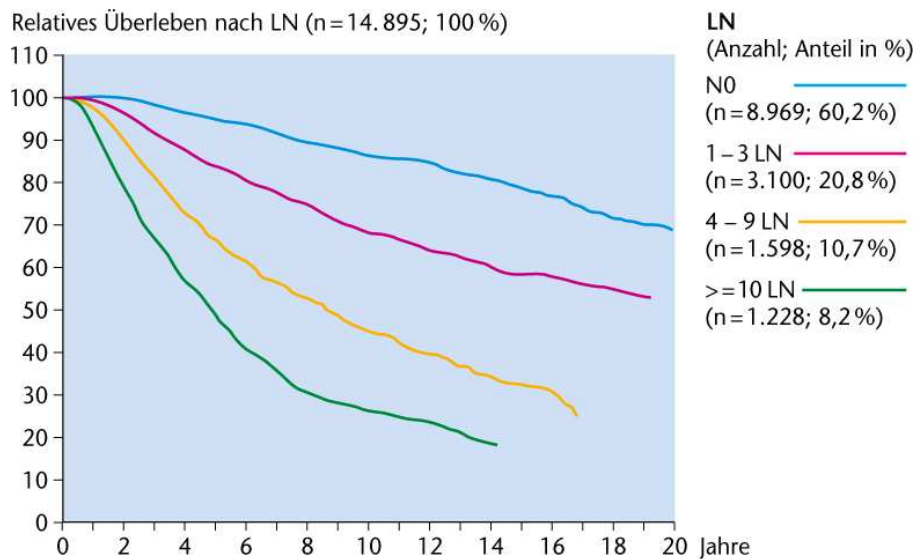


Abbildung 4: Relatives Überleben in Abhängigkeit des Nodalstatus (Engel et al., 2005)

Bei etwa 50% aller invasiven Mammakarzinome lässt sich ein metastatischer Befall der axillären Lymphknoten nachweisen. In Ländern mit effektivem Früherkennungsprogramm (Mammographiescreening) werden Tumore in immer früheren Tumorstadien entdeckt, wodurch auch der Befall der axillären Lymphknoten bei Diagnosestellung rückläufig ist. Dabei sind vor allem Lymphknoten der Level I und II betroffen (Tominaga et al., 2004). Traditionell wird der axilläre Nodalstatus daher mittels axillärer Lymphonodektomie (ALND) der Level I und II bestimmt (Abbildung 5). Heutzutage kommt jedoch vermehrt die Sentinel-Lymphonodektomie (SLND) zum Einsatz. Hierbei wird der erste drainierende Lymphknoten nach periareolärer Injektion von Patentblau oder ⁹⁹Techneium intraoperativ nachgewiesen und entfernt (Kühn et al., 2005).

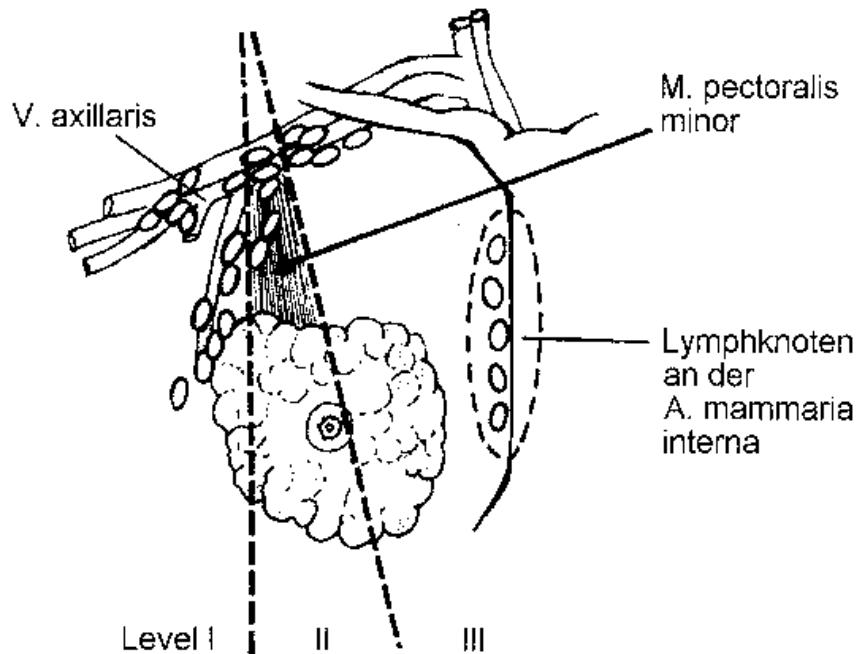


Abbildung 5: Klinische Einteilung der axillären Lymphknotenlevel (UICC)

Histologischer Tumortyp

Die histologische Subspezifizierung des Mammakarzinoms hat eine direkte prognostische Bedeutung. Hierzu wurde vom National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) eine Einteilung der invasiven Karzinome hinsichtlich einer ungünstigen, intermediären und günstigen Prognose vorgenommen (Fisher et al., 1993):

Ungünstig:

- Duktale Karzinome
- Atypisch medulläres Karzinom

Intermediär:

- Lobuläres Karzinom
- Medulläres Karzinom
- Mischformen

Günstig:

- Muzinöses Karzinom
- Papilläres Karzinom
- Tubuläres Karzinom

Histologisches Grading

Das histologische Grading als Maß des Differenzierungsgrades stellt eine der ältesten Methoden zur Prognoseabschätzung beim Mammakarzinom dar. Obwohl das Grading sehr stark von der Erfahrung des beurteilenden Pathologen abhängig ist und hinsichtlich der auszuwertenden Faktoren kontrovers diskutiert wird, ist es dennoch ein überaus wichtiger Prognosefaktor (Komaki et al., 2006). So beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate von G1-Tumoren über 80%, die von G2-Tumoren etwa 60% und die von G3-Tumoren nur 45% (Dixon, 2000). Studien zeigten zudem, dass Patientinnen mit G3-Tumoren ein mehr als 4-fach erhöhtes Rezidivrisiko gegenüber Frauen mit G1-Tumoren aufweisen (Le Doussal et al., 1989).

Hormonrezeptorstatus

Die Kenntnis des Hormonrezeptorstatus besitzt sowohl prädiktive als auch prognostische Bedeutung. Der Nachweis positiver Hormonrezeptoren zeigt ein hormonabhängiges Wachstum des Karzinoms und ist Grundlage einer effektiven antihormonellen Therapie mit Tamoxifen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Darüber hinaus wird hormonrezeptorpositiven Karzinomen vor allem in den ersten postoperativen Jahren eine bessere Prognose hinsichtlich der Rezidivneigung zugeschrieben (Hilsenbeck et al., 1998).

Blut- und Lymphgefäßinvasion

Der Einbruch einzelner Tumorzellen in Lymphspalten (Lymphangiosis carcinomatosa) oder Blutgefäße (Hämangiosis carcinomatosa) geht mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich eines Lokalrezidivs, axillären Lymphknotenbefalls und Fernmetastasen einher (Chua et al., 2001; Cianfrocca und Goldstein, 2004; Pinder et al., 1994). Bettelheim et al. wiesen bereits 1984 auf eine Senkung der Lebenserwartung bei Patientinnen mit Blut- und/oder Lymphgefäßinvasion hin (Bettelheim et al., 1984a). Rosen et al. gelang ebenfalls der Nachweis einer direkten Korrelation von Lymphangiainvasion (LVI) mit Rezidivrisiko und erhöhter Mortalität (Rosen et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit LVI-positiven Karzinomen ein erhöhtes Rezidivrisiko von 38% gegenüber den Patientinnen ohne Lymphangiainvasion aufwiesen (22%). Auch die Arbeitsgruppe um Lauria bestätigte die überaus hohe prognostische Relevanz der Gefäßinvasion, wies seinerzeit jedoch auf die niedrige Prävalenz einer Angiainvasion hin (Lauria et al., 1995). Die Evidenz der prognostischen Aussagekraft der Blut- bzw. Lymphgefäßinvasion führte dazu, dass 2005 erstmals „Gefäßinvasion (vessel-invasion)“ als selbstständiger Prognosefaktor in die Konsensusempfehlungen der St. Gallen Konferenz aufgenommen wurde (Goldhirsch et al., 2005). Allerdings fehlte, wie auch in der Bestätigung 2007, die Unterscheidung zwischen Blut- und Lymphgefäßinvasion (Goldhirsch et al., 2007).

Eine direkte Auswirkung auf das klinische Prozedere hat die LVI derzeit im Rahmen der Indikationsstellung zur Postmastektomie-Bestrahlung. Nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) sollte eine Bestrahlung der Thoraxwand bei Vorliegen der folgenden Faktoren erfolgen:

- Tumore ≥ 5 cm (pT3/pT4)
- inflammatorisches Mammakarzinom (pT4d)
- ≥ 4 befallene axilläre Lymphknoten (pN2a)
- R1/R2-Resektion
- fakultativ bei 1-3 befallenen axillären Lymphknoten (pN1a)

Sowie bei Kombination von mindestens zwei der folgenden Faktoren:

- Alter < 40 Jahre
- Lymphangiosis carcinomatosa oder Gefäßeinbrüche (L1/V1)
- Tumore > 3 cm (pT2)
- entdifferenzierte Karzinome (G3)
- Multizentrität oder Multifokalität
- Infiltration der Pectoralisfaszie
- Sicherheitsabstand < 5 mm

1.1.4.2 Moderne Prognosefaktoren

Neben den oben genannten etablierten Prognosefaktoren sind eine Vielzahl tumorbiologischer Prognosefaktoren Gegenstand der heutigen Forschung:

Proliferation und Ploidie

- S-Phase
- Ki-67/MIB-1
- EGF-Rezeptor

Invasion und Metastasierung

- Plasminogen-Aktivator (uPA) / Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)
- Tumorzellnachweis im Knochenmark

Tumorsuppressor- und Onkogene

- p53
- Her2/neu

Bisher hat jedoch nur der HER2/neu-Status als Indikator einer hohen Tumoraggressivität klinische Bedeutung erlangt. Die Überexpression korreliert mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen (Toikkanen et al., 1992). Eine frühzeitige Bestimmung des HER2/neu-Status ist daher hinsichtlich einer Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab von großer therapeutischer Bedeutung (Harbeck und Heywang-Köbrunner, 2006).

Neuere Studien überprüfen aktuell den Stellenwert sogenannter Genexpressionsanalysen, die sowohl prognostische als auch prädiktive Aussagen für definierte Subpopulationen von Patientinnen zulassen (Paik et al., 2004, 2006; Van` t Veer et al., 2005). Nachdem erste Ergebnisse diesbezüglich auf eine bessere Vorhersage der Prognose und des individuellen Therapieansprechens hindeuten, ist es möglich, dass diese molekularpathologischen Analysen die klassischen Prognosefaktoren verdrängen werden.

1.2 Rolle des Lymphsystems bei der Tumormetastasierung

1.2.1 Entwicklung des Lymphgefäßsystems

Lymphgefäße wurden erstmals im 17. Jahrhundert von dem italienischen Anatom Gasparo Aselli als „lacteae venae“ oder milchige Venen beschrieben. Doch erst 200 Jahre später stellte Florence Sabin eine erste Theorie zur Herkunft des Lymphgefäßsystems auf. Aufgrund von Experimenten mit Schweineembryos, denen sie Farbstoffe injizierte, folgerte sie den venösen Ursprung des Lymphgefäßsystems. Sie nahm an, dass isolierte primitive Lymphsäcke aus Endothelzellen hervorgehen, die während der frühen Embryonalentwicklung aus Venen hervorsprossen (Sabin, 1902).

Nachdem die Forschung auf dem Gebiet der Lymphangiogenese im vergangenen Jahrhundert durch intensive Studien zur Entwicklung des Blutgefäßsystems verdrängt wurde, konnten die Erkenntnisse von Sabin erst zur Jahrtausendwende bestätigt werden. Demnach tritt die Lymphangiogenese während der Embryonalentwicklung gegenüber der Angiogenese mit zeitlicher Verzögerung in Erscheinung. In unmittelbarer Nähe der Kardinalvenen entstehen anschließend Kapillarkonvolute, die zu Lymphsäcken fusionieren (Wilting et al., 1999). Andere Studien wiesen jedoch auf einen weiteren Mechanismus hin, der parallel abzulaufen scheint (Schneider et al., 1999). Untersuchungen an Vogelchimären zeigten, dass das Lymphgefäßsystem nur zum Teil venösen Ursprungs ist. Zum anderen Teil wird es aus Lymphangioblasten gebildet, die in der Splanchnopleura und in den Somiten (embryologische Ursegmente) lokalisiert sind. Aus den Somiten wandern Lymphangioblasten in die Körperwand und in die Extremitäten ein, wo sie sich an der Bildung der Lymphgefäße beteiligen. Die Lymphangioblasten für die Lymphgefäße der inneren Organe entstammen der Splanchnopleura (Wilting et al., 2003).

1.2.2 Struktur und Funktion des Lymphgefäßsystems

Das Lymphgefäßsystem besteht aus einem Netzwerk feinwandiger Gefäße, das die interstitielle Lymphflüssigkeit sammelt, in den zwischengeschalteten Lymphknoten filtert und schließlich in den Blutkreislauf zurückführt. Weiterhin dient es dem Transport von fetthaltigem Chylus und spielt eine signifikante Rolle bei der Immunantwort des Körpers (Roitt et al., 1998). Im Vergleich zu Blutgefäßen finden sich innerhalb des Lymphgefäßsystems funktionale und strukturelle Unterschiede. Lymphkapillaren besitzen ein etwa dreifach größeres Lumen sowie unregelmäßigere Konturen als Blutkapillaren und sind lediglich durch ein sehr dünnes Endothel ausgekleidet (Leak, 1970; Ryan, 1989). Die Endothelzellen sind zwar stellenweise durch tight-junctions verbunden, dazwischen liegen jedoch ventilartige Lücken, durch die Flüssigkeit und kleine Partikel ungehindert in das Gefäß eindringen können. Eine durchgehende Basalmembran sowie Perizyten fehlen zudem gänzlich. Einzigartig sind zudem sich überlappende interzelluläre Kontaktzellen, die sich beim Anstieg des interstitiellen Drucks dehnen und hierdurch Flüssigkeit sowie Makromolekülen ein einfaches Eindringen in das Lymphgefäß ermöglichen. An der abluminalen Seite der Endothelzellen inserieren Mikrofibrillen, so genannte Ankerfilamente, die an elastischen Fasern des interstitiellen Bindegewebes befestigt sind. Durch diese Verspannungen werden die Lymphkapillaren offen gehalten (Casley-Smith und Florey, 1961; Leak und Burke, 1966; Skobe und Detmar, 2000).

1.2.3 Entwicklung spezifischer Lymphgefäßmarker

Die Erforschung des Lymphgefäßsystems wurde im vergangenen Jahrhundert zu Gunsten von Studien des Blutgefäßsystems stark vernachlässigt. Der Grund hierfür lag, neben dem primär stärkeren Interesse am Blutkreislauf, vor allem in Schwierigkeiten bei der histologischen Differenzierung von Blut- und Lymphgefäßen (Van den Eynden et al., 2006). Erste Forschergruppen konnten daher lediglich auf Injektionstechniken bei der Untersuchung des Lymphgefäßsystems zurückgreifen. Dabei wurden Farbstoffe (Patentblau, u.a.) injiziert, die selektiv von Lymphgefäßen aufgenommen wurden und so lymphatische Strukturen makroskopisch sichtbar machten (Sulis et al., 1975).

Spätere Studien nutzten Panendothelmarker gegen Blut- und Lymphgefäße (PECAM-1/CD31, CD34) in Kombination mit den Basalmembran-Antikörpern Laminin und Kollagen Typ IV (Nerlich und Schleicher, 1991; Newman et al., 1990). Dabei wurden Gefäße, die zwar mit den Panendothelmarkern reagierten aber weder eine Basalmembran noch Erythrozyten aufwiesen, als Lymphgefäß identifiziert. Ein ähnliches methodisches Vorgehen lag darin, histologische Schnitte mittels PECAM-1/CD31 in Kombination mit dem Blutgefäßmarker PAL-E zu färben (Jussila et al., 1998).

