Immunhistochemischer Nachweis von Progesteronrezeptoren in primären Mammarkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen

E.		Müller-Holzner ^a
A.		Zeimet ^a
G.		Daxenbichler ^a
C.		Marth ^a
L.		Müller ^b
O.		Dapunt ^a

^aUnivers.-Klinik f. Frauenheilk. Innsbruck (Vorst.: Prof. Dr. O. Dapunt) ^bII. Univers.-Klinik f. Chirurgie, Innsbruck (Vorst.: Univ.-Prof. Dr. E. Bodner)

Dr. Elisabeth Müller-Holzner, Univers.-Klinik f. Frauenheilk., Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

Der Gehalt an Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptoren (PR) ist vor allem beim Mammarkarzinom ein etablierter prognostischer Parameter bezüglich des Ansprechens auf endokrine Therapie-maßnahmen. Auch bei positivem Rezeptorbefund reagiert allerdings fast ein Viertel der Tumoren nicht auf diese Therapie. Es gilt daher, Methoden zu finden, die es in noch höherem Maße erlauben, prä-therapeutisch jene Karzinome zu erkennen, die durch Hormon-therapie in ihrem Wachstum gehemmt werden können.

Eine Möglichkeit dazu sehen wir darin, nicht nur den Rezeptor-gehalt des Primärtumors sondern auch den der allenfalls vor-handenen Lymphknotenmetastasen zu bestimmen. Es würden damit nämlich gerade die Tumorzellen untersucht, die ihre Potenz zu metastasieren bereits gezeigt haben. Und gerade diese Zellen sind es, die durch die endokrine Therapie zerstört werden sollen. Das Problem dabei war bisher die Tatsache, daß Lymphknotenmetastasen meist so klein sind, daß sie makroskopisch nicht erkennbar sind, das heißt, die Diagnose wird erst nach der Routinefixierung im Paraffinschnitt gestellt. Herkömmliche Methoden des Rezeptornach-weises – sowohl biochemisch als auch immunhistochemisch – be-nötigen allerdings Frischgewebe, das dann nicht mehr zur Verfügung steht.

Unser Ziel war es daher, eine Methode zu finden, die mit aus-reichender Sicherheit auch am routinemäßig fixierten Material mit dem am besten dokumentierten monoklonalen Antikörper gegen den Progesteronrezeptor, KD 68 von Abbott, durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse am Paraffinschnitt wurden mit denen an Gefrierschnitten derselben Tumoren, mit dem biochemischen Rezeptorgehalt und in einem kleineren Kollektiv mit dem Ansprechen auf Tamoxifentherapie korreliert. Anschließend wurde der PR-Gehalt von primären Mammarkarzinomen und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen untersucht.

Material und Methode

Ausgehend von der vom Hersteller angegebenen Standardinkubation, die für die Gefrierschnitte ohne Modifikation angewendet wurde, wurden für die Paraffinschnitte verschiedenste Inkubationsvarianten getestet. Die zuerst durchgeführte Enzymvorbe-

handlung mit Pronase oder Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die besten Ergebnisse wurden mit folgender Inkubation erzielt: 1. „Blocking reagent“ aus dem Abbott Pg-RICA Kit (15 Minuten), 2. Primär-antikörper KD 68 (über Nacht, 1 :10 verdünnt, Abbott Laboratories. North Chicago, 111.), 3. Ziege-anti Ratte Ig biotinyliert (1 h, 1:600 verdünnt, Chemicon. Temecula. CA). 4. Extravidin-Peroxidase (1 h, 1:600 verdünnt, BioMakor, Heidelberg, BRD), 5. DAB (5 Minuten). 6. Gegenfärbung in Haematoxylin. Zwischen den Inkubations-schritten wurden die Schnitte jeweils 2 mal mit PBS (pH 7,2) + Triton X-100 0,5 % (Serva, Heidelberg, BRD) gewaschen.

Die Ergebnisse am Paraffinschnitt wurden in 34 Fällen mit denen an Gefrierschnitten derselben Tumoren verglichen.

Bei 70 Karzinomen wurde das Ergebnis am Paraffinschnitt mit dem biochemischen Progesteronrezeptorgehalt, der mit der Dextran Coated Charcoal (DCC) Methode bestimmt wurde, verglichen. Der Cut-off Wert lag bei 25 fmol/mg Protein.

Von 20 Patientinnen, die zwischen 1976 und 1984 wegen eines Mammakarzinoms radikal mastektomiert worden waren und die beim Auftreten von Metastasen (1–9 Jahre nach der Operation) ausschließlich mit Tamoxifen therapiert worden waren, wurde das Ansprechen auf die Behandlung nach den Kriterien der UICC erhoben und mit dem immunhistochemisch am Paraffinschnitt bestimmten PR-Gehalt korreliert.

Schließlich wurden Paraffinschnitte von 50 primären invasiven duktalem Mammakarzinomen und insgesamt 151 Lymphknotenmetastasen auf ihren PR-Gehalt untersucht.

Ergebnisse

Der Vergleich der Ergebnisse am Gefrierschnitt und am Paraffinschnitt und der zwischen biochemisch und immunhistochemisch am Paraffinschnitt bestimmtem PR-Gehalt zeigte eine signifikante Übereinstimmung in 32 von 34 bzw. 56 von 70 Fällen (jeweils $p < 0,0001$), Tab. 1). Auch die Übereinstimmung des Therapieerfolges mit dem PR-Gehalt am Paraffinschnitt ist statistisch signifikant ($p < 0,0001$): 7 Karzinome waren PR positiv, davon zeigten 2 ein „No change“

Tabelle 1. Gegenüberstellung des durch verschiedene Methoden bestimmten Progesteronrezeptorgehaltes. fPR: immunhistochemisch am Gefrierschnitt, pPR: immunhistochemisch am Paraffinschnitt. bPR: biochemisch (DCC-Methode)

fPR pos.

fPR neg. bPR pos. bPR neg.

42 6

8 14

24 2

pPR pos. pPR neg.

nach UICC, 5 reagierten auf die Tamoxifentherapie mit Voll- oder Teilremission. Von den 13 Patientinnen mit PR negativen Karzinomen hatten 12 einen progredienten Krankheitsverlauf, eine Patientin zeigte „noch change“.

Die Ergebnisse an den 50 primären Mammakarzinomen und ihren Metastasen zeigten ein sehr heterogenes Bild (Abb. 1): PR negative Primärtumoren hatten ausschließlich negative Metastasen. 11 der 18 PR schwach positiven Karzinome hatten nur negative Metastasen. in 3 Fällen waren alle Metastasen PR positiv, in 4 Fällen waren sie zum Teil positiv und zum Teil negativ. In der Gruppe der mittelstark und stark PR positiven Karzinome war das Ergebnis in

den Metastasen sehr unterschiedlich. einer dieser Tumoren hatte 6 vollständig negative Metastasen. Insgesamt war der pPR-Gehalt in den Metastasen niedriger als der der Primärtumoren ($p < 0,001$).

Diskussion und Zusammenfassung

Wir konnten zeigen, daß mit dem monoklonale[] Antikörper KD 68 auch am Paraffinschnitt Progesteronrezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Dadurch wurde es ermöglicht, zusätzlich zur üblichen Bestimmung des Rezeptorgehaltes von Primärtumoren auch den von Lymphknotenmetastasen zu bestimmen und damit jene Tumorzellen zu untersuchen[], die ihre Fähigkeit zu metastasieren bereits bewiesen haben.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß bei PR negatives Primärtumor damit zu rechnen ist, daß auch die Metastasen negativ sind. Ist aber das primäre Karzinom PR positiv, so schließt dies nicht aus, daß die entsprechenden Lymphknotenmetastasen in hohem Maße PR negativ sind und man daher mit endokrinen Therapiemaßnahmen die metastasierenden Zellen nicht erfaßt. Wir glauben daher, daß durch die Untersuchung des Rezeptorgehaltes in Lymphknotenmetastasen wertvolle zusätzliche Informationen für das Erstellen neuer Therapiekonzepte gewonnen werden können. Literatur beim Verfasser.

Patientin	pPR negativ	pPR schwach positiv	pPR mittelstark positiv	pPR stark positiv
K.M.	••			
P.H.	•••			
H.G.	••••			
S.M.	••			
H.J.	••			
S.M.	••			
H.L.	•			
J.E.	••••			
F.H.	••			
P.M.	•			
K.S.	••			
S.J.	••			
H.H.	••			
S.H.	••			
Z.A.	•			
K.W.	•			
E.A.	•••			
D.H.	•••			
S.U.	••••••••			
H.M.	•••			
G.M.	•••			
R.M.	••	••		
G.T.	•			
N.M.	•••			
L.M.	••••			
H.G.	••			
D.H.		•		
W.A.	••••••	••••	••	
L.G.		••		
H.J.		••		
K.M.	•••••••	•••••	•	
T.A.	••	•••	•••	•
G.H.			••	
S.M.			•	
W.A.		•	••	
R.R.			•••	
R.M.			•	
R.A.	••••••	••		
L.E.		••	•	
G.M.				•
A.E.		•		
K.E.		•		
S.G.		•••	•	
F.M.		••		
G.S.		•		
G.E.		•••	•	
O.J.			•	
M.E.				•
Ü.R.				••••
K.A.			••	

□
 Abb. 1. Darstellung des Progesteronrezeptorgehaltes von primären Mammakarzinomen und Lymphknotenmetastasen an Paraffinschnitten. Jede Zeile repräsentiert eine Patientin (n = 50), der graue Hintergrund markiert den PR-Gehalt des Primärtumors, jeder schwarze Punkt den PR-Gehalt einer Lymphknotenmetastase. Schwach positiv = 10–30 % positive Tumorzellen mittelstark positiv = 31–60 % und stark positiv = > 60 % positive Tumorzellen