

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Disseminierte Tumorzellen
im
Knochenmark
bei primärem Mammakarzinom
zum Zeitpunkt der Diagnosestellung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian Universität zu München

vorgelegt von
Frau Charlotte v. Padberg
aus München
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Christian Schindlbeck
.....

Mitberichterstatter: Priv. Doz.. Dr. Doris Mayr
Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Wolfgang Janni

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 1.2011

*There is no end to our searchings. No generous mind stops within itself.
Its pursuits are without limit; its food is wonder, the chase, ambiguity.*

- Montaigne, Essays -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.2	Ätiologie des Mammakarzinoms	3
1.3	Histologie und TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	4
1.4	Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms.....	6
1.4.1	Operative Therapie	7
1.4.2	Adjuvante Strahlentherapie	8
1.4.3	Adjuvante Chemotherapie.....	8
1.4.4	Adjuvante endokrine Therapie	9
1.5	Isolierte Tumorzellen	10
1.6	Entwicklung des Nachweises minimal residualer Tumorerkrankungen bei soliden Malignomen	11
1.7	Zusammenfassung	13
2	Ziel der Arbeit	14
3	Patientenkollektiv und Methoden.....	15
3.1	Patientenkollektiv	15
3.1.1	Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms	15
3.1.2	Verlaufskontrolle.....	19
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Durchführung der Knochenmarksaspiration	19
3.2.2	Aufbereitung des Knochenmarkspirats und Detektion zytokeratin-positiver Zellen	21
3.2.3	Nachbeobachtung	27
3.2.4	Statistische Methoden	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Charakteristika des Gesamtkollektivs.....	31
4.2	Nachbeobachtungszeitraum	43
4.3	Überlebenszeiten.....	57
4.4	Inzidenz Disseminierter Tumorzellen im Knochenmark beim primären Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.....	76
5	Auswertung.....	90

5.1	Untersuchung der Basischarakteristika in Verbindung mit dem Auftreten eines Rezidivs.....	90
5.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms und prognostische Bedeutung.....	92
6	Diskussion	95
6.1	Forschungsstand	95
6.2	Kontroversen in der Methodik des Nachweises disseminierter Tumorzellen	101
7	Zusammenfassung.....	105
8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	107
9	Danksagung.....	110
10	Tabellen und Abbildungen.....	111
10.1	Tabellen	111
10.2	Abbildungen	111
11	Lebenslauf.....	114
12	Appendix	115
12.1	Stadieneinteilung des Mammakarzinoms	115
12.2	Einteilung der Differenzierungsgrade des Mammakarzinoms	120
12.3	Patientinnenaufklärung für die Knochenmarkspunktion	121
13	Literaturverzeichnis.....	123

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom war bis in die 80er Jahre eine der Öffentlichkeit noch recht unbekannte und in ihrem Schweregrad weithin nicht abschätzbare Erkrankung. Erst durch die Krankheit einiger bedeutender Frauen, wie Betty Ford oder Nancy Reagan, trat der Brustkrebs mit seinen weitreichenden gesellschaftlichen Folgen mehr und mehr in das öffentliche Bewusstsein, dessen Sinne durch weitere Veröffentlichungen von Krankheitsberichten wie der von Nancy Binkers¹ als auch durch für Laien verständliche Statistiken² geschärft wurden. Zwischen 1980 und 1990 erkannten auch Politik und Justiz ihre Verantwortung zum Handeln und entwickelten Gesundheitsprogramme, wie zum Beispiel das bayrische Mammographie-Screening, welche sich im verstärkten wissenschaftlichen Sinne der Erforschung zur Bekämpfung des Brustkrebses und einer gezielten Früherkennung widmeten.¹ Ferner wurde aus gesundheitspolitischer Sicht versucht, Standards zu den bisher bildgebenden Verfahren wie der Mammographie zu überarbeiten und zu verbessern, um ein möglichst erfolgreiches frühdiagnostisches System für die weibliche Bevölkerung zu entwickeln.² Bayern führte im April 2003 ein flächendeckendes Mammographie-Screening Programm (BMS) ein, welches 2006 positiv evaluiert wurde.³

Das Mammakarzinom bezieht sich auf Krebsarten, welche aus dem Brustparenchym, meistens aus dem Epithelgewebe der Milchgänge oder den Läppchen, welche die Kanäle mit Milch versorgen, entstehen. Krebsarten, die aus den Kanälen entstehen, werden als ductale Krebsgeschwüre bezeichnet und diejenigen welche aus den Läppchen entstehen, sind als lobuläre Krebsgeschwüre bekannt.^{4,5,6} Es gibt viele verschiedene Arten des Mammakarzinoms, mit verschiedenen Stufen (Ausbreitung), Aggressivität und genetischen Merkmalen. Das Überleben variiert in starker Abhängigkeit von diesen Faktoren. Es sind computergestützte Modelle verfügbar, damit eine Überlebensprognose gestellt werden kann. Ein 10-jähriges erkrankungsfreies Überleben, unter Berücksichtigung der besten Behandlung, abhängig vom Szenario, variiert zwischen 98% und 10%. Eine Behandlung umfasst

Chirurgie, Pharmazeutika (hormonelle Therapie und Chemotherapie) und Strahlentherapie.⁴

Die Inzidenz steigt mit dem Alter in der gesamten Lebensspanne in den westlichen Ländern, wenngleich die Zuwachsrate bis zum Alter von 50 Jahren größer ist, als über 50 Jahren. Das Mammakarzinom ist bei gut situierten Frauen mit hohem Bildungsniveau häufiger als in bildungsfernen Schichten, bei unverheirateten Frauen, bei Frauen in städtischen Gebieten und bei Hellhäutigen höher als bei Multipigmentierten, zumindest bei denen über 50 Jahren. Frauen in den nordamerikanischen und nordeuropäischen Ländern haben das höchste Risiko für ein Mammakarzinom, Frauen in den südeuropäischen und lateinamerikanischen Ländern haben ein mittleres Risiko und Frauen in Afrika und in asiatischen Ländern haben das geringste Risiko. Dennoch wurden schnelle Zuwachsraten sowie die Zunahme an Ereignisraten in den letzten Jahren in vielen asiatischen, mitteleuropäischen, und einigen südamerikanischen Länder bemerkt.^{7,8,9}

Heute ist das Mammakarzinom das häufigste Malignom der Frau und zählt europaweit mit einer Mortalität von knapp 50%¹ zu den häufigsten Neoplasie bedingten Todesursachen. Insgesamt erkranken weltweit zwischen 14 und 21% der Frauen, in Deutschland ca. 18% in ihrem Leben, d.h. bei jeder achten bis elften Frau wird ein Mammakarzinom diagnostiziert.¹⁰ Laut der Todesursachenstatistik verstarben in Deutschland 2007 16 780 Frauen an einem Mammakarzinom.¹¹ Die Inzidenz für die Bundesrepublik Deutschland liegt bei jährlichen 57 000 Neuerkrankungen, von denen ca. 6% der Erkrankten jünger als 40 Jahre sind.¹¹ Derzeitige Statistiken zeigen eine Zunahme der Neuerkrankungen gerade bei jüngeren Frauen, denn jährlich versterben fast 17 592 Frauen in der 3. bis 5. Lebensdekade an einem Mammakarzinom und seinen Folgen.¹¹ Während die Zahl an Neuerkrankungen bei Brustkrebs seit 1980 weiter ansteigt, nimmt die Sterblichkeit seit Mitte der 1990-er Jahre leicht ab.¹²

1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms

Die ätiologischen Faktoren des Mammakarzinoms sind bislang noch unbekannt, obwohl manche Autoren vermuten, dass ein bestimmter Lebensstil als auch bestimmte hormonelle und genetische Dispositionen das Risiko einer Erkrankung erhöhen.¹³ Mehrere etablierte Risikofaktoren sind bei der Entwicklung eines Mammakarzinoms beteiligt^{14,15}, die in erster Linie dem Alter und dem weiblichen Geschlecht zugeordnet werden.^{16,15} Eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Mammakarzinomentwicklung besteht bei einer familiären Vorgeschichte, bei Verwandten des ersten Grades (d.h. Mutter, Schwester, Tochter), wenn der Krebs prämenopausal diagnostiziert worden ist. Bei diesen Frauen besteht ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko des sich entwickelnden Mammakarzinoms. Sollten mehrere Verwandte zweiten Grades an einem Mammakarzinom erkrankt sein, ist das Risiko einer Mammakarzinomentwicklung erhöht, jedoch wurde dieses Risiko bisher nicht quantifiziert. Etwa 8 Prozent aller Fälle des Mammakarzinoms sind erblich bedingt. Ungefähr die Hälfte dieser Fälle wird einer Mutation der zwei Mammakarzinom - Empfänglichkeitsgenen, BRCA1 und BRCA2 zugeschrieben.^{17,18,19} Erblich bedingtes Mammakarzinom tritt häufiger bei prämenopausalen Frauen auf, als das bilaterale nonhereditäres Mammakarzinom. Sind mehrere Familienmitglieder über mehr als drei Generationen von einer Mammakarzinomerkrankung betroffen, wird auch die väterliche Seite mit einbezogen. Zur Erkennung von BRCA- Mutationen stehen Screening- Tests zur Verfügung. Gentests sind jedoch umstritten und werfen zu viele Fragen über ihre Zuverlässigkeit und somit über die Verwendung von Testergebnissen auf.²⁰

Bei einer Brustbiopsie ist eine Erfassung der Vorgeschichte notwendig, weil z. B. eine proliferative Abnormität, wie eine atypische Hyperplasie, das Risiko einer Mammakarzinomentwicklung durch eine Biopsie vergrößern kann. Bei einer Mammakarzinomerkrankung in der Vorgeschichte, liegt das Risiko einer erneuten Mammakarzinomentwicklung bei 0,5 bis 1,0 Prozent pro Jahr. Weil eine konservative Behandlung bei Frauen bei erster Mammakarzinomerkrankung üblich ist, entwickeln sich viele zweite Mammakarzinomerkrankungen in derselben Brustdrüse. Eine frühe Menarche und eine späte Menopause sowie eine lebenslange Aufnahme von Hormonen beeinflussen das Risiko eines Mammakarzinoms. Auch Frauen, welche

ihr erstes Kind nach Erreichung des 30. Lebensjahres gebären oder noch nie schwanger geworden sind, sind ebenfalls einem erhöhten Risiko ausgesetzt. Offenbar beschleunigt eine Erhöhung der weiblichen reproduktiven Hormone die Zellteilung im Brustgewebe, dieses wiederum steigert das Risiko von Mutationen. Die Anwendung von oralen Kontrazeptiva kann minimal das Risiko eines Mammakarzinoms erhöhen, aber auch Frauen, welche orale Kontrazeptiva für weniger als 10 Jahre verwendet haben, haben das gleiche Risiko, wie Frauen, die sie nie verwendet haben.²¹ Es existieren viele Studien über die Gefahren zur Östrogen-Ersatztherapie (ERT). Während es ein gering erhöhtes Risiko mit ERT geben kann, wird dieses Risiko gewöhnlich durch die Vorteile von ERT aufgewogen.²² Weitere Risikofaktoren sind ein hoher Lebensstandard, Hellhäutigkeit und Exposition von ionisierender Strahlung, um ein Mammakarzinom zu entwickeln.⁸

Internationale Schwankungen der Mammakarzinomrate scheinen mit Variationen in der Ernährung zu korrelieren, insbesondere beim Fettkonsum.²³ Jedoch sind relevante diätetische Faktoren nicht fest etabliert. Andere Risikofaktoren, welche mit der Mammakarzinomentwicklung im Zusammenhang stehen können, werden zurzeit studiert und umfassen chemische Exposition, Alkoholkonsum, Übergewicht, Fehlgeburten und physische Inaktivität. Obwohl Frauen ihre geerbten und persönlichen Risikofaktoren nicht ändern können, können sie ihre Ernährungsgewohnheiten dahingehend verändern, dass der Faseranteil erhöht und der Fettanteil vermindert ist, sowie der Alkoholkonsum reduziert wird. Eine neue Studie zeigt²⁴, dass Tamoxifen, der auswählende Östrogen-Rezeptor-Modulator, die Gefahr des sich entwickelnden Mammakarzinoms reduziert. Raloxifen (eine ähnliche Zusammensetzung) kann auch das Risiko reduzieren.²⁵

1.3 Histologie und TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

Die am häufigsten beobachtete Variante in der Histologie stellt mit bis zu 80% das invasiv-duktales Karzinom dar. Weitere Varianten sind in prozentual abnehmender Reihenfolge das lobuläre Karzinom mit bis zu 15%, das medulläre Karzinom mit maximal 3% aller Befunde, das tubuläre Karzinom mit einer Spannbreite von 1 bis maximal 15%, das muzinöse Karzinom mit einem geringen ein bis zwei %igen

Vorkommen und das papilläre Karzinom, welches in ein bis sieben Prozent der Fälle beobachtet wird.²⁶ Nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) wurde zur Einteilung der Stadien maligner Tumoren die TNM- Klassifikation gemäß der Idee von P. Denoix in den 50er Jahren eingeführt.²⁷

Das Mammakarzinom kann durch verschiedene Schemata klassifiziert werden. Dazu gehören z.B. das oben genannte Cancer Staging (TNM), die pathologische Klassifikation, die histologischen Grade, der Rezeptor-Status und das Vorhandensein oder Fehlen von Genen, die durch DNA- Tests ermittelt werden.

Die meisten Mammakarzinome sind aus dem Epithel der Gänge oder Läppchen abgeleitet. Krebserkrankungen aus anderen Geweben werden als „seltene“ Krebsarten angesehen. Ein Karzinoma in situ ist die Verbreitung von Krebszellen im Epithelgewebe ohne Invasion des umgebenden Gewebes. Ein invasives Karzinom infiltriert das umliegende Gewebe.⁴ Zellen, die sich sehr schnell teilen, haben eine schlechte Prognose. Eine Möglichkeit zur Messung des Zellwachstums eines Tumor ist mit der Anwesenheit des Proteins Ki67 gegeben, das anzeigt, dass die Zelle in der S Phase ist, die auch eine Empfänglichkeit für bestimmte Behandlungen anzeigt.²⁸

Wenn Zellen differenziert werden, nehmen sie unterschiedliche Gestalten und Formen an, um als ein Teil eines Organs zu fungieren. Krebs befallene Zellen verlieren diese Differenzierung. Die Zellen welche normalerweise für den Gewebeaufbau von Milchgängen fungieren, werden in Ihrer Funktion desorganisiert. Die Zellteilung wird nicht kontrolliert und die Zellkerne entwickeln sich nicht gleichförmig. Die Pathologen beschreiben die Zellen auch als: gut differenziert (low grade), mäßig differenziert (intermediate grade) und schlecht differenziert (high grade). Schlecht differenzierte Tumore haben eine schlechtere Prognose.^{29,30,31,32}

Die Zellen verfügen über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und in ihrem Zytoplasma und im Nukleus. Chemische Botenstoffe binden sich an Rezeptoren und diese Verbindung führt zu Veränderungen in der Zelle. Es können in den Mammakarzinomzellen wichtige Rezeptoren vorhanden sein: Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und HER2 (human=menschlich, Epidermal=an

der Zelloberfläche befindlich, Wachstumsfaktor-Rezeptor Nr.2). Zellen mit diesen Rezeptoren sind ER-positiv (ER+), negative ER (ER-), positive PR(PR+), negative PR (PR-), HER2-positiv (HER2+) und HER2-negativ (HER2-). Zellen mit keinem dieser Rezeptoren werden basale oder dreifach-negative Zellen genannt. Alle diese Rezeptoren werden durch Immunhistochemie identifiziert.

Laut der aktuellen Risikoklassifizierungen des internationalen Brustkrebskongresses in St. Gallen 2007 wurden folgende Kategorien festgelegt: niedriges, mittleres und hohes Risiko.³³ Die Risikogruppen wurden nach den Kriterien Lymphknoten positiv/negativ, Östrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR), HER2 und Alter eingeteilt.

Andere molekularbiologische Tumorparameter werden ebenfalls diskutiert wie zum Beispiel die Plasminogen-Aktivatoren (uPA, wobei u für den Urokinase-Typus steht) als auch deren Inhibitoren (PAI-1, PAI-2), jedoch ist deren prognostische Validierung bislang noch unausgereift und bedarf weiterer Betrachtung.^{34,35,36}

Auch wenn zum Zeitpunkt der Primärdiagnose meist keine Fernmetastasen festgestellt werden, können diese dennoch im weiteren Verlauf der Erkrankung auftreten.³⁷ Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 81% und die 10-Jahres-Überlebensrate bei 68%, wahrscheinlich als Folge minimaler Residuen des Tumors.³⁸

1.4 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

Zu den heute gängigen Untersuchungen in der Frühdiagnostik des Mammakarzinoms gehören zum einen die regelmäßige Selbstuntersuchung als auch die ärztliche Untersuchung der Brust und in fortgeschrittenen Lebensdekaden oder bei Verdacht die Mammasonographie, Mammographie und Kernspintomografie.²⁶ Liegt ein unklarer Befund oder ein bestätigter Verdacht durch die bildgebenden Verfahren vor, so werden minimal-invasive diagnostische Methoden angewandt, wie die Feinnadelpunktion, eine Biopsie oder eine Probeexstirpation.

Etwa 90 Prozent aller Brustgewebeveränderungen, werden durch gutartige Läsionen verursacht. Glatte und gummiartige Brustgewebeveränderungen werden in der Regel bei Frauen in den 20ern und 30ern mit Fibroadenomen und bei Frauen in den 30er und 40er Lebensjahren als Zysten assoziiert.⁴

Schmerzen in der Brust präsentieren sich als eine undifferenzierte Problematik.³⁹ Eine Mastodynie wird selten mit einem Mammakarzinom assoziiert und steht normalerweise mit Mastopathie bei prämenopausalen Frauen im Zusammenhang. Bei postmenopausalen Frauen, welche eine Östrogen Ersatz-Therapie erhalten, können die Schmerzen in der Brust auch durch eine Mastopathie verursacht werden. Der Schmerz, der fibrozystischen Bedingungen, wird mit einer diffusen klumpigen Brust assoziiert.⁴⁰

Rötungen, Schwellungen und Vertiefungen der Haut oder der Brustwarze werden mit malignen Erkrankungen assoziiert. Ein weiteres häufiges Problem präsentiert sich in der Mamillensekretion. Eine Entleerung aus einem Mammakarzinom ist in der Regel spontan, blutig und verbunden mit einer Verdickung, die sich um einen einzigen Kanal in der Brust herum lokalisiert.⁴¹ Eine Verdickung, die auf ein Mammakarzinom schließen lässt, ist in der Regel separiert, diskret und verhärtet. In einigen Fällen ist die Verdickung an der Haut oder einem Muskel fixiert. Eine verdächtige Verdickung ist häufig einseitig und nicht schmerzhaft. Ein Erstmammakarzinom wird selten bilateral diagnostiziert.

1.4.1 Operative Therapie

Aufgrund der modernen Medizin und früher Diagnostik lassen sich mehr als die Hälfte alle Mammakarzinome durch eine chirurgische Intervention brusterhaltend therapieren⁴², wobei zu beachten gilt, dass der palpable Tumor ohne die Resektion übermäßig gesunden Gewebes der sonst gesunden Patienten exstirpiert wird. In manchen Fällen ist eine radikale Mastektomie indiziert. Dies gilt bei Patientinnen, bei welchen der Primär sich multizentrisch ausdehnt; bei denen das Verhältnis von Tumor und Brustvolumen unausgewogen ist, die trotz mannigfacher Nachresektionen nicht als tumorfrei betrachtet werden, die sich die Mastektomie

selbst wünschen; die einen expansiven Befall der Haut durch Inflammation aufweisen.²⁷ Ferner kann auch im Rahmen zuvor formulierter Indikationen eine haalterhaltende Variante der Mastektomie durchgeführt werden, bei welcher der Hautmantel unter Resektion des Brustdrüsenparenchyms erhalten bleibt.²⁷

Abgesehen von der Tumorexstirpation besteht die therapeutische chirurgische Intervention des Mammakarzinoms auch aus einer systematisch durchgeführten Sentinellymphknotenbiopsie (SLNB). Vorteile liegen in der minimal-invasiven Methode, die ein genaues Staging erlaubt, ohne klinischen Lymphknotenbefund.⁴³ Eine Lymphadenektomie kann aufgrund von unterschiedlichen Faktoren notwendig werden. Für den zuverlässigen Befund der axillären Lymphknoten sollten mindestens zehn Lymphknoten aus den Staging Leveln pN 3 und pN 3a obligat sind.¹¹

1.4.2 Adjuvante Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist ein essentieller Bestandteil zur lokalen Kontrolle der Tumorausdehnung und wirkt sich bei einer Vielzahl von Patienten nachweislich positiv auf das Gesamtüberleben aus.⁴⁴ Als obligat gilt der Einsatz der adjuvanten Strahlentherapie im Rahmen der brusterhaltenden chirurgischen Interventionen. Sind die Lymphknoten massiv befallen, so werden auch die Thoraxwand und die infra- als auch supraklavikulären Lymphbahnen bestrahlt.

1.4.3 Adjuvante Chemotherapie

Das erste bekannte und erfolgreich angewandte Kombinationsschema setzte sich aus den Chemotherapeutika Cyclophosphamid (C), Methotraxat (M) und Fluorouracil (F) zusammen und zeigte in Studien einen signifikanten Benefit bezüglich der Rezidivfreiheit und auch bezüglich des Gesamtüberlebens.^{45,46} Heute werden in der Chemotherapie häufig Kombinationen verwendet wie AC (Adriamycin, Cyclophosphamid, EC (Epirubicin, Cyclophosphamid) FAC (Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid oder FEC (Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid), wobei derzeit keine Standardkombination existiert.^{33,47}

Zum jetzigen Stand der Forschung gilt es als gesichert, dass bei Patientinnen mit einem hoch endokrin-sensitivem, HER2-negativen Tumor, der wenig chemosensibel ist, eine Chemotherapie nicht viel Erfolg zeigt. In den letzten Jahren hat sich aber die Therapie auf der Basis von Anthracycline in Ergänzung mit Taxanen mehr und mehr durchgesetzt. Taxane werden als erfolgreich versprechend vor allem bei Patientinnen eingesetzt, deren Tumor nicht hormonrezeptiv ist.³³ In jüngster Zeit ist es in der Diskussion, ob Anthracycline als Standardkomponente einer adjuvanten Chemotherapie eingesetzt werden sollen, doch bis jetzt ist die Evaluation noch nicht abgeschlossen.

Aufgrund unterschiedlicher Faktoren wird eine Vielzahl der Frauen mit Mammakarzinom nach den gegenwärtigen therapeutischen Richtlinien neoadjuvant oder adjuvant systemisch behandelt.⁴⁸

1.4.4 Adjuvante endokrine Therapie

Grundlegende Bedingungen für das erfolgreiche Ansprechen einer adjuvanten endokrinen Therapie ist ein Hormonrezeptor-positives Mammakarzinom. Aus den drei Möglichkeiten der endokrinen Intervention stellt die Ovarsuppression bei Patientinnen in der Prämenopause eine Therapieoption dar. Hierbei werden Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Antagonisten verabreicht, die eine determinierte Suppression der Eierstockfunktion bewirken. Die Ovarsuppression ist auf mindestens zwei Jahre beschränkt und ist in ihrer Wirkung analog einer Zytostatika Behandlung.²⁷ Im Anschluss sollte eine Behandlung mit Tamoxifen, 20mg täglich, über fünf Jahre erfolgen. Patientinnen, die ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen, erhalten die Tamoxifenbehandlung obligat, und dies gilt als zweite Therapieoption bei Patientinnen in der Post- und Prämenopause.⁴⁹ Bei Patientinnen in der Postmenopause wird initial oder nach erfolgreicher Behandlung mit Tamoxifen ein Aromatase-Inhibitor verabreicht.⁵⁰

1.5 Isolierte Tumorzellen

Eine einzelne Tumorzelle wird als isolierte Tumorzelle definiert. Trotzdem zählen auch Konglomerate von einzelnen Tumorzellen, deren räumliche Ausdehnung nicht größer als ein Durchmesser von 0,2 mm ist, zu den isolierten Tumorzellen. Isolierte Tumorzellen lassen sich mit Hilfe immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden darstellen, wie beispielsweise mit der reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)⁵¹ oder mit der histochemischen Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Bei der HE-Färbung werden die angefertigten Schnittproben zunächst der Standardfärbung mit Hämatoxylin/Eosin unterzogen. Dabei färben sich im Wesentlichen die Zellkerne in Abhängigkeit von der Chromatinstuktur mit dem Farbstoff Hämatoxylin in unterschiedlicher Intensität blau an, wohingegen die Zelleiber durch Reaktion mit dem Farbstoff Eosin in unterschiedlichen Rottönen zur Darstellung kommen.⁵²

Ein Charakteristikum isolierter Tumorzellen ist der fehlende Hinweis auf Proliferation oder eine Penetration⁵⁰, welche typisch für Primärtumor und Metastasen sind. Erkrankte Patientinnen mit dem Befund disseminierter isolierter Tumorzellen im Knochenmark werden als M0 in der TNM-Klassifikation eingestuft.^{27,53}

Der Nachweis isolierter Tumorzellen gilt als Hinweis auf eine klinisch okkulte hämatogene Disseminierung von Tumorzellen in das mesenchymale Kompartiment des Knochenmarkes. Besonders effizient und aussagekräftig scheint der Nachweis isolierter Tumorzellen mit Hilfe eines Antikörper-Nachweises gegen Zytokeratinkomponenten.⁵⁴ Daneben wird isolierten Tumorzellen auch eine große Bedeutung bei der diagnostischen Evaluierung und Erfassung anderer solider Tumoren beigemessen wie beispielsweise dem Magenkarzinom⁵⁵, dem kolorektalem Karzinom⁵⁶, dem Ovarialkarzinom⁵⁷ und dem Prostatakarzinom⁵⁸.

Von molekularbiologisch besonderer Relevanz scheint der Nachweis der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zu sein⁵⁹, da sie funktionell eine systemische Komponente darstellen. Diese Aussage bekräftigen zwei große Untersuchungen an insgesamt 1279 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im UICC Stadium 1-3. Die Studien zeigten eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und dem Auftreten von

Fernmetastasen, was wiederum mit dem tumorbedingten Versterben der Patientinnen assoziiert war.^{60,61} Demnach unterstreicht die multivariante Analyse die prognostische Relevanz von Knochenmarksbefunden als unabhängigen Parameter.

1.6 Entwicklung des Nachweises minimal residueller Tumorerkrankungen bei soliden Malignomen

Heute misst man dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen in frühen Stadien solider Tumoren eine zunehmende klinische Bedeutung bei. Dies liegt hauptsächlich daran, dass man als Grund der Fernmetastasierung die hämatogene Streuung einzelner Tumorzellen ansieht.⁶² Nach Engells Entdeckung von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Krebspatienten im Jahre 1955⁶³ erschien in den 60er Jahren eine große Anzahl von Arbeiten, die sich mit dem zytomorphologischen Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen beschäftigten.⁶⁴ Es wurden jedoch falsch positive Nachweisraten von bis zu 96% festgestellt. Dies lag an der nicht ausreichenden Spezifität rein zytomorphologischer Nachweismethoden. Daher wurde die Detektion zirkulierender Tumorzellen als nicht durchführbar angesehen.

Ungefähr 20 Jahre später standen andere immunzytochemische Nachweismethoden zur Verfügung.⁶⁵ Die Problematik wurde jetzt als „Minimal Residual Disease“ (MRD) bezeichnet und eine Reihe sensitiver Testmethoden für verschiedene Tumorentitäten wie Neuroblastoma, Mamma- und Bronchialkarzinom entwickelt.^{66,67,68} Während die Nachweismethoden eine ausreichende Sensitivität aufwiesen, um eine Tumorzelle unter 100.000 bis 1.000.000 mononuklearen Zellen aufzuspüren, wurde die prognostische Bedeutung der mit diesen Methoden erhobenen Befunde wiederholt in Frage gestellt.⁶⁹ Kreuzreaktionen der eingesetzten monoklonalen Antikörper, vor allem mit hämatopoetischen Stammzellen, führten vielfach zu der Vermutung, dass falsch-positive Befunde erneut die Aussagekraft der Nachweismethoden beeinträchtigen könnten.^{59,70,71,72}

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird seit den „Achtziger Jahren“ zum Nachweis von MRD bei verschiedenen Malignomen eingesetzt.^{73,74} Sie ist eine in

in vitro Methode, welche durch Anwendung von Oligonukleotidprimern in der Lage ist, spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und anschließend durch Färbung nachzuweisen.

Die Einführung der „reverse transcriptase“ (RT)-PCR, welche tumorspezifische mRNA amplifizieren kann, war eine der bedeutendsten Entwicklungen. Sie wurde zum ersten Mal bei der Detektion von t(9,22)-Translokationen bei chronisch myeloischer Leukämie eingesetzt.⁷⁵ Der Ansatz zum Nachweis von MRD basiert auf der Annahme, dass maligne Zellen mittels Transkription Marker exprimieren, die typisch für ihr Ursprungsgewebe sind. Ein Vorteil der RT-PCR gegenüber der konventionellen PCR ist, dass extrazelluläre RNA instabil ist und damit weniger falsch positive Resultate erzielt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Anzahl der RNA-Transkripte zu quantifizieren.⁷⁶ Bei der derzeitigen PCR-Technologie ist es möglich, 1 Tumorzelle in 1.000.000 – 10.000.000 mononuklearen Zellen nachzuweisen.⁷⁷ Allerdings gibt es auch einige Probleme, die den Vorzügen gegenüber stehen. Zwei davon sind besonders bedeutend: Zum einen ist es ungeklärt, welche genetischen Marker vor dem Hintergrund tumorspezifischer Heterogenität zum Nachweis von malignen Zellen am besten geeignet sind⁷⁸, zum anderen führt die illegitime Amplifikation und Transkription von epithelialen Markern, wie CK-19 oder tumorspezifischen Markern wie CEA oder HER2-neu, auf einem niedrigen Niveau erneut zu falsch-positiven Testergebnissen.^{79,80,81} Mittlerweile gibt es jedoch ein Einvernehmen, dass mit der Quantifizierung des Amplifikationsnachweises und der Definition eines geeigneten Schwellenwertes eine ausreichende Spezifität des molekularen Nachweises von disseminierten Tumorzellen erreicht werden kann.^{79,82,83} Die umfangreichste Erfahrung beim molekularen Nachweis von disseminierten Tumorzellen besteht mit den epithelialen Markern CK-19 und CK-20, wobei allerdings Uneinigkeit darüber herrscht, welcher der beiden Cytokeratine besser geeignet ist.^{79,80,81,84}

Heute gibt es noch keine ausreichenden Erfahrungen mit molekularen Nachweismethoden. Daher wird der immunzytochemische Nachweis von isolierten Tumorzellen im Knochenmark derzeit als die sicherste Detektionsmethode angesehen.⁵⁹ Die hier gemachten Untersuchungen wurden mit einem etablierten immunzytologischen Ansatz⁸⁵ durchgeführt. Die Kontroversen in der Methodik des

immunzytochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen werden im Kapitel 6.2 diskutiert.

1.7 Zusammenfassung

Der maligne Tumor der Brust, das Mammakarzinom, ist in Deutschland und auch europaweit eine der häufigsten Krebserkrankungen der Frau und die häufigste Todesursache. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken steigt mit steigendem Alter und ist abhängig von einer Vielzahl prädisponierender Faktoren. Daher ist eine effiziente Frühdiagnostik sinnvoll und obligat, da mit Hilfe frühzeitiger chirurgischer Interventionen, adjuvanter Strahlen – und Chemotherapie viele Patientinnen tumor- und rezidivfrei überleben können.

Eine erfolgreiche Primärtherapie verhindert jedoch nicht das Auftreten von Fernmetastasen, die häufig erst nach langer Latenzzeit auftreten.⁸⁶ Dies liegt ursächlich in der Persistenz einer minimalen residualen Tumorerkrankung.⁸⁷ Des Weiteren erlauben andere Faktoren wie Tumorgröße, axillärer Nodalstatus als auch das histopathologische Grading nur einen relativ geringen Spielraum für Prognosen für den Krankheitsverlauf. Zudem lässt sich das Risiko für das Auftreten eines Tumorrezidivs nur grob abschätzen. Daher bleibt die Ungewissheit nach einem individuellen Therapieerfolg bis zur Diagnostik eines Tumorrezidivs bestehen. Eine Chance zur zukünftig individuell angepassten Therapie bei erstdiagnostiziertem Mammakarzinom bietet die Erforschung minimaler Tumorresiduen.⁸⁸ Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose lassen sich bereits minimale Residuen im Knochenmark feststellen, selbst wenn eine R0-Resektion des Tumors durchgeführt wird.⁷²

Der immunhistochemische Nachweis disseminierter epithelialer Knochenmarkszellen gehört daher zu den erfolgversprechendsten prognostischen Determinanten⁸⁹ und ist nach neuesten Studien als ein unabhängiger Risikofaktor einzuschätzen.⁶⁵

2 Ziel der Arbeit

Motivation

„Divinum opus sedare dolorem.“

HIPPOKRATES.

Die klassische Prognose des Mammakarzinoms basiert auf der TNM-Klassifikation. Als Determinanten der Therapieindikation gelten hier neben Tumormorphologie und Befall des Lymphsystems auch die Hormonsensitivität und HER-2-Expression. Diese Parameter genügen jedoch nur mangelhaft bei unveränderter Mortalität als Index für eine optimale Behandlung, wobei auch weiterhin molekulargenetischen Markern im Rahmen der Beurteilung und Prognose von Tumoren und deren Therapie nur eine geringe Bedeutung zukommt. Zu diesen molekulargenetischen Markern zählen nicht nur die in der Praxis weithin bekannten Tumormarker, sondern auch die disseminierten Tumorzellen, welche als entscheidendes Charakteristikum zur Beurteilung und frühzeitigen Erfassung von Metastasen operieren, da sie als hämatogen gestreuter Keim des Primärtumors agieren.

Disseminierte Tumorzellen sind noch weitgehend unbekannt in ihren Funktionen, Relationen und Interaktionen. Daher sind sie gerade im Gebiet der Tumorausbreitung und Metastasierung das Objekt von Forschung und Wissenschaft.

Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erforschung der hämatogenen Metastasierung im Knochenmark bei Mammakarzinom. Dabei wurde der Fokus insbesondere auf die Datenanalyse zum Zeitpunkt der Primärdiagnose gelegt und mit den, bisher in der einschlägigen Literatur publizierten, Daten und Fakten diskutiert.^{60,61,90,91,92,93,94,95,96,97,98}

Im Einzelnen wurde das Ziel der Arbeit konzeptionell anhand folgender Fragestellungen erarbeitet:

- Wie hoch ist die Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bei Mammakarzinom? Korrelieren Quantität und Qualität der erfassten disseminierten Tumorzellen mit Tumorstadium und/oder speziellen Patientinnencharakteristika? (vgl. Kapitel 5.1 / 5.2)
- Besteht eine Assoziation zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose bei Mammakarzinom und dem Auftreten eines Tumorrezidivs? (vgl. Kapitel 5.1 / 5.2)
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer minimal residuellen Tumorerkrankung bei Patientinnen mit klinischer Rezidivfreiheit und der Überlebenswahrscheinlichkeit? (vgl. Kapitel 6.1)

Die vorliegende Arbeit gründet sich daher auf die Erfassung von Korrelation, Relationen und Assoziationen zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und speziellen Parametern zur prognostischen Abschätzung des Gesamtüberlebens der Patientinnen.

3 Patientenkollektiv und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms

Im Zeitraum von März 1994 bis Juni 2002 wurden an der I. Frauenklinik konsekutiv 500 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom untersucht. Vor Beginn der Primärtherapie erhielten die Patientinnen eine Knochenmarkaspiration. Patientinnen, bei denen eine primäre Fernmetastasierung oder ein Zweitmalignom vorlag, waren von der Untersuchung ausgeschlossen. Patientinnen mit multizentrischen und multifokalen Tumoren, einer Hämangiosis oder einer Lymphangiosis karzinomatosa waren nicht von der Studie ausgeschlossen. Weiteres Einschlusskriterium und obligat für jedwede iatrogene Intervention war das schriftliche Einverständnis der Patienten (vgl. Patientenaufklärung 12.3)

Vorab wurde präoperativ ein Menopausenstatus erhoben. Anschließend erfolgte die postoperative histologische Untersuchung des Primärtumors nach den Richtlinien der TNM-Klassifikation der UICC. Ferner wurden die Tumoren kategorisiert nach erkrankter Seite, Quadrant und histopathologischem Grading. Weiterhin wurde eine Hormonsensitivität mit dem Fokus einer positiven Östrogen- und Progesteronrezeptoraktivität untersucht.

Therapie des Primärtumors

Gemäß den unter 1.4.1. erwähnten operativen Therapieoptionen wurden die Patientinnen entsprechend der Ausdehnung des Primärtumors entweder brusterhaltend segmentektomiert (BET), eine Mamma-Ablatio oder eine subcutane Mastektomie durchgeführt. Konnte der Tumor in der Erstoperation nicht vollständig reseziert werden, so wurden die Patientinnen sekundär abladiert oder nachreseziert. Insgesamt wurde das Patientenkollektiv daher als R0-reseziert eingestuft.

Die axilläre Dissektion erfolgte anhand einer systematischen Entfernung der Lymphknoten der Level I und II. Bestand intraoperativ der Verdacht auf eine axilläre Lymphknotenmetastasierung und/oder war die Tumorgroße $\geq T_2$, wurden die axillären Lymphknoten ebenfalls entfernt und anschließend mit der lamellierten Paraffinschnitttechnik sorgfältig histologisch untersucht.

Die brusterhaltend operierten Patientinnen wurden im Anschluss an die chirurgische Intervention mit einer adjuvanten Telekobaltbestrahlung der Brust behandelt, wobei mittels tangentialer Gegenfelder mit Einzelfractionen von 1,8 - 2,0 Gray bis zu einer Gesamtdosis von 50-50,4 Gray bestrahlt wurde. Patientinnen nach Mastektomie und einer nachweislich bestehenden Lymphangiosis carcinomatosa wurden zusätzlich an der Thoraxwand bestrahlt. Bei medialer Tumorlokalisation wurden die Lymphknoten retrosternal entlang der Arteria mammaria interna bestrahlt. Lagen in mehr als drei axillären Lymphknoten Metastasen vor, so wurde auch die Infra-/Supraclavicularregion bestrahlt. Zur Sicherung einer individuell abgepassten Bestrahlung wurde der Bestrahlungsplan rechnergestützt auf Basis computertomographischer Aufnahmen modifiziert. Die Bestrahlung wurde 4-6 Wochen nach der Primärtherapie in Abhängigkeit von der Wundheilung begonnen.

Eine adjuvante Chemotherapie erhielten Patientinnen mit Mammakarzinom mit positivem Befund der Lymphknotenmetastasierung. Patientinnen mit positiver Östrogenrezeptorsensitivität erhielten statt der adjuvanten Chemotherapie eine Antiöstrogentherapie. Zum Studienzeitpunkt wurden Patientinnen, die drei metastatisch befallene axilläre Lymphknoten aufwiesen, chemotherapeutisch mit dem CMF-Schema behandelt. Wurden mehr als drei befallene Lymphknoten diagnostiziert, so erhielten die Patientinnen randomisiert entweder das EC/CMF-Schema (Epirubicin und Cyclophosphamid, gefolgt von CMF) oder das DE-Schema (Docetaxel und Epirubicin).

Alle unterschiedlichen Schemata wurden in der vorliegenden Arbeit als Chemotherapie zusammengefasst und entsprechen ausdrücklich nicht mehr den aktuellen Therapierichtlinien. Da die vorliegende Studie von 1994-2002 durchgeführt wurde gelten die chemotherapeutischen Schemata der damals etablierten Therapierichtlinien (s. Tab. 1). Nur wenigen Patientinnen wurde eine Hochdosistherapie mit Stammzellreinfusion verabreicht. Die unterschiedlichen Therapieansätze sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 1: Chemotherapieschemata Mammakarzinom. Es muss ausdrücklich darauf hin gewiesen werden, dass die in der Tabelle aufgeführten Schemata den Richtlinien des Studienzeitintervalls von 1994 bis 2002 und daher nicht den aktuellen Therapierichtlinien entsprechen. * Bezogen auf die Körperoberfläche

Schema	Substanz	Dosierung	Wiederholung
CMF	Cyclophosphamid	600 mg/m ² *	6xq3w
	Methotrexat	40 mg/m ² *	6xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m ² *	6xq3w
EC/CMF	Epirubicin	90 mg/m ² *	4xq3w
	Cyclophosphamid	600 mg/m ² *	4xq3w, anschl.
	Cyclophosphamid	600 mg/m ² *	3xq3w
	Methotrexat	40 mg/m ² *	3xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m ² *	3xq3w
DE	Docetaxel	75 mg/m ² *	4xq3w
	Epirubicin	90 mg/m ² *	4xq3w

Therapie bei Tumorrezidiv

Das therapeutische Vorgehen bei Patientinnen mit Tumorrezidiv unterscheidet sich chirurgisch durch eine erneute brusterhaltende chirurgische Intervention oder eine sekundäre Mastektomie.