Beide Methoden waren jedoch unzuverlässig, weshalb eine exakte Untersuchung von Lymphgefäßen erst durch die neuerliche Entwicklung spezifischer Antikörper gegen lymphatische Endothelien (VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1, Podoplanin, D2-40) möglich wurde. Bei VEGFR-3 handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Rezeptor zur Signaltransduktion innerhalb der Lymphangiogenese. Er wird vorwiegend auf adulten lymphatischen Endothelzellen exprimiert (Kukk et al., 1996). Spätere Studien zeigten allerdings, dass VEGFR-3 neben Lymphgefäßen auch intratumorale Blutgefäße färbt, weshalb er seine Bedeutung bei der immunhistochemischen Untersuchung von Karzinomen verlor (Partanen et al., 1999; Valtola et al., 1999).

Der Hyaluronsäure-Rezeptor Lyve-1 (CD44) ist auf der luminalen und abluminalen Oberfläche von Lymphgefäßen lokalisiert. Hier dient er der Aufnahme von Hyaluron in die Endothelzellen sowie dessen Transport aus der Peripherie hin zu den Lymphgefäßen (Banerji et al., 1999; Prevo et al., 2001). LYVE-1 gilt jedoch auch in der histopathologischen Routinediagnostik aufgrund der gleichzeitigen Färbung von bronchialen Gefäßen, Hautzellen, Makrophagen und Lebersinusoiden nicht als eindeutig spezifischer Marker für Lymphgefäße (Mouta Carreira et al., 2001).

Der Transkriptionsfaktor Prox-1 stellt ebenfalls einen hochspezifischen Marker zum Nachweis lymphatischer Endothelien dar. Prox-1 dient dem Wachstum und der Verlängerung von Lymphgefäßtrieben während der Lymphangiogenese, wobei seine Expression auf adulten Lymphendothelzellen erhalten bleibt (Wigle und Oliver, 1999). Der Einsatz von Prox-1 wird in der pathologischen Diagnostik jedoch auch durch Kreuzreaktionen mit nicht-endothelialen Geweben (Herz, Leber, Pankreas, ZNS) limitiert (Oliver et al., 1993; Sosa-Pineda et al., 2000).

Das Glycoprotein Podoplanin (gp36) wurde erstmals auf der Oberfläche glomerulärer Ratten-Epithelzellen (Podozyten) nachgewiesen. Es wird vor allem in kleinen Lymphgefäßen sowie in benignen Gefäßtumoren und Angiosarkomen exprimiert. Blutgefäße und endotheliale Venolen in Lymphknoten sind allerdings Podoplanin negativ, weshalb Podoplanin als zuverlässiger Lymphgefäßmarker gilt (Birner et al., 2001; Breiteneder-Geleff et al., 1997; Schoppmann et al., 2001).

Der monoklonale Antikörper D2-40 ist gegen das onkofetale M2A-Protein auf fetalen Stammzellen sowie Lymphgefäßendothelien gerichtet und zeigt zudem eine gleichzeitige Reaktion mit gp36, was humanem Podoplanin entspricht (Kahn und Marks, 2002; Ogasawara et al., 2008; Schacht et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass D2-40 in der Lage ist, lymphatische Endothelien in gesunden und neoplastischen Geweben nachzuweisen, ohne eine gleichzeitige Reaktion mit Arterien oder Venen zu haben (Kahn und Marks, 2002). Somit wurde ein Marker entwickelt, der sich durch seine hohe Spezifität von 98.8% sowie Sensitivität von 97.3% in Bezug auf lymphatische Endothelien gegenüber den anderen Antikörpern auszeichnet (Evangelou et al., 2005).

1.2.4 Tumorinduzierte Lymphangiogenese beim Mammakarzinom

Erste Untersuchungen beim Mammakarzinom wiesen im Jahr 2001 auf den potentiell aktiven Prozess einer tumorvermittelten Lymphangiogenese hin. Skobe et al. zeigten, dass die Überexpression des Wachstumsfaktors VEGF-C eine verstärkte Lymphangiogenese sowie Lymphknotenmetastasen hervorruft (Skobe et al., 2001). Spätere Studien identifizierten darüber hinaus auch VEGF-D als prolymphangiogenen Faktor und wiesen auf dessen prognostische Bedeutung hinsichtlich der Existenz axillärer Lymphknotenmetastasen hin (Abbildung 6) (Nakamura et al., 2003).

Im adulten Gewebe liegt die physiologische Funktion von VEGF-C in der Proliferation, Migration und dem Überleben von Lymphendothelzellen. VEGF-C wird dabei als unreifes langes Polypeptid sezerniert, das durch proteolytische Spaltung aktiviert wird, wodurch kurze reife Peptide entstehen. Die unreifen langen Moleküle binden mit hoher Affinität am lymphatischen Wachstumsrezeptor VEGFR-3, wohingegen die kurzen reifen Peptide zusätzlich Liganden für VEGFR-2 auf Blut- und Lymphgefäßen darstellen (Joukov et al., 1997; Roy et al., 2006).

VEGF-D weist hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu VEGF-C auf, wobei es den gleichen, wenn auch schwächeren, mitogenen Stimulus über VEGFR-2 und VEGFR-3 auf die Angiogenese und Lymphangiogenese ausübt (Roy et al., 2006).

Die Expression von VEGF-C und VEGF-D durch den Tumor wird über Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine und tumoreigene inflammatorische Zellen reguliert. Durch die Bindung an VEGFR-3 kommt es im Folgenden zu einer aktiven tumorinduzierten Lymphangiogenese mit anschließender lymphatischer Dissemination von Tumorzellen in die Peripherie (Skobe et al., 2001; Stacker et al., 2001). Neuere Studien weisen zudem auf den Einfluss von VEGF-A über den VEGFR-2-Signalweg auf die tumorvermittelte Lymphangiogenese hin (Cueni und Detmar, 2006).

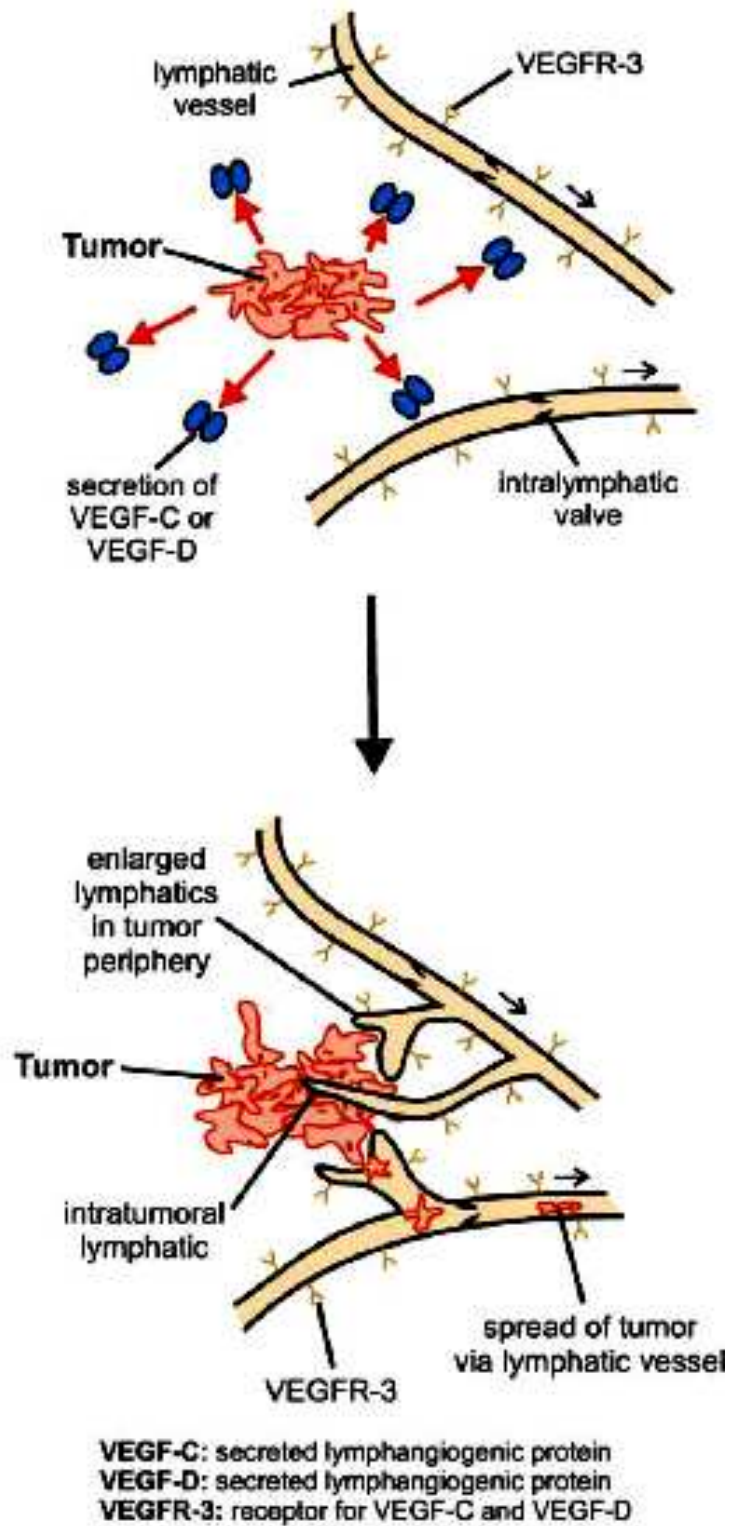


Abbildung 6: Wirkungsweise der karzinogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D auf peritumorale Lymphgefäße (Cao, 2005)

1.2.5 Rolle der Lymphgefäße bei der Metastasierung des Mammakarzinoms

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt primär über das Lymphsystem, wobei der axilläre Lymphknotenstatus die größte prognostische Bedeutung für das Überleben der Patientinnen darstellt (Cody et al., 2004; Fisher et al., 1983).

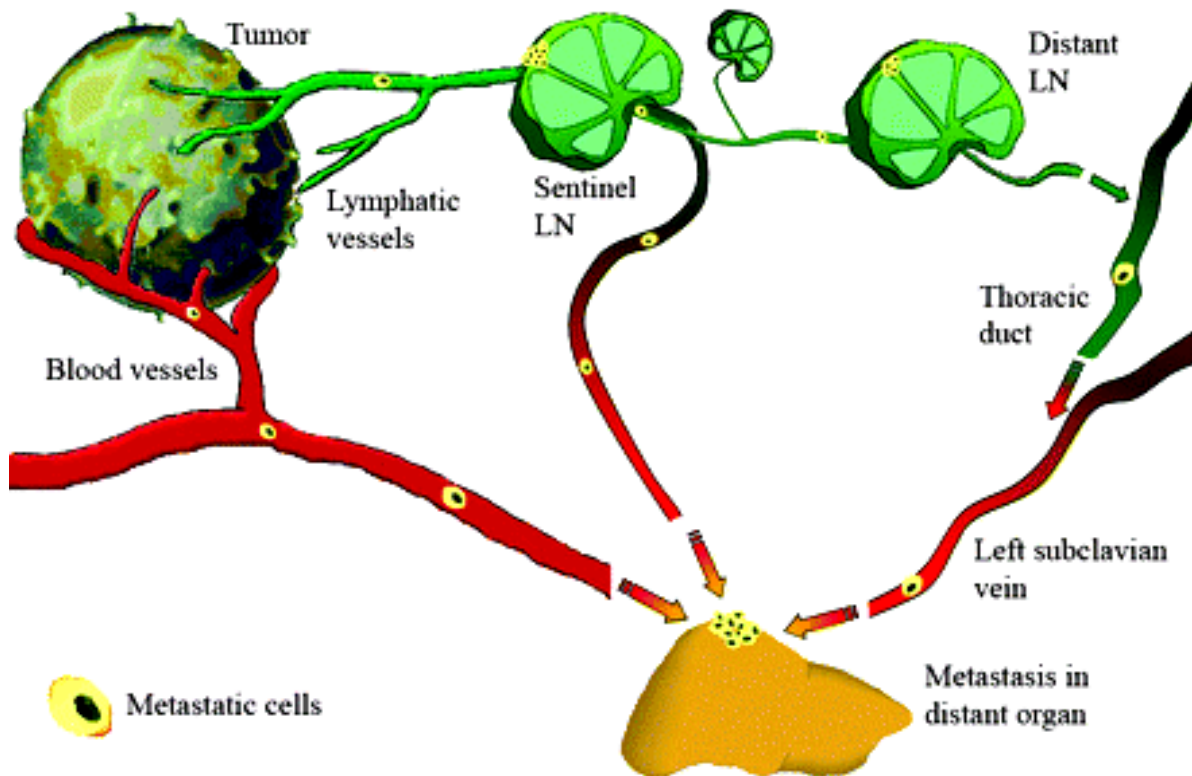


Abbildung 7: Wege der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung (Tobler und Detmar, 2006)

Ausgehend von metastatischen Lymphknoten erfolgt die weitere lymphatische Streuung über den Ductus thoracicus in den linken Venenwinkel und somit in die Körperperipherie. Daneben kommt es zu einer direkten hämatogenen Streuung durch Gefäße des Primärtumors sowie über Blutgefäße der befallenen Lymphknoten (Abbildung 7).

Trotz der hohen prognostischen Bedeutung des Lymphknotenstatus ist bisher wenig über die molekularen Mechanismen der lymphatischen Tumorzellinvasion bekannt. Traditionell betrachtet man diesen Vorgang als passives Geschehen, wobei maligne Zellen zusammen mit Proteinen und interstitieller Flüssigkeit in das Lymphgefäß aufgenommen werden. Dabei scheint die hohe Permeabilität der Lymphgefäßwand und das Fehlen einer durchgehenden Basalmembran diesen Vorgang zu unterstützen (Hartveit, 1990). Neuere Studien gehen dahingegen von einem aktiven Prozess aus, wonach das lymphatische Endothel, aktiviert durch den Tumor, Chemokine freisetzt, die das Übertreten von Tumorzellen in das Lymphgefäßlumen erleichtern (Pepper und Skobe, 2003).

Für das Mammakarzinom gilt es jedoch als gesichert, dass die Invasion von Tumorzellen in Lymphgefäße einen prognostischen Einfluss für das Auftreten von Lokalrezidiven, axillären Lymphknoten- sowie Fernmetastasen darstellt (Chua et al., 2001; Cianfrocca und Goldstein, 2004; Pinder et al., 1994). Trotz methodischer Probleme wiesen Bettelheim et al. bereits 1984 auf die geringere Lebenserwartung von Patientinnen mit Blut- und/oder Lymphgefäßinvasionen hin (Bettelheim et al., 1984a). Rosen et al. beschrieben wenige Jahre später ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen Lymphangioinvasion und höherem Rezidivrisiko sowie erhöhter Mortalität (Rosen et al., 1989). Jüngere Studien machen zudem auf deren potentielle Bedeutung für die Prädiktion von Lymphknotenmetastasen aufmerksam (Arnaout-Alkarain et al., 2007; Tezuka et al., 2007; Van den Eynden et al., 2006).

Das Vorhandensein von Lymphgefäßen innerhalb der Tumormasse war lange Zeit ebenfalls Inhalt kontroverser Diskussionen. Es wurde postuliert, dass diese durch den großen Druck, welcher durch die wachsenden Tumorzellen ausgeübt wird, kollabieren (Leu et al., 2000). Nachdem spätere Studien jedoch intratumorale Gefäße bei verschiedenen Tumorentitäten nachweisen konnten, gelang dies ebenfalls beim Mammakarzinom. Hier konnte gezeigt werden, dass intratumorale Lymphgefäße in signifikantem Zusammenhang mit dem axillären Lymphknotenstatus, der Rezidivrate und dem Gesamtüberleben stehen (Achen et al., 2005; Van der Auwera et al., 2005; Yamauchi et al., 2007). Die Vermehrung und Vergrößerung peritumoraler Lymphgefäße wird dahingegen bereits einstimmig als unabhängiger prognostischer Faktor anerkannt (Choi et al., 2005; Stacker et al., 2002).

1.3 Zielsetzung

Der Einbruch von Tumorzellen in Lymphgefäße ist mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom assoziiert. Trotz der hohen prognostischen Bedeutung stellt die Diagnose einer Lymphangi Invasion den Pathologen mangels ausreichend sensitiver sowie spezifischer Detektionsmethoden vor methodische Probleme. Die Entwicklung von D2-40, einem spezifischen Antikörper gegen lymphatische Endothelien, ermöglicht erstmals eine exakte Unterscheidung zwischen Lymph- und Blutgefäßen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, maligne Brusttumore mit dem Antikörper D2-40 hinsichtlich einer lymphatischen Tumorzellinvasion (LVI) zu untersuchen, um so einen Vergleich mit der LVI-Detektionsrate aus der routinediagnostischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung herzustellen. Des Weiteren wird der Faktor D2-40-LVI mit etablierten histopathologischen Faktoren korreliert und seine Eignung zur Prädiktion von axillären Lymphknotenmetastasen untersucht. Abschließend soll überprüft werden, ob durch eine eventuelle Steigerung der Detektionsrate von Lymphangi Invasionen retrospektiv die Indikationsstellung für eine Postmastektomie-Thoraxwandbestrahlung geändert worden wäre.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurden 254 maligne Brusttumore von 247 Patientinnen mit primärem, invasiven Mammakarzinom untersucht, die in den Jahren 2002 - 2005 in der Universitätsfrauenklinik Bonn operiert wurden. In sieben Fällen lag ein bilaterales Mammakarzinom vor.

Bei 225 Patientinnen wurde eine Sentinel-Lymphonodektomie (SLND) bzw. eine axilläre Lymphonodektomie (ALND) durchgeführt (zweimal bilateral), weshalb für 22 Patientinnen (27 Tumore) keine Informationen bezüglich des ipsilateralen Nodalstatus vorliegen.

Gründe für einen Verzicht auf eine SLND oder ALND waren:

- Bei 5 Patientinnen lag ein bilaterales Mammakarzinom vor. In diesen Fällen wurde eine SLND/ALND lediglich auf der Seite mit dem größeren Primärtumor durchgeführt.
- In 6 Fällen wurde zur Verkürzung der Operationsdauer aufgrund des hohen Patientenalters (74 bis 85 Jahre) und in weiteren 9 Fällen wegen einer relevanten Komorbidität auf eine SLND/ALND verzichtet.
- Vier Patientinnen mit klinisch negativem axillären Befund wiesen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms bereits Fernmetastasen auf, weshalb aufgrund des fehlenden therapeutischen Nutzens auf eine Entfernung axillärer Lymphknoten verzichtet wurde.
- Bei 2 Patientinnen wurde bei vorliegendem mikroinvasiven Karzinom ($\leq 2\text{mm}$) bzw. tubulären Karzinom ($< 10\text{mm}$) von einer SLND/ALND Abstand genommen.
- In einem Fall lehnte die Patientin die Durchführung einer SLND/ALND ab.

Nicht in das Kollektiv aufgenommen wurden Patientinnen, bei denen lediglich eine stanziobiopsische Diagnosesicherung erfolgte, sowie Patientinnen für die kein histologisches Material mehr zur Verfügung stand. Patientinnen mit einem Carcinoma in situ wurden ebenso ausgeschlossen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Material, Fixation und histologische Standardfärbung

Das Tumorgewebe wurde in 10%igem, gepufferten Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und die angefertigten 3-4 µm dicken Schnitte routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zusätzlich erfolgte die immunhistochemische Ermittlung des Rezeptorstatus von Östrogen, Progesteron und HER2/neu. Im Falle eines HER2/neu-Scorewertes von 2+ wurde zusätzlich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt (siehe unten).

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Färbung mittels Avidin-Biotin-Methode

Die Avidin-Biotin-Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Hühnereiweiß-Glykoproteins Avidin (substituierbar durch Streptavidin) zum Vitamin Biotin. Histochemisch wird die Peroxidase im Avidin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen (Denk, 1989).

Von dem eingebetteten Gewebe werden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf spezielle Kapillarspaltobjektträger (Chem Mate™ Capillary Gap Microscope Slides 75 µm, DAKO Cytomation) faltenfrei eingespannt. Zur besseren Verwertbarkeit werden die Schnitte über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

Zu Beginn der immunhistochemischen Färbung müssen die Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierzu werden sie zuerst 10 Minuten in Xylol und anschließend 10 Minuten in 100%igem Ethanol gewaschen. Anschließend werden sie kurz in eine absteigende Alkoholreihe (96%, 70% und 50%) geführt und abschließend in Trispuffer gespült. (Trispuffer: Die Stammlösung besteht aus 60.57g Tris Merck 8382, 500ml Aqua dest. und 430ml 1N HCl. Für die Gebrauchslösung werden 900ml einer 0.9%-igen NaCl-Lösung mit 100ml der Stammlösung vermischt).

Nach erfolgter Entparaffinierung und Rehydrierung werden die Schnitte in der Mikrowelle (zweimal 15 Minuten bei 600W) in einer Epitop-Retrieval-Lösung (Citratpuffer) vorbehandelt. (Citratpuffer-Stammlösung: Stammlösung A: 21.01g Zitronensäure/1000ml und Stammlösung B: 29.41g Natriumcitrat-Dihydrat/1000ml. Für die Gebrauchslösung werden 500ml Aqua dest. auf 9 ml der Stammlösung A und 41 ml der Stammlösung B gegeben). Die weiteren Schritte erfolgen semiautomatisch mit dem DAKO TechMate™ 500, um eine optimale Standardisierung zu erreichen. Hierbei werden sämtliche Färbeschritte (Färbezeiten und Färbereihenfolge) gemäß eines auf das Gerät ausgerichteten Färbeprotokolls durchgeführt.

Die Objektträger werden paarweise zusammengelegt und in einen Objektträgerhalter gestellt. Hierdurch entsteht ein kapillarer Spalt.

Beim Färbvorgang werden die Objektträgerpaare in die jeweilige mit Reagenzien gefüllte Küvettenvertiefung eingetaucht. Die Kapillarkraft bedingt, dass die Lösungen gleichmäßig über das Gewebe gezogen werden.

Zur Blockung der endogenen Peroxidase werden die Schnitte vor dem Einsetzen des Chromogensubstrats in 3% Wasserstoffperoxid inkubiert. Eine Hintergrundfärbung durch den Primärantikörper wird vermieden, indem die im Präparat vorhandenen unspezifischen Eiweiße durch Benetzen mit vier unterschiedlichen Puffern geblockt werden. Die verwendeten Puffer 1, 2 und 3 enthalten primär Carrierproteine. Der vierte Puffer enthält Wasser.

Nun erfolgt die Auftragung des Primärantikörpers und dessen Bindung an die Antigene auf dem Gewebe. Als Sekundärantikörper dient ein biotinylierter Brückenantikörper, der sich durch Benetzen an den primären Antikörper anlegt. In seiner Funktion dient er als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Folgekomplex aus Streptavidin und Horse-Radish Peroxidase. Zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen werden parallel zu den jeweiligen Färbvorgängen Negativkontrollen durchgeführt. Hierzu werden die Kontrollschnitte ohne Primärantikörper unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert.

Durch Einsetzen eines geeigneten Chromogensubstrats (stabile Pufferlösung aus Wasserstoffperoxid und 3-Amino-9-ethylcarbazol) wird die Peroxidase histochemisch nachgewiesen und zu einem farbigen Endprodukt (Rotfärbung) im Bereich des Antigens umgesetzt. Im Anschluss erfolgt die Gegenfärbung mittels Hämatoxylin. Durch die Spülung mit Leitungswasser kommt es zur Blaufärbung der Kerne.

Zwischen den einzelnen Färbe-, Puffer- und Spülschritten wird der Objektträgerhalter auf Saugkissen abgestellt, um die sich im Kapillarspalt befindliche Reagenz/Spülung zu entfernen. Nach erfolgter Färbung werden die Schnitte mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel (Aquatex) eingedeckt.

2.2.2.2 Primäre Antikörper

Folgende Antikörper kommen zum Einsatz:

Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40

DCS/Signet

Clone: D2-40

Cat No.: 730-01

Verdünnung: 1:50

Das monoklonale Maus-Anti-D2-40 reagiert mit einem O-Sialoglykoprotein (M2A-Protein; 40kDa), das sich in fetalen Hoden, testikulären Keimzelltumoren und lymphatischen Endothelzellen nachweisen lässt. Zudem dient es dem Nachweis von humanem Podoplanin, weshalb es zur spezifischen immunhistochemischen Diagnostik lymphatischer Endothelien eingesetzt werden kann (Kahn und Marks, 2002; Schacht et al., 2004).

Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 Class II

DAKO Cytomation

Clone: QBEnd-10

Code: M 7165

Verdünnung: 1:100

Bei CD34 handelt es sich um ein einkettiges Transmembranprotein mit circa 116 kDa. Es wird auf unreifen hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen, embryonalen Fibroblasten, kapillaren Endothelzellen in Blut- und Lymphgefäßen sowie vereinzelt Gliazellen des Nervengewebes exprimiert (Krause et al., 1996; Nishio et al., 1997).

2.2.2.3 Ermittlung des Hormonrezeptorstatus von Östrogen und Progesteron

Bezüglich des Hormonrezeptorstatus von Östrogen und Progesteron erfolgt die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte nach den Richtlinien von Remmele und Stegner (1987). Der genannte Immunreaktive Score (IRS) stellt das Produkt der beiden Parameter Färbeintensität (SI) und dem Prozentsatz positiver Kerne (PP) dar.

| Prozentsatz positiver Kerne | PP | Färbeintensität | SI |
|-----------------------------|----|---------------------|----|
| 0% | 0 | Keine Färbung | 0 |
| < 10% | 1 | Schwache Intensität | 1 |
| 10-50% | 2 | Mäßige Intensität | 2 |
| 51-80% | 3 | Starke Intensität | 3 |
| > 80% | 4 | | |
| IRS=PPxSI | | | |

Tabelle 2: Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS)

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ergibt sich durch die Multiplikation von SI und PP ein Maximalwert des IRS von 12. In der vorliegenden Studie gelten Karzinome ab einem IRS von 1 für ER oder PR als hormonrezeptorpositiv.

2.2.2.4 Bestimmung der Überexpression des HER2/neu-Onkoproteins

Der HER2/neu-Status wird immunhistochemisch durch den HercepTest der Firma DAKO nachgewiesen. Das Färbeergebnis wird als vierstufiger DAKO-Score von 0 bis 3+ angegeben, der sich auf mindestens 10% der Tumorzellen bezieht. Dabei gelten Werte von 0 und 1+ als negativ, ein DAKO-Score von 3+ als positiv.

Bei einem Scorewert von 2+ erfolgt zusätzlich der Nachweis des Grades der HER2/neu-Genamplifikation mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

2.3 Histologische Beurteilung und Arbeitsgänge

1. Arbeitsgang

Im Zuge der Routinediagnostik erfolgt die Befundung der Präparate durch erfahrene Pathologen des Universitätsklinikums Bonn. Neben der histomorphologischen Einteilung der Brusttumore erfolgt die Beurteilung hinsichtlich einer Lymphangioinvasion sowie des Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptorstatus.

2. Arbeitsgang

Aus den vorliegenden Routinepräparaten werden jeweils ein bis zwei repräsentative Schnitte zur weiteren immunhistochemischen Diagnostik ausgewählt. Dabei wird auf die genaue Erfassung des Tumors, sowie eines adäquaten Tumorrandbereiches geachtet, der der weiteren Untersuchung zugrunde liegt.

3. Arbeitsgang

Die mit den Markern D2-40 und CD34 immunhistochemisch gefärbten Schnitte werden auf das Vorliegen einer Lymphangioinvasion untersucht und mit den ursprünglichen Diagnosen, basierend auf der Routine-HE-Färbung, korreliert.

Die Erfassung der identischen Gefäßsituation in den drei fortlaufend angefertigten Gewebsschnitten (HE, D2-40 und CD34) wird unter Berücksichtigung des physiologischen Lymphgefäßlumens von bis zu 100 µm und der gewählten Schnittdicke von 3 µm gewährleistet (Siegenthaler et al., 2006). Sämtliche Ergebnisse werden von einer erfahrenen Pathologin überprüft.

4. Arbeitsgang

In den Fällen, die nach der Korrelation im dritten Arbeitsgang Unterschiede hinsichtlich der Feststellung einer Lymphangioinvasion aufweisen (HE-LVI positiv versus CD34/D2-40 LVI negativ) erfolgt die Entfärbung des primären HE-Schnittes und anschließend die spezifische Färbung mit D2-40. Hierdurch wird die direkte Überprüfung der ursprünglichen Diagnose ermöglicht.

5. Arbeitsgang

Analog zum vierten Arbeitsgang findet eine Überprüfung der Karzinome statt, bei denen ursprünglich keine Lymphangioinvasion im HE-Schnitt diagnostiziert wurde, immunhistochemisch jedoch CD34 und/oder D2-40 eine LVI nachweisen konnten. Hierzu wird das Areal der im D2-40- bzw. CD34-gefärbten Schnitt detektierten Lymphangioinvasion auf den primären HE-Schnitt projiziert und dieser Bereich erneut hinsichtlich einer LVI untersucht.

2.4 Statistik

Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mittels SPSS 14.0 und SAS V9.1 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn.

Die statistische Untersuchung bezüglich einer Korrelation zwischen D2-40-positiver LVI und den histopathologischen Charakteristika (histologischer Subtyp, Grading, Tumorgroße, Nodalstatus, Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptorstatus) sowie den patientenbezogenen Daten (Alter <40 Jahre, Menopausenstatus) erfolgte mittels Fisher Exact Test und dem Chi-Quadrat-Test. Dabei wird das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Mit Hilfe einer logistischen Regression wurde eine multivariate Überprüfung der univariat signifikanten Parameter zur Vorhersage des Nodalstatus (Alter <40 Jahre, Grading, Tumorgroße, D2-40 LVI positiv und HE-LVI positiv) durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob die Kombination einzelner, von einander unabhängiger Parameter, einen Zugewinn an Treffsicherheit erreicht.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Patientenkollektivs

3.1.1 Alter der Patientinnen

Zur Bestimmung des Patientenalters wurden die zum Zeitpunkt der Diagnose vollendeten Lebensjahre berücksichtigt. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs beträgt 56.3 Jahre (Median 57 Jahre). Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 28 Jahre, die älteste 85 Jahre alt.

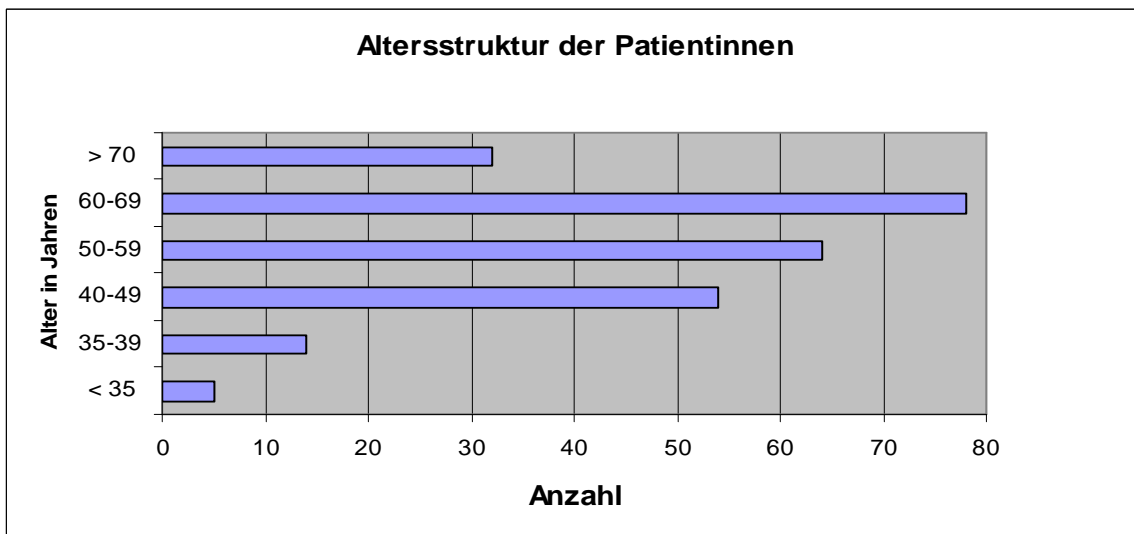


Abbildung 8: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (n=247)

3.1.2 Menopausenstatus

Von den 247 untersuchten Patientinnen wurden in der der Studie zugrunde liegenden Aktdokumentation zum Zeitpunkt der Diagnose 80 (32.4%) als prämenopausal und 167 (67.6%) als postmenopausal eingestuft (Abbildung 9).

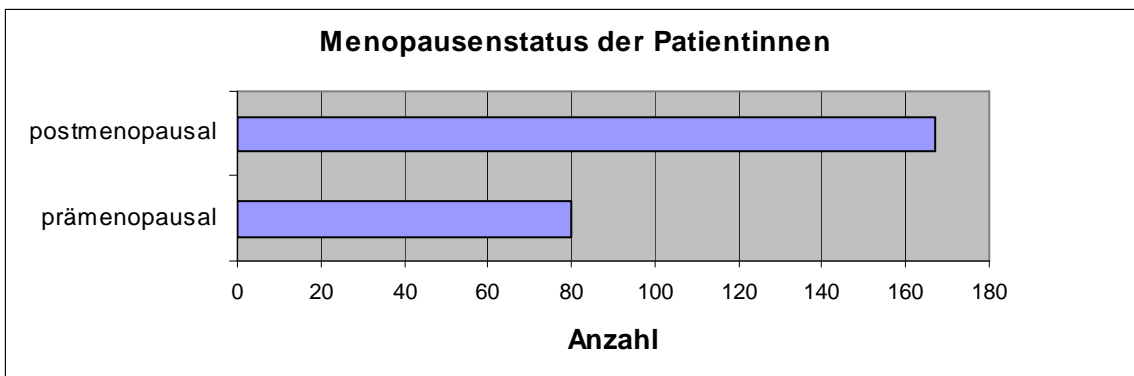


Abbildung 9: Menopausenstatus der Patientinnen (n=247)

3.1.3 Histopathologische Charakteristika

In Tabelle 3 sind die Tumoreigenschaften der 254 Mammakarzinome hinsichtlich Tumorgröße, Nodalstatus, histologischem Subtyp und Grading aufgeführt.

| Tumorgröße | Anzahl | Prozent |
|------------------------------|---------------|----------------|
| pT1a | 12 | 4.7% |
| pT1b | 43 | 16.9% |
| pT1c | 104 | 40.9% |
| pT2 | 66 | 26.0% |
| pT3 | 12 | 4.7% |
| pT4a | 2 | 0.8% |
| pT4b | 11 | 4.3% |
| pT4c | 1 | 0.4% |
| pT4d | 3 | 1.2% |
| Nodalstatus* | | |
| pNx | 27 | 10.6% |
| pN0 | 134 | 52.8% |
| pN1mic | 7 | 2.8% |
| pN1 | 50 | 19.7% |
| pN2 | 20 | 7.9% |
| pN3 | 16 | 6.3% |
| Histologischer Subtyp | | |
| invasiv-duktral | 157 | 61.8% |
| invasiv-lobulär | 58 | 22.8% |
| invasiv duktulo-lobulär | 27 | 10.6% |
| invasiv-tubulär | 4 | 1.6% |
| invasiv tubulo-lobulär | 2 | 0.8% |
| invasiv-muzinös | 2 | 0.8% |
| invasiv-medullär | 2 | 0.8% |
| invasiv-papillär | 2 | 0.8% |
| Grading | | |
| G1 | 12 | 4.7% |
| G2 | 139 | 54.7% |
| G3 | 103 | 40.6% |

Tabelle 3: Histopathologische Charakteristika der 254 Mammakarzinome
 (*Der Nodalstatus bezieht sich auf die einzelnen Tumore der insgesamt 247 Patientinnen, von denen 7 ein bilaterales Mammakarzinom aufwiesen)

3.1.4 Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status

Der Rezeptorstatus für Östrogen, Progesteron und HER/2neu wurde für 254 Karzinome ermittelt (Tabelle 4).

| Ostrogenrezeptor | Anzahl | Prozent |
|----------------------------|---------------|----------------|
| negativ | 42 | 16.5% |
| positiv | 212 | 83.5% |
| Progesteronrezeptor | | |
| negativ | 64 | 25.2% |
| positiv | 190 | 74.8% |
| HER2/neu | | |
| negativ | 214 | 84.3% |
| positiv | 40 | 15.7% |

Tabelle 4: Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status der 254 Mammakarzinome

3.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

In 70 von 254 Fällen (27.6%) konnte eine Lymphangiominvasion mittels D2-40 erkannt werden (D2-40 LVI positiv). Der immunhistochemische Nachweis mittels CD34 (CD34 LVI positiv) gelang in 64 Fällen (25.2%). Sechs Tumore waren D2-40 LVI positiv, jedoch CD34 LVI negativ. Insgesamt konnte LVI in keinem Fall unter Anwendung von CD34 nachgewiesen werden, die mittels D2-40 nicht auch entdeckt wurde. In sämtlichen Negativkontrollen zeigte sich keine Farbreaktion der Lymphgefäße.

D2-40 und CD34 LVI positiv

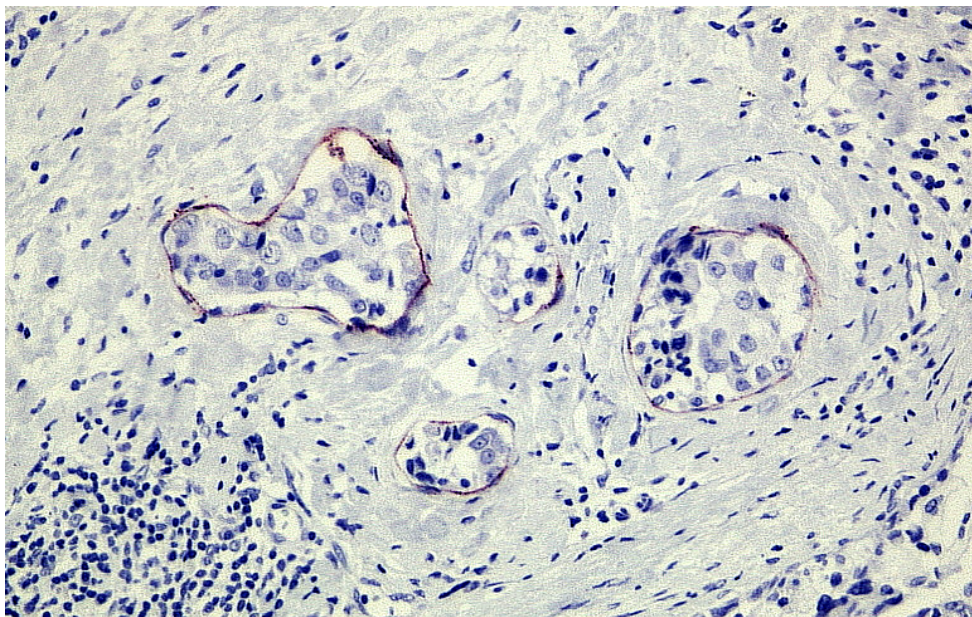


Abbildung 10: Lfd-Nr. 268, D2-40 LVI positiv, Vergrößerung: 100-fach

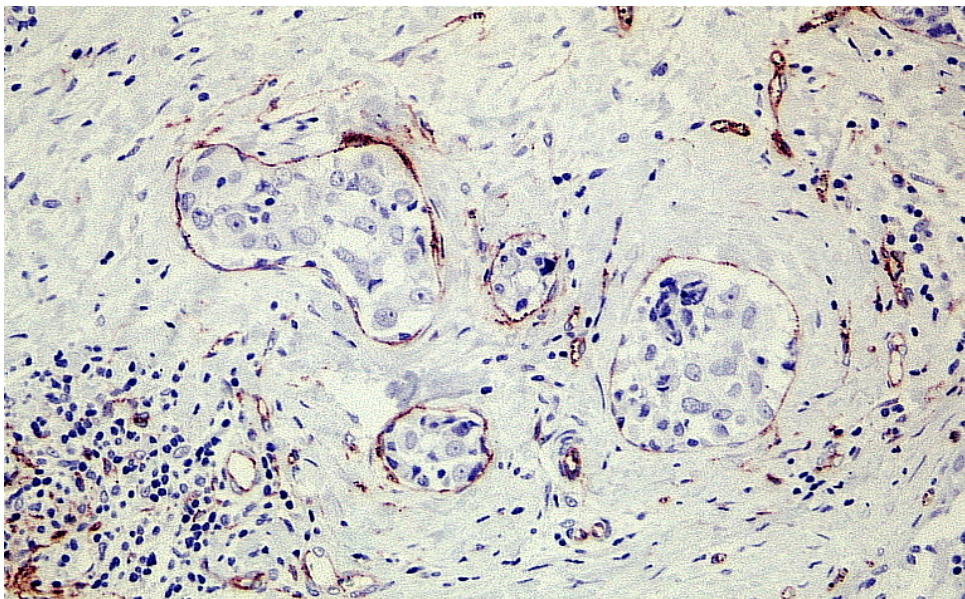


Abbildung 11: Lfd-Nr. 268, CD34 LVI positiv, Vergrößerung: 100-fach

D2-40 LVI positiv und CD34 LVI negativ

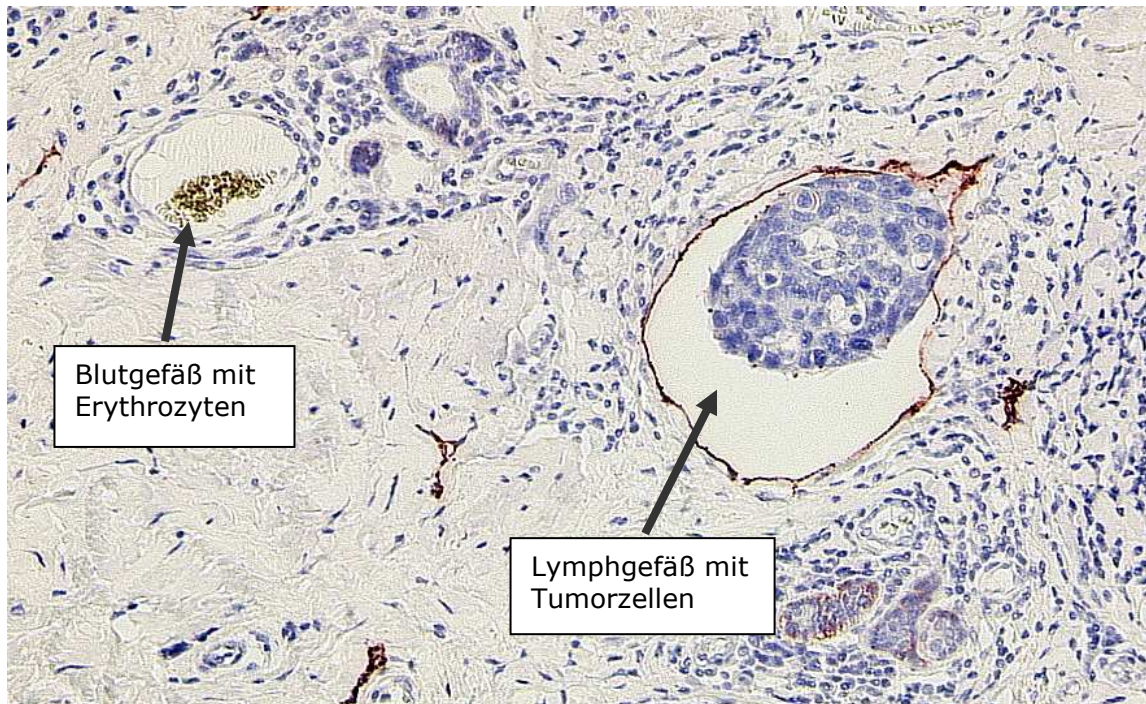


Abbildung 12: Lfd-Nr. 157, Lymphgefäß D2-40 LVI positiv, Blutgefäß D2-40 negativ;
Vergrößerung: 100-fach

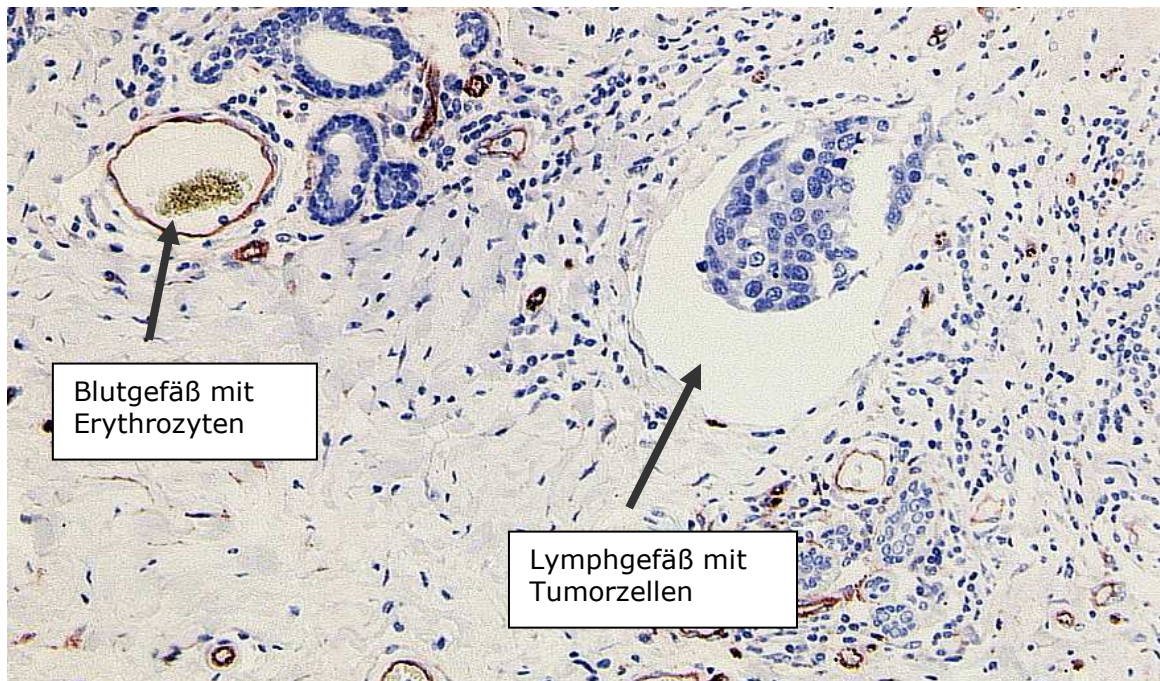


Abbildung 13: Lfd-Nr. 157, Lymphgefäß CD34 LVI negativ, Blutgefäß CD34 positiv;
Vergrößerung: 100-fach

3.3 Auswertung der routinediagnostischen HE-Färbung

In der Routinediagnostik wurde eine Lymphangiainvasion in 50 von 254 Karzinomen (19.7%) mittels Hämatoxylin-Eosin nachgewiesen (HE-LVI positiv). Von diesen 50 Karzinomen war eine LVI in der immunhistochemischen Färbung mittels D2-40 in insgesamt 40 Fällen (80%) nachvollziehbar.

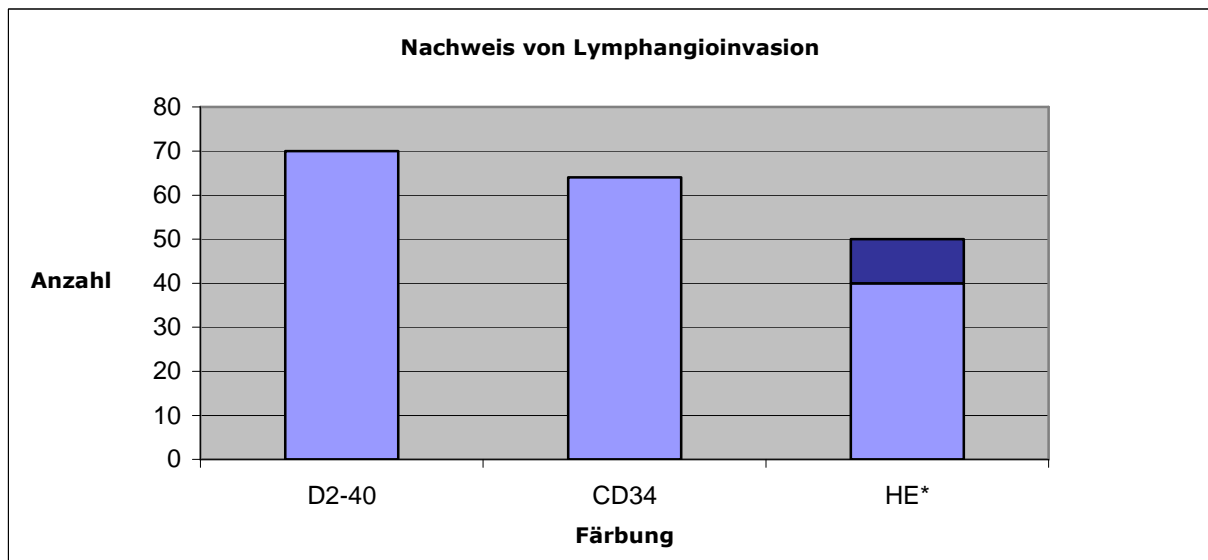


Abbildung 14: Nachweis von Lymphangiainvasion mittels D2-40, CD34 und HE (*Hiervon 10 Fälle falsch positiv)

Bei den restlichen 10 Karzinomen wurde die Diagnose einer LVI zwar auf Basis der HE-Diagnostik gestellt, konnte aber mittels D2-40 und/oder CD34 nicht bestätigt werden. Zur endgültigen Kontrolle wurden die 10 HE-Schnitte entfärbt und einer spezifischen Färbung mittels D2-40 unterzogen. In der direkten immunhistochemischen Zweitfärbung wurden ebenfalls in allen 10 Fällen keine lymphatischen Invasionen diagnostiziert. Nach nochmaliger Einschätzung durch den Pathologen wurden diese mit Tumorzellen gefüllten Spalträume als Fixierungsartefakte eingestuft. Insgesamt wurde eine Lymphangiainvasion mittels HE-Färbung in 4% (n=10) des Gesamtkollektives falsch positiv diagnostiziert. Des Weiteren war die routinediagnostische Aufarbeitung mittels Hämatoxylin-Eosin in 30 (42.9%) von 70 Fällen nicht in der Lage, eine auf Grundlage der immunhistochemischen Färbung nachgewiesenen LVI zu identifizieren. Bezogen auf die vorliegenden 254 Karzinome führte die routinediagnostische Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin somit in 11.8% (n=30) zu einem falsch negativen Ergebnis.

3.4 Korrelation von D2-40 positiver LVI und klinisch-pathologischen Faktoren

Für die folgenden Berechnungen werden im Falle von Patientinnen mit bilateralen Tumoren (n=7) beide Karzinome getrennt betrachtet. Dabei verhielten sich die beidseitigen Karzinome bei keiner Patientin im Bezug auf D2-40 LVI sowie bei der daraus resultierenden Korrelation mit den untersuchten Faktoren unterschiedlich:

3.4.1 Alter und Menopausenstatus

Bei der Korrelation von D2-40 positiver LVI und dem Lebensalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zeigte sich in der univariaten Analyse ein signifikanter Zusammenhang ($p=0.049$) zwischen Lymphangiainvasion und einem Patientenalter von weniger als 40 Jahren. Die Korrelation von Menopausenstatus und D2-40 positiver LVI war hingegen nicht signifikant.

| | D2-40 LVI | | Anzahl (n=247) | p-Wert | |
|------------------|----------------|----------|-------------------|------------------|-------|
| | positiv | negativ | | | |
| Alter (Jahre) | < 40 | 9 (47%) | 10 (53%) | 19 ^a | 0.049 |
| | ≥ 40 | 60 (26%) | 168 (74%) | 228 ^b | |
| Menopausenstatus | prämenopausal | 24 (30%) | 56 (70%) | 80 ^c | n.s. |
| | postmenopausal | 45 (27%) | 122 (73%) | 167 ^d | |

Tabelle 5: Korrelation von D2-40 mit Alter und Menopausenstatus
(^a davon 1 bilaterales Karzinom, ^b davon 6 bilaterale Karzinome,
^c davon 4 bilaterale Karzinome, ^d davon 3 bilaterale Karzinome)

3.4.2 Tumorbezogene Faktoren

Histologischer Subtyp

Die Angaben zum histologischen Subtyp der 254 Mammakarzinome sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es war keine signifikante Korrelation von histologischem Subtyp und Lymphangiainvasion nachweisbar (Tabelle 6).

Tumorgröße

Die Verteilung der Tumorgröße ist Tabelle 3 zu entnehmen. D2-40- LVI positiv korrelierte in der univariaten Analyse signifikant mit der Tumorgröße ($p<0.001$). Mit zunehmendem Tumordurchmesser steigt dabei der Anteil D2-40 positiver LVI an (Tabelle 6).

Grading

Die Beurteilung des Malignitätsgrades der 254 Karzinome ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Schlecht differenzierte Karzinome wiesen in 44% eine signifikant ($p < 0,001$) höhere Rate an D2-40 positiver LVI auf als mäßig oder gut differenzierte Karzinome mit 16% und 25% (Tabelle 6).

| | D2-40 LVI | | Anzahl (n=254) | p-Wert |
|------------------------------|-----------|-----------|-------------------|--------|
| | positiv | negativ | | |
| Histologischer Subtyp | | | | |
| invasiv-duktal | 44 (28%) | 113 (72%) | 157 | n.s. |
| invasiv-lobulär | 14 (24%) | 44 (76%) | 58 | |
| invasiv duktulo-lobulär | 10 (33%) | 17 (67%) | 27 | |
| invasiv-tubulär | 0 (0%) | 4 (100%) | 4 | |
| invasiv tubulo-lobulär | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 | |
| invasiv-muzinös | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 | |
| invasiv-medullär | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 | |
| invasiv-papillär | 0 (0%) | 2 (100%) | 2 | |
| Tumorgroße | | | | |
| T1 | 28 (18%) | 131 (82%) | 159 | <0.001 |
| T2 | 24 (36%) | 42 (64%) | 66 | |
| T3 | 8 (67%) | 4 (33%) | 12 | |
| T4 | 10 (59%) | 7 (41%) | 17 | |
| Grading | | | | |
| G1 | 3 (25%) | 9 (75%) | 12 | <0.001 |
| G2 | 22 (16%) | 117(84%) | 139 | |
| G3 | 45 (44%) | 58(56%) | 103 | |

Tabelle 6: Korrelation von D2-40 LVI und histopathologischen Charakteristika

3.4.3 Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem Nodalstatus

Zu 227 Tumoren von insgesamt 225 Patientinnen lagen Informationen bezüglich des Nodalstatus vor. In zwei Fällen erfolgte bei bilateralem Mammakarzinom die operative Exploration beider Axillae. Die Verteilung der unterschiedlichen Stadien des axillären Lymphknotenbefalls ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Zwischen D2-40 LVI positiv und dem axillären Nodalstatus zeigte sich in der univariaten Analyse ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p < 0.001$). Während bei Patientinnen mit negativem Nodalstatus in nur 15% eine D2-40 positive LVI vorlag, gelang der Nachweis von lymphatischen Invasionen mittels D2-40 bei Patientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten (N1a) in 34% sowie bei Patientinnen mit 4-9 befallenen Lymphknoten (N2a) in 60% der Karzinome. Bei Patientinnen mit mehr als 9 befallenen Lymphknoten (N3a) konnte bei 69% der Mammakarzinome eine Lymphgefäßinvasion mittels D2-40 nachgewiesen werden.

| | D2-40 LVI | | Anzahl (n=227*) | p-Wert |
|--------------------|------------------|-----------|----------------------------|---------------|
| | positiv | negativ | | |
| Nodalstatus | | | | |
| N0 | 20 (15%) | 114 (85%) | 134 | <0.001 |
| N1mic | 4 (57%) | 3 (43%) | 7 | |
| N1a | 17 (34%) | 33 (66%) | 50 | |
| N2a | 12 (60%) | 8 (40%) | 20 | |
| N3a | 11 (69%) | 5 (31%) | 16 | |

Tabelle 7: Korrelation von D2-40 positiver LVI und dem Nodalstatus
(*227 Tumore von 225 Patientinnen; in 2 Fällen liegt ein bilaterales
Mammakarzinom vor)

3.4.4 Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem Hormonrezeptor- sowie dem HER2/neu-Status

Der Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu-Rezeptorstatus für alle 254 Karzinome ist in Tabelle 4 aufgeführt. In 28 Fällen (11%) lag ein so genanntes „triple-negatives“ Karzinom vor, bei denen alle drei Rezeptoren negativ waren.

Wie in Tabelle 8 aufgeführt, bestand eine signifikante Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem Östrogen- ($p=0.015$) sowie dem Progesteronrezeptorstatus ($p=0.002$). Die Korrelation von Her2/neu-Status und D2-40 LVI positiv lag geringfügig unterhalb des Signifikanzniveaus ($p=0.055$). Zwischen D2-40 LVI positiv und der Subgruppe der „triple-negativen“ Karzinome zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0.022$).

| | D2-40 LVI | | Anzahl (n=254) | p-Wert |
|-------------------------|------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|
| | positiv | negativ | | |
| ER | | | | |
| positiv | 52 (24.5%) | 160 (75.5%) | 212 | 0.015 |
| negativ | 18 (43%) | 24 (57%) | 42 | |
| PR | | | | |
| positiv | 42 (22%) | 148 (78%) | 190 | 0.002 |
| negativ | 27 (42%) | 37 (58%) | 64 | |
| HER2/neu | | | | |
| positiv | 16 (40%) | 24 (60%) | 40 | n.s. ($p=0.055$) |
| negativ | 54 (25%) | 160 (75%) | 214 | |
| Triple-negative* | | | | |
| ja | 12 (43%) | 16 (57%) | 28 | 0.022 |
| nein | 52 (23%) | 174 (77%) | 226 | |

Tabelle 8: Korrelation von D2-40 positiver LVI und Hormon- sowie HER2/neu-Rezeptorstatus (*Triple-negativ: ER, PR und HER2/neu negativ)

3.5 Multivariate Analyse zur Prädiktion des axillären Nodalstatus

3.5.1 Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren

Die Korrelation klinischer sowie histopathologischer Charakteristika mit dem Nodalstatus wurde univariat überprüft. Wie in Tabelle 9 aufgeführt, erwiesen sich die Faktoren Alter ($p=0.021$), Tumorgröße ($p<0.001$), Grading ($p<0.001$), HE-LVI positiv ($p<0.001$) und D2-40 LVI positiv ($p<0.001$) als statistisch signifikant. Ein signifikanter Zusammenhang für den histologischen Subtyp, Menopausen-, Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und Her2/neu-Status konnte nicht nachgewiesen werden.

Alle univariat signifikanten Parameter (Alter, Tumorgröße, Grading, HE-LVI positiv, D2-40 LVI positiv) wurden mittels logistischer Regression einer multivariaten Analyse unterzogen. Dabei waren lediglich die Faktoren Grading ($p=0.0352$; Odds Ratio: 1.953), Tumorgröße ($p=0.0003$; Odds Ratio: 3.167) und D2-40 LVI positiv ($p=0.0003$) signifikant, wobei D2-40 LVI positiv mit 3.489 die höchste Odds Ratio aufwies. Die Faktoren Alter und HE-LVI positiv zeigten sich in der multivariaten Analyse als nicht signifikant (Tabelle 9).

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=227) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Alter (Jahre) | | | | | |
| < 40 | 6 (33%) | 12 (77%) | 18 | 0.021 | n.s. |
| ≥ 40 | 128 (61%) | 81 (39%) | 209 | | |
| Menopausenstatus | | | | | |
| prämenopausal | 42 (54%) | 36 (46%) | 78 | n.s. | n.s. |
| postmenopausal | 92 (62%) | 57 (38%) | 149 | | |
| Tumorgröße | | | | | |
| ≤ 2cm | 102 (73%) | 38 (27%) | 140 | < 0.001 | 0.0003 Odds Ratio: 3.167 |
| > 2cm | 32 (8%) | 55 (92%) | 87 | | |
| Histologischer Subtyp | | | | | |
| invasiv-duktales | 82 (58%) | 60 (42%) | 142 | n.s. | n.s. |
| andere | 51 (60%) | 34 (40%) | 85 | | |
| Grading | | | | | |
| 1 | 7 (78%) | 2 (22%) | 9 | < 0.001 | n.s. |
| 2 | 88 (70%) | 37 (30%) | 125 | | |
| 3 | 39 (42%) | 54 (58%) | 93 | | |
| Grading | | | | | |
| 1+2 | 95(71%) | 39 (29%) | 134 | < 0.001 | 0.0352 Odds Ratio: 1.953 |
| 3 | 39(42%) | 54 (58%) | 93 | | |
| Hormonrezeptor* | | | | | |
| negativ | 21 (64%) | 12 (36%) | 33 | n.s. | n.s. |
| positiv | 113 (58%) | 81(42%) | 194 | | |
| Triple-negativ | | | | | |
| nein | 120 (59%) | 82 (41%) | 202 | n.s. | n.s. |
| ja | 14 (56%) | 11 (44%) | 25 | | |
| HER2/neu | | | | | |
| negativ | 22 (59.5%) | 15 (40.5%) | 37 | n.s. | n.s. |
| positiv | 112 (59%) | 78 (41%) | 190 | | |
| HE-LVI | | | | | |
| negativ | 122 (67%) | 61(33%) | 183 | < 0.001 | n.s. |
| positiv | 12 (27%) | 32 (73%) | 44 | | |
| D2-40-LVI | | | | | |
| negativ | 114 (70%) | 49 (30%) | 163 | < 0.001 | 0.0003 Odds Ratio: 3.489 |
| positiv | 20 (31%) | 44 (69%) | 64 | | |

Tabelle 9: Multivariate Analyse: Korrelation von patientenbezogenen und histopathologischen Faktoren mit dem Nodalstatus
(*Als Hormonrezeptor positiv wurden Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor positive Tumoren gewertet)

3.5.2 Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren bei Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1)

In der Subgruppe von 140 Patientinnen mit T1-Karzinomen ($\leq 2\text{cm}$) waren nur die Parameter Grading ($p=0.037$) und D2-40 LVI positiv ($p<0.001$) univariat signifikant (Tabelle 10). In der multivariaten Analyse war nur der Faktor D2-40 LVI positiv für die Vorhersage des Nodalstatus bei kleinen Tumoren signifikant ($p=0.0003$; Odds Ratio: 5.395).

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=140) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Grading | | | | | |
| 1+2 | 78(78%) | 22 (22%) | 100 | 0.037 | n.s. |
| 3 | 24(60%) | 16 (40%) | 40 | | |
| D2-40 LVI | | | | | |
| negativ | 91 (80%) | 23 (20%) | 114 | < 0.001 | 0.0003 Odds Ratio: 5.395 |
| positiv | 11 (42%) | 15 (58%) | 26 | | |

Tabelle 10: Multivariate Analyse: Korrelation der univariat signifikanten Parameter Grading und D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei Patientinnen mit Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1)

3.5.3 Korrelation von Nodalstatus und klinischen sowie histopathologischen Faktoren bei Tumoren $\leq 5\text{cm}$ (pT1/2)

Für die 202 Patientinnen mit T1/2-Tumoren ($\leq 5\text{cm}$) zeigten die Parameter Grading ($p<0.001$) und D2-40 LVI positiv ($p<0.001$) als einzige aller überprüften Faktoren in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation mit dem Nodalstatus (Tabelle 11). Beide Faktoren zeigten sich auch in der multivariaten Analyse unabhängig voneinander als signifikant, wobei sich auch hier die D2-40 positive LVI als der Parameter mit dem stärkeren Gewicht darstellte: D2-40 LVI positiv ($p<0.001$; Odds Ratio: 3.513) und Grading ($p<0.0192$; Odds Ratio: 2.143).

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=202) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Grading | | | | | |
| 1+2 | 94(75%) | 32 (25%) | 126 | < 0.001 | 0.0192 Odds Ratio: 2.143 |
| 3 | 38(50%) | 38 (50%) | 76 | | |
| D2-40 LVI | | | | | |
| negativ | 113 (74%) | 40 (26%) | 153 | < 0.001 | < 0.001 Odds Ratio: 3.513 |
| positiv | 19 (39%) | 30 (61%) | 49 | | |

Tabelle 11: Multivariate Analyse: Korrelation der univariat signifikanten Parameter Grading und D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei Patientinnen mit Tumoren $\leq 5\text{cm}$ (pT1+pT2)

3.5.4 Prädiktion des Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre)

Hinsichtlich des Nodalstatus lagen Informationen zu 26 (81.2%) von 32 Patientinnen vor, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose das 70. Lebensjahr bereits erreicht hatten. Bei 6 Patientinnen (18.8%) wurde aufgrund des hohen Alters (74-85 Jahre) und einhergehender Komorbidität auf die Durchführung einer SLND bzw. ALND verzichtet. Bei 13 Patientinnen (50%) lag ein positiver Nodalstatus vor. Der D2-40-gestützte Nachweis einer Lymphangiainvasion gelang jedoch nur in 4 (30.8%) dieser 13 Fälle. In einem weiteren Fall (7.7%) wurde bei negativem Nodalstatus die Diagnose D2-40 LVI positiv gestellt (Tabelle 12). Innerhalb der Gruppe älterer Patientinnen (>69 Jahre) konnte somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen D2-40 LVI positiv und axillärem Lymphknotenstatus hergestellt werden.

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=26) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| D2-40 LVI | | | | | |
| negativ | 12 (57%) | 9 (43%) | 21 | n.s. | n.s. |
| positiv | 1 (20%) | 4 (80%) | 5 | | |

Tabelle 12: Multivariate Analyse: Korrelation des univariat signifikanten Parameters D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre)

3.5.5 Korrelation von Nodalstatus und D2-40 LVI bei älteren Patientinnen mit Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1)

Führte man eine weitere Differenzierung der älteren Patientinnen (>69 Jahre) durch und betrachtete lediglich die Fälle mit Karzinomen $\leq 2\text{cm}$ (pT1), so lagen in 11 (42.3%) der 26 Fälle Angaben zum Nodalstatus vor.

In dieser Subgruppe lag bei 3 Patientinnen (27.3%) ein positiver Nodalstatus vor, wobei lediglich in einem Fall (33.3%) D2-40 LVI positiv war. Auch die weitere Differenzierung innerhalb der Gruppe älterer Patientinnen (>69 Jahre) in solche mit Karzinomen $\leq 2\text{cm}$ (pT1) führte somit zu keiner signifikanten Korrelation von D2-40 LVI positiv und axillärem Lymphknotenstatus.

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=11) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| D2-40 LVI | | | | | |
| negativ | 8 (80%) | 2 (20%) | 10 | n.s. | n.s. |
| positiv | 0 (0%) | 1 (100%) | 1 | | |

Tabelle 13: Multivariate Analyse: Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre) mit Karzinomen $\leq 2\text{cm}$ (pT1)

3.5.6 Korrelation von Nodalstatus und D2-40 LVI bei jungen Patientinnen (<40 Jahre)

Bei 19 Patientinnen trat das Mammakarzinom bereits vor Vollendung des 40. Lebensjahres auf. Angaben zum Nodalstatus lagen in 18 Fällen (94.7%) vor.

Ein metastatischer Befall der axillären Lymphknoten wurde bei 12 Patientinnen (66.7%) diagnostiziert. Es lag in nur 5 (41.7%) dieser 12 Fälle eine D2-40 positive LVI vor. Zudem wurde die Diagnose D2-40 LVI positiv bei 4 (66.7%) der 6 nodalnegativen Patientinnen gestellt. Somit konnte innerhalb der Gruppe junger Patientinnen (<40 Jahre) kein signifikanter Zusammenhang zwischen D2-40 LVI positiv und axillärem Lymphknotenstatus hergestellt werden.

| | Nodal negativ | Nodal positiv | Anzahl (n=18) | Univariater p-Wert | Multivariater p-Wert |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| D2-40 LVI | | | | | |
| negativ | 2 (22%) | 7 (78%) | 9 | n.s. | n.s. |
| positiv | 4 (44%) | 5 (56%) | 9 | | |

Tabelle 14: Multivariate Analyse: Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem Nodalstatus bei jungen Patientinnen (<40 Jahre)

3.6 Indikation zur Postmastektomie-Bestrahlung

Vor dem Hintergrund der in Kapitel 1.1.4.1 angeführten Leitlinie der DEGRO wurde innerhalb des vorliegenden Kollektivs untersucht, in wie vielen Fällen durch die mit Hilfe von D2-40 zusätzlich gestellte Diagnose einer Lymphangiosis carcinomatosa (L1) retrospektiv die Indikation zur Postmastektomie-Bestrahlung bestanden hätte.

Bei insgesamt 35 der 227 Patientinnen (15.4%) wurde eine primäre oder sekundäre Mastektomie ohne anschließende Bestrahlung der Thoraxwand durchgeführt.

Mittels D2-40 konnte in insgesamt 6 Fällen (17%) zusätzlich eine LVI nachgewiesen werden. In zwei Fällen hätte die zusätzlich entdeckte LVI retrospektiv zu keiner Änderung des Prozederes geführt, da kein weiterer Co-Faktor für die Indikation einer Postmastektomie-Bestrahlung vorlag.

In einem Fall lag zusätzlich zur D2-40 positiven LVI ein Alter unter 35 Jahren vor, in 3 weiteren Fällen der Befall von 1-3 axillären Lymphknoten. Somit hätte retrospektiv in 2% (n=4) aller Fälle auf Grundlage der DEGRO-Leitlinien eine Postmastektomie-Bestrahlung durchgeführt werden müssen.

4 Diskussion

Im Jahr 2002 beschrieben Kahn et al. erstmals den Einsatz von D2-40, einem monoklonalen Antikörper zum histopathologischen Nachweis lymphatischer Endothelien, bei Kaposisarkomen und einer Untergruppe von Angiosarkomen (Kahn et al., 2002). Seither wurde D2-40 in mehreren Studien zum spezifischen Nachweis von Lymphgefäßen bei verschiedenen Tumorentitäten untersucht.

Gombos et al. nutzten D2-40 zur Untersuchung von intratumoralen und peritumoralen Lymphgefäßen beim Zervixkarzinom. Dabei wiesen sie bei hoher peritumoraler Lymphgefäßdichte und gleichzeitig starker Expression von VEGF-C im peritumoralen Gewebe auf dessen lymphangiogenetische Funktion in der Tumorperipherie hin. Des Weiteren beschrieben sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen LVI, peripherer Lymphgefäßdichte und dem Gesamtüberleben der Patientinnen (Gombos et al., 2005). Im gleichen Jahr wurde D2-40 von Fukunaga zur Untersuchung der lymphatischen Differenzierung von Gefäßtumoren eingesetzt. Dabei machte diese Forschergruppe auf den potentiellen Einsatz von D2-40 für die pathologische Diagnostik von Lymphangi Invasionen bei Tumorerkrankungen aufmerksam (Fukunaga, 2005). Walgenbach-Brünagel et al. nutzen D2-40 zur Beurteilung von lymphatischen Invasionen beim Kolonkarzinom und konnten einen signifikanten Zuwachs der Detektionsrate im Vergleich zur routinediagnostischen HE-Färbung erzielen (Walgenbach-Brünagel et al., 2006). Parallel zu den hier genannten Untersuchungen wurde der mögliche Einsatz von D2-40 beim Mammakarzinom in verschiedenen Studien erprobt. Im Jahr 2005 untersuchten Choi et al. das lymphangiogenetische Potential verschiedener VEGF-Klassen beim Mammakarzinom und konnten eine signifikante Korrelation von Lymphgefäßdichte und VEGF-C sowie VEGF-D nachweisen (Choi et al., 2005). Im gleichen Jahr nutzten Van der Auwera et al. D2-40 in einer Doppelfärbung mit Ki-67 bei inflammatorischen und nichtinflammatorischen Mammakarzinomen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die signifikant höhere Proliferationsrate des lymphatischen Endothels bei inflammatorischen Karzinomen wahrscheinlich die höhere Rate der lymphatischen Metastasierung bedingt (Van der Auwera et al., 2005). Jüngere Studien betrachteten neben der Gefäßdichte auch das Vorhandensein von Lymphangi Invasionen, wobei auf deren Bedeutung für die Prädiktion von Lymphknotenmetastasen hingewiesen wurde (Van den Eynden et al., 2006). Arnaout-Alkarain et al. sowie Tezuka et al. wiesen durch die Korrelation histopathologischer und patientenbezogener Daten mit dem Faktor LVI ebenfalls auf dessen prognostische Bedeutung beim Mammakarzinom hin (Arnaout-Alkarain et al., 2007; Tezuka et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung von D2-40 für den Nachweis von Lymphangi Invasionen bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom untersucht

werden. Dabei war insbesondere die Möglichkeit der Prädiktion von axillären Lymphknotenmetastasen Gegenstand der Analyse.

Am vorliegenden Kollektiv gelang der immunhistochemische Nachweis einer Lymphangiainvasion mittels D2-40 bei 70 der 254 Karzinome (28%). Verglichen mit einer Detektionsrate von 16% (n=40) unter Verwendung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt dies einen signifikanten Zuwachs von 43% im Vergleich zur Routinemethode dar. Umgekehrt war die routinediagnostische Aufarbeitung mittels Hämatoxylin-Eosin in 30 von 70 Fällen (43%) nicht in der Lage, eine bestehende LVI zu identifizieren. Bezogen auf das Gesamtkollektiv war die routinediagnostische HE-Färbung somit in 12% falsch negativ. Kahn und Marks wiesen ebenfalls auf eine hohe Rate falsch negativer Ergebnisse bei der Befundung von HE-Schnitten hinsichtlich des Vorliegens lymphatischer Invasionen hin. Bei der Auswertung von 50 Karzinomen beschrieben sie den Anteil falsch negativer Diagnosen auf 18% (Kahn und Marks, 2002).

Tumorzellinvasionen in Blut- und Lymphgefäße stellen ein erhöhtes Risiko für ein Lokalrezidiv und ein verkürztes Gesamtüberleben dar (Fitzgibbons et al., 2000; Nime et al., 1977; Pinder et al., 1994). Aufgrund der zunehmenden Evidenz wurde das Vorhandensein lymphatischer und vaskulärer Invasionen daher im Jahr 2005 von der internationalen Brustkrebs-Konsensuskonferenz in Sankt Gallen den etablierten Prognosefaktoren hinzugefügt (Goldhirsch et al., 2005). Im Jahr 2007 wurde die Implementierung der Gefäßinvasion zwar bestätigt, doch dahingehend eingeschränkt, dass es sich um einen ausgedehnten Befund der Hämangiosis bzw. Lymphangiosis handeln müsse (Goldhirsch et al., 2007). Diese Einschränkung ist unter anderem auf diagnostische Schwierigkeiten bei der Differenzierung von Blut- oder Lymphgefäßinvasion zurückzuführen (Van den Eynden et al., 2006). Da man nach Pantel und Brakenhoff jedoch bei Blut- und Lymphgefäßinvasionen von verschiedenen Wegen der Metastasierung und somit von einer unterschiedlichen prognostischen Wertigkeit ausgehen muss, scheint eine korrekte Differenzierung zwischen lymphatischer und vaskulärer Invasion von essentieller Bedeutung (Pantel und Brakenhoff, 2004).

In den vergangenen Jahren wurden daher vielfältige Marker zum histopathologischen Nachweis vaskulärer und lymphatischer Endothelien entwickelt. Die Mehrzahl dieser Antikörper (CD31, CD34, Elastika-van-Gieson und Anti-Faktor-VIII, u.a.) war jedoch primär gegen Blutgefäße gerichtet, wohingegen eine Färbung von Lymphgefäßen lediglich schwach oder gar nicht erfolgte (Bettelheim et al., 1984b; Hanau et al., 1993; Saigo und Rosen, 1987). Dieser Nachweis gelang erst durch die neuerliche Entwicklung selektiver Marker gegen lymphatische Endothelzellen (VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1, Podoplanin, D2-40).

In der vorliegenden Studie konnte eine bestehende Lymphangiainvasion mittels CD34 in 64 von 70 Fällen (91%) nachgewiesen werden. Dieser Endothelmarker war jedoch in 6 Fällen (9%) nicht in der Lage, eine bestehende LVI zu identifizieren. Zudem gab es

keinen Fall, in dem CD34 eine zusätzliche lymphatische Invasion detektierte, die nicht bereits durch D2-40 entdeckt wurde. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass D2-40 beim Mammakarzinom über eine genügend hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von lymphatischer Tumorzellinvasion verfügt und zukünftig keiner Qualitätskontrolle durch eine Kombination mit weiteren Panendothelmarkern mehr bedarf.

Des Weiteren stellt die Differenzierung zwischen wahren Lymphgefäßeinbrüchen und dem Vorhandensein von Tumorzellen in artifiziellen Spalträumen eine diagnostische Herausforderung dar. Dabei bereiten vor allem fixationsbedingte Schrumpfungsvorgänge sowie deren subjektive Interpretation durch den Pathologen als Gefäßlumina besondere Schwierigkeiten. Andere Studiengruppen nutzten daher Antikörper der Klassen CD31, CD34, Anti-Faktor-VIII sowie einen ABH-Blutgruppenantikörper zur Unterscheidung zwischen echten Gefäßlumen und Retraktionsartefakten (Kato et al., 2003; Lee et al., 1986, 1990; Saigo und Rosen, 1987).

Im vorliegenden Kollektiv wurde auf Basis der HE-Diagnostik in 10 von 254 Karzinomen ein vorliegendes Artefakt fälschlicherweise als LVI beschrieben. Dies führte somit in der Routinediagnostik in 4% der Fälle zu einem falsch positiven L-Status. Auch Kahn und Marks bezifferten die Prävalenz bezüglich LVI falsch positiver HE-Schnitte in deren Studienkollektiv auf 4% (Kahn und Marks, 2002). In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass im vorliegenden Kollektiv bei 5 der 10 Patientinnen (50%) mit Retraktionsartefakten im HE-Schnitt auch ein metastatischer Befall der axillären Lymphknoten vorlag, wenngleich diese Korrelation nicht signifikant war ($p=0.370$). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen neuerer Studien überein, wonach derartige Retraktionsartefakte beim primären Mammakarzinom mit der axillären Metastasierung korrelieren (Acs et al., 2007; Irie et al., 2007). Zudem zeigen auch erste Untersuchungen beim Ösophaguskarzinom einen signifikanten Zusammenhang zwischen lymphogener Metastasierung und isolierten Tumorzellnestern in peritumoralen Spalträumen (Bujas et al., 2008). Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei Retraktionsartefakten nicht zwangsläufig um fixationsbedingte Erscheinungen handeln muss. Vielmehr könnte es sich hierbei um das morphologische Korrelat eines tumorvermittelten stromalen Umbauvorgangs handeln, der zur lymphatischen Invasion und Progression des Karzinoms führt. In Anbetracht der potentiellen Aggressivität dieser prälymphatischen Invasion ist dieses histopathologische Phänomen in weiteren Studien auf seine prädiktive und prognostische Aussagekraft hin zu überprüfen.

Mehrere Studien haben die Korrelation zwischen LVI und histopathologischen sowie klinischen Charakteristika beim Mammakarzinom untersucht. Arnaout-Alkarain et al. wiesen diesbezüglich auf den signifikanten Zusammenhang von D2-40 positiver LVI mit jungem Patientenalter ($p=0.0003$), großer Tumorgröße ($p=0.005$), hohem Grad der Differenzierung ($p=0.0001$) und Östrogenrezeptorstatus ($p=0.005$) hin. Der histologische

Subtyp ($p=0.06$) sowie der Progesteronrezeptorstatus ($p=0.09$) erreichten das Signifikanzniveau in dieser Studie allerdings nicht (Arnaout-Alkarain et al., 2007). Tezuka et al. konnten in einer analogen Studie ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen D2-40 positiver LVI und jungem Patientinnenalter ($p=0.037$) zeigen. Zusätzlich wurde von ihnen eine signifikante Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem Menopausen- ($p=0.001$) und Nodalstatus ($p=0.046$) nachgewiesen. Diese Studiengruppe beschrieb jedoch keinen signifikanten Zusammenhang von D2-40 positiver LVI mit der TumorgroÙe, dem Hormonrezeptorstatus und dem Grad der Differenzierung (Tezuka et al., 2007).

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen D2-40 positiver LVI und jungem Patientenalter, großem Primärtumor, positivem Nodalstatus, schlechter Differenzierung (G3) und negativem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen werden. Dabei bestand keine signifikante Korrelation zwischen D2-40 positiver LVI und dem histologischen Subtyp. Die Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem HER2/neu-Status zeigte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang, wobei hier ein Trend zur beobachten war ($p=0.055$), wonach bei HER2/neu positiven Tumoren der Anteil der D2-40 positiven LVI größer war als im HER2/neu negativem Kollektiv.

In der Subgruppe so genannter „triple-negativer“ Mammakarzinome (diese Karzinome weisen jeweils einen negativen Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Status auf) zeigte sich eine signifikante Korrelation mit einer D2-40 positiven LVI. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Dent et al. überein, die in einer Untersuchung ebenfalls auf die Prävalenz lymphatischer Invasionen bei „triple-negativen“ Karzinomen hinwiesen, wobei in deren Studie der Zusammenhang zwischen beiden Faktoren kein signifikantes Niveau erreichte (Dent et al., 2007).

Beim „triple-negativen“ Karzinomtyp handelt es sich um maligne Brusttumore, die sich durch eine besonders schlechte Prognose und Aggressivität auszeichnen (Haffty et al., 2006). Rakha et al. wiesen diesbezüglich auf ein schnelles Wachstum, eine schlechte Differenzierung sowie hohe Rezidiv- und Metastasenraten hin (Rakha et al., 2007). Zudem zeigen „triple-negative“ Karzinome signifikant höhere Mortalitätsraten (Santillan et al., 2008). Doch auch therapeutisch stellt diese Tumorentität eine Herausforderung dar, da sie weder einer endokrinen Therapie noch einer Antikörpertherapie mittels Trastuzumab zugänglich ist. Unsere Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass diese Tumorentität aufgrund bisher nicht bekannter Eigenschaften zu einer frühen Infiltration von LymphgefäÙen neigt, was möglicherweise zum Teil die schlechte Prognose dieser Tumoren begründet. Sollte sich dies in prospektiven Studien bestätigen lassen, bietet der Faktor Lymphangiogenese bei „triple-negativen“ Tumoren möglicherweise den Ansatz für eine gezielte Therapie. Ein therapeutischer Ansatz könnte womöglich im Einsatz von Medikamenten zur Inhibierung der Lymphangiogenese oder aber in einer routinemäßigen Postmastektomie-Bestrahlung der Thoraxwand bei „triple-negativen“ Mammakarzinomen

liegen. Betrachtet man diesbezüglich beispielsweise die vorliegenden Patientendaten, so erhielten 100 Patientinnen mit insgesamt 105 Karzinomen eine primäre und/oder sekundäre Ablatio. Bei 49 dieser Patientinnen (49%) mit 51 Tumoren erfolgte keine konsekutive Bestrahlung der Thoraxwand, hiervon waren jedoch 6 Patientinnen (12.2%) „triple-negativ“. Somit wäre bei 6% aller Patientinnen mit einer Ablatio eine zusätzliche Postmastektomie-Bestrahlung notwendig gewesen.

Bis heute gilt das Vorliegen axillärer Lymphknotenmetastasen (ALNM) als wichtigster prognostischer Faktor für das Mammakarzinom (Cody et al., 2004; Fisher et al., 1983; Karlsson et al., 2007; Russo et al., 1987). Allerdings geht die operative Exploration der Axilla mit einer zum Teil erheblichen postoperativen Morbidität für die Patientinnen einher. Abgesehen von Lymphödemen sind Serome, Hämatome, Wundheilungsstörungen und Abszesse in der Literatur beschrieben. Doch auch postoperative Schmerzen, Sensibilitäts- und Mobilitätsstörungen sowie die daraus resultierende psychische Belastung stellen eine signifikante Minderung der Lebensqualität vieler Patientinnen dar (Clodius, 2001; Maunsell et al., 1993).

Durch die Einführung der Sentinel-Lymphonodektomie (SLND) beim Mammakarzinom konnte die Morbidität bei geeigneten Patientinnen signifikant gesenkt werden (Giuliano et al., 1994; Krag et al., 1993). Allerdings lassen sich durch die SLND jedoch auch Komplikationen wie Serome, Hämatome, Abszesse, Nervenläsionen und Lymphödeme nicht vollständig vermeiden (Baron et al., 2007; Wilke et al., 2006). Aus diesem Grund ist die Identifizierung von Patientinnen mit einem niedrigen Risiko für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sinnvoll, da bei diesen auf jegliche operative Intervention in der Achselhöhle verzichtet werden könnte. Diesbezüglich wurden bereits in mehreren Studien klinische und histopathologische Faktoren auf ihre Eignung zur Prädiktion des Nodalstatus untersucht (Anan et al., 2000; Rivadeneira et al., 2000; Shoup et al., 1999). Dabei wurde den Faktoren Lymphangiainvasion, Tumorgröße, Grading und junges Patientenalter die größte klinische Relevanz zugesprochen. Shoup et al. wiesen in diesem Kontext besonders auf die deutliche Korrelation von LVI und Nodalstatus bei kleinen Karzinomen (pT1) hin (Shoup et al., 1999).

In einer multivariaten Analyse zeigten im vorliegenden Kollektiv die Faktoren D2-40 positive LVI, Tumorgröße und Grading eine signifikante Korrelation mit dem axillären Lymphknotenstatus. Dabei wurde D2-40 LVI positiv mit einer Odds Ratio von 3.489 ($p=0.0003$) als stärkster prädiktiver Parameter identifiziert. Des Weiteren zeigte D2-40 LVI positiv mit einer Odds Ratio von 5.395 ($p=0.0003$) in der Subgruppe aus 140 Patientinnen mit kleinen (pT1) Karzinomen als einziger Parameter eine signifikante Bedeutung für die Prädiktion von ALNM. In einer Studie zur Prädiktion des Nodalstatus bei Karzinomen mit einem Durchmesser von weniger als 10 mm von Rivadeneira et al. wurde dem Grad der Differenzierung und einem jungen Patientenalter eine signifikante

Bedeutung zugesprochen (Rivadeneira et al., 2000). Diese signifikante Bedeutung der Faktoren Alter und Grading konnte am vorliegenden Kollektiv nicht bestätigt werden.

Innerhalb des jeweiligen Kollektivs besonders junger (<40 Jahre) oder älterer (>69 Jahre) Patientinnen war D2-40 LVI positiv nicht in der Lage, Subgruppen mit besonderem Risiko für axilläre Lymphknotenmetastasen zu definieren. Bei 13 von 26 Patientinnen (50%), die das 69. Lebensjahr bereits vollendet hatten, lagen zwar ALNM vor, es zeigte sich jedoch, dass lediglich in 4 dieser 13 Fälle (31%) die Diagnose D2-40 LVI positiv gestellt wurde. Durch eine weitere Unterteilung dieser Patientinnengruppe in solche Patientinnen mit kleinen (pT1) Karzinomen konnte zudem gezeigt werden, dass trotz der Beurteilung als D2-40 LVI negativ 67% der Karzinome mit einem positiven Nodalstatus einhergingen. Bei den Patientinnen, die bereits vor dem 40. Lebensjahr erkrankten wurde ebenfalls bei negativem axillären Befund in 67% die Diagnose D2-40 LVI positiv gestellt.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass D2-40 einerseits einen starken Prädiktor für ALNM darstellt, andererseits nicht in der Lage ist, eine eindeutige Gruppe von Patientinnen zu definieren, bei der auf eine operative Exploration der Axilla verzichtet werden kann. In diesem Zusammenhang muss in prospektiven Studien untersucht werden, ob der axilläre Nodalstatus und die mittels D2-40 detektierte LVI möglicherweise voneinander unabhängige prognostische Faktoren darstellen. Dies könnte bedeuten, dass Patientinnen, die zwar nodalpositiv sind, bei negativem D2-40 LVI-Status über eine günstigere Prognose verfügen. Somit würde der Nodalstatus beispielsweise bei sehr alten Patientinnen mit kleinem Tumor und der Beurteilung D2-40 LVI negativ eine untergeordnete Rolle spielen, weshalb auf eine SLND oder ALND verzichtet werden könnte. Umgekehrt wäre es möglich, im Kollektiv der nodalnegativen Patientinnen eine Subgruppe mit erhöhtem Rezidivrisiko zu identifizieren, die einer entsprechenden System- oder Strahlentherapie (s.o.) zugeführt werden müsste.

Die Invasion von Blut- oder Lymphgefäßen durch Tumorzellen bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom stellt ebenfalls einen prädiktiven Faktor für das Ansprechen auf eine postoperative Radiatio der Thoraxwand nach Mastektomie dar. Karlsson et al. zeigten, dass junge Patientinnen, die mit einer modifiziert radikalen Mastektomie behandelt wurden und 1-3 axilläre Lymphknotenmetastasen aufwiesen bei Nachweis einer Lymphangiainvasion ein erhöhtes Risiko für lokoregionäre Rezidive aufweisen. Aus diesem Grund schlagen die Autoren vor, dass diese Patientengruppe ebenfalls, wie Patientinnen mit 4 oder mehr befallenen Lymphknoten, eine Bestrahlung der Thoraxwand erhalten sollte (Karlsson et al., 2007). O'Rourke et al. wiesen ebenfalls auf die Korrelation von LVI mit dem vermehrten Auftreten von Lokalrezidiven hin (O'Rourke et al., 1994). In einer kürzlich durchgeführten retrospektiven Analyse der International Breast Cancer Study Group Studien I-VII konnte des Weiteren gezeigt werden, dass vor allem postmenopausale Frauen mit nodalnegativen pT2-Karzinomen und vorliegender LVI

erhöhte Raten an Lokalrezidiven aufwiesen (Wallgren et al., 2003). Legt man diese Erkenntnisse zugrunde, hätte sich im vorliegenden Kollektiv das postoperative Management aufgrund der jetzt mittels D2-40 entdeckten Lymphangiominvasionen bei 5 Patientinnen (2%) hin zu einer Postmastektomie-Radiatio geändert. Zusammenfassend zeigt dies, dass die Steigerung der Detektionsrate lymphatischer Invasionen durch den routinemäßigen Einsatz von D2-40 einen relevanten Anstieg der Indikation zu postoperativen Bestrahlungen bei Patientinnen mit Mastektomie zur Folge hätte. Neueren Ergebnissen einer Metaanalyse der EBCTCG aus dem Jahr 2005 zufolge hat die Vermeidung von Lokalrezidiven, anders als bisher angenommen, einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientinnen (EBCTCG, 2005). Clarke et al. wiesen ebenfalls auf den positiven Zusammenhang zwischen adjuvanten Therapien zur Vermeidung lokoregionärer Rezidive und der Gesamtmortalität hin. Dabei könnte die potentielle Vermeidung von jeweils 4 Lokalrezidiven innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung und Therapie zur Verhinderung eines Todesfalls nach 15 Jahren führen (Clarke et al., 2005). Da die Detektionsrate lymphatischer Invasionen durch den routinemäßigen Einsatz von D2-40 erhöht werden könnte, würde dies zu einem vermehrten Einsatz einer postoperativen Bestrahlung führen. Hierdurch könnte eine Senkung der Rezidivrate und somit eine Mortalitätsreduktion herbeigeführt werden. Diese hoch spekulative Hypothese muss jedoch durch große prospektiv-randomisierte Studien verifiziert werden.

Die große prognostische Bedeutung von lymphatischen Invasionen für das Auftreten von Lokalrezidiven sowie axillären Lymphknoten- und Fernmetastasen eröffnet zudem die Möglichkeit einer gezielten, anti-lymphangiogenen Tumortherapie (Achen und Stacker, 2008; Chua et al., 2001; Cianfrocca und Goldstein, 2004; Pinder et al., 1994). Erste Studien mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin weisen in Tiermodellen auf eine aktive Inhibierung der tumorvermittelten Lymphangiogenese über den VEGF-Signalweg hin (Kobayashi et al., 2007; Seeliger et al., 2007). Das „mammalian Target of Rapamycin“ gilt dabei als Schlüsselenzym für Zellteilung und Zellwachstum, das weitere Proteine und Enzyme durch Phosphorylierung aktiviert (Wang und Proud, 2006). Sollten sich diese Erkenntnisse in weiteren Studien bestätigen, könnten speziell Patientinnen mit D2-40 LVI positiv und somit erhöhtem Rezidiv- und Metastasenrisiko von einer gezielten anti-lymphangiogenen Therapie mittels Rapamycin profitieren.

Es konnte gezeigt werden, dass D2-40 der alleinigen HE-Färbung überlegen ist und zu einem signifikanten Zuwachs der Detektionsrate vorliegender Lymphangiominvasionen führt. Die hohe Sensitivität und Spezifität des Antikörpers kann in zukünftigen Studien zur Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßinvasionen genutzt werden. Aufgrund der hohen prädiktiven Aussagekraft von D2-40 positiver LVI für das Vorliegen axillärer Lymphknotenmetastasen sollte in Studien überprüft werden, ob geeignete Subgruppen

identifiziert werden können, bei denen auf die operative Exploration der Axilla verzichtet werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen daher die Einführung der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper D2-40 zur Detektion von Lymphgefäßinvasion in die histologische Routinediagnostik des Mammakarzinoms nahe.

5 Zusammenfassung

Der Einbruch von Tumorzellen in Lymphgefäße ist mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom assoziiert. Trotz der hohen prognostischen Bedeutung gibt es jedoch bis heute methodische Probleme bei der Diagnose einer Lymphangiainvasion im Rahmen der routinemäßig durchgeführten HE-Färbung. Die Entwicklung von D2-40, einem spezifischen Antikörper gegen lymphatische Endothelien, eröffnet die Möglichkeit einer exakten Unterscheidung zwischen Lymph- und Blutgefäßen sowie einer Steigerung der Detektionsrate an Lymphangiainvasionen.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie 254 invasive Mammakarzinome von insgesamt 247 Patientinnen (7 Patientinnen mit bilateralen Tumoren) mit dem neu entwickelten Antikörper D2-40 hinsichtlich einer lymphatischen Tumorzellinvasion untersucht.

Dabei konnte bei 70 Karzinomen (28%) eine Lymphangiainvasion mittels D2-40 nachgewiesen werden. Verglichen mit der Detektionsrate von 16% (n=40) bei der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin stellte dies einen signifikanten Zuwachs von 43% dar.

Durch die Korrelation von D2-40 positiver LVI mit klinischen und histopathologischen Daten konnten signifikante Zusammenhänge zwischen vorliegender Lymphangiainvasion und jungem Patientenalter ($p=0.045$), großem Primärtumor ($p<0.001$), positivem Nodalstatus ($p<0.001$), schlechter Differenzierung ($p<0.001$) und negativem Hormonrezeptorstatus (ER: $p=0.015$; PR: $p=0.002$) nachgewiesen werden. Bei der Subgruppe der „triple-negativen“ Karzinome (ER, PR und Her2/neu negativ) ließ sich zudem eine signifikante Korrelation mit einer D2-40 positiven LVI nachweisen ($p=0.022$). In einer multivariaten Analyse klinischer sowie histopathologischer Charakteristika zeigte die D2-40 positive LVI (Odds Ratio: 3.489; $p=0.0003$) gefolgt von Tumorgröße (Odds Ratio: 3.167; $p=0.0003$) und Grading (Odds Ratio: 1.953; $p=0.0352$) die stärkste prädiktive Bedeutung zur Voraussage eines positiven axillären Nodalstatus.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schätzung der altersspezifischen Mortalität des Mammakarzinoms in Deutschland 2006
- Abbildung 2: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland 2006
- Abbildung 3: Relatives Überleben in Abhängigkeit der Tumorgroße
- Abbildung 4: Relatives Überleben in Abhängigkeit des Nodalstatus
- Abbildung 5: Klinische Einteilung der axillären Lymphknotenlevel
- Abbildung 6: Wirkungsweise der karzinogenen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D auf peritumorale Lymphgefäße
- Abbildung 7: Wege der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung
- Abbildung 8: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (n=247)
- Abbildung 9: Menopausenstatus der Patientinnen (n=247)
- Abbildung 10: Lfd-Nr. 268, D2-40 LVI positiv, Vergrößerung: 100-fach
- Abbildung 11: Lfd-Nr. 268, CD34 LVI positiv, Vergrößerung: 100-fach
- Abbildung 12: Lfd-Nr. 157, Lymphgefäß D2-40 LVI positiv, Blutgefäß D2-40 negativ; Vergrößerung: 100-fach
- Abbildung 13: Lfd-Nr. 157, Lymphgefäß CD34 LVI negativ, Blutgefäß CD34 positiv; Vergrößerung: 100-fach
- Abbildung 14: Nachweis von Lymphangioinvasion mittels D2-40, CD34 und HE

6.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms
- Tabelle 2: Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS)
- Tabelle 3: Histopathologische Charakteristika der 254 Mammakarzinome
- Tabelle 4: Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status der 254 Mammakarzinome
- Tabelle 5: Korrelation von D2-40 mit Alter und Menopausenstatus
- Tabelle 6: Korrelation von D2-40 LVI und histopathologischen Charakteristika
- Tabelle 7: Korrelation von D2-40 positiver LVI und dem Nodalstatus
- Tabelle 8: Korrelation von D2-40 positiver LVI und Hormon- sowie HER2/neu-Rezeptorstatus
- Tabelle 9: Multivariate Analyse: Korrelation von patientenbezogenen und histopathologischen Faktoren mit dem Nodalstatus
- Tabelle 10: Multivariate Analyse: Korrelation der univariat signifikanten Parameter Grading und D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei Patientinnen mit Tumoren $\leq 2\text{cm}$ (pT1)
- Tabelle 11: Multivariate Analyse: Korrelation der univariat signifikanten Parameter Grading und D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei Patientinnen mit Tumoren $\leq 5\text{cm}$ (pT1+pT2)
- Tabelle 12: Multivariate Analyse: Korrelation des univariat signifikanten Parameters D2-40 LVI mit dem Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre)
- Tabelle 13: Multivariate Analyse: Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem Nodalstatus bei älteren Patientinnen (>69 Jahre) mit Karzinomen $\leq 2\text{cm}$ (pT1)
- Tabelle 14: Multivariate Analyse: Korrelation von D2-40 LVI positiv mit dem Nodalstatus bei jungen Patientinnen (<40 Jahre)

7 Literatur

Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 2005; 7: 121-127

Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131: 225-234

Acs G, Dumoff KL, Solin LJ, Pasha T, Xu X, Zhang PJ. Extensive retraction artefact correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis and predicts poor outcome in early stage breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 129-140

Anan K, Mitsuyama S, Tamae K, Nishihara K, Iwashita T, Abe Y, Ihara T, Toyoshima S. Axillary lymph node metastases in patients with small carcinomas of the breast: is accurate prediction possible? *Eur J Surg* 2000; 166: 610-615

Arnaut-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol* 2007; 20: 183-191

Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789-801

Baron RH, Fey JV, Borgen PI, Stempel MM, Hardick KR, Van Zee KJ. Eighteen sensations after breast cancer surgery: a 5-year comparison of sentinel lymph node biopsy and axillary lymph node dissection. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1653-1661

Bastert G. Spezielle gynäkologische Onkologie II Band 12 3. Auflage. München: Urban & Schwarzenberg, 1996: 124-136

Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 419-427

Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br J Cancer* 1984a; 50: 771-777

Bettelheim R, Mitchell D, Gusterson BA. Immunohistochemistry in the identification of vascular invasion in breast cancer. *J Clin Pathol* 1984b; 37: 364-366

Birner P, Obermair A, Schindl M, Kowalski H, Breitenecker G, Oberhuber G. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 93-97

Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: A study of 1709 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Brit J Cancer* 1957; 11: 353-377

Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1141-1152

Bujas T, Pavić I, Lenicek T, Mijić A, Kruslin B, Tomas D. Peritumoral Retraction Cleaving Correlates with Advanced Stage Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 443-447

Calaf GM, Hei TK. Establishment of a radiation- and estrogen-induced breast cancer model. *Carcinogenesis* 2000; 21: 769-776

Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 735-743

Casley-Smith JR, Florey HW. The structure of normal small lymphatics. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1961; 46: 101-106

Chua B, Ung O, Taylor R, Boyages J. Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer. *ANZ J Surg* 2001; 71: 723-728

Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, Cohen C, Young AN. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18: 143-152

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9: 606-616

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366: 2087-2106

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 276-285

Clodius L. Minimizing secondary arm lymphedema from axillary dissection. *Lymphology* 2001; 34: 106-110

Cody HS 3rd, Borgen PI, Tan LK. Redefining prognosis in node-negative breast cancer: can sentinel lymph node biopsy raise the threshold for systemic adjuvant therapy? *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 227-230

Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 950-964

Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2167-2177

Denk H. Immunhistochemische Färbemethoden. In: Böck P, HRSG. Romeis Mikroskopische Technik. München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1989: 251-261

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res 2007; 13: 4429-4434

De Waard F. Breast cancer incidence and nutritional status with particular reference to body weight and height. Cancer Res 1975; 35: 3351-3356

Dixon M. ABC of breast diseases 2nd edition. London: BMJ Books, 2000

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005; 365: 1687-1717

Engel J, Hölzel D, Schubert-Fritschle G. Epidemiologie. In: Sauer H, HRSG. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München. München-Wien-New York: Zuckschwerdt, 2005: 1-11

Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. Mod Pathol 2005; 18: 1490-1497

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol 2007; 18: 581-592

Firth HV, Hurst JA. Oxford Desk Reference Clinical Genetics. Oxford-New York: Oxford University Press, 2005: 426-433

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. Cancer 1983; 52: 1551-1557

Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. Cancer 1993; 71: 2507-2514

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 966-978

Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. Histopathology 2005; 46: 396-402

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. Ann Surg 1994; 220: 391-398

Goerke K, Steller J, Valet A. Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe 6. Auflage. München: Urban & Fischer, 2003

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-1583

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18: 1133-1144

Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8364-8371

Greenstein B, Raue F. Endokrinologie. Berlin-Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1996: 74-75

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5652-5657

Hanau CA, Machera H, Miettinen M. Immunohistochemical evaluation of vascular invasion in carcinomas with five different markers. *App Immunohistochem* 1993; 1: 46-50

Harbeck N, Heywang-Köbrunner S. Veränderungen und Tumoren der Mamma. In: Kiechle M, HRSG. Gynäkologie und Geburtshilfe. München: Urban & Fischer, 2006: 550-576

Harris JR, Lippmann ME, Morrow M, Osborne CK. Diseases of the breast 3rd edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004

Hartveit E. Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology* 1990; 16: 533-543

Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 227-237

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer* 1990; 46: 796-800

Irie J, Manucha V, Ioffe OB, Silverberg SG. Artefact as the pathologist's friend: peritumoral retraction in in situ and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 53-59

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96

Jonat W. Gut- und bösartige Neubildungen der Mamma. In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KT, Weiss JM, HRSG. Gynäkologie und Geburtshilfe. Berlin: Springer, 2000: 628-658

Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; 16: 3898-3911

Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkilä P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K. Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 1998; 58: 1599-1604

Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 2002; 82: 1255-1257

Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002; 15: 434-440

Karlsson P, Cole BF, Price KN, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA, Murray E, Lindtner J, Collins JP, Holmberg SB, Fey MF, Thürlimann B, Crivellari D, Forbes JF, Gelber RD, Goldhirsch A, Wallgren A. The role of the number of uninvolved lymph nodes in predicting locoregional recurrence in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2019-2026

Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1900-1908

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993a; 15: 36-47

Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: summary and future directions. *Epidemiol Rev* 1993b; 15: 256-263

Kobayashi S, Kishimoto T, Kamata S, Otsuka M, Miyazaki M, Ishikura H. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci* 2007; 98: 726-733

Komaki K, Sano N, Tangoku A. Problems in histological grading of malignancy and its clinical significance in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer* 2006; 13: 249-253

Koscielny S, Tubiana M, Lê MG, Valleron AJ, Mouriessé H, Contesso G, Sarrazin D. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; 49: 709-715

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13

Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* 1993; 2: 335-339

Kühn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D; Consensus Committee of the German Society of Senology. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005; 103: 451-461

Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829-3837

Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, Varriale E, Pettinato G, Panico L, Petrella G. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer* 1995; 76: 1772-1778

Leak LV, Burke JF. Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am J Anat* 1966; 118: 785-809

Leak LV. Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc Res* 1970; 2: 361-391

Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64: 1914-1921

Lee AK, DeLellis RA, Wolfe HJ. Intramammary lymphatic invasion in breast carcinomas. Evaluation using ABH isoantigens as endothelial markers. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 589-594

Lee AK, DeLellis RA, Silverman ML, Heatley GJ, Wolfe HJ. Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1457-1465

Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000; 60: 4324-4327

MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, Andersen AP, Cole P, deWaard F, Kauraniemi T, Polychronopoulou A, Ravnihar B, Stormby N, Westlund K. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1982; 30: 427-431

Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *JAMA* 1998; 279: 922-929

Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 2025-2032

Marshall LM, Hunter DJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Byrne C, London SJ, Colditz GA. Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 297-301

Maunsell E, Brisson J, Deschênes L. Arm problems and psychological distress after surgery for breast cancer. *Can J Surg* 1993; 36: 315-320

Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001; 61: 8079-8084

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 716-721

Nerlich AG, Schleicher E. Identification of lymph and blood capillaries by immunohistochemical staining for various basement membrane components. *Histochemistry* 1991; 96: 449-453

Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990; 247: 1219-1222

Nime FA, Rosen PP, Thaler HT, Ashikari R, Urban JA. Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1977; 1: 25-30

Nishio H, Tada J, Hashiyama M, Hirn J, Ingles-Esteve J, Suda T. CD34 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, HRSG. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference ; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York-London: Garland Publishing Inc, 1997: 974-976

Ogasawara S, Kaneko MK, Price JE, Kato Y. Characterization of anti-podoplanin monoclonal antibodies: critical epitopes for neutralizing the interaction between podoplanin and CLEC-2. *Hybridoma* 2008; 27: 259-267

Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P. Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech Dev* 1993; 44: 3-16

O'Rourke S, Galea MH, Morgan D, Euhus D, Pinder S, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Local recurrence after simple mastectomy. *Br J Surg* 1994; 81: 386-389

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-2826

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3726-3734

Rack B, Eiermann W, Engel J, Euler U, Funke I, Harbeck N, Jückstock J, Permanetter W. Prognostische und prädiktive Faktoren beim invasiven Mammakarzinom. In: Janni W, HRSG. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München. München-Wien-New York: Zuckschwerdt, 2007: 85-91

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448-456

Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; 86: 2406-2412

Pepper MS, Skobe M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* 2003; 163: 209-213

Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994; 24: 41-47

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 2001; 276: 19420-19430

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32

Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologie* 1987; 8: 138-140

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2008

Rivadeneira DE, Simmons RM, Christos PJ, Hanna K, Daly JM, Osborne MP. Predictive factors associated with axillary lymph node metastases in T1a and T1b breast carcinomas: analysis in more than 900 patients. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 1-6

Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. London: Mosby International, 1998

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1239-1251

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2090-2100

Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the mammary gland. Atlas of Tumor Pathology. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1993

Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-2887

Russo J, Frederick J, Ownby HE, Fine G, Hussain M, Krickstein HI, Robbins TO, Rosenberg B. Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 123-131

Ryan TJ. Structure and function of lymphatics. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 18-24

Sabin FR. On the origin and development of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1902; 1: 367-389

Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989; 5: 102-110

Saigo PE, Rosen PP. The application of immunohistochemical stains to identify endothelial-lined channels in mammary carcinoma. *Cancer* 1987; 59: 51-54

Santillan AA, Kiluk JV, Cox JM, Meade TL, Allred N, Ramos D, King J, Cox CE. Outcomes of locoregional recurrence after surgical chest wall resection and reconstruction for breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1322-1329

Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, Karp SE, Begg CB. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 467-473

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166: 913-921

Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, Wilting J. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn* 1999; 216: 311-319

Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 2351-2355

Seeliger H, Guba M, Kleespies A, Jauch KW, Bruns CJ. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 611-621

Sellers T, Grabrick D. Epidemiology of breast cancer. In: Jotai I, HRSG. Manual of Breast Diseases. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002: 149-179

Shoup M, Malinzak L, Weisenberger J, Aranha GV. Predictors of axillary lymph node metastasis in T1 breast carcinoma. *Am Surg* 1999; 65: 748-752

Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie.* Stuttgart-New York: Georg Thieme, 2006

Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 14-19

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198

Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 168-183

Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* 2000; 25: 254-255

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-191

Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002; 16: 922-934

Sulis E, Busilacchi M, Chessa A, Monni A, Turno R, Zizi P, Pani P. Technique of lymphography in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1975; 165: 213-217

Tezuka K, Onoda N, Takashima T, Takagaki K, Ishikawa T, Wakasa T, Wakasa K, Hirakawa K. Prognostic significance of lymphovascular invasion diagnosed by lymphatic endothelium immunostaining in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2007; 17: 997-1003

Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis--impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 691-696

Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1044-1048

Tominaga T, Takashima S, Danno M. Randomized clinical trial comparing level II and level III axillary node dissection in addition to mastectomy for breast cancer. *Br J Surg* 2004; 91: 38-43

UICC. *TNM classification of malignant tumors*, 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002

Valtola R, Salven P, Heikkilä P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1381-1390

Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, Vermeulen PB, Van Marck EA. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2006; 94: 1643-1649

Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Colpaert CG, Van Laere SJ, van Dam P, Van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7637-7642

Van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1631-1635

Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev* 2007; 8: 395-408

Walgenbach-Brünagel G, Tolba RH, Varnai AD, Bollmann M, Hirner A, Walgenbach. Detection of lymphatic invasion in early stage primary colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40. *Eur Surg Res* 2006; 38: 438-444

Wallgren A, Bonetti M, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Holmberg SB, Lindtner J, Thürlimann B, Fey M, Werner ID, Forbes JF, Price K, Coates AS, Collins J; International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. Risk factors for locoregional recurrence among breast cancer patients: results from International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1205-1213

Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 362-369

Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-778

Wilke LG, McCall LM, Posther KE, Whitworth PW, Reintgen DS, Leitch AM, Gabram SG, Lucci A, Cox CE, Hunt KK, Herndon JE 2nd, Giuliano AE. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 491-500

Wilting J, Neeff H, Christ B. Embryonic lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 1999; 297: 1-11

Wilting J, Tomarev SI, Christ B, Schweigerer L. Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003; 1: 33-40

Yamauchi C, Hasebe T, Iwasaki M, Imoto S, Wada N, Fukayama M, Ochiai A. Accurate assessment of lymph vessel tumor emboli in invasive ductal carcinoma of the breast according to tumor areas, and their prognostic significance. *Hum Pathol* 2007; 38: 247-259

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kuhn für das Überlassen der Thematik und die Unterstützung dieser Doktorarbeit. Herrn Dr. M. Braun danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, stete Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik, wodurch er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. R. Büttner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Pathologie der Universität Bonn. Herrn Prof. Dr. HP. Fischer und Frau Dr. U. Flucke für die geduldige Hilfe in praktischen Fragen. Den Mitarbeiterinnen des Immunhistochemischen Labors, insbesondere Susanne Steiner und Barbara Reddemann für die unkomplizierte und schnelle Zusammenarbeit sowie die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor.

Frau Marieke Mielich danke ich für Ihre Freundschaft sowie die tatkräftige Hilfe im Archiv und beim Erstellen der histologischen Bilder.

Abschließend gebührt mein besonderer Dank meiner Familie sowie Tim Rißel für die Kraft und Unterstützung bei dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.

Teile der in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnisse wurden in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht:

Braun M, Flucke U, **Debald M**, Walgenbach-Brünagel G, Walgenbach KJ, Höller T, Pölcher M, Wolfgarten M, Sauerwald A, Keyver-Paik M, Kühr M, Büttner R, Kuhn W. Detection of lymphovascular invasion in early breast cancer by D2-40 (podoplanin): a clinically useful predictor for axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112: 503-511

Braun M, Flucke U, **Debald M**, Pölcher M, Walgenbach-Brünagel G, Walgenbach KJ, Büttner R, Kuhn W. Detection of lymphatic vessel invasion in early breast cancer by the monoclonal antibody D2-40 (podoplanin). *Journal of Clinical Oncology* 2008; ASCO Annual Meeting Proceedings Vol 26

Braun M, Flucke U, **Debald M**, Pölcher M, Walgenbach-Brünagel G, Walgenbach KJ, Büttner R, Kuhn W. Detection of lymphovascular invasion in early breast cancer by D2-40 –A novel antibody for lymphatic endothelium immunostaining. *Deutscher Krebskongress* 2008. *Onkologie* 2008; 31: 141