

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

**Vergleich der prognostischen Relevanz des  
Nachweises disseminierter Tumorzellen im  
Knochenmark von Mamma- und  
Ovarialkarzinompatientinnen**

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

vorgelegt von  
**August Andreas Trimpl**  
aus  
**München**  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Kindermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Zimmermann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S. Braun

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 07. 2005

# Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| CA-125           | Spezieller Tumormarker; von malignen Zellen produzierte tumorassoziierte Proteine, die bei signifikanter Serumkonzentration auf eine Neoplasie hinweisen |
| CI               | Confidence Intervall   |
| CK               | Zytokeratin (CK8, CK18 und CK19)   |
| CK+              | Zytokeratinpositive Zellen   |
| CK-              | Zytokeratinnegative Zellen   |
| DTZ              | Disseminierte Tumorzellen  |
| Fa.              | Firma  |
| FIGO             | Einteilung maligner Ovarialtumore nach der Federation Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique   |
| G <sub>1-3</sub> | Grading, Einteilung eines Tumors nach der histologischen Differenzierung seiner Zellen   |
| Gy               | Gray, Einheit der Strahlendosis  |
| ISHAGE           | International Society of Hemathotherapy and Graft Engeneering  |
| k.S.             | Keine Signifikanz; Aufgrund fehlender Signifikanz konnte keine Einschätzung des relativen Risikos vorgenommen werden                                     |
| LMU              | Ludwig-Maximilians-Universität in München  |
| M <sub>0-1</sub> | Fehlen (M <sub>0</sub> ) oder Vorhandensein (M <sub>1</sub> ) von Fernmetastasen, TNM-Klassifikation   |
| m <sup>2</sup>   | Quadratmeter   |
| N <sub>0-3</sub> | Fehlen (N <sub>0</sub> ) oder Vorhandensein und Ausdehnung (N <sub>1-3</sub> ) von Lymphknotenmetastasen, TNM-Klassifikation                             |
| PCR              | Polymerase-Chain -Reaction, dt. Polymerase-Ketten-Reaktion   |
| pT, pN, pM       | postoperativ, histopathologisch gesicherte TNM-Klassifikation  |
| R <sub>0-1</sub> | Fehlen (R <sub>0</sub> ) oder Vorhandensein (R <sub>1</sub> ) von intraperitonealem Resttumorgewebe postoperativ, FIGO-Klassifikation                    |
| R.G.             | Referenzgruppe   |
| RR               | relatives Risiko   |
| T <sub>1-4</sub> | Ausdehnung (T <sub>1-4</sub> ) des Primärtumors, TNM-Klassifikation  |
| ZIK              | Zytokeratinnachweis im Knochenmark   |

# Inhaltsverzeichnis

|   |        |
|---|--------|
| <i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i> .....  | - 1 -  |
| <i>INHALTSVERZEICHNIS</i> .....   | - 2 -  |
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | - 3 -  |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....   | - 7 -  |
| 2.1. Die Patientinnen .....   | - 7 -  |
| 2.1.1. Patientinnen mit Ovarialkarzinom .....   | - 8 -  |
| 2.1.2. Patientinnen mit Mammakarzinom.....  | - 10 - |
| 2.2. Die Untersuchungsmethoden.....   | - 12 - |
| 2.2.1. Die Gewinnung und Aufbereitung der Knochenmarksproben .....                          | - 12 - |
| 2.2.2. Die Immunzytochemie.....   | - 13 - |
| 2.2.3. Die statistischen Analysen .....   | - 16 - |
| <b>3. ERGEBNISSE</b> .....  | - 19 - |
| 3.1. Die Patientinnen mit Ovarialkarzinom .....   | - 19 - |
| 3.1.1. Der Nachweis von DTZ im Knochenmark .....  | - 19 - |
| 3.1.2. Die klinischen Merkmale der Patientinnen .....                                       | - 20 - |
| 3.1.3. Die Korrelation des Nachweises von DTZ im Knochenmark mit dem klinischen Verlauf...- | 23 -   |
| 3.1.3.1. Die Untergruppe der optimal operierten Patientinnen .....                          | - 27 - |
| 3.1.3.2. Die Untergruppe der Patientinnen mit belassenem Resttumor .....                    | - 29 - |
| 3.2. Die Patientinnen mit Mammakarzinom .....   | - 31 - |
| 3.2.1. Der Nachweis von DTZ im Knochenmark .....  | - 31 - |
| 3.2.2. Die klinischen Merkmale der Patientinnen.....  | - 32 - |
| 3.2.3. Die Korrelation des Nachweises von DTZ im Knochenmark mit dem klinischen Verlauf...- | 34 -   |
| 3.2.3.1. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Lymphknotenstatus.....-       | 39 -   |
| 3.2.3.2. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Tumorgading .....             | - 42 - |
| 3.2.3.3. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Östrogenrezeptorstatus...-    | 45 -   |
| 3.2.3.4. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach der Größe ihrer Tumore .....      | - 49 - |
| <b>4. DISKUSSION</b> .....  | - 53 - |
| 4.1. Der Zytokeratinnachweis als Indikator für die Streuung des Primärtumors.....           | - 56 - |
| 4.2. Die prognostische Aussagekraft der disseminierten Tumorzellen .....                    | - 58 - |
| 4.3. Die klinisch-therapeutischen Konsequenzen.....   | - 62 - |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | - 66 - |
| <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | - 68 - |
| <i>LEBENS LAUF</i> .....  | -77-   |

# **1. Einleitung**

In Deutschland ist „das Ovarialkarzinom (...) mit 8.000 Neuerkrankungen pro Jahr die sechsthäufigste Malignomerkrankung der Frau, liegt bei den Todesursachen an vierter Stelle und ist somit in Relation zur Anzahl der Erkrankten die häufigste gynäkologische Krebstodesursache“.<sup>52</sup> Diese Aussage verdeutlicht das, bei relativ niedriger Inzidenz, hohe maligne Potenzial des Ovarialkarzinoms, dem auch mit den modernsten Therapieansätzen oft nur unzureichend begegnet werden kann. Von der Häufigkeit kommt dem Mammakarzinom in den westlichen Industrieländern die größte Bedeutung zu. „Von den Malignomen der Frau entfallen ca. 25 % auf das Mammakarzinom bei jährlich 110 Erkrankten pro 100.000 Frauen. Etwa jede zehnte Frau entwickelt im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom“<sup>57</sup>. Die 5-Jahres-Überlebensraten für das therapierte Ovarialkarzinom betragen in etwa 35 %, die für das therapierte Mammakarzinom ca. 75 %. Dieser Unterschied beruht sicher auch auf der Tatsache, dass das Ovarialkarzinom sich längere Zeit symptomlos, unbemerkt intraabdominal entwickeln kann und sich der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon in einem fortgeschrittenerem Stadium befindet.

Die Beurteilung der Progredienz bzw. der Aggressivität des Tumors anhand von klinisch quantifizierbaren Parametern ermöglicht dem behandelnden Arzt die Abschätzung der erforderlichen Radikalität seiner Therapie. Alle heutzutage bei Tumorerkrankungen eingesetzten Behandlungsformen, allen voran Operation, Chemotherapie und Bestrahlungstherapie, sind durch starke Nebenwirkungen gekennzeichnet, die massive Einschränkungen der Lebensqualität der Patientinnen nach sich ziehen. Je genauer die Parameter sind, die der behandelnde Arzt zur Beurteilung der histologischen Struktur des Tumors,

seiner aktuellen Ausbreitung und der, gegebenenfalls bereits erfolgten, systemischen Streuung heranzieht, desto zielgerichteter, erfolgreicher und auch gleichzeitig schonender wird die daraus resultierende Therapie sein. Gerade in der Gynäkologie besteht von Seiten der Patientinnen verstärkt der Wunsch in der Therapieplanung, die chirurgische Intervention und die folgenden adjuvanten Therapien möglichst nebenwirkungsarm zu gestalten. Dieser Trend zur minimalinvasiven Therapie führt zum Beispiel dazu, dass heute schon in einzelnen Kliniken bis zu 80 % aller Mammakarzinome brusterhaltend operiert werden. Ein seit Jahrzehnten angewandtes Mittel zur Prognosebeurteilung und der Objektivierung der Vergleichbarkeit von verschiedenartigen Therapieansätzen ist die TNM-Klassifikation<sup>27</sup> maligner Tumoren. Dieses Schema beurteilt maligne Tumore anhand ihrer Größe, der etwaigen Beteiligung von regionären Lymphknoten und dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von makroskopisch erkennbaren Fernmetastasen und versucht dadurch eine Aussage über den Schweregrad einer Erkrankung zu machen. Gegenwärtig weist man dem Lymphknotenstatus N<sub>0-1</sub> bzw. pN<sub>0-1</sub> die zentrale Bedeutung bei der Beurteilung der systemischen Tumorzellstreuung zu, noch vor dem Auftreten klinisch manifester Fernmetastasen. Es „erleiden jedoch 30 % der nodal-negativen Patientinnen eine letale Fernmetastasierung, andererseits leben bis 40 % der nodal-positiven Patientinnen nach 10 Jahren ohne manifeste Fernmetastasen“.<sup>1</sup> Wie diese Zahlen verdeutlichen, sind die Lymphknoten nur von begrenzter Aussagekraft hinsichtlich später auftretender Fernmetastasen. Diese Überlegungen werfen die Frage auf, ob es nicht möglich ist, auf einem anderen Wege die systemische Streuung des Tumors zu erkennen und somit eine genauere Aussage über den weiteren Krankheitsverlauf, im Speziellen der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von lokalen Rezidiven oder von Fernmetastasen, zu treffen. Da Knochenmark physiologischer Weise keine

Epithelzellen enthält, müsste der Nachweis typischer Bestandteile von Epithelzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit epithelialen Tumoren auf eine unerwünschte Ausbreitung des Primärtumors hindeuten. Der immunhistochemische Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, der auch bei anderen epithelialen Tumoren erforscht wird, kann ein möglicher Ansatz sein, früher und sicherer als durch die Lymphknotenanalyse die Fähigkeit des Primärtumors zur systemischen Streuung zu erkennen. Die dabei notwendige Knochenmarksentnahme ist ein technisch einfach durchzuführender und beliebig oft wiederholbarer Eingriff. Diese Entnahme, die in der Regel während der Narkose, noch vor der Tumorresektion erfolgt, ist für die Patientinnen ein komplikationsarmer Eingriff und postoperativ mit relativ wenig Schmerzen verbunden. Damit könnte es möglich sein, eine einfache, sichere und reproduzierbare Methode zur Beurteilung der Streuungskapazität eines Tumors zu etablieren. Inwieweit diese Arbeitshypothese zutrifft, und falls dies so ist, welche Aussagekraft der Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark für die Prognose der Patientinnen mit Mamma- oder Ovarialkarzinom hat, soll in dieser Arbeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Krankenakten von 660 Patientinnen, die sich über einen Zeitraum von annähernd vier Jahren in der I. Frauenklinik der LMU München aufgrund eines histologisch gesicherten Ovarial- oder Mammakarzinoms therapieren ließen und sich im Zuge dessen freiwillig einer Knochenmarkspunktion unterzogen, auf ihren weiteren Krankheitsverlauf untersucht. Mittels statistischer Verfahren wie der Cox-Regressionsanalyse und der Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurde untersucht, ob durch den Knochenmarksbefund eine Einteilung der Patientinnen in unterschiedliche Risikogruppen bezüglich der Progression ihrer Erkrankung möglich ist. Eine weitere Differenzierung erfolgte durch eine Aufspaltung der

Patientinnenkollektive in einzelne Untergruppen, die sich anhand ihres Lymphknotenstatus, der Hormonrezeptorsensibilität, der Tumorgröße, der operativen Vorgehensweise oder dem Grad der Differenzierung des Tumors unterschieden. Die hierbei gewonnenen Daten wurden untereinander in Relation gesetzt, bewertet und mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Die Patientinnen**

Die im Rahmen dieser Studie untersuchten, therapierten und weiter beobachteten Patientinnen teilten sich in zwei unterschiedliche Kollektive auf. Die Gruppe der Patientinnen mit Mammakarzinomen setzte sich aus 552 Patientinnen zusammen, die derjenigen mit Ovarialkarzinomen aus 108 Patientinnen. Es wurden nur solche Patientinnen in diese Studie aufgenommen, bei denen zum Zeitpunkt der Primäroperation klinisch kein Anhalt für das Vorhandensein von Fernmetastasen zu erkennen war und bei denen der Primärtumor makroskopisch vollständig entfernt werden konnte. Zur Verlaufskontrolle erfolgten alle drei Monate klinische Nachuntersuchungen und die Bestimmung des CA-125-Serumtumormarkers, ohne routinemäßig weitere bildgebende Verfahren einzusetzen. Diese kamen nur dann zum Einsatz, wenn sich bei der klinischen Untersuchung Verdachtsmomente ergaben, die auf eine Progression der Erkrankung hindeuteten. Die Einteilung der Tumore erfolgte nach der 5. Ausgabe des TNM-Schemas.<sup>63</sup> Dabei unterscheidet man die präoperative klinische TNM-Klassifikation von der postoperativen histopathologisch verifizierten Klassifikation pTNM. Neben dieser für alle malignen Tumore anwendbaren Einteilung existiert für die Gruppe der Ovarialkarzinome zusätzlich noch die FIGO-Gruppierung der Federation Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique<sup>51</sup>. Diese Einteilung unterscheidet sich vom TNM-Schema nicht mehr wesentlich, gilt für das Ovarialkarzinom international jedoch immer noch als die am meisten verbreitete Klassifikation und wurde deshalb zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien in dieser Untersuchung auch angewandt. Sowohl die

immunhistochemische Auswertung der gewonnenen Knochenmarksbiopsien als auch die histopathologischen Untersuchungen der Tumorresektate erfolgten völlig unabhängig voneinander. Aufgrund dessen ergab sich eine Kontrollgruppe von 191 Patientinnen, bei denen der initiale Tumorverdacht histologisch nicht bestätigt wurde und deren Daten deshalb nicht in die Ergebnisse der Studie miteingingen. Stattdessen wurden bei diesen Patientinnen gutartige Wucherungen diagnostiziert, unter anderem Fibroadenome, Mastopathien, Abszesse oder auch Zysten. Ihre Knochenmarksergebnisse ermöglichten jedoch eine Überprüfung der angewandten Färbemethode auf möglicherweise falsch positive Ergebnisse. Die beiden Patientinnenkollektive, aus denen die unten beschriebenen Daten gewonnen wurden, teilten sich wie folgt auf:

### **2.1.1. Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Die Ergebnisse dieser Gruppe basieren auf den Daten von insgesamt 108 Patientinnen, die in dem Zeitraum von März 1994 bis Dezember 1997 in der I. Frauenklinik der LMU München aufgrund eines histologisch gesicherten Ovarialkarzinoms therapiert wurden. Das Durchschnittsalter betrug 61 Jahre und schwankte zwischen 29 Jahren und 80 Jahren.

Nachdem alle Patientinnen eingehend über die Möglichkeiten und Risiken einer Knochenmarkspunktion informiert wurden, erklärten sie schriftlich ihr Einverständnis mit dem vorzunehmenden, zusätzlichen Eingriff. Alle Patientinnen unterzogen sich einer Laparotomie mit Hysterektomie, beidseitiger Ovarektomie, Omentektomie und anschließendem peritonealem Tumordebulking, falls dies möglich war. Eine Entfernung der pelvinen und paraaortalen Lymphknoten unter therapeutischen Gesichtspunkten wurde nur

dann durchgeführt, wenn der Tumor in seiner größten Ausdehnung eine maximale Dicke von weniger als zwei cm hatte und der Allgemeinzustand der Patientin einen solch ausgedehnten chirurgischen Eingriff zuließ. Mit Ausnahme der nach FIGO I a oder b eingruppierten Patientinnen erhielten alle eine zusätzliche systemische Chemotherapie. Die dabei angewandten Verfahren bestanden entweder in der Gabe von:

|                       |  |                |
|-----------------------|--|----------------|
| <i>Cylophosphamid</i> | 600 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche | kombiniert mit |
| <i>Carboplatin</i>    | 350 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche |                |

oder

|                    |   |                |
|--------------------|---|----------------|
| <i>Paclitaxel</i>  | 185 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche  | kombiniert mit |
| <i>Carboplatin</i> | 350 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche. |                |

Eine abdominale Bestrahlung wurde bei keiner der Patientinnen durchgeführt. Um den lokoregionären Befund und möglicherweise vorhandenen Fernmetastasen zu erkennen, wurden weiter klinische Untersuchungen an allen Patientinnen durchgeführt. Diese beinhalteten Röntgenaufnahmen des Thorax und des Abdomens, Ultraschallaufnahmen der Leber sowie Computertomographieaufnahmen des Abdomen und des Thorax. Falls die klinische Situation es erforderte, wurden ergänzend folgende weitere Untersuchungen durchgeführt: Rektoskopien, Zystoskopien, kolorektale Kontrastmittelaufnahmen und renale Pyelogramme. Routinemäßig wurde der CA-125 Serumentumormarker untersucht, wobei Werte von über 35 U/mL als erhöht eingestuft wurden. All diese Untersuchungsmethoden ergaben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keinen Anhalt für eine Fernmetastasierung und auch anamnestisch gab es in der Vorgeschichte bei keiner der Patientinnen einen anderen epithelialen Tumor.

## 2.1.2. Patientinnen mit Mammakarzinom

In dieser Gruppe beruhen die Ergebnisse auf den Daten von 552 Patientinnen, welche in der Zeit vom Februar 1994 bis August 1998 in der I. Frauenklinik der LMU München und der gynäkologischen Abteilung der II. Medizinischen Klinik Augsburg aufgrund eines histologisch gesicherten Mammakarzinoms therapiert wurden. Auch sie wurden wieder über die Möglichkeiten und Risiken einer Knochenmarkspunktion eingehend informiert und gaben dann im Anschluss alle schriftlich ihr Einverständnis zu diesem Eingriff. Ein weiterer epithelialer Tumor war auch bei keiner dieser Patientinnen zu diesem Zeitpunkt der Studie bekannt. Die Entnahme der Knochenmarksproben aus beiden Hüften erfolgte hier auch wieder vor der initialen Exzision des Primärtumors.

In allen Fällen wurde der Primärtumor vollständig entfernt, wobei in 54 % der Fälle (bei 298 Patientinnen) brusterhaltend operiert wurde und in 46 % (254 Patientinnen) eine vollständige Mastektomie erfolgte.

Ausnahmslos erfolgte, bei allen brusterhaltend operierten Patientinnen, im Anschluss an die Operation eine Radiatio. Bei den mastektomierten Patientinnen erhielten 37 % (94 Patientinnen) eine Brustwandbestrahlung. Die Patientinnen, die keine zusätzliche Chemotherapie erhielten, wurden mit 50 Gy in 25 Sitzungen bestrahlt. Erfolgte eine zusätzliche Chemotherapie, so wurden dann 50,4 Gy in 28 Sitzungen verabreicht. Von den 270 nodal negativen Patientinnen erhielten 23 eine systemische Chemotherapie und 33 Patientinnen wurde das Anti-Östrogen Tamoxifen verabreicht. Von den 170 Patientinnen die sich bereits in der Menopause befanden, hatten 42 % einen östrogenrezeptorpositiven Tumor. Diese Gruppe erhielt 20-30 mg Tamoxifen täglich über einen Zeitraum von zwei bis fünf Jahren. Ausnahmslos alle Patientinnen, ob prämenopausal oder postmenopausal, erhielten im Falle eines östrogenrezeptornegativen Tumors eine zusätzliche Chemotherapie. Alle

Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten erhielten insgesamt sechs Zyklen Chemotherapie bestehend aus folgender Kombination:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <i>Cyclophosamide</i> | 600 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche,   |
| <i>Methotrexat</i>    | 40 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche und |
| <i>5-Fluoruracil</i>  | 600 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche    |

in einem Abstand von jeweils 21 Tagen. In den 101 Fällen in denen vier oder mehr lokoregionäre Lymphknoten befallen waren, wurden erst vier Zyklen mit

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <i>Epirubicin</i>     | 90 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche und |
| <i>Cyclophosamide</i> | 600 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche    |

verabreicht, gefolgt von drei Zyklen der Cyclophosamid-Methotrexat-5-Fluoruracil-Kombination. Bei den 19 Patientinnen, bei denen Anzeichen auf ein inflammatorisches Mammakarzinom hindeuteten, erfolgte bereits präoperativ eine Chemotherapie in drei Zyklen, entweder mit der oben beschriebenen Epirubicin-Cyclophosamid-Kombination, oder mit

|                   |   |
|-------------------|---|
| <i>Epirubicin</i> | 90 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche und |
| <i>Paclitaxel</i> | 175 mg/m <sup>2</sup> Körperoberfläche.   |

Es stellte sich später heraus, dass alle diese 19 Patientinnen einen positiven Lymphknotenstatus aufwiesen. Auch in dieser Gruppe erfolgte vor der Entfernung des Primärtumors systematisch eine Reihe von Untersuchungen, um möglicherweise bereits vorhandene Fernmetastasen zu erkennen. Diese Untersuchungen bestanden aus Thoraxröntgenaufnahmen, Mammographieaufnahmen der kontralateralen Brust, Ultraschallaufnahmen der Leber und einem vollständigem Knochenszintigramm. Dabei wurde zu diesem Zeitpunkt keine Fernmetastase gefunden.

## **2.2. Die Untersuchungsmethoden**

Die Entnahme, Aufbereitung und Befundung der Knochenmarksaspirate erfolgte durch die Mitarbeiter des Labors für Tumorimmunologie an der I. Frauenklinik der Universität München. Sämtliche Patientinnendaten, histologische und immunzytochemische Ergebnisse wurden vom Autor zusammen mit den Verlaufskontrollen aus den Krankenakten erhoben und in einer Datenbank zusammengefasst.

### **2.2.1. Die Gewinnung und Aufbereitung der Knochenmarksproben**

Die Gewinnung der Knochenmarksbiopsien erfolgte in beiden Gruppen nach derselben Methode. Unmittelbar nach Einleitung der Intubationsnarkose zur Entfernung des Primärtumors, jedoch noch vor jeglichem chirurgischen Eingriff, wurden mittels einer Nadelpunktion Knochenmarksaspirate aus der *christa iliaca anterior superior dextra et sinistra* entnommen. Die dabei gewonnenen Mengen schwankten zwischen 3,5 ml und 11 ml. Die Zentrifugation des gewonnenen Materials erfolgte mittels eines Ficoll-Hypaque Dichtegradienten (Fa. Pharmacia, Uppsala, Finnland) mit einer Dichte von 1.077 g/mol bei 900-facher Erdbeschleunigung für 30 Minuten. Dann wurden bei 150facher Erdbeschleunigung für fünf Minuten mittels einer Universal 30F Zentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland)  $10^6$  mononukleäre Interphasezellen isoliert, gereinigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Dieses Verfahren erlaubt die Aufbereitung einer reproduzierbaren Anzahl an Zellen, bei einer Verlustrate von weniger als 10 %. Nach einer mehrstündigen Lufttrocknungszeit wurden die Präparate entweder sofort gefärbt oder bei

-80° C gelagert, eine Temperatur bei der die epithelialen Antigene noch mindestens 2 Jahre nachweisbar sind. Aufgrund des bemerkenswert sauberen Hintergrundes konnten positive Zellen ohne größere Unsicherheiten bestimmt werden. Von 14 Patientinnen der Ovarialkarzinomgruppe wurden Proben des intraperitonealen Tumorgewebes entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bei -80°C gelagert und in 5µm Schnitte geteilt, um das Markierungspotenzial des A45-B/B3 Antikörpers zu überprüfen.

### **2.2.2. Die Immunzytochemie**

Um einen Vergleich mit anderen Studien möglich zu machen, wurden bei der Gewebsaufbereitung und der immunzytochemischen Färbung die neuesten Empfehlungen<sup>3</sup> des Tumor Cell Detection Committee der International Society of Hemathotherapy and Graft Engeneering (ISHAGE) beachtet. Zur Kennzeichnung der Tumorzellen in der aufbereiteten Knochenmarksprobe wurde der mononukleäre Antikörper A45-B3 (Fa. Micromet, München, Deutschland) in einer Dosierung von 1.0-2.0 µg/ml eingesetzt. Dieser Antikörper richtet sich gegen die in Tumorzellen häufig auftretende Zytokeratinpolypeptide, unter anderem gegen die Heterodimere 8/18 und 8/19. Die spezifische Antikörperreaktion wurde mittels der alkalischen Phosphatase antialkalische Phosphatase-Reaktion (APAAP-Methode) hervorgebracht in Kombination mit der Neofuchsinmethode, um die Bindung zu visualisieren. Der dabei verwendete Antikörper des alkalische Phosphatase-Komplexes D651 (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem Zytokeratin gebundenen A45-B/B3 über eine Hase-Anti-Maus-Antikörperreaktion mittels Z 259 (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) gebunden. Des Weiteren wurden die Präparate der sich entwickelnden Neofuchsinlösung

für 20 Minuten ausgesetzt, abgewaschen und mit Deckplättchen verschlossen. Um eine schnelle Suche nach zytokeratinpositiven Zellen (CK+) zu ermöglichen, wurde auf eine Gegenfärbung verzichtet. Eine Probe wurde dann als positiv bewertet, wenn eine oder mehrere CK+ Zellen gefunden wurden<sup>49</sup>.

**Bild 1**

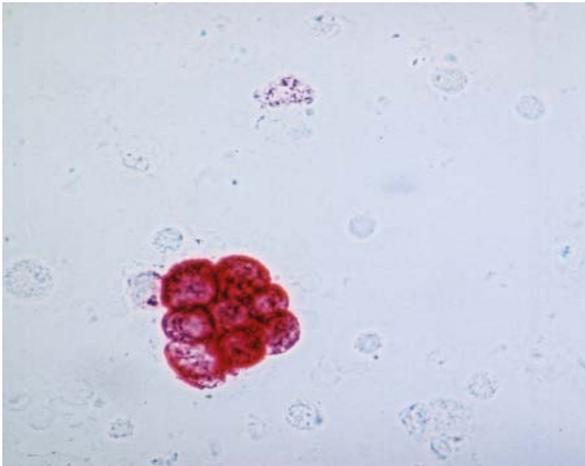


**Abbildung dreier immunzytochemisch nachgewiesener, rot angefarbter, CK+ Zellen, isoliert aus einem Knochenmarksaspirat einer Patientin mit Mammakarzinom (pT2N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>G2); auffallend ist der bemerkenswert saubere Hintergrund, der eine klare Unterscheidung von Knochenmarkszellen und disseminierten Tumorzellen (DTZ) erlaubt.**

Die Auswertung der Präparate erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Untersucher, die in mehr als 95 % der Fälle zu den gleichen Wertungen kamen. In der abschließenden, gemeinschaftlichen Reevaluation der strittigen Beurteilungen konnten sich die Untersucher in allen Fällen im Konsens auf eine einheitliche Meinung festlegen.

Zur Prüfung der Spezifität wurde jede zytochemische Färbung sowohl auf falsch positive wie auch auf falsch negative Ergebnisse hin kontrolliert.

**Bild 2**



**Abbildung eines Clusters: hierbei handelt es sich um eine Aggregation multipler immunzytochemisch nachgewiesener Zellen, isoliert aus dem Knochenmarksaspirat einer Patientin mit Mammakarzinom; auch diese heben sich deutlich von ihrer Umgebung ab, so dass eine eindeutige Identifizierung möglich ist.**

Die Brustkrebs-Zelllinie BT-20, eingebettet in mesenchymalen Zellen der U-937 Histiocytom Tumorzelllinie, diente als Positivkontrolle jeder immunzytochemischen Färbung. Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde durch eine angemessene Verdünnung der Maus-Myelomantikörper bei der isotypischen Kontrolle der Knochenmarksproben der Patientinnen kontrolliert. Als Negativkontrolle dienten die Knochenmarkaspirate der 191 Patientinnen, bei denen sich der Anfangsverdacht eines malignen Geschehens in der späteren histopathologischen Untersuchung nicht bestätigte. Bei 153 dieser Patientinnen wurden Fibroadenome, Mastopathien, Abszesse oder auch Zysten der Brust diagnostiziert. Weitere 38 Patientinnen mit initialem Verdacht auf Ovarialkarzinom zeigten in der histopathologischen Untersuchung lediglich solide Zysten, Zystadenome oder zervikale Neoplasien Grad I oder II. In zwei von diesen Fällen wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Hierbei handelte es sich in einem Fall um eine chronische Mastitis und im anderen Fall um ein Zystadenom des Ovars.

### 2.2.3. Die statistischen Analysen

Die Qualität der erhobenen Daten wurde durch einen Abgleich aller erhobenen immunzytochemischen und histopathologischen Befunde sowie der im Rahmen der Verlaufskontrolle erhobenen Ergebnisse mit den in den ursprünglichen Krankenakten aufgezeichneten Daten gesichert. Ausgangspunkt der Messung war der Tag der Operation des Primärtumors und damit die Entnahme des Knochenmarks. Als Endpunkt der Messungen wurde die letzte bekannte krankheitsfreie Verlaufskontrolluntersuchung, die erstmalige Manifestation von Fernmetastasen oder der durch die Erkrankung bedingte Tod festgelegt. Die Erhebung der Daten der Verlaufskontrolle endete am 30. Juni 2000. Lokoregionäre Rezidive wurden als separate Endpunkte bestimmt und als solche auch dementsprechend vermerkt. In diesem Zusammenhang galt ipsi- und kontralateraler Brustkrebs in der Mammakarzinomgruppe per definitionem als lokoregionäres Rezidiv. Die Daten der Patientinnen, die bereits in den Untersuchungen vor dem Ersteingriff Fernmetastasen aufwiesen, fanden keinen Eingang in diese Studie. Pleuraergüsse wurden nur dann als Fernmetastasen gewertet, wenn ihre Malignität auch mittels Zytologie nachgewiesen werden konnte. Die statistische Aufarbeitung der gesammelten Daten erfolgte auf drei verschiedene Arten. Neben einer univariablen Analyse erfolgte eine multivariable, nach dem Cox-Regressions-Modell und eine Analyse der Überlebenszeiten mittels Kaplan-Meier-Kurven.<sup>32</sup> Bei diesen statistischen Analysen wurden sowohl die Gesamtgruppe der Ovarialkarzinompatientinnen, beziehungsweise der Mammakarzinompatientinnen, als auch spezielle Untergruppen der einzelnen Kollektive untersucht. Diese Untergruppen waren bei der Ovarialkarzinomgruppe die optimal operierten ( $R_{0-1}$ ) gegenüber den nicht vollständig operierte Patientinnen ( $R_2$ ) und in der Mammakarzinomgruppe die mit ( $N_1$ ) und ohne Lymphknotenbefall ( $N_0$ ), die östrogenrezeptorpositiv

gegenüber den östrogenrezeptornegativen, die mit einer Tumorgröße kleiner 2 cm ( $T_1$ ) gegenüber denen größer 2 cm ( $T_{2-4}$ ) und die mit einem Grading der Stufe 1-2 ( $G_{1-2}$ ) gegenüber Patientinnen mit einem Grading der Stufe 3 ( $G_3$ ). Bei der Analyse der Überlebenszeiten wurde das Auftreten des ersten lokoregionären Rezidivs, das erstmalige Auftreten von Fernmetastasen und die Gesamtüberlebensdauer jeweils als eigenständiges zufallsbedingtes Ereignis erfasst und gesondert mittels Kaplan-Meier-Kurven ausgewertet.

Die multivariablen Analysen wurden mit Hilfe der Cox-Regressions-Analysen durchgeführt. Sie erlauben, den Einfluss von bestimmten unabhängigen Risikofaktoren auf die Ereignisintensität, die Hazardfunktion, zu untersuchen. Diese analysierten Kovarianten waren in der Ovarialkarzinomgruppe die Figo-Einteilung und eine gegebenenfalls belassene Resttumorgröße. In der Mammakarzinomgruppe waren das der Hormonrezeptorstatus und die Tumorgröße. In beiden Gruppen wurden der Knochenmarksbefund, der Lymphknotenstatus und das Grading analysiert. Um die Aussagekraft der Variablen mit diesem Modell vergleichen zu können, ist die Unabhängigkeit der einzelnen Variablen voneinander und die Varianzhomogenität untereinander von elementarer Bedeutung. Beide Voraussetzungen waren bei den verwendeten Variablen erfüllt. Als das zu analysierende Ereignis wurde einerseits der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Fernmetastasen und andererseits der Eintritt des Todes definiert. Die dabei untersuchten Variablen wurden schrittweise in das Modell eingebracht, um die Aussagekraft des Nachweises von ZIK mit der der anderen Prognosefaktoren zu vergleichen<sup>12</sup>.

Die Übereinstimmung der Verteilung der einzelnen Variablen wurde durch den Mann-Whitney U Test überprüft, ein auf Rängen basierender Test für unverbundene Stichproben. Dabei wurden Unterschiede zwischen den Gruppen als signifikant angesehen, wenn die P-Werte unter 0,05 lagen. Zum Anfertigen

der oben beschriebenen Analysen wurde das Softwareprogramm SPSS 12.0 für Windows (Fa. SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Die Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

#### **3.1.1. Der Nachweis von DTZ im Knochenmark**

Die Ovarialzellen der entnommenen Proben des intraperitonealen Tumorgewebes, die dem A45-B/B3-Antikörper ausgesetzt wurden, zeigten eine gleichmäßige kräftige Färbung. Das gleiche Vorgehen zeigte bei Knochenmark gesunder Patientinnen keine Hintergrundfärbung, da Knochenmark normalerweise keine epithelialen Zellen enthält. Einige der gewonnenen Knochenmarksaspirate enthielten einzelne eingebettete Ovarialkarzinomzellen, die in der oben beschriebenen Versuchsanordnung eine breite Färbung des Zytoplasmas aufwiesen. Anhand der Knochenmarksaspirate der 191 tumorfreien Patientinnen, bei denen sich nach Verdacht auf ein Karzinom in der anschließenden histopathologischen Untersuchung kein Anhalt für ein malignes Geschehen zeigte, konnte die Spezifität des Antikörpers überprüft werden. In einem Prozent (2 Fälle) dieser Gruppe zeigten sich spezifisch angefärbte CK+ Zellen. Die Histologie dieser beiden Fälle zeigte in einen Fall eine gutartige chronische Entzündung der Brust und im zweiten Fall ein gutartiges Zystadenom des Ovars. Die 108 dieser Untersuchung zugrunde liegenden Knochenmarksbiopsien stammen alle von Patientinnen, bei denen erst kurz vor Entnahme der Proben ein auf den lokoregionären Bereich begrenztes Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde. Zum Zeitpunkt der Primäroperation waren weder Anzeichen für Fernmetastasen erkennbar, noch in der Krankengeschichte Hinweise auf das Vorhandensein vormaliger epithelialer Tumore verzeichnet. Dies entspricht einem Stadium I bis III nach der Einteilung

der FIGO-Klassifikation. Zum Zeitpunkt der Primäroperation, noch vor jeglicher chirurgischen Intervention, konnten in 32 (30 %) der insgesamt 108 Knochenmarksaspiraten einzelne DTZ nachgewiesen werden. Die Anzahl dieser CK+ Zellen variierte von einer bis zu 31 pro  $2 \times 10^6$  mononukleären Zellen bei einem Mittelwert von drei. Unter der Annahme, dass die Zellen gleichmäßig auf das Knochenmark verteilt sind, errechnet sich eine Gesamtmenge an Tumorzellen im Knochenmark von  $8 \times 10^5$  bis  $28 \times 10^6$  Zellen. Ansammlungen von mehreren CK+ Zellen konnten in keiner der 32 positiven Proben nachgewiesen werden.

### **3.1.2. Die klinischen Merkmale der Patientinnen**

Bei der statistischen Auswertung der gesammelten Daten zeigte sich, dass keiner der etablierten Risikofaktoren für den weiteren Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms, wie die histologische Morphologie des Tumors, der Differenzierungsgrad, möglicherweise belassener intraperitonealer Resttumor, Aszites, eine intraperitoneale Metastasierung oder mögliche Beteiligung der retroperitoneal gelegenen Lymphknoten, in seiner Aussage mit einem positiven Knochenmarksbefund in Verbindung gebracht werden konnte (Tabelle 1). Es zeigte sich auch kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark und den verschiedenen FIGO-Stadien, wobei in diesem Zusammenhang jedoch erwähnt werden muss, dass von den 11 Patientinnen mit einer Einstufung Ic nach FIGO, was einem frühen Stadium der Erkrankung entspricht, bei der das Tumorwachstum jedoch bereits über das Ovarialparenchym hinausgewachsen ist, bei vieren der Nachweis von CK+

Zellen im Knochenmark gelang. Im Gegensatz dazu fand sich in der Gruppe der acht Patientinnen mit FIGO I a/b, bei denen die Tumorausdehnung auf das Ovarialparenchym beschränkt ist, kein einziger positiver Befund. Da Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom meist erhöhte Werte des Serumentumormarkers CA-125 zeigen, wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten CA-125-Wert und dem Auftreten von CK+ Zellen im Knochenmark herstellen ließ. Unabhängig vom Knochenmarksbefund zeigten 85 von 108 Patientinnen erhöhte CA-125 Werte, dies entspricht 79 %. Beim Betrachten der im Knochenmark positiv befundenen Patientinnen zeigte sich bei 26 von 32 ein erhöhter CA-125 Wert (84 %). Demgegenüber hatten in 59 von 76 Fällen (78 %) die Patientinnen bei negativen Knochenmarksbefunden einen CA-125 Anstieg zu verzeichnen. Alle oben gemachten Aussagen und Werte basieren auf den Ergebnissen des Chi<sup>2</sup>-Tests, der die Unabhängigkeit zweier Alternativmerkmale untersucht.

Tabelle 1

### Die klinischen Merkmale der 108 Patientinnen mit Ovarialkarzinom und Knochenmarksbiopsien

| Eigenschaften                   | Patientinnen | CK+ | CK- | Prozentsatz CK+* | P** Wert |
|---------------------------------|--------------|-----|-----|------------------|----------|
| <b>Gesamtanzahl</b>             | 108          | 32  | 76  | 29,6             |          |
| <b>Alter</b>                    |              |     |     |                  | 0,55     |
| über 61Jahre                    | 56           | 18  | 38  | 32,1             |          |
| unter 61 Jahre                  | 52           | 14  | 38  | 26,9             |          |
| <b>FIGO-Klassifikation</b>      |              |     |     |                  | 0,39     |
| I                               | 20           | 4   | 16  | 20               |          |
| II                              | 10           | 2   | 8   | 20               |          |
| III                             | 78           | 22  | 56  | 33,3             |          |
| <b>Lymphknotenbeteiligung</b>   |              |     |     |                  | 0,52     |
| pN <sub>0</sub>                 | 49           | 13  | 36  | 26,5             |          |
| pN <sub>1</sub>                 | 59           | 19  | 40  | 32,2             |          |
| <b>Aszites</b>                  |              |     |     |                  | 0,64     |
| vorhanden                       | 57           | 18  | 39  | 31,6             |          |
| nicht vorhanden                 | 51           | 14  | 37  | 27,5             |          |
| <b>belassene Resttumormenge</b> |              |     |     |                  | 0,12     |
| R <sub>0</sub>                  | 39           | 7   | 32  | 17,9             |          |
| R <sub>1</sub>                  | 25           | 8   | 17  | 32               |          |
| R <sub>2</sub>                  | 44           | 17  | 27  | 38,6             |          |
| <b>CA-125 Tumormarker</b>       |              |     |     |                  | 0,67     |
| erhöht                          | 85           | 26  | 59  | 30,6             |          |
| normal                          | 23           | 6   | 17  | 26,1             |          |
| <b>Differenzierung</b>          |              |     |     |                  | 0,02     |
| G <sub>1</sub>                  | 23           | 2   | 21  | 8,7              |          |
| G <sub>2</sub>                  | 36           | 10  | 26  | 27,7             |          |
| G <sub>3-4</sub>                | 49           | 20  | 29  | 40,8             |          |
| <b>Histologie</b>               |              |     |     |                  | 0,4      |
| serös                           | 77           | 21  | 56  | 27,3             |          |
| andere***                       | 31           | 11  | 20  | 35,5             |          |

#### **Legende:**

übernommen aus Braun et al. <sup>9</sup>

\* CK+ = Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark

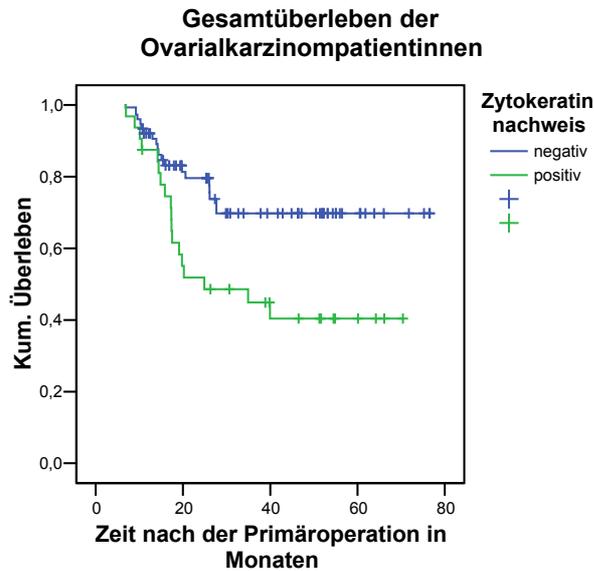
\*\* Die P-Werte basieren auf den Ergebnissen des Chi<sup>2</sup>-Tests, der die Unabhängigkeit von zwei Alternativmerkmalen untersucht

\*\*\* andere setzte sich zusammen aus den Befunden undifferenzierte (n=11), endometrioid (n=10) und muzinöse (n=6) und Klarzell-(n=4)Ovarialkarzinome

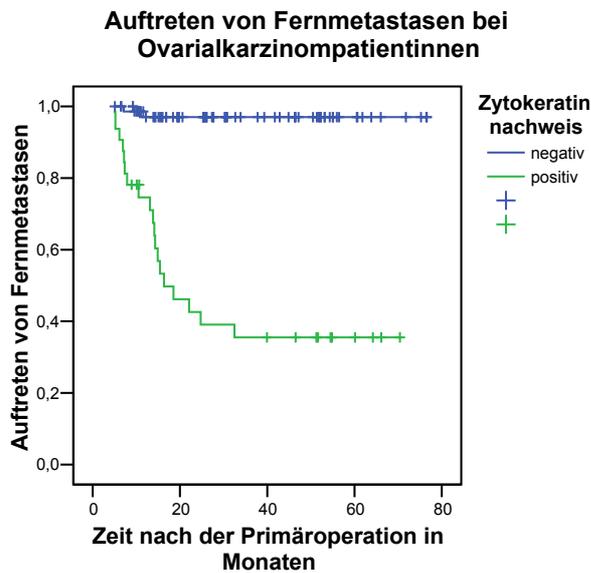
### **3.1.3. Die Korrelation des Nachweises von DTZ im Knochenmark mit dem klinischen Verlauf**

Die Verlaufskontrolle erfolgte über einen Zeitraum von durchschnittlich 45 Monaten und variierte in den einzelnen Fällen von 12 Monaten bis zu 77 Monaten. Bei 53 Patientinnen, dies entspricht 49 % der Untersuchten, trat ein Wiederaufflammen des malignen Geschehens ein. Diese Rezidive traten meisten intraperitoneal auf, lediglich bei 21 Patientinnen (19 %) zeigten sich extraperitoneale Fernmetastasen. Diese Zahlen unterstreichen die Bedeutung der lokoregionären Rezidivierung des Tumors für den weiteren Krankheitsverlauf. Der Einfluss des Knochenmarksbefundes auf die Gesamtüberlebenschance (Kaplan-Meier-Diagramm 1), das fernmetastasenfreie Überleben (Kaplan-Meier-Diagramm 2) und das rezidivfreie Überleben (Kaplan-Meier-Diagramm 3) wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven untersucht. In allen drei Analysen zeigte sich für die Gruppe der Patientinnen, mit erbrachten Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark, eine deutlich schlechtere Prognose des weiteren Krankheitsverlaufes. Es zeigte sich auch eine deutliche Überlegenheit der Aussagekraft des Zytokeratinnachweises für das Auftreten von Fernmetastasen gegenüber dem Auftreten von lokoregionären Rezidiven.

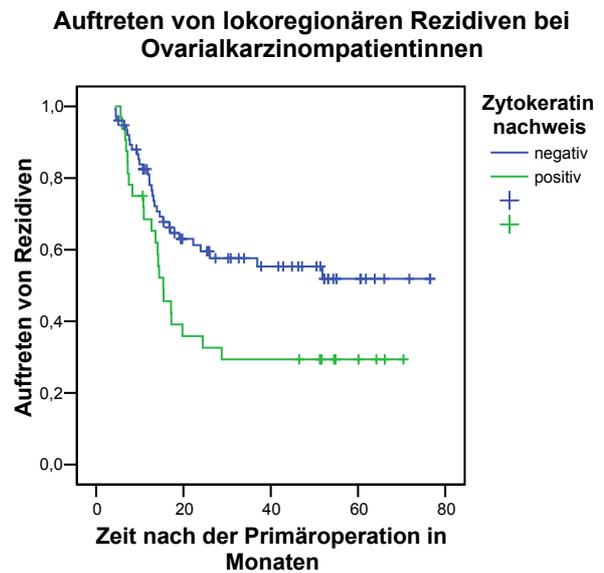
**Kaplan-Meier-Diagramm 1**



**Kaplan-Meier-Diagramm 2**



**Kaplan-Meier-Diagramm 3**



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Ovarialkarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

- (1) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,078)
- (2) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit (P-Wert < 0,0001)
- (3) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,0191)

Ein Drittel der Patientinnen (37 von 108) verstarb im Untersuchungszeitraum an den Folgen ihrer Tumorerkrankung. Aufgeteilt nach den jeweiligen Untergruppen ergibt sich eine Gesamtüberlebens-wahrscheinlichkeit von 41 % bei CK+ im Knochenmark bzw. 69 % Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in der Gruppe ohne CK-Nachweis im Knochenmark.

Das spätere Auftreten von Fernmetastasen korreliert am deutlichsten mit dem Nachweis von DTZ. 59 % der aufgetretenen Fernmetastasierungen traten in der Gruppe der 32 Patientinnen mit Zytokeratinnachweis im Knochenmark auf, gegenüber 3 % in der Gruppe der 76 ohne DTZ im Knochenmark. Die Wahrscheinlichkeit für das gesamte Patientinnenkollektiv betrug 19 %.

Lokoregionäre Rezidive traten in der Gruppe ohne Zytokeratinnachweis im Knochenmark mit einer Wahrscheinlichkeit von 41 % auf. Bei Zytokeratinnachweis im Knochenmark lag die Wahrscheinlichkeit bei 69 %.

Mittels einer Coxanalyse wurde untersucht, ob das Vorhandensein von DTZ im Knochenmark eine statistisch signifikante Aussage über die Dauer des fernmetastasenfreien postoperativen Überlebens der Patientinnen gibt.

Zudem wurde untersucht, ob diese Aussagekraft unabhängig von Faktoren wie der FIGO-Klassifikation, der Menge des intraperitoneal belassenen Resttumors, des Lymphknotenstatus oder des Menopausenstatus ist. Wie sich zeigte, waren der Knochenmarksstatus und die intraperitoneal belassene Resttumormenge alleinig unabhängige Prognosefaktoren für das spätere Auftreten von Fernmetastasen (Tabelle 2). Dementsprechend war für die oben beschriebene optimal operierte Gruppe R<sub>0-1</sub> der Zytokeratinnachweis im Knochenmark der einzige unabhängige Prognosefaktor für die Vorhersage von Fernmetastasen.

Tabelle 2

**Univariate und multivariable Analyse der Einflussfaktoren auf das erstmalige Auftreten von Fernmetastasen bei Ovarialkarzinompatientinnen**

| <b>Variable</b>                                    | Patientinnen <sup>1</sup> | Univariate            |                     | Multivariabel         |                     | <b>P-Wert</b> |
|--|---------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
|  |                           | <b>RR<sup>5</sup></b> | 95% CI <sup>4</sup> | <b>RR<sup>5</sup></b> | 95% CI <sup>4</sup> |               |
| <b>A) Patientinnenanzahl</b>                       | <b>108</b>                |                       |                     |                       |                     |               |
| <b>CK-Nachweis</b>                                 |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| positiv  | 19/32                     | 16,5                  | 6,2-56,9            | 18,2                  | 6,6-64,3            | 0,001         |
| negativ  | 2/76                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| <b>Figo-Einteilung</b>                             |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| I oder II  | 2/30                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| III  | 19/78                     | 4,2                   | 1,3-13,8            |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,67          |
| <b>Grading</b>                                     |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| G1 oder 2  | 5/59                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| G3   | 16/49                     | 3,8                   | 1,7-8,5             |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,67          |
| <b>Lymphknotenstatus</b>                           |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| positiv  | 16/59                     | 3,7                   | 1,3-10,1            |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,93          |
| negativ  | 5/49                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| <b>Residualtumor</b>                               |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| keiner/nur mikroskopisch                           | 6/64                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  | 4,7                   | 2,1-10,7            | 0,0002        |
| Makroskopisch erkennbar                            | 15/44                     | 3,6                   | 1,9-6,8             |                       |                     |               |
| <b>B) nur die Patientinnen mit R<sub>0-1</sub></b> | <b>64</b>                 |                       |                     |                       |                     |               |
| <b>CK-Nachweis</b>                                 |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| positiv  | 5/15                      | 7,3                   | 1,5-56,8            | 7,3                   | 1,5-56,8            | 0,018         |
| negativ  | 1/49                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| <b>Figo-Einteilung</b>                             |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| I oder II  | 1/27                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| III  | 5/37                      | 3,9                   | 0,7-20,7            |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,14          |
| <b>Grading</b>                                     |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| G1 oder 2  | 4/47                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| G3   | 2/17                      | 1,7                   | 0,6-4,8             |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,73          |
| <b>Lymphknotenstatus</b>                           |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| positiv  | 4/27                      | 3,5                   | 0,6-19,4            |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,11          |
| negativ  | 2/37                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| <b>Residualtumor</b>                               |                           |                       |                     |                       |                     |               |
| keiner   | 2/39                      | 1,0                   | R. G. <sup>2</sup>  |                       |                     |               |
| mikroskopisch erkennbar                            | 4/25                      | 5,2                   | 0,9-28,4            |                       | k. S. <sup>3</sup>  | 0,25          |

**Legende:**

übernommen aus Braun et al.<sup>9</sup>

<sup>1</sup> Anzahl der Patientinnen mit Fernmetastasen/Gesamtanzahl der Patientinnen

<sup>2</sup> **R.G.** Referenzgruppe

<sup>3</sup> **k.S.** keine Signifikanz; aufgrund fehlender Signifikanz konnte keine Einschätzung des relativen Risikos vorgenommen werden

<sup>4</sup> **CI** Confidence Intervall

<sup>5</sup> **RR** relatives Risiko

### 3.1.3.1. Die Untergruppe der optimal operierten Patientinnen

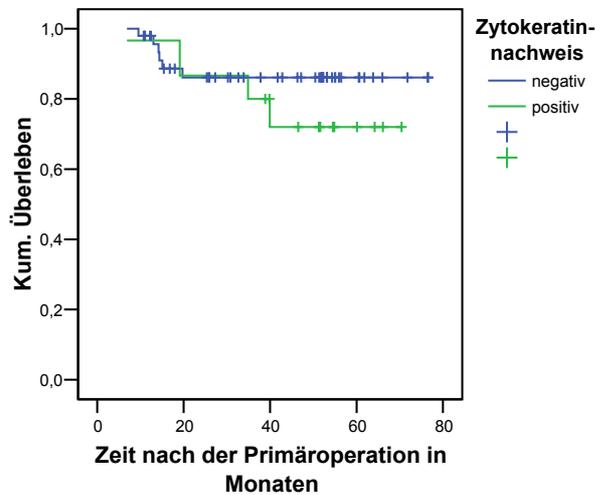
Bei 64 der 108 Patientinnen wurde in der Primäroperation der intraperitoneale Tumor nach makroskopischen Kriterien vollständig ( $R_{0-1}$ ) entfernt. Aus der Gruppe dieser optimal operierten Ovarialkarzinompatientinnen verstarben 10 während des Beobachtungszeitraumes. Sechs Patientinnen stammten aus der Gruppe der 49 CK- getesteten, wohingegen vier der 15 CK+ Patientinnen verstarben (Kaplan-Meier-Diagramm 4). Bei einem P-Wert von 0,3365 entspricht dies keiner statistisch signifikanten Aussage.

Beim Auftreten von lokoregionären Rezidiven (Kaplan-Meier-Diagramm 5) zeigten sich mit 20 % für die Gruppe der CK- und 40 % für die Gruppe der CK+ bei einer Wahrscheinlichkeit von 25 % für die Gesamtgruppe der Ovarialkarzinompatientinnen mit  $R_{0-1}$ , keine statistisch signifikanten Unterschiede (P-Wert = 0,2247).

Fernmetastasen traten in der Gruppe der Patientinnen ohne DTZ im Knochenmark nur in einem von 49 Fällen auf, jedoch bei 5 der 15 Patientinnen mit DTZ im Knochenmark (Kaplan-Meier-Diagramm 6) (P-Wert = 0,0012).

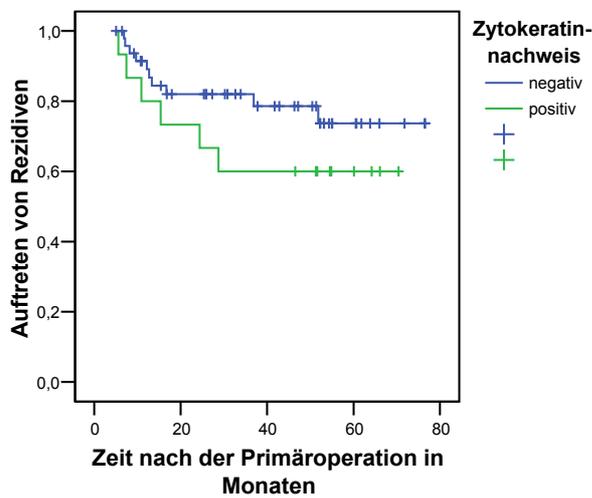
### Kaplan-Meier-Diagramm 4

**Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 0-1**



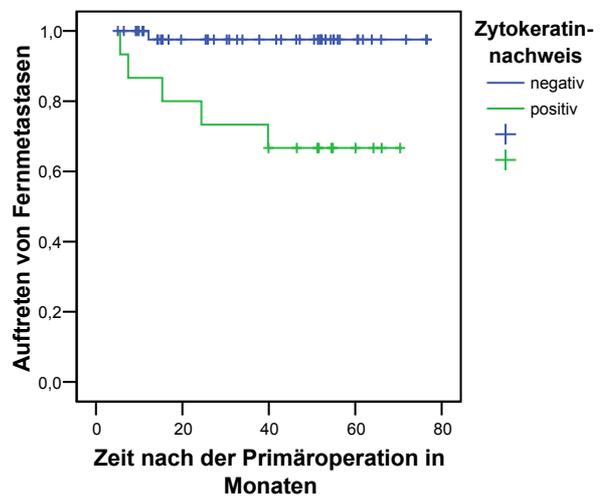
### Kaplan-Meier-Diagramm 5

**Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 0-1**



### Kaplan-Meier-Diagramm 6

**Auftreten von Fernmetastasen bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 0-1**



**Legende:**

**Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Ovarialkarzinompatientinnen mit makroskopisch vollständig entferntem Tumor (R<sub>0-1</sub>), aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.**

- (4) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,3365);
- (5) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,2247);
- (6) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,0012)

### **3.1.3.2. Die Untergruppe der Patientinnen mit belassenem Resttumor**

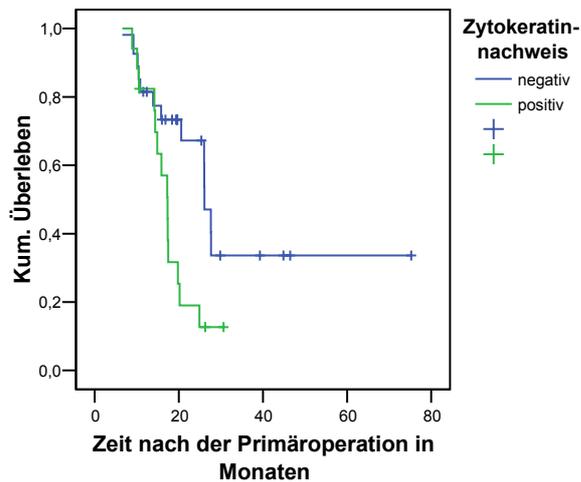
Von den 44 Patientinnen, bei denen der Tumor in der Primäroperation nicht vollständig entfernt werden konnte, überlebten 39 % den Untersuchungszeitraum. Diese Überlebenswahrscheinlichkeit setzte sich aus 52 % für die CK- und 18 % für die CK+ Gruppe zusammen. Von den 34 % der Patientinnen dieser Gruppe, die im weiteren Krankheitsverlauf eine Fernmetastase entwickelten, kam nur eine aus der Gruppe der 27 Patientinnen mit CK- Befund (= 4 %). Demgegenüber standen 14 von 17 Patientinnen mit Fernmetastasen aus dem CK+ Kollektiv (Kaplan-Meier-Diagramm 7). Auch hierbei war in dieser Untergruppe der durchschnittliche Beobachtungszeitraum mit 14 Monaten, aufgrund der hohen Inzidenz der Metastasierung, bei einer relativ kleinen Population, sehr kurz. Trotzdem ist der Zusammenhang in dieser Gruppe zwischen einem positiven Knochenmarksbefund und dem späteren Auftreten von Fernmetastasen eindeutig.

Des Weiteren wurde für diese Untergruppe die Häufigkeit eines lokoregionären Rezidives analysiert (Kaplan-Meier-Diagramm 8). Wie zu erkennen ist, stellt das frühzeitige Auftreten von Rezidiven bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom den Hauptgrund für die schlechte Prognose eines Ovarialkarzinoms dar. In diesem Fall betrug der durchschnittliche Beobachtungszeitraum bis zum erstmaligen Auftreten eines Rezidives im Schnitt 14 Monate nach der Primäroperation. Für Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist der Knochenmarksstatus keine Variable, die die Prognose eines Rezidives statistisch signifikant beeinflusst. Selbst bei der Metastasierung der retroperitonealen Lymphknoten, die als das erste Anzeichen für eine Ausdehnung des Tumors über das Peritoneum hinaus gewertet werden kann,

waren die CK+ Zellen annähernd gleichmäßig auf die nodal negativen (24 %) und nodal positiven (22 %) verteilt.

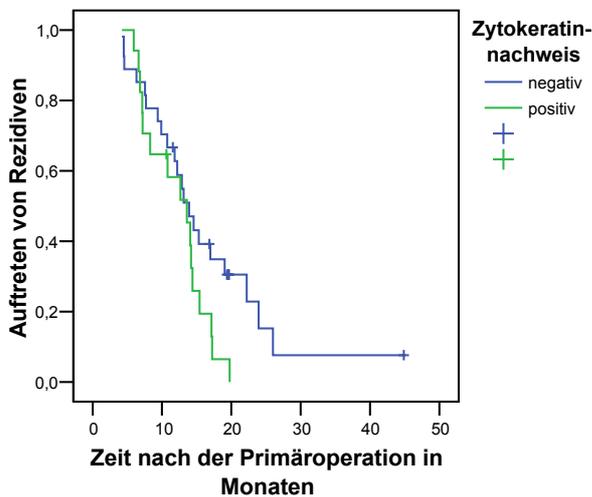
**Kaplan-Meier-Diagramm 7**

**Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 2**



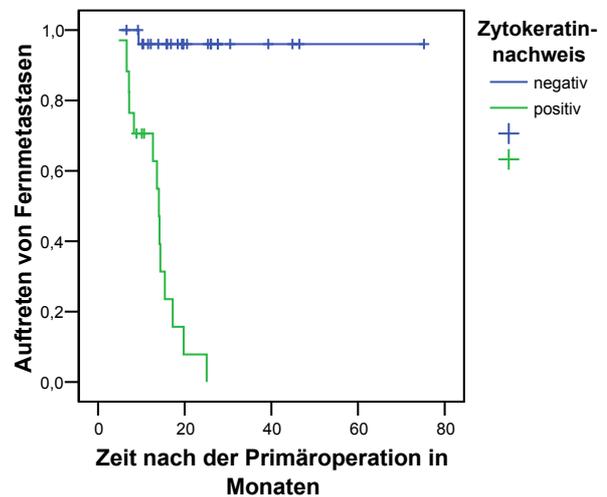
**Kaplan-Meier-Diagramm 8**

**Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 2**



**Kaplan-Meier-Diagramm 9**

**Auftreten von Fernmetastasen bei Ovarialkarzinompatientinnen mit R 2**



**Legende:**

**Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Ovarialkarzinompatientinnen mit belassenem Residualtumor (R<sub>2</sub>), aufgliedert dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.**

**(7) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,017)**

**(8) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit (P-Wert = 0,0883)**

**(9) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit (P-Wert < 0,0001)**

## **3.2. Die Patientinnen mit Mammakarzinom**

### **3.2.1. Der Nachweis von DTZ im Knochenmark**

Wie für die Ovarialkarzinomgruppe dienten die 191 Patientinnen, bei denen sich in der postoperativen histologischen Untersuchung der Anfangsverdacht eines malignen Geschehens nicht bestätigte, als Kontrollgruppe zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperreaktion. Bei keiner der 552 Patientinnen, bei denen erst kurz zuvor ein Mammakarzinom festgestellt wurde und die wieder in ihrer Krankengeschichte keine vorausgegangenen malignen epithelialen Erkrankungen aufwiesen, zeigten sich zum Zeitpunkt der Primäroperation klinische Anzeichen für das Vorhandensein von makroskopisch erkennbaren Fernmetastasen ( $M_0$ ). Bei dieser Gruppe konnten in 199 Fällen (36 %) CK+ Zellen nachgewiesen werden. Die überwiegende Mehrzahl der positiv befundeten Knochenmarksbiopsien (185 von 199 Proben) zeigte einzelne disseminierte Tumorzellen. Anders als in der Ovarialkarzinomgruppe zeigten sich jedoch auch in 7 % der CK+ Proben sog. Cluster, d.h. Aggregationen mehrerer Tumorzellen zu Zellhaufen, die als frühe Stadien sich entwickelnder Fernmetastasen interpretierbar sind. Das Verhältnis der zytokeratinpositiven Zellen zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen betrug ähnlich wie bei der Ovarialkarzinomgruppe im Durchschnitt drei CK+ Zellen pro  $2 \times 10^6$  untersuchte Knochenmarkszellen. Die Anzahl der identifizierten Zellen variierte dabei zwischen einer und 1223 markierter Zellen pro Probe.

### 3.2.2. Die klinischen Merkmale der Patientinnen

Die Mehrzahl der entfernten Primärtumore (58 %) maßen in ihrer maximalen Ausdehnung 2 cm oder weniger. Dies entspricht in der TNM-Klassifizierung einem Stadium pT1a-c. Dabei zeigte sich, dass bei Primärtumoren mit einem Durchmesser über 2 cm auch die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von CK+ Zellen stieg (P-wert < 0,001). Patientinnen mit pT1a zeigten in 23 % der Fälle einen knochenmarkspositiven Befund, mit pT1b in 35 % und mit pT1c in 30 %. Dabei betrug der P-wert 0,56 für die Unterschiede innerhalb der einzelnen Untergruppen. In der Gruppe der 19 Patientinnen mit inflammatorischem Mammakarzinom fanden sich in 15 Proben (79 %) CK+ Zellen (P-Wert < 0,001). Obgleich der Lymphknotenstatus als der Standardrisikofaktor für die Prognosebeurteilung angesehen wird, fand sich in etwa das gleiche Verhältnis von positiven zu negativen Knochenmarksbefunden beim Vergleich der beiden Gruppen von nodal negativen und nodal positiven Patientinnen (P-Wert = 0,13). Ein Drittel aller Patientinnen ohne klinische oder histopathologische Anzeichen einer Beteiligung der Lymphknoten zeigte bereits eine okkulte Tumorzellausbreitung im Knochenmark (100 von 301 Fällen). Wie die Tabelle 3<sup>9</sup> zeigt, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und dem Auffinden von DTZ im Knochenmark (P-Wert < 0,001). Alle angegebenen Werte basieren auf der Analyse der Häufigkeitsunterschiede bezüglich der Ausprägung verschiedener Merkmale mittels eines Chi<sup>2</sup>-Tests.

Tabelle 3

### Die klinischen Merkmale der 552 Patientinnen mit Mammakarzinom und Knochenmarksbiopsien

| Eigenschaften                                 | Patientinnen<br>(n= 552) | DTZ im Knochenmark |              | P-<br>Wert** |
|---|--------------------------|--------------------|--------------|--------------|
|   |                          | CK- * (n=353)      | CK+* (n=199) |              |
| <b>Durchschnittsalter</b>                     | 56                       | 56                 | 54           | 0,11         |
| <b>Menopausenstatus</b>                       |                          |                    |              | 0,3          |
| Prämenopausal                                 | 126                      | 78                 | 48           |              |
| Postmenopausal                                | 426                      | 275                | 151          |              |
| <b>Tumorgroße</b>                             |                          |                    |              | 0,001        |
| kleiner gleich 2 cm (pT1a-c)                  | 320                      | 226                | 94           |              |
| größer 2cm (pT2 und pT3)                      | 189                      | 110                | 79           |              |
| Haut- bzw. Brustwandinfiltration<br>(pT4 a-d) | 43                       | 17                 | 26           |              |
| <b>Grading</b>                                |                          |                    |              | 0,017        |
| G1  | 31                       | 22                 | 9            |              |
| G2  | 293                      | 201                | 92           |              |
| G3  | 228                      | 130                | 98           |              |
| <b>Lymphknotenmetastasen</b>                  |                          |                    |              | 0,001        |
| keine Lymphknotenmetastase                    | 301                      | 201                | 100          |              |
| 1-3 Lymphknotenmetastasen                     | 104                      | 79                 | 25           |              |
| 4-9 Lymphknotenmetastasen                     | 62                       | 36                 | 26           |              |
| mehr als 9<br>Lymphknotenmetastasen           | 85                       | 37                 | 48           |              |
| <b>Hormonrezeptorstatus</b>                   |                          |                    |              | 0,83         |
| positiv                                       | 289                      | 186                | 103          |              |
| negativ                                       | 263                      | 167                | 96           |              |
| <b>Histologie</b>                             |                          |                    |              | 0,001        |
| inflammatorischer Brustkrebs                  | 19                       | 4                  | 15           |              |
| andere  | 533                      | 349                | 184          |              |

**Legende:**

übernommen aus Braun et al. <sup>8</sup>

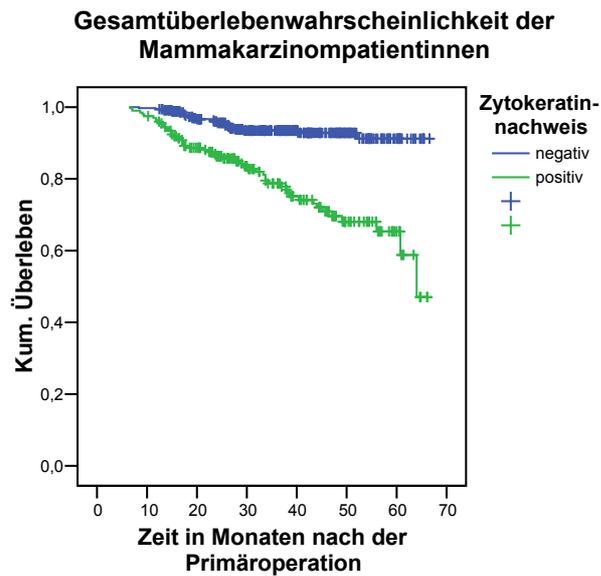
\* CK-Nachweis = Nachweis Zytokeratin positiver Zellen im Knochenmark

\*\* Die P-Werte basieren auf den Ergebnissen des Chi<sup>2</sup>-Tests, der die Unabhängigkeit von zwei Alternativmerkmalen untersucht

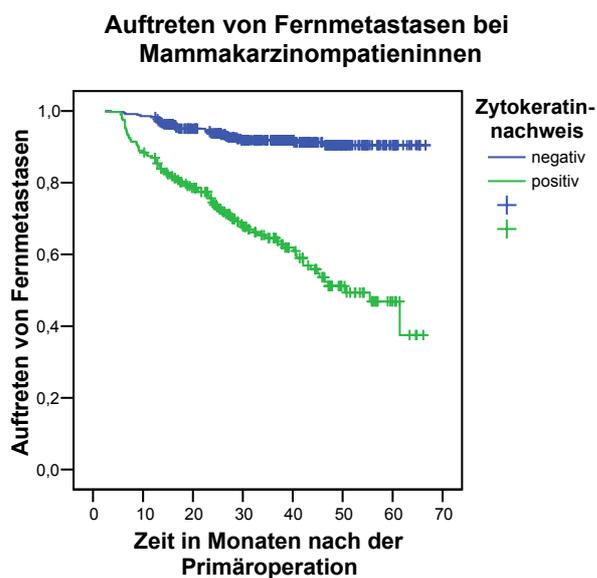
### **3.2.3. Die Korrelation des Nachweises von DTZ im Knochenmark mit dem klinischen Verlauf**

Bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 38 Monaten, der zwischen 10 Monaten und 70 Monaten variierte, zeigte sich bei 135 Patientinnen ein Wiederaufflammen des malignen Geschehens. Diese Rückfallgruppe setzte sich aus 28 Patientinnen (21 %) mit lokoregionären Rezidiven und 107 Patientinnen (79 %) mit Fernmetastasen zusammen. Von den 199 Patientinnen, bei denen CK+ Zellen im Knochenmark nachgewiesen wurden, trat im Untersuchungszeitraum bei 49 Patientinnen (25 %) ein tumorbedingter Tod ein. Demgegenüber verstarben in der knochenmarksnegativen Gruppe lediglich 6 % an ihrem Tumor. In der Gruppe der CK- Patientinnen erlitten 8 % (28 von 353 Fällen) einen Rückfall in Form einer Fernmetastase, gegenüber 40% in der Gruppe der Patientinnen mit CK+ Befund (79 von 199 Fälle). Die Gruppe der Patientinnen mit Fernmetastasen ließ sich nach dem Ort des Auftretens des Rezidives aufgliedern. Dabei zeigten Patientinnen mit alleinigen viszerale Metastasen viel seltener CK+ Zellen im Knochenmark als Patientinnen mit rein ossären oder kombiniert ossären und viszerale Metastasen (Balkendiagramm 1).

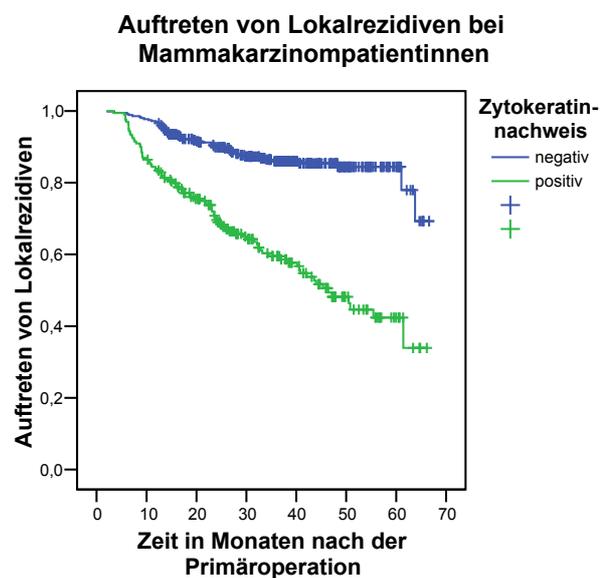
Kaplan-Meier-Diagramm 10



Kaplan-Meier-Diagramm 11



Kaplan-Meier-Diagramm 12



**Legende:**

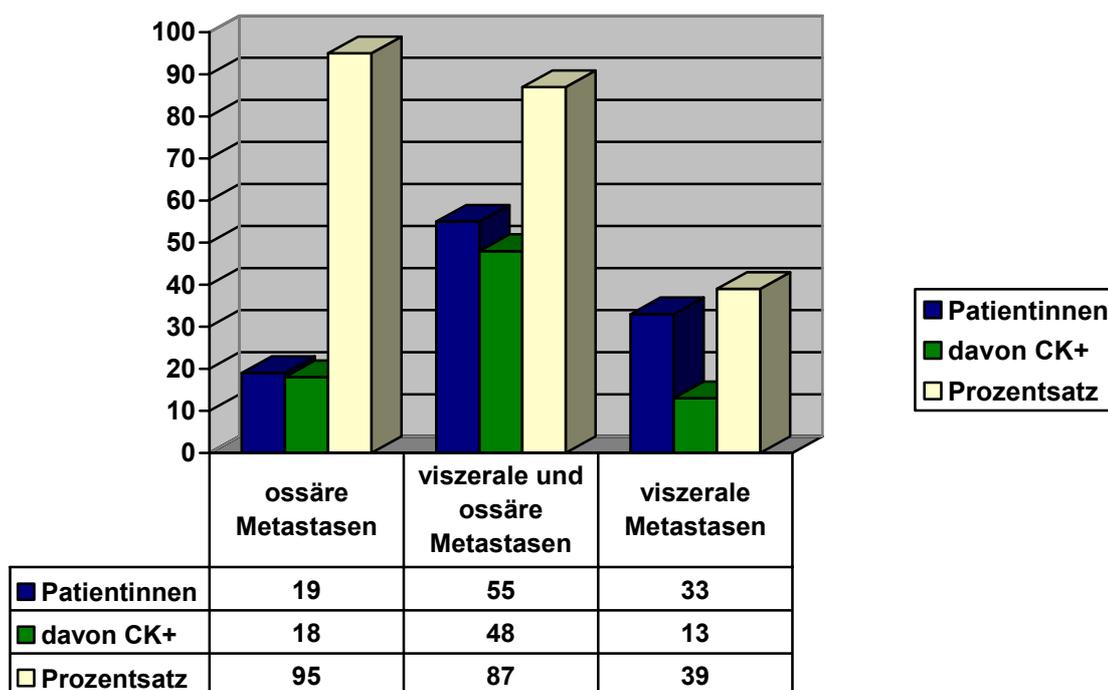
Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(10) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit (P-Wert < 0,0001)

(11) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit (P-Wert < 0,0001)

(12) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit (P-Wert < 0,0001)

## Korrelation zwischen dem Knochenmarksbefund und dem Ort der Metastasierung



48 der 353 Patientinnen mit negativem Knochenmarksbefund erlitten im Beobachtungszeitraum ein lokoregionäres Rezidiv (14 %) gegenüber 87 der 199 knochenmarkspositiven Patientinnen (44 %). Aus diesen Zahlen wird auch bezüglich dieses Kriteriums wieder eine deutlich schlechtere Prognose für Patientinnen mit Nachweis CK+ Zellen im Knochenmarksaspirat deutlich.

Auch hier wurde wieder eine Coxanalyse durchgeführt, um die prognostische Aussagekraft des Nachweises von DTZ im Knochenmark und deren Unabhängigkeit vom Lymphknotenstatus, dem Menopausenstatus, der Tumorgröße, der Tumoreinteilung, dem Hormonrezeptorstatus und dem Alter

zu überprüfen.<sup>8</sup> Für das Auftreten eines lokoregionären Rezidives konnte kein unabhängiger Prognosefaktor ermittelt werden. Im Gegensatz dazu stellten sich der Knochenmarksstatus, der Hormonrezeptorstatus und der Lymphknotenstatus als unabhängige Prognosefaktoren für das Auftreten von Fernmetastasen und für die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit dar. In allen multivariablen Analysen zeigte sich die Aussagekraft der Prognosefaktoren stark vermindert gegenüber der univariablen Analyse, mit Ausnahme der DTZ im Knochenmark (Tabelle 4).

Tabelle 4

**Univariate und multivariable Analyse der Einflussfaktoren auf den weiteren Krankheitsverlauf bei Mammakarzinompatientinnen**

**1. Erstmaliges Auftreten von Fernmetastasen im Beobachtungszeitraum**

| <b>Variable</b>                | Patientinnen mit Fernmetastasen/<br>Gesamtanzahl der Patientinnen | Univariate      |                     | Multivariabel   |                     | P-Wert |
|--------------------------------|---|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------|
|                                |   | RR <sup>4</sup> | 95% CI <sup>3</sup> | RR <sup>5</sup> | 95% CI <sup>3</sup> |        |
| <b>CK-Nachweis<sup>5</sup></b> |   |                 |                     |                 |                     |        |
| positiv                        | 79/199  | 5,99            | 3,89-9,23           | 6,07            | 3,91-9,42           | <0,001 |
| negativ                        | 28/353  |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>TumorgroÙe</b>              |   |                 |                     |                 |                     |        |
| > 5 cm                         | 81/497  | 3,37            | 2,17-5,25           | 1,91            | 1,18-3,08           | 0,007  |
| ≤ 5 cm                         | 26/55   |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Grading</b>                 |   |                 |                     |                 |                     |        |
| G1 oder G2                     | 43/324  | 2,24            | 1,56-3,21           |                 | k. S. <sup>2</sup>  | 0,35   |
| G3                             | 64/228  |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Lymphknotenmetastase</b>    |   |                 |                     |                 |                     |        |
| vorhanden                      | 76/251  | 3,52            | 2,32-5,35           | 2,07            | 1,01-4,25           | 0,045  |
| nicht vorhanden                | 31/301  |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Hormonrezeptorstatus</b>    |   |                 |                     |                 |                     |        |
| Negativ                        | 40/289  | 1,97            | 1,33-2,92           | 1,71            | 1,13-2,58           | 0,012  |
| Positiv                        | 67/263  |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |

**2. Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum**

|                                | Verstorbene Patientinnen/<br>Gesamtanzahl der Patientinnen | Univariate      |                     | Multivariabel   |                     | P-Wert |
|--------------------------------|--|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------|
|                                |  | RR <sup>4</sup> | 95% CI <sup>3</sup> | RR <sup>5</sup> | 95% CI <sup>3</sup> |        |
| <b>CK-Nachweis<sup>5</sup></b> |  |                 |                     |                 |                     |        |
| positiv                        | 49/199   | 4,28            | 2,59-7,09           | 4,17            | 2,51-6,94           | 0,001  |
| negativ                        | 22/353   |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>TumorgroÙe</b>              |  |                 |                     |                 |                     |        |
| > 5 cm                         | 52/497   | 3,55            | 2,10-6,01           |                 | k. S. <sup>2</sup>  | 0,058  |
| ≤ 5 cm                         | 19/55  |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Grading</b>                 |  |                 |                     |                 |                     |        |
| G1 oder G2                     | 26/324   | 2,43            | 1,55-3,82           |                 | k. S. <sup>2</sup>  | 0,28   |
| G3                             | 45/228   |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Lymphknotenmetastase</b>    |  |                 |                     |                 |                     |        |
| vorhanden                      | 55/251   | 4,94            | 2,82-8,65           | 2,88            | 1,10-7,56           | 0,031  |
| nicht vorhanden                | 16/301   |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |
| <b>Hormonrezeptorstatus</b>    |  |                 |                     |                 |                     |        |
| Negativ                        | 18/289   | 3,38            | 1,98-5,77           | 2,97            | 1,68-5,23           | 0,001  |
| Positiv                        | 53/263   |                 | R. G. <sup>1</sup>  |                 |                     |        |

**Legende:**

übernommen aus Braun et al. <sup>8</sup>

<sup>1</sup> R.G. Referenzgruppe

<sup>2</sup> k.S. keine Signifikanz; Aufgrund fehlender Signifikanz konnte keine Einschätzung des relativen Risikos vorgenommen werden

<sup>3</sup> CI Confidence Intervall

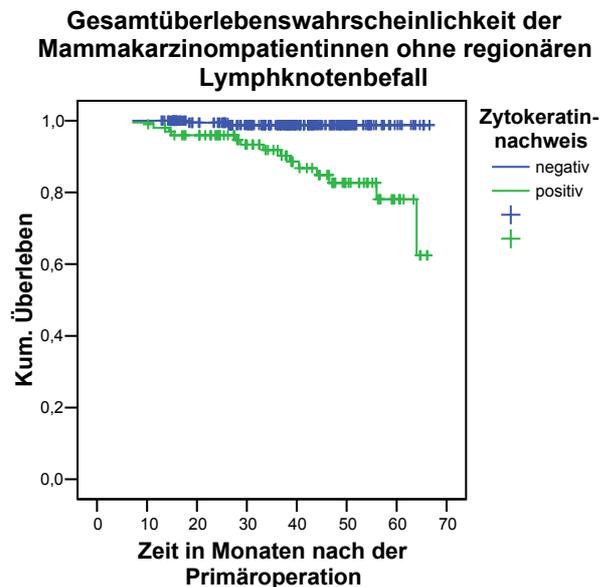
<sup>4</sup> RR relatives Risiko

<sup>5</sup> CK-Nachweis = Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark

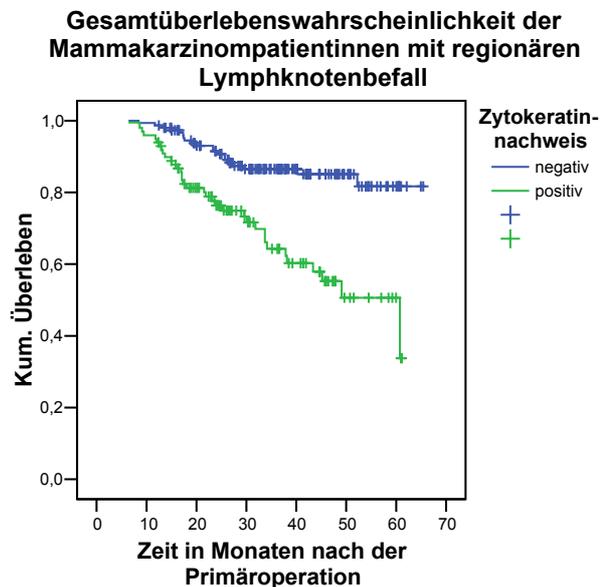
### **3.2.3.1. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Lymphknotenstatus**

Der Nachweis von Tumorzellen in den lokoregionären Lymphknoten ist ein Ausdruck für eine bereits erfolgte Streuung des Primärtumors. Aus diesem Grund werden die bei der Primäroperation gewonnenen Lymphknoten nach Malignitätsanzeichen untersucht. Für diese postoperativ erhobene Klassifizierung müssen mindestens zehn axilläre Lymphknoten entfernt werden. In der folgenden Analyse wurden die Mammakarzinompatientinnen in die Untergruppen der nodal negativen ( $N_0$ ) und der nodal positiven ( $N_1$ ) unterteilt. Teilt man die Gruppe der nodal negativen Patientinnen nach ihrem Knochenmarkstatus auf, so ergibt sich für die Patientinnen mit ZIK ohne regionären Lymphknotenbefall (Kaplan-Meier-Diagramm 13) 14 % Risiko für ein tumorbedingtes Ableben. Dieses unterscheidet sich nur geringfügig von den 13 % bei der Gruppe der knochenmarksnegativen, nodal positiven Patientinnen (Kaplan-Meier-Diagramm 14). Die Gruppe der Patientinnen, bei denen sowohl der Knochenmarksbefund als auch der Lymphknotenstatus negativ waren, zeigten die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit. Mit zwei aus 201 beobachteten Patientinnen betrug das Risiko dieser Gruppe nur 1 %. Die eindeutig schlechteste Prognose mit 35% ergab sich bei gleichzeitigem Nachweis von disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten sowie im Knochenmark.

Kaplan-Meier-Diagramm 13



Kaplan-Meier-Diagramm 14



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

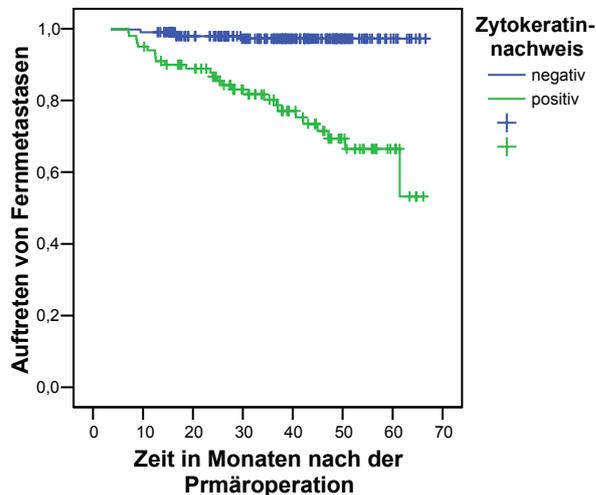
(13) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit ohne lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

(14) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

Fernmetastasen bei Patientinnen ohne regionären Lymphknotenbefall traten in 10 % der untersuchten Krankheitsverläufe auf. Ohne ZIK lag dieses Risiko bei 2 %, mit ZIK lag es bei 26 % (Kaplan-Meier-Diagramm 15). Bei Patientinnen mit regionärem Lymphknotenbefall traten in 30% der untersuchten Krankheitsverläufe Fernmetastasen auf. Ohne ZIK lag dieses Risiko bei 15 %, mit ZIK lag es bei 54 % (Kaplan-Meier-Diagramm 16).

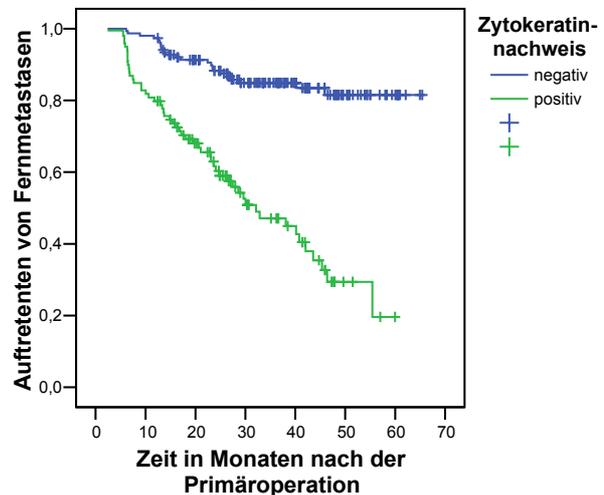
Kaplan-Meier-Diagramm 15

Auftreten von Fernmetastasen bei Patientinnen ohne regionären Lymphknotenbefall



Kaplan-Meier-Diagramm 16

Auftreten von Fernmetastasen bei Mammakarzinompatientinnen mit regionären Lymphknotenbefall



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(15) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit ohne lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

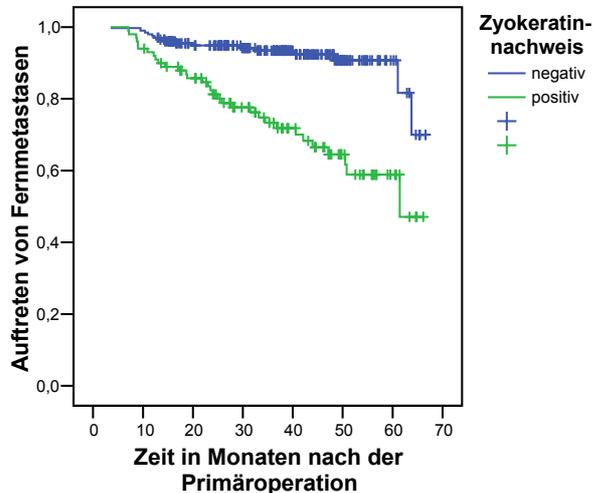
(16) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

Lokoregionäre Rezidive traten bei den untersuchten Mammakarzinompatientinnen ohne Beteiligung der regionären Lymphknoten mit einer Gesamtwahrscheinlichkeit von 16 % auf. Patientinnen, die dabei keine CK+ Zellen im Knochenmark aufwiesen, zeigten ein Risiko von 8 %, mit CK+ Zellen im Knochenmark betrug das Risiko 32 %.

Bei einer Beteiligung der regionären Lymphknoten traten lokoregionäre Rezidive bei den untersuchten Mammakarzinompatientinnen mit einer Gesamtwahrscheinlichkeit von 35 % auf. Patientinnen, die keine CK+ Zellen im Knochenmark aufwiesen, zeigten dabei ein Risiko von 26 %, mit CK+ Zellen im Knochenmark betrug das Risiko 56 %.

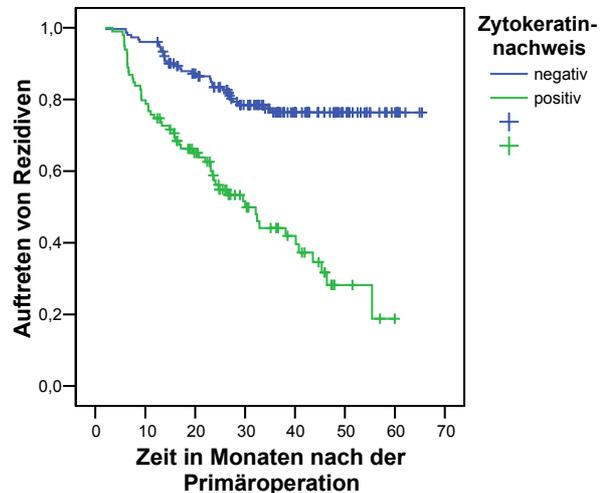
Kaplan-Meier-Diagramm 17

Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Patientinnen ohne regionären Lymphknotenbefall



Kaplan-Meier-Diagramm 18

Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Patientinnen mit regionären Lymphknotenbefall



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(17) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit ohne lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

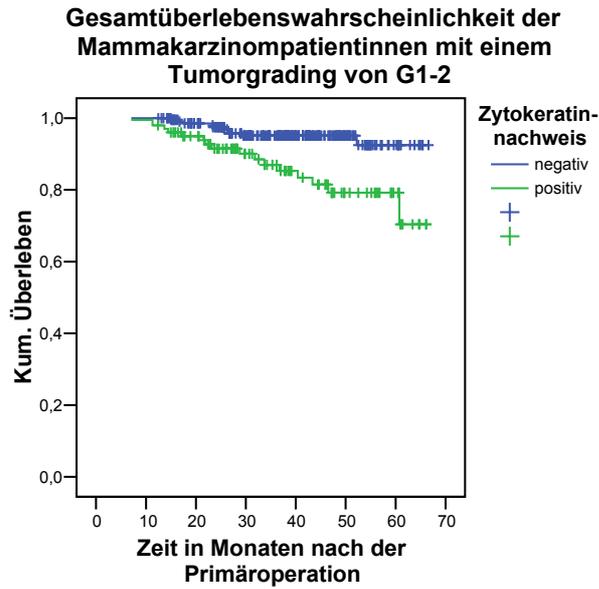
(18) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit lokoregionären Lymphknotenbefall (P-Wert < 0,0001)

### 3.2.3.2. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Tumorgrading

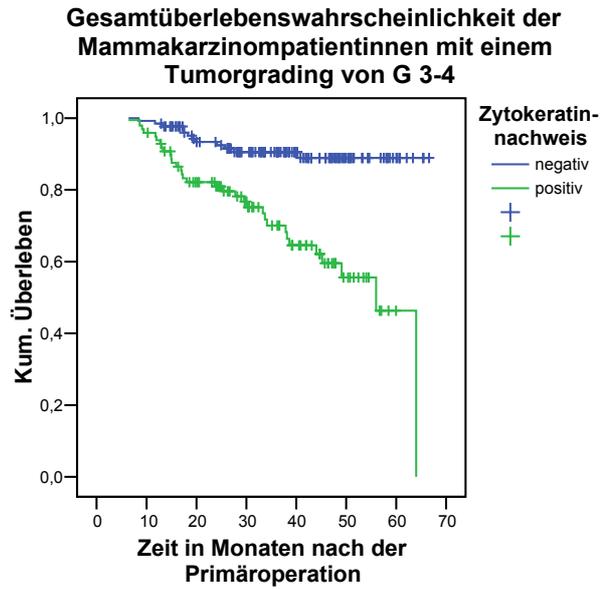
Mit Hilfe des Grading kann ein Tumor anhand seiner histologischen Differenziertheit eingeteilt und sein pathologisches Potenzial abgeschätzt werden.

In der Gruppe G 1-2 (Kaplan-Meier-Diagramm 19) betrug die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit 92 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 96 % gegenüber 84 % in der CK+ Untergruppe. In der Gruppe G 3-4 (Kaplan-Meier-Diagramm 20) ergaben sich die 80 % Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit aus 91 % für die CK- Patientinnen und 66 % für die CK+ Patientinnen.

Kaplan-Meier-Diagramm 19



Kaplan-Meier-Diagramm 20



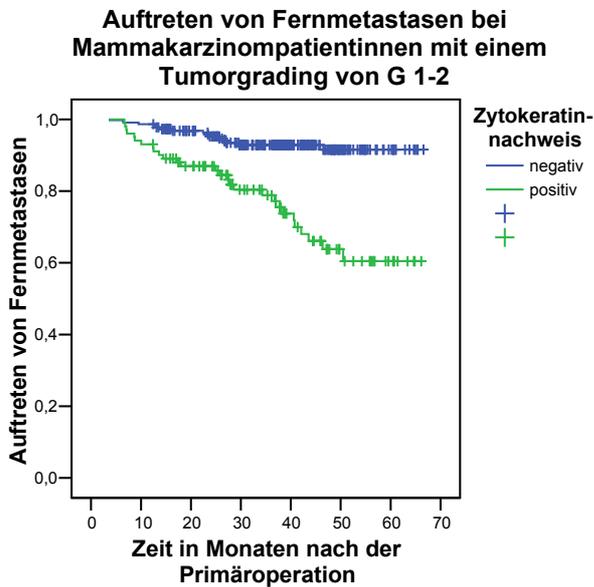
**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

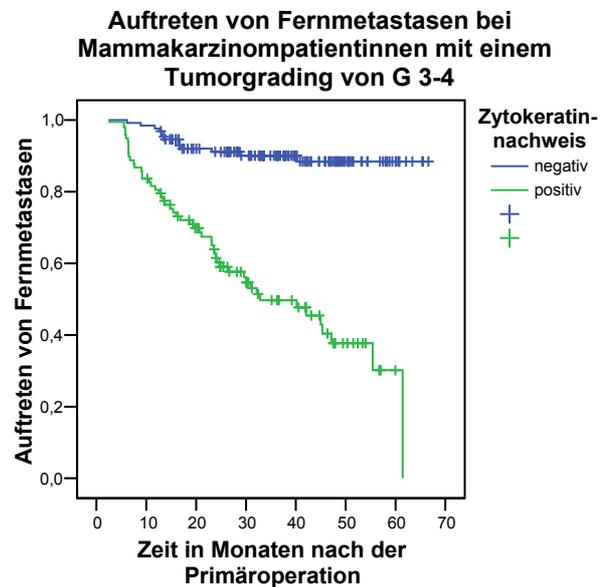
(19) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit einem Grading G1-2 (P-Wert = 0,001)

(20) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit einem Grading G 3-4 (P-Wert < 0,0001)

Kaplan-Meier-Diagramm 21



Kaplan-Meier-Diagramm 22



**Legende:**

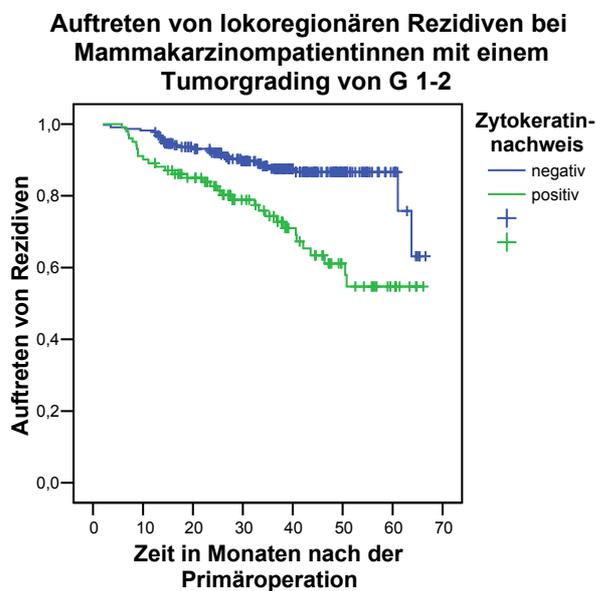
Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(21) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit einem Grading G 1-2 (P-Wert < 0,0001)

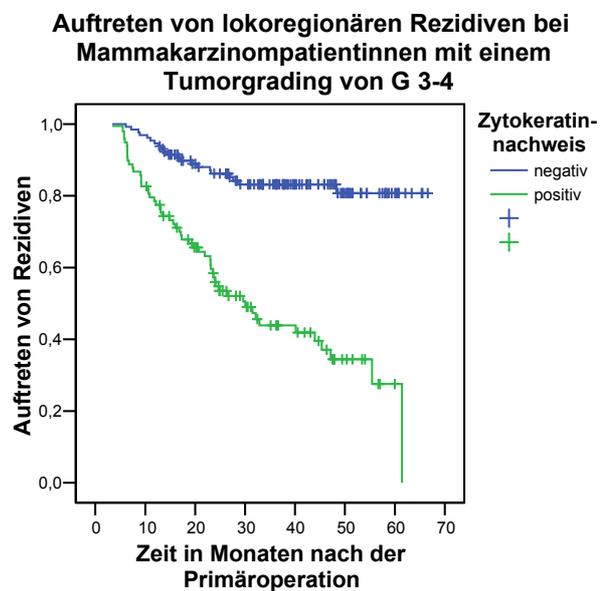
(22) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit einem Grading G 3-4 (P-Wert < 0,0001)

Das Auftreten von Fernmetastasen war in beiden Gruppen bei Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark deutlich erhöht. In der Gruppe G 1-2 (Kaplan-Meier-Diagramm 21) betrug die Wahrscheinlichkeit an einer Fernmetastase zu erkranken, 13 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 7 % gegenüber 28 % in der CK+ Untergruppe. In der Gruppe G 3-4 (Kaplan-Meier-Diagramm 22) ergaben sich die 18 % Metastasenwahrscheinlichkeit aus 10 % für die CK- Patientinnen und 52 % für die CK+ Patientinnen.

**Kaplan-Meier-Diagramm 23**



**Kaplan-Meier-Diagramm 24**



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(23) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einem Grading G 1-2 (P-Wert < 0,0001)

(24) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einem Grading G 3-4 (P-Wert < 0,0001)

Auch lokoregionäre Rezidive waren in beiden Gruppen bei Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark gehäuft aufgetreten. In der Gruppe G 1-2 (Kaplan-Meier-Diagramm 23) betrug die Wahrscheinlichkeit, an einem lokalen Rezidiv

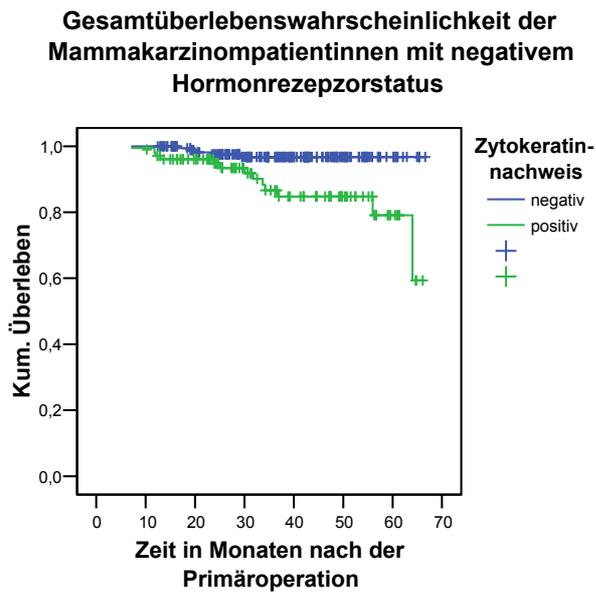
zu erkranken, 18 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 12% gegenüber 32 % in der CK+ Untergruppe. In der Gruppe G 3-4 (Kaplan-Meier-Diagramm 24) ergaben sich die 33 % Rezidivwahrscheinlichkeit aus 16 % für die CK-Patientinnen und 56 % für die CK+ Patientinnen.

### **3.2.3.3. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach dem Hormonrezeptorstatus**

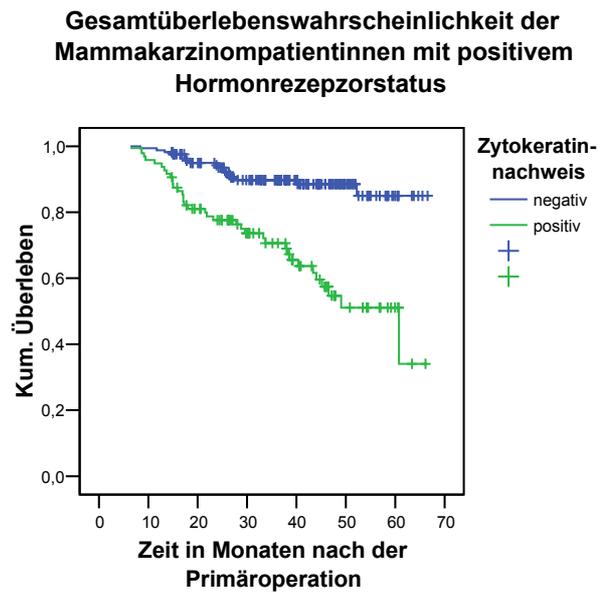
Hormonrezeptoren, wie Östrogen- oder Progesteronrezeptoren, auf den Oberflächen der Tumorzellen können, falls vorhanden, Ansatzpunkte gezielter endokriner Therapien hormonsensitiver Mammakarzinome mittels Antiöstrogenen oder Aromatasehemmern sein.

In der Gruppe der Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 25) betrug die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit 94 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 97 % gegenüber 87 % in der CK+ Untergruppe. Bei den Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 26) ergaben sich die 80 % Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit aus 90% für die CK- Patientinnen und 63 % für die CK+ Patientinnen. Dies entspricht einer ähnlichen Verteilung wie bei den Gradinguntergruppen.

Kaplan-Meier-Diagramm 25



Kaplan-Meier-Diagramm 26



**Legende:**

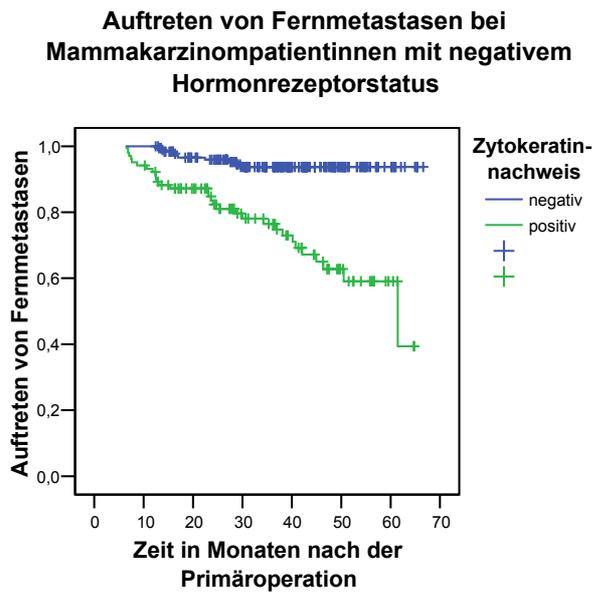
Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom mit positivem bzw negativem Östrogenrezeptorstatus, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(25) Gesamtüberlebenschancen mit einem negativem Rezeptorstatus (P-Wert = 0,0008)

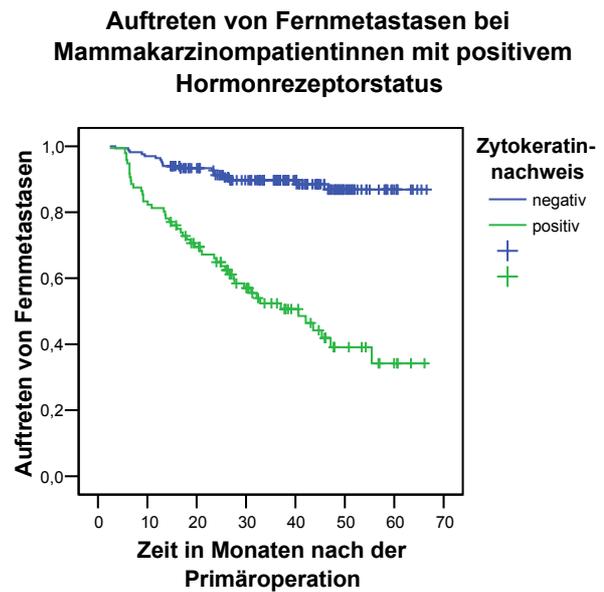
(26) Gesamtüberlebenschancen der mit einem positiven Rezeptorstatus (P-Wert < 0,0001)

In der Gruppe der Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 25) betrug die Gesamtüberlebenschancen 92 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 96 % gegenüber 83 % in der CK+ Untergruppe. Bei den Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 26) ergaben sich die 79 % Gesamtüberlebenschancen aus 89% für die CK- Patientinnen und 64 % für die CK+ Patientinnen.

Kaplan-Meier-Diagramm 27



Kaplan-Meier-Diagramm 28



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

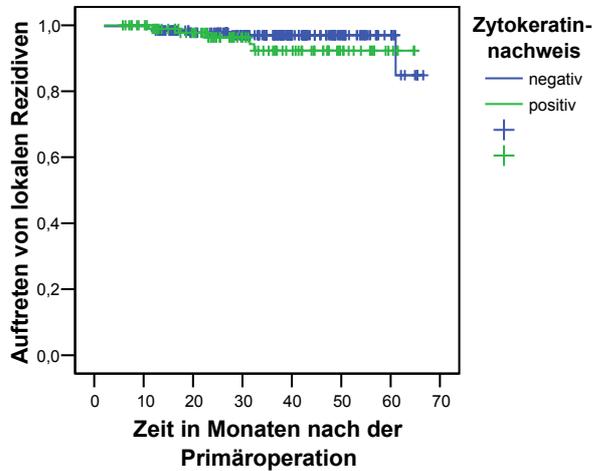
(27) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit einem negativem Östrogenrezeptorstatus (P-Wert < 0,0001)

(28) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit einem positiven Östrogenrezeptorstatus (P-Wert < 0,0001)

Das Auftreten von Fernmetastasen war in beiden Gruppen bei Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark deutlich erhöht. In der Gruppe mit negativem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 27) betrug die Wahrscheinlichkeit, an einer Fernmetastase zu erkranken, 14 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 5 % gegenüber 29 % in der CK+ Untergruppe. In der hormonrezeptorpositiven Gruppe (Kaplan-Meier-Diagramm 28) ergaben sich die 25% Metastasenwahrscheinlichkeit aus 11 % für die CK- Patientinnen und 51 % für die CK+ Patientinnen.

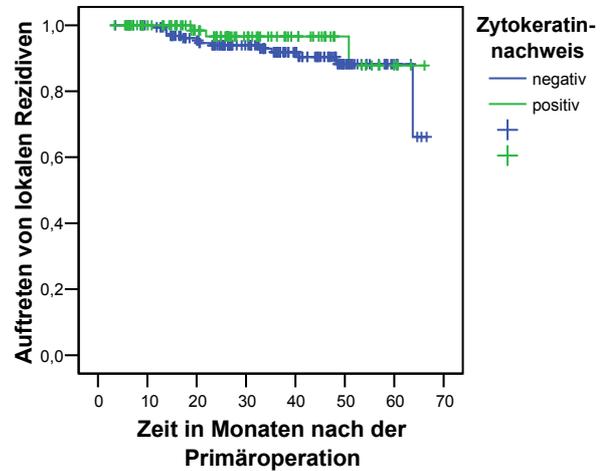
Kaplan-Meier-Diagramm 29

Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Mammakarzinompatientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus



Kaplan-Meier-Diagramm 30

Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei Mammakarzinompatientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(29) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einem negativem Östrogenrezeptorstatus (P-Wert = 0,3619)

(30) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einem positiven Östrogenrezeptorstatus (P-Wert = 0,3014)

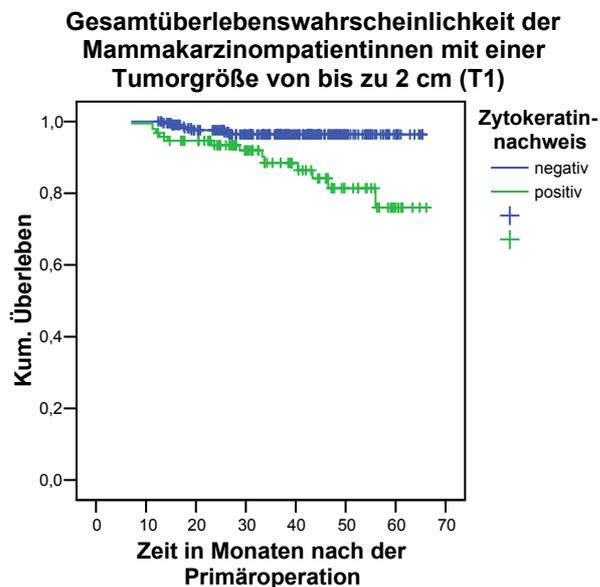
Lokoregionäre Rezidive waren in beiden Gruppen bei Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark gehäuft aufgetreten. In der Gruppe mit negativem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 29) betrug die Wahrscheinlichkeit, an einem lokalen Rezidiv zu erkranken, 4 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 3 % gegenüber 5 % in der CK+ Gruppe. In der Gruppe mit positivem Hormonrezeptorstatus (Kaplan-Meier-Diagramm 30) ergaben sich die 6 % Rezidivwahrscheinlichkeit aus 8 % für die CK- Patientinnen und 3 % für die CK+ Patientinnen.

### 3.2.3.4. Die Selektion der Mammakarzinompatientinnen nach der Größe ihrer Tumore

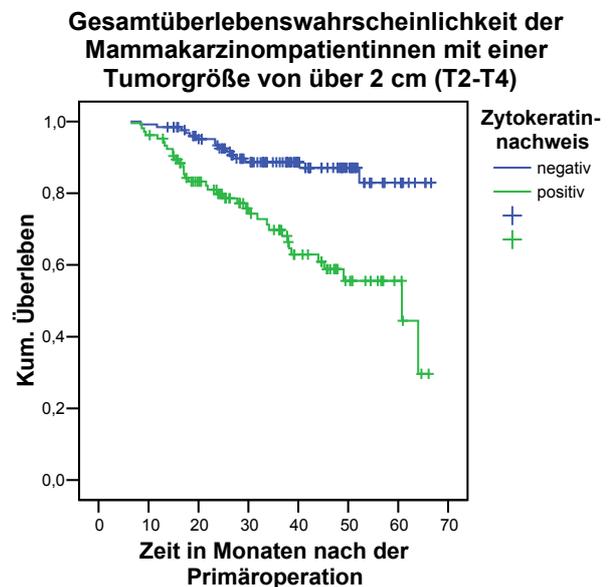
Mammakarzinome können anhand ihrer Größe in die Stadien T1-T4 eingeteilt werden. Dabei entspricht:

- T1 einer Größe bis zu 2 cm im größten Durchmesser
- T2 einer Größe von mehr als 2 cm aber weniger als 5 cm
- T3 einer Größe von mehr als 5 cm
- T4 jeder Größe bei direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Brusthaut

Kaplan-Meier-Diagramm 31



Kaplan-Meier-Diagramm 32



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(31) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit einer Tumorgröße kleiner gleich 2 cm (T1) (P-Wert = 0,0006)

(32) Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit mit einer Tumorgröße über 2 cm (T2-4). (P-Wert < 0,0001)

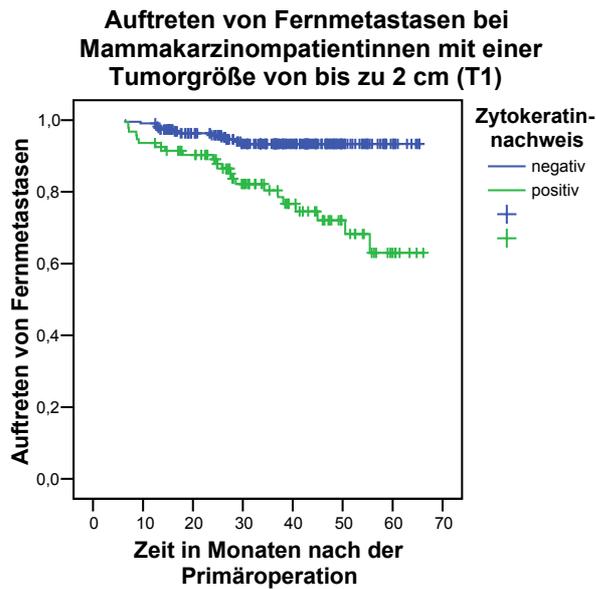
Es wurden die Patientinnen mit T1, d.h. einer maximalen Tumorgröße von 2 cm denen mit T2-T4 gegenübergestellt und verglichen. Für die Patientinnen mit einer Tumorgröße bis maximal zwei cm Durchmesser ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 94 %, den Untersuchungszeitraum zu überleben (Kaplan-Meier-Diagramm 31). Darunter zeigten die Patientinnen ohne ZIK eine Wahrscheinlichkeit von 97 % gegenüber 86 % in der Gruppe mit ZIK.

In der Gruppe der Patientinnen mit einer Tumoreinteilung T2-T4 betrug die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit 78 % (Kaplan-Meier-Diagramm 32), die sich aus 88 % für die Patientinnen ohne ZIK und 66 % für Patientinnen mit ZIK zusammensetzte.

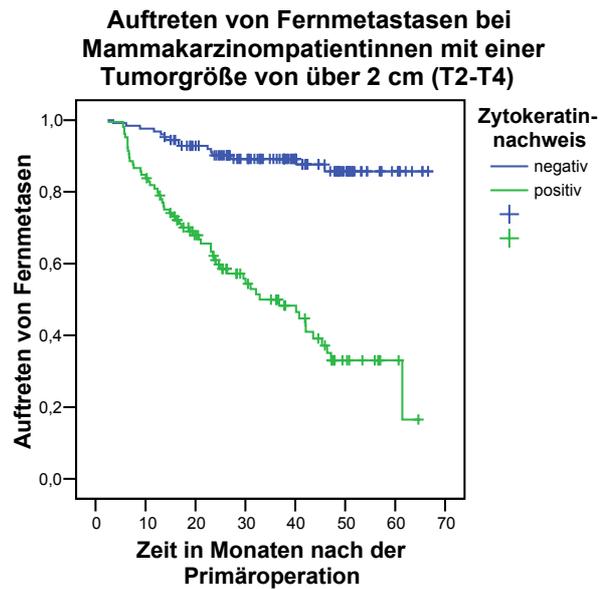
Das Auftreten von Fernmetastasen war in beiden Gruppen bei Nachweis von ZK+ Zellen im Knochenmark deutlich erhöht. In der Gruppe, welche einen Tumor mit einem maximalen Durchmesser von 2 cm hatte (Kaplan-Meier-Diagramm 33), betrug die Wahrscheinlichkeit, an einer Fernmetastase zu erkranken, 11 %. Dabei erreichte die CK- Untergruppe 6 % gegenüber 23 % in CK+ Untergruppe.

In der Gruppe der Patientinnen mit einer Tumorgröße von über 2 cm (Kaplan-Meier-Diagramm 34) ergaben sich die 31 % Metastasenwahrscheinlichkeit aus 22 % für die CK- Patientinnen und 54 % für die CK+ Patientinnen.

Kaplan-Meier-Diagramm 33



Kaplan-Meier-Diagramm 34



**Legende:**

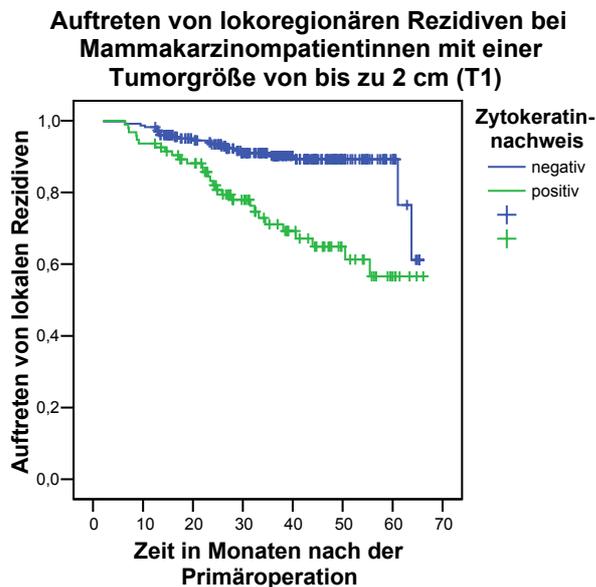
Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(33) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit mit einer Tumorgröße kleiner gleich 2 cm (T1) (P-Wert < 0,0001)

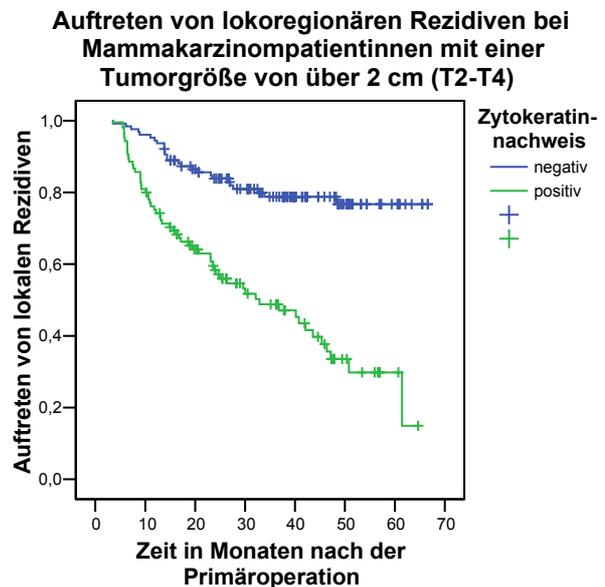
(34) Fernmetastasenwahrscheinlichkeit der mit einer Tumorgröße über 2 cm (T2-4) (P-Wert < 0,0001)

Lokoregionäre Rezidive traten in beiden Gruppen bei Nachweis von ZIK gehäuft auf. In der Gruppe der Patientinnen mit einer maximalen Tumordurchmesser von 2 cm (Kaplan-Meier-Diagramm 35) betrug die Wahrscheinlichkeit, an einem lokalen Rezidiv zu erkranken, 16 %. Dabei erreichte die Untergruppe ohne ZIK 10 % gegenüber 30 % in der CK+ Gruppe. In der Gruppe der Patientinnen mit einer Tumorgröße von über 2 cm (Kaplan-Meier-Diagramm 36) ergaben sich die 37 % Rezidivwahrscheinlichkeit aus 20 % für die CK- Patientinnen und 56 % für die CK+ Patientinnen.

Kaplan-Meier-Diagramm 35



Kaplan-Meier-Diagramm 36



**Legende:**

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patientinnen mit Mammakarzinom, aufgegliedert nach dem Zytokeratinnachweis im Knochenmark.

(35) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einer Tumorgröße kleiner gleich 2 cm (T1) (P-Wert < 0,0001)

(36) Lokalrezidivwahrscheinlichkeit mit einer Tumorgröße über 2 cm (T2-4) (P-Wert < 0,0001)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit Ausnahme der Gruppe der G<sub>3-4</sub>-Patientinnen die Unterschiede der Risikoverteilung bei CK+ und CK- in den Untergruppen nahezu derjenigen der Hauptgruppen entspricht. Nur bei den G<sub>3-4</sub>-Patientinnen zeigte sich bei ZIK eine über das Risiko der Gesamtgruppe hinausgehende Verschlechterung der weiteren Prognose der Erkrankung.

## 4. Diskussion

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren für Krebspatientinnen ist nach wie vor die Ausdehnung und Lage des Primärtumors zum Zeitpunkt der Primäroperation. Ist es zu diesem Zeitpunkt möglich, im Idealfall alle vorhandenen Tumorzellen chirurgisch zu entfernen, so ist eine vollständige Heilung theoretisch möglich. In der klinischen Beobachtung tritt jedoch schon frühzeitig eine Streuung des Tumors durch einzelne dislozierte Tumorzellen über den ganzen Körper ein. Diese verstreuten Tumorzellen bilden die Keimzellen für das spätere Auftreten von lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen und werden damit im weiteren Verlauf der Erkrankung ursächlich verantwortlich für das tumorbedingte Ableben der Patientinnen. Das Verständnis der Ursachen der Verbreitung dieser einzelnen Zellen, ihrer Wege und die Möglichkeiten der Nachvollziehbarkeit und der Beeinflussbarkeit dieser Vorgänge werden zentrale Gesichtspunkte zukünftiger Therapieansätze sein. Steven Paget beschrieb bereits 1889 mit seiner „seed and soil -Theorie“<sup>47</sup> die Vorstellung von einzelnen Tumorzellen (seed = der Samen), die in der Umgebung des Organs, in das sie verfrachtet wurden (soil = der Nährboden) als Keimzellen für weiteres Tumorwachstum auch fernab des eigentlichen Primärtumors fungierten. Einige früher nicht interpretierbare klinische Beobachtungen, wie zum Beispiel die Übertragung eines Malignoms vom Spender eines Transplantats zum Empfänger<sup>18 36</sup>, konnten erst mit Hilfe der Molekularbiologie erklärt werden. Basierend auf dieser Vorstellung der Tumorausbreitung begann man vor mehr als 20 Jahren<sup>15 53</sup>, aufgrund der sich Anfang der 80er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts entwickelnden immunzytochemischen Färbeverfahren, zunächst mit der gezielten Suche nach

okkulten metastatischen Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen. Weitere epitheliale Tumoren wie Magen<sup>29 31 40</sup>-, Pankreas<sup>54 62</sup>, Kolon<sup>16 67</sup>- und Ösophaguskarzinom<sup>43 56</sup> wurden und werden von verschiedenen Forschungsgruppen auf die Nachweisbarkeit von CK+ Zellen an Stellen fernab des eigentlichen Primärtumors untersucht. Neben dem Knochenmark wandte sich die Forschung bei residualen Tumoren epithelialen Ursprungs im Weiteren auch den lokoregionären Lymphknoten<sup>5 22</sup> und dem peripher-venösen Blut<sup>10 41</sup> zu. Aktuelle Versuche eines immunhistochemischen Nachweises von DTZ in der Leber<sup>28</sup> sind noch nicht über das Tierversuchsstadium hinaus. Einige Forschungsgruppen<sup>30 45</sup> versuchen neuerdings anstelle der immunzytochemischen Färbung den Tumorzellnachweis durch eine reverse Transkriptase-PCR-Technik zu ersetzen, erkaufen sich jedoch dabei die höhere Sensitivität ihrer Untersuchungstechniken mit einer geringeren Spezifität<sup>37</sup>. Die Aussagekraft des Nachweises okkultur Tumorzellen im Knochenmark auf die weitere Prognose des Krankheitsverlaufes war seit dem Beginn der Forschung auf diesem Gebiet sehr umstritten. So finden sich in der Literatur sowohl Studien, die den isolierten Tumorzellen im Knochenmark eine hohe Aussagekraft bezüglich der Streuung des Primärtumors zuschreiben<sup>13 20 25 34 65</sup>, als auch Studien, die keine Korrelationen fanden<sup>21 39 60 64</sup>. Eine Erklärung für diesen Widerspruch liegt in der fehlenden Einheitlichkeit der unterschiedlichen Versuchsaufbauten und der verschiedenartigen Antikörper und Färbemethoden. Die Prognosefähigkeit der angewandten Methoden wird maßgeblich von der Antikörperspezifität, der Verfahrenssensitivität, der gewonnenen Aspiratmenge, der Studiengruppengröße und der Dauer des Beobachtungszeitraumes beeinflusst. Es ist offensichtlich, dass mit einem für die jeweilige Tumorart inadäquaten Antikörper oder einem zu kurzen Beobachtungszeitraum keine signifikanten Korrelationen zwischen der

Auswertung der Knochenmarkspräparate und dem weiteren Krankheitsverlauf hergestellt werden kann. Die aktuellen Studien großer Patientinnengruppen sprechen, trotz unterschiedlicher Nachweisverfahren, für die prognostische Bedeutung der CK+ Zellen im Knochenmark<sup>19 23 24 38</sup>. Die Beobachtung, dass verschiedene Tumorarten in ihrer initialen Phase eine annähernd gleiche Anzahl an nachweisbaren Tumorzellen im untersuchten peripheren Gewebe (z.B. Knochenmark) zeigen, dieses einheitliche Bild sich mit zunehmendem Krankheitsverlauf jedoch weitaus differenzierter aufspaltet, spricht dafür, dass die Streuung der verschiedenen Tumore auf ähnliche Weise erfolgt, die einzelnen Zellen jedoch unterschiedliche Wachstumsbedingungen in ein und demselben Gewebe vorfinden.<sup>48</sup> Dieser Hypothese entspricht auch die Beobachtung, dass in der frühen Phase eines Kolonkarzinoms und eines Mammakarzinoms die Anzahl der im Knochenmark nachgewiesenen zytokeratinpositiven Zellen annähernd gleich ist, mit Fortschreiten der Erkrankung jedoch immer mehr okkulte Tumorzellen bei den Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden können, während dieser Anstieg aber bei den Kolonkarzinompatienten nicht so deutlich zu Tage tritt<sup>35</sup>. Zudem liegt die Anzahl der Knochenmarksmetastasen beim Mammakarzinom deutlich höher als beim Kolonkarzinom<sup>2</sup>. Setzt man das oben gesagte in Relation zu den beschriebenen Ergebnissen dieser Studie so stellen sich folgende Fragen:

1. Ist die oben beschriebene Methode der immunzytochemischen Färbung einzelner Zellen im Knochenmark ein adäquater Nachweis für eine Streuung des jeweiligen Primärtumors?
2. Welche prognostische Relevanz hat das Auftreten dieser einzelnen disseminierten Tumorzellen für die jeweilige Tumorart?

3. Welche Konsequenzen für die therapeutischen Maßnahmen ergeben sich aus diesen Schlussfolgerungen?

#### **4.1. Der Zytokeratinnachweis als Indikator für die Streuung des Primärtumors**

Schon mehreren Studien konnten zeigen, dass monoklonale Antikörper die gegen Zytokeratin gerichtet sind, als geeignetes Mittel dienen können, um einzelne epitheliale Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen,<sup>6 44 66</sup> da Zytokeratin ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts von epithelialen Zellen ist. Da im Knochenmark physiologischer Weise keine Epithelzellen vorkommen, legt dort der Nachweis von Zellen mit typischen epithelialen Merkmalen bei Patientinnen mit epithelialen Tumoren den Schluss nahe, dass es sich bei diesen Zellen um Abkömmlinge des Primärtumors handelt. Die Tatsache, dass diese isolierten Zellen chromosomale Aberrationen zeigen, die denen gleichen, die man üblicherweise in Tumorzellen findet,<sup>33</sup> ist ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei den angefärbten Zellen nicht um zufällig markierte atypische Knochenmarkszellen handelt, sondern dass diese Zellen sehr wahrscheinlich einzelne frühzeitige Ableger des Primärtumors sind. Die Heterogenität der verschiedenen Tumorzellen legt denn Schluss nahe, dass die Aussagekraft der Färbungen steigt, wenn nicht nur eine, sondern mehrere, verschiedene Arten von Zytokeratin erkannt und markiert werden. Aus diesem Grund richtet sich der in dieser Studie verwendete monoklonale Antikörper A45-B/B3 gegen die im Menschen am häufigsten vorkommenden Zytokeratine CK8, CK18 und CK19. Die auf diesem Wege erhöhte Sensitivität der Färbung mag eine Erklärung dafür sein, dass entgegen anderer Untersuchungen,<sup>11</sup> die mittels anderer Antikörper disseminierte Tumorzellen suchten und dabei keinen

Zusammenhang zum weiteren Krankheitsverlauf fanden, in den beiden untersuchten Gruppen der Nachweis von DTZ die Prognose der Patientinnen deutlich beeinflusste. Aus dem vorhergehenden lässt sich schließen, dass wir heute aufgrund verbesserter technischer Möglichkeiten eine weitaus größere Anzahl an DTZ im Knochenmark auffinden können, als dies mit den früher getesteten Antikörpern der Fall war. Doch allein die Tatsache, dass bei der Probeentnahme naturgemäß nur ein Teil des Knochenmarks entnommen und untersucht wird, macht klar, dass bei fehlendem Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen nicht davon ausgegangen werden kann, dass keine abgewanderten Primärtumorzellen im Knochenmark vorhanden sind. Das heißt, dass falsch negative Ergebnisse mit der oben beschriebenen Methode nicht auszuschließen sind, ihre Anzahl jedoch abnehmen wird, je höher die Anzahl der ausgezählten Zellen ist. In der Kontrollgruppe der 191 biopsierten Patientinnen, bei denen sich nach der Operation histologisch zeigte, dass der vermeintliche Tumor nicht maligne war, wurden die gewonnenen Proben jedoch standardmäßig und ohne Einblick der Befunder in den Histologiebefund aufbereitet. Die Tatsache, dass davon 189 Proben als negativ befundet wurden, spricht für die hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers A45-B/B3. Für die beiden möglicherweise falsch positive Ergebnisse gibt es drei Erklärungen. Neben der Möglichkeit, dass bei der Gewebeaufbereitung Fehler unterlaufen sein könnten, ist auch die Färbung einer Plasmazelle<sup>17</sup> möglich, die fälschlicherweise als Tumorzelle missgedeutet wurden. Zum anderen ist es denkbar, dass zum Zeitpunkt der Operation die resizierte tumorverdächtige Stelle zwar nicht bösartig war, jedoch an einer anderen Stelle im Körper ein sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht erkannter, jedoch bereits streuender epithelialer Tumor befand.

## **4.2. Die prognostische Aussagekraft der disseminierten Tumorzellen**

Beim Ovarialkarzinom, bei dem in etwa 40 % der Fälle im weiteren Krankheitsverlauf Fernmetastasen vorwiