

Auch auf dem Gebiet der gastrointestinalen Karzinome konnten signifikante Zusammenhänge gefunden werden. So zeigte Cooper an 43 Patienten mit einem Rektumkarzinom eine Verbindung von deutlich verkürzter Überlebenszeit und erhöhter Glut-1-Expression (Cooper 2003).

Auch für prognostische Aussagen beim Pankreaskarzinom eignete sich die Bestimmung der Glut-1-Expression. Ito beschrieb diesbezüglich einen Zusammenhang zum invasiven Wachstum, was sich in einer limitierten Prognose widerspiegelte (Ito 2004).

Kato untersuchte Präparate von 95 Patienten mit einem Ösophaguskarzinom und fand heraus, dass es signifikante Zusammenhänge zwischen der Glut-1-Expression und T- und N-Stadium gibt. Die Überlebensraten von Patienten mit Glut-1-positiven Tumoren waren signifikant niedriger als jene der Glut-1-negativen Patientengruppe. Basierend auf diesen Ergebnissen empfahl er, Glut-1 als wertvollen Marker für Tumoraggressivität und Prognose zusätzlich zu etablierten Methoden zu nutzen (Kato 2002).

Und schließlich zeigte sich auch bei Prostatakarzinomen eine signifikant erhöhte Glut-1-Expression bei besonders malignen Formen (Effert 2004).

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

In den Jahren 1993 bis 1998 wurden in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 106 Patienten mit Malignomen der Mundhöhle behandelt. Dabei handelte es sich in 99 Fällen um Plattenepithelkarzinome (93,4%). Allen weiteren Untersuchungen wurden diese 99 Patienten zugrunde gelegt. Die Datenerfassung erfolgte auf der Grundlage der Patientenakten bis einschließlich 2003 und damit bis zum Erreichen eines 5-jährigen Nachbeobachtungszeitraumes.

Bei allen Patienten wurden folgende klinische Parameter erhoben: Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnosestellung durch Probeexzision, Noxen wie Alkohol und Nikotin. Ferner wurden die Tumorausdehnung [T], das Ausmaß von regionären Lymphknotenmetastasen [N] bzw. Fernmetastasen [M] nach den Vorgaben des American Joint Committee on Cancer (AJCC) bzw. Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) aus dem Jahre 1990 in einer TNM-Formel zusammengefasst (Flemming 1997). Das

Ausmaß der diagnostischen Maßnahmen zur Fixierung der TNM-Formel wurde in Form der so genannten Certainty-Faktoren C1-C3 festgehalten (Wittekind 2004).

Darüber hinaus wurden die histologische Differenzierung [Grading] (Veronesi 1989), das Auftreten von Rezidiven, das eventuelle Vorhandensein eines Residualtumors (R-Klassifikation), der eventuelle Todestag und die eventuelle Todesursache erfasst.

Alle erhobenen Parameter orientierten sich an den Anforderungen der DÖSAK-Erhebung (Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich), und es wurde eine Datenbank im Statistik-Programm SPSS 12.0 erstellt.

Datenlücken wurden durch Anfragen vorwiegend an die Hausärzte, in seltenen Fällen auch an die Krankenkassen und Einwohnermeldeämter, geschlossen.

3.2 Überlebensstatistiken nach Kaplan-Meier

Um die Überlebenszeiten zu analysieren und zu vergleichen, wurde die Methode nach Kaplan-Meier (Kaplan 1958) verwandt, die den Vorteil eines geringen Informationsverlustes bietet, da die Ereignisse (Tod eines Patienten) die Beobachtungsintervalle definieren und diese nicht fest vorgeben.

Zur Berechnung wurde die überlebte Zeit in Tagen vom Zeitpunkt der Diagnosestellung der Tumorerkrankung bis zum Tag des eventuellen Todes herangezogen. Unterschieden wurden die Todesursachen a) am Tumor verstorben oder mit deutlichen Zeichen des Tumorprogresses und b) nicht am Tumor verstorben.

Dabei verläuft die geschätzte kumulative Survivalfunktion treppenförmig. Eine Änderung erfolgt bei Eintreten des definierten Ereignisses (hier der Todesfall). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve berücksichtigt aber auch Patienten, die nicht am Tumor verstorben sind. Diese werden graphisch in Form eines Kreuzes als so genannte zensierte Fälle markiert.

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Sämtliche immunhistochemische Untersuchungen erfolgten an Paraffinblöcken der entsprechenden Patienten. Die Färbungen wurden im Pathohistologischen Labor der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Institut für Pathologie selbständig durchgeführt.

Von den 99 Patienten wurden jeweils 21 mit klinisch positivem (rezidiv- und metastasenfreies Erreichen der 5-Jahresüberlebensgrenze) bzw. klinisch besonders

negativem Verlauf (Rezidiv oder Metastase mit tumorassoziiertem Exitus letalis innerhalb der ersten 2 Jahre nach Diagnosestellung) separiert. Von den Paraffinblöcken dieser Patienten wurden Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht.

Zur Färbung wurde nach der so genannten ABC-Methode, einer indirekten Methode, vorgegangen. Dabei bindet ein unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper an das Antigen. Danach wird ein zweiter mit Biotin markierter (biotinylierter) Sekundärantikörper appliziert, der gegen den Primärantikörper (jetzt das Antigen) gerichtet ist. Nun reagiert der biotinylierte Sekundärantikörper mit einem Avidin-Biotin-Komplex (Ausnutzung der hohen Affinität von Biotin zu Avidin). Der schematische Ablauf einer so genannten ABC-Methode geht aus der Abbildung 3 hervor.

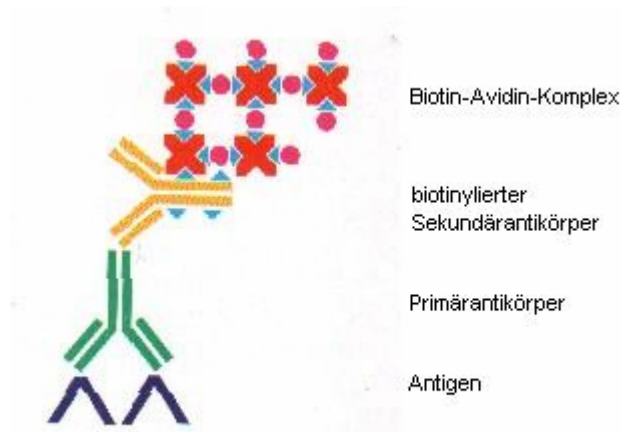


Abbildung 2 - ABC- Methode: Der Avidin-Biotin-Komplex reagiert mit dem biotinylierte Antikörper (übernommen aus Thomas Boenisch „Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden“, 3. Auflage, 2003)

Das Ausmaß der Bindung der Antikörper wurde schließlich durch eine Substrat-Chromogenlösung sichtbar und somit die geplante semiquantitative Auswertung am Lichtmikroskop erst möglich.

Zur Anwendung kam der Primärantikörper Glut-1 der Firma Acris. Orientierend an den Empfehlungen der Herstellerfirma wurden verschiedene Aufbereitungen der Präparate und Verdünnungen getestet.

Als Negativ- bzw. Positivkontrolle kamen Hirngewebe der Ratte und Mundschleimhauttumorpräparate eigener Patienten zum Einsatz. Im Ergebnis der Voruntersuchungen zur Verdünnung des Primärantikörpers ergab sich eine optimale Verdünnung desselben in Höhe 1:200 in PBS-Puffer. Alle weiteren experimentellen Schritte wurden chronologisch wie folgt durchgeführt:

- Vorwärmung der Objektträger (60°C, 30 Minuten) und Behandlung in einem Entparaffinierer (Gerät „Midas E“)
- Aufbereitung in der Mikrowelle (20 Minuten, 600 Watt, in Natriumcitrat)
- Abkühlphase auf Zimmertemperatur und Spülvorgänge (Wasserstoffperoxid und destilliertes Wasser)
- Parallel dazu Vorbereitung des Primärantikörpers (Verdünnung mit PBS-Puffer s.o.)
- Aufziehen der Objektträger auf Coverplates und Einwirkung eines Proteinblockierers
- Applikation des Primärantikörpers und Inkubation im Ofen (37°C, 30 Minuten)
- Spülung und Einwirken des Sekundärantikörpers für 12 Minuten (Zimmertemperatur)
- Spülung und Einwirken einer Peroxidase für 12 Minuten (Zimmertemperatur)
- Spülung und Einwirkung (15 Minuten) der frisch hergestellten Färbelösung („Zymed Chromogen-Kit“)
- Hintergrundfärbung mit Hämalaun (Gerät „Midas E“)
- Eindeckung der Objektträger mit handwarmer Gelatine und Trocknung bei 55°C

3.4 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Sämtliche gegen Glut-1 gefärbten Plattenepithelkarzinome wurden lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 100- bzw. 200-fach hinsichtlich Färbeintensität und prozentualen Anteils positiv gefärbter Zellen im Tumorgewebe untersucht.

Zur Auswertung wurde der immunreaktive Score nach REMMELE und STEGNER (Remmele 1987) herangezogen. Die Auswertungskriterien dieses semiquantitativen Verfahrens sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 - Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

$$\text{Prozentsatz positiver Kerne} \quad \times \quad \text{Färbeintensität} \quad = \quad \text{IRS (0-12 Punkte)}$$

Keine pos. Kerne	0 Punkte	Keine Färbung	0 Punkte
< 10% pos. Kerne	1 Punkt	Schwache Färbeintensität	1 Punkt
10-50% pos. Kerne	2 Punkte	Mäßige Färbeintensität	2 Punkte
51-80% pos. Kerne	3 Punkte	Starke Färbeintensität	3 Punkte
> 80% pos. Kerne	4 Punkte		

3.5 Statistische Sicherung

Sämtliche Parameter wurden in das Programm SPSS 12.0 eingegeben und statistisch ausgewertet.

Mit Hilfe des Log-Rank-Testes, des Testverfahrens nach Breslow und nach Tarone-Ware wurde für kategoriale Parameter das Überleben verschiedener Teilkollektive auf signifikante Unterschiede überprüft. Für metrische Merkmale kam für diese Zwecke das Verfahren der Cox-Regression zur Anwendung.

Darüber hinaus wurden der Chi-Quadrat-Test, der Likelihood-Quotient und der exakte Test nach Fisher sowie für die multifaktorielle Analyse entsprechender Parameter die ordinale Regression verwandt.