

Aus der Chirurgische Klinik und Poliklinik
Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. K.-W. Jauch

**Prognostische Relevanz
des Knochenmarkstatus von nodal-negativen
Mammakarzinom-Patientinnen
im Langzeit-follow-up**

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

vorgelegt von

Friederike Irene Graunke

aus Erding

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Ilona Funke

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Miriam Lenhard

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

16.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	4
3. Material und Methoden	5
3.1 Die Patientinnen	5
3.1.1 Das Gesamtkollektiv	5
3.1.2 Das Kontrollkollektiv	6
3.2 Knochenmarkentnahme,- aufarbeitung und – auswertung	6
3.3 Patientenbezogene Daten	10
3.4 Tumorbezogene Daten	10
3.5 Therapiebezogene Daten	11
3.6 Die Nachsorgedaten	11
3.7 Statistische Auswertung des Gesamtkollektivs	12
4. Ergebnisse	13
4.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich prognostisch relevanter Faktoren	13
4.1.1 Patientenbezogene Parameter des Gesamtkollektivs	13
4.1.2 Tumorbezogene Parameter des Gesamtkollektivs	16
4.1.3 Therapiebezogene Parameter des Gesamtkollektivs	22
4.1.4 Fakultativ erhobene Parameter des Gesamtkollektivs	24
4.1.5 Follow-Up-Daten der Patientinnen	25
4.2 Wie häufig konnten disseminierte epitheliale CK-18 positive Tumorzellen bei Mammakarzinom-Patientinnen im Knochenmark nachgewiesen werden ?	27
4.2.1 Sind disseminierte epitheliale CK-18 positive Tumorzellen auch im Knochenmark von Patienten ohne maligne epitheliale Tumorerkrankung nachweisbar ?	28
4.2.2 Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter mit dem Knochenmarkstatus	28

4.3	Univariate Analyse im Kaplan-Meier-Verfahren	33
4.3.1	Das Gesamtkollektiv im Langzeitverlauf	33
4.3.2	Subgruppenanalyse der Mammakarzinom-Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus mit/ohne Therapie	34
5.	Diskussion	35
6.	Zusammenfassung und Ausblick	41
7.	Anhang	42
	<i>TNM-Klassifikation</i>	42
	<i>UICC-Klassifikation</i>	44
	<i>Grading</i>	45
	<i>Serienbriefe und Fragebogen</i>	46
	Literatur	49
	Danksagung	55

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Bearbeitung des Knochenmarkpunkttates	6
Tabelle 2:	Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark (APAAP-Färbung)	7
Tabelle 3:	Patientenbezogene (obligate und fakultative) Daten	10
Tabelle 4:	Tumorbezogene (obligate und fakultative) Daten	10
Tabelle 5:	Verteilung der patientenbezogenen Daten des Gesamtkollektivs	13
Tabelle 6:	Verteilung der tumorbezogenen Daten des Gesamtkollektivs	16
Tabelle 7:	Verteilung der therapiebezogenen Daten des Gesamtkollektivs	22
Tabelle 8:	Verteilung der fakultativ erhobenen Daten des Gesamtkollektivs	24
Tabelle 9:	Nachsorge-Ergebnisse	25
Tabelle 10:	Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und klinisch-pathologischen Parametern im Gesamtkollektiv	29
Tabelle 11:	Gesamtüberleben mit/ohne Systemtherapie	34
Tabelle 12:	Literaturübersicht zur prognostischen Relevanz in Bezug auf das Gesamtüberleben (OAS = overall survival) und des rezidivfreien Überlebens (DFS = disease free survival) des Knochenmarkstatus bei Mammakarzinom-Patientinnen aller Tumorstadien	39
Tabelle 13:	Aktuelle Literaturübersicht zur prognostischen Relevanz des Knochenmarkstatus im Hinblick auf OAS/DFS in der Subgruppe der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen	40

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist weltweit der am häufigsten vorkommende maligne Tumor der Frau. Die globale Inzidenz liegt bei 1. Mio./Neuerkrankungen pro Jahr. In Deutschland machte das Mammakarzinom der Frau im Jahre 2002 24% aller malignen Krebsneuerkrankungen aus. Es steht damit an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenzen, und ist somit auch in der BRD die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau [16].

In Deutschland und in anderen westlichen Industrieländern erkrankt durchschnittlich etwa jede elfte Frau einmal in ihrem Leben an einem Mammakarzinom. Dies waren im Jahre 2003 in absoluten Zahlen bezogen auf Deutschland 47500 Frauen, von diesen verstarben ca. 18000 Frauen an ihrer Brustkrebserkrankung. Die tumorbedingte Mortalität liegt damit bei 38,3%. Das Mammakarzinom ist damit die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter von 35-59 Jahren [21].

Um der Mammakarzinomerkrankung effektiver begegnen zu können, kommt heutzutage der Früherkennung eine wichtige Rolle zu. Ziel des sogenannten Screenings ist es, bei asymptomatischen Frauen eine mögliche Erkrankung in einem frühen und daher noch potentiell kurablen Stadium zu entdecken. Die Aufgabe des Screenings ist also die Suche nach Auffälligkeiten und nicht die definitive Diagnose.

Das Instrumentarium der Früherkennungsuntersuchung umfasst neben der klinischen Brustuntersuchung mittels Inspektion und Palpation die Mammographie. Da 10%-15% der tastbaren Karzinome mammographisch nicht nachzuweisen sind, wird zusätzlich oder ergänzend sowohl die Mammasonographie wie auch die Magnet-Resonanztomographie zu diagnostischen Zwecken herangezogen [37].

Die Ausweitung eines Mammakarzinoms auf benachbarte Gewebe, Organe oder Organsysteme vollzieht sich per continuitatem, durch lymphogene und/oder hämatogene Metastasierung.

Die lymphogene Ausweitung erfolgt in die regionären Lymphknoten und dabei hauptsächlich in die Achsellymphknoten.

Bei einer Tumorgröße von 2-5cm im Durchmesser sind bei ca. 50% der Patientinnen bereits histologisch nachweisbare Lymphknotenmetastasen vorhanden [16].

Das heißt, es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Größe des Primärtumors und seiner metastatischen Aussaat über das Lymph- und/oder Blutsystem.

Werden regionäre Lymphknotenmetastasen nachgewiesen, ist von einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit auszugehen, dass zusätzlich eine hämatogene Metastasierung bereits stattgefunden hat. Verschiedene Organe sind bevorzugt von einer hämatogenen Filialisierung betroffen. Diese sind das Skelettsystem, Pleura, Lunge, Leber und Gehirn, sowie selten das Ovar.

Im Zuge der Metastasierung lösen sich einzelne Tumorzellen vom Gewebeverband des Primärtumors, um dann in Blut- und Lymphgefäße einzudringen. Dies erfordert die Fähigkeit zur Migration sowie den Abbau von Gewebsschranken mittels proteolytischer Enzyme, durch Unterdrückung der Expression oder Wirksamkeit von Proteasehemmern.

Die so eingeschwemmten und damit verschleppten Tumorzellen passieren mittels Bindung an spezifische Adhäsionsmoleküle des Endothels die Gefäßwände und können sich an anderer Stelle im Organismus absiedeln.

Eine Größenzunahme des Tumors bzw. seiner Metastasen erfordert sowohl Wachstumsfaktoren als auch sogenannte Angiogenesefaktoren, welche durch Freisetzung von Mediatoren stimuliert werden, um die entsprechende Versorgung mit Sauerstoff und Substraten zu gewährleisten [5].

Um den aktuellen Metastasierungsgrad zu bestimmen, werden derzeit in der klinischen Routine sogenannte Staging-Untersuchungen herangezogen. Zu ihnen zählen der Röntgen-Thorax, die Abdomen-Sonographie und die Skelettszintigraphie.

Das Skelettsystem ist in Abhängigkeit vom Tumorstadium und Rezeptorstatus das am häufigsten befallene Organsystem von soliden Metastasen. Bis zu 20% der Patientinnen mit Mammakarzinom entwickeln Knochenfiliae. Im Rahmen von verschiedenen Studien wurden Knochenmark-Aspirate auf disseminierte Tumorzellen hin untersucht. Durch den Einsatz sensitiver immunzytochemischer und molekularer Techniken ist es nunmehr möglich, auch einzelne disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Diese Erweiterung des aktuellen Tumorstaging gewinnt zunehmend an klinischer Relevanz und wird in dieser Arbeit bei nodal-negativen (N0) Mammakarzinom Patientinnen analysiert.

Als Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz gelten heute Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Typ, Grading (siehe Anhang) und Steroidhormonrezeptorstatus. Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptoren) einer/s Patienten/in ist heute beim Mammakarzinom obligat. Dieser ist richtungweisend für die Therapie der Erkrankung.

Den stärksten prognostischen Faktor stellt der Nodalstatus dar, hierbei korreliert die Anzahl der befallenen Lymphknoten direkt mit dem Rezidivrisiko und der Überlebenschancen. Trotz eines negativen Nodalstatus ist bei ca. 33% der Patientinnen innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung ein lokoregionäres Rezidiv oder eine Absiedelung von Fernmetastasen nachweisbar.

Deshalb ist es unerlässlich, die aktuelle Methodik weiter zu optimieren, um das Risikoprofil der Patientinnen individuell abzuschätzen und postoperativ risikoadaptiert behandeln zu können.

Neue Ansätze außerhalb dieser Arbeit sind beispielsweise die Bestimmung des Plasminogenaktivators vom Urokinasentyp (uPA) und seines Inhibitors Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), welcher an der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen beteiligt ist und somit bei verstärkter Expression die Prognose verschlechtert [24, 31, 39, 46].

Ein weiterer wichtiger Ansatz, ist die Bestimmung des HER-2/neu-Onkoproteins welches bei Überexpression Aussagen über die Aggressivität des Verlaufs und der Downregulation des Hormonrezeptorstatus zulässt [39, 44].

Ein ebenso neuer Ansatz ist der Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom. Das Vorkommen solcher Tumorzellen im Knochenmark, steht nachweislich in Verbindung mit einer Verschlechterung der Prognose bezüglich des rezidiv freien und des Gesamtüberlebens ungeachtet des vorliegenden Tumorstadiums [10].

Ein zentrales Kriterium in dieser Analyse ist eine histopathologisch nicht stattgefundene

lymphogene Metastasierung (N0). Der Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen in diesem N0-Kollektiv scheint ein potenziell unabhängiger Faktor zur Beurteilung von Rezidiv freiem und Gesamtüberleben zu sein [7, 14].

Letzteres wird in dieser Arbeit, bei einem Gesamtkollektiv von 284 nodal-negativen (N0) Mammakarzinom-Patientinnen mit Langzeit-Follow-up (Median 10,9 Jahre) analysiert werden. Es wurde evaluiert, ob der Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei nodal-negativen Mammakarzinom Patientinnen ein prognostischer Faktor ist.

2. Fragestellung

1. Hat der Knochenmarkstatus bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen im Langzeitverlauf einen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und Rezidivhäufigkeit nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen in der Langzeitbeobachtung ?
3. Besteht bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen eine Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und anderen ausgewählten Parametern ?
4. Wie verhält sich das Gesamtüberleben nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen unter Berücksichtigung des Knochenmarkstatus mit und ohne Therapie im Langzeitverlauf ?

3. Material und Methoden

3.1 Die Patientinnen

3.1.1 Das Gesamtkollektiv

Das Gesamtkollektiv dieser prospektiven Studie umfasst 284 nodalnegative Mammakarzinom-Patientinnen.

Die Einschlusskriterien beinhalteten:

- primäres Mammakarzinom
- negativer Nodalstatus (pN0)
- Resektionsränder (R0), makroskopisch und mikroskopisch tumorfrei
- Ausschluss von Fernmetastasen (M0)

Es wurden ausschließlich Patientinnen in die Studie aufgenommen, die im Zeitraum von 1990 bis 1993 ihre operative Primärtherapie erhielten. Die Patientinnen wurden in der Chirurgischen oder Gynäkologischen Klinik des Klinikums Großhadern in München, des Klinikums Augsburg, der Maria-Theresia Klinik, des Klinikums Landshut und des Klinikums Reichenbach behandelt. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 10,9 Jahren.

Die beteiligten Patientinnen gaben im Rahmen eines Aufklärungsgespräches ihr Einverständnis, dass intraoperativ Knochenmarkaspirate entnommen werden.

Waren Knochenmarksentnahme oder eine Auswertung nicht möglich, so wurden diese Patientinnen nicht in das Kollektiv miteinbezogen.

Eingangs erfolgten bei allen beteiligten Patientinnen verschiedene Staginguntersuchungen; zu ihnen zählten routinemäßig Mammographie, Röntgen-Thorax-Aufnahme, Abdomen-Sonographie und Skelettszintigraphie.

Des Weiteren wurden jeweils die Tumormarker CEA (Normalbereich < 3.0 ng/ml) und CA 15-3 (Normbereich < 28.0 U/ml) obligat und die Proteasen uPA (Normbereich < 3.00 ng/ml) und PAI 1 (Normbereich < 14.0 ng/ml) fakultativ bestimmt.

Die operative Therapie bestand je nach individueller Befundkonstellation und Patientenwunsch aus einer modifizierten radikalen Mastektomie (MRM) oder einer brusterhaltenden Operation (BET).

Den brusterhaltenden Operationen schloss sich eine Radiatio an, die nach einer Mastektomie nur bei spezieller Indikation erfolgte. Weitere Therapien waren die adjuvante Hormontherapie (meist mittels Tamoxifen) oder eine adjuvante Chemotherapie. Die Indikation zur systemischen Therapie wurde gemäß den zum damaligen Zeitpunkt jeweils geltenden internationalen Konsensus-Empfehlungen gestellt.

3.1.2 Kontrollkollektiv [14]

Das Kontrollkollektiv umfasst 133 Patientinnen, mit unterschiedlichen Erkrankungen: benignen gastrointestinalen Erkrankungen, Mastopathien, Autoimmunerkrankungen, chronische Pneumonien, Tuberkulose, Traumata sowie maligne hämatologische Erkrankungen und Karzinoide.

Auch von diesem Kollektiv wurde das Knochenmark auf disseminierte epitheliale CK18-positive Tumorzellen nach der unter 3.2 aufgeführten Methode untersucht.

3.2 Knochenmarkentnahme, -aufarbeitung und -auswertung

Nach schriftlich erteilter Einverständniserklärung der Patientinnen wurden intraoperativ die Knochenmarkaspirate (2-10ml) aus beiden spinae iliaca anterior superioris entnommen.

Die Knochenmarkentnahme und Aufarbeitung erfolgte nach etablierten Protokollen.

Material	Firma
Punktionskanülen	Nicolai
10ml Spritzen	BD
Lösungen	Firma
Heparin	(variabel nach Klinik)

Tabelle1: Bearbeitung des Knochenmarkpunktates

Durchführung	geschätzte Zeit (min)
<u>Vor der OP:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Aufklärung des Patienten • Einverständniserklärung des Patienten mit Datum und Unterschrift <u>Punktion des linken und des rechten Beckenkamms:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkt: vor Hautschnitt • Wichtig: 0,5ml Heparin vorlegen, direkt nach Punktion mischen und die Spritzen mit Patientenaufklebern versehen <u>Nach Punktion:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Verständigung des Labors Das Punktat wird an der Steuerstelle abgeholt	Gesamt: 10 min

Befundung: <ul style="list-style-type: none"> • Immunzytologische Bestimmung der Anzahl epithelialer Zellen im Knochenmark • Zeitraum: 14 Tage Abgabe des Befundbogens auf Station 	
---	--

Tabelle 2: Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark (APAAP-Färbung)

Vorbereitung (Material, Lösungen und Geräte):		
Lösungen	Firma	Bestell.Nr.
AP-Conjugate Substrate Kit	BioRad	170-6432
Levamisolhydrochlorid	Sigma	L-9756
AB-Serum	Biotest	805135
MOPC-21	Sigma	M-9269
A45/3B10	AS Diagnostik	ZR002A
Rabbit immunglobulins to Mouse Immunglobulins	Dako	Z259
APAAP (Mouse, Monoclonal)	Dako	D651
D-PBS (zum Ansetzen der Lösungen)	Gibco	14190-169
PBS (zum Waschen)		
106g Natriumchlorid	Fluka	71380
4g Kaliumchlorid	Fluka	60130
4g Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	4873.1000
28,4g Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	6580.0500
→ Auffüllen mit 20l A.dest		
Paraformaldehyd	Fluka Chemie AG	76240
 Vorbereitungen		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Ansetzen der Antikörper</u> MOPC-21: Arbeitskonzentration: 2µg/ml Verdünnung: 1:100 A45/3B10: Arbeitskonzentration: 2µg/ml Verdünnung: 1:100 • <u>Herstellen von 1%igem Paraformaldehyd:</u> 5g Paraformaldehyd abwiegen und mit PBS auf 500ml auffüllen. Unter ständigem Rühren auf 60°C erhitzen, bis sich das Paraformaldehyd vollständig gelöst hat. ACHTUNG: darf nicht kochen! Temperatur der Lösung mit einem Thermometer überprüfen! Abkühlen lassen. Eventuell auf Eis stellen. 		

<ul style="list-style-type: none"> • Objektträger: Für die Färbung werden pro Patient 4 Haftobjektträger benötigt: 2 x Haftobjektträger: A45 = Befund 2 x Haftobjektträger: MOPC-21 = Isotypkontrolle Pro Färbung werden zusätzlich noch 2 Zytospin mit Zytokeratin positiven Zellen eingesetzt: 1 x Positivkontrolle für A45/3B10 1 x Isotypkontrolle (MOPC-21) Anmerkung: pro Zytospin <u>immer</u> 100 µl Lösung auftragen 																			
Durchführung:	geschätzte Zeit (min)																		
<ul style="list-style-type: none"> • Auftauen der Haftobjektträger und der Zytospins • Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 10% AB/PBS: 20' 600µl pro Auftragsstelle • Inkubation mit dem Primärantikörper: 45' 250 µl pro Auftragsstelle • 3 x 3 min waschen in 1 x PBS TIPP: Während dieser Zeit den Brückenantikörper herstellen: Verdünnung 1:20 mit 10% AB/PBS • Inkubation mit dem Bückenantikörper (rabbit immunglobulins to mouse immunglobulins): 30' 250 µl pro Auftragsstelle • 3 x 3 min waschen in 1 x PBS Während dieser Zeit den APAAP-Komplex herstellen: Verdünnung 1:100 mit 10% AB/PBS • Inkubation mit dem APAAP-Komplex: 30' 250 µl pro Auftragsstelle • 3 x 3 min waschen in 1 x PBS <p>→ Während dieser Zeit die Entwicklerlösung herstellen:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Menge</th> <th style="text-align: left;">Reagenz</th> <th style="text-align: left;">Herstellung</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>388µl</td> <td>AP-Puffer</td> <td>Stammlösung 1:25 mit A. dest. verdünnen</td> </tr> <tr> <td>4µl</td> <td>Lösung A</td> <td>gebrauchsfertig</td> </tr> <tr> <td>4µl</td> <td>Lösung B</td> <td>gebrauchsfertig</td> </tr> <tr> <td>4µl</td> <td>Lösung H</td> <td>36,1mg Levamisolhydrochlorid mit A. dest. auffüllen auf 1ml</td> </tr> <tr> <td>400µl</td> <td colspan="2">Gesamtlösung</td> </tr> </tbody> </table>	Menge	Reagenz	Herstellung	388µl	AP-Puffer	Stammlösung 1:25 mit A. dest. verdünnen	4µl	Lösung A	gebrauchsfertig	4µl	Lösung B	gebrauchsfertig	4µl	Lösung H	36,1mg Levamisolhydrochlorid mit A. dest. auffüllen auf 1ml	400µl	Gesamtlösung		<p>30 min</p> <p>20 min</p> <p>45 min</p> <p>10 min</p> <p>30 min</p> <p>10 min</p> <p>30 min</p> <p>10 min</p>
Menge	Reagenz	Herstellung																	
388µl	AP-Puffer	Stammlösung 1:25 mit A. dest. verdünnen																	
4µl	Lösung A	gebrauchsfertig																	
4µl	Lösung B	gebrauchsfertig																	
4µl	Lösung H	36,1mg Levamisolhydrochlorid mit A. dest. auffüllen auf 1ml																	
400µl	Gesamtlösung																		

<ul style="list-style-type: none"> • Inkubation mit der Entwicklerlösung: 10' 400 µl pro Auftragefläche • 3 x 3 min waschen in 1 x PBS • Fixation mit 1%igem Paraformaldehyd: 5' • 3 x 3 min waschen in 1 x PBS • Haftobjekträger können nun 4 Tage lang bei 4°C in PBS aufbewahrt werden! 	10 min 10 min 5 min 10 min Gesamt: 3,5h
Kontrolle und Bewertung:	
<p><u>Kontrolle</u> Isotypkontrolle (MOPC-21): Knochenmarkszellen Patient (Haft – OT) und Tumorzelllinie (Zytospin) mit Zytokeratin – positiven Zellen Positivkontrolle (A45/3B10): Tumorzelllinie (Zytospin) mit Zytokeratin – positiven Zellen</p>	

Das zu den Filamentproteinen gehörende Zytokeratin 18 ist Teil des Zytoskelettes in allen eukaryonten Zellen und wird sowohl von unterschiedlichen Epithelien, als auch epithelialen Tumoren und von disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark exprimiert [2, 36].

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Der Knochenmarkstatus wurde als positiv bestimmt, wenn eine oder mehrere CK18-positive Zellen gefunden wurden [14].

3.3 Patientenbezogene Daten

Zusätzlich zu den obligat erhobenen Parametern wurden verschiedene Parameter fakultativ erhoben.

Tabelle 3: Patientenbezogene (obligate und fakultative) Daten

Obligate Parameter	Fakultative Parameter
Alter	Hormonelle Antikonception
Menopausestatus	Diabetes mellitus Erkrankung
Staginguntersuchungen	Erstsymptom der Tumorerkrankung
Ergebnis Nachsorge	
Zweitmalignomerkrankung	

3.4 Tumorbezogene Daten

Folgende auf den Tumor der Patientinnen bezogene Daten wurden erhoben.

Tabelle 4: Tumorbezogene (obligate und fakultative) Daten

Obligate Parameter	Fakultative Parameter
pT-Stadien	Tumorassoziierte Proteasen (uPA, PAI 1)
Histologischer Tumortyp	
Grading	
UICC	
Hormonrezeptorstatus	
Tumormarker (CEA, CA15-3)	

Das pTNM-Stadium, der histologische Tumortyp und das Grading wurden dem jeweiligen histopathologischen Befund entnommen. Die Einteilung des Gratings (G1-3) erfolgte nach der Klassifikation von Bloom und Richardson in der Modifikation nach Elston und Ellis [14, 5, 16]. Das Hormonrezeptor-Labor der Frauenklinik des Klinikums Großhadern und das Pathologische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität ermittelten die Hormonrezeptor-Werte, die nach dem immunreaktiven Score von Remmele und Stegner oder mittels Immunoassay ausgewertet wurden [43]. Diese Parameter wurden jeweils routinemäßig im Rahmen der Diagnostik erhoben. Die tumorassoziierten Proteasen (uPA und PAI 1) wurden innerhalb des gleichen Zeitraums im Forschungslabor der Frauenklinik des Klinikums Großhadern München bestimmt.

3.5 Therapiebezogenen Daten

Folgende therapiebezogene Daten wurden obligat dokumentiert:

- Operative Primärtherapie
- Radiatio
- Adjuvante Hormontherapie
- Adjuvante Chemotherapie

Fakultativ erhobene therapiebezogene Daten:

- Wiederaufbauplastik (WAP)

3.6 Die Nachsorgedaten

Der Erhebung der Nachsorgedaten ging die schriftliche Ankündigung eines Telefonats voraus. Innerhalb des angegebenen Zeitraums erfolgte dann ein Telefonat, in dem mittels eines standardisierten Nachsorgefragebogens die Daten (siehe Anhang) erhoben wurden. Circa 80% der Patientinnen dieses Kollektivs konnten auf diesem Weg kontaktiert werden. Telefonisch nicht erreichbaren oder ins Ausland verzogenen Patientinnen wurde ein Fragebogen (siehe Anhang) postalisch zugestellt, welcher von drei von vier Patientinnen ausgefüllt zurückgesandt wurde.

Die verbleibenden Patientinnen konnten über ihre Hausärzte, Krankenhäuser (Chirurgische Klinik und Frauenklinik des Klinikums Großhadern sowie Klinikum Augsburg), bei welchen regelmäßiger Patientenkontakt zu den jeweiligen Nachsorgeuntersuchungen gegeben war, oder über Wohn- oder Altenheime (bei bettlägerigen, dementen Patientinnen) nachgesorgt werden. Nur fünf Patientinnen konnten auf keinem der genannten Wege kontaktiert werden und gingen daher mit dem Ergebnis unter letzter Verlauf als „unbekannt“ in die Auswertung ein. Drei Patientinnen verweigerten das Gespräch, gingen jedoch mit der Information "lebt" in die Auswertung ein.

Obligat wurde erfragt, ob sich Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen entwickelt hatten oder ein Zweitmalignom (auch kontralaterales Mammakarzinom) aufgetreten war. Gegebenenfalls wurden die Daten zur Art und Dauer der daraufhin erfolgten Therapie erhoben. Im Falle des Ablebens von Patientinnen wurde das genaue Todesdatum und die Todesursache verzeichnet.

3.7 Statistische Auswertung des Gesamtkollektivs

Für den Vergleich zweier Stichprobenmittelwerte bezüglich der untersuchten Parameter wurde als Verneinung der eigentlichen Arbeitshypothese (Beeinflussung des Gesamtüberlebens durch den Knochenmarkstatus) die Nullhypothese (keine Beeinflussung des Gesamtüberlebens durch den Knochenmarkstatus) aufgestellt. Dann wurden die Variablen formuliert, die Daten erhoben und in eine Filemaker Datei (Filemaker Pro 4.1) eingegeben. Jeder Wert wurde in ein definiertes Feld eingetragen, wobei nur zuvor festgelegte Wertebereiche eingegeben werden konnten, um Eingabe von Fehlern zu minimieren. Es erfolgten regelmäßige Plausibilitäts- und Konsistenzkontrollen.

Zur statistischen Auswertung wurden die Variablen nach cut-off Festlegung dichotomisiert, d.h. in mindestens zwei zu vergleichende Gruppen eingeteilt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SAS, Version 6.08 TS 407 (SAS Inc., Cary, NC USA) durchgeführt. Zur Prüfung der Beziehung zwischen den einzelnen Variablen und dem Knochenmarkstatus wurden der χ^2 - Test verwendet, der keine Zeitangaben berücksichtigt.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Berechnungen war die univariate Analyse von Knochenmarkbefund und den anderen Variablen möglich. Die Kaplan-Meier-Methode ist geeignet, den Anteil der Beobachtungseinheiten zu schätzen, die unter den Bedingungen der Studie einen bestimmten Zeitpunkt (hier den des Nachsorgedatums) überleben.

Durch den log-rank-Test wurde geprüft, ob die beobachteten Unterschiede in den Überlebenszeitkurven signifikant waren; d.h. es wurde geprüft, ob die Überlebenszeit in beiden Stichproben der gleichen Verteilung folgte. Im log-rank-Test wird die Nullhypothese aufgestellt, der zufolge die beobachtete Differenz zufallsbedingt ist und beide Gruppen Stichproben aus derselben Grundgesamtheit darstellen.

Mit dem Fisher's exact test wird die Unabhängigkeit zweier Merkmale einer kleinen Stichprobe nachgewiesen. Hiermit kann die Signifikanz des Unterschiedes zweier Merkmale untersucht werden.

Der p-Wert gibt an, auf welchem Niveau sich ein signifikantes Ergebnis eingestellt hätte, wenn man unter der zweiseitigen Fragestellung ein statistisches Testverfahren durchgeführt hätte. Beim p-Wert spricht man häufig auch von Überschreitungswahrscheinlichkeit, weil er die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der sich unter der Nullhypothese die gefundenen oder noch extremere Ergebnisse einstellen. Daher ist der p-Wert für die explorative Datenanalyse sehr nützlich. Signifikanz ergibt sich bei Werten von $p < 0.05$. Bei signifikant korrelierenden Variablen besteht eine mindestens 95%ige Wahrscheinlichkeit einer nicht zufälligen Abhängigkeit, das heißt, wenn der p-Wert kleiner 0.05 ist.

4. Ergebnisse

4.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich prognostisch relevanter Faktoren

Diese prospektive Studie umfasst 284 nodal-negative Mammakarzinom-Patientinnen, die über einen Langzeitverlauf (mediane Nachbeobachtungszeit von 3931 Tagen oder 10,9 Jahren) regelmäßig nachgesorgt wurden. Dabei wurden patienten- und therapiebezogene Daten erhoben. Das Verteilungsmuster der einzelnen Parameter ist in den Tabelle 5 bis 8 aufgeführt. Sofern bei einzelnen Parametern die Daten nicht für alle 284 Patientinnen erhoben werden konnte, wurden die verfügbaren Datensätze als neue Berechnungsgrundlage herangezogen.

4.1.1. Patientenbezogene Parameter des Gesamtkollektivs

Tabelle 5: Verteilung der patientenbezogenen Daten im Gesamtkollektiv (n=284).

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
Alter	< 35 Jahre	12	4,2
	≥ 35 und < 50 Jahre	82	28,9
	≥ 50 Jahre	190	66,9
	< 54 Jahre	134	47,2
	≥ 54 Jahre	150	52,8
Range	23 Jahre/82 Jahre		
Menopausestatus	Prämenopause	106	37,3
	Perimenopause	15	5,3
	Postmenopause	163	57,4
	keine Angaben	0	0

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
<u>Staging Untersuchungen</u>			
Röntgenthorax n=274	fraglicher Befund	1	0,4
	ohne pathologischen Befund	273	99,6
	Röntgenthorax nicht durchgeführt	0	0
	keine Angaben	10	3,5
Oberbauchsono- graphie n=275	fraglicher Befund	3	1,1
	ohne pathologischen Befund	268	97,5
	Sonographie nicht durchgeführt	4	1,5
	keine Angaben	9	3,2
Skelettszintigraphie n=276	fraglicher Befund	17	6,2
	ohne pathologischen Befund	250	90,6
	Skelettszintigraphie nicht durchgeführt	9	3,3
	keine Angaben	8	2,8
Mammographie n=272	Verdacht auf Tumor der Gegenseite	9	3,3
	gesicherter Tumor der Gegenseite	1	0,4
	Gegenseite ohne pathologischen Befund	259	95,2
	Mammographie der Gegenseite nicht durchgeführt	3	1,1
	keine Angaben	12	4,2

Legende: Die Unterteilung nach Altersklassen richtet sich zum einen nach der Altersspanne in welcher das Erkrankungsrisiko als besonders hoch (≥ 35 und < 50 Jahre) einzuschätzen ist und zum anderen nach dem mittleren Alter (Median, $<$ bzw. ≥ 54 Jahre) der Patientinnen. Darüber hinaus ist auch der Range aufgeführt. Die Patientinnen, die nicht sicher in eine der drei zur Verfügung stehenden Kategorien, den Menopausestatus betreffend einzuordnen waren, wurden der Gruppe „perimenopausal“ zugerechnet.

Zur Altersverteilung

Die Altersgruppe der unter 35 Jährigen war in dieser Analyse mit 12 Patientinnen (4,2%) vertreten.

Im Alter zwischen 35-50 Jahren waren in dieser Analyse 82/284 Patientinnen, das entspricht 28,9%. Die über 50 Jährigen stellten die stärkste Gruppe mit 190/284 und somit 66,9% dar. Der Median, also das mittlere Alter, lag bei 54 Jahren. Die jüngste Patientin war 23 Jahre jung, die älteste 82 Jahre (= Range).

Menopausestatus

Hierbei wurde das Kollektiv in drei Gruppen unterteilt. „Prämenopause“ betraf die Patientinnen, welche eine bestehende kontinuierliche Menstruation angaben, „Perimenopause“ umfasste den Teil des Kollektivs, deren Menstruation noch nicht vollständig ausgeblieben war, sich jedoch bereits in ihrer Stärke und Kontinuität stark zu den bekannten Monatsblutungen unterscheiden. In der Unterteilung „Postmenopause“ sind die Patientinnen zusammengefasst, die keine Periode mehr haben. Zum Zeitpunkt der Nachsorgeerhebung befanden sich 37,3% (106/284) in der Prämenopause, 5,3% (15/284) in der Perimenopause und die meisten Patientinnen, nämlich 57,4% (163/284) in der Postmenopause.

Die prozentuale Verteilung des Kollektivs auf die drei Gruppen stimmt mit den der Literatur zu entnehmenden Werten überein.

4.1.2 Tumorbezogene Parameter des Gesamtkollektivs

Tabelle 6: Verteilung der tumorbezogenen Daten des Gesamtkollektivs (pN0, n=284)

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
TumorgroÙe (pT-Stadien)	pTis	32	11,2
	pT1	166	58,4
	pT1a	18	6,3
	pT1b	32	11,3
	pT1c	115	40,5
	pT2	76	26,8
	pT3	5	1,8
	pT4	5	1,8
Tumortyp	Ductales carcinoma in situ (DCIS)	28	9,9
	Lobuläres carcinoma in situ (LCIS)	3	1
	Invasiv duktales Karzinom	124	43,7
	Invasiv duktales Karzinom (mit intraduktalem Anteil)	91	32
	Lobuläres Karzinom	16	5,6
	Morbus Paget der Mamma	1	0,3
	Andere Histologien	18	6,3
	Keine Angaben	3	1
Grading	G1	27	9,5
	G2	165	58,1
	G3	73	25,7
	Keine Angaben	19	6,7

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
UICC- Klassifikation	Stadium 0	32	11,2
	Stadium I	166	58,4
	Stadium II	81	28,5
	Stadium III	5	1,8
	Stadium IV	0	0
Rezeptorstatus	Positiv	209	73,6
	Negativ	42	14,8
	Keine Angabe	33	11,6
Östrogen- rezeptorstatus	Positiv	187	65,8
	Negativ	58	26,4
	Keine Angabe	0	0
Progesteron- rezeptorstatus	Positiv	178	62,7
	Negativ	67	23,6
	Keine Angabe	0	0
Tumormarker	≥ 1 Tumormarker positiv	36	12,7
	Negativ	215	75,7
	Keine Angaben	33	11,6
CEA	≥ 3.0 ng/ml	20	8,9
	< 3.0 ng/ml	205	91,1
	Keine Angaben	59	20,8
CA 15-3	≥ 28.0 U/ml	18	8
	< 28.0 U/ml	208	92
	Keine Angaben	58	20,4

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%	
Proteasen	uPA	≥ 3.0 ng/ml	23	37,1
		< 3.0 ng/ml	39	62,9
		Keine Angaben	222	78,2
	PAI 1	≥ 14.0 ng/ml	54	87,1
		< 14.0 ng/ml	8	12,9
		Keine Angaben	222	78,2
Knochenmark- status	Positiv	73	25,7	
	Negativ	211	74,3	

Legende: Bei der Einteilung des Gradings wurden Patientinnen mit Grad 1-2 unter Grad 2 und Patientinnen mit Grad 2-3 unter Grad 3 zusammengefasst. War eine histologische Einteilung nicht möglich (Grad X), so wurden diese Patientinnen in die Gruppe „keine Angaben“ eingerechnet.

Tumorgröße (pT-Stadien)

Bei der Verteilung der pT-Stadien stellte die zahlenmäßig stärkste Gruppe die Tumorgröße pT1 (166/284) mit 58,4%, wobei die Untergruppe pT1c (115/284) mit 40,5% den größten Anteil hatte. Primärtumore im Stadium pT2 hatten 26,8% (76/284) der Patientinnen und bei 11,2% (32/284) lag ein Carcinoma in situ (pTis) vor. Tumore des Stadiums pT3 und pT4 hatten nur 5 Patientinnen (1,8%).

Tumortyp

Der am häufigsten vertretene histologische Typus war das invasiv duktales Mammakarzinom das bei 75,7% (215/284) der Patientinnen diagnostiziert wurde.

Am zweithäufigsten waren Patientinnen mit einem Carcinoma in situ 31/284 (10,9%) deren Hauptanteil Patientinnen mit einem duktales Carcinoma in situ 28/284 (9,9%) waren.

Seltene histologische Typen wurden in der Gruppe „andere Histologien“ zusammengefasst, hierin fielen medulläre, tubuläre, papilläre und muzinöse Mammakarzinome mit einer Anzahl von 18 Patientinnen also 6,3% des Gesamtkollektivs.

Lobuläre Karzinome waren am vierthäufigsten mit 16/284 (5,6%). Patientinnen ohne Angaben über den jeweilig vorliegenden histologischen Typ, wurden in der Gruppe „keine Angaben“ zusammengefasst.

Eine Patientin (0,3%) hatte einen Morbus Paget der Mamma.

Grading

Bei dieser Klassifikation wird die histopathologische Differenzierung der Mammakarzinome unter Einbeziehung histologischer und zytologischer Kriterien vorgenommen (siehe Anhang).

In dem vorliegenden Kollektiv waren 9,5% der Patientinnen (27/284) G1 und somit als „gut differenziert“ einzuordnen.

Die Mehrzahl der Patientinnen 165/284 (58%) hatten Tumore mit einem mäßigen Differenzierungsgrad (G2). Die Patientinnen mit Differenzierungsgrad G3 waren mit 73/284 (25,7%) vertreten.

Lagen keine Daten über das Grading vor, so flossen diese in die Kategorie „keine Angaben“ (7/284; 6,7%) ein.

UICC-Klassifikation

In dieser Einteilung war aufgrund der obligaten Einschlusskriterien (pN0, M0) keine Patientin im Stadium IIIa oder IV.

Es waren 32/284 (11,2%) Patientinnen dem Stadium 0 zuzuordnen. Bei den meisten Patientinnen lag mit 58,4% (166/284) das UICC-Stadium I vor.

Stadium II umfasste 81/284 (28,5%) Patientinnen, wobei 76/284 (26,8%) im Stadium IIa und 5/284 (1,8%) im Stadium IIb waren.

Bei 5 Patientinnen lag das Stadium IIIb vor, was einem Prozentsatz von 1,8% entspricht.

Hormonrezeptorstatus

Da bei der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus bei 33 Patientinnen keine Angaben vorlagen, reduziert sich die Berechnungsgrundlage auf 251 Patientinnen.

In dem vorliegenden Kollektiv waren 209/251 (83,3%) der Patientinnen hormonrezeptorpositiv, 42/251 (16,7%) wurden negativ getestet.

Die Expression des Östrogenrezeptors war bei 65,8% (187/284) der Patientinnen nachweisbar, der Progesteronrezeptor war mit 62,7% (178/284) ähnlich häufig nachweisbar.

Nicht gesondert aufgeführt wurden Patientinnen, deren Tumore sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren exprimiert hatten.

Eine Gruppe mit 33/284 (11,6%) Patientinnen ist unter „keine Angaben“ aufgeführt. Hierunter fielen Patientinnen mit einem Carcinoma in situ (CIS), bei welchen zumeist die zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus erforderliche Menge an Tumormaterial nicht ausreichte. Die Bestimmung des Rezeptorstatus erfolgte mittels Immunassay (ELISA) oder immunhistologisch mit dem Immunreaktiven Score (IRS) auf einer Skala 0-12 nach Remmele und Stegner [40].

Tumormarker

Bei der Bestimmung der Tumormarker CEA (Carcino-Embryonales-Antigen) und CA 15-3 (vom Tumor produziertes Antigen) konnten bei 33/284 (11,6%) keine Angaben gemacht werden. Hieraus ergibt sich eine neue Berechnungsgrundlage von 251 Patientinnen. Im Detail gliederten sich die Patientinnen bezüglich der Tumormarker folgendermaßen auf:

Insgesamt war bei 12,7% entsprechend 36/251 Patientinnen mindestens ein Tumormarker erhöht, bei der Mehrzahl, nämlich 75,7% (215/251) waren diese jedoch negativ.

Der Tumormarker CEA war bei 8,8% des Kollektivs (20/225) erhöht (≥ 3.0 ng/ml), bei der überwiegenden Anzahl der Patientinnen, nämlich 91,1% (205/225) lagen die Werte im Normbereich (< 3.0 ng/ml).

Keine Aussage konnte bei 20,8% (59/284) der Patientinnen getroffen werden.

Der zweite untersuchte Tumormarker CA 15-3 war bei der Mehrzahl der Patientinnen dieser Analyse nicht erhöht (< 28 U/ml), genauer bei 92% (208/226).

Eine Erhöhung (≥ 28.0 U/ml) dieses Parameters lag bei 8% (18/226) vor und keine Angaben konnten bei 20,4% (58/284) der Patientinnen gemacht werden.

Tumorassoziierte Proteolysefaktoren

Bei den analysierten Proteasen handelt es sich um uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und seinen Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-Typ). Diese sind am Abbau des Tumorstromas und der Basalmembran beteiligt und tragen so zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen bei.

Gemeinsam mit dem uPA-Rezeptor (uPA-R) ermöglichen sie die gerichtete Invasion der Tumorzellen und spielen eine wichtige Rolle bei Adhäsion und Migration von Tumorzellen [27]. Die Bestimmung von uPA und PAI-1 erfolgt mittels standardisierter ELISAs im Tumorgewebeextrakt.

Analysen bestätigen, dass hohe Konzentrationen von uPA und/oder PAI-1 im Primärtumor mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen. Nodal-negative Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 im Primärtumor haben eine sehr gute Prognose [39].

Bei dem größten Teil des Kollektivs, nämlich bei 78,2% (222/284) konnten sowohl uPA als auch PAI-1 betreffend keine Angaben gemacht werden. Dies ist darin begründet dass die klinische Einführung dieser Parameter erst Mitte der 90iger Jahre erfolgte.

In dem vorliegenden Kollektiv lag bei 37,1% (23/62) der Patientinnen die Protease uPA und bei 87,9% (54/62) die Protease PAI-1 erhöht vor.

Ein erniedrigter uPA-Wert (≤ 3.0 ng/ml) lag bei 62,9% (39/62) Patientinnen vor. Ein erniedrigter PAI-1-Wert (≤ 14.0 ng/ml) war bei 12,9% (8/62) zu finden.

Der Knochenmarkstatus

Das Ziel der vorliegenden Analyse war die Klärung, welchen Einfluss der Knochenmarkstatus auf die Prognose der Patientinnen im Langzeitverlauf hat. Der Knochenmarkstatus wurde als „positiv“ gewertet, wenn ein oder mehrere CK18-positive Zellen detektiert wurden.

Bei 73/284 Patientinnen war der Knochenmarkstatus positiv (25,7%).

Ein negativer Knochenmarkstatus, das heißt kein Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde bei 74,3% (211/284) der Patientinnen bestätigt.

4.1.3. Therapiebezogene Parameter des Gesamtkollektivs (n=284)

Tabelle 7: Verteilung der therapiebezogenen Daten des Gesamtkollektivs (pN0, n=284)

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
Operative Therapie	brusterhaltende Operation (Tumorektomie/Quadrantenresektion)	115	40,5
	nicht brusterhaltende Operation (Mastektomie)	167	58,8
	keine Angaben	2	0,7
Radiatio	adjuvante Radiatio	112	39,4
	keine Radiatio	169	59,5
	keine Angaben	3	1
Systemische Therapie	adjuvante Hormontherapie	46	16,2
	adjuvante Chemotherapie	29	10,2
	keine systemische Therapie	206	72,5
	keine Angaben	3	1

Die operative Therapie

In 115 Fällen (40,5%) von insgesamt 284 Patientinnen konnte die Operation brusterhaltend durch Tumorektomie oder mittels Quadrantenresektion, durchgeführt werden.

Eine vollständige Entfernung der Brustdrüse (Mastektomie) und somit eine nicht brusterhaltende Operation war bei 58,8% der Patientinnen (167/284) indiziert.

Im Jahre 1990 war bei 32,7% (16/49) der Patientinnen eine Tumorgöße > 2cm (\geq pT2) festgestellt worden. Von diesen wurden 69,4% (34/49) mastektomiert. Im Jahre 1999 wurde nur noch bei 13,3% (2/15) der Patientinnen mit gleicher Tumorgöße die Mastektomie durchgeführt, da sich die Kriterien zur Indikationsstellung diesbezüglich grundsätzlich verändert haben [13].

Mammakarzinom-Patientinnen, welche eine neoadjuvante Therapie durchlaufen haben, sind in dem vorliegenden Kollektiv nicht vertreten.

Die Strahlentherapie (Radiatio)

Nach einer brusterhaltenden Operation wurde routinemäßig eine Strahlentherapie empfohlen, die bei 97,4% (112/115) der brusterhaltend operierten Frauen auch durchgeführt wurde. Drei Patientinnen lehnten eine adjuvante Strahlentherapie ab. Mastektomierten Patientinnen wurde nur bei Tumorinfiltration der Thoraxwand eine Bestrahlung nahegelegt. Somit erhielt die Mehrzahl, nämlich 59,6% (169/284), keine Bestrahlung. Die hohe Zahl an mastektomierten Patientinnen ist im zeitlichen Zusammenhang des Erhebungszeitraumes zu sehen.

Zu drei Patientinnen kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da hierzu entsprechende Angaben fehlen, dieser Datenausfall entspricht 1,0%.

Die adjuvante Therapie

Bei 46/284 (16,2%) Patientinnen war bei positivem Hormonrezeptorstatus eine adjuvante Hormontherapie indiziert.

Zum Einsatz kam Tamoxifen einzeln oder in Kombination mit GnRH-Analoga oder Aromatasehemmern.

Eine adjuvante Chemotherapie erhielten 10,2% (29/284) der Patientinnen. Dabei wurde nach den damals gültigen Empfehlungen für die adjuvante Therapie nodal-negativer Patientinnen vorgegangen. Das hatte zur Folge, dass Patientinnen der frühen Rekrutierungsjahre deutlich seltener eine adjuvante Therapie erhielten, als die Patientinnen welche in den letzten Jahren in das Patientenkollektiv eingingen.

Das CMF-Schema (6x 500/40/600 mg/m² Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorurazil q4w, d1 und 8) wurde bei der überwiegenden Mehrzahl des Kollektivs angewandt. Danach war das EC Schema (4x 90/600 mg/m² Epirubicin, Cyclophosphamid q3w) das am häufigsten eingesetzte Schema. Besonders prämenopausale Hochrisiko-Patientinnen erhielten sowohl eine Chemo- als auch eine endokrine Therapie [14, 25].

In dieser Analyse hatten sich 72,5% (206/284) der Patientinnen keiner adjuvanten systemischen Therapie unterzogen.

4.1.4. Fakultativ erhobene Parameter des Gesamtkollektivs

Tabelle 8: Verteilung der fakultativ erhobenen Daten des Gesamtkollektivs (pN0, n=284)

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
hormonelle Antikonzeption n=223	hormonelle Antikonzeption	108	48,4
	keine hormonelle Antikonzeption	115	51,6
	keine Angaben	61	21,5
Diabetes mellitus n=266	Diabetes mellitus mit Diättherapie	1	0,4
	Diabetes mellitus mit medikamentöser Therapie	18	6,8
	Diabetes mellitus mit Insulintherapie	3	1,1
	Diabetes mellitus ohne weitere Angaben	1	0,4
	Diabetes mellitus nicht bekannt	243	91,4
	keine Angaben	18	6,3
Erstsymptom der Tumorerkrankung n=187	Knoten selbst getastet	96	51,3
	Tastbefund bei Routineuntersuchung	17	9
	Entdeckung bei Mammographie	41	22
	Sekretion der Mamille	5	2,7
	andere Symptomatik	28	15
	keine Angaben	97	34,1
Wiederaufbauplastik (WAP) n=266	WAP mittels Expander	36	13,5
	WAP mittels Turn-over-Flap	5	1,9
	WAP mittels TRAM	4	1,5
	WAP mittels VRAM	1	0,4
	WAP mittels Latissimus dorsi-Schwenklappen	17	6,4
	WAP mittels anderer Methoden	3	1,1
	keine WAP	87	32,7
	brusterhaltende Therapie	113	42,5
	keine Angaben	18	6,3

4.1.5 Follow-Up-Daten der Patientinnen

Die nachfolgende Tabelle 9 beschreibt die Nachsorgedaten im Gesamtkollektiv von 284 langzeitnachbeobachteten Mammakarzinom-Patientinnen (pN0). Insgesamt wurde eine Tumorprogredienz bei 70 Patientinnen (24,6%) nachgewiesen und Zweitmalignome bei 30 Patientinnen.

Tabelle 9: Nachsorge-Ergebnisse (n= 284; mediane Nachbeobachtungszeit 10,9 Jahre)

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
Ergebnis Nachsorge	lebt tumorfrei	164	57,7
	lebt mit Lokalrezidiv	1	0,3
	lebt mit Fernmetastase	4	1,4
	lebt mit Lokalrezidiv und Fernmetastase	0	0
	OP Rezidiv/Fernmetastase jetzt tumorfrei	28	9,8
	lebt mit kontralateralem Karzinom	1	0,3
	lebt mit Zweitkarzinom	2	0,7
	OP 2. Karzinom, jetzt tumorfrei	17	6
	Tod unbekannte Ursache	3	1
	Tod durch Tumor ohne nähere Angabe	1	0,3
	Tod durch Lokalrezidiv	3	1
	Tod durch Fernmetastasierung	34	12
	Tod durch Fernmetastasierung und Lokalrezidiv	1	0,3
	Tod mit anderer Ursache	17	6
	keine Angaben	5	1,8
	lediglich „lebt“, ohne nähere Angaben	3	1
	Progredienz der Erkrankung	Tumorprogredienz	70
Lokoregionäres Rezidiv		29	10,2
Fernmetastasierung		41	14,4

Parameter	Unterteilung der Parameter	Patientenanzahl	%
Zweitmalignome	kontralaterales Mammakarzinom	19	6,7
	gynäkologisches Karzinom	5	1,8
	kolorektales Karzinom	1	0,3
	andere Malignome	5	1,8

Legende: Unter Tumorprogression wird das Auftreten von lokoregionären Rezidiven (Lokalrezidiven und regionärem Tumorgeschehen) und Metastasen verstanden. Mit „Tod durch Tumor“ ist der Tod als Folge der Mammakarzinomerkrankung durch Metastasierung und/oder ein lokoregionäres Rezidiv gemeint.

Ergebnis Nachsorge

Zum Zeitpunkt der Nachsorgeerhebung lebten 224 von 284 Patientinnen (78,9%), entsprechend waren 59/284 nämlich 20,8% der Patientinnen zu dieser Zeit bereits verstorben. Bei fünf Patientinnen war keine Nachsorgeerhebung möglich, diese gingen unter „keine Angaben“ in die Analyse ein.

Von den 224 lebenden Patientinnen des Kollektivs waren 57,7% (164/284) tumorfrei.

Bei anderen war entweder eine Tumorprogression unterschiedlichen Ausmaßes gegeben, oder Daten über den Gesundheitszustand waren nicht in Erfahrung zu bringen.

Als Lokalrezidiv wird das erneute Auftreten der Tumorerkrankung nach brusterhaltendem Vorgehen im Bereich der Mamma oder nach Mastektomie im Bereich der Thoraxwand bzw. der verbliebenen Narben verstanden.

Ein regionäres Rezidiv bezeichnet einen erneuten Tumorbefall ipsilateraler, axillärer, infra- oder supraklavikulärer Lymphknoten nach Primärbehandlung.

Sind Lymphknoten-Metastasen im zervikalen Bereich oder darüber hinaus in anderen Teilen des Organismus nachzuweisen, gelten diese als Fernmetastasen (pM1).

Eine Tumorprogression hatte bei 24,6% (70/284) der Patientinnen stattgefunden. Von diesen entfielen 41,4% (29/70) bzw. bezogen auf das Gesamtkollektiv 10,2% (29/284) auf ein nachgewiesenes lokoregionäres Rezidiv. Von diesen 29 Patientinnen waren drei (10,3%) zum Zeitpunkt der Datenerhebung bereits verstorben.

In 58,6%, nämlich bei 41/70 Patientinnen (bzw. 14,4%, 41/284 bezogen auf das Gesamtkollektiv), der Fälle lag eine Fernmetastasierung vor. 35/41 von einer Fernmetastasierung betroffene Patientinnen waren zum Nachsorgezeitpunkt bereits verstorben.

Bevorzugte Organe der hämatogenen Metastasierung beim Mammakarzinom sind mit absteigender Häufigkeit das Skelettsystem (im Speziellen die Wirbelsäule und das Becken), des weiteren Pleura, Lunge, Leber und Gehirn [41].

Diese Angaben aus der Literatur bestätigten sich auch in dieser Analyse.

Der Nachweis von Fernmetastasen war bei 43,9% (18/41) ossärer Natur. Von diesen 18 Patientinnen waren 83,3% bereits verstorben.

Nachfolgend waren Fernmetastasen in Lunge (5/41) und Leber (5/41) gleich häufig anzutreffen. Zum Zeitpunkt der Nachsorge waren davon zwei der betroffenen Patientinnen noch am Leben und sieben Patientinnen bereits verstorben. Bei einer der beiden Lebenden wurde die Lungenmetastase im Gesunden reseziert und die Patientin war zum Nachsorgezeitpunkt weiterhin tumorfrei. Bei einer Patientin wurden Fernmetastasen sowohl in der Leber wie auch in der Lunge nachgewiesen.

Bei einer weiteren lebenden Patientin mit nachgewiesener Fernmetastasierung im Gehirn lag zusätzlich noch ein Lokalrezidiv vor.

Die exakte Lokalisation der Fernmetastasierung war bei zwei bereits verstorbenen Patientinnen nicht mehr zu ermitteln.

Insgesamt sind von 70 Patientinnen, bei welchen nachgewiesenermaßen eine Tumorprogression stattgefunden hatte, 32 (45,7%) Patientinnen am Leben und 38 Patientinnen, also 54,3% bereits verstorben.

Eine Patientin starb an den Folgen ihrer Tumorerkrankung ohne weitere Klassifizierung.

Somit sind 39 von 284 (13,7%) Patientinnen tumorabhängig und 17/284 (6,0%) Patientinnen tumorunabhängig verstorben.

Zweitmalignome wurden in kontralaterales Mammakarzinom, gynäkologische, kolorektale und andere Malignome unterteilt, wovon 30 Patientinnen des Kollektivs betroffen waren.

Patientinnen mit welchen ein telefonischer Kontakt möglich war, die jedoch zu keinerlei Gespräch bereit waren, gingen in die Analyse mit „lebt“ ein ohne weitere Informationen. Dies war bei 3/284 Patientinnen (1,05%) der Fall.

4.2. Wie häufig konnten disseminierte epitheliale, CK18-positive Tumorzellen bei Mammakarzinom-Patientinnen im Knochenmark nachgewiesen werden?

Das in dieser Arbeit betrachtete Langzeitkollektiv umfasst 284 Mammakarzinom-Patientinnen. Bei diesen wurde zum Zeitpunkt ihrer operativen Primärtherapie der Knochenmarkstatus erhoben. In 74,3% der Präparate (211/284) konnten keine epithelialen, disseminierten CK18-positiven Zellen nachgewiesen werden, bei den übrigen 25,7% (73/284) war der Knochenmarksstatus positiv.

Bei den positiven Patientinnen basierte der Befund von 37% (27/73) auf einer einzelnen nachweisbaren CK18-positiven Zelle. Bei den restlichen 63% (46/73) positiven Patientinnen bewegte sich der Nachweis der besagten Zellen zwischen 2 und maximal 400 Zellen pro 1×10^6 untersuchten Zellen.

4.2.1 Sind disseminierte epitheliale CK18-positive Tumorzellen auch im Knochenmark von Patienten ohne maligne epitheliale Tumorerkrankung nachweisbar ?

Die hier aufgeführten Patienten stellen das Kontrollkollektiv dar und unterzogen sich aufgrund verschiedenster Indikationsstellungen (Patienten mit Leberparenchymsruptur, Karzinoid, Mastitis und jeweils zwei Patienten mit Tuberkulose und mit kolorektalem Karzinom) unterschiedlichsten Operationen, im Zuge derer der Knochenmarkstatus durch eine intraoperativ durchgeführte Knochenmarkpunktion erstellt werden konnte.

Die Spezifität des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark liegt damit in dieser Untersuchung bei 96,2% (5/133; 3,8%).

4.2.2 Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter mit dem Knochenmarkstatus

Die folgende Tabelle korreliert den Knochenmarkstatus mit den erhobenen Parametern/Nachsorgedaten des Gesamtkollektivs, zum Zeitpunkt der operativen Primärtherapie. Für die p-Wert Berechnung wurde der Chi-Quadrat-Test herangezogen.

Tabelle 10: Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und klinisch-pathologischen Parametern im Gesamtkollektiv

Parameter	Anzahl der Patienten	Knochenmarkstatus				p-Wert
		Positiv		Negativ		
		n	%	n	%	
Alter						
< 35 Jahre	12	3	25	9	75	
≥ 35 Jahre	272	70	25,7	202	74,2	
gesamt	284	73		211		0,95
< 54 Jahre	134	35	26,1	99	73,8	
≥ 54 Jahre	150	38	25,3	112	74,6	
gesamt	284	73		211		0,87
Menopausestatus						
Prämenopause	106	24	22,6	82	77,3	
Perimenopause	15	4	26,6	11	73,3	
Postmenopause	163	45	27,6	118	72,3	
gesamt	284	73		211		0,65
Tumorgroße						
pTis-pT1c	198	53	26,7	145	73,2	
pT2-pT4	86	20	23,2	66	76,7	
gesamt	284	73		211		0,53

Parameter	Anzahl der Patienten	Knochenmarkstatus				p-Wert
		Positiv		Negativ		
		n	%	n	%	
Grading						
G1 + G2	192	49	25,5	143	74,4	
G3	73	19	26	54	73,9	
gesamt	265	68		197		0,93
Rezeptorstatus						
positiv	209	55	26,3	154	73,6	
negativ	42	11	26,1	31	73,8	
gesamt	251	66		185		1
Östrogenrezeptorstatus						
positiv	187	49	26,2	138	73,7	
negativ	58	14	24,1	44	75,8	
gesamt	245	63		182		0,75
Progesteronstatus						
positiv	178	44	24,7	134	75,2	
negativ	67	19	28,3	48	71,6	
gesamt	245	63		182		0,56

Parameter	Anzahl der Patienten	Knochenmarkstatus				p-Wert
		Positiv		Negativ		
		n	%	n	%	
Tumormarker						
negativ	215	57	26,5	158	73,4	
≥ 1TM positiv	36	9	25	27	75	
gesamt	251	66		185		0,84
CA 15-3						
≥ 28,0 U/ml	176	49	27,8	127	72,1	
< 28,0 U/ml	50	15	30	35	70	
gesamt	226	64		162		0,76
uPA						
≥ 3,0 ng/ml	23	4	17,3	19	82,6	
< 3,0 ng/ml	39	9	23	30	76,9	
gesamt	62	13		49		0,59
PAI 1						
≥ 14,0 ng/ml	54	13	24	41	75,9	
< 14,0 ng/ml	8	0	0	8	100	
gesamt	62	13		49		0,11

Parameter	Anzahl der Patienten	Knochenmarkstatus				p-Wert
		Positiv		Negativ		
		n	%	n	%	
Follow-up						
lebt, tumorfrei	164	41	25	123	75	
lebt, Progression	51	13	25,5	38	74,5	
gesamt	215	54		161		0,94
lebt, tumorfrei	164	41	25	123	75	
Tod durch Tumor	39	11	28,2	28	71,8	
gesamt	204	52		151		0,68
lebt, tumorfrei	164	41	25	123	75	
Progression	90	24	26,6	66	73,3	
gesamt	254	65		189		0,77

Legende: Wie schon unter 4.1 dargelegt, konnten nicht alle untersuchten Parameter auch bei allen Patientinnen tatsächlich erhoben werden. Die Patientinnen, bei welchen die einzelnen Parameter erfasst werden konnten, sind entsprechend aufgeführt. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die jeweils in der gleichen Zeile angegebene Patientenzahl, 100% entsprechen der Zahl die jeweils unter „gesamt“ aufgeführt ist.

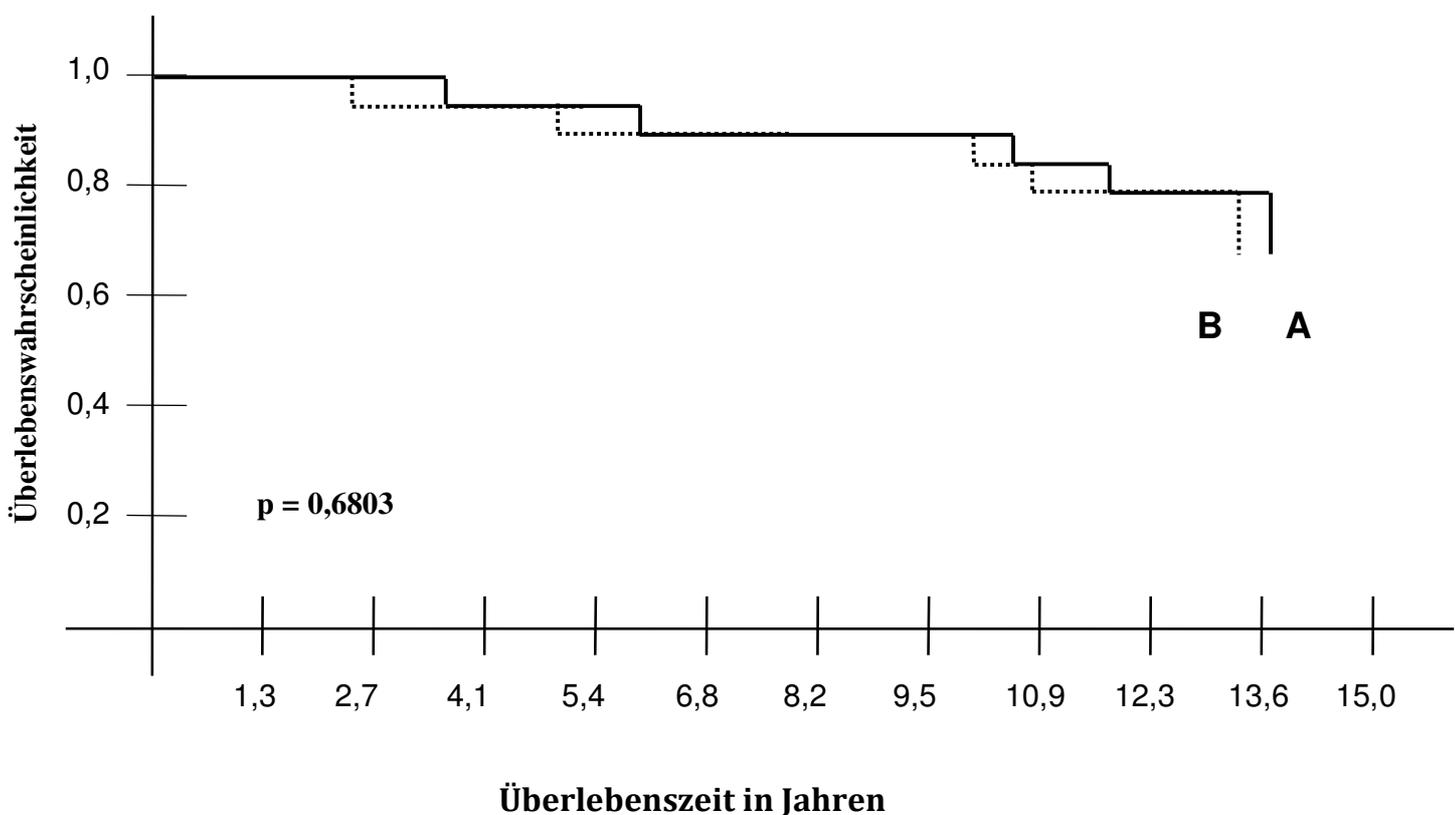
Weder bei den patientenbezogenen, noch bei den tumorbezogenen Parametern zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Knochenmarkstatus.

4.3 Univariate Analyse im Kaplan-Meier-Verfahren

4.3.1 Das Gesamtkollektiv im Langzeitverlauf

Die x-Achse stellt das Überleben in Abhängigkeit von der Zeit dar, die y-Achse macht Angaben zum kumulativen Überleben in Prozent. Bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10,9 Jahren zeigte der Knochenmarkstatus im Langzeitkollektiv in der univariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Abbildung 1: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus des Gesamtkollektivs im Langzeitverlauf



Legende: A: Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus (n=211)
B: Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus (n=73)

Der p-Wert (0,6803) bezieht sich auf den Vergleich im Kaplan-Meier-Schätzverfahren bzw. im log-rank Test

Anhand der graphischen Darstellung ist ersichtlich, dass beide Kurven gleichsinnig verlaufen und sich somit auch nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10,9 Jahren kein signifikanter Unterschied ($p=0,6803$) des Knochenmarkstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben von nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen ergibt.

4.3.2 Subgruppenanalyse der Mammakarzinom-Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus mit/ohne Systemtherapie im Langzeitverlauf (Frage 4)

Mit dem Fisher's exact test wird die Unabhängigkeit zweier Merkmale einer kleinen Stichprobe nachgewiesen. In diesem Falle wird die Stichprobe gebildet von den Mammakarzinom-Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus (n=73). Untersucht wird die Unabhängigkeit der Patientinnenanzahl mit und ohne Therapie bzw. die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen beiden Merkmalen.

Tabelle 11: Gesamtüberleben mit/ohne Systemtherapie

	Bereits verstorben	am Leben	
Ohne Therapie	6	38	44
Mit Therapie	5	24	29
	11	62	73

Der Unterschied zwischen Mammakarzinom-Patientinnen mit und ohne Therapie ist bei einem sich daraus ergebenden p-Wert von 0,7442 als statistisch nicht signifikant zu werten. Jedoch ergab sich aus der 10-Jahres-Überlebensrate (10-JÜR) des Gesamtkollektivs für den positiven Knochenmarkstatus (74%) gegenüber dem negativen Knochenmarkstatus (79%) ein tendenziell reduziertes Gesamtüberleben.

5. Diskussion

Das Mammakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau und steht daher im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.

Statistisch gesehen erkrankt jede elfte Frau in Deutschland an einem Mammakarzinom. Brustkrebs ist für mehr als ein Viertel aller weiblichen Krebserkrankungen und für 18,0% aller Krebstodesfälle bei Frauen in Deutschland verantwortlich. Dies bedeutet, dass auch in diesem Jahr wieder ca. 17 500 Frauen an dieser Tumorerkrankung versterben werden [21].

Trotz des erheblichen Fortschritts in der systemischen Therapie tritt eine Tumorprogression gerade beim Mammakarzinom oft erst nach langjähriger Latenzzeit auf. Innerhalb der ersten 10 Jahre kommt es bei ca. 25–30% der Mammakarzinom-Patientinnen nach primärer Therapie zu einer Progredienz ihrer Tumorerkrankung.

Zur adäquaten prognostischen Einschätzung des individuellen Risikos einer Mammakarzinom-Patientin ist es somit von enormer Bedeutung zusätzlich zu den bereits etablierten Prognoseparametern weitere aussagekräftige Prognosefaktoren zu finden, die eine Einteilung in Hoch- und Niedrigrisikogruppe erlauben.

Im Rahmen der St. Gallen-Konsensus-Konferenz 2005 wurde eine Klassifikation dreier Risikogruppen in niedriges, mittleres und hohes Rezidivrisiko vorgenommen. Demnach werden nodal-negative Mammakarzinom-Patientinnen den Gruppen: niedriges und mittleres Rezidivrisiko zugeordnet. Kriterien für die jeweilige Klassifikation beziehen die bereits bekannten Faktoren wie Nodalstatus, Tumorgröße, Grading, Invasivität, aber auch Hormonsensibilität und HER-2/neu Expression mit ein [22].

Als mögliche Ursache für die schlechte Prognose des Mammakarzinoms wird die frühzeitige, häufig klinisch inapparente okkulte Disseminierung kleinerer Tumorzellverbände oder einzelner Tumorzellen diskutiert [6, 26].

Eine vom Primärtumor ausgehende Disseminierung von Tumorzellen findet oftmals bereits im Frühstadium der Tumorgenese statt [8, 11, 29].

Die Tumorzellen disseminieren in sekundäre Organe um nach unbestimmter Zeit über noch nicht aufgeklärte Aktivierungsmechanismen zu proliferieren bzw. klinisch manifest zu werden [8, 36]. Die manifeste Fernmetastasierung stellt die Hauptursache für ein tumorbedingtes Versterben dar. In Bezug auf den Nachweis von disseminierten Tumorzellen stehen sich derzeit zwei Ansätze gegenüber. Zum einen die Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut und zum anderen der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark [38, 43].

Das Knochenmark ist ein geeigneter Nachweisort für Tumorzellen epithelialen Ursprungs da dort unter physiologischen Umständen unter den Zellen der Hämatopoese keine epithelialen Zellen zu finden sind.

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wird in der aktuellen pTNM-

Klassifikation (6. Auflage, UICC 2002) nicht als Metastasierung gewertet und separat klassifiziert. Unterschieden wird zwischen isolierten Tumorzellen und Mikrometastasen. Hierbei gilt der Nachweis isolierter Tumorzellen (einzeln, oder kleine Zellansammlung von $\leq 0,2\text{mm}$) als metastatisch inaktiv, da keine Proliferation oder Stromareaktion nachweisbar ist und führt z.B. bezogen auf den Lymphknotenstatus zu einer pN0 Zuordnung. Hingegen gelten Karzinomzellen jenseits der Basalmembran in das angrenzende Gewebe von einer Größe zwischen 0,2 mm und 2 mm als Mikrometastase [35, 45].

Terminologisch wird in der Literatur von Mikrometastasierung ($\leq 0,2\text{cm}$, Extravasation), Minimal Residuale Tumorerkrankung (MRD, postoperativer Knochenmarkstatus bei noch vorhandenen disseminierten Tumorzellen) oder Dissemination von isolierten Tumorzellen gesprochen.

Der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark (Knochenmarkstatus) als Indikator für die Entwicklung von Metastasen wird in der Literatur mehrfach beschrieben [12, 28, 33].

Der Knochenmarkstatus erwies sich bereits in einigen früheren Studien als stärkerer Prognosefaktor als der Nodal- und Östrogenrezeptorstatus und war in einer multivariaten Analyse ein unabhängiger prognostischer Parameter für ein reduziertes Gesamtüberleben [7, 9, 30, 48].

Gemäß den AGO-Richtlinien (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.) gilt der positive Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger prognostischer Faktor (LOE I, Oxford Levels of evidence) [1, 39].

Im Rahmen einer Tagung der senologischen Gesellschaften (Deutschland, Österreich, Schweiz) wurde 2006 eine Standardisierung der Methode erarbeitet. Eine Zusammenfassung wurde von Fehm et al 2006 verfasst [17].

Im Detail werden die einzelnen Schritte über Knochenmarksgewinnung, Zellisolation, Färbung und Auswertung im Hinblick auf eine einheitliche Methodik dargestellt.

Die Knochenmarksentnahme („*Collection*“, „*Processing*“) sollte demnach einheitlich in Bezug auf Entnahmeort, Aufbewahrungsbehältnisse, Kühlung weiterer Preparation usw. erfolgen. Die Aufarbeitung („*Fixation*“, „*Immunocytochemical staining*“, „*Quality controls*“) sollte ebenfalls nach festgelegten Standards erfolgen, wie auch die Beurteilung („*Classification*“, „*Interpretation*“) der Befunde, hierbei ist entscheidend wann ein Knochenmarkstatus als positiv oder negativ gewertet wird [17].

Der Verdienst der Arbeit von Fehm et al ist die Definition methodischer Standards, weil erst durch deren Einhaltung die Vergleichbarkeit von Daten und Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen bezüglich des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark möglich wird.

Der Knochenmarkstatus wird aktuell in Bezug auf die Zuordnung zu einer Rezidivrisikogruppe gemäß den Kriterien der St. Gallen-Konsensus-Konferenz 2005/2007 aufgrund der mangelnden Sensitivität der Methode bisher nicht berücksichtigt [22, 23].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die prognostische Relevanz disseminierter CK-18 positiver Tumorzellen im Knochenmark nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen (n=284)

im Langzeit Follow-up (mediane Nachbeobachtungszeit 10,9 Jahre) hinsichtlich Tumorprogression und Gesamtüberleben untersucht. Hierbei wurde eine Korrelation mit ausgewählten Patientinnen-, Tumor- und Therapiebezogenen Parametern überprüft.

Dieser Arbeit liegen Daten einer Follow-up-Analyse eines Subkollektivs von 97 nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 7,6 Jahren zugrunde. Hierbei hatte sich der Knochenmarkstatus in der multivariaten Analyse als Faktor mit unabhängigem Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,048$) gezeigt [14].

Obwohl zum Zeitpunkt der Rekrutierung im Jahre 1990 keine Standards definiert waren, entspricht das Vorgehen weitgehend den später beschriebenen Protokollen. Lediglich bei der Knochenmarkgewinnung wurde die Spannbreite der Menge an gewonnenem Material, nämlich 2–10ml im Gegensatz zu Fehm et al von 5–10ml minimal abweichend gesetzt. Demnach wurden auch Patientinnen mit einer Knochenmarkentnahme von lediglich 2–4ml in die Analyse einbezogen. Die Abnahmemenge wurde so gering wie möglich gehalten, um das Risiko einer möglichen Verunreinigung mit peripherem Blut zu minimieren; es ist davon auszugehen, dass das Risiko einer Verunreinigung der Aspirate mit der Abnahmemenge steigt.

Hinsichtlich Entnahmeort, -art, Zellzahl und anschließender Aufarbeitung, sowie der Verwendung der immunozytochemischen APAAP-Färbung und Einsatz eines Anti-Cytokeratin-Antikörpers zur Detektion der Tumorzellen entspricht das methodische Vorgehen dieser Analyse den Vorgaben zur Standardisierung von Fehm et al von 2006 [14, 17].

Auch wurden in Übereinstimmung mit den Kriterien in Fehm et al Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern vorgenommen. Zusätzlich konnte anhand eines Kontrollkollektivs von Patienten mit gutartigen Erkrankungen das immunozytochemische Färbeverfahren validiert werden [14].

Das aktuell untersuchte Gesamtkollektiv umfasste 284 nodal-negative Mammakarzinom-Patientinnen, die im Zeitraum von 1990–1993 ihre operative Primärtherapie erhielten.

Die Nachsorgedaten des Kollektivs wurden telefonisch mittels standardisiertem Fragenkatalog oder postalisch zugestelltem Fragebogen erhoben.

Die Daten und die aus der statistischen Berechnung erzielten Ergebnisse hatten die Beantwortung der eingangs gestellten Fragen zum Ziel.

Frage 1: Hat der Knochenmarkstatus bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen im Langzeitverlauf einen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit?

Frage 2: Gibt es eine Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und Rezidivhäufigkeit nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen in der Langzeitbeobachtung?

Frage 3: Besteht bei nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen eine Korrelation zwischen Knochenmarkstatus und anderen ausgewählten Parametern?

Frage 4: Wie verhält sich das Gesamtüberleben nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen unter Berücksichtigung des Knochenmarkstatus mit und ohne Therapie im Langzeitverlauf?

In der untersuchten Gruppe der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen hatten 25,7% (73/284) einen positiven Knochenmarkstatus.

Bei einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 10,9 Jahren ergab die statistische

Auswertung keine Korrelation des Knochenmarkstatus mit den ausgewählten Parametern. Es ergab sich zudem keine prognostische Relevanz bezüglich des Auftretens einer Tumorprogression ($p=0,77$) oder des Gesamtüberlebens ($p=0,68$, Log-Rank-Test). Ein positiver Knochenmarkstatus bei Patientinnen mit/ohne Therapie ergab keine statistisch signifikante Korrelation ($p=0,74$, Fisher's Exact Test).

Entsprechend dieser Ergebnisse konnte der Knochenmarkstatus als unabhängiger prognostischer Faktor in der Subgruppe der nodal-negativen Patientinnen nicht als statistisch signifikant bestätigt werden.

Die 10 Jahres-Überlebens-Rate (10-JÜR) des Gesamtkollektivs im Langzeit-Follow-up der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen betrug 79%.

Bei Patientinnen mit einem nachgewiesenen positiven Knochenmarkstatus ergab sich eine 10-JÜR von 74% (54/73).

Demgegenüber ergab sich für den negativen Knochenmarkstatus eine 10-JÜR von 79,1% (167/211). Nodal-negative Patientinnen mit einem initial positiven Knochenmarkstatus haben demnach ein tendenziell reduziertes Gesamtüberleben als Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im Knochenmark (74% versus 79,1%). Dieser Unterschied von 5,1% in der 10-JÜR ist jedoch nicht statistisch signifikant.

Im Vergleich zu diesen Daten ergab die Metaanalyse von Braun et al (2005) für den Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose eine schlechtere Prognose. Allerdings ist ein direkter Vergleich nicht möglich, da sich diese Daten auf Mammakarzinom-Patientinnen mit den Tumorstadien UICC-I/II/III/IV beziehen [10].

Tabelle 12: Literaturübersicht zur prognostischen Relevanz des Knochenmarkstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben (OAS=overall survival) und das rezidivfreie Überleben (DFS=disease free survival) bei Mammakarzinom-Patientinnen aller Tumorstadien.

Autor	n	Tumorstadium gemäß UICC	Mediane Nachbeobachtungszeit in Jahren	Prognostische Relevanz, OAS=overall survival DFS=disease free survival
Diel et al, 1996	721	I-IV	6,0	Ja, DFS/OAS
Mansi et al, 1999	318	I-IV	12,5	Nein
Braun et al, 2000	1348	I-III	4,4	Ja, OAS
Gebauer et al, 2001	410	I-IV	10,0	Nein
Gerber et al, 2001	507	I-IIB (nur T1-2)	3,4	Ja, DFS/OAS
Wiedswang et al, 2003	857	I-IV	4,5	Ja, OAS
Pierga et al, 2004	270	I-IV	2,9	Ja, DFS
Bidard et al, 2008	621	I-III	4,6	Ja, DFS/OAS

Eine gesonderte Darstellung der Ergebnisse bezogen auf Kollektive der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen ist lediglich bei Braun et al (2000) und Bidard et al (2008) zu finden. Hierbei ergab sich für den Knochenmarkstatus bei Braun et al (2000) eine prognostische Relevanz bezüglich DFS und OAS.

In der Analyse von Bidard et al (2008) zeigte sich bei etwa gleicher medianer Nachbeobachtungszeit wiederum keine prognostische Relevanz des Knochenmarkstatus bezogen auf DFS und OAS [3, 8].

Die Veröffentlichung der Studie von Wiedswang et al 2005 fand nach der Herausgabe der Metaanalyse von Braun et al 2005 statt, daher ist dieser mit einer früheren (2003) veröffentlichten Studie in die Metaanalyse miteinbezogen worden. Die gesonderte Subkollektivanalyse der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen wurde erst in der Studie von 2005 herausgearbeitet und ergab bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 3,3 Jahren eine prognostische Relevanz bezüglich DFS und OAS [48, 49].

Die Analyse von Ditsch N 2003 ist mit dem Langzeitkollektiv nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen aufgelistet. Hierbei ergab sich für den Knochenmarkstatus bei einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 7,6 Jahren eine prognostische Relevanz bezüglich des OAS [14].

Die nachfolgende Tabelle stellt die aktuelle Datenlage der Subgruppe der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen dar. Der Literaturumfang diesbezüglich fällt im Vergleich deutlich geringer aus.

Tabelle 13: Aktuelle Literaturübersicht zur prognostischen Relevanz des Knochenmarkstatus in der Subgruppe der nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen

Autor	n	Tumorstadium gemäß UICC	Mediane Nachbeobachtungszeit in Jahren	Prognostische Relevanz, OAS=overall survival DFS=disease free survival
Braun et al, 2000	1036	N0	5,0	Ja, DFS, OAS
Ditsch N, 2003	97	N0	7,6	Ja, OAS
Wiedswang et al, 2005	245	N0	3,3	Ja, DFS, OAS
Bidard et al, 2008	295	N0	4,6	Nein
Graunke F, 2009*	284	N0	10,9	Nein

* Dieses Kollektiv beinhaltet Teile des ebenfalls aufgeführten Langzeitkollektivs von Ditsch N 2003

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Studien (Tabelle 13) mit einem medianen Nachbeobachtungszeitraum bis zu 10 Jahre überwiegend eine prognostische Relevanz bezüglich des Gesamtüberlebens und/oder des rezidivfreien Überlebens ergaben. Diese Ergebnisse beziehen sich auf einen Zeitraum, in welchem am häufigsten die Progredienzen einer Mammakarzinomerkkrankung zu finden sind.

Bei der Analyse über diesen Nachbeobachtungszeitraum hinaus (> 10 Jahre) konnte keine prognostische Relevanz des Knochenmarkstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben und/oder das rezidivfreie Überleben mehr eruiert werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Mit mehr als 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau. Die bisher bereits etablierten Prognoseparameter wie z.B. Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, Rezeptorstatus, bilden das individuelle Risiko von Mammakarzinom-Patientinnen unzureichend ab, da es nach wie vor in 25% der Fälle nodal-negativer Mammakarzinom-Patientinnen nach adjuvanter Therapie innerhalb der ersten 10 Jahre zu einer Progression ihrer Tumorerkrankung kommt.

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, weitere Prognosefaktoren zu finden, welche diese Hochrisikogruppe hinreichend selektieren.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde untersucht, ob der Nachweis disseminierter CK-18 positiver Tumorzellen im Knochenmark von nodal-negativen Mammakarzinom-Patientinnen mit ausgewählten patientinnen-, tumor- und therapiebezogenen Parametern korreliert. Seine prognostische Relevanz hinsichtlich Tumorprogression und Gesamtüberleben wurden geprüft.

Das Gesamtkollektiv umfasste 284 Patientinnen, die im Zeitraum von 1990 bis 1993 ihre operative Primärtherapie erhielten.

Bei 25,7% der Patientinnen (73/284) lag ein Nachweis dieser Zellen vor (KM-Status positiv). Ein negativer Knochenmarkstatus ergab sich bei 74,3% (211/284) der Patientinnen.

Die Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie hatten tendenziell ein schlechteres Gesamtüberleben, als die Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus. Dieser Unterschied war nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10,9 Jahren jedoch statistisch nicht signifikant.

In Bezug auf die nodal-positiven Mammakarzinom-Patientinnen ist die prognostische Bedeutung des Knochenmarkstatus gesichert und sollte daher in die Routinediagnostik bei Mammakarzinom aufgenommen werden [7].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Knochenmarkanalyse stellt jedoch die Möglichkeit der Effizienzüberprüfung der adjuvanten Therapie dar. Als sogenannter Surrogatmarker kann der Knochenmarkstatus als probates Instrument zum Zwecke des Therapiemonitoring eingesetzt werden [42].

7. Anhang

TNM-Klassifikation [35, 45]

pT-Primärtumor

pTX	: Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	: kein Anhalt für Primärtumor
pTis	: Karzinoma in situ
pTis (DCIS)	: duktales Karzinoma in situ
pTis (LCIS)	: lobuläres Karzinoma in situ
pTis (Paget)	: Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor
pT1	: Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	: Microinvasion von 0,1cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	: mehr als 0,1cm, aber nicht mehr als 0,5cm in größter Ausdehnung
pT1b	: mehr als 0,5cm, aber nicht mehr als 2cm in größter Ausdehnung
pT1c	: mehr als 1cm, aber nicht mehr als 2cm in größter Ausdehnung
pT2	: Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 5cm in größter Ausdehnung
pT3	: Tumor mehr als 5cm in größter Ausdehnung
pT4	: Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pT4a	: mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	: mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	: Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	: entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

pN- Regionäre Lymphknoten

- pNX : regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- pN0 : keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- pN0 (i+) : isolierte Tumorzellen oder kleine Ansammlung von Zellen $\leq 0,2\text{mm}$ in regionalen Lymphknoten
- pN1mi : Mikrometastase ($> 0,2\text{mm}$, aber max. 2mm in größter Ausdehnung)
- pN1 : Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n)
- pN1a : Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, mind. eine $> 2\text{mm}$
- pN1b : Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n)
- pN1c : Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n)
- pN2 : Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
- pN2a : Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest einer größer als 2mm in max. Ausdehnung
- pN2b : Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
- pN3 : 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
- pN3a : Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (mindestens einer $> 2\text{mm}$) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
- pN3b : 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,
- pN3c : Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

pM-Fernmetastasen

pMX	: Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	: keine Fernmetastasen
pM1	: Fernmetastasen

UICC Stadien

UICC ist die Abkürzung für Union Internationale Contra Le Cancer (internationale Union gegen Krebs)

Stadieneinteilung:

Stadium 0	: Tis N0 M0
Stadium I	: T1 N0 M0
Stadium IIA	: T2 N0 M0, T0 N1 M0, T1 N1 M0
Stadium IIB	: T2 N0 M0, T2 N2 M0
Stadium IIIA	: T0 N2 M0, T1 N2 M0, T2 N2 M0, T3 N1-2 M0
Stadium IIIB	: T4 jedes N M0, jedes T N3 M0
Stadium IV	: jedes T jedes N M1

Grading

Das histologische Grading zur Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome aller histologischer Typen erfolgt nach einer Modifikation des von Bloom und Richardson vorgeschlagenen Gradings entsprechend Elston und Ellis [15]. Die histo- und zytologischen Kriterien, die semiquantitativ beurteilt werden, sind Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate. Bei der Quantifizierung der Mitoserate ist die individuelle Gesichtsfeldgröße zu berücksichtigen, um Unschärfen zu vermeiden. Je Einzelkriterium können 1-3 Punkte vergeben werden, der Summenscore ergibt die Einteilung des Gradings.

GX	: Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	: gut differenziert (3-5 Punkte), Malignitätsgrad gering
G2	: mäßig differenziert (bis 7 Punkte), Malignitätsgrad mäßig
G3	: schlecht differenziert (bis 9 Punkte), Malignitätsgrad hoch

**Fragebogen
Mammakarzinom-Nachsorge**

Name der Patientin: _____

Datum des Anrufs: _____

Patientin lebt

- a) Tumorfrei seit:
- b) Rezidiv:
Zeitpunkt:
Lokalisation:
Bisherige Therapie:
- c) Fernmetastasen:
Zeitpunkt:
Lokalisation:

Patientin tot

- Sterbedatum:
- Ursache:
 - Mammakarzinom:
 - Fernmetastasen:
 - Lokalrezidiv
- andere Ursache

Familiäre Disposition

- a) Ja (Art und Lokalisation des Karzinoms):
- b) Wer betroffen? (Verwandschaftsgrad):
- c) Nein:

Zweitkarzinom

- a) Ja, welches:
- b) Nein:
- c) Bisherige Therapie:

Hormontherapie

- a) Präoperativ:
- b) Postoperativ:
- c) Präparat:

Aktuelle Medikamenteneinnahme:

-
-
-

Bemerkungen:

Serienbrief 1

Adresse

Datum

Sehr geehrte Frau X,

vor einigen Jahren sind Sie im Klinikum Großhadern wegen einer Brustkrebserkrankung behandelt worden. Im Rahmen der Brustkrebsnachsorge würden wir jetzt gerne erfahren, wie Ihr Gesundheitszustand ist und ob wir Ihnen bei aktuellen Problemen weiterhelfen können. Daher möchten wir Sie gerne in der Zeit vom bis anrufen und Ihnen einige Fragen zu Ihrem Befinden stellen.

Wir hoffen, dass Sie für dieses Telefonat zur Verfügung stehen.

Ihre Auskünfte helfen uns sehr, auch anderen Patienten mit dieser Erkrankung eine gute Behandlung zukommen zu lassen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. I. Funke
Oberärztin der Klinik

Friederike Graunke

Serienbrief 2

Adresse

Datum

Sehr geehrte Frau X,

sie wurden in unserem Hause vor ein paar Jahren wegen einer Brustkrebserkrankung behandelt. Im Rahmen der Brustkrebsnachsorge würden wir jetzt gerne erfahren wie ihr momentaner gesundheitlicher Zustand ist und ob wir Ihnen bei aktuellen Problemen weiterhelfen können.

Da Sie sich im Ausland befinden senden wir Ihnen anbei dieses Schreibens einen Fragebogen zu, der einige Fragen zu ihrem Befinden enthält.

Wir möchten Sie bitten diesen ausgefüllt und in dem mitgesandten frankierten Rückumschlag an uns zurückzusenden.

Bei Rückfragen stehen wir Ihnen gerne jederzeit zur Verfügung.

Fr. Dr. Funke 089-7095-3439 (nachmittags)
Brustzentrum 089-7095-6262

Mit freundlichen Grüßen

Friederike Graunke

Literaturverzeichnis

- [1] **AGO** (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.) -Leitlinien: Kommission Mamma:
Prognostic and predictive factors (Thomssen/Costa);
www.ago-online.org; S 185, 2008
- [2] **Allgayer H**, Heiss MM, Riesenberger R, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW:
Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK 18: investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol;
J Histochem Cytochem. 45(2): 203-12, 1997
- [3] **Bidard FC**, Vincent-Salomon A, Gomme S, Nos C, de Rycke Y, Thiery JP, Sigal-Zafrani B, Mignot L, Sastre-Garau X, Pierga JY:
Disseminated tumor cells of breast cancer patients; a strong prognostic factor for distant and local relapse;
Clin Cancer Res. 14(11); 3306-11, 2008
- [4] **Bloom HJ**, Richardson WW:
Histological grading and prognosis in breast cancer";
Br J Cancer 11: 359-377, 1957
- [5] **Brando H.**:
Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer,
Breast cancer 2007; 14 (2); 163-173
- [6] **Braun S**, Auer M, Rosenberg R:
Importance of occult metastatic cells in the treatment of patients with breast and gastrointestinal cancers;
Acta Med Austriaca Suppl., 59: 18-26, 2002
- [7] **Braun S**, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich RM, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F:
Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy;
J Clin Oncol 19(5): 1468-1475, 2001
- [8] **Braun S**, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G:
Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I,II or III breast cancer;
N Engl J Med 342(8): 525-533, 2000

-
- [9] **Braun S**, Vogl F, Schlimok G, Diel I, Janni W, Gerber B, Gebauer G, Coombes RC, Pierga J-Y, Naume B, Pantel K:
Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases; 10 years survival
4199 breast cancer patients ;
Breast Cancer Res Treat; 67 (Suppl.): Abstract SABCS, No 7, 2003;
- [10] **Braun S**, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K:
A pooled Analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer;
N Engl J Med 353; 8: 793-802, 2005
- [11] **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., 9 (10): 1749-56, 1991
- [12] **Diel IJ**, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G:
Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value
in comparison with nodal status;
J Nat Cancer Institut, Vol. 88, No. 22, 1652-1658, 1996
- [13] **Ditsch N**, Imhoff K, Kuschel B, Maurer S, Meindl A, Rjosk-Dendorfer D, Rühl I, Schwarz Boeger U:
Hereditäres Mammakarzinom;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome,
Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 92-103, 2007
- [14] **Ditsch N**:
Prognostische Relevanz disseminierter CK18-positiver Zellen im Knochenmark nodal-
negativer Mammakarzinom-Patientinnen und Nachweis des Östrogenrezeptors (ÖR) auf
disseminierten CK18-positiven Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-
Patientinnen; 2003;
- [15] **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 19 (5); 403-410, 1991
- [16] **Engel J**, Beinert T, Delius M, Hölzel D, Schubert-Fritschle G:
Epidemiologie;
In: Manual, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome,
Tumorzentrum München, 11. Auflage: S.1-11, 2007

-
- [17] **Fehm T**, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener W, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E:
A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation;
Cancer 107; 885-92, 2006
- [18] **Funke I**, Anthuber C, Bauerfeind I, De Waal JC, Eiermann W, Engel J, Fügler, Gabka C, Hamann U, Heitland A, Höß C, Kolben M, Löhrs B, Raab G, Weiß E, Wolf C: Operative Therapie des primären Mammakarzinoms und Rekonstruktionsverfahren;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 104-113, 2007
- [19] **Gebauer G**, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W;
Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term-follow up
J Clin Oncol; 19:3669-3674, 2001
- [20] **Gerber B**, Kause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K:
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; 19:960-971, 2001
- [21] **Giersiepen K**, Heitmann C, Janhsen K, Lange C:
Brustkrebs;
Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt, Heft 25,
- [22] **Goldhirsch A**, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members:
Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005;
Ann Oncol; 16 (10); 1569-83, 2005
- [23] **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;
Ann Oncol; 18 (7): 1133-44, 2007
- [24] **Harbeck N**, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M:
Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer;
Thromb Haemost. 91(3): 450-6, 2004

-
- [25] **Heinemann V**, Abenhardt W, Bastert G, Beinert T, Dietzfelbinger H, Eiermann W, Harbeck N, Hölzel D, Kahlert St, Lorenz T, Pihusch R, Rauthe G, Salat C, Sattler D: Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms; In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 251-269, 2007
- [26] **Hossfeld DK**, Izbicki JR, Hosch SB, Pantel K: Minimal residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren: Stand der Forschung und Implikationen für die Therapie; Dtsch Arztebl, 97 (22); A-1526/B-1286/C-1202, 2000
- [27] **Jänicke F**, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M: For the german chemo N0 study group risk-adapted adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer based on tumor biological factors uPA and PAI-1: first interim analysis of a randomized multicenter trail; J Natl Cancer Inst 93; 913–920, 2001
- [28] **Janni W**, Hepp F, Strobl B, Rack B, Rjosko D, Kentenich C, Schindlbeck C, Hantschmann P, Pantel K, Sommer H, Braun S: Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus; Cancer, 97: 405-11, 2003
- [29] **Janni W**, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K: Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen; Deutsches Ärzteblatt 101; 51-52; A 3496-3502; 2004
- [30] **Janni W**, Wiedswang G, Fehm T, Jückstock J, Borgen PI, Rack B, Braun S, Sommer H, solomayer EF, Pantel K, Nesland JM, Friese K, Naume B: The Persistence of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) during Follow-up predicts increased risk for relapse; Cancer, Vol (103) Nr. 5, 2005
- [31] **Look MP**, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtators F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner 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, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in 8377 breast cancer patient; J Natl Cancer Inst, 94 (2); 116–28, 2002

-
- [32] **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, 354 (9174):197-202, 1999
- [33] **Mansi JL**, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HAT, Dearnaley D, Coombes RC:
Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: Prognostic significance after 6 years follow-up;
Eur J Cancer 27 (12); 1552-1555, 1991
- [34] **Moll R**, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R:
The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell;
Cell 31(1); 11-24; 1982
- [35] **Nährig J**, Högel B, Marlow S, Permanetter W:
Pathologie des Mammakarzinoms;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik , Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 49-76, 2007
- [36] **O'Sullivan GC**, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M, Shanahan F:
Micrometastases: marker of metastatic potential of evidence of residual disease ?;
Gut, 40:512-515, 1997
- [37] **Perlet C**, Artmann A, De Waal JC, Hellemann HP, Hölzel D, Imhoff K, Kessler M, Rjosk-Dendorfer D, Sittek H, Strauss A, Strigl R, Wolf C, Wolf M:
Mammographie-Screening, bildgebende und minimal-invasive Diagnostik;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 30-48, 2007
- [38] **Pierga JY**, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelénat H:
Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood an bone marrow of breast cancer patients;
Clinical Cancer Research, Vol. 10, 1392-1400, 2004
- [39] **Rack B**, Eiermann W, Engel J, Euler U, Funke I, Harbeck N:
Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 85-91, 2007
- [40] **Remmele W**, Stegner HE:
Recommendation for uniform definition of an immunoreactiven score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue;
Pathologie 8; 138–140, 1987

-
- [41] **Röper B**, Bauerfeind I, Baumeister RGH, Eiermann W, Engel J, Höß C, Lindner H, Schaffer P, Sommer H:
Behandlung des lokalen und regionären Tumorrezidivs;
In: Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 11. Auflage: S. 230-241, 2007
- [42] **Schlimok G**, Pantel K, Loibner H, Fackler-Schwalbe I, Riethmüller G:
Reduktion of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours;
Eur J Cancer, 31A (11):1799-803, 1995
- [43] **Slade MJ**, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA, Stebbing J, Palmeri 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, 100(1):160-6, 2009
- [44] **Thrivani K**, Deshmane V, Bapsy PP, Krishnamoorthy L, Ramaswamy G:
clinical utility of serum human epidermal receptor-2/neu detection in breast cancer patients;
Indian J Med Res. 125:137-42, 2007
- [45] **UICC: TNM-Classification of malignant tumors;**
Sobin LH and Wittekind CL (Eds.)
6th Edition, Wiley-Liss, Inc, New York, 2002
- [46] **Untch M**, Konecny G, Sittok H, Kessler M, Reiser M, Hepp H:
Systemische Therapie;
In: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms,
State of the Art 2000: 378-388, 2000
- [47] **WHO:**
Histological typing of breast tumors;
2nd ed Geneva
- [48] **Wiedswang G**, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B:
Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer;
J Clin Oncol; 21: 3469-3478, 2003
- [49] **Wiedswang G**, Borgen E, Schirmer C, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B:
Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer;
Int J Cancer: 118, 2013-2019, 2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- *Meinem Ehemann Frank-Rouven ohne dessen Unterstützung und Kraft die Arbeit an dieser Analyse nicht möglich gewesen wäre*
- *Meinem bereits verstorbenen Großvater für seine unermüdliche Geduld und seinen Beistand*
- *Meinen Kindern, Valentin und Isabella, den hinreißenden Störenfrieden*
- *Meinem Vater und Stiefmutter, die mit Rat und Tat zur Seite standen*
- *Meiner Tante, die unermüdlich Korrekturbearbeitungen übernahm*

- *Frau PD Dr. med. I. Funke für die Überlassung des Themas und Betreuung der Arbeit*