Wurde ein Rezidiv der Thoraxwand nach Mastektomie diagnostiziert, wurde mit Hilfe einer großzügigen Exzision in sano reseziert. Eine sekundäre Strahlentherapie der Brustwand wurde sowohl bei Patientinnen mit rezidivumgebender Lymphangiosis oder Hämangiosis karzinomatosa, als auch bei Patientinnen mit schnittrandnahe Lokalrezidiv angewendet.

Da Patientinnen mit einem Lokalrezidiv kurz nach Primärdiagnose ein erhöhtes Risiko für eine Fernmetastasierung bergen, wurde eine sekundäre Chemotherapie nach dem EC-Schema (Epirubicin, Cyclophosphamid) oder eine taxanhaltige Infusion verabreicht. Als weitere systemische Behandlung wurden die Patientinnen einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen 20 mg/die oder mit Aromatasehemmer unterzogen.

Therapie bei Fernmetastasen

Abhängig von der Vortherapie, der Lokalisation, des Allgemeinzustandes und der prognostischen Gesamtsituation der Patientinnen wurde beim Auftreten von Fernmetastasen eine Kaskadentherapie gemäß den „*Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinom*“ des Tumorzentrums München durchgeführt.

Im Rahmen der therapeutischen Behandlung von Fernmetastasen auf endokriner Basis wurden selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMS), Aromatasehemmer, Gestagene und Gonadotropin-Releasing-Hormon Agonisten (GnRH-Analoga) eingesetzt. Bei ossären Metastasen mit entsprechender Schmerzsymptomatik oder der Gefahr pathologischer Frakturen wurden sowohl Strahlentherapie als auch Bisphosphonate eingesetzt.

3.1.2 Verlaufskontrolle

Die Primärtherapie des Patientinnenkollektivs erfolgte nach den in Kapitel 4.2 geschilderten Richtlinien. Die Nachsorge orientierte sich an den ‚*Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome*‘ des Tumorzentrums München.⁹⁹ In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Daten lokaler Rezidive, ossärer viszeraler und multipler Metastasen von Patientinnen aus den Jahren 1994 bis 2002 erfasst.

Die erhaltenen Basischarakteristika wurden den unterschiedlichen Therapie-schemata gegenübergestellt und im Vergleich zum Auftreten eines Rezidivs analysiert. Es soll an dieser Stelle nochmals eindringlich betont werden, dass die heutigen therapeutischen Behandlungsformen sich von denen des Studienzeitraumes unterscheiden und letztere daher nicht mehr dem heutigen Kenntnisstand entsprechen. Daher können Aussagen und hypothetische Formulierungen nur im Kontext der Therapierichtlinien zum Studienintervall betrachtet und diskutiert werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Durchführung der Knochenmarksaspiration

An der I. Frauenklinik der LMU München wurde die Knochenmarkspunktion ausschließlich im Bereich der Spina iliaca anterior superior von Mitgliedern des tumorimmunologischen Labors durchgeführt (s. Abb.1 unten und Abb.2, S.16). Im Rahmen des Primär-Screenings wurde diese Punktion bei Patientinnen mit klinischem Verdacht auf Mammakarzinom nach erfolgreicher Intubationsnarkose, aber vor Beginn der Primäroperation unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

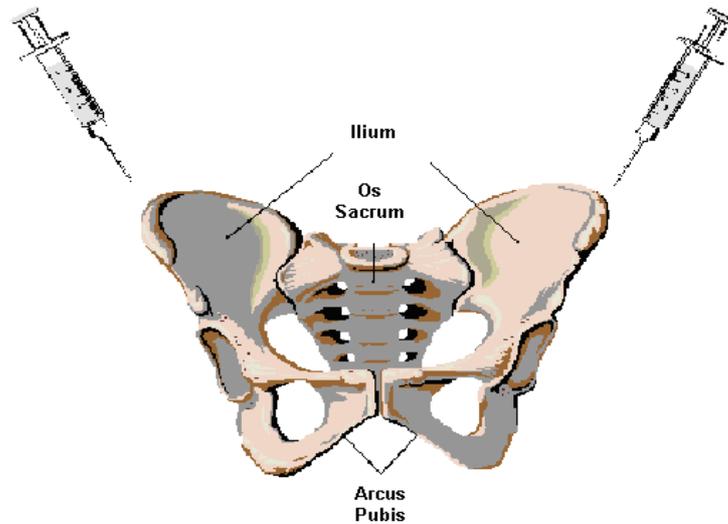


Abbildung 1: Punktionsstellen bei der Knochenmarkaspiration. Im Rahmen der Knochenmarkspunktion wurde das Ilium, das Os sacrum und der Arcus pubis punktiert.

Das Risiko einer möglichen Kontamination der Präparate mit epithelialen Zellen wurde durch eine Schnittinzision der Haut am Punktionsort weitestgehend gering gehalten. Aus beiden Beckenkämmen wurden 3 - 5 ml Knochenmark entnommen und mit 0,5 – 1 ml Natrium-Heparin versetzt. Anschließend wurden die Proben unmittelbar in das tumorimmunologische Labor gebracht, um dort nach dem in Kapitel 1.6 geschilderten Verfahren aufgearbeitet und untersucht zu werden.

Das schriftliche Einverständnis zum Eingriff und zur wissenschaftlichen Auswertung wurde von allen Patientinnen bereits vor der Punktion eingeholt. Zur Aufklärung diente das im Kapitel 12.3 beigefügte Merkblatt.

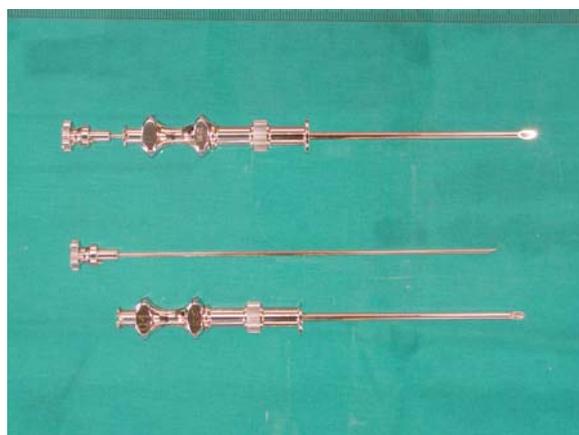


Abbildung 2: Knochenmarksaspirationsnadeln

Im Rahmen der Patientenaufklärung wurden alle punktionsbedingten Risiken wie Blutung, Infektion, Wundheilungsstörung als auch das erhöhte Verletzungsrisiko der Beckengefäße (Aa. und Vv. iliaca communis, iliaca interna et iliaca externa) und das Risiko einer Osteomyelitis ausführlich beschrieben.

3.2.2 Aufbereitung des Knochenmarkspirats und Detektion zytokeratin-positiver Zellen

Die hier beschriebene Aufbereitung des Knochenmarkes und die Detektion von zytokeratin-positiven Zellen erfolgte nach dem von Pantel et al. 1994 eingeführten und beschriebenen Protokoll.⁷² Die Aufbereitung des Knochenmarkes umfasste zwei grundlegende Arbeitsschritte: Das Anfertigen eines Knochenmarkszellen tragenden *Zytospins* und die *immunzytochemische Färbung* dieses Zytospins.

Zur Herstellung der *Zytospins* wurde das Knochenmark zunächst unter sterilen Bedingungen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Hankscher Lösung (Biocrom, Berlin) auf 50ml aufgefüllt und 10min bei 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei $r = 16$ (entsprechend 160g) in einer Hettich Zentrifuge Universal 30F bei einer Temperatur von 21 Grad Celsius zentrifugiert (Auslauf ungebremst). Durch diesen Vorgang wurden Plasma, Fettpartikel und Detritus aus der Probe entfernt. Das Aliquot wurde vorsichtig abpipettiert.

Die Zellsuspension (Pellet) wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Dichte 1,077g/mol) überschichtet. Die folgende Abbildung 3 zeigt die entsprechend vorbereiteten Zentrifugenröhrchen vor der Zentrifugation.

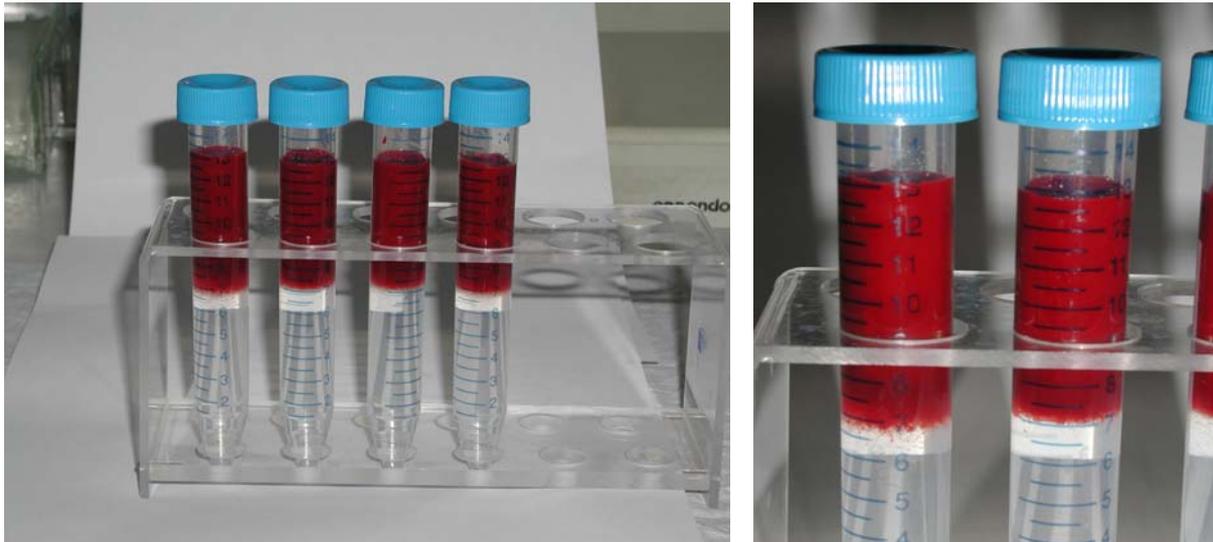


Abbildung 3: Aufbereitung des Knochenmarksaspirats. Zentrifugenröhrchen mit Zellsuspension und Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts)

Durch die Dichtegradientenzentrifugation bei 900g (2300rpm, 21 Grad Celsius) über 30min (Auslauf ungebremst) wurden Tumorzellen, Knochenmarkzellen und eine leukozytäre Fraktion aus der peripheren Blutbeimengung in der Interphase angereichert. Erythrozyten und Granulozyten gelangten weitestgehend in das Pellet. Die Abbildung 4 (S.18) zeigt die entsprechend vorbereiteten Zentrifugenröhrchen vor der Zentrifugation. Die leukozytäre Fraktion ist im rechten Bild als ‚Ring‘ zu erkennen. Die Interphase und die obere Phase wurden mit einer Pipette aufgenommen, in ein neues 50ml Röhrchen überführt und mit Phosphatpuffer (PBS, pH = 7,4) auf 50ml aufgefüllt.

Es folgte ein erneuter Zentrifugationsprozess über eine Zeit von 10min bei rpm 1600 und 4 Grad Celsius (Auslauf gebremst). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in PBS und auf 2-3ml resuspendiert.

Das Gesamtvolumen der Suspension wurde mit der Pipette bestimmt. Anschließend erfolgte eine volumengleiche Mischung von 10µl der eben bereiteten Suspension mit 10µl Trypanblau. Diese Farbsuspension ermöglicht sowohl eine mikroskopische Vitalitätsprüfung der Zellen, als auch die Bestimmung der Zelldichte. Die Auszählung der Zellen erfolgte in der Neubauer Zählkammer (Thomakreuz 25 Quadrate ausgezählt), wobei ein Sollwert von 50-300 Zellen/Quadrat angesetzt wurde.

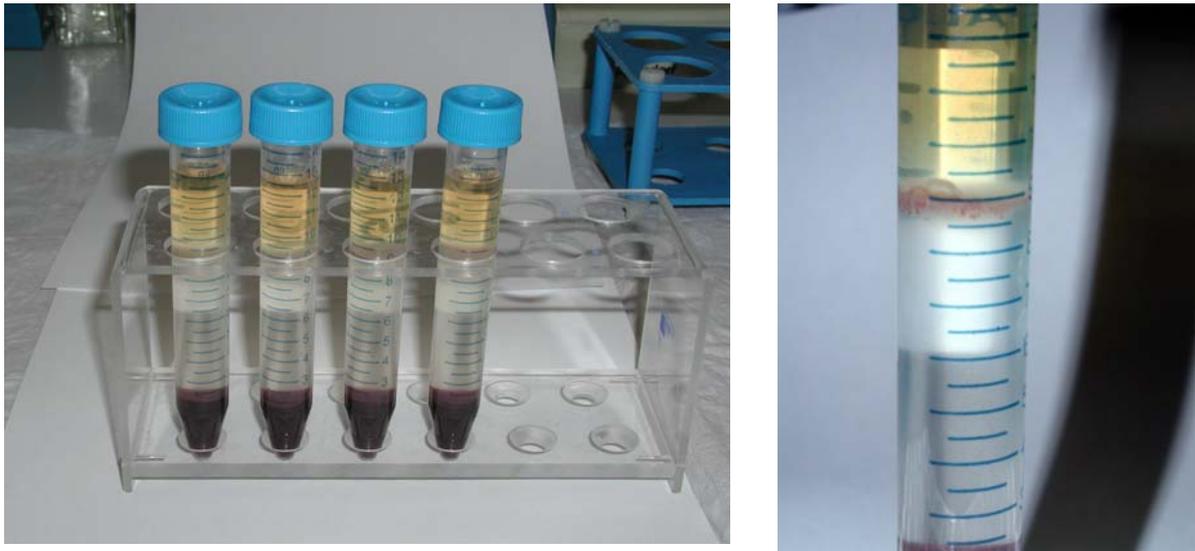


Abbildung 4: Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque. Zentrifugenröhrchen nach Zentrifugation mit Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts). Im rechten Bild kann man deutlich den „Ring“ der leukozytären Phase erkennen.

Zur Herstellung der Zytospins lässt sich das notwendige Aspirationsvolumen mit der Formel

$$Volumen = \frac{10^6 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Gleichung 1: Berechnung des Aspirationsvolumens.

berechnen. Durch das so ermittelte Aspirationsvolumen ist gewährleistet, dass die geschätzte Zellzahl von 10^6 Zellen pro *Zytospin* erreicht wird. Das Volumen wurde in eine 15 ml Zentrifugations-Tube (vgl. Abbildung 5) überführt und mit PBS auf 4 ml aufgefüllt. Nach Fertigstellung der Träger erfolgte die Zentrifugation über 3min bei 1000 rpm und Raumtemperatur auf einer Hettich Universal 30 F Zentrifuge (Auslauf gebremst).

Die so angefertigten *Zytospins* wurden nun 12 – 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.



Abbildung 5: Zentrifugations-Tube in der Hettich Universal 30 F Zentrifuge. Anschließend wurden die angefertigten Zytospins für 12 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Die *immunzytochemische Färbung* von mindestens vier Präparaten wurde mit dem monoklonalen Antikörper A45/B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik durchgeführt, da der murine monoklonale Antikörper A45-B/3 (Firma Micromet, Martinsried) vom Isotyp IgG-1 ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 erkennt. ^{129,131,134,135,166}

Das Antikörperserum wurde zunächst in PBS auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Applikation der Antikörper erfolgte über einen Zeitraum von 45min. Anschließend wurde dreifach mit PBS gewaschen und über 30min mit dem Rabbit-Mouse Brückenantikörper ZO2593 (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG-1, IgG-2a, IgG-2b, IgG-3 inkubiert. Nach Inkubation wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit dem APAAP-System (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG-1 (kappa) inkubiert. Die Substratlösung für die Entwicklung des Immuno-Enzym-Konjugates mit alkalischer Phosphatase besteht aus drei separat angesetzten Lösungen.

Lösung I enthält 90mg Levamisole [L-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phneylimidazo 2,1-b thiazole] und 62,5ml 0,2-molare Trislösung (Firma Sigma, Deisenhofen) in 250ml

destilliertem H₂O. Nach Zugabe von Lösung II (50mg Na NO₂ [Firma Merck, Darmstadt] in 1250 µl Aqua dest. und 500 µl 5% Neufuchsin [Firma Serva, Heidelberg] in 2-molarer HCL-Säure [Firma Merck, Darmstadt]) wurde Lösung III (125mg Naphtol-AS-BI-Phosphat [Firma Sigma, Deisenhofen] gelöst in 1500µl N,N-Dimethylformamid [Firma Sigma, Deisenhofen]) zugesetzt. Die Präparate verblieben 20min in der gefilterten Substratlösung. Die gewaschenen Präparate wurden feucht mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex (Firma Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen bedeckt.

Die mikroskopische Detektion der, nach dem geschilderten Protokoll angefärbten cytokeratin-positiven Zellen, erfolgte durch systematisches, manuelles Screening in der Durchlichtmikroskopie. Hier mussten alle der folgenden Kriterien erfüllt sein. (vgl. Abbildung 6)

- Nachgewiesene Zellintegrität bei der Vitalitätsprüfung der Zellen (durchgehende Zellmembran, Zellkern abgrenzbar)
- Zellen gleichmäßig angefärbt (sie dürfen intrazelluläre Granula haben)
- Im Phasenkontrast Bestätigung der Färbung und gut erkennbarer Zellkern
- Positivfärbung in gleicher Ebene mit den umgebenden Zellen

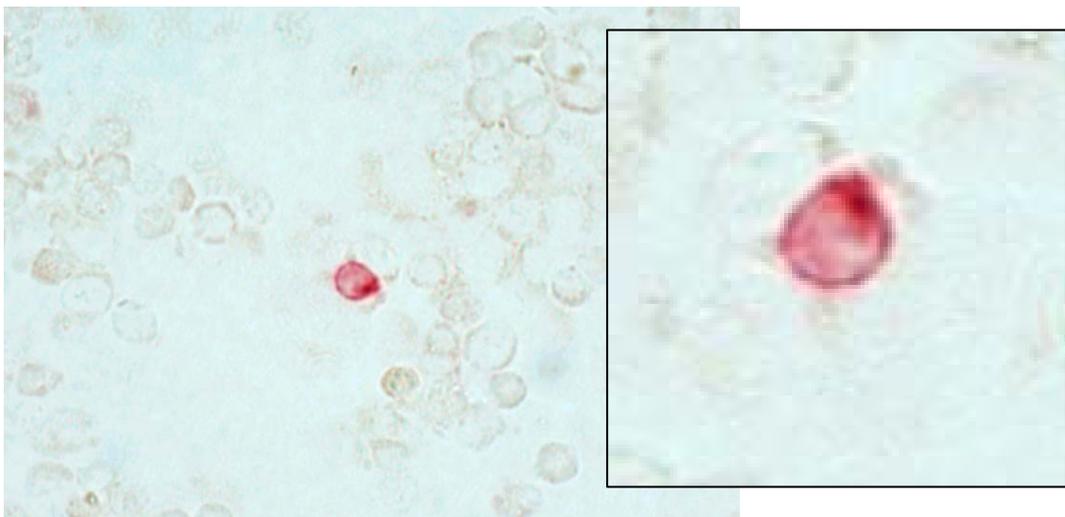


Abbildung 6: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkspirat. Das rechte Bild zeigt eine stark vergrößerte Ansicht der isolierten Tumorzelle in Bild links. Beide Aufnahmen zeigen eine Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle mit dem Antikörper A45B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik; zu beachten ist vor allem die fehlende Anfärbung der im Hintergrund erkennbaren Knochenmarkszellen.

Weitere pathomorphologische Kriterien wie etwa das Zellkern/Zellplasmaverhältnis wurden nicht angewendet. Diese definierten Kriterien galten sowohl für singuläre isolierte Tumorzellen als auch für so genannte Zellcluster (vgl. Abb. 7), also Konglomerate von mindestens zwei, meist mehreren zytokeratin-positiven Zellen. Alle Präparate mit positiven Färbereignissen wurden von zwei unabhängigen Gutachtern ohne Kenntnis der Tumorentität und des Tumorstadiums analysiert. Nur bei Übereinstimmung der beiden Gutachter wurde das positive Färbereignis als Tumorzelle klassifiziert.

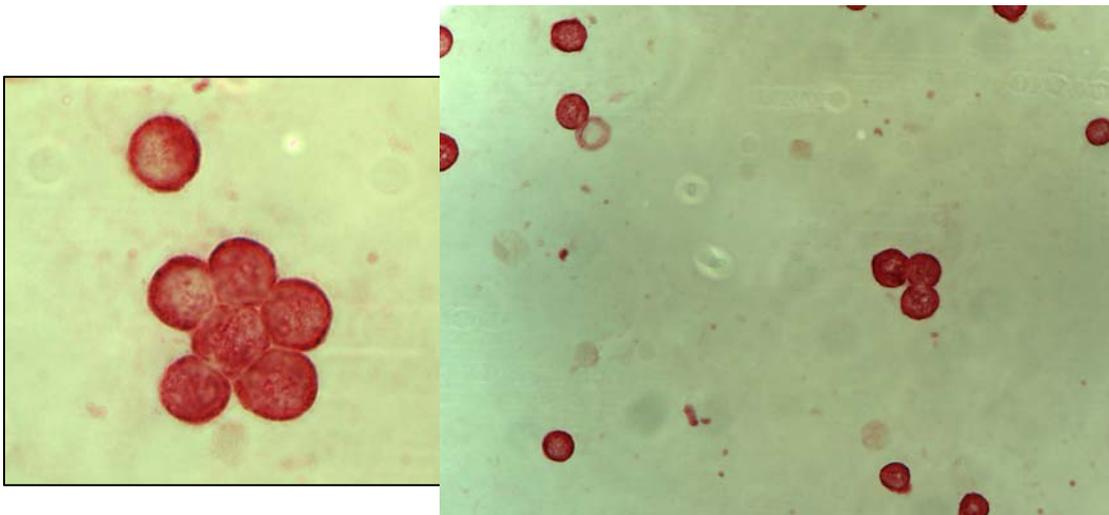


Abbildung 7: Positivfärbung eines Zellclusters von Mammakarzinomzellen (mit Detailansicht)

Positive Färbereignisse, welche die oben genannten Kriterien nicht erfüllten, wurden als Artefakte eingestuft.

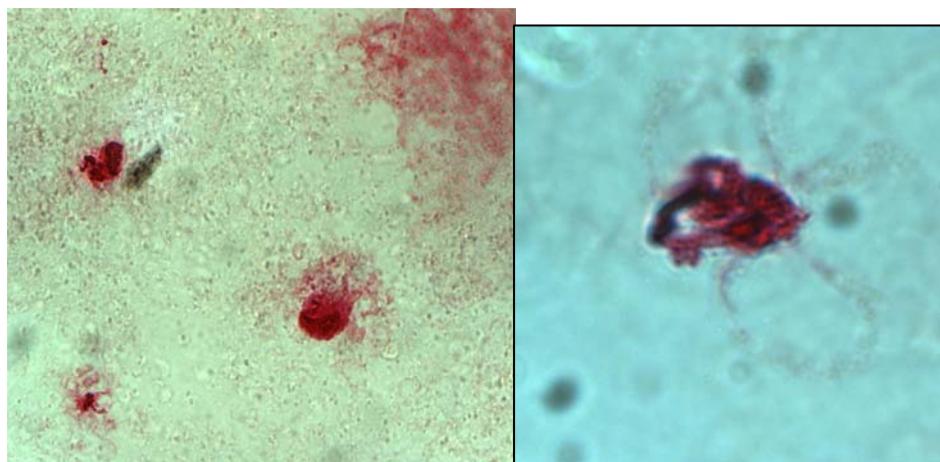


Abbildung 8: Angefärbte Artefakte im Knochenaspirat

Für die Positivfärbung von Artefakten, im Gegensatz zu Tumorzellen, sprachen vor allem folgende Kriterien (Beispiele in Abbildung 8 oben):

- Starke Kaliberschwankungen im Färbeereignis
- Unregelmäßige, kantige, bizarre Oberfläche des Färbeereignisses
- Positivfärbung in unterschiedlicher Ebene als die umgebenden Zellen

3.2.3 Nachbeobachtung

Der Verlauf der meisten Patientinnen wurde von der onkologischen Ambulanz der I.Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München verfolgt. Manchmal war es nötig, eine externe onkologische Nachsorge durchzuführen. In diesem Fall wurden in regelmäßigen Abständen die niedergelassenen Ärzte der Patientinnen darauf hingewiesen, den Gesundheitszustand der Patientinnen zu erheben. Während der ersten zwei Jahre nach Primärdiagnose oder Rezidivdiagnose erfolgten die Nachsorgetermine in drei-monatigen Abständen, in den darauffolgenden zwei Jahren im sechs-monatigen Intervall und anschließend jährlich. Um den Verlauf effizient zu erfassen, wurden Nachsorgeanamnese, körperliche Untersuchung und apparative Diagnostik durchgeführt.

Gemäß den ‚*Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome*‘ des Tumorzentrums München wurden im Rahmen der **Nachsorgeanamnese** folgende Fragen an die Patientinnen gerichtet:

- Haben Sie Veränderungen oder Knoten im Bereich des Operationsgebietes, der Restbrust, der Achseln oder der Brust der Gegenseite getastet?
- Haben Sie Beschwerden des Skelettsystems?
- Hat sich der Bauchumfang verändert?
- Haben Sie neuerdings Probleme mit der Atmung?
- Hat sich Ihr Gewicht verändert?
- Leiden Sie unter zunehmender Müdigkeit oder Leistungsschwäche?

Die **körperliche Untersuchung** umfasste die Gewichtskontrolle, eine komplette Brustuntersuchung, eine jährliche gynäkologische Untersuchung, Perkussion und Auskultation der Lunge, die Prüfung der Klopfschmerzhaftigkeit des Rumpfskeletts, die neurologische Orientierungsuntersuchung und die Beurteilung des Leistungsvermögens.

Zur routinemäßigen **apparativen Diagnostik** zählte die regelmäßige Mammographie und Mammasonographie der Restbrust und/oder der kontralateralen Brust. Bei klinischem Verdacht auf ein Rezidiv wurden weitere bildgebende Verfahren wie Skelettszintigraphie, Leber-sonographie oder Röntgenthorax durchgeführt.

Es wurden Unterschiede zwischen lokalen, viszeralen, ossären und multiplen Rezidiven festgelegt. Als lokales Rezidiv wurde jede Wiederkehr des Malignoms im Operationsgebiet der Mastektomie zwischen Mitte des Sternums und vorderer Axillarlinie sowie unterhalb der Fossa infraclavicularis und der 7. Rippe definiert. Ebenso zählten Wiedererkrankungen an der Pektoralismuskulatur sowie an den Faszien von M. serratus lateralis und M. obliquus externus zu diesem Rezidivtypus. Absiedelungen in knöchernen und viszeralen Bereichen wurden als ossäre und viszerale Metastasen bezeichnet. Alle anderen Absiedelungen des Tumors wurden als multiple Metastasen bewertet.¹⁰⁰

Der Verlauf der Patientinnen galt als beendet, wenn die Patientin nicht mehr in der onkologischen Sprechstunde oder in den ambulanten Zentren erschien oder verstorben war. In den Gesamtüberlebenskurven wurden nur die Todesfälle gewertet, die kausal mit der Erkrankung des Mammakarzinoms in Verbindung standen. Daraufhin wurden sie mit dem Tumorregister¹⁰¹ verifiziert, deren Vergleich nach dem Log-Rank-Test angelegt ist. Die multivariate Analyse erfolgt nach dem Cox-Regressions Modell.¹⁰²

3.2.4 Statistische Methoden

Vorgehen, statistische Verfahren und SPSS Prozeduren

Zum Einsatz kam das Statistikpaket „Statistical Package for the Social Sciences 11,5 und 12,0“.¹⁰³ Die Tumorstadien wurden gemäß der TNM-Einteilung der „Union International Contre le Cancer“ (UICC) eingeteilt.^{104,105} Im Folgenden wurden die angewandten statistischen Verfahren vorgestellt. In Klammern sind jeweils die per Maus angesteuerten Namen der SPSS Prozeduren angegeben, die in dieser Analyse zum Einsatz kamen.

Vorbereitende Arbeiten

Die zur Verfügung gestellten Daten wurden um Labels für Variablen und Werte ergänzt und z.T. vom Typ alphanumerisch nach numerisch umkodiert. Eine Überprüfung auf Redundanzen im Datensatz (doppelte Datenzeilen, IDs, Personennamen) fiel negativ aus. Am Anfang der Auswertung wurden die Daten unabhängig von den formulierten Hypothesen einer sog. EDA (Explorative Datenanalyse, Prozedur EXAMINE) vorrangig zur weiteren Überprüfung der Datenqualität unterzogen. In den Originaldaten festgestellte Fehler wurden korrigiert; z.B. enthielt die Variable zur Anzahl der untersuchten Lymphknoten die Anzahl der positiven Lymphknoten und umgekehrt. In mehreren Fällen wurden auch fehlerhafte (zum Beispiel negative) Datumsangaben entfernt.

Für bestimmte Analysen war die Neuberechnung von Variablen erforderlich. Die Differenz zwischen dem letzten Datum des Vitalstatus und dem Datum der Knochenmarkspunktion wurde zum Beispiel als Überlebenszeit in Tages- und Monatseinheiten in sondierende Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier)¹⁰⁶ einbezogen.

Deskriptive Analysen

Im Anschluss an die Qualitätssicherung wurde eine systematische deskriptive Analyse durchgeführt. Die deskriptive Analyse forderte u.a. gruppierte und nicht gruppierte Häufigkeitstabellen (Kreuztabellen) und Mittelwertstabellen ein. Die grafische Analyse forderte u.a. gruppierte und ungruppierte Balkendiagramme für

Häufigkeiten und Mittelwerte an, darüber hinaus je nach Analyseziel gruppierte und ungruppierte Boxplots, Histogramme und NP-Plots.

Statistik

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden eine Vielzahl inferenzstatistischer Verfahren eingesetzt: Tabellenanalysen (exakt, asymptotisch), Gruppenvergleiche (parametrisch, nichtparametrisch), Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier)⁷² und das Verfahren der binären logistischen Regression. Das Verfahren der binären logistischen Regression wird an dieser Stelle nur skizziert.

Mittels bivariater Tabellenanalysen werden die Signifikanz und das Ausmaß des Zusammenhangs von kategorial skalierten Variablen untersucht. Die Tabellenanalysen werden sowohl asymptotisch, als auch exakt durchgeführt (Prozedur CROSSTABS). Die Teststatistik basiert generell auf dem Chi²-Test. Der Chi²-Test testet die Hypothese, ob Zeilen- und Spaltenvariable voneinander unabhängig sind. Bei 2x2-Tabellen wird der exakte Test nach Fisher berechnet.

Als Zusammenhangsmaße werden der Kontingenzkoeffizient, Phi, Cramer's V, die Korrelation nach Spearman und Kendall's tau-b¹⁰⁷ angefordert.

Der Kontingenzkoeffizient ist ein auf der Chi²-Statistik basierendes Zusammenhangsmaß und liegt immer zwischen Null und Eins. Null gibt an, dass kein Zusammenhang zwischen Zeilen- und Spaltenvariable besteht. Werte nahe der Eins deuten auf einen starken Zusammenhang zwischen den Variablen hin.

Als parametrischer Ansatz wird die einfaktorielle Varianzanalyse angewendet. Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse werden die Mittelwerte einer kontinuierlich gestuften abhängigen (Response) Variable über die Gruppen miteinander verglichen, die durch eine einzelne Klassifikationsvariable definiert werden. Der F-Test⁷³, der der Varianzanalyse zugrunde liegt, teilt die Gesamtvarianz in die Varianz, die durch die Unterschiede zwischen den Gruppen verursacht wird, und die verbleibende Varianz, die nicht durch das Modell, also den Gruppeneffekt, verursacht wird, auf. Der F-Test vergleicht also das Verhältnis der Varianzen zwischen bzw. innerhalb der Gruppen. Je größer der ermittelte F-Wert ist, umso wahrscheinlicher bzw. größer ist ein Gruppeneffekt.

Voraussetzungstests (u.a. Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen inkl. dazugehörigen Grafiken), Tests der Zwischensubjekteffekte (inkl. Modelltest, Power und Effektstärke), Schätzungen der Randmittel, paarweise Vergleiche (nur bei mehr als zwei Vergleichsgruppen sinnvoll), grafischen (Histogramm, PP-Diagramm) und statistischen Tests (Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest)⁷³ auf Normalverteilung der Daten bzw. Residuen. Zusätzlich wird eine unterstützende Berechnung über nichtparametrische Ansätze durchgeführt. Die Ergebnisse stützen sich gegenseitig. Sie hängen also nicht von einem besonderen statistischen Ansatz ab. Als nichtparametrischer Ansatz wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Der Mann-Whitney-U-Test (synonym: Wilcoxon-Test)⁷³ untersucht die Fragestellung, ob zwei unabhängige (auch ungleich große) Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen.

Die Überlebenszeitanalyse erlaubt die Überprüfung der Fragestellung, ob sich die Überlebenszeiten (in Monaten) (bei Berücksichtigung zensierter Fälle) zwischen den Stufen diverser Gruppierungsfaktoren unterscheiden. Standardmäßig werden die Kaplan-Meier-Analysen⁷² mit der letzten Rechtszensur berechnet, wenn Patienten den Zeitraum der Studie überleben oder aus nicht studienrelevanten Gründen versterben.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika des Gesamtkollektivs

Menopause

Das Patientinnenkollektiv setzte sich insgesamt aus 500 Patienten zusammen, von denen 144 Patientinnen (28,8%) ihre Menopause noch nicht und 347 Frauen (69,4%) ihre Menopause bereits erreicht hatten.

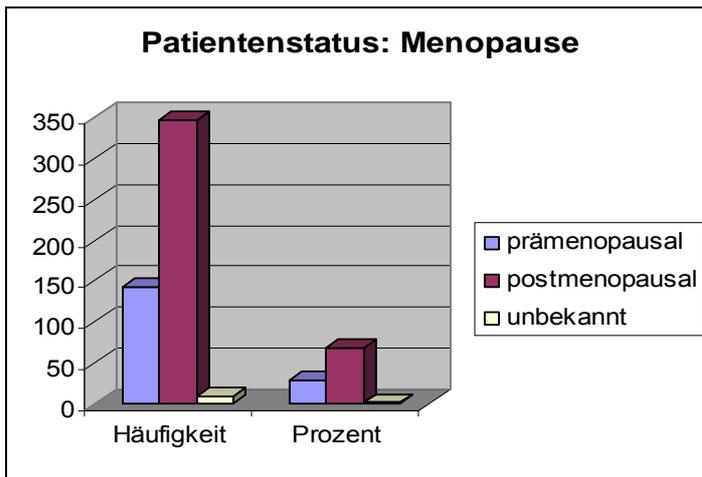


Abbildung 9: Menopause zum Zeitpunkt der Primärtherapie. Wie die Abbildung zeigt, hatten mehr als doppelt so viele der Patientinnen bei Primärtherapie bereits die Menopause durchlaufen.

Von den erfassten Patientinnen wurden Neun (1,8%) keinem Status zugeordnet. Die Standardabweichung betrug 12,9 bei einem Minimum von Eins und einem Maximum von 95. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass doppelt so viele postmenopausale Patientinnen in die Studie eingingen wie prämenopausale Patientinnen.

Betroffene Brustseite

Bei 260 Patientinnen befand sich der Tumor in der linken Brust (52%), wohingegen 232 Patientinnen einen rechtsseitigen Befund (46,4%) aufwiesen. Lediglich bei 8 Patientinnen (1,6%) konnte ein Tumorgeschehen auf beiden Brustseiten diagnostiziert werden. Das Kollektiv kann daher in Anbetracht des Seitenbefalls als nahezu ausgeglichen beschrieben werden.

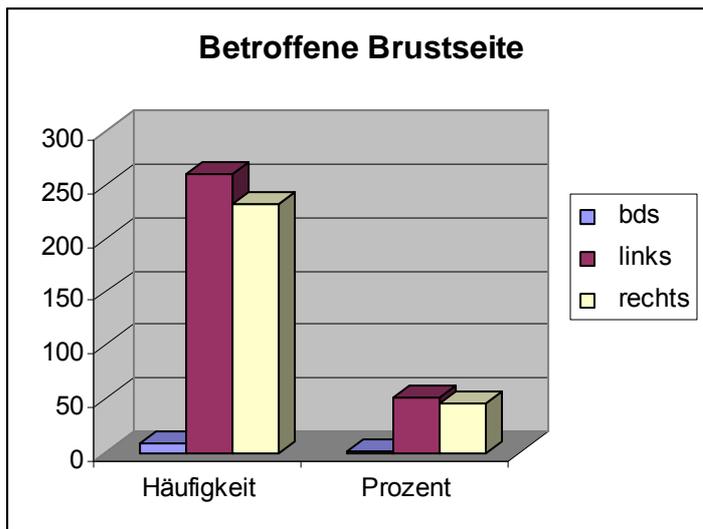


Abbildung 10: Betroffene Brustseite. Die Abbildung zeigt näherungsweise ein Gleichgewicht in der kollektiven Verteilung der betroffenen Brustseite.

Betroffener Quadrant

220 (44,0%) der diagnostizierten Tumoren befanden sich im äußeren oberen Quadranten.

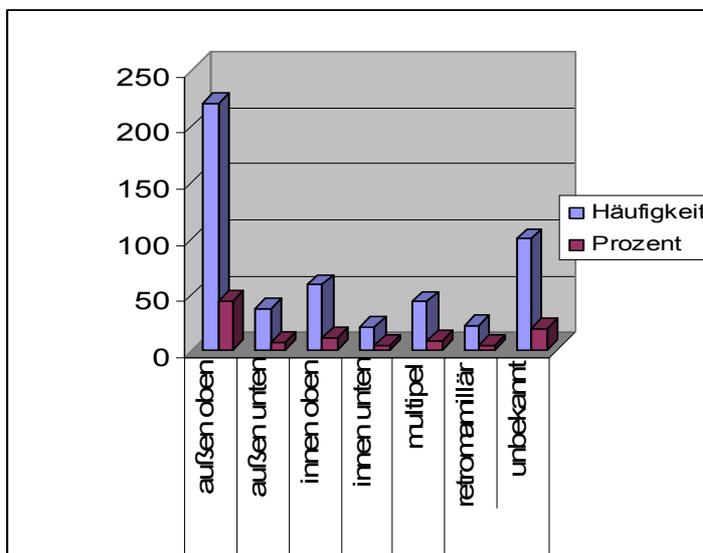


Abbildung 11: Betroffener Quadrant. Die Abbildung zeigt deutlich eine Präferenz des äußeren, oberen Quadranten im Kollektiv. In abnehmender Reihenfolge befand sich der Tumor innen-oben, multipel, außen-unten, retro-mamillär, innen-unten.

Bei 58 Patientinnen (11,6%) lag der Tumor im inneren oberen Quadrant, während er bei 43 Patientinnen (8,6%) multipel auftrat. Bei 99 Patientinnen (19,8%) wurde die Tumorlokalisierung keinem Quadranten zugeordnet.

Tumorhistologie

In der Tumorhistologie konnte bei 324 Patientinnen (64,8%) ein duktal-invasives Karzinom und bei 106 Patientinnen (21,2%) ein lobulär-invasives Karzinom festgestellt werden. Somit besteht eine deutliche numerische Präferenz zugunsten des duktal-invasiven Karzinoms innerhalb des Studienkollektivs.

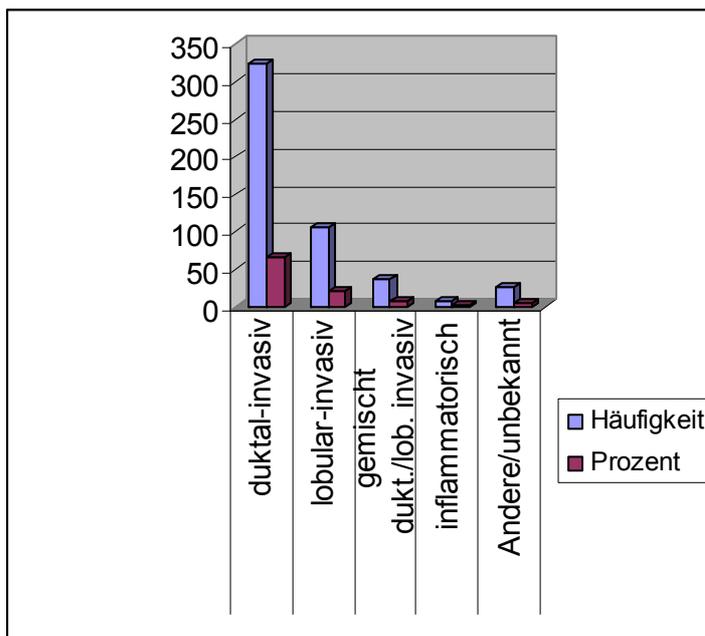


Abbildung 12: Tumorhistologie. Die Abbildung zeigt eine prominente numerische Häufigkeit sowie einen überlegenen prozentualen Anteil der duktal-invasiven Karzinome über das Gesamtkollektiv. Insgesamt zeigten 324 Patientinnen histologisch diesen Tumortypus.

Karzinoma in Situ

Von den insgesamt 500 Patientinnen zeigten 307 Patientinnen (61,4%) kein Carcinoma in situ (CIS), wohingegen 32 Patientinnen (6,4%) ein duktales Carcinoma in situ (DCIS) aufwiesen. Bei lediglich 3 Patientinnen (0,6%) konnte ein lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) diagnostiziert werden.

Weiterhin konnten 158 der Karzinome (31,6%) keiner der Krebsvorstufen zugeordnet werden.

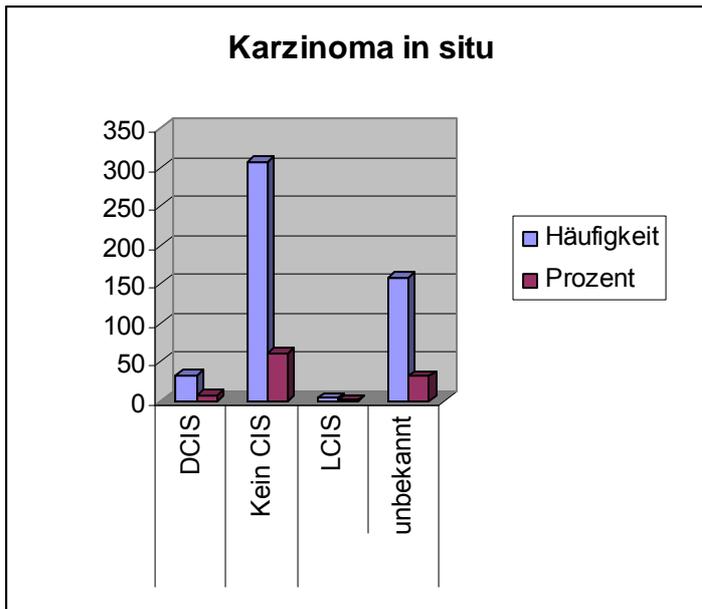


Abbildung 13: Carcinoma-in-situ. Die Abbildung zeigt einen hohen Anteil von Patientinnen, bei denen kein CIS diagnostiziert wurde. Nahezu ein Drittel der Karzinome konnte nicht kategorisiert werden.

Tumorgröße

Die Einteilung der Tumorgröße erfolgte anhand des TNM-Schemas (vgl. Kapitel 1.3). Insgesamt zeigte sich eine deutliche Präferenz der Tumorgröße T1c (1-2cm), die bei 220 Patientinnen (44%) erhoben wurde.

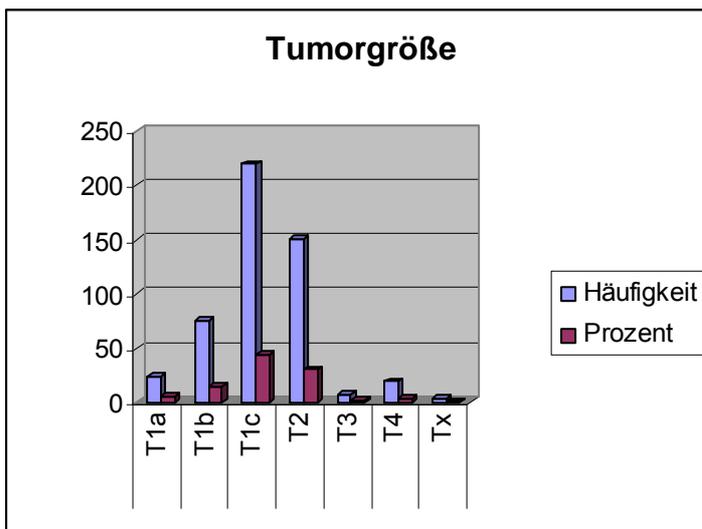


Abbildung 14: Tumorgröße. Die Graphik zeigt eine offensichtliche Präferenz der Tumorgrößen von 1-2 cm (T1c) und von Tumoren, die größer als 2 cm aber in ihrer Ausdehnung kleiner als 5 cm sind, innerhalb des Gesamtkollektivs.

Ferner wurde bei 151 Patientinnen (30,2%) ein Tumor der Größe T2 nach TNM (größer als 2 cm, jedoch kleiner als 5 cm) diagnostiziert. In abnehmender Reihenfolge wurden Tumoren der Größe T1b (0,5 cm<T<1 cm, 15%), T1a (T≤0,5 cm, 4,8%), T4 (Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut, 3,8%), T3 (T>5 cm, 1,4%) festgestellt. Nur in 0,8% der Fälle konnte der Primärtumor nicht beurteilt werden.

Tumordifferenzierungsgrad

Im Rahmen der Studie konnten unterschiedliche Differenzierungsgrade der Tumoren gemäß dem Grading nach UICC festgestellt werden. Bei 194 Patientinnen (38,8%) handelte es sich um ein mäßig differenziertes Karzinom. Dahingegen wiesen 143 Patientinnen (28,6%) ein schlecht differenziertes Karzinom auf. Bei 140 Patientinnen (28%) konnte das Karzinom keinem Differenzierungsgrad zugeordnet werden und 23 Patientinnen (4,6%) zeigten ein hoch differenziertes Karzinom.

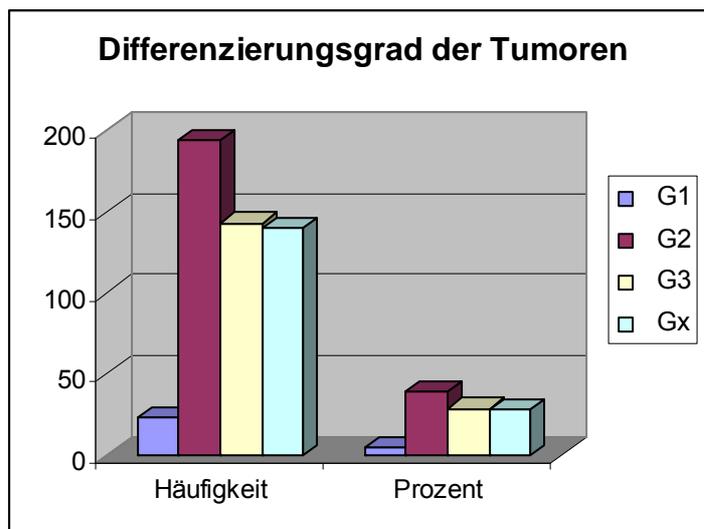


Abbildung 15: Differenzierungsgrad der Tumoren. In der Graphik ist deutlich eine numerische Präferenz zugunsten der mäßig differenzierten Tumoren zu erkennen.

Lymphknotenstatus

Insgesamt 255 Patientinnen (51%) der 500 Patienten hatten keine Metastasen in den Lymphknoten (Standartabweichung = 3,4). Bei 48 Patientinnen (9,6%) konnten die regionären Lymphknoten nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt).

Bei 9 Patientinnen (1,8%) konnten nur Mikrometastasen (kleiner als 0,2 cm) diagnostiziert werden. 43 Patientinnen (8,6%) hatten 1 bis 3 nodale Metastasen (größer als 0,2 cm, aber alle kleiner als 2 cm). Bei 8 Patientinnen (1,6%) waren 4 oder mehr Lymphknoten befallen. 79 Patientinnen (15,8%) zeigten eine Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel hinaus, blieben in ihrer größten Ausdehnung aber unter 2 cm. In 38 Fällen (7,6%) zeigten sich Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, die untereinander oder an anderen Strukturen fixiert waren.

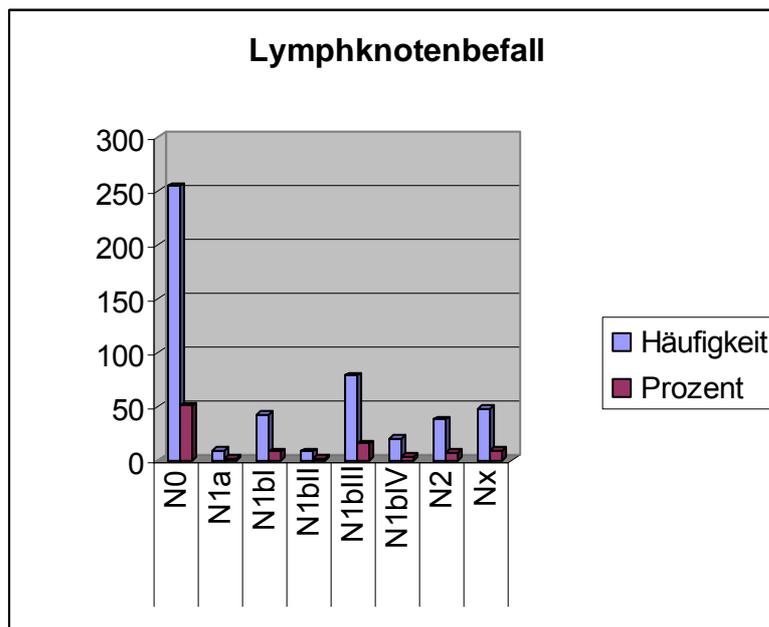


Abbildung 16: Lymphknotenbefall. Insgesamt waren mehr als die Hälfte der Patientinnen in den Lymphknoten metastasenfrei.

Östrogen Rezeptorstatus

Von den 500 Patientinnen zeigte sich in 323 Fällen (64,6%) eine positive Östrogenrezeptorsensitivität, wohingegen 148 der Mammakarzinome (29,6%) einen negativen Befund aufwiesen. Bei 29 Patientinnen (5,8%) konnte eine Östrogenrezeptorsensitivität nicht verifiziert werden.

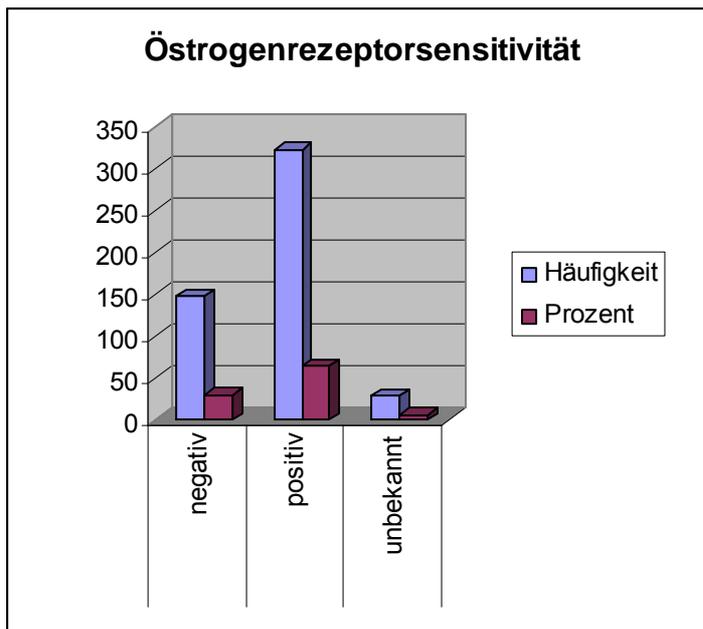


Abbildung 17: Östrogenrezeptorsensitivität. Bei mehr als der Hälfte der Patientinnen konnte ein positiver Östrogenrezeptorbefund erhoben werden.

Progesteron Rezeptorstatus

Auf das Gesamtkollektiv bezogen zeigte sich in 292 der Primärtumoren (58,4%) ein positiver Progesteronrezeptorstatus, wohingegen 176 der Mammakarzinome (35,2%) keine Progesteronrezeptoren aufwiesen und in 32 Fällen (6,4%) keine Zuordnung getroffen werden konnte.

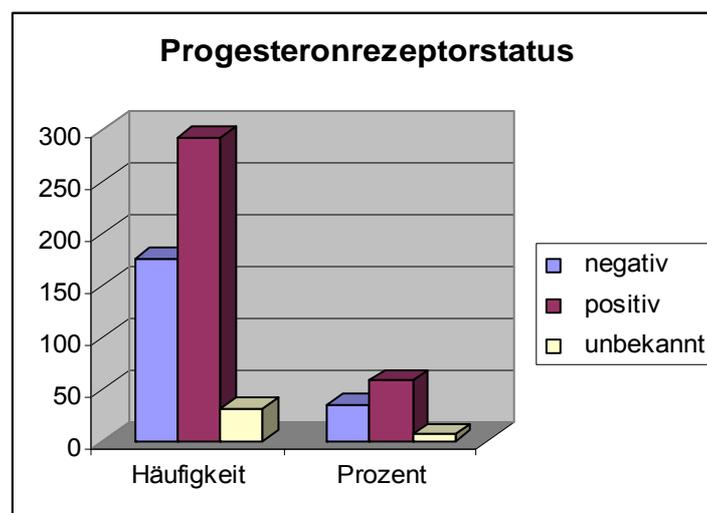


Abbildung 18: Progesteronrezeptorstatus. Die Abbildung zeigt eine deutliche numerische Häufigkeit zugunsten eines positiven Progesteronrezeptorstatus beim Primärtumor.

Multifokale Tumoren

Insgesamt zeigte sich bei 241 Patientinnen (48,2%) ein multifokaler Tumor, der in 237 Fällen (47,4%) nicht festgestellt werden konnte. Bei 22 Patientinnen (4,4%) konnte keine Zuordnung getroffen werden. Multizentrische Tumoren konnten bei 63 Patientinnen (12,6%) festgestellt werden. 402 Patientinnen (80,4%) wiesen keinen multizentrischen Tumor auf und bei 35 Patientinnen (7%) konnte keine Zuordnung getroffen werden.

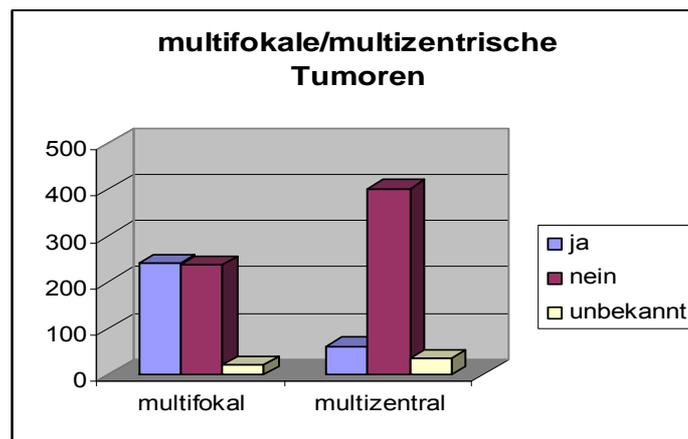


Abbildung 19: Multifokale/Multizentrische Tumoren. Insgesamt zeigte sich in nur 12,6% der Fälle ein multizentrischer, in 48,2% der Fälle ein multifokaler Tumor.

Lymphangiosis karzinomatosa und Hämangiosis karzinomatosa

Bei 108 Patientinnen (21,6%) konnte eine Lymphangiosis karzinomatosa diagnostiziert werden. 368 Patientinnen (21,6%) waren nicht betroffen und bei 24 Patientinnen (4,8%) konnte keine Zuordnung getroffen werden.

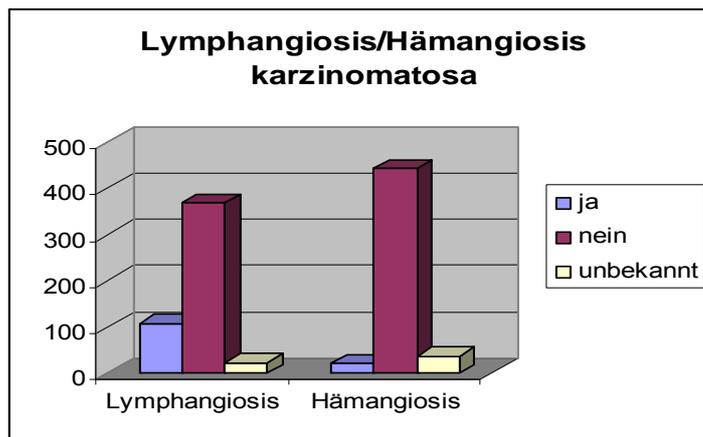


Abbildung 20: Lymphangiosis/Hämangiosis karzinomatosa. Nur 21,6% der Patientinnen zeigten eine Lymphangiosis karzinomatosa und 4,2% eine Hämangiosis karzinomatosa.

Im Gesamtkollektiv konnten zudem bei 442 Patientinnen (88,4%) keine und bei 21 (4,2%) Patientinnen eine Hämangiosis karzinomatosa beobachtet werden, wobei in 37 Fällen keine Zuordnung getroffen werden konnte.

Zytokeratin-Zellen im Knochenmarksaspirat

Aus dem vor der Primäroperation gewonnenen Knochenmarksaspirat konnten bei 109 Patientinnen (21,8%) zytokeratine Zellen beobachtet werden. Bei 391 Aspiraten (78,2%) fiel der Befund negativ aus.

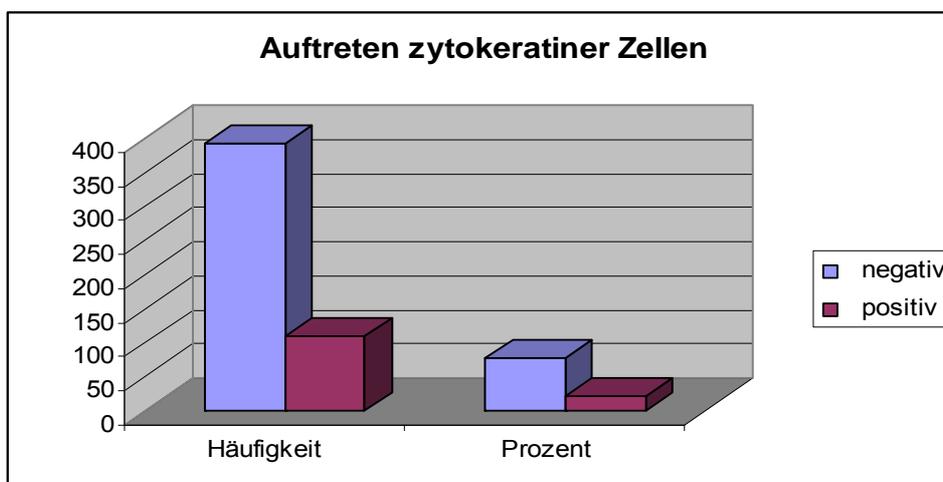


Abbildung 21: Auftreten von zytokeratinen Zellen im Knochenmarksaspirat. Die Abbildung zeigt, dass nur ca. ein Fünftel der Patientinnen einen positiven Zellbefund aufwiesen.

Primäroperation

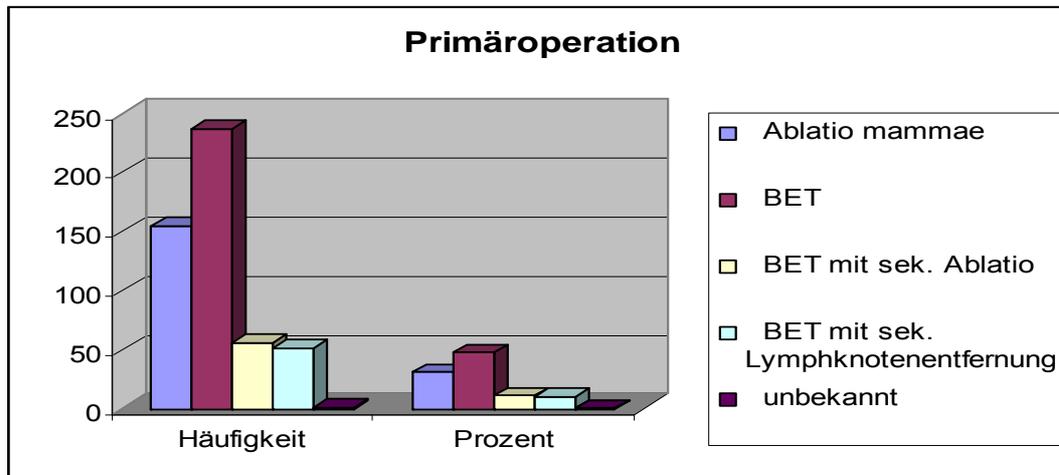


Abbildung 22: Primäroperation. Die Abbildung zeigt, dass die BET mindestens viermal häufiger durchgeführt wurde als die BET mit sek. Ablatio oder BET mit sek. Lymphknotenentfernung.

Im Rahmen der primär-chirurgischen Versorgung wurde in 155 Fällen (31%) eine Mamma-Ablatio und bei 237 Patientinnen (47,4%) eine brusterhaltende Operation, bei 56 Patientinnen (11,2%) eine brusterhaltende Exzision mit anschließender sekundärer Ablatio und bei 51 Patientinnen (10,2%) eine BET mit sekundärer Lymphknotenentfernung vorgenommen. Lediglich in einem Fall (0,2%) wurde die Operation keiner der Kategorien zugeordnet.

Systemische Therapie

Eine der vorgestellten kombinierten Chemotherapien erhielten je nach Indikation 132 Patientinnen (26,4%), wobei 5 Patientinnen (1%) eine hoch-dosierte (HD) Chemotherapie erhielten und 268 Patientinnen (53,6%) nicht chemotherapeutisch behandelt wurden.

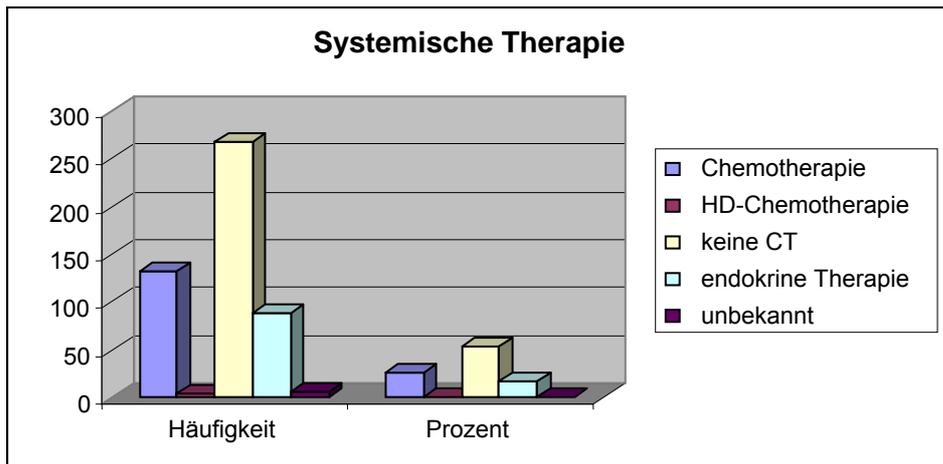


Abbildung 23: Systemische Therapie. Die Graphik zeigt, dass mehr als die Hälfte der Patientinnen nicht chemotherapeutisch behandelt wurde.

Insgesamt unterzogen sich 232 Patientinnen einer systemischen Therapie (46,4%). Die Chemotherapie (CT) wurde statistisch nach zwei Gesichtspunkten beurteilt: Hoch-Dosis (HD) und Nicht-Hoch-Dosis (NHD) Chemotherapie. Alle in Kapitel 3.2.1 vorgestellten chemotherapeutischen Schemata zum Studienzeitpunkt wurden unter dem Begriff Chemotherapie zusammengefasst.

Bestrahlung

Eine Bestrahlung erhielten insgesamt 311 Patientinnen (62,2%), von denen 88 Patientinnen (17,6%) mit einer Einzelfraktion von 1,8 Gray und 223 Patientinnen (44,6%) mit 2,0 Gray bestrahlt wurden. In 158 Fällen (31,6%) erfolgte keine adjuvante Bestrahlung und in 31 Fällen (6,2%) ist die Zuordnung nicht bekannt.

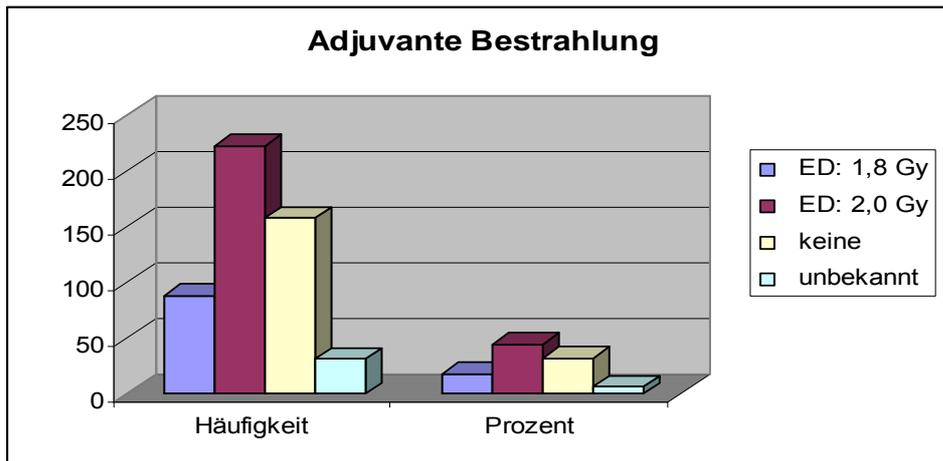


Abbildung 24: Adjuvante Bestrahlung. Die Abbildung zeigt deutlich auf, dass von den 311 bestrahlten Patientinnen die Mehrheit mit Einzelfractionen von 2,0 Gray bestrahlt worden sind.

4.2 Nachbeobachtungszeitraum

Von den 500 Patientinnen verstarben im Zeitraum von 1994 bis zum Jahr 2002 58 Patientinnen (11,6%) an den Folgen des Mammakarzinoms. 15 Patientinnen (3%) wiesen keine karzinomabhängige Todesursache auf. Zum Studienabschluss lebten noch 427 Patientinnen (85,4%) des Gesamtkollektivs.

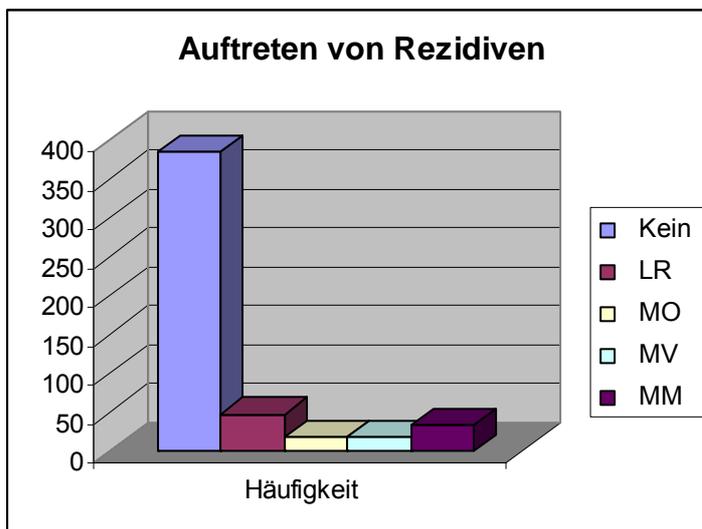


Abbildung 25: Auftreten von Rezidiven. Die Abbildung zeigt deutlich, dass bei mehr als zwei Drittel der Patientinnen kein Rezidiv beobachtet wurde.

Während des Untersuchungszeitraums wurden die Patientinnen auf lokale Rezidive (LR), ossäre (MO), viszerale (MV) und multiple Metastasen (MM) untersucht.

Insgesamt zeigten 385 Patientinnen (77%) kein Rezidiv, wohingegen bei 115 Patientinnen ein Rezidiv diagnostiziert wurde.

Die im Studienzeitraum an einem Rezidiv erkrankten 115 Frauen (23%) werden nun in Bezug zu den in 4.1 dargestellten Patientencharakteristika gesetzt und verglichen.

Rezidiv und Menopause

Ein Rezidiv zeigte sich bei 47 (9,4% von 500) von 144 Patientinnen mit prämenopausalem Status. Im Gesamtkollektiv waren 347 Patientinnen postmenopausal, von denen wiederum 64 (12,8% von 500) ein Rezidiv entwickelten. (GK pWert=0,167).

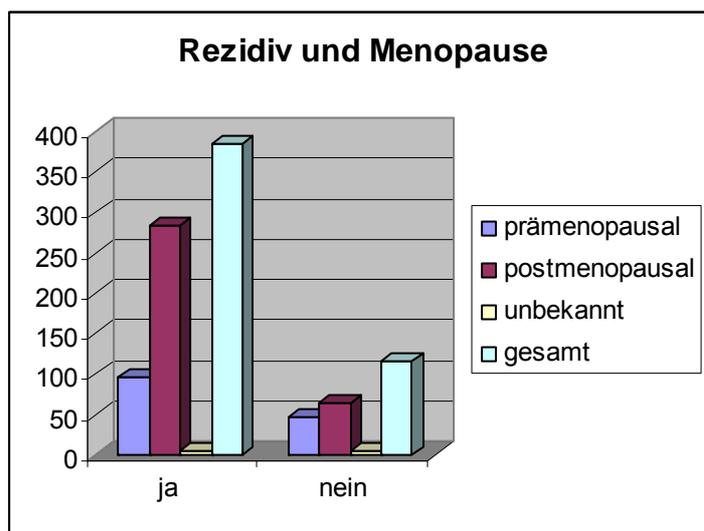


Abbildung 26: Rezidiv und Menopause. Die Abbildung zeigt, dass mehr Patientinnen nach der Menopause ein Rezidiv entwickelten, als Patientinnen vor der Menopause.

Rezidiv und Betroffene Seite

Die linksseitigen Tumoren sind in 13,4% des Gesamtkollektivs (67 von 260 Patientinnen) rezidivpositiv, beidseitig vorkommende Tumoren zeigen in 0,2% des Gesamtkollektivs (1 von 8 Patientinnen) eine rezidivpositive Entwicklung, Tumore der rechten Seite zeigen in 9% des Gesamtkollektivs (47 von 232 Patientinnen) eine Assoziation zum Wiederauftreten des Tumors (pWert=0,739).

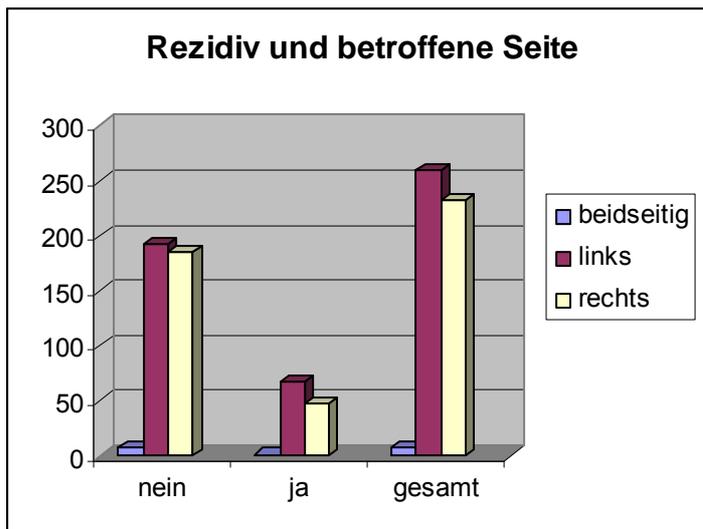


Abbildung 27: Rezidiv und betroffene Seite. In der Graphik lässt sich erkennen, dass Patientinnen mit linksseitigem Tumor am häufigsten Rezidive ausbildeten, aber auch nur einen geringfügig höheren Anteil an Patientinnen ohne Rezidiv stellen.

Rezidiv und Quadrant

Werden die Rezidive in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten betrachtet, so ergibt sich, dass die meisten Rezidive (50 von 220 Patientinnen, 22,7%) im äußeren oberen Quadranten auftraten (pWert=0,143).

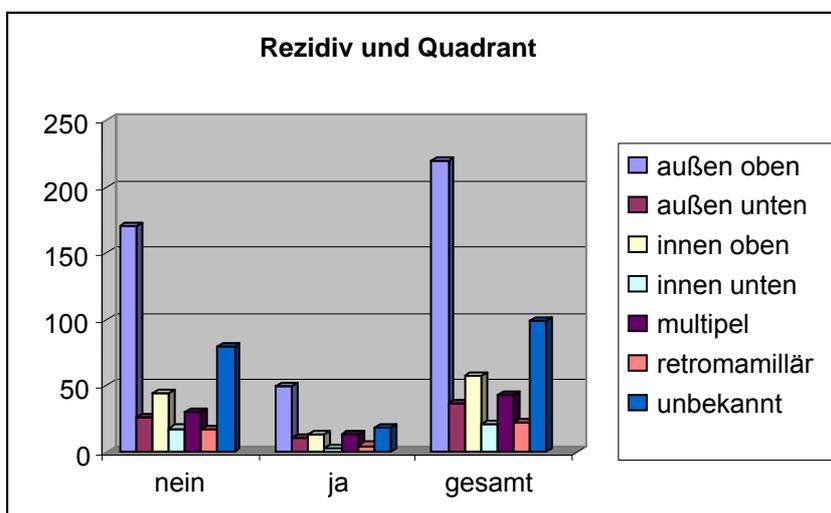


Abbildung 28: Rezidiv und Quadrant. Wie in der Abbildung zu sehen, ist der Anteil der Patientinnen mit Rezidiv am höchsten, wenn der Tumor im äußeren, oberen Quadranten liegt. Der Anteil der Patientinnen mit dieser Lokalisation am Gesamtkollektiv ist dabei ebenfalls am höchsten.

Bezogen auf das Gesamtkollektiv lässt sich sagen, dass bei 10% der außen oben befindlichen Tumoren die Patientinnen erneut erkranken. In Anbetracht des größeren

Anteils der Patientinnen mit Tumoren im äußeren, oberen Quadranten am Gesamtkollektiv (44%), bedürfen die anderen Quadranten genauerer Betrachtung. So zeigen Patientinnen mit Tumoren im äußeren unteren Quadranten in 42% (2,2% von 500) ein Rezidiv, Patientinnen im Quadrant innen-oben in 35% (2,8% von 500) und die Patientinnen mit multiplen Tumoren in 43% (2,6% von 500) ein Rezidiv.

Rezidiv und Tumorhistologie

Die tumorhistologische Beurteilung ergab, dass bei 16,2% der duktal-invasiven Tumoren und bei 3,4% lobulär-invasiven Tumoren ein Rezidiv auftritt, wobei beide Tumorarten auch den höchsten Anteil am Gesamtkollektiv einnehmen.

Auffällig ist, dass von dem insgesamt kleinen Anteil von 8 Patientinnen (1,6% von 500), die ein inflammatorisches Karzinom entwickelt hatten, 6 Patientinnen (75%) ein Rezidiv entwickelten. (GK pWert=0,208).

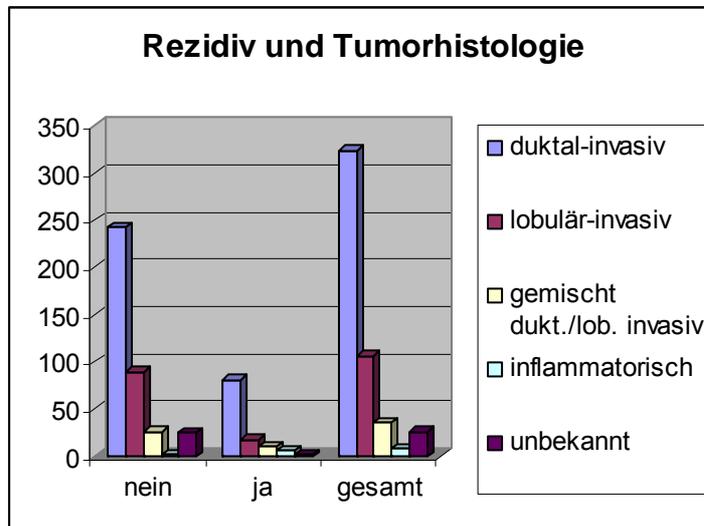


Abbildung 29: Rezidiv und Tumorhistologie. Der Anteil an duktal-invasiven Tumoren stellt numerisch die meisten Patientinnen mit und ohne Rezidiv.

Rezidiv und Karzinoma in situ

Patientinnen, deren Primärtumor auf die Milchdrüsen (LCIS) begrenzt war, entwickelten kein Rezidiv. Hingegen waren acht von 24 Patientinnen mit duktalem Karzinoma-in-situ (DCIS) rezidivpositiv (1,6% von 500).

Patientinnen, die kein Karzinoma-in-situ aufwiesen, zeigten in 92 Fällen (29,9%) ein Rezidiv, was einen prozentualen Anteil von 18,4% am Gesamtkollektiv ergibt. (GK (pWert=0,068))

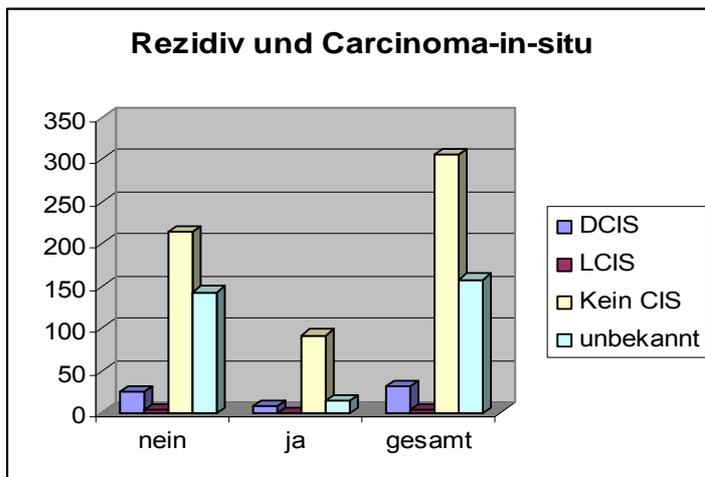


Abbildung 30: Rezidiv und Carcinoma-in-situ. Die Abbildung zeigt einen hohen Anteil an Rezidiven bei Patientinnen ohne CIS, wobei die Patientinnen mit DCIS den höchsten Anteil der CIS einnahmen.

Rezidiv und Tumorgröße

Anhand der erfassten Daten lässt sich sehr gut erkennen, dass das numerische Rezidivaufreten sich proportional zur Tumorgröße verhält; das heißt mit zunehmender Tumorgröße nahm auch die Häufigkeit eines Rezidives zu.

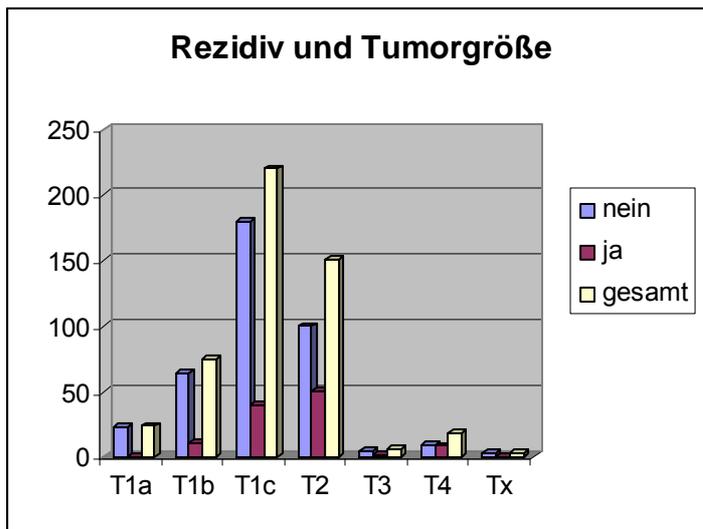


Abbildung 31: Rezidiv und Tumorgröße. Die Abbildung zeigt, dass mit zunehmender Tumorgöße auch die Häufigkeit der Rezidive zunimmt.

Während bei T1a nur eine Patientin von 24 (4,2%) ein Rezidiv entwickelte, waren es bei den Patientinnen mit T2 schon 33,7% (51 von 151 Patientinnen) und bei den Patientinnen mit T4 schon 47,3% (9 von 19), bei denen ein Rezidiv beobachtet wurde. Bezogen auf das Gesamtkollektiv erkrankten am häufigsten die Frauen mit der Tumorgöße T2 (10,2% von 500) (pWert=0,262).

Rezidiv und Tumordifferenzierung

Stellt man die diagnostizierten Rezidive in Bezug zum Grading, so lässt sich erkennen, dass gerade die Patientinnen mit gut differenzierten Tumoren seltener ein Rezidiv entwickelten, als die Patientinnen mit mäßig oder schlecht differenzierten Tumoren. Während es noch im Differenzierungsgrad G2 nur bei näherungsweise einem Viertel der Frauen zu einem Rezidiv kam (23,2%, 45 von 194 Patientinnen), so waren es bei Differenzierungsgrad G3 schon fast ein Drittel der Frauen (32,2%, 46 von 143 Patientinnen). (GK pWert=0,166).

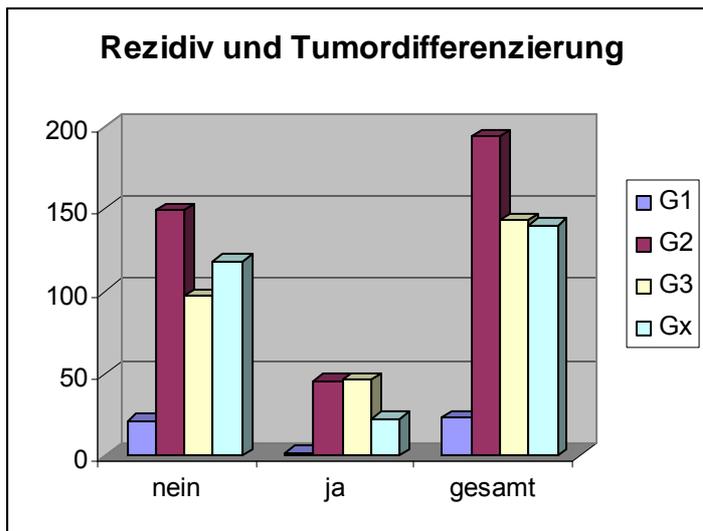


Abbildung 32: Rezidiv und Tumordifferenzierung. In der Abbildung ist deutlich eine Zunahme des Auftretens von Rezidiven mit höherem Differenzierungsgrad assoziiert, d.h. je schlechter der Primärtumor differenziert ist, umso häufiger kam es zu Rezidiven.

Auch auf das Gesamtkollektiv bezogen, erkrankten am häufigsten Patientinnen mit einem schlecht differenziertem Karzinom (9,2%).

Rezidiv und Lymphknotenstatus

Auch im Rahmen des Lymphknotenbefalls lässt sich erkennen, dass sowohl mit Zunahme der Metastasen in den Lymphknoten, als auch mit Zunahme der nodalen Metastasengröße, eine Zunahme der Rezidivhäufigkeit einhergeht. Von den insgesamt 255 Patientinnen ohne Lymphknotenbefall entwickelten 40 Patientinnen (15,7%) ein Rezidiv. Bezogen auf das Gesamtkollektiv ergibt dies einen prozentualen Anteil von 8%. Rezidive bei Mikrometastasen in den Lymphknoten konnten bei zwei von insgesamt neun Patientinnen (22,2%) festgestellt werden. Während es bei Patientinnen mit N1bI ein bis drei Lymphknoten waren, die mit mindestens einer Metastase >0,2 cm, aber allen Metastasen <2 cm befallen waren, noch 25,5% der Patientinnen sind, die ein Rezidiv entwickelten (11 von 43), so sind es bei Patientinnen mit N1bIV (alle Metastasen in den Lymphknoten sind ≥ 2 cm sind) schon 35% der Patientinnen (7 von 20), bei denen ein Rezidiv beobachtet wurde.

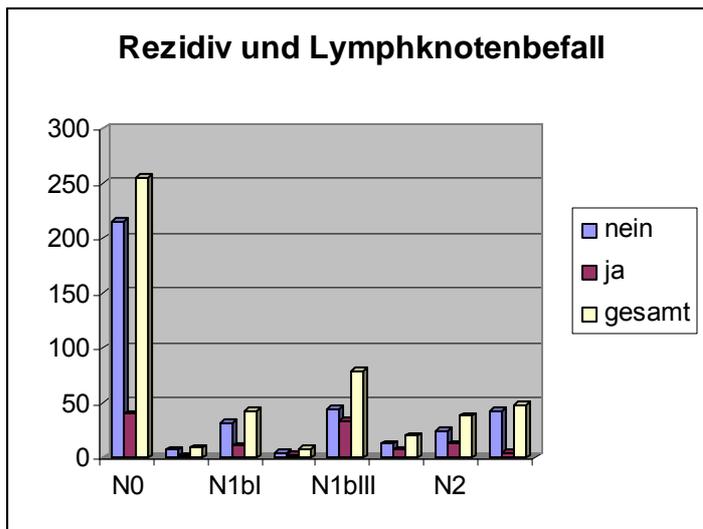


Abbildung 33: Rezidiv und Lymphknotenbefall. Die Abbildung zeigt eine Zunahme der Rezidivhäufigkeit in Abhängigkeit zum Lymphknotenbefall und zur Metastasengröße in den Lymphknoten.

Bezogen auf das Gesamtkollektiv lässt sich bei Patientinnen mit einem Lymphknotenbefall von N1bII (37,5%) und N1bIII (43%) am häufigsten ein Rezidiv beobachten (pWert=0,279).

Rezidiv und Östrogenrezeptorstatus

Bei Betrachtung des Östrogenrezeptorstatus zeigt sich, dass 33% der Patientinnen mit negativem Rezeptorstatus ein Rezidiv entwickelten (49 von 148), wohingegen bei nur 18,2% der Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen (59 von 323) ein Rezidiv diagnostiziert wurde. Auf das Gesamtkollektiv bezogen ergaben sich somit 9,8% der Patientinnen als rezidivfrei und 11,8% als rezidivpositiv (pWert=0,159).

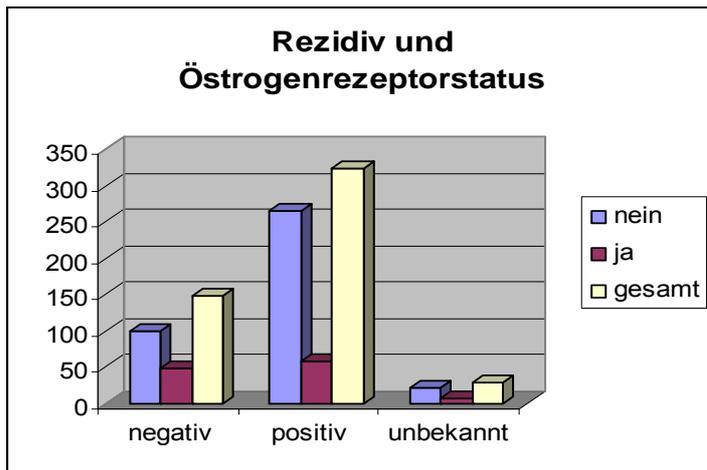


Abbildung 34: Rezidiv und Östrogenrezeptorstatus. Die Abbildung zeigt deutlich, dass weniger Patientinnen ein Tochtergeschwulst ausbilden, die als Östrogenrezeptor-positiv befunden wurden.

Rezidiv und Progesteronrezeptorstatus

Patientinnen mit einem negativen Progesteronrezeptorstatus zeigten in 28,4% (50 von 176 Patientinnen) ein Tochtergeschwulst im Gegensatz zu den Progesteron positiv befundenen Patientinnen, die in nur 19,2% der Fälle (57 von 292 Patientinnen) ein Rezidiv entwickelten. Bezogen auf das Gesamtkollektiv machen die Progesteron-negativen Rezidive 10% der Fälle aus, während die Progesteron-positiven Rezidive 11,4% der Fälle ausmachen (pWert=0,100).

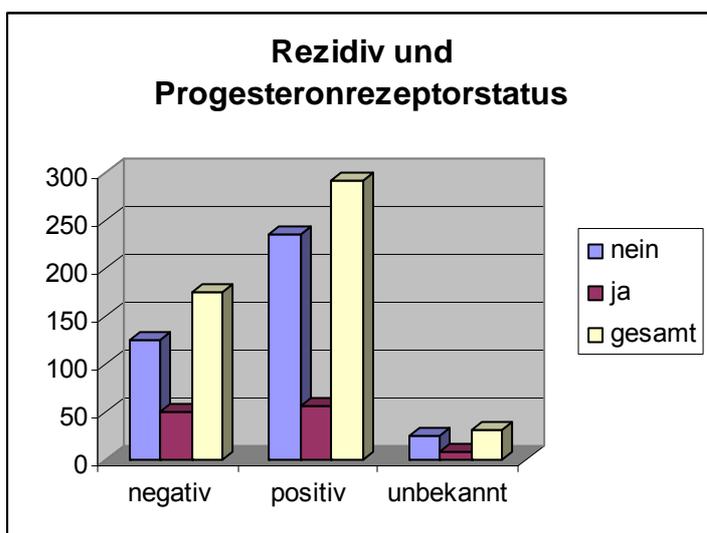


Abbildung 35: Rezidiv und Progesteronrezeptorstatus. Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptor haben ein leicht erhöhtes Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken.

Rezidiv und Multifokale Tumoren

Patientinnen mit multifokalen Tumoren bildeten in 7,4% der Fälle häufiger ein Rezidiv aus, als Patientinnen ohne multifokale Tumoren (27,4% vs. 20,3%; 66 von 241 zu 48 von 237). Auf das Gesamtkollektiv bezogen, wurden Rezidive bei 13,2% der Patientinnen mit multifokalem Tumor und bei 9,6% ohne multifokalen Tumor beobachtet (pWert=0,084).

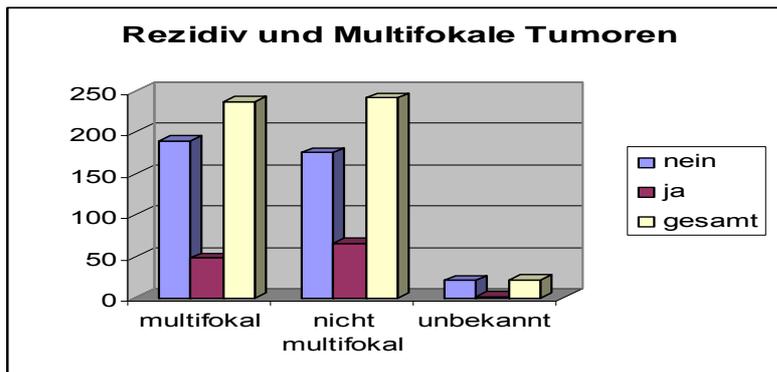


Abbildung 36: Rezidiv und Multifokale Tumoren. Die Abbildung stellt eine nur geringfügig höhere numerische Rezidivhäufigkeit bei Patientinnen mit multifokalem Tumor dar.

Rezidiv und Multizentrische Tumoren

Die Rezidivhäufigkeit lag bei Patientinnen mit multizentrischem Tumor bei 39,7% (25 von 63), wobei nur 21,6% der Patientinnen (87 von 402) ohne multizentrischen Tumor ein Rezidiv ausbildeten (pWert=0,144).

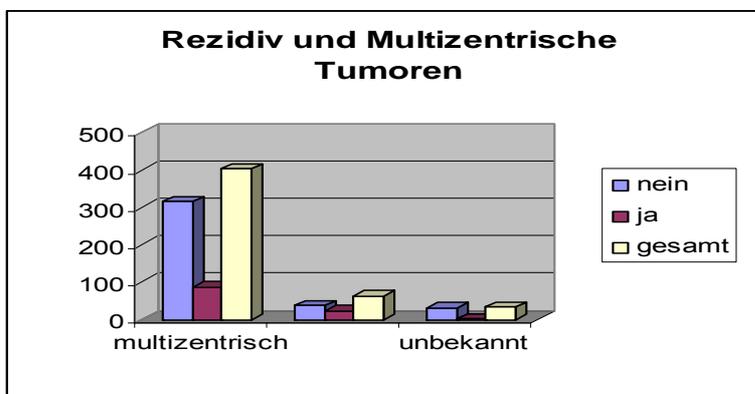


Abbildung 37: Rezidiv und Multizentrische Tumoren. Waren die Tumoren multizentrisch, so bildete sich häufiger eine Tochtergeschwulst als bei den nicht-multizentrischen Tumoren.

Rezidiv und Lymphangiosis karzinomatosa

Wiesen die Patientinnen eine Lymphangiosis karzinomatosa bei Primärtherapie auf, so zeigte sich in 35,2% der Fälle ein Rezidiv (38 von 108), wobei von den 368 Patientinnen ohne Lymphangiosis karzinomatosa 74 Patientinnen, sprich 20,1%, ein Tochtergeschwulst ausbildeten. Bezogen auf das Gesamtkollektiv ergibt sich somit ein prozentualer Anteil von 14,8% der Rezidivpositiven mit Lymphangiosis karzinomatosa, gegen lediglich 7,6% ohne Lymphangiosis karzinomatosa (pWert=0,149).

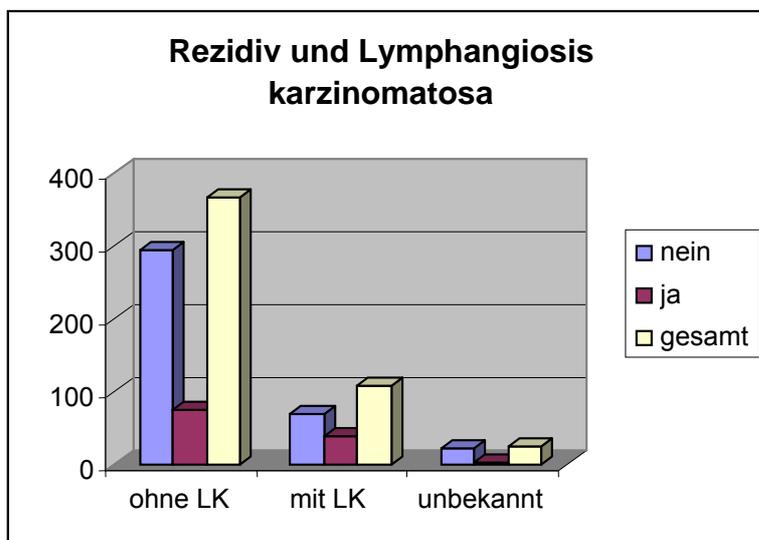


Abbildung 38: Rezidiv und Lymphangiosis karzinomatosa. Die Abbildung zeigt eine günstigere Rezidivprognose für Patientinnen ohne Lymphangiosis karzinomatosa. (LK = Lymphangiosis karzinomatosa).

Rezidiv und Hämangiosis karzinomatosa

Patientinnen mit einer Hämangiosis karzinomatosa zeigten in 42% der Fälle einen rezidivpositiven Befund (9 von 21), während 23% der Patientinnen ohne Hämangiosis karzinomatosa (101 von 442) ein Tochtergeschwulst ausbilden. Bezogen auf das Gesamtkollektiv zeigt sich hier, dass prozentual nur 1,8% der 500 Patientinnen ein Rezidiv ausbilden, wenn bei Primärtherapie eine Hämangiosis karzinomatosa diagnostiziert wird (pWert=0,098).

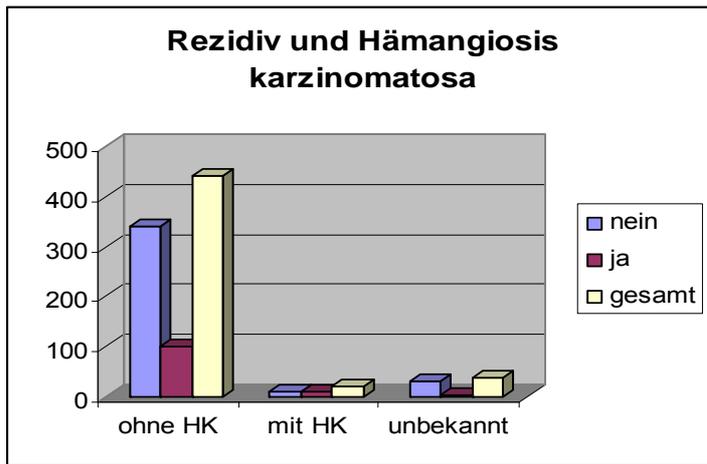


Abbildung 39: Rezidiv und Hämangiosis karzinomatosa. Die Abbildung zeigt, dass Patientinnen mit einer HK (Hämangiosis karzinomatosa) prozentual häufiger an einem Rezidiv erkranken.

Rezidiv und Zytokeratin-Zellen im Knochenmarksaspirat

Rezidive traten bei 28,4% der zytokeratin-positiv befundeten Patientinnen (31 von 109) auf. Nur bei 21% der zytokeratin-negativen Patientinnen (84 von 391) konnte ein Rezidiv diagnostiziert werden (pWert=0,474).

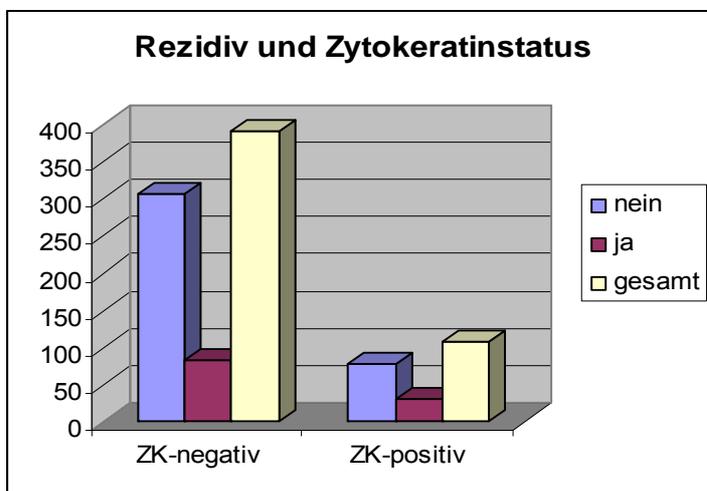


Abbildung 40: Rezidiv und Zytokeratinstatus. Die Abbildung zeigt auf den Gesamtanteil bezogen eine numerische Präferenz von Rezidiven zugunsten der zytokeratin-positiven Patientinnen.

Rezidiv und Primäroperation

Patientinnen nach Mamma-Ablatio zeigen in 29,7% (9,2% von 500) der Fälle einen rezidivpositiven Befund (46 von 155), während 25,3% (12% von 500) der Patientinnen nach BET (60 von 237) ein Tochtergeschwulst ausbilden

(pWert=0,189). Die Rezidivhäufigkeit lag bei Patientinnen nach BET mit sekundärer Ablatio bei 10,7% (6 von 56), wobei nur 5,8% der Patientinnen (3 von 51) nach BET mit sekundärer Lymphknotenentfernung ein Rezidiv ausbildeten.

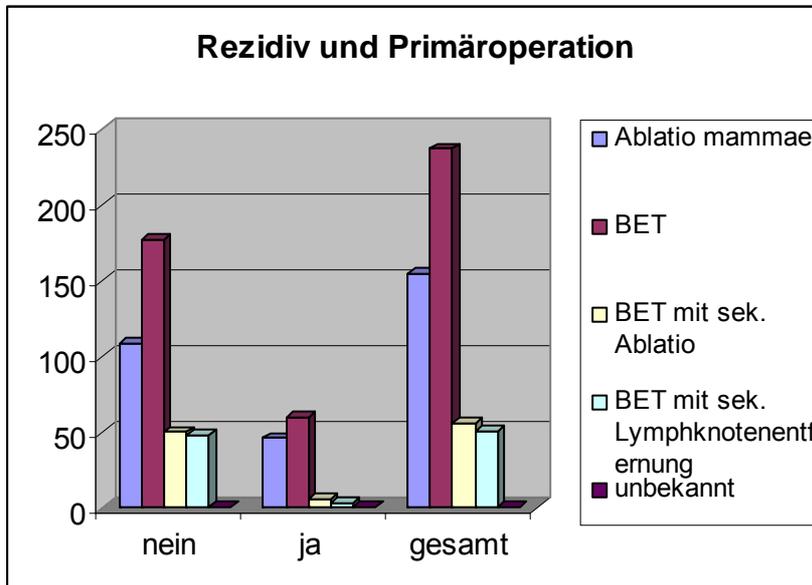


Abbildung 41: Rezidiv und Primäroperation. Da die Mehrheit der Patientinnen brusterhaltend operiert wurde, stellten eben diese Patientinnen sowohl bei den rezidivpositiven als auch bei den rezidivnegativen Kollektiven die höchste Anzahl. In den meisten Fällen erkrankten die Patientinnen mit primärer Ablatio erneut.

Rezidiv und systemische Therapie

Von den insgesamt 268 Patientinnen, die keine systemische Therapie erhielten, bildeten 40 Patientinnen (14,9%, bezogen auf das Gesamtkollektiv 8%) ein Rezidiv aus (pWert=0,739).

Im Rahmen der endokrinen Therapie bekamen 25 der 88 Patientinnen (28,4%, bezogen auf das Gesamtkollektiv 5%) ein Tochtergeschwulst, während 40% der HD-chemotherapierten Patientinnen (2 von 5; 0,4% von 500) im Gegensatz zu 36,4% der normal chemotherapeutisch versorgten Patientinnen (48 von 132; 9,6% von 500), die ein Rezidiv ausbildeten.

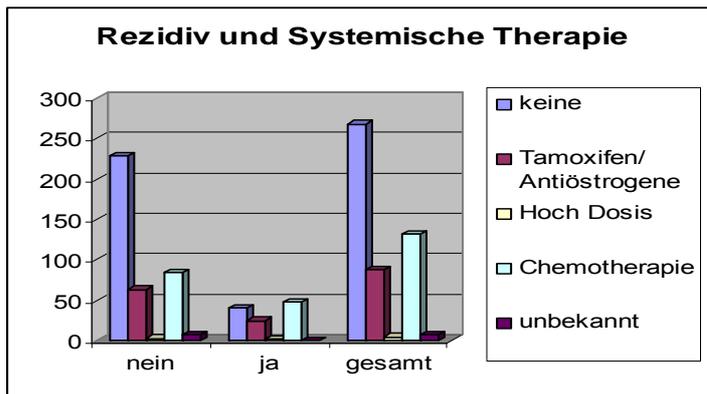


Abbildung 42: Rezidiv und Systemische Therapie. Die Abbildung zeigt, dass die mit Chemotherapie behandelten Patientinnen nur geringfügig häufiger ein Tochtergeschwulst ausbildeten als die Patientinnen, die gar nicht systemisch behandelt wurden.

Rezidiv und Bestrahlung

Patientinnen, die sich einer adjuvanten Bestrahlungstherapie unterzogen, zeigten bei einer Einzelstrahlungs-dosis mit 1,8 Gray in 25% der Fälle (22 von 88 Patientinnen; 4,4% von 500), und bei 2,0 Gray in 26,9% der Fälle (60 von 223, 12% von 500) ein Rezidiv. (GK pWert=0,104)

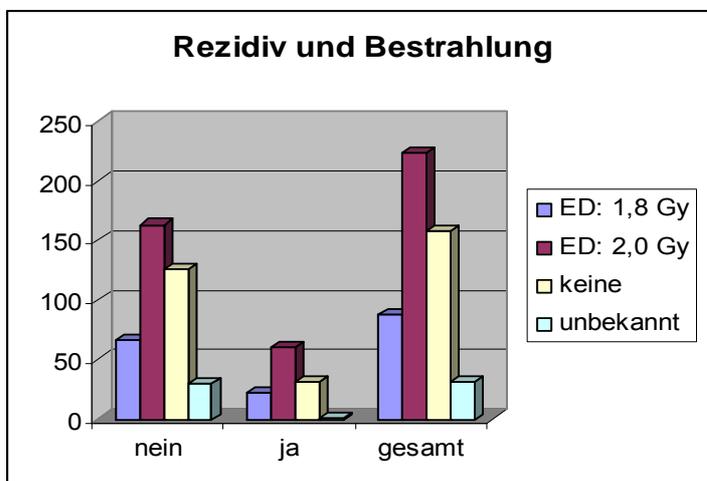


Abbildung 43. Rezidiv und Bestrahlung. Die Abbildung zeigt keine deutliche Präferenz zwischen einer Bestrahlungsintensität und der Rezidivhäufigkeit.

Erhielten die Patientinnen keine Bestrahlung, so ließ sich bei 20% der Patientinnen (32 von 158; 6,4% von 500) ein Rezidiv beobachten.

4.3 Überlebenszeiten

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Menopause

Die zu erwartende Überlebenszeit, die insgesamt 88,3 % der Patientinnen mit einer Standardabweichung von 4,5 Monaten und einem Median von 32,68 Monaten erreichen, beträgt in der Studie 101,65 Monate. Insgesamt treffen 18 Ereignisse bei den prämenopausalen Patientinnen (12,5%) und 36 Ereignisse bei den postmenopausalen Patientinnen (10,4%) ein.

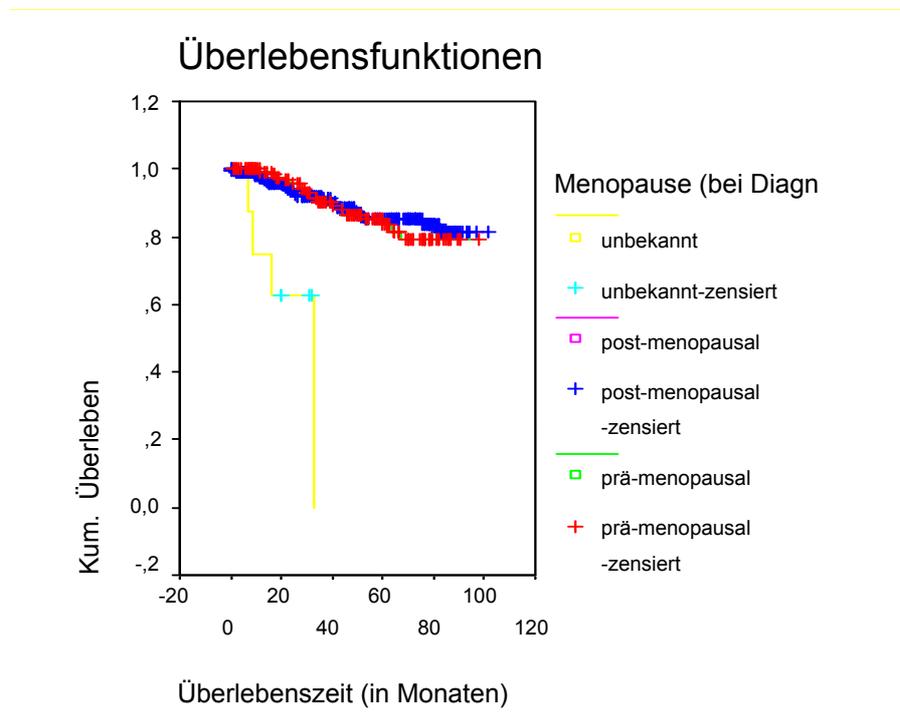


Abbildung 44: Überleben in Abhängigkeit des Menopausenstatus. Die Abbildung zeigt eine, geringfügige Signifikanz der Überlebenszeit zugunsten der Patientinnen mit postmenopausalem Zustand.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der betroffenen Brustseite

Die durchschnittliche Gesamtüberlebenszeit bezogen auf die betroffene Brustseite betrug 80,2 Monate mit einer Standardabweichung von 1,8 Monaten. Von den Patientinnen, bei denen beide Brüste betroffen waren, zeigte keine während der Studie ein Ereignis, wohingegen 31 Ereignisse bei den linksseitig betroffenen Patientinnen (11,9%) und 27 Ereignisse bei den rechtsseitig betroffenen Patientinnen (11,7%) eintraten.

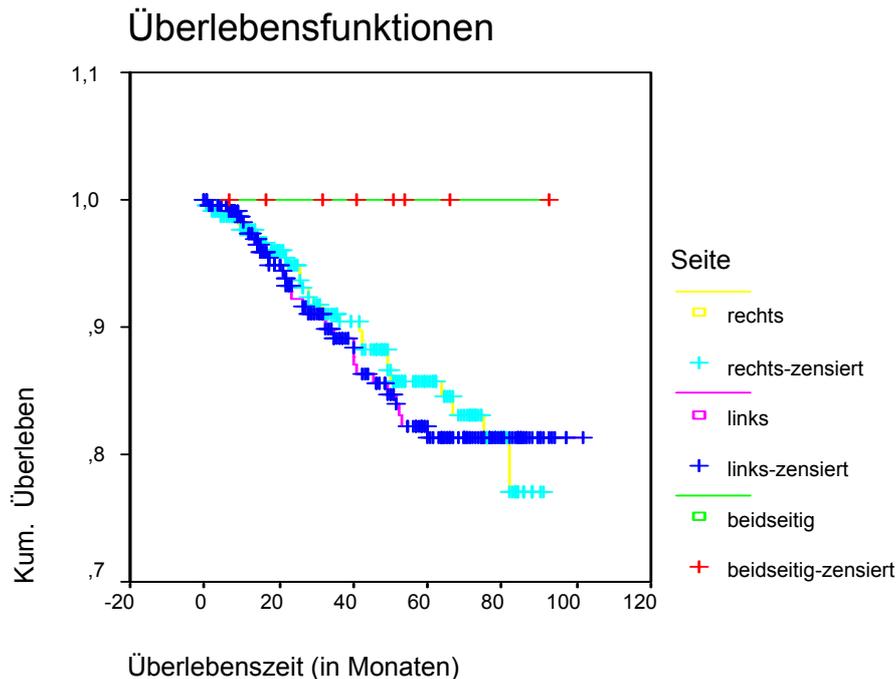


Abbildung 45: Überlebenszeit in Abhängigkeit der betroffenen Brustseite. Die Überlebenszeitfunktion zeigt dass das kumulative Überleben für die linksseitig betroffenen Patientinnen eine Signifikanz gegenüber den rechtsseitig betroffenen Patientinnen aufweist.

Überlebenszeit in Abhängigkeit des Quadranten

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit zum Quadranten war für Patientinnen mit einem Tumor durchschnittlich 82,23 Monate mit einer Standardabweichung von 1,96 Monaten bei 25 Ereignissen. Für die Lokalisation im äußeren-unteren Quadranten betrug sie durchschnittlich 80,64 Monate mit einer Standardabweichung von 6,08 Monaten bei 6 Ereignissen. Patientinnen mit Tumoren im inneren-oberen Quadranten überlebten durchschnittlich 91,68 Monate mit einer Standardabweichung von 3,82 Monaten bei 6 Ereignissen. Bei Erkrankungen im inneren-unteren Quadranten waren es 93,07 Monate mit einer Standardabweichung von 3,65 Monaten bei einem Ereignis. Mit lateralem Tumor betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 63 Monate mit einer Standardabweichung von 5,88 Monaten bei 4 Ereignissen. Patientinnen mit multiplen Tumoren überlebten durchschnittlich 78,38 Monate mit einer Standardabweichung von 4,16 Monaten bei 7 Ereignissen, wohingegen bei retromamillären Tumoren die durchschnittliche Überlebenszeit 83,8 Monate bei einer Standardabweichung von 5,63 Monaten bei 3 Ereignissen war.

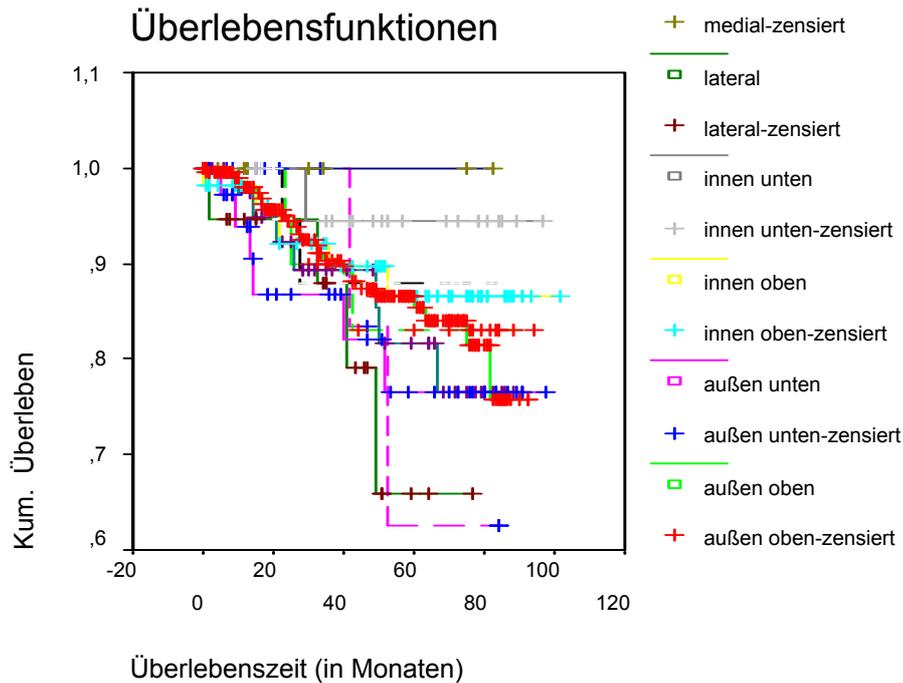


Abbildung 46: Überlebenszeit in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten. Die Überlebenszeitfunktionen zeigen die längste Überlebenszeit, wenn bei Patientinnen der Primärtumor im inneren oberen Quadranten lokalisiert war.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit zur Tumordifferenzierung betrug für Patientinnen mit einem Grading G1 durchschnittlich 86,07 Monate mit einer Standardabweichung von 3,85 Monaten bei einem Ereignis. Patientinnen mit G2 hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 92,44 Monaten bei einer Standardabweichung von 2,05 Monaten und 18 Ereignissen. Die durchschnittliche Überlebenszeit für G3 betrug 70,67 Monate bei einer Standardabweichung von 2,79 Monaten bei 32 Ereignissen, während sie für G4 nur noch 52,59 Monate bei einer Standardabweichung 14,91 Monaten bei einem Ereignis betrug. Somit lässt sich sagen, dass mit steigendem Grading die durchschnittliche Überlebenszeit sinkt.

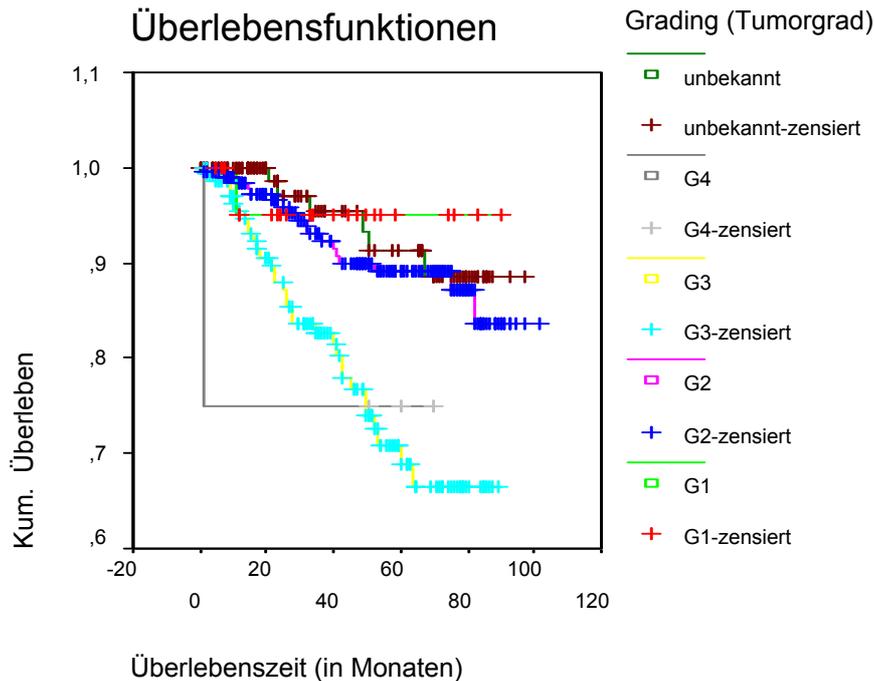


Abbildung 47: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung. Die Überlebenszeitfunktion zeigt deutlich ein schlechteres Überleben für Patientinnen mit schlecht differenziertem Karzinom.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von der TumorgroÙe

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von der TumorgroÙe betrug für Patientinnen mit einer GröÙe T1a durchschnittlich 86,08 Monate mit einer Standardabweichung von 3,83 Monaten bei einem Ereignis. Patientinnen mit T1b hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 91,06 Monaten bei einer Standardabweichung von 2,69 Monaten und 4 Ereignissen. Die durchschnittliche Überlebenszeit für T1c betrug 90,52 Monate bei einer Standardabweichung von 1,62 Monaten bei 14 Ereignissen, während sie für T2 nur noch 79,84 Monate bei einer Standardabweichung 3,33 Monaten bei 31 Ereignissen betrug. Patientinnen mit T3 überlebten durchschnittlich 67,27 Monate mit einer Standardabweichung von 10,60 Monaten bei 2 Ereignissen, wohingegen das Kollektiv mit T4b durchschnittlich 60,4 Monate bei einer Standardabweichung von 11,65 Monaten und zwei Ereignissen überlebte.

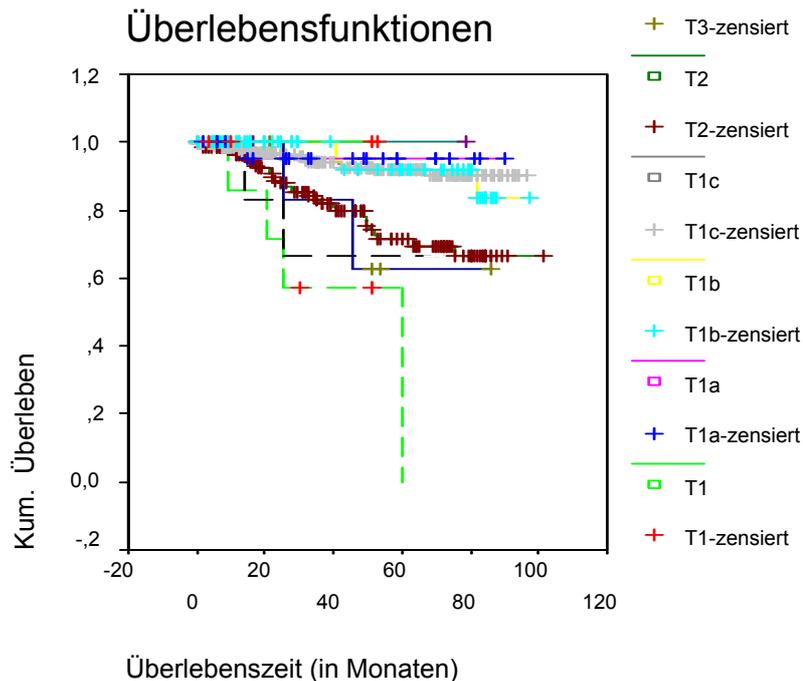


Abbildung 48: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der TumorgroÙe. Auch diese Abbildung zeigt, dass ein größerer Tumor mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert ist.

Die kürzeste Überlebenszeit zeigten Patientinnen mit einer TumorgroÙe T4d, die durchschnittlich bei 40,1 Monaten bei einer Standardabweichung von 9,14 Monaten und 4 Ereignissen lag. Wie auch beim Grading zeigt sich hier, dass eine Zunahme der TumorgroÙe mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist.

Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus betrug für Patientinnen mit einem Status N0 durchschnittlich 95,05 Monate mit einer Standardabweichung von 1,58 Monaten bei 16 Ereignissen. Bei Patientinnen mit N1a verkürzte sich die Lebenszeit auf durchschnittlich 72,78 Monate bei einer Standardabweichung von 10,04 Monaten und 2 Ereignissen. Die durchschnittliche Überlebenszeit für N1bI betrug 84,15 Monate bei einer Standardabweichung von 3,3 Monaten bei 4 Ereignissen, während sie für N1bII nur noch 76,81 Monate bei einer Standardabweichung von 8,02 Monaten bei einem Ereignis betrug.

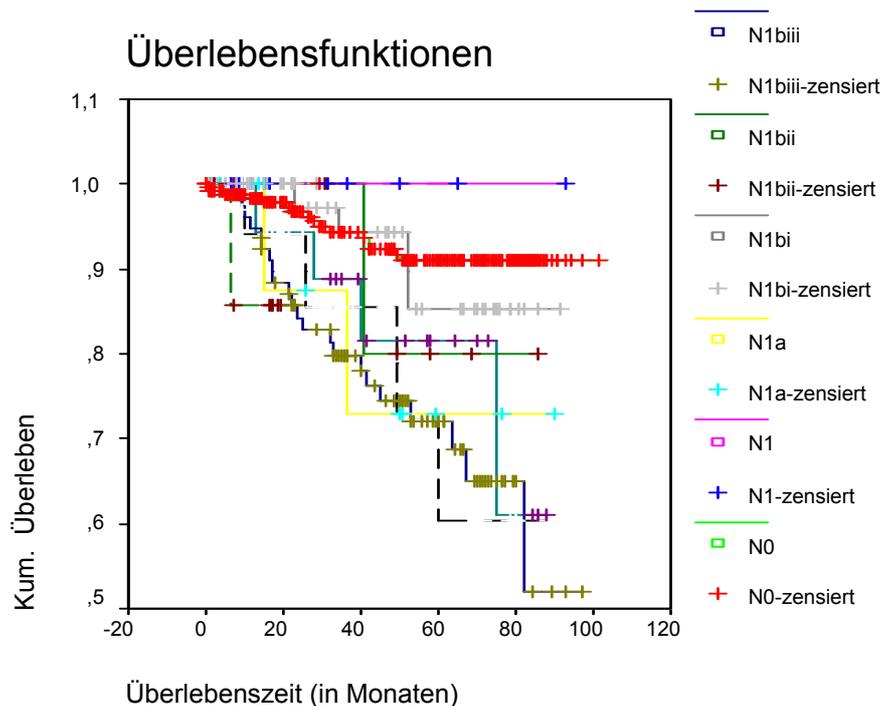


Abbildung 49: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus. Die Funktionen zeigen, dass sich mit zunehmender Metastasierung der Lymphknoten die durchschnittliche Überlebenszeit verkürzt.

Patientinnen mit N1bIII überlebten durchschnittlich 72,85 Monate mit einer Standardabweichung von 4,23 Monaten bei 22 Ereignissen, wohingegen das Kollektiv mit N1bIV durchschnittlich 74,24 Monate bei einer Standardabweichung von 5,94 Monaten und 4 Ereignissen überlebte. Patientinnen mit N2 hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 69,6 Monaten bei einer Standardabweichung von 5,86 Monaten und 7 Ereignissen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Östrogenrezeptorsensitivität

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit der Östrogenrezeptorsensitivität betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich 92,09 Monate mit einer Standardabweichung von 1,73 Monaten bei 27 Ereignissen. Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 81,45 Monaten bei einer Standardabweichung von 2,76 Monaten und 26 Ereignissen.

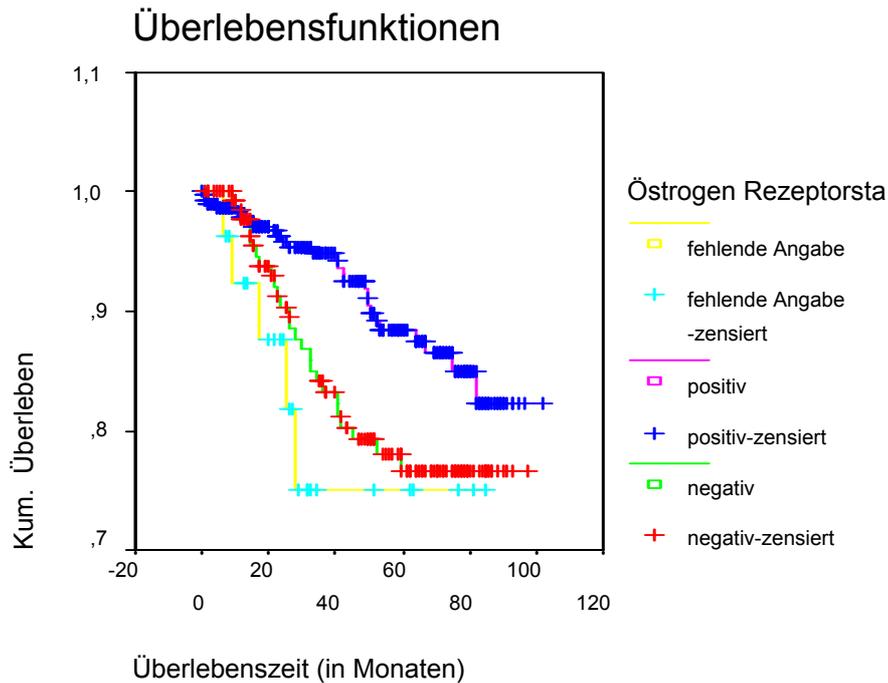


Abbildung 50: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Östrogenrezeptorsensitivität. Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus lebten durchschnittlich 10,64 Monate länger als Patientinnen mit negativem Befund.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Progesteronrezeptorsensitivität

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit der Progesteronrezeptorsensitivität betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich 89,27 Monate mit einer Standardabweichung von 1,49 Monaten bei 23 Ereignissen. Patientinnen mit negativem Progesteronrezeptorstatus hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 83,19 Monaten bei einer Standardabweichung von 3 Monaten und 29 Ereignissen.

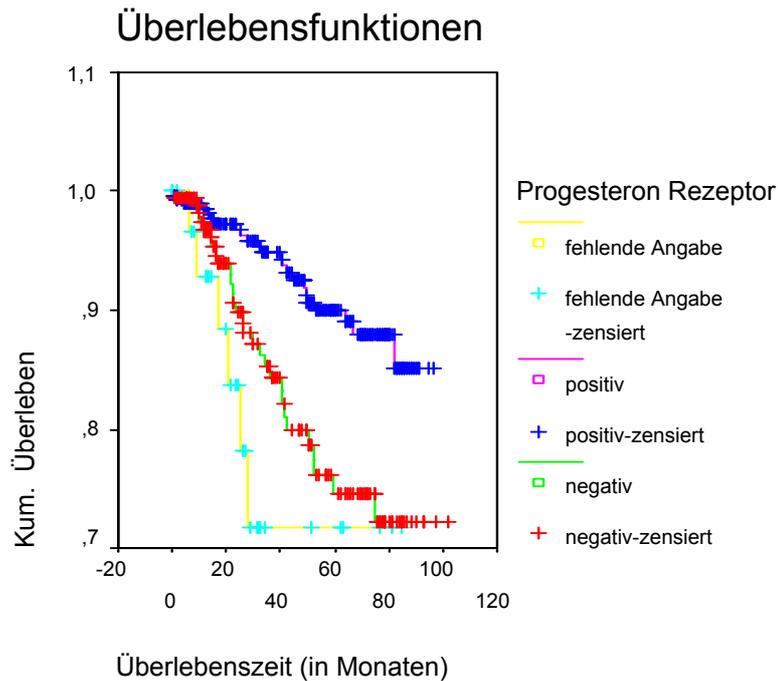


Abbildung 51: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Progesteronrezeptorsensitivität. Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptorstatus lebten durchschnittlich 6,08 Monate länger als Patientinnen mit negativem Befund.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von multifokalen Tumoren

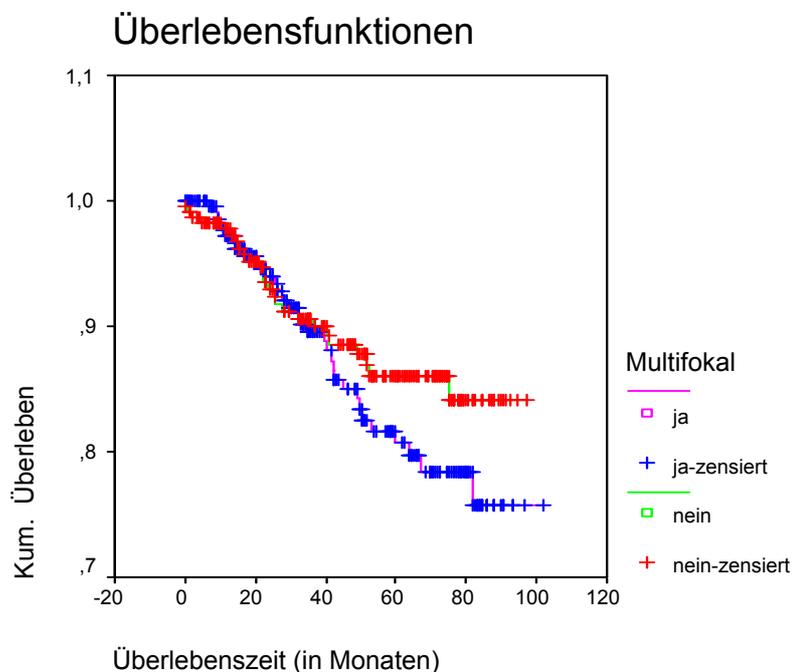


Abbildung 52: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multifokalen Tumoren. Die Überlebenszeitfunktionen zeigen, dass ein multifokaler Tumor zu einer höheren Anzahl an Rezidiven führte.

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von multifokalen Tumoren betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich 87,02 Monate mit einer Standardabweichung von 2,29 Monaten bei 33 Ereignissen. Patientinnen ohne multifokalem Tumor hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 87,04 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,92 Monaten und 25 Ereignissen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von multizentrischen Tumoren

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von multizentrischen Tumoren betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 72,3 Monate mit einer Standardabweichung von 4,23 Monaten bei 13 Ereignissen.

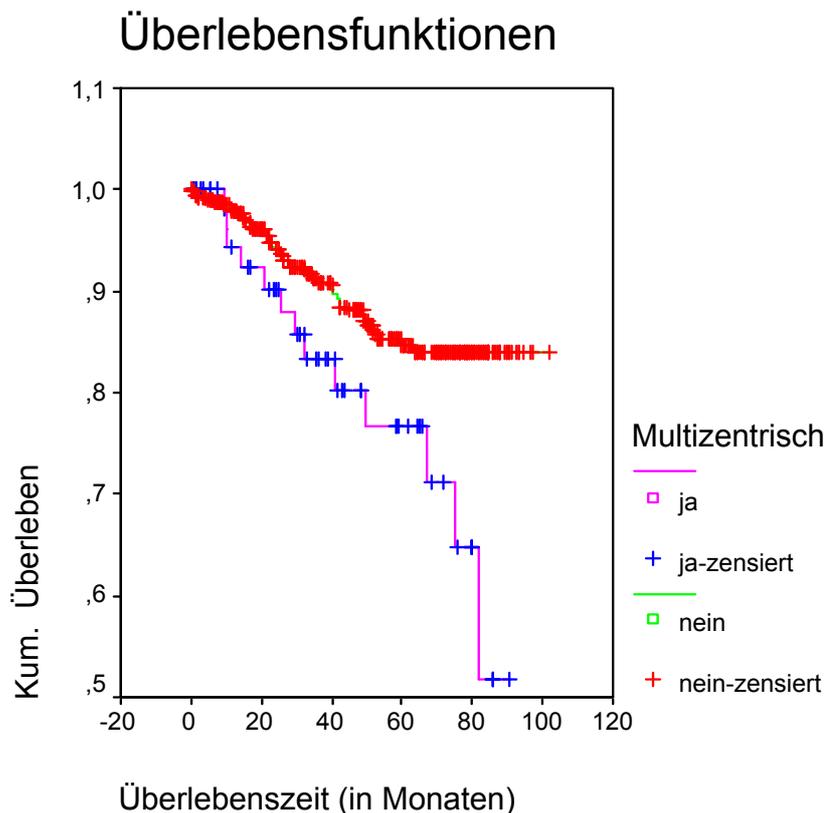


Abbildung 53: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multizentrischen Tumoren. Die Überlebenszeitfunktionen zeigen, dass ein multizentrischer Tumor zu einer höheren Anzahl an Ereignissen und einer deutlich geringeren Überlebenszeit führte.

Patientinnen ohne multizentrischen Tumor hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 90,57 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,55 Monaten

und 44 Ereignissen und lebten damit durchschnittlich 18,27 Monate länger, als die Patientinnen des anderen Kollektivs.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von lokalen Rezidiven

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von lokalen Rezidiven betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich 83,32 Monate mit einer Standardabweichung von 3,8 Monaten bei 17 Ereignissen, während Patientinnen ohne lokales Rezidiv eine durchschnittliche Überlebenszeit von 86,73 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,47 Monaten und 41 Ereignissen hatten.

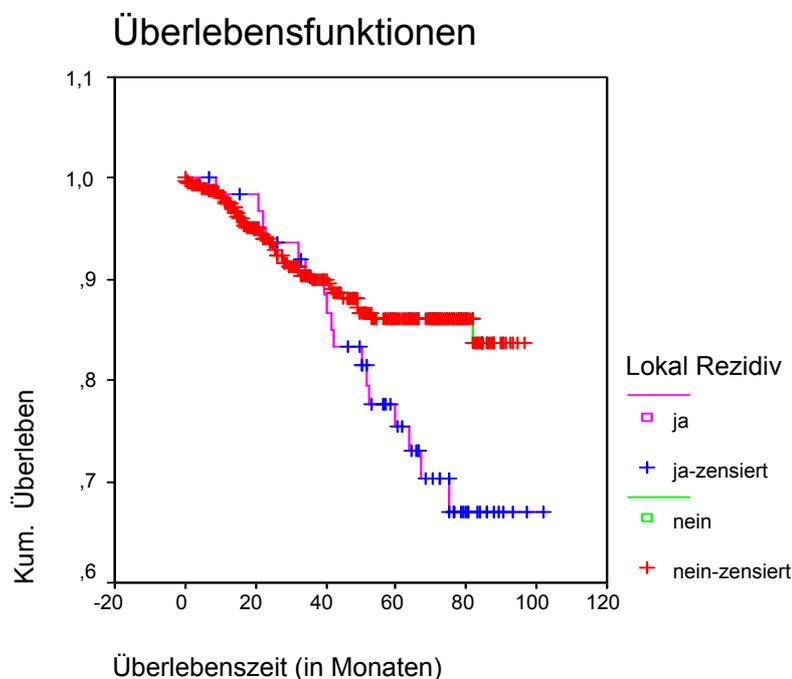


Abbildung 54. Überlebenszeit in Abhängigkeit von lokalen Rezidiven. Die Überlebensfunktionen zeigen ein etwas besseres Überleben ohne lokales Rezidiv.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasen

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasen betrug für Patientinnen mit Fernmetastasen durchschnittlich nur 41,81 Monate mit einer Standardabweichung von 3,35 Monaten bei 48 Ereignissen, während Patientinnen ohne Fernmetastasen eine durchschnittliche Überlebenszeit von 99,09 Monaten bei einer Standardabweichung von 0,8 Monaten und 10 Ereignissen hatten. Damit war die

durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen ohne Fernmetastasen 57,28 Monate länger als für Patientinnen mit Fernmetastasen.

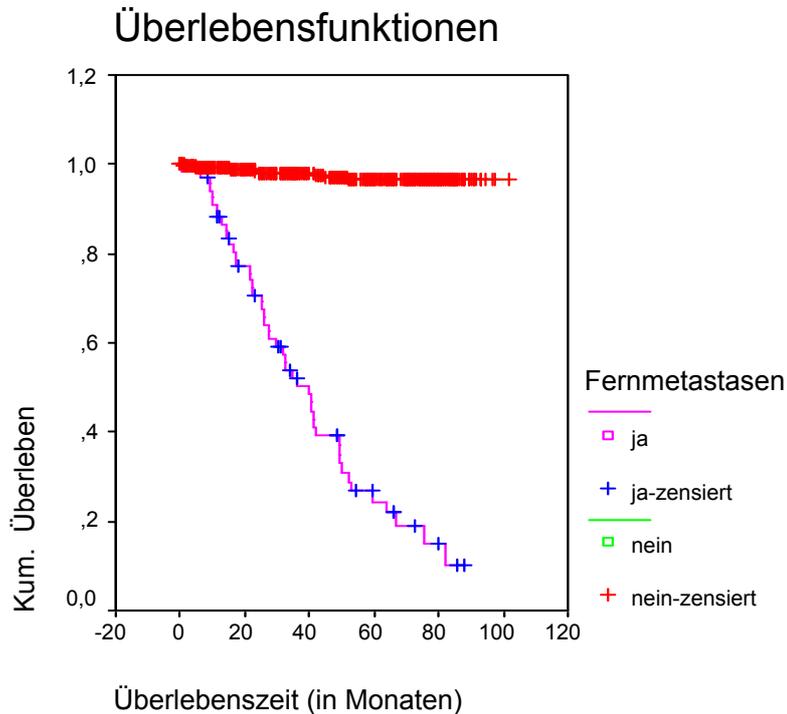


Abbildung 55: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasen. Die Graphik zeigt deutlich ein besseres Überleben zugunsten der Patientinnen ohne Fernmetastasen.

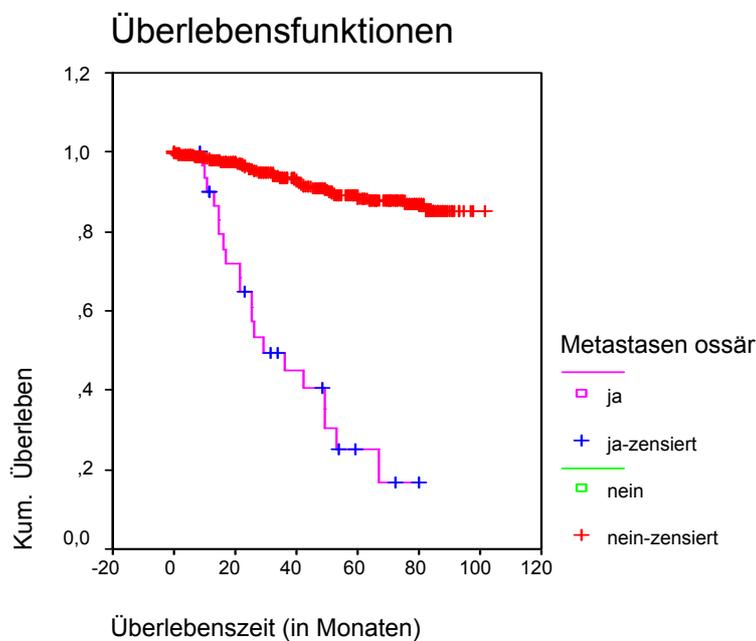


Abbildung 56: Überlebenszeit in Abhängigkeit von ossären Metastasen. In der Abbildung lässt sich anhand der Überlebensfunktionen ein deutlich besseres Überleben für das Kollektiv ohne ossäre Metastasen ablesen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von ossären Metastasen

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von ossären Metastasen betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 39,68 Monate mit einer Standardabweichung von 4,86 Monaten bei 20 Ereignissen, während Patientinnen ohne ossäre Metastasen durchschnittlich 92,7 Monate bei einer Standardabweichung von 1,37 Monaten und 38 Ereignissen erlebten. Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen ohne ossäre Metastasen 53,02 Monate länger als für Patientinnen mit ossären Metastasen (s. auch Abb. 56, S.59).

Überlebenszeit in Abhängigkeit von viszeralen Metastasen

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von viszeralen Metastasen betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 37,5 Monate mit einer Standardabweichung von 3,79 Monaten bei 35 Ereignissen, während Patientinnen ohne viszerale Metastasen eine durchschnittliche Überlebenszeit von 95,07 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,2 Monaten und 23 Ereignissen hatten.

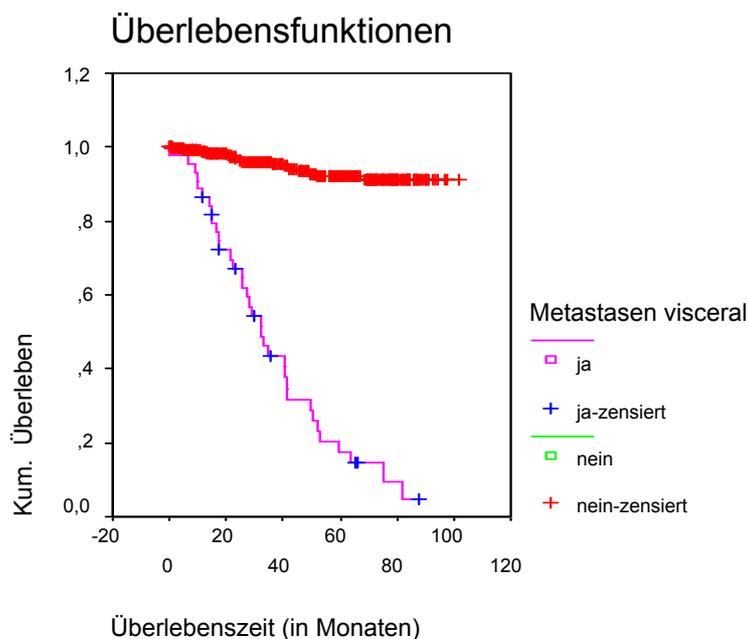


Abbildung 57: Überlebenszeit in Abhängigkeit von viszeralen Metastasen. In der Abbildung lässt sich anhand der Überlebensfunktionen ein deutlich besseres Überleben für das Kollektiv ohne viszerale Metastasen erkennen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von multiplen Metastasen

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit von multiplen Metastasen betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 28,81 Monate mit einer Standardabweichung von 4,09 Monaten bei 19 Ereignissen, während Patientinnen ohne multiple Metastasen eine durchschnittliche Überlebenszeit von 92,61 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,37 Monaten und 39 Ereignissen hatten.

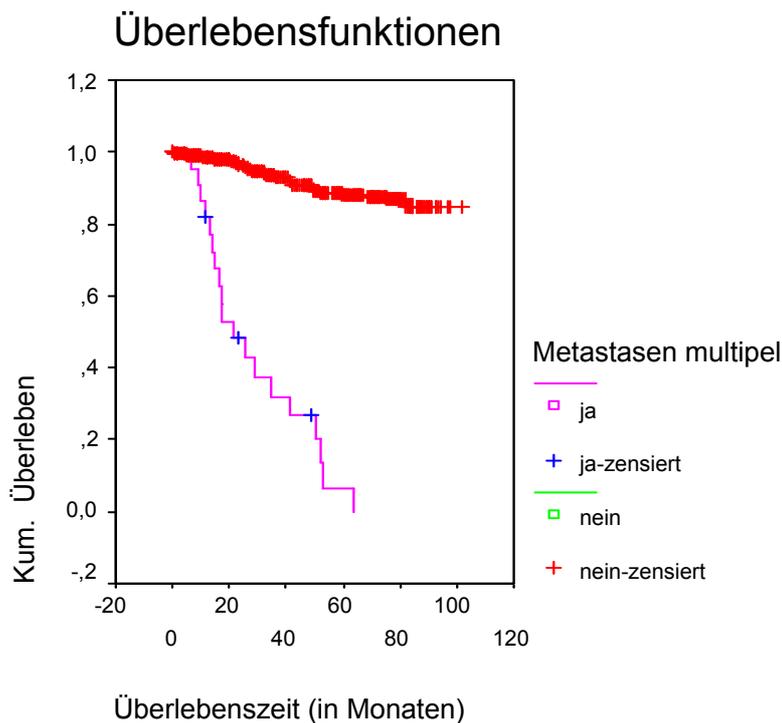


Abbildung 58: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multiplen Metastasen. Die Graphik zeigt deutlich ein besseres Überleben zugunsten der Patientinnen ohne multiple Metastasen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von Lymphangiosis karzinomatosa

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 66,06 Monate mit einer Standardabweichung von 3,49 Monaten bei 26 Ereignissen, während Patientinnen ohne Lymphangiosis karzinomatosa eine durchschnittliche Überlebenszeit von 92,94 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,48 Monaten und 31 Ereignissen hatten. Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen ohne Lymphangiosis karzinomatosa 26,9 Monate länger als für Patientinnen mit Lymphangiosis karzinomatosa.

Überlebensfunktionen

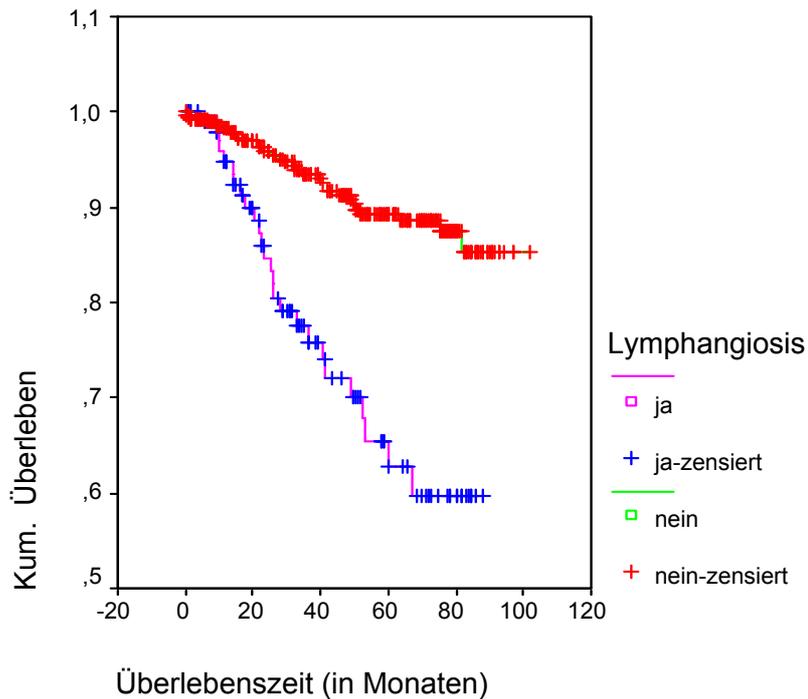


Abbildung 59: Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa. Die Graphik zeigt ein deutlich besseres Überleben zugunsten der Patientinnen ohne Lymphangiosis karzinomatosa.

Überlebenszeit in Abhängigkeit von Hämangiosis karzinomatosa

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich nur 61,76 Monate mit einer Standardabweichung von 7,84 Monaten bei 6 Ereignissen, während Patientinnen ohne Hämangiosis karzinomatosa eine durchschnittliche Überlebenszeit von 90,43 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,43 Monaten und 48 Ereignissen hatten. Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen ohne Hämangiosis karzinomatosa 28,67 Monate länger als für Patientinnen mit Hämangiosis karzinomatosa.

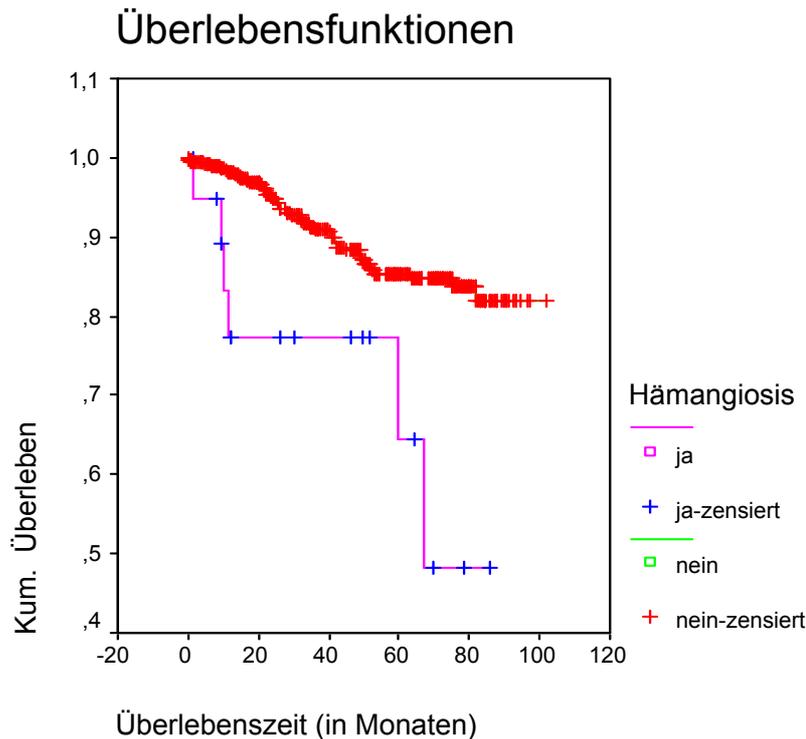


Abbildung 60: Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa. Die Graphik zeigt ein deutlich besseres Überleben zugunsten der Patientinnen ohne Hämangiosis karzinomatosa.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Primäroperation

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit zur Primäroperation betrug für Patientinnen mit einer Mamma-Ablatio durchschnittlich 85,68 Monate mit einer Standardabweichung von 2,79 Monaten bei 27 Ereignissen. Die Überlebenszeit für die Patientinnen mit einer BET betrug durchschnittlich 87,68 Monate mit einer Standardabweichung von 1,84 Monaten bei 24 Ereignissen. Patientinnen mit BET und sekundärer Ablatio hatten durchschnittlich eine Überlebenszeit von 80,96 Monate mit einer Standardabweichung von 3,49 Monaten bei fünf Ereignissen, während die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit BET und sekundärer Lymphknotenentfernung 84,94 Monate mit einer Standardabweichung von 5,49 Monaten bei zwei Ereignissen betrug.

Überlebensfunktionen

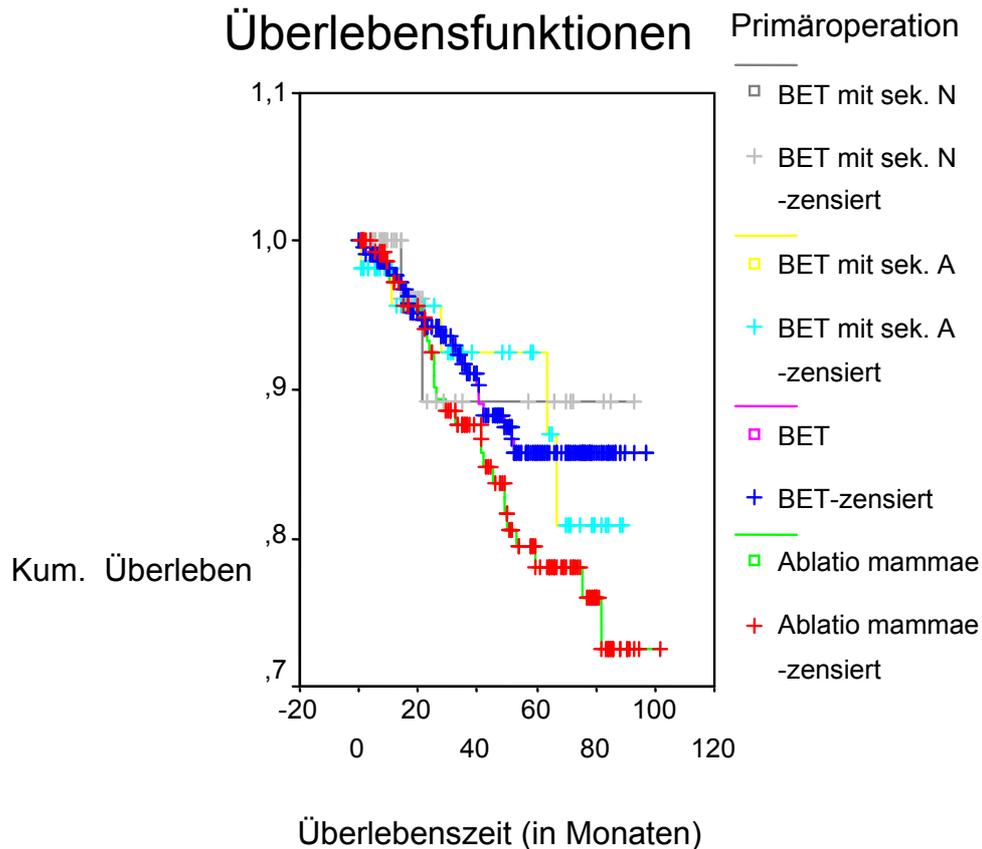


Abbildung 61: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Primäroperation. Die Graphik zeigt, dass in dem Kollektiv der Patientinnen mit einer Mamma-Ablatio deutlich mehr Ereignisse bei einer geringfügig längeren Überlebenszeit zutrafen.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Chemotherapie

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Chemotherapie betrug für Patientinnen mit Chemotherapie durchschnittlich 77,76 Monate mit einer Standardabweichung von 3,23 Monaten bei 26 Ereignissen, während Patientinnen ohne Chemotherapie eine durchschnittliche Überlebenszeit von 94,91 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,57 Monaten und 17 Ereignissen hatten. Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit systemischer Therapie 17,15 Monate länger als für Patientinnen ohne systemische Therapie. Patientinnen mit Tamoxifenbehandlung hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 77,94 Monaten bei einer Standardabweichung von 3,59 Monaten bei 13 Ereignissen, wohingegen die HD-chemotherapierten Patientinnen im Durchschnitt nur 45,08 Monate mit einer Standardabweichung von 5,22 Monaten bei 2 Ereignissen überlebten.

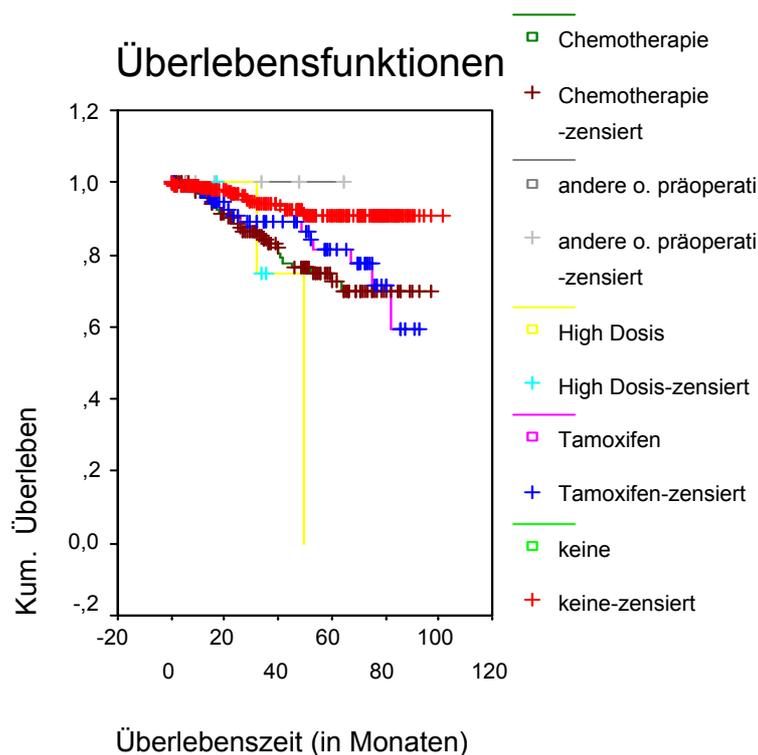


Abbildung 62: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Chemotherapie. Die Überlebenszeitfunktionen zeigen ein deutlich besseres Überleben zugunsten der Patientinnen ohne Chemotherapie.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der systemischen Therapie

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit einer systemischen Therapie betrug für Patientinnen mit systemischer Therapie durchschnittlich 94,91 Monate mit einer Standardabweichung von 1,57 Monaten bei 17 Ereignissen, während Patientinnen ohne systemische Therapie eine durchschnittliche Überlebenszeit von 79,29 Monaten bei einer Standardabweichung von 2,5 Monaten und 41 Ereignissen hatten. Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit systemischer Therapie 16,62 Monate länger als für Patientinnen ohne systemische Therapie.

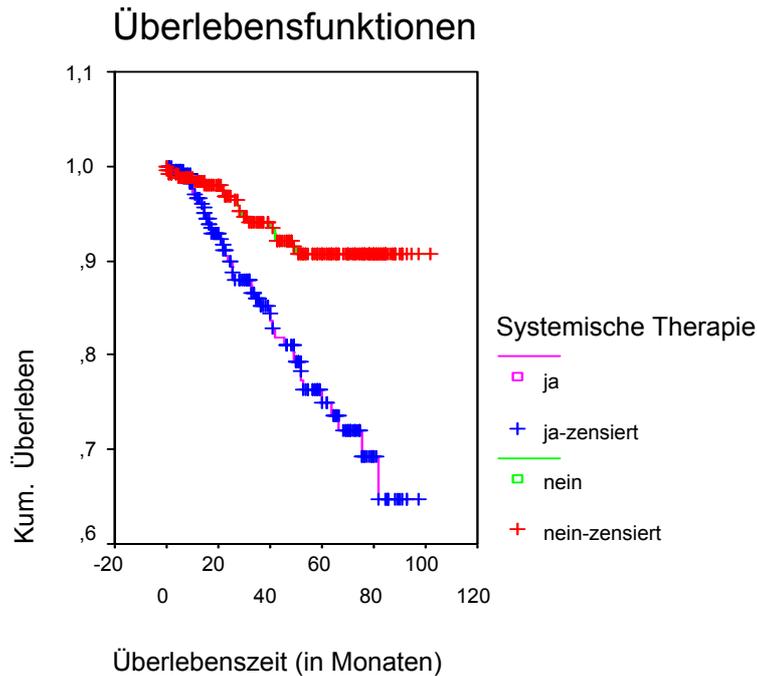


Abbildung 63: Überlebenszeit in Abhängigkeit der systemischen Therapie. Die Graphik zeigt ein deutlich besseres Überleben zugunsten der Patientinnen mit systemischer Therapie.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der Bestrahlung

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit der Bestrahlung betrug für Patientinnen mit Bestrahlung bei einer Einzelfraktion von 1,8 Gray durchschnittlich 81,16 Monate mit einer Standardabweichung von 4,26 Monaten bei 11 Ereignissen, während Patientinnen mit Einzelfraktionen von 2,0 Gray eine durchschnittliche Überlebenszeit von 85,85 Monaten bei einer Standardabweichung von 2 Monaten und 28 Ereignissen hatten. Die Patientinnen ohne Bestrahlung hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 89,63 Monaten bei einer Standardabweichung von 2,62 Monaten und 18 Ereignissen.

Damit war die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen ohne Bestrahlung 8,47 Monate länger als für Patientinnen mit einer 1,8 Gray Bestrahlung

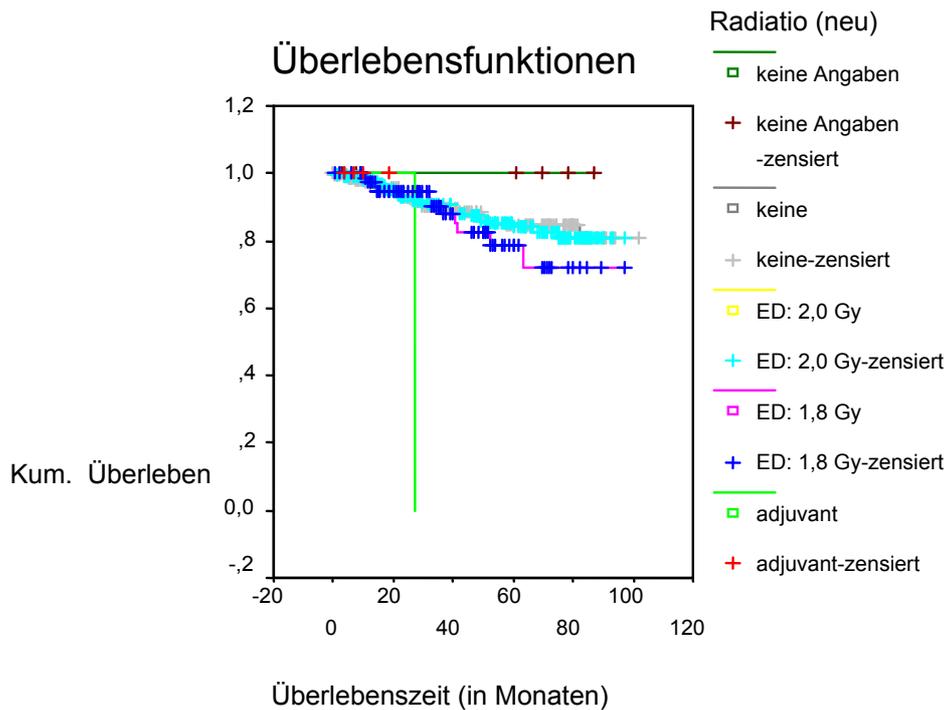


Abbildung 64: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Bestrahlung. Die Graphik zeigt nur eine geringfügige längere Überlebenszeit für Patientinnen ohne Bestrahlung.

Überlebenszeit in Abhängigkeit der zytokeratinen Zellen im Knochenmark

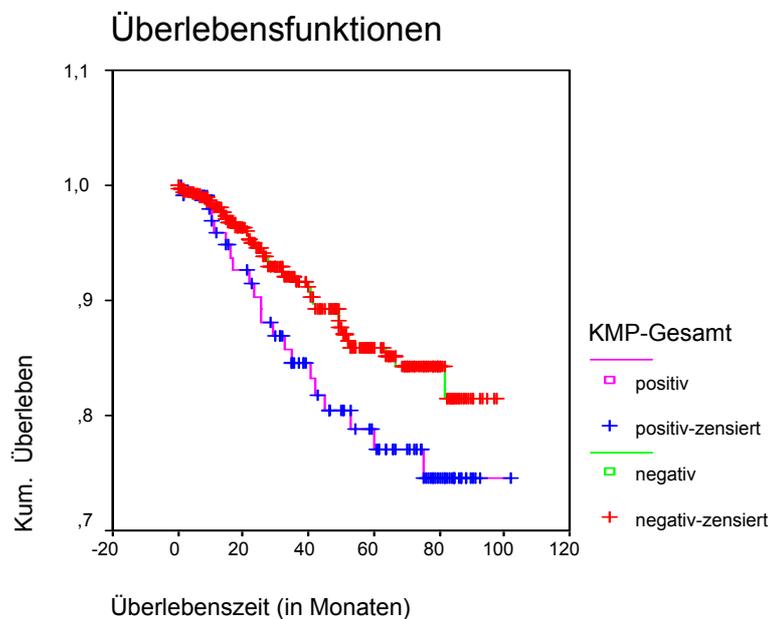


Abbildung 65. Überlebenszeit in Abhängigkeit der zytokeratinen Zellen. Die Graphik zeigt nur eine geringfügige längere Überlebenszeit für Patientinnen ohne zytokeratine Zellen.

Die Überlebenszeit in Abhängigkeit der zytokeratinen Zellen betrug für Patientinnen mit positivem Befund durchschnittlich 84,43 Monate mit einer Standardabweichung von 3,42 Monaten bei 20 Ereignissen, während Patientinnen mit negativem Befund eine durchschnittliche Überlebenszeit von 86,95 Monaten bei einer Standardabweichung von 1,57 Monaten und 38 Ereignissen hatten. Insgesamt zeigte sich eine schlechtere durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit positivem Befund, die durchschnittlich 2,52 Monate kürzer lebten als die Patientinnen mit negativem Befund.

4.4 Inzidenz Disseminierter Tumorzellen im Knochenmark beim primären Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Die Patientinnen wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf Tumorzellen im Knochenmark untersucht. Die erhaltenen Befunde wurden ebenfalls in Bezug zu Basischarakteristika der Frauen verglichen.

Tumorzellen in Abhängigkeit der Menopause

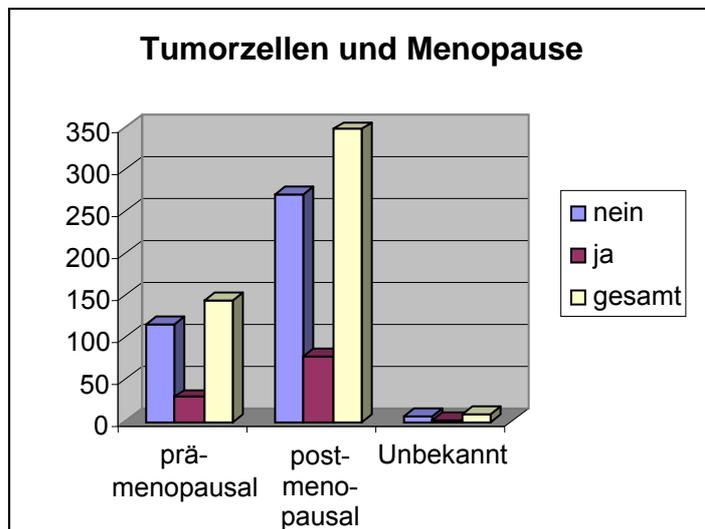


Abbildung 66: Tumorzellen und Menopause. Die Abbildung zeigt eine nur geringfügig höhere Anzahl an post-menopausalen Patientinnen mit positiven Zytokeratinzellen verglichen mit der Gesamtanzahl.

Betrachtet man die Anwesenheit von Tumorzellen in Abhängigkeit zum Menopausenstatus, so zeigt sich bei 29 der 144 prä-menopausalen Patientinnen (20,1% und 5,8% des Gesamtkollektivs) ein positiver Befund bezüglich der Tumorzellen im Knochenmark. Bei den post-menopausalen Frauen waren es 78 von 347 (22,4% und 15,6% des Gesamtkollektivs), das heißt, dass die post-menopausalen Patientinnen prozentual nur geringfügig häufiger zytokeratine Knochenmarkszellen im Aspirat aufwiesen. (GK pWert=0,026).

Tumorzellen in Abhängigkeit der betroffenen Seite

Von den 8 beidseitigen Tumoren war nur einer Knochenmark-positiv (12,5% und 0,2% des Gesamtkollektivs (GK), wohingegen es bei den linksseitigen Tumoren 63 von 260 Patientinnen (24,2% und 12,6% des GK) und bei den rechtsseitigen Tumoren 45 von 232 Patientinnen waren (19,3% und 9% des GK), die zytokeratine Zellen im Knochenmarksaspirat aufwiesen. (GK p Wert=0,065).

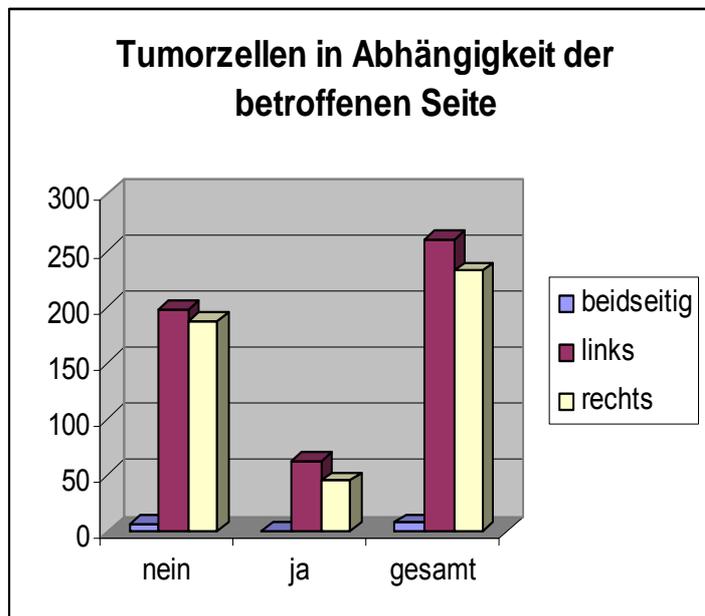


Abbildung 67: Tumorzellen in Abhängigkeit der betroffenen Seite. Die Abbildung zeigt, dass die linksseitig befindlichen Tumoren häufiger mit einem zytokeratin-positiven Befund assoziiert waren als die rechtsseitigen Tumoren.

Tumorzellen in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten

Betrachtet man die Anwesenheit von Tumorzellen bezüglich des betroffenen Quadranten, so ergab sich bei 49 von 220 (22,2% und 9,8% des GK) der sich im oberen äußeren Quadranten befindlichen Tumoren ein zytokeratin-positiver Befund. Im äußeren unteren Quadranten zeigten sich 5 von 37 Patientinnen (13,5% und 1% des GK) zytokeratin-positiv, während es bei 20,6% bzw. 2,4% des GK (12 von 58) der Patientinnen mit einem Tumor im inneren oberen Quadrant waren, die zytokeratin-positiv befundet wurden. Im inneren-unteren Quadranten waren 6 von 21 Patientinnen und damit 28,5% bzw. 1,2% des GK zytokeratin-positiv.

Die Patientinnen mit einem Tumor im äußeren-oberen Quadranten stellten damit den größten Anteil an zytokeratinen Zellen im Knochenmarksaspirat, aber auch gleichzeitig das größte Kollektiv insgesamt dar (pWert=0,149).

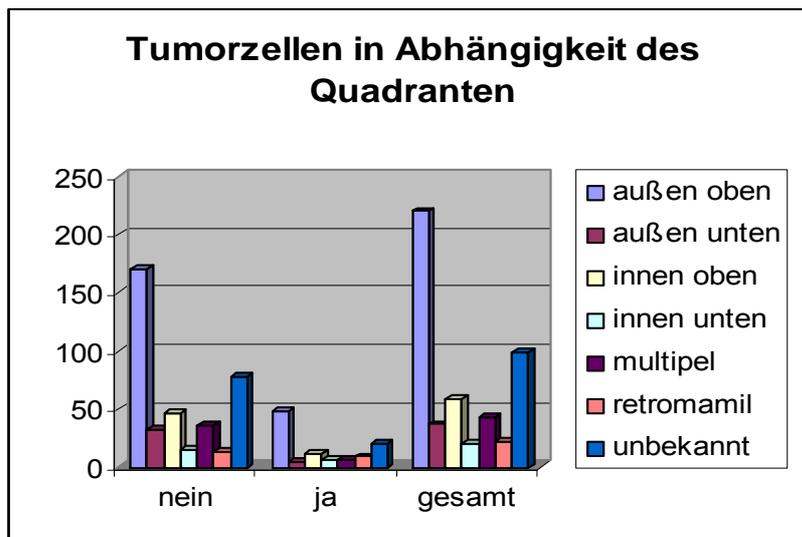


Abbildung 68: Tumorzellen in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten. Die Abbildung zeigt, dass der äußere-obere Quadrant am häufigsten mit einem zytokeratin-positiven Befund assoziiert war.

Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumorhistologie

Betrachtet man die Anwesenheit von Tumorzellen bezüglich der Tumorhistologie, so waren 75 von 324 (23,1% und 15% des GK) der duktal-invasiven und 21 von 106 (19,8% und 4,2% des GK) der lobulär-invasiven Tumoren zytokeratin-positiv. Bei den gemischten Tumoren waren es 22,2% bzw. 1,6% des GK (8 von 36) und bei den

inflammatorischen 25% bzw. 0,4% des GK, d.h. 6 von 8 Tumoren, die im Aspirat Zytokeratinzellen enthielten. Insgesamt stellten die duktal-invasiven Tumoren histologisch auch den größten Anteil des Gesamtkollektivs (pWert=0,071).

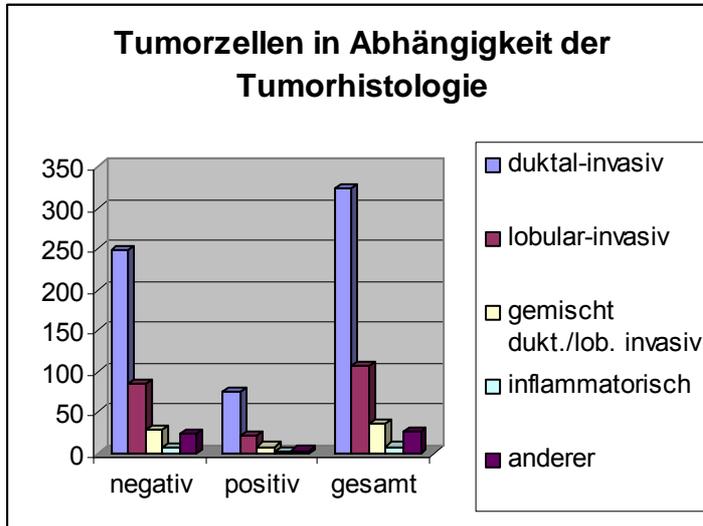


Abbildung 69: Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumorhistologie. Die Abbildung zeigt, dass bei einem duktal-invasivem Tumor häufiger Zytokeratinzellen beobachtet wurden, als bei anderen Tumoren.

Tumorzellen in Abhängigkeit der Karzinoma in situ

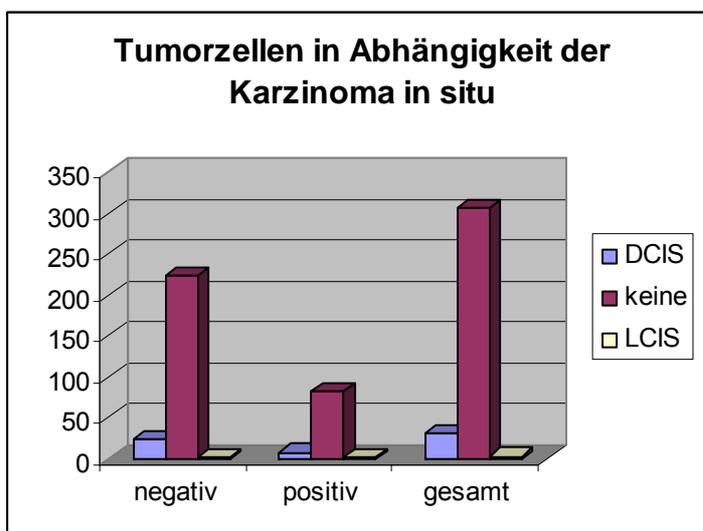


Abbildung 70: Tumorzellen in Abhängigkeit der Karzinoma in situ. Die Abbildung zeigt deutlich, dass Patientinnen ohne Karzinoma in situ den größten Anteil des Kollektivs stellten. Das DCIS-Kollektiv hat ein Viertel (25%) zytokeratin positiver Befunde, während es bei den LCIS schon ein Drittel (33%) sind.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zu den Karzinoma in situ, so ließen sich bei acht von 32 Patientinnen (25% und 1,6% des GK) mit duktalem Karzinoma in situ und bei einem von drei mit lobulärem Karzinoma in situ (33% und 0,2% des GK) zytokeratine Zellen im Knochenmark beobachten. (GK Wert=0,019)

Tumorzellen in Abhängigkeit der TumorgroÙe

Bezüglich der TumorgroÙe konnten bei 6 von 24 Patientinnen (25% und 1,2% des GK) mit T1a zytokeratinhaltige Zellen gefunden werden. Bei einem Umfang von T1b waren es 12 von 75 (16% und 2,4% des GK) und bei T1c 44 von 220 (20% und 8,8 des GK), die in ihrem Aspirat zytokeratine Zellen aufwiesen. Geschwüre mit der Klassifikation T2 waren bei 20,5% (6,2% des GK) und in der Kategorie T3 waren 57,1% (0,8% des GK) der Aspiarte zytokeratin-positiv (37 von 151). Es wurden bei 31,5% der T4 Tumoren (1,2% des GK) als zytokeratin-positiv befundet (6 von19). (GK pWert=0,161).

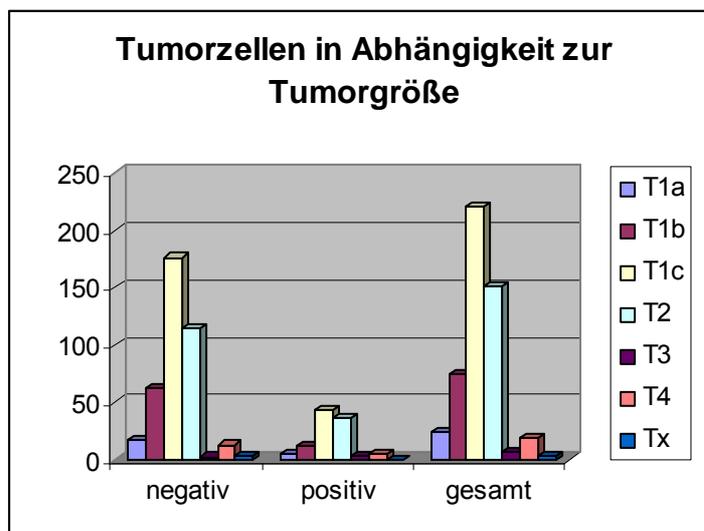


Abbildung 71: Tumorzellen in Abhängigkeit der TumorgroÙe. Die Abbildung zeigt, dass prozentual die meisten zytokeratin-positiven Befunde bei T3 Tumoren gefunden wurden. Allerdings waren die meisten Patientinnen an T1a, T1b und T1c Tumoren erkrankt.

Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung

Bezüglich der Tumordifferenzierung konnte bei 5 von 23 Patientinnen (21,7% und 0,1% des GK) mit G1 zytokeratinhaltige Zellen gefunden werden. Bei einem Grading

von G2 waren es schon 49 von 194 (25,2% und 9,8% des GK) und bei G3 waren es 35 von 143 (24,4% und 7% des GK), die in ihrem Aspirat zytokeratine Zellen aufwiesen. Insgesamt wurden am häufigsten zytokeratin-positive Asperate bei Patientinnen mit Grading G2 und dann G3, am seltensten jedoch mit G1 beobachtet (pWert=0,117).

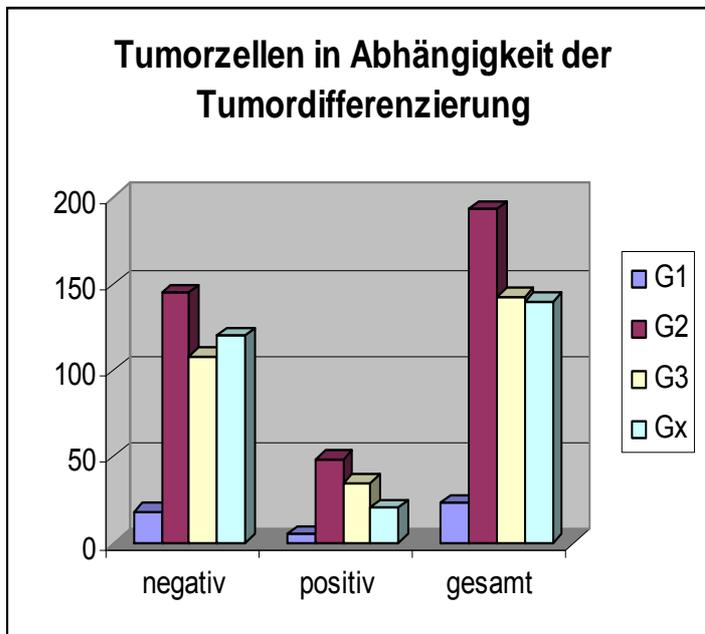


Abbildung 72: Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung. Die Abbildung zeigt eine numerisch höhere Häufigkeit zytokeratin-positiver Zellen im Grading G2 und G3 als in G1.

Tumorzellen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

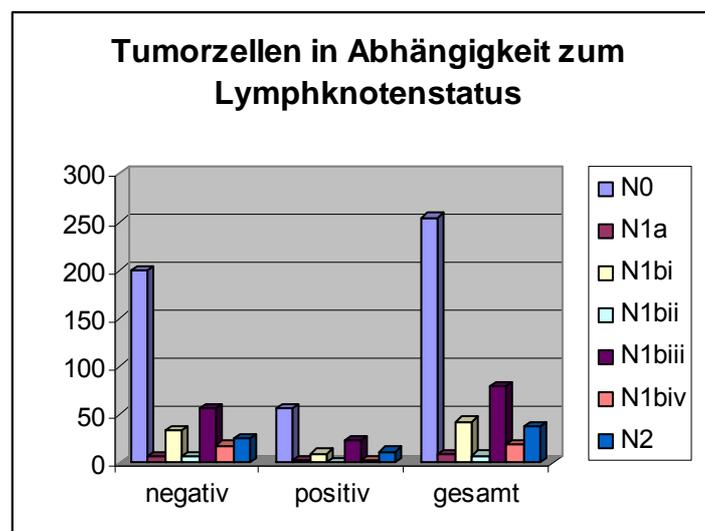


Abbildung 73. Tumorzellen in Abhängigkeit zum Lymphknotenstatus. Die Abbildung zeigt eine besondere Abhängigkeit des Lymphknotenstatus von einem zytokeratin-positiven Befund.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zum Lymphknotenstatus, so zeigten 56 von 255 Patientinnen (21,9% bzw. 10,8% des GK) ohne befallene Lymphknoten zytokeratin-positive Aspirate, während es bei den Patientinnen mit N1a schon drei von neun (33,3% und 0,6% des GK) waren. Bei den Frauen mit N1bI 10 von 43 (23,2% und 2% des GK), im Kollektiv mit N1bII eine von acht (12,5% und 0,2% des GK), bei denen mit N1bII 23 von 79 (29,1% und 4,6% des GK) und im Kollektiv mit N1bIV waren es zwei von 20 (10% und 0,4% des GK) mit zytokeratin-positivem Befund. Es wurden bei 31,5% der Patientinnen mit einem Status von N2 (2,4% des GK) zytokeratin positive Zellen gefunden. (GK pWert=0,180)

Tumorzellen in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zum Östrogenrezeptorstatus, lässt sich bei 67 von 323 der Patientinnen (20,7% und 13,4% des GK) mit positiven Östrogenrezeptoren ein zytokeratin-positives Aspirat dokumentieren. (GK pWert=0,054)

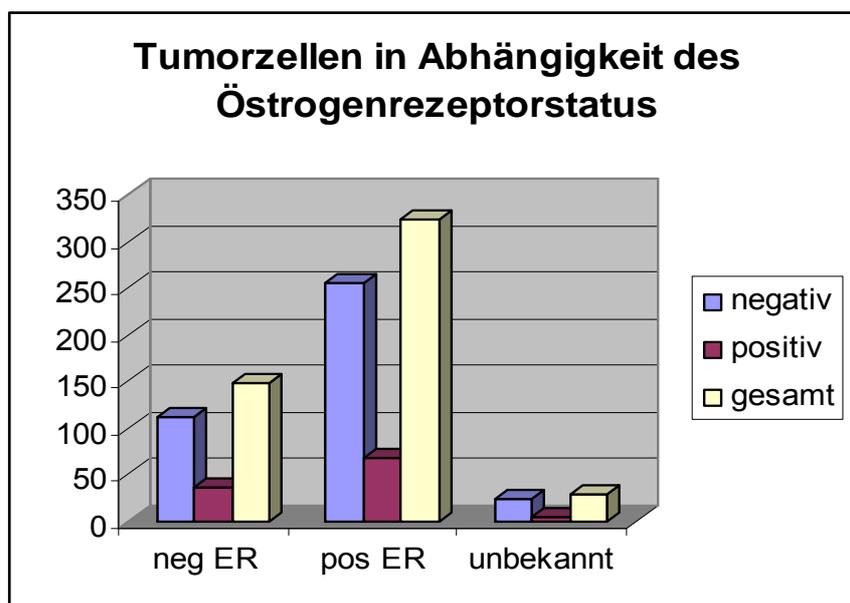


Abbildung 74: Tumorzellen in Abhängigkeit zum Östrogenrezeptorstatus. Die Abbildung zeigt eine numerische Häufung der zytokeratin-positiven Befunde zugunsten der Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus.

Tumorzellen in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zum Progesteronrezeptorstatus, lässt sich in 58 von 292 (19,8% und 11,6% des GK) mit positiven Progesteronrezeptoren ein zytokeratin-positives Aspirat beobachten. (pWert=0,068)

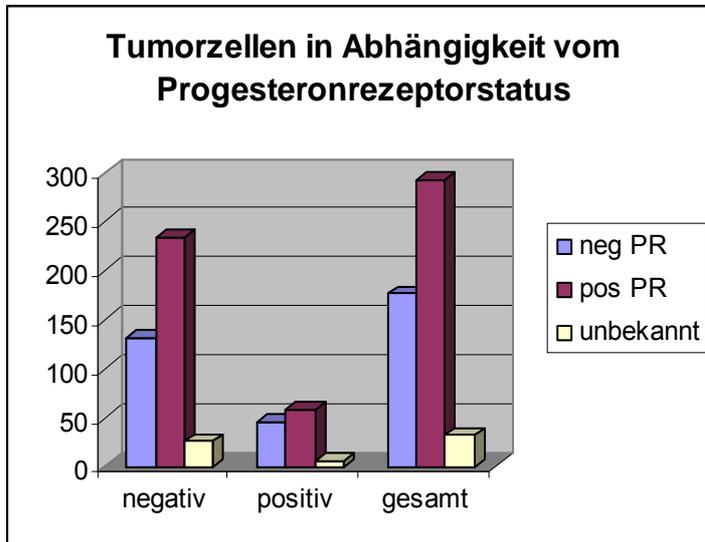


Abbildung 75: Tumorzellen in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus. Die Abbildung zeigt, dass sich zytokeratin-negative wie auch -positive Befunde gemäß der Gesamtverteilung verteilen.

Tumorzellen in Abhängigkeit multifokaler Tumoren

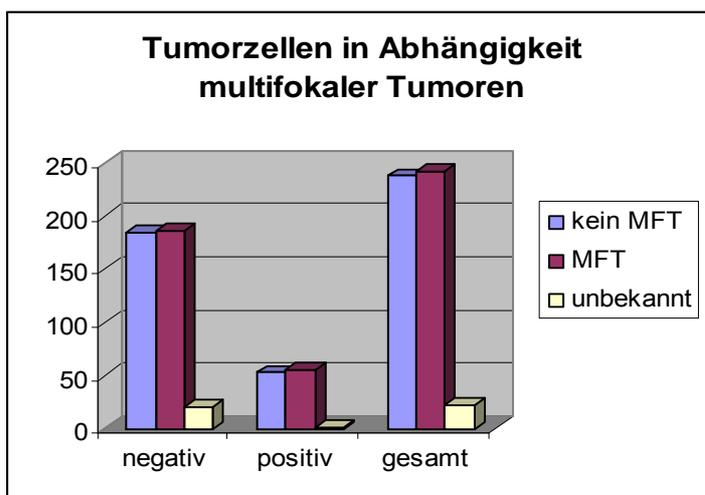


Abbildung 76: Tumorzellen in Abhängigkeit multifokaler Tumoren. Die Abbildung zeigt, dass die Multifokalität relativ unabhängig von Tumorzellstatus ist. Auffällig ist, dass die unbekannt Tumoren häufig als zytokeratin-negativ befunden wurden.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit multifokaler Tumoren so zeigt sich, dass sich in 55 der 241 Patientinnen (22,8%, 11% des GK) mit multifokalem Tumor zytokeratine Zellen im Aspirat befanden, während es bei den Patientinnen ohne multifokalem Tumor 53 von 237 Patientinnen waren (22,4%, 10,6% des GK). (GK pWert=0,005)

Tumorzellen in Abhängigkeit multizentrischer Tumoren

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit multizentrischer Tumoren so zeigt sich, dass sich bei 20 der 63 Patientinnen (31,7%, 4% des GK) mit multizentrischem Tumor zytokeratine Zellen im Aspirat befanden, während es bei den Patientinnen ohne multizentrischem Tumor 87 von 402 Patientinnen waren (21,6%, 17,4% des GK). (GK pWert=0,082)

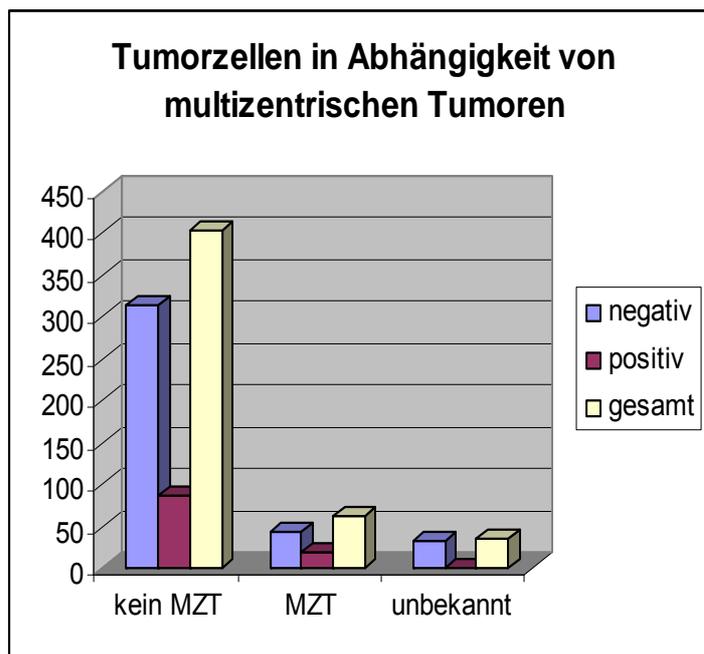


Abbildung 77: Tumorzellen in Abhängigkeit multizentrischer Tumoren. Die Abbildung zeigt, dass bei Patientinnen ohne multizentrische Tumoren (MZT) anteilig deutlich häufiger zytokeratin-negative Aspirate vorlagen als im Kollektiv mit multizentrischen Tumoren.

Tumorzellen in Abhängigkeit von Lymphangiosis Karzinomatosa

Betrachtet man das Auftreten von Tumorzellen in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa, so zeigen 25 von 108 Patientinnen (23,1%, 5% des GK) einen

zytokeratin-positiven Befund, während es 81 von 368 Patientinnen (22%, 17,4% des GK) ohne Lymphangiosis Karzinomatosa mit zytokeratin-positivem Befund waren.

Demnach kann keine Assoziation zwischen Lymphangiosis karzinomatosa und dem Auftreten von Tumorzellen erkannt werden. (GK pWert=0,011)

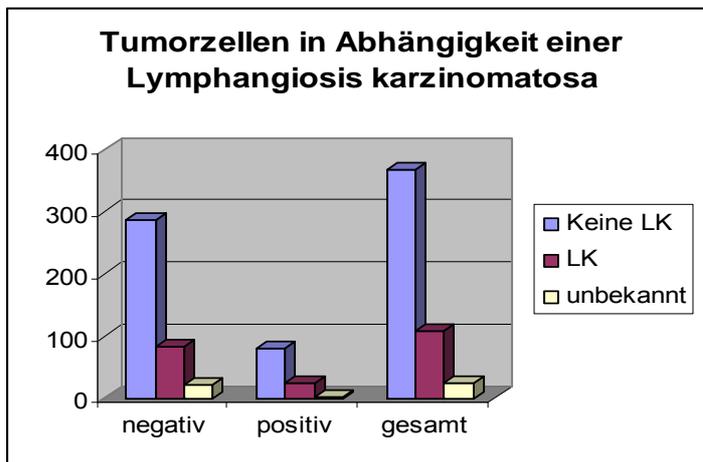


Abbildung 78. Tumorzellen in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa. Die Graphik zeigt ein sich auf das Gesamtkollektiv bezogenes ähnliches Verhalten der Verteilungen innerhalb der Charakteristika, jedoch waren ob mit oder ohne Lymphangiosis karzinomatosa (LK) mehr Asperate ohne zytokeratine Zellen beobachtet worden.

Tumorzellen in Abhängigkeit von Hämangiosis Karzinomatosa

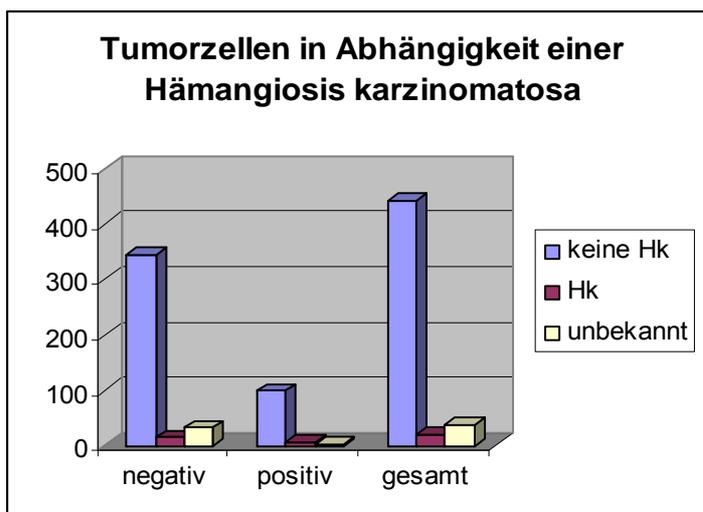


Abbildung 79. Tumorzellen in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa. Die Graphik zeigt ein sich auf das Gesamtkollektiv bezogenes ähnliches Verhalten der Verteilungen innerhalb der Charakteristika, jedoch zeigte sich auch hier, dass unabhängig vom Auftreten einer Hämangiosis karzinomatosa (HK) mehr Asperate ohne zytokeratine Zellen beobachtet worden waren.

Betrachtet man das Auftreten von Tumorzellen in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa, so zeigen 6 von 21 Patientinnen (28,6%, 1,2% des GK) einen zytokeratin-positiven Befund, während es 99 von 442 Patientinnen (22,2%, 19,8% des GK) ohne Hämangiosis karzinomatosa mit zytokeratin-positivem Befund waren. (GK pWert=0,031)

Tumorzellen in Abhängigkeit der Primäroperation

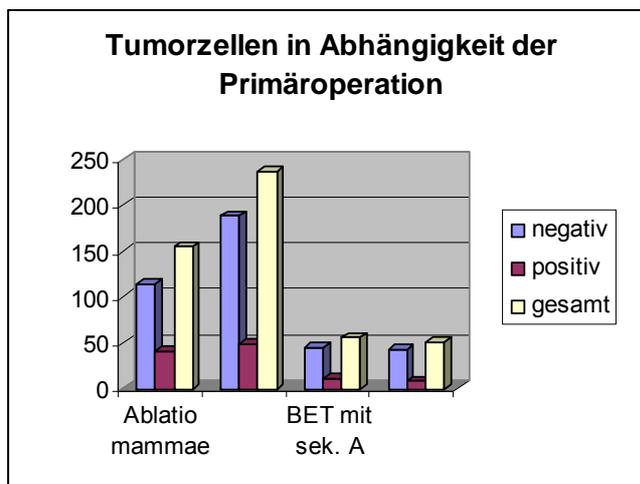


Abbildung 80: Tumorzellen in Abhängigkeit der Primäroperation. Die Graphik zeigt, dass am häufigsten bei BET operierten Patientinnen ein zytokeratin-positiver Befund erfasst wurde, gefolgt von den Ablatio mammae.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zur Primäroperation so zeigt sich, dass sich bei 41 der 155 Patientinnen (26,5%, 8,2% des GK) mit Mamma Ablatio, bei 49 von 237 Patientinnen (20,6%, 9,8% des GK) mit BET zytokeratine Zellen im Aspirat befanden. Bei den Patientinnen mit BET und sekundärer Ablatio waren 11 von 56 Patientinnen (19,6%, 2,2% des GK) und bei den acht von 51 Patientinnen (15,6%, 1,6% des GK) positiv für zytokeratine Zellen. (GK p Wert=0,83)

Tumorzellen in Abhängigkeit der systemischen Therapie

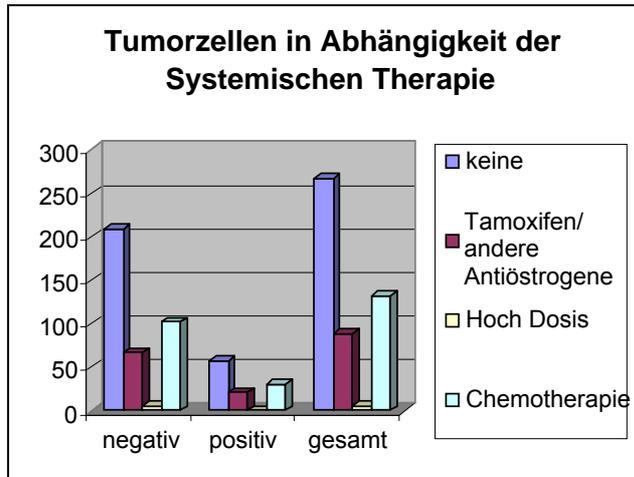


Abbildung 81: Tumorzellen in Abhängigkeit zur systemischen Therapie. Die Abbildung zeigt, dass die meisten zytokeratin-positiven Befunde bei den Patientinnen ohne systemische Therapie gefunden wurden, gefolgt vom Kollektiv, das chemotherapeutisch behandelt wurde.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zur systemischen Behandlung, so zeigten 58 von 268 Patientinnen (21,6% bzw. 11,6% des GK) ohne systemische Therapie zytokeratin-positive Aspirate, während es bei den Patientinnen mit Tamoxifen oder anderer Antiöstrogen-Therapie schon 21 von 88 (23,9% und 4,2% des GK) und bei denen mit Chemotherapie 30 von 132 (22,7% und 6% des GK) mit zytokeratin-positivem Befund waren. Bei den mit HD-Chemotherapie behandelten Patientinnen enthielt kein Knochenmarksaspirat Tumorzellen. (GK pWert=0,129)

Tumorzellen in Abhängigkeit der Bestrahlung

Betrachtet man die Tumorzellen in Abhängigkeit zur Bestrahlung, so zeigten 17 von 88 Patientinnen (19,3 % bzw. 3,4% des GK) mit einer Bestrahlung von 1,8 Gray pro Einzeldosis zytokeratin-positive Aspirate, während es bei den Patientinnen mit 2,0 Gray schon 55 von 223 (24,7% und 11% des GK) und bei denen ohne Bestrahlung 35 von 158 Patientinnen (22,2% und 7% des GK) mit zytokeratin-positivem Befund waren. (GK pWert=0,073)

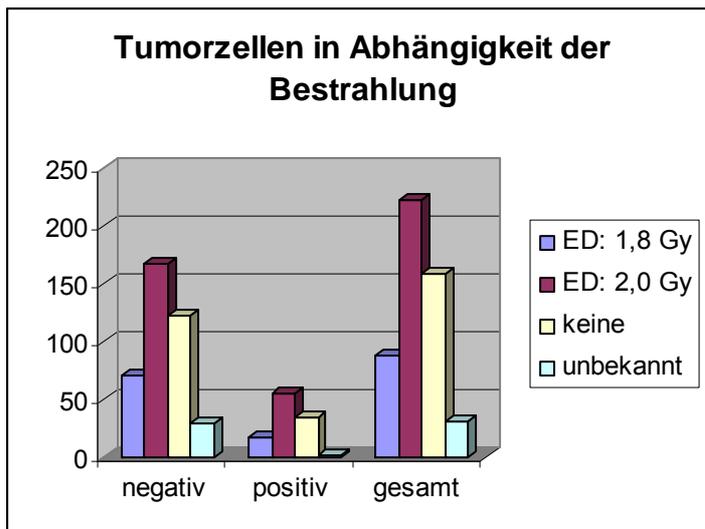


Abbildung 82: Tumorzellen in Abhängigkeit der Bestrahlung. In der Graphik sieht man, dass sich die Verteilung der zytokeratin-positiven Befunde adäquat der Gesamtverteilung verhält und demnach die Patientinnen mit Einzeldosen von 2,0 Gray am häufigsten zytokeratine Zellen in ihrem Aspirat aufwiesen.

Tumorzellen in Abhängigkeit von Art und Anzahl der Rezidive

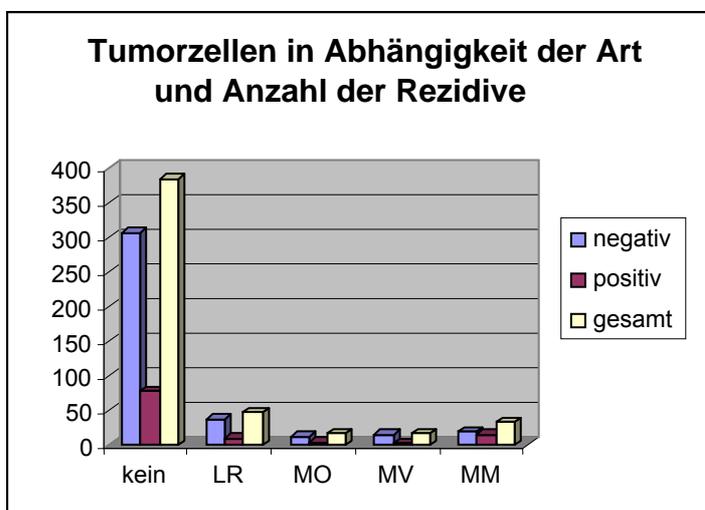


Abbildung 83: Tumorzellen in Abhängigkeit von Art und Anzahl der Rezidive. Die Abbildung zeigt, dass die multiplen Metastasen anteilig die meisten zytokeratin-positiven Befunde aufwiesen.

Setzt man die Tumorzellen in Abhängigkeit zu Art und Anzahl der Rezidive, so zeigen 78 von 385 Patientinnen (20,3% bzw. 15,6% des GK) ohne Rezidiv zytokeratin-positive Aspirate, während es bei den Patientinnen mit lokalen Rezidiven 10 von 479 (21,3% und 2% des GK), bei denen mit ossären Metastasen 4 von 17 (23,5% und 0,8% des GK), im Kollektiv mit viszeralen Metastasen 2 von 17 (11,8%

und 0,4% des GK) und bei denen mit multiplen Metastasen 15 von 34 (44,1% und 3% des GK) mit zytokeratin-positivem Befund waren. (GK pWert=0,474)

Tumorzellen in Abhängigkeit des Vitalstatus

In Patientinnen, die an Tumor unabhängigen Ursachen verstarben, waren 5 von 15 Aspirate (33,3%, 1% des GK) zytokeratin-positiv, während es hingegen bei den Patientinnen, die an den Folgen des Tumorgeschehens verstarben, 20 von 58 Aspirate waren (34,5%, 4% des GK), die zytokeratin-positiv waren. Die noch lebenden Patienten zeigten in 343 von 427 untersuchten Aspiratproben (80,3%, 68,6% des GK) einen zytokeratin-negativen Befund. Somit lässt sich schließen, dass ein zytokeratin-negativer Befund mit dem Überleben assoziiert sein muss. (GK pWert=0,125)

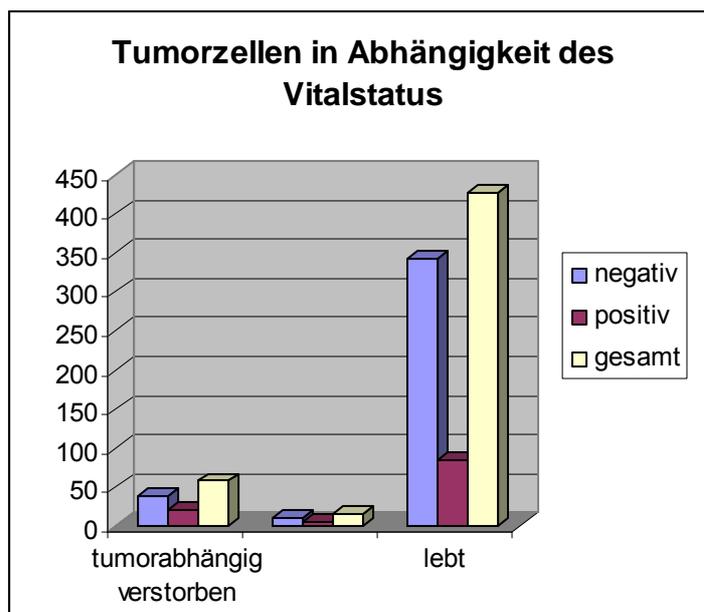


Abbildung 84: Tumorzellen in Abhängigkeit des Vitalstatus. Die Graphik zeigt deutlich, dass die lebenden Patientinnen viermal häufiger zytokeratin-negative als zytokeratin-positive Aspiratproben aufweisen. Bei den tumorabhängig Verstorbenen sind deutlich mehr zytokeratin-positive am Gesamtanteil zu erkennen.

5 Auswertung

5.1 Untersuchung der Basischarakteristika in Verbindung mit dem Auftreten eines Rezidivs

Insgesamt verstarben 11,6% der Patientinnen im Zeitraum von 1994 bis 2002 tumorabhängig und 23% der Frauen erkrankten an einem Rezidiv.

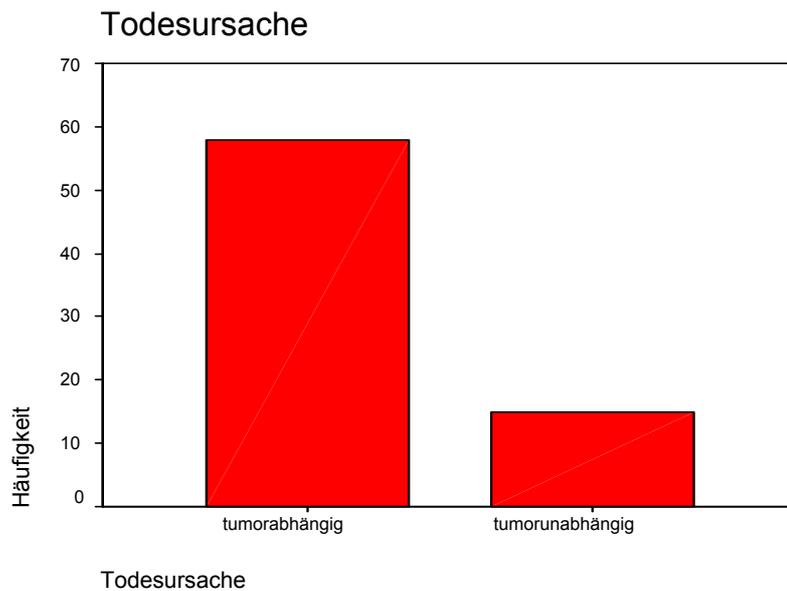


Abbildung 85: Balkendiagramm Todesursache. Von den 74 verstorbenen Patientinnen, starben 58 an einer tumorabhängigen, und 16 an einer Tumorunabhängigen Ursache.

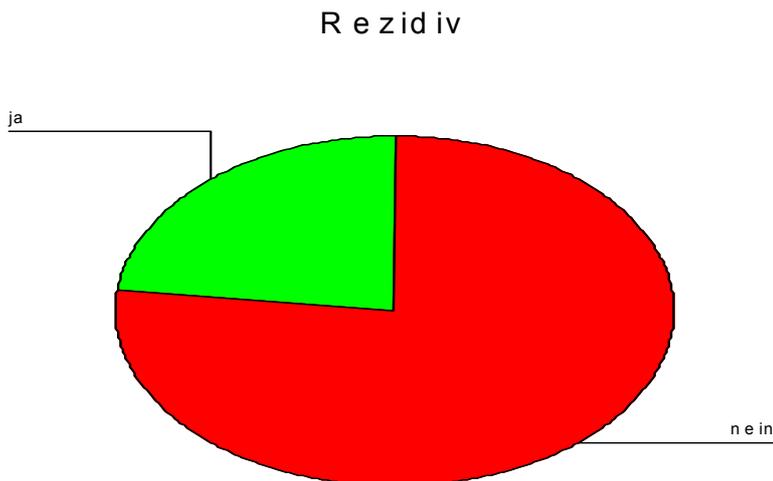


Abbildung 86: Kreisdiagramm zum Auftreten eines Rezidivs.

In der Berechnung des Prognosemodells ergeben sich weiterhin folgende Verbindungen. Beim Menopausenstatus ist der Einfluss von „prämenopausal“ auf die abhängige Variable mit $p=0,001$ statistisch signifikant. Das Odds Ratio von 2,614 zeigt, dass für prämenopausale Frauen die mit „1“ kodierte Ausprägung der abhängigen Variable beim Anstieg dieses Prädiktors um eine Einheit ca. 2-6 mal wahrscheinlicher ist, das heißt, dass prämenopausale Patientinnen 2-6 mal häufiger an einem Rezidiv erkranken. Eine Korrelation besteht auch zwischen dem Auftreten einer Lymphangiosis karzinomatosa und einem Rezidiv mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,001$ und dem Auftreten einer Hämangiosis karzinomatosa mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,035$.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der mehrstufigen Prädiktoren Lymphknotenstatus und die Östrogenrezeptor Positivität (ERPR) erläutert; die letzte Kategorie ist jeweils redundant und ergibt sich aus den anderen Gruppierungen. ERPR ($p=0,006$) ist insgesamt statistisch signifikant. Die vorgestellte ERPR-Einzelstufe 1 („Östrogen: negativ / Progesteron: negativ“) zeigt eine statistische Signifikanz von $p=0,001$ zugunsten dem Auftreten eines Rezidivs. Das Odds Ratio von 3,102 zeigt, dass für Frauen mit negativem Rezeptorstatus beim Anstieg dieses Prädiktors um eine Einheit das Ereignis „Rezidiv: ja“ ca. dreimal wahrscheinlicher ist, d.h. Patientinnen mit negativem Rezeptorstatus erkranken wahrscheinlich dreimal häufiger an einem Rezidiv. Abschließend wurden die Ergebnisse des metrischen Prädiktors eines positiven Lymphknotenstatus (LKPOS) erläutert. Bei LKPOS drückt das $\text{Exp}(B) = 1.453$ bei einem Anstieg um eine Einheit zunehmende Quoten der abhängigen Variablen aus. Dies macht ein „Rezidiv: ja“ ca. 1,5-mal wahrscheinlicher, d.h. Patientinnen mit Lymphknotenbefall entwickeln 1,5-mal wahrscheinlicher ein Rezidiv.

Weiterhin ist die Tumordisseminierung mit $p=0,008$ statistisch signifikant zugunsten dem Vorliegen Tumor disseminierter Zellen. Patientinnen mit Tumor disseminierten Zellen im Knochenmarksaspirat zeigen eine statistisch signifikante Assoziation zur Entwicklung eines Rezidivs. Ferner besteht eine starke statistisch signifikante Korrelation zwischen Vitalstatus und Rezidiventwicklung, als auch zwischen Tumorhistologie und Tumorgröße und Rezidiventwicklung bei $p=0,00$. Alle weiteren Charakteristika sind nicht aussagekräftig.

5.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms und prognostische Bedeutung

Bei 21,8% der Patientinnen (109 von 500) wurden in der hier vorliegenden Arbeit zytokeratin-positive Zellen im Knochenmarksaspirat gefunden und mit einigen Prognosekriterien verglichen.

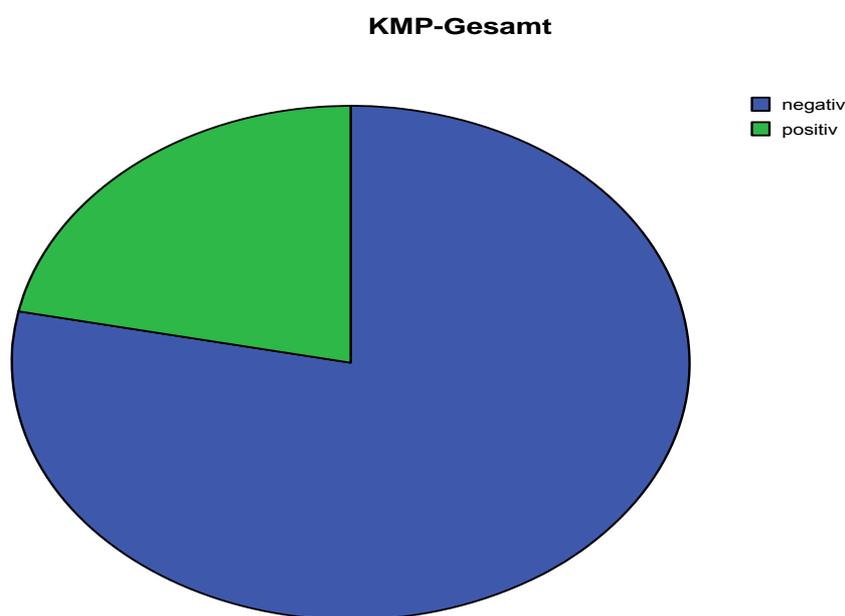


Abbildung 87: Kreisdiagramm zur Knochenmarksbiopsie. Das Kreisdiagramm zeigt die Verteilung der negativen und positiven Befunde auf das Gesamtkollektiv.

Im Prognosemodell konnte eine statistisch relevant Korrelationen zwischen dem Auftreten eines Rezidivs und der Knochenmarkpositivität mit einer statistischen Signifikanz von $p=0,007$ errechnet werden. Die Relationen zwischen den Knochenmarksbefunden und den unterschiedlichen Metastasenarten wurden einzeln betrachtet.

So zeigt sich zwischen positivem Knochenmarksbefund und dem Auftreten eines ossären Rezidivs eine hohe statistische Signifikanz mit einem $p=0,005$.

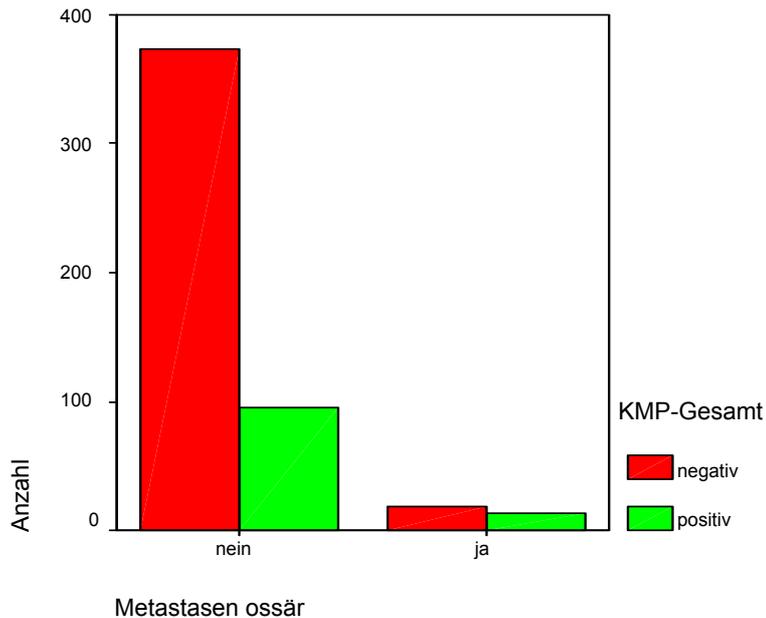


Abbildung 88: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Relationen zwischen Knochenmarksbefund und ossärem Rezidiv. Das Diagramm zeigt deutlich eine Assoziation zwischen dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Aspirat und einem ossärem Rezidiv.

Ebenso konnte eine statistisch signifikante Korrelation von $p=0,015$ zwischen viszerale Metastasen und zytokeratin-positiven Befunden beobachtet werden.

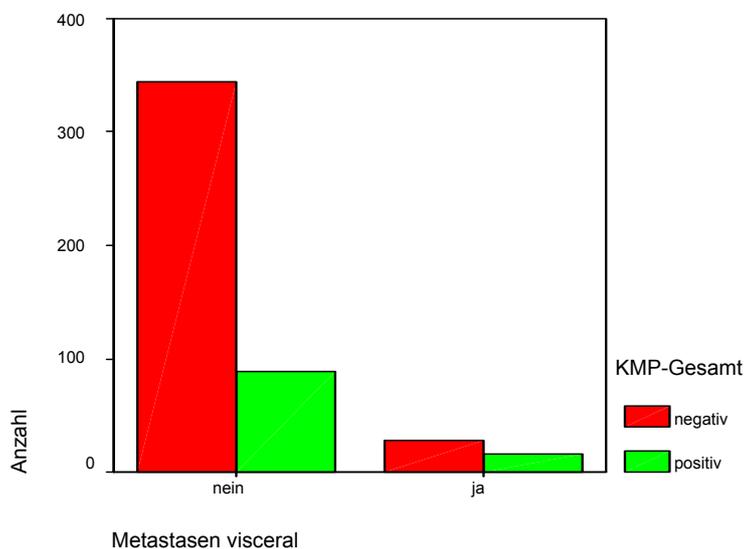


Abbildung 89: Balkendiagramm zytokeratin-positiver Befund und viszerale Metastasen. Das Diagramm zeigt deutlich, dass Patientinnen, die eine viszerale Metastase entwickelten, anteilig häufiger Tumor disseminierte Zellen im Knochenmarksaspirat aufwiesen.

Ferner gibt es eine starke statistische Assoziation zwischen dem Auftreten von Fern - bzw. multiplen Metastasen und einem positiven Knochenmarksbefund bei einem $p= 0,001$.

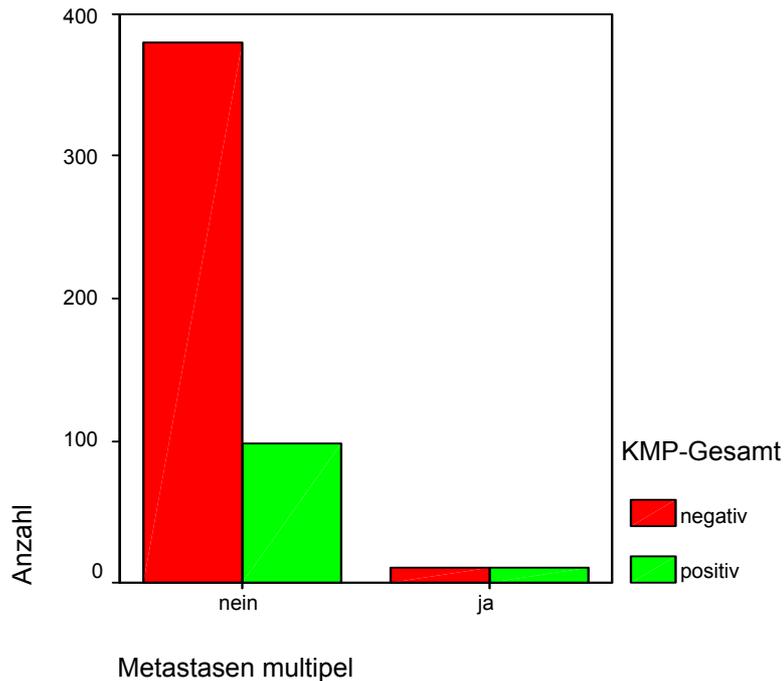


Abbildung 90: Balkendiagramm Fernmetastasen und zytokeratin-positiver Befund. Das Diagramm zeigt deutlich, dass bei Auftreten eines multiplen Rezidivs bzw. bei Fernmetastasen die Hälfte aller Frauen disseminierte Tumorzellen im Aspirat aufwiesen.

Eine weitere statistisch signifikante Korrelation besteht zwischen Vitalstatus und dem Auftreten Tumor disseminierter Zellen mit einem $p = 0,02$.

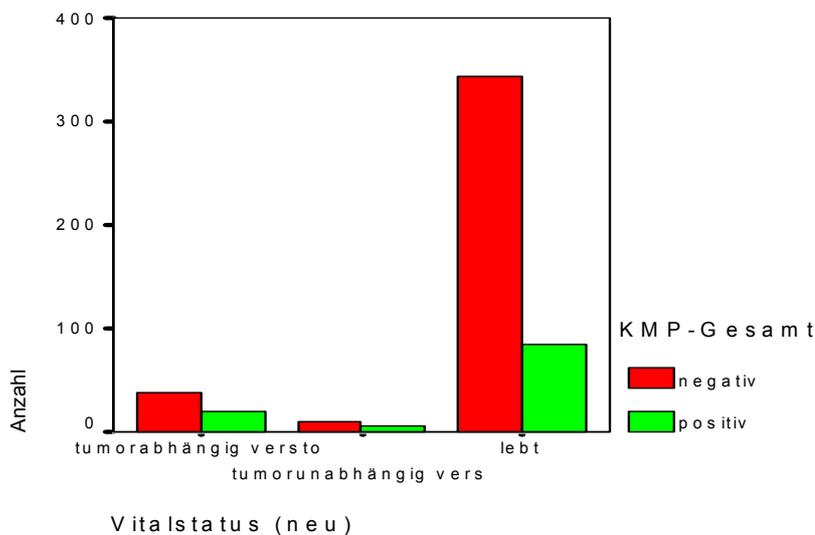


Abbildung 91: Balkendiagramm Vitalstatus und zytokeratin-positiver Befund. Im Diagramm lässt sich gut erkennen, dass die tumorabhängig verstorbenen Patientinnen anteilig häufiger zytokeratin-positiv waren. Hingegen zeigen die noch lebenden Patientinnen deutlich häufiger negative Befunde.

6 Diskussion

6.1 Forschungsstand

Im Gegensatz zu der Messmethode der vorliegenden Arbeit, in der eine Knochenmarksaspiration mit anschließender Aufbereitung und Detektion von zytokeratin-positiven Zellen (DTSc) mittels der (RT)-PCR vorgenommen wurde, sind in den vergangenen Jahren die meisten Studien zu disseminierten Tumorzellen bei Brustkrebs durch Bestimmungen von Blutproben (CTCs) entstanden, da sich diese Messmethode einfacher in den Klinikalltag integrieren lässt.^{108,109,110}

Slade et al. 2009¹¹¹ verglichen beide Testverfahren und konnten zeigen, dass die Ergebnisse sich nicht wesentlich unterschieden mit einer Tendenz, dass DTCs sich häufiger bei Patienten mit einem positiven Lymphknotenbefund zeigten. Auch diese Studie befürwortet das Testverfahren der CTCs, weil es einfacher und vor allem häufiger anzuwenden ist. Demgegenüber steht die Auswertung von Fehm et al., die darauf hinweist, dass DTCs für die Prognostik viel sicherer ist als CTCs, auch wenn auf die einfache Handhabung verwiesen wird.¹¹² Schindlbeck et al. (2008) unterstützen ebenso dieses Testverfahren. Sie konnten auch nachweisen, dass der Wirkstoff Zoledronat isolierte Tumorzellen im Knochenmark bei Krebspatientinnen deutlich reduzieren kann.¹¹³

Das Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit persistierendem Mammakarzinom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Eine Vielzahl von Untersuchungen hat bereits die prognostische Bedeutung des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark untersucht.^{60,61,91,93,94,97,114} Bislang ist aber nicht sicher, welche biologischen Faktoren eine hämatogene Dissemination prognostizieren können. Schindlbeck et al untersuchten 265 Krebsproben von Patienten, die einen BM Befund für HER2, Topoisomerase IIalpha (Top IIa), Ki 67, und p53 hatten. Doch keiner dieser Faktoren konnte eine sichere Prognose für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (DTC-BM) geben.¹¹⁵ Ebenso erbrachte eine Studie, die den Serum Tumor Marker Carcinoembryonic antigen (CEA) untersuchte, keine klinische und prognostische Sicherheit. Jedoch konnte einen Trend zum kürzeren DFS Status in der Gruppe mit dem Antigen CEA im Knochenmark bestätigt werden ($p=0.05548$).¹¹⁶

Demgegenüber konnten Studien für (HIF-1alpha) und (VEGF)¹¹⁷ und für das Thomsen-Friedenreich (TF) antigen (CD 176)¹¹⁸ in CTCs eine positive Relation zwischen der Expression im Blut und Brustkrebs mit Metastasen nachgewiesen werden.

Bezüglich der prognostischen Bedeutung herrscht jedoch noch Uneinigkeit, da beispielsweise die Autoren Cote et al. (1991)⁹¹ und Diel et al. (1992)⁷⁰ einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und dem Auftreten von Rezidiven als auch einer geringeren Gesamtüberlebensrate beobachten konnten, jedoch Funke et al. (1998)⁶⁹ und Untch et al. (1989)¹¹⁹ eben diesen Zusammenhang nicht bestätigen konnten. In der Untersuchung von Diel et al. korrelierte der Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark mit Tumorgröße ($p < 0,001$), axillärer Lymphknotenmetastasierung ($p = 0,001$), Menopausenstatus ($p = 0,01$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,002$), was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten korreliert. Allerdings in der Arbeit von Braun et al. assoziierte der Knochenmarkstatus nur mit der Tumorgröße ($p < 0,001$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,017$), nicht jedoch mit dem Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen. Lediglich nach Stratifizierung der Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten konnte Braun eine positive Korrelation errechnen.

Insgesamt konnte die vorliegende Studie zeigen, dass das Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist.

Im Jahre 1997 wurde die Klassifikation M1(I) als Hinweis für eine hämatogene Mikrometastasierung in das TNM System eingeführt.¹⁰⁵ Die Überarbeitung der TNM-Klassifikation führte 1998 zu einer Metaanalyse, welche insgesamt 20 Studien mit 2.494 Patientinnen einschloss. Der Untersuchungsfokus lag hierbei auf der Heterogenität der untersuchten Tumorentitäten und Testmethoden, die insgesamt zu einem zurückhaltenden Ergebnis führten, jedoch ein relatives Rezidivrisiko von 1,34 (1,27 – 1,42, 95% CI) für Patientinnen Mammakarzinom bei Auftreten von disseminierten Tumorzellen formulierten.⁶⁹

Die Vermutung liegt nahe, dass die unterschiedlichen Studienergebnisse in einer Inkongruenz der Studienfallzahlen aber auch der Nachweismethoden zum Erfassen disseminierter Tumorzellen ursächlich begründet sein mag. Relevant ist hierbei vor allen Dingen die Test-Sensitivität und -Spezifität¹²⁰. Bislang wurden nur die Zytokeratin-Antikörper zum Nachweis effizient validiert^{114,121}, so dass nun auch andere Autoren die Wichtigkeit einer standardisierten immunzytochemischen Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen erkannt haben.

In einer umfangreichen Studie der I. Universitätsfrauenklinik München und der Frauenklinik des Zentralklinikum Augsburg wurden im Jahr 2000 viele neue Daten ergänzt.⁶⁰ In dieser Untersuchung an 552 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im UICC-Stadium I-III, zu denen auch ein Teil, der in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen gehörte, war das Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen und mit dem tumorbedingten Versterben der Patientinnen assoziiert ($p < 0.001$). Die prognostische Relevanz der Knochenmarksbefunde bestätigte sich in der multivarianten Analyse als unabhängiger Parameter.

In Tabelle 2 sind die bis dato wichtigsten Publikationen zur prognostischen Relevanz isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom zusammengefasst.

Tabelle 2: Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom.

Antikörper	Antigen	N	Inzidenz (%)	Prognost. Relevanz	Literatur
E29	EMA	350	25	+	Mansi et al. 1991 ¹¹⁴
E29	EMA	350	25	-	Mansi et al. 1999 ⁹⁶
E29/12H12	EMA/Glyco-protein	68	37	-	Untch et al. 1999 ⁹⁸
E29/Moll/12H12	EMA/Cyto-keratin	100	38	+	Harbeck et al. 1994 ⁹³
2E11	TAG12	727	43	+	Diel et al. 1996 ⁶¹

35H11/34H12	Cytokeratin	25	16	n.b.	Ellis et al. 1989 ⁹¹
T16/26	Cytokeratin	49	35	+	Cote et al. 1991 ⁹⁰
CK2	Cytokeratin-18	155	18	+	Schlimok et al. 1987 ⁹⁷
CK2	Cytokeratin-18	234	38	n.b.	Funke et al. 1996 ⁹²
AE-1/AE-3	Cytokeratin	128	19	+	Landys et al. 1998 ⁹⁴
A45-B/B3	Cytokeratin- 8/18&8/19	552	36	+	Braun et al. 2000 ⁶⁰
CK2	Cytokeratin 8/18/19	554	31	+	Gerber et al. 2001 ¹²²
CK	EMA	393	42	+	Gebauer et al. 2001 ¹²³
CK	Mucin	4703	31	+	Braun et al. 2005 (pooled analysis) ¹²⁴
A45-B/B3	TF2	76	23	+	Schindlbeck et al. 2008 ¹¹⁸

Momentan scheint sich, vorbehaltlich größerer Fallzahlen und einer Standardisierung der Testmethodik, die Bedeutung des Knochenmarkstatus als Surrogatmarker für eine weitere Progression der Tumorerkrankung zunehmend zu bestätigen. Trotzdem bleibt dessen Korrelation mit etablierten konventionellen Prognosefaktoren kontrovers. Für den Fall, dass die Tumorzeldisseminierung in das Knochenmark von bekannten Prognoseparametern abhängig ist, würde dies die darauf folgende Therapie und die klinische Bedeutung einschränken. Auch die zwei größten Untersuchungen von Diel et al.⁶¹ und Braun et al.⁶⁰ zeigen ein uneinheitliches Bild. In der Untersuchung von Diel et al. korrelierte der Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark mit Tumorgröße ($p < 0,001$), axillärer Lymphknotenmetastasierung ($p = 0,001$), Menopausenstatus ($p = 0,01$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,002$), was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten korreliert. Allerdings in der Arbeit von Braun et al. assoziierte der Knochenmarkstatus nur mit der Tumorgröße ($p < 0,001$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,017$), nicht jedoch mit dem Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen. Lediglich nach Stratifizierung der Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten konnte Braun eine positive Korrelation errechnen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und zytokeratinen Zellen konnte statistisch in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. In dieser Arbeit bleibt eine Assoziation des Knochenmarkstatus von den konventionellen Prognoseparametern weiterhin ungeklärt. Es konnte ebenso keine Assoziation zwischen der Vermehrung der im Knochenmark detektierten zytokeratin-positiven Zellen und einer Vergrößerung des Tumors gefunden werden. Die Untersuchungen des Lymphknotenstatus wiesen ebenfalls keine Relation zur Persistenz von disseminierten Tumorzellen auf. Der Grund für die inkonstanten Beobachtungen mag in den verschiedenen Metastasierungswegen zu finden sein.¹²⁵ Ferner zeigt sich im Verlauf der vorgestellten Literatur von Diel und Braun eine weitere Minderung der Aussagekraft,¹²⁶ da bzw. etwa 30% der Patientinnen ohne Nachweis axillärer Lymphknotenmetastasen trotzdem im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Fernmetastasierung erlitten. Im Gegensatz dazu blieben Patientinnen mit einer Lymphknotenmetastasierung teilweise rezidivfrei.³⁸

Die lokoregionäre Progression der Tumoren war auch bei anderen Erkrankungen wie dem Zervix- und Ovarialkarzinom von besonderer Bedeutung, da eine unabhängige prognostische Relevanz der hämatogenen Mikrometastasierung beobachtet werden konnte. In einer diesbezüglich durchgeführten Studie an 93 Patientinnen mit Zervixkarzinom war das Auftreten von disseminierten Tumorzellen nicht mit lokoregionären Rezidiven ($P = 0,16$), aber mit Fernmetastasierung ($P = 0,02$) und tumorabhängigem Tod ($P = 0,008$) verbunden.⁵¹ In der multivariaten Analyse blieb der positive Knochenmarksbefund ein unabhängiger Prognosefaktor mit einer Hazard-Ratio von 6,7 für ein verkürztes Gesamtüberleben ($P = 0,023$).

In einer weiteren Studie an 108 Patientinnen mit epithelalem Ovarialkarzinom war ein tumorzellpositiver Knochenmarksbefund kaum mit einem intraperitonealen Rezidiv ($P = 0,05$), aber deutlich mit extraperitonealer Fernmetastasierung ($P < 0,0001$) und tumorabhängigem Tod ($P = 0,01$) assoziiert. Multivariat bestätigte sich der Nachweis disseminierter Tumorzellen ebenfalls als unabhängiger Prognosefaktor mit einem relativen Risiko von 13,8 für ein verkürztes fernmetastasenfreies Überleben ($P < 0,0001$).¹²⁷ Diese beiden Studien^{51,127} sind im Literaturverzeichnis vorliegend. Diese Studie zeigt unabhängig von anderen Basischarakteristika eine

Korrelation zwischen einem zytokeratin-positiven Knochenmarksbefund und dem Auftreten eines Rezidivs.

In einer publizierten multivarianten Poolanalyse von Braun et al. (2005)⁶⁵ zur prognostischen Relevanz von Mikrometastasen im Knochenmark wurden 9 unabhängige Studien in die Metaanalyse eingeschlossen, wobei der Gesamtdatenpool Daten von 4703 Patientinnen mit Mammakarzinom umfasste. Die Prävalenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark lag hier bei 30,6%, während sie weitaus häufiger bei ausgedehnten Tumoren, bereits progredientem Lymphknotenbefall, negativem ERPR-Status und hohem Grading nachgewiesen werden konnten. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von insgesamt 10 Jahren konnte eine ungünstige Prognose bei Auftreten von disseminierten Tumorzellen beobachtet werden, wobei jene mit zytokeratin-positivem Befund bei einer statistischen Signifikanz von $p < 0,001$ ein bis zu 2,15mal höheres Sterberisiko bargen, als die Patientinnen ohne Tumorzellen. Das relative Sterberisiko betrug für Patientinnen mit isolierten Zytokeratinzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum 1,695 und ein Krankheitsrückfall kam bei Patientinnen mit zytokeratin-positivem Befund 2,13 mal häufiger vor als mit negativem Befund. Insgesamt war das erkrankungsfreie Überleben bei Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark statistisch signifikant verkürzt mit einem $p < 0,001$.

Es scheint, dass zum Zeitpunkt der Primärdiagnose mehrere prognostische Faktoren wie TNM-Status, Tumormorphologie (Grading, Lymphangiosis carcinomatosa) und der ERPR-Status zu den Determinanten mit wissenschaftlich haltbarer klinischer Relevanz zählen.^{48,128} Diese prognostischen Determinanten scheinen jedoch nach durchgeführter Primärtherapie nicht mehr den gleichen prognostischen Nährwert zu zeigen, da in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen den gegebenen Faktoren nach Primärtherapie und einem Wiedererkranken als statistisch gesichert beobachtet werden konnte. Hingegen könnte die Untersuchung des Knochenmarks als fester Bestandteil der Nachuntersuchungen die Patientinnen mit erhöhtem Rezidivrisiko nach Primärtherapie besser abschätzen und erfassen.

In der vorliegenden Arbeit gab es keinen Zusammenhang zwischen systemischer Therapie und der Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.

Möglicherweise liegt die Ursache für das unzureichende Ansprechen auf eine systemische Therapie im ruhenden Zustand der Tumorzellen¹²¹, denn dies könnte die für das Mammakarzinom charakteristische lange Latenzzeit bis zum Auftreten eines Rezidivs hinreichend erklären. Da ca. 80% der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sich ebenfalls nicht in einem Proliferationsstatus befinden¹²¹, ließe sich damit auch begründen, warum sie durch Chemotherapeutika nur unzureichend angegriffen werden.¹²⁹

6.2 Kontroversen in der Methodik des Nachweises disseminierter Tumorzellen

Den in verschiedenen Ergebnissen zusammengefassten Untersuchungen liegt vor allem die wie bereits in 6. dargestellten Heterogenität der angewandten Verfahren zu Grunde. Am längsten finden so genannte tumorassoziierte Zellmembranproteine bei der immunzytochemischen Detektion von Tumorzellen Anwendung. Die am meisten verwendeten Antigene für die Antikörperbindung sind das „epithelial membrane antigen“ (EMA)^{96,114} und das polymorphe epitheliale Glykoprotein TAG12^{61,70}. Während jene Studien mit Antikörpern gegen solche mucin-ähnlichen Membranproteine die derzeit längsten Nachbeobachtungszeiten aufweisen und deshalb bezüglich der Einschätzung der prognostischen Relevanz von besonderer Bedeutung sind, wird Kritik an der Spezifität der in diesen Studien verwendeten Antikörper geäußert. Die Expression der mucin-ähnlichen Membranproteine durch hämatopoetische Stammzellen^{97,130} kann zu einer Positivfärbung von 2- 10% der mesenchymalen mononukleären Zellen von tumorfreien Probanden führen.¹³¹

In einigen Untersuchungen wird dargestellt, dass Zytokeratine als integrierte Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen stabil exprimierte Merkmale in Tumorzellen sind, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern in einzelnen Karzinomzellen einfach nachweisbar sind. Bei diesen antizytokeratin Antikörpern scheint die Spezifität höher zu sein, als bei Antikörpern gegen muzin-ähnliche Membranproteine.⁶⁰ In dieser Untersuchung wird der anti-cytokeratin Antikörper A45-B/B3¹³² verwendet. Dieser ist gegen ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 gerichtet und hat in der Vergangenheit

eine Spezifität von ca. 98% bewiesen.⁶⁰ Es ist eine ektope oder illegitime m-RNA-Expression von Zytokeratinen in den mesenchymalen Zellen des Knochenmarkes möglich.^{78,133,134,135,136} Allerdings ist dies von untergeordneter Bedeutung beim immunzytochemischen Nachweis der Zellen. Illegitime Zytokeratin-m-RNA führen nur selten zu einer ektope Expression von Zytokeratinproteinen.^{130,137,138,139} Daher scheinen diese mehr beim molekularen Nachweis von Tumorzellen von Wichtigkeit zu sein^{133,140}, als bei der immunzytochemischen Detektion. Andere Untersuchungen an Knochenmarksbiopsien haben gezeigt, dass zytokeratin-positive Tumorzellen zum großen Teil am Interstitium außerhalb der sinusoidalen Gefäße liegen und somit den Metastasierungsschritt der Extravasion bereits durchlaufen haben.¹⁴⁰ Die Phänotypisierung zytokeratin-positiver disseminierter Tumorzellen durch PCR und FISH-Analyse durch Klein et al.¹⁴¹ und Müller et al.¹⁴² hat auch weitere genetische Merkmale nachgewiesen, die für Tumorzellen charakteristisch sind.

Die Expression der mehr als 20 unterschiedlichen Zytokeratinisomere unterliegt einer komplexen Regulation.¹⁴³ Monoklonale Antikörper gegen das Zytokeratinisomer 18^{55,56,144,145} wurden in den meisten Studien verwendet. Die Sensitivität der Nachweismethode kann durch die häufige Down-Regulation des Zytokeratinisomers 18 in Tumorzellen beeinträchtigt sein, während sie durch die Verwendung eines Panzytokeratin-Antikörpers wahrscheinlich verbessert werden kann.¹³⁰ Bis heute ist ungeklärt, welcher Antikörper am besten geeignet ist, um die Grundlage für einen zuverlässigen und reproduzierbaren Goldstandard für die immunzytochemische Detektion von Tumorzellen im Knochenmark zu bieten.

Es gibt allerdings einige zusätzliche Elemente der Nachweismethode, die noch weiterer Abklärung bedürfen. Derzeit gibt es eine Vielzahl an Anreicherungsverfahren für Tumorzellen, vor allem durch magnetisierte Antikörper.¹⁴⁶ Die häufig sehr geringe Anzahl der detektierten Zellen wird durch sie, genauer durch Positivselektion der zytokeratin-positiven Zellen oder durch Negativselektion von CD34-positiven Zellen, deutlich erhöht. Neben methodischen Schwierigkeiten wie der Besetzung von Antikörperbindungsstellen in Konkurrenz mit anderen Antikörperfärbungen für eine potenzielle Phänotypisierung, fehlt bislang die Bestätigung der prognostischen Relevanz der so erhobenen Befunde. Weiterhin ist

noch nicht geklärt, bis zu welchem Ausmaß eine Tumorzellanreicherung notwendig und sinnvoll ist.

Die mikroskopische Detektion der Zellen ist ebenfalls noch ein ungeklärtes Problem der Nachweismethodik. Derzeit fehlen allgemein anerkannte Standardrichtlinien, um ein immunzytochemisches Färbeereignis sicher als Tumorzelle klassifizieren zu können. Die subjektive Bandbreite der hier angewandten Kriterien führt zu Unsicherheiten in der Methodik, die im Falle einer therapeutischen Relevanz des Testergebnisses inakzeptabel sind. Daher wurden automatisierte Systeme entwickelt, um eine Objektivierung des mikroskopischen Read-outs zu erreichen. Diese müssen nicht nur eine hohe Sensitivität aufweisen, sondern durch computergestützte Analysen uniforme Kriterien anwenden, um die Wahrscheinlichkeit besser einzuschätzen, dass ein bestimmtes Färbeereignis eine Tumorzelle repräsentiert.^{147,148}



Abbildung 92: Automatisiertes Zellscreeningsystem MDS® der Firma Allied Imaging

Derzeit sind vor allem die Systeme der amerikanischen Firmen Chromavision und Applied Imaging im Einsatz, bedürfen aber noch einer ausreichenden Validierung. Im Moment ist das System MDS® der Firma Applied Imaging im tumorimmunologischen Labor unserer Klinik in Erprobung (Abbildung 92) und liefert bis dato zuverlässige, mit manueller Detektion vergleichbare, Ergebnisse.

Der hier verwendete Testansatz ist einer der heutzutage am besten validierten nichtmolekularen Nachweismethoden für hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark.^{59,60,149} Daher scheint es, dass diese Testmethode für die Evaluierung

des Verlaufs disseminierter Tumorzellen während verschiedener Stadien der Brustkreberkrankung geeignet ist. Durch die Beibehaltung der Modalitäten der Nachweismethoden über alle Elemente dieser Untersuchung hinweg, wurde eine größtmögliche Konsistenz und Reproduzierbarkeit gewährleistet. Allerdings muss einer routinemäßigen Durchführung eines Tumorzellscreenings im Knochenmark eine grundlegende Standardisierung der Testmethodik vorausgehen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten von isolierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose einer Brustkrebserkrankung sowie weitere Einflussfaktoren auf diese Erkrankung untersucht. Ferner wird die Bedeutung von isolierten Tumorzellen im Knochenmark während des Verlaufs evaluiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern den Wissenstand über die Bedeutung von ‚Minimal Residual Disease‘ besonders durch ihren longitudinalen Charakter, der gegenüber bekannten Daten eine Innovation darstellt. Für diese Arbeit finden bereits publizierte Daten^{92,93,97} Verwendung.

Bei 109 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 500 Patientinnen (21,8%) wurden zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms isolierte Tumorzellen im Knochenmark festgestellt. Durchschnittlich wurden 5 zytokeratin-positive Zellen/10⁶ Knochenmarkzellen (Standardabweichung 70,5) bei einem positiven Knochenmarksbefund detektiert.

Gegenüber den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorgröße, axillärer Lymphknotenstatus, histopathologisches Grading, Menopausenstatus und Hormonrezeptorstatus fand sich keine statistisch signifikante Korrelation des positiven Knochenmarkstatus. Ebenso zeigte sich mit den untersuchten histopathologischen Zusatzkriterien wie histologischer Subtyp, Lymph- und Hämangiosis carcinomatosa sowie Multifokalität und –zentrität keine statistische Signifikanz.

Um die Frage der Inzidenz und prognostischen Bedeutung isolierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinomrezidiv zu klären, wurden Patientinnen mit einem lokoregionären, einem ossären und einem viszeralem Rezidiv oder einer Fernmetastasierung untersucht. Bei 10 von 47 Patientinnen (21,2%) mit lokoregionärem Rezidiv wurden isolierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden, während dies bei 15 von 34 (44,1%) der Patientinnen mit Fernmetastasierung der Fall war. Im Falle von viszeralem Metastasen waren es zwei von 17 (11,7%) und bei der ossären Metastasierung vier von 17 Patientinnen (23,5%).

Aufgrund der großen Bandbreite der Anzahl der detektierten Tumorzellen im Knochenmark wurde der optimale Schwellenwert für eine prognostische Bedeutung isolierter Tumorzellen bei Patientinnen mit Fernmetastasen mittels CART-Analyse berechnet. Diese Analyse ergab einen optimalen Schwellenwert bei 2,5 Tumorzellen pro einer Million Knochenmarkzellen. Während 10 von 47 Patientinnen mit lokoregionärem Rezidiv (21,2%) über diesem Schwellenwert lagen, war dies bei vier von 17 Patientinnen (23,5%) mit ossären Metastasen der Fall. 15 von 34 Frauen (44,1%) erkrankten an multiplen Metastasen und lagen oberhalb des Schwellenwertes.

Patientinnen mit einer Fernmetastasierung und einer mikrometastatischen Tumorzelllast im Knochenmark oberhalb des Schwellenwertes von 2,5 Tumorzellen pro einer Million Knochenmarkzellen, wiesen eine signifikant schlechtere Überlebensprognose auf als Patientinnen mit wenig oder keinen isolierten Tumorzellen im Knochenmark.

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse bestätigte die Detektion einer höheren Anzahl von Tumorzellen als wichtigsten Prognosefaktor für das Gesamtüberleben. Bei Patientinnen mit einem solchen Knochenmarksbefund waren im Studienverlauf 52% tumorabhängig verstorben.

Die wichtigste klinische Relevanz dieser Beobachtung könnte zukünftig in Fällen mit ausschließlich ossärer Metastasierung zu sehen sein, bei denen der Nachweis einer erhöhten mikrometastatischen Tumorzelllast (z.B. ≥ 5 zytokeratin-positive Zellen/ 10^6 Knochenmarkszellen) die Entscheidung für eine systemische Therapie unterstützen könnte.

8 Schlussfolgerung und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass disseminierte Tumorzellen als Hinweis einer minimal residuellen Tumorerkrankung während der Primärdiagnose des Mammakarzinoms nachgewiesen werden können. Eine prognostische Relevanz der disseminierten Tumorzellen kann ferner, wie bereits bekannt,^{38,61} zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms angenommen werden. Heute ist die TNM Klassifikation der Forschung angeglichen und hat im Punkt M0 (i) das Kriterium der disseminierten Tumorzellen aufgenommen. Dies gilt als Zeichen eines Therapieversagens bzw. deutet auf ein hohes Rezidivrisiko hin.

Studien zur Beobachtung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark können signifikant zum Verständnis über die Tumorbiologie solider Tumoren beitragen. Eine Reihe von Charakteristika von Primärtumoren steht derzeit zur Verfügung, um eine indirekte Einschätzung des allgemeinen Erkrankungsrisikos durchzuführen.

Zu diesen Charakteristika zählen neben den bekannten Prognoseparametern des Tumor-Stagings⁶⁰ bestimmte Antigeneigenschaften der Primärtumoren, wie proliferationsassoziierte Antigene (z. B. Ki-67, p 120),¹³⁰ Wachstumsfaktoren (z. B. epidermal growth factor, erb-B2)¹⁴⁷ und Adhäsionsfaktoren (z. B. 17-1A Antigen)⁷⁹. Allerdings korrelieren diese Tumoreigenschaften häufig nicht mit den phänotypischen Eigenschaften disseminierter Tumorzellen,^{60,78} was die limitierte prognostische Aussagekraft dieser Primärtumorcharakteristika teilweise zu erklären vermag. Der unmittelbare Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark kann eventuell nicht nur einen direkteren Ansatz zur Einschätzung des Generalisierungsrisikos und damit der Prognose der Erkrankung liefern, sondern kann auch vielfältige Hinweise auf das tumorbiologische Geschehen zwischen Primärdiagnose und Rezidiv geben. Eine weitere Phänotypisierung und genetische Analyse der isolierten Tumorzellen im Knochenmark, kann Hilfestellungen beispielsweise bei der Beantwortung der Fragen liefern, warum die Tumorzellen während der rezidivfreien Latenzzeit nicht vom körpereigenen Immunsystem erkannt und eliminiert werden, welche Faktoren die

Dauer der Latenzzeit beeinflussen, sowie die Auslösung der makroskopischen Fernmetastasierung verursachen.

Die Detektion und Charakterisierung hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark kann eine Reihe aussichtsreicher Anwendungen in der Onkologie finden. Vor allem Patientinnen ohne Nachweis einer lymphogenen Metastasierung und niedrigem bis mittlerem Rezidivrisiko gemessen an der St. Gallener Risikostratifizierung^{33,47} würden in Unkenntnis des Knochenmarkstatus meist keine systemisch-adjuvante Therapie erhalten. Bei Nachweis disseminierter Tumorzellen könnten diese Patientinnen vor dem Hintergrund des erhöhten Rezidivrisikos von einer adjuvanten Therapie profitieren. In ähnlicher Weise könnte eine hohe mikrometastatische Tumormarklast im Knochenmark, bei bekannter ossärer Filialisierung, die Entscheidung für eine systemische Therapie unterstützen.

Ferner kann die Beobachtung des Knochenmarkstatus wertvolle Informationen zur Einschätzung des individuellen Rezidivrisikos nach erfolgter Primärtherapie liefern. Während eine Individualisierung der Therapie und die Definition eines adjuvanten Therapieansprechens derzeit nicht möglich sind, könnte die sequentielle Knochenmarkaspiration Möglichkeiten zur Einschätzung der adjuvanten Therapieeffizienz bieten. Schließlich ergäbe sich aus der Detektion isolierter Tumorzellen im Knochenmark während der rezidivfreien Nachbeobachtung nicht nur die Erkenntnis eines erhöhten Rezidivrisikos, sondern durch die Charakterisierung der gefundenen Tumorzellen, könnte die Wahl einer sekundär adjuvanten Therapie beeinflusst werden. Durch den Nachweis bestimmter therapeutisch zu nützender Antigeneigenschaften der Tumorzellen, ließe sich durch den Einsatz von Zellzyklus unabhängigen Therapieformen, wie etwa der von Antikörpertherapien, die individuelle onkologische Sicherheit erhöhen, wie dies bereits bei anderen soliden Tumoren unter Beweis gestellt wurde.¹⁴⁰

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Beobachtungen sollten allerdings vor dem Hintergrund der geringen Fallzahlen mit der gebotenen Vorsicht interpretiert werden. Weiterhin wurden die Patientinnen nur einmalig punktiert, so dass es keine Verlaufskontrollen bezüglich der Anzahl der disseminierten Tumorzellen gibt.

Ferner ist die Nachbeobachtungszeit in den beiden Analysen zur prognostischen Relevanz von disseminierten Tumorzellen in der rezidivfreien Nachsorge und der mikrometastatischen Tumorlast bei Fernmetastasierung noch sehr kurz. Der Vergleich der frühen Ergebnisse von Mansi et al. zur prognostischen Relevanz von isolierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms^{120,61} mit den späteren Resultaten nach einer medianen Langzeitbeobachtung von 12,5 Jahren⁶⁰ zeigt, dass sich das Signifikanzniveau unter Umständen mit einer längeren Nachbeobachtung relativieren kann. Zwar war die Detektion von isolierten Tumorzellen auch nach der längeren Nachbeobachtungszeit noch signifikant mit einer kürzeren rezidivfreien und Gesamtüberlebenszeit assoziiert, jedoch büßte dieser Parameter in der multivariaten Analyse seine prognostische Unabhängigkeit gegenüber den konventionellen Prognoseparametern ein. Es sind deshalb vor allem drei Forderungen für die zukünftige wissenschaftliche Arbeit mit diesem potenziellen Prognose- und Monitoringinstrument aufzustellen: Erstens muss vor einem routinemäßigen Einsatz der Knochenmarkaspiration, während der Diagnose und Nachsorge des Mammakarzinoms, eine weitere methodische Validierung und vor allem eine Standardisierung des Testansatzes gefordert werden.

Die Variabilität der Methodik birgt noch eine schwer einzustufende Unsicherheit in sich. Zweitens muss untersucht werden, ob sich die Untersuchungsergebnisse, wie bei etablierten Prognoseparametern bereits geschehen, durch größere Fallzahlen reproduzieren lassen. Drittens, muss besonders vor dem Hintergrund der bereits angesprochenen langen Latenzzeit, zwischen Primärdiagnose und Rezidiv des Mammakarzinoms die Langzeitbeobachtung bestätigen, dass die prognostische Relevanz nicht nur eine vorübergehende statistische Beobachtung ist, sondern auch im Langzeitverlauf wertvolle Informationen über den vermutlichen Verlauf der Erkrankung liefert. Sollten sich zukünftig diese Forderungen zuverlässig erfüllen lassen, könnte die Detektion isolierter Tumorzellen im Knochenmark das Repertoire der diagnostischen Instrumente bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms und den weiteren Verlauf wertvoll bereichern.

9 Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. W. Janni und Herrn PD. Dr. C. Schindlbeck. Sie haben mich seit Beginn dieser Arbeit immer unterstützt. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht fertig gestellt worden.

Herrn Prof. Dr. H. P. Scheidel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe, diese Arbeit trotz Berufstätigkeit fertig stellen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln das Ergebnis einer aktiven wissenschaftlichen Arbeitsgruppe dar. Diese Arbeitsgruppe wurde 1994 von Dr. S. Braun gegründet, der sie auch über viele Jahre leitete. Seinem Engagement sind der Beginn und der Fortbestand dieser Arbeitsgruppe zu verdanken. Der aktiven Mitarbeit von Frau Dr. D. Rjosk, Frau B. Strobl, Frau Dr. Ch. Kentenich, Dr. F. Hepp, Dr. W. Sigg, Fr. P. Schaffer und Frau Brigitte Rack ist es zu verdanken, dass dieses Forschungslabor auch in jüngster Zeit weiterhin innovative Konzepte vorantreibt und viele der neuen Ideen in praktische Projekte umgesetzt werden. Die seit kurzem zunehmend produktive Kooperation mit der histologischen Arbeitsgruppe der Klinik, vor allem Dr. P. Hantschmann und Dr. N. Shabani, ist eine zusätzliche Bereicherung der tumorimmunologischen Arbeitsgruppe.

Der größte Teil Routinearbeit des tumorimmunologischen Labors, vor allem bei der Knochenmarksaufarbeitung wird von der MTA B. Zill geleistet. Ihrem treuen, kollegialen und zuverlässigen Einsatz über die Jahre gilt mein besonderer Dank.

Ich danke Frau Dr. Verena v. Johnston und Frau Nina Pretzlick für Ihre konstruktive Kritik.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung. Sie haben mir nicht nur bei dieser Arbeit, sondern während meines gesamten bisherigen Lebensweges zur Seite gestanden. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht fertiggestellt worden. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

10 Tabellen und Abbildungen

10.1 Tabellen

Tabelle 1. Chemotherapieschemata Mammakarzinom.	17
Tabelle 2 Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen	97

10.2 Abbildungen

Abbildung 1: Punktionsstellen bei der Knochenmarkaspiration	20
Abbildung 2: Knochenmarksaspirationsnadeln.....	20
Abbildung 3: Aufbereitung des Knochenmarksaspirats	22
Abbildung 4: Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque	23
Abbildung 5: Zentrifugations-Tube in der Hettich Universal 30 F Zentrifuge	24
Abbildung 6: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat.....	25
Abbildung 7: Positivfärbung eines Zellklusters von Mammakarzinomzellen	26
Abbildung 8: Angefärbte Artefakte im Knochenaspirat	26
Abbildung 9: Menopause zum Zeitpunkt der Primärtherapie	32
Abbildung 10: Betroffene Brustseite.	33
Abbildung 11: Betroffener Quadrant.....	33
Abbildung 12: Tumorhistologie	34
Abbildung 13: Carcinoma-in-situ.....	35
Abbildung 14: Tumorgröße	35
Abbildung 15: Differenzierungsgrad der Tumoren	36
Abbildung 16: Lymphknotenbefall.....	37
Abbildung 17: Östrogenrezeptorsensitivität	38
Abbildung 18: Progesteronrezeptorstatus	38
Abbildung 19: Multifokale/Multizentrische Tumoren	39
Abbildung 20: Lymphangiosis/Hämangiosis karzinomatosa	40
Abbildung 21: Auftreten von zytokeratinen Zellen im Knochenmarksaspirat	40
Abbildung 22: Primäroperation	41
Abbildung 23: Systemische Therapie	42
Abbildung 24: Adjuvante Bestrahlung.....	43
Abbildung 25: Auftreten von Rezidiven.....	43
Abbildung 26: Rezidiv und Menopause	44

Abbildung 27: Rezidiv und betroffene Seite.....	45
Abbildung 28: Rezidiv und Quadrant.....	45
Abbildung 29: Rezidiv und Tumorphistologie.....	46
Abbildung 30: Rezidiv und Carcinoma-in-situ.....	47
Abbildung 31: Rezidiv und TumorgroÙe.....	48
Abbildung 32: Rezidiv und Tumordifferenzierung.....	49
Abbildung 33: Rezidiv und Lymphknotenbefall.....	50
Abbildung 34: Rezidiv und Östrogenrezeptorstatus.....	51
Abbildung 35: Rezidiv und Progesteronrezeptorstatus.....	51
Abbildung 36: Rezidiv und Multifokale Tumoren.....	52
Abbildung 37: Rezidiv und Multizentrische Tumoren.....	52
Abbildung 38: Rezidiv und Lymphangiosis karzinomatosa.....	53
Abbildung 39: Rezidiv und Hämangiosis karzinomatosa.....	54
Abbildung 40: Rezidiv und Zytokeratinstatus.....	54
Abbildung 41: Rezidiv und Primäroperation.....	55
Abbildung 42: Rezidiv und Systemische Therapie.....	56
Abbildung 43: Rezidiv und Bestrahlung.....	56
Abbildung 44: Überleben in Abhängigkeit des Menopausenstatus.....	57
Abbildung 45: Überlebenszeit in Abhängigkeit der betroffenen Brustseite.....	58
Abbildung 46: Überlebenszeit in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten.....	59
Abbildung 47: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung.....	60
Abbildung 48: Überlebenszeit in Abhängigkeit von der TumorgroÙe.....	61
Abbildung 49: Überlebenszeit in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus.....	62
Abbildung 50: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Östrogenrezeptorsensitivität.....	63
Abbildung 51: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Progesteronrezeptorsensitivität.....	64
Abbildung 52: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multifokalen Tumoren.....	64
Abbildung 53: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multizentrischen Tumoren.....	65
Abbildung 54: Überlebenszeit in Abhängigkeit von lokalen Rezidiven.....	66
Abbildung 55: Überlebenszeit in Abhängigkeit von Fernmetastasen.....	67
Abbildung 56: Überlebenszeit in Abhängigkeit von ossären Metastasen.....	67
Abbildung 57: Überlebenszeit in Abhängigkeit von viszeralen Metastasen.....	68
Abbildung 58: Überlebenszeit in Abhängigkeit von multiplen Metastasen.....	69
Abbildung 59: Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa.....	70
Abbildung 60: Überlebenszeit in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa.....	71

Abbildung 61: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Primäroperation.....	72
Abbildung 62: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Chemotherapie.....	73
Abbildung 63: Überlebenszeit in Abhängigkeit der systemischen Therapie	74
Abbildung 64: Überlebenszeit in Abhängigkeit der Bestrahlung	75
Abbildung 65: Überlebenszeit in Abhängigkeit der zytokeratinen Zellen	75
Abbildung 66: Tumorzellen und Menopause	76
Abbildung 67: Tumorzellen in Abhängigkeit der betroffenen Seite	77
Abbildung 68: Tumorzellen in Abhängigkeit des betroffenen Quadranten.....	78
Abbildung 69: Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumorphistologie	79
Abbildung 70: Tumorzellen in Abhängigkeit der Karzinoma in situ	79
Abbildung 71: Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumorgroße.....	80
Abbildung 72: Tumorzellen in Abhängigkeit der Tumordifferenzierung	81
Abbildung 73: Tumorzellen in Abhängigkeit zum Lymphknotenstatus.....	81
Abbildung 74: Tumorzellen in Abhängigkeit zum Östrogenrezeptorstatus	82
Abbildung 75: Tumorzellen in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus.....	83
Abbildung 76: Tumorzellen in Abhängigkeit multifokaler Tumoren	83
Abbildung 77: Tumorzellen in Abhängigkeit multizentrischer Tumoren	84
Abbildung 78: Tumorzellen in Abhängigkeit einer Lymphangiosis karzinomatosa....	85
Abbildung 79: Tumorzellen in Abhängigkeit einer Hämangiosis karzinomatosa.....	85
Abbildung 80: Tumorzellen in Abhängigkeit der Primäroperation	86
Abbildung 81: Tumorzellen in Abhängigkeit zur systemischen Therapie.....	87
Abbildung 82: Tumorzellen in Abhängigkeit der Bestrahlung	88
Abbildung 83: Tumorzellen in Abhängigkeit von Art und Anzahl der Rezidive	88
Abbildung 84: Tumorzellen in Abhängigkeit des Vitalstatus	89
Abbildung 85: Balkendiagramm Todesursache	90
Abbildung 86: Kreisdiagramm zum Auftreten eines Rezidivs	90
Abbildung 87: Kreisdiagramm zur Knochenmarksbiopsie	92
Abbildung 88: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Relationen zwischen Knochenmarksbefund und ossärem Rezidiv	93
Abbildung 89: Balkendiagramm zytokeratin-positiver Befund und visz. Metastasen	93
Abbildung 90: Balkendiagramm Fernmetastasen und zytokeratin-positiver Befund .	94
Abbildung 91: Balkendiagramm Vitalstatus und zytokeratin-positiver Befund	94
Abbildung 92: Autom. Zellscreeningsystem MDS® der Firma Allied Imaging	103

11 Lebenslauf

Persönliches

Name: Charlotte Annemarie v. Padberg, geb. Ernst
Geburtsdatum: 03. 01. 1978, München

Ausbildung

Juni 1997	Abitur 2,7
1998-2000	Studium an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
April 2000	Physikum, Note: 3,3
März 2001	1. Staatsexamen, Note: 3,0
2001-2003	Studium an der Ludwig Maximilians Universität zu München
April 2003	2. Staatsexamen, Note 2,6
Okt 2003	Studium an Humboldt Universität zu Berlin
Okt 2003- Feb 2004	Praktisches Jahr an der Universität zu Sydney und der Universität zu Rom
Feb 2004- Sept 2004	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik der Charite
Nov 2004	3. Staatsexamen, Note 1,0 Gesamtnote 2,1
April 2005	Assistenzärztin in der Frauenklinik des Rot-Kreuz-Klinikums in München
Okt 2006	Assistenzärztin in der Frauenklinik des Marienkrankenhauses in Hamburg
Okt 2009	Assistenzärztin in der Frauenklinik der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/M.

Sprachen

Deutsch, Englisch, Französisch, Italienisch

Interessen und sportliche Aktivitäten

Reiten: Deutsche und Bayrische Meisterschaften, Bayrischer Kader 1989-1998

Tauchen, Skifahren
Kunst und Literatur

12 Appendix

12.1 Stadieneinteilung des Mammakarzinoms

pT-Primärtumor

pT X

Primärtumor kann nicht beurteilt werden

pT O

kein Anhalt für Primärtumor

pT is

Carcinoma in situ: intraduktales Karzinom

pT is (DCIS)

duktales Karzinoma in situ

pT is (LCIS)

lobuläres Karzinoma in situ

pT is (Paget)

Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbarem Tumor.
Anmerkung: *Die Paget-Erkrankung kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert*

pT 1

Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung

pT 1mic

Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung

pT 1a

mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung

pT 1b

mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung

pT 1c

mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung

pT 2

Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter

Ausdehnung

pT 3

Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung

pT 4

Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut. **Anmerkung:** Die Brustwand schließt die Rippen, die interkostalen Muskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pectoralis-Muskulatur.

pT 4a

mit Ausdehnung auf die Brustwand

pT4b

mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust

pT 4c

Kriterien 4a und 4b gemeinsam

pT4d

entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

pN-Regionäre Lymphknoten

pN X

regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
(zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)

pN 0

keine regionären Lymphknotenmetastasen

pN1 mi

Mikrometastasen (größer als 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm
in maximaler Ausdehnung).

pN 1

Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder
ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit
mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der
Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht
klinisch erkennbar waren.

pN 1a

Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten,
zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung.)

pN 1b

Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit
mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der
Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht
klinisch erkennbar waren.

pN 1c

Metastase in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten entlang der
A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die
bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber
nicht klinisch erkennbar waren.

pN 2

Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in
klinisch erkennbaren c ipsilateralen Lymphknoten entlang der A.
mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.

pN 2a

Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten,
zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung.

pN2b

Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten
entlang der A. mammaria interna ohne axilläre
Lymphknotenmetastasen.

pN 3

Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.

pN 3a

Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2 mm in max. Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten.

pN 3b

Metastase(n) in klinisch erkennbarem(en) Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinel Lymphknotendissektion, aber nicht klinisch erkennbar.

pN 3c

Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.

Anmerkungen: a) Fälle, bei denen nur isolierte Tumorzellen in regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden, werden als pN0 (i+) klassifiziert. Isolierte Tumorzellen sind definiert als einzelne Tumorzellen oder kleine Ansammlungen von Zellen, die in ihrer größten Ausdehnung 0,2 mm nicht überschreiten und gewöhnlich mittels Immunhistochemie oder molekularen Methoden entdeckt werden. Manchmal können sie mittels H&E-Färbung verifiziert werden. Isolierte Tumorzellen zeigen typischerweise keine Hinweise auf eine metastatische Aktivität, d. h. Proliferation oder Stromareaktion. B) Nicht klinisch erkennbar = nicht entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie). C) klinisch erkennbar = entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) oder makroskopisch vom Pathologen erkannt.

pM-Fernmetastasen

pM X

Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

pM 0

keine Fernmetastasen

pM 0 (i)

Tumorzell dissemination im Knochenmark

pM 1

Fernmetastasen

12.2 Einteilung der Differenzierungsgrade des Mammakarzinoms

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
Tubulusausbildung	>75%	1
	10-75%	2
	<10	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Stark	3
Mitoserate	0-5/10 HPF*	1
	6-11/10 HPF*	2
	>12/10 HPF*	3
Summenscore		3-9

Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	gut
6,7	mäßig	G2	mäßig
8,9	hoch	G3	schlecht

*HPF= high power field (= 400 fache Vergrößerung im Mikroskop) mit einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm bei einem Lichtmikroskop ohne Großsehfelddtubus mit Sehfeldzahl 18

12.3 Patientinnenaufklärung für die Knochenmarkspunktion

EINWILLIGUNG ZUR KNOCHENMARKPUNKTION IMMUNZYTOTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Liebe Patientin,

die Untersuchung des Knochenmarks wird in der Krebsdiagnostik eingesetzt, um wertvolle Informationen über den Ausbreitungsgrad der Krankheit zu erhalten. Dieses Verfahren ist momentan noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, um neue Therapiemöglichkeiten und Chancen der Früherkennung zu entwickeln. Zu diesem Zweck, bitten wir Sie, liebe Patientin, um die Einwilligung zu einer Knochenmarkspunktionspunktion. Die Untersuchung ist kostenlos.

Untersuchungsverfahren

Mit einer Spezialnadel wird vom Beckenkammknochen der linken und rechten Seite jeweils eine Knochenmarkprobe entnommen. Die Punktion des Knochenmarks erfolgt in örtlicher Betäubung.

Anhaltende Schmerzen im Bereich der Punktionsstelle nach der Operation sind nicht zu erwarten. Wird die Punktion in örtlicher Betäubung durchgeführt, so kann das Ansaugen des Knochenmarks einen heftigen, aber sehr kurzen Schmerz verursachen.

Mögliche Komplikationen

Die Risiken des Eingriffs, wie z.B. das Infektionsrisiko, sind außerordentlich gering. Eventuelle Nachblutungen aus Hautvenen sind selten und lassen sich durch einfachen Druck auf die Punktionsstelle leicht beherrschen.

Die Beantwortung der folgenden Fragen hilft uns, die Risiken zusätzlich möglichst gering zu halten:

1. Besteht eine vermehrte Blutungsneigung?
 nein ja
 2. Besteht eine Allergie ? (z.B. Medikamente, Pflaster, örtliche Betäubungsmittel ?)
 nein ja, welche:
-

Verhalten nach der Untersuchung

Zur Blutstillung genügt in der Regel ein Druck von wenigen Minuten auf die Einstichstelle. Die Punktionsstelle braucht in der Regel vom Arzt nicht mehr kontrolliert zu werden, falls nicht eine Nachblutung aus dem Punktionskanal oder länger andauernde Schmerzen auftreten.

Nach einer Knochenmarkpunktion, die in örtlicher Betäubung durchgeführt wurde sollten Sie mindestens eine halbe Stunde ruhen.

Herr/Frau Dr. _____

hat mit mir heute anhand dieses Informationsblattes ein Aufklärungsgespräch geführt, bei dem ich alle mich interessierenden Fragen stellen konnte. Ich stimme zu, dass das entnommene Knochenmark und die Untersuchungsergebnisse wissenschaftlich ausgewertet und weiterverwendet werden.

Ich habe keine weiteren Fragen und benötige keine zusätzliche Überlegungsfrist.

Ich willige hiermit in die vorgeschlagene Untersuchung ein.

ODER

Ich versage meine Zustimmung.

_____, den _____

Unterschrift der Patientin

Unterschrift des Arztes/der Ärztin

13 Literaturverzeichnis

- 1 Braun S., Susan G. The history of breast cancer advocacy Breast j. 2003 May;9 Suppl 2:S101-3. Komen Breast Cancer Fondation, Dallas, Texas.
- 2 Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U: Patterns of relapse and survival in operable breast carcinoma with positive and negative axillary nodes. Tumori. 1978;64:241-58.
- 3 Nährig J, Höfler H, Heywang-Köbrunner SH, Prat N, Hölzel D, Wünsch PH, Lebeau A: Erfahrungen aus dem Bayerischen Mammographie-Screening-Programm. Der Pathologe 2006;27(5): 387-392.
- 4 Hammer C, Fanning A, Crowe J. Overview of breast cancer staging and surgical treatment options. Cleve Clin J Med. 2008 Mar;75 Suppl 1:S10-6.
- 5 Guray M, Sahin AA. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. The Oncologist 2006;11:435-449.
- 6 American Cancer Society (ACS). What is Breast Cancer? (revised, Sep. 2, 2005). Retrieved July 8 2006 from the ACS web site: www.cancer.org.
- 7 Kelsey JL, Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology. Cancer Res. 1988 Oct 15;48(20):5615-23.
- 8 McPherson K, Steel CM and J M Dixon .Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 2000 September 9;321(7261): 624-628.
- 9 Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. Salud Publica Mex. 2009;51 Suppl 2:s141-6.
- 10 Merzenich H, Giersiepen K, Kieschke J, Zeeb H.: Screening for colorectal cancer: what is the most effective strategy? Gesundheitswesen. 2005 Nov;67(11): 803-8.
- 11 Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome. Herausgegeben von Dr. med. Ingo Bauerfeind. München 12. Auflage 2009.
- 12 Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008.
- 13 Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. N. Engl. J. Med. 2000;342:564-571.
- 14 Madigan PM, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst 1987;87:1681.
- 15 Key T, Verkasalo P, Banks E. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol 2001;2:133-140.
- 16 Jin F, Devesa S, Chow W-H, Zheng W, Ji B-T, Fraumeni J, et al. Cancer incidence trends in urban Shanghai, 1972-1994: An update. Int J Cancer. 1999;83:435-440.
- 17 Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R., et al. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. N Engl J Med 1997;336:1416-21.

-
- 18 Chang-Claude J. Schwerpunktthema Frauen, Leben und Krebs.: Omnimed Verlagsgesellschaft; 1997:595-597.
- 19 Tyczynski JE. Breast cancer in Europe. Fact Sheet, European Network of Cancer Registries ENCR. 2002.
- 20 Carney PA, Miglioretti DL, Yankaskas BC, et al.: Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography, *Annals of Internal Medicine* 2003;138(3):168–175, 2003.
- 21 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;347:1713-27.
- 22 Speroff L. Postmenopausal hormone therapy and breast cancer. *Obstet Gynecol* 1996;87:44S-54S.
- 23 McCready T, Littlewood D, Jenkinson J. Breast self-examination and breast awareness: a literature review. *J Clin Nurs*. 2005 May;14(5):570-8.
- 24 Cui X, Dai D, Tseng M, Shu X-O, Gao Y-T, Zheng W. Dietary patterns and breast cancer risk in the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1443-1448.
- 25 Olopade O, Fackenthal J, Dunston G, Tainsky M, Collins F, Whitfield-Broome C. Breast cancer genetics in African Americans. *Cancer* 2003;97(1 Suppl):236-245.
- 26 Hampton T. Oncologists advise breast awareness over routine breast self-examination. *JAMA*. 2008 Oct 15;300(15):1748-9.
- 27 Wittekind C, Bootz F, Meyer HJ. TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage. Springer Verlag; Berlin 2003.
- 28 Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjänen K. Mitotic indexes as prognostic predictors in female breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992;118(1):75-81.
- 29 Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Sep 1;20(17):3628-36.
- 30 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
- 31 Genestie C, Zafrani B, Asselain B, Fourquet A, Rozan S, Validire P, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res*. 1998 Jan-Feb;18(1B):571-6.
- 32 Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G and S. Eva Singletary. Prognostic Factors in Node-Negative Breast Cancer A Review of Studies With Sample Size More Than 200 and Follow-Up More Than 5 Years. *Ann Surg*. 2002 January;235(1): 10–26.
- 33 Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of Oncology* 18: 1133–1144, 2007.

- 34 Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:142-153.
- 35 Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Lohrs U. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:354-363.
- 36 Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtatos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J.Natl.Cancer Inst.* 2002;94:116-128.
- 37 Janni W, Kindermann G. Trophoblasttumoren. In: Bender HG, Diedrich K, Künzel W. *Spezielle Gynäkologische Onkologie*, vol. 11, 4 ed. München: 2000.
- 38 Dimpfl T, Janni W, Rjosk D, Knobbe A, Genz T. Brusterhaltende Mammachirurgie 1963-1998: Erfolge und Komplikationen. In: Untch M, et al. *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms: State of the Art 2000*, 2 ed. München: Zuckerschwerdt, 2000.
- 39 Martin KA, Manson JE. Approach to the patient with menopausal symptoms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Dec;93(12):4567-75.
- 40 Harvey JA. Sonography of palpable breast masses. *Semin Ultrasound CT MR* 2006; 27:284-297.
- 41 Stein L, Chellman-Jeffers M. The radiologic workup of a palpable breast mass. *Cleve Clin J Med.* 2009 Mar;76(3):175-80.
- 42 Janni W, Gerber B, Sommer H, Untch M, Krause A, Dian D, Runnebaum I, Rack B, Friese K. Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2005;102:A 2795-2804.
- 43 Kretschmer L, Thoms KM, Peeters S, Haenssle H, Bertsch HP, Emmert S. Postoperative morbidity of lymph node excision for cutaneous melanoma-sentinel lymphonodectomy versus complete regional lymph node dissection. *Melanoma Res.* 2008 Feb;18(1):16-21.
- 44 Peto R. Meta-analysis on local therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88.
- 45 Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med* 1976; 294(8):405-410.
- 46 Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995; 332(14):901-906.
- 47 Huober J, Senn HJ, Thürlimann B. Kongressbericht 11. Internationaler Brustkrebskongress St. Gallen 2009. Newsletter 2/2009 der Schweizerischen Gesellschaft für Senologie
- 48 Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357-3365.
- 49 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. V: Update 1998. *Recent Results Cancer Res* 1998; 152:481-497.

-
- 50 Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, Chlebowski RT, Gelber R, Edge SB, Gralow J, Cobleigh MA, Mamounas EP, Goldstein LJ, Whelan TJ, Powles TJ, Bryant J, Perkins C, Perotti J, Braun S, Langer AS, Browman GP, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):619-629.
- 51 Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86(12):2668-2673.
- 52 Breitenseher M, Dominikus M, Amann G. Bildgebende Diagnostik und Therapie der Weichteiltumoren: Mit pathologischer Klassifikation, Nuklearmedizin, interventioneller Therapie. Stuttgart: Thieme 2008, S. 17.
- 53 Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer* 2003; 98(12):2740-2741.
- 54 Morris VL, Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis* 1997;17:281-96.
- 55 Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J.Clin.Oncol.* 1996;14:1810-7.
- 56 Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340:685-9.
- 57 Braun S, Hepp F, Janni W, Blankenstein T, Pantel K. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin.Oncol.* 2001;19(2):368-75.
- 58 Weckermann D, Wawroschek F, Krawczak G, Haude KH, Harzmann R. Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time to biochemical relapse after radical prostatectomy? *Urol.Res.* 1999;27:285-90.
- 59 Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *J Natl.Cancer Inst.* 1999;91:1113-24.
- 60 Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl.J Med* 2000;342:525-33.
- 61 Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996;88:1652-8.
- 62 Hellman S. Stopping metastases at their source. *N.Engl.J Med* 1997;337:996-7.
- 63 Engell HC. Cancer Cells in the Circulating Blood. *Acta Chir Scand* 1955;Supp 201.
- 64 Christopherson W. Cancer Cells in the Peripheral Blood: A Second Look. *Acta Cytol* 1965;9:169-74.
- 65 Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793-802.
- 66 Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J.Clin.Oncol.* 1990;8:736-40.

-
- 67 Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983;2:1271-4.
- 68 Stahel RA, Mabry M, Skarin AT, Speak J, Bernal SD. Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J.Clin.Oncol.* 1985;3:455-61.
- 69 Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:557-66.
- 70 Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J.Clin.Oncol.* 1992;10:1534-9.
- 71 Janni W, Rjosk D, Braun S. Clinical Relevance of Occult Metastatic Cells in the Bone Marrow of Patients with Different Stages of Breast Cancer. *Clin Breast Canc* 2000;1:217-25.
- 72 Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J.Hematother.* 1994;3:315-22.
- 73 Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987;237:175-8.
- 74 Negrin RS, Blume KG. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease [editorial]. *Blood* 1991;78:255-8.
- 75 Kawasaki, E., Clark, S., Coyne, M., Smith, S., Champlin, R., and Witte, O. Diagnosis of Chronic Myeloid and Acute Lymphocytic Leukemias by Detection of Leukemai-Specific mRNA Sequences Amplified in Vitro. *Proc Natl.Acad Sci USA* 85, 5698-5702.1988. Ref Type: Abstract
- 76 Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW et al. In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J.Urol.* 1990;144:1550-6.
- 77 Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A et al. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J.Clin.Oncol.* 1995;13:1195-200.
- 78 Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:2632-40.
- 79 Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:870-9.
- 80 Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:1432-9.
- 81 Zhong XY, Kaul S, Diel I, Eichler A, Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J.Cancer Res Clin.Oncol.* 1999;125:286-91.
- 82 Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur.J.Cancer* 2000;36:1681-94.
- 83 Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas. *In Vivo* 2000;14:237-50.

-
- 84 Fishman A, Klein A, Zemer R, Zimlichman S, Bernheim J, Cohen I et al. Detection of Micrometastasis by Cytokeratin-20 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) in Lymph Nodes of Patients with Endometrial Cancer. *Gynecol.Oncol.* 2000;77:399-404.
- 85 Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J.Pathol.* 1998;185:427-34.
- 86 Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J.Natl.Cancer Inst.* 1999;91:80-5.
- 87 Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin.Oncol.* 2000;18:80-6.
- 88 Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4: 448–456.
- 89 Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61:1890-1895.
- 90 Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.* 1991;9:1749-56.
- 91 Ellis G, Ferguson M, Yamanaka E, Livingston RB, Gown AM. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* 1989;63:2509-14.
- 92 Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H et al. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int.J.Cancer* 1996;65:755-61.
- 93 Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br.J.Cancer* 1994;69:566-71.
- 94 Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;49:27-33.
- 95 Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur.J.Cancer* 1991;27:1552-5.
- 96 Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long- term follow-up study. *Lancet* 1999;354:197-202.
- 97 Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:8672-6.
- 98 Untch, M., Kahlert, S., Funke, I., Boettcher, B., Konecny, G., Nestle-Kraemling, C., and Bauernfeind, I. Detection of Cytokeratin (CK) 18 Positive Cells in the Bone Marrow (BM) of Breast Cancer Patients-No Prediction of Bad Outcome. *Proc.ASCO* 18, 693a. 1999. Ref Type: Abstract
- 99 Sauer H. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Mammakarzinome. *Tumormanual* 1997.

-
- 100 Genz Th, Schaller G. Das Rezidiv beim Mammakarzinom. *Krebsmedizin* 1990;11:15-8.
- 101 Altmann U, Katz FR, Tafazzoli AG, Haeberlin V, Dudeck J. GTDS--a tool for tumor registries to support shared patient care. *Proc.AMIA.Annu.Fall.Symp.* 1996;512-6.
- 102 Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B* 1972;34:187-220.
- 103 SPSS, Chicago, Bühl & Zöfel, 2001; Diehl & Staufenbiel, 2001; Janssen & Laatz, 1999.
- 104 Sobin LH. Frequently asked questions regarding the application of the TNM classification. TNM/Prognostic Factors Project (International Union Against Cancer [UICC]). *Cancer* 1999;85:1405-6.
- 105 Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997;80:1803-4.
- 106 Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
- 107 Janssen, Jürgen & Laatz, Wilfried (1999). Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows: Eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem Version 8 und das Modul Exakte Tests. Dritte, neubearbeitete und erweiterte Auflage. Berlin/Heidelberg: Springer.
- 108 Martin M, Garcia-Saenz JA, Maestro De las Casas ML, Vidaurreta M, Puente J, Veganzones S, Rodriguez-Lajusticia L, De la Orden V, Oliva B, De la Torre JC, Lopez-Tarruella S, Casado A, Sastre J, Diaz Rubio E. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: timing of blood extraction for analysis. *Anticancer Res.* 2009 Oct; 29(10):4185-7.
- 109 Payne RE, Yagüe E, Slade MJ, Apostolopoulos C, Jiao LR, Ward B, Coombes RC, Stebbing J. *Pharmacogenomics.* 2009 Jan;10(1):51-7.
- 110 Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 1;13(3):920-8.
- 111 Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA; Stebbing J, Palmieri C, Sinnott HD, Kulinskaya E, Pitfield T, McCormack RT; Pantel K, Coombes RC. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br J Cancer* 2009 Jan 13;100(1):160-6.
- 112 Fehm T, Janni W, Rack B, Müller V, Solomayer E, Schindlbeck C, Jückstock J, Pantel K, Wallwiener D, Friese K. Detection of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood of Breast Cancer Patients - Standardising the Method and Looking for Clinical Relevance. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2007;4(2): 92-98.
- 113 Schindlbeck C, Strobl B, Sommer H, Friese K, Janni W: Efficacy of zoledronate in treating persisting isolated tumor cells in bone marrow in patients with breast cancer. A phase II pilot study. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008 Feb;133(7):285-9.
- 114 Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur.J.Cancer* 1991;27:1552-5.
- 115 Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Friese K. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1174-85.
- 116 Janku F, Srovnal J, Korinkova G, Novotny J, Petruzalka L, Power D, Matous B, Hajduch M. Molecular detection of disseminated breast cancer cells in the bone marrow of early breast

-
- cancer patients using quantitative RT PCR for CEA. *Neoplasma*. 2008;55(4):317-22.
- 117 Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, Gerogoulas V, Mavroudis D, Agelaki S. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(6):R84.
- 118 Schindlbeck C, Stellwagen J, Jeschke U, Karsten U, Rack B, Janni W, Jückstock J, Tulusan A, Sommer H, Friese K: Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich-Antigen. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(3):233-40.
- 119 Untch M, Harbeck N, Eiermann W. Micrometastases in bone marrow at the time of primary treatment of breast cancer: a new prognostic criterion? *Gynakol Rundsch* 1989; 29 Suppl 2:231-233.
- 120 Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17):6326-6334.
- 121 Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(17):1419-1424.
- 122 Gerber B, Krause A, Muller H, et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol*. 2001;19:960–971.
- 123 Gebauer G, Fehm T, Merkle E, et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2001;19:3669–3674.
- 124 Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:793–802.
- 125 Fisher B, Wolmark N, Redmond C, Deutsch M, Fisher ER. Findings from NSABP Protocol No. B-04: comparison of radical mastectomy with alternative treatments. II
- 126 Menard S, Bufalino R, Rilke F, Cascinelli N, Veronesi U, Colnaghi MI. Prognosis based on primary breast carcinoma instead of pathological nodal status. *Br.J Cancer* 1994;70:709-12.
- 127 Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kantenich C, Riethmuller G et al. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol*. 2001;19:368-75.
- 128 Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-187.
- 129 Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1):75-90.
- 130 Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J.Hematother*. 1994;3:165-73.
- 131 Brugger W, Buhning HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R et al. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J.Clin.Oncol*. 1999;17:1535-44.

-
- 132 Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr OM, Bodenmuller H, Bonfrer H et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour.Biol.* 1998;19:132-52.
- 133 Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S et al. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses
- 134 Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int.J.Cancer* 1999;80:119-25.
- 135 Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 1993;142:1111-8.
- 136 Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection
- 137 Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K. Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl.Cancer Inst.* 1998;90:1099-101.
- 138 Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, Sedira M, Bazinet M, Kinne DW et al. Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease. *Am.J.Surg.Pathol.* 1988;12:333-40.
- 139 Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996;347:649-53.
- 140 Schlimok, G. Mikrometastasen epithelialer Tumoren im Knochenmark: Immunzytochemischer Nachweis und in vivo Markierung mit Hilfe monoklonaler Antikörper. 1988. Ludwig-Maximilians-Universität. Ref Type: Thesis/Dissertation
- 141 Klein CA, Schmidt KO, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:4494-9.
- 142 Mueller P, Carroll P, Bowers E, Moore D, Cher M, Presti J et al. Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer* 1998;83:538-46.
- 143 Fuchs E. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends Genet* 1988;4:277-82.
- 144 Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O et al. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993;53:1027-31.
- 145 Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J et al. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur.J.Cancer* 1991;27:1461-5.
- 146 Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp.Hematol.* 1998;26:252-64.
- 147 Cote, R. J., Shi, S. R., Beattie, E. J., Makarewicz, B., and Chaiwun, B. Automated detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Proc.ASCO* 16, 458a. 1997. Ref Type: Abstract

-
- ¹⁴⁸ Makarewicz, B., McDuffie, L., Shi, S. R., Catterjee, S., Yang, C., and Taylor, C. R. Immunohistochemical detection of occult micrometastases using an automated intelligent microscopy system. *Proc Am Assoc Cancer* 38, 269. 1997. Ref Type: Abstract
- ¹⁴⁹ Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki J, Riethmueller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 1997;68:1241-50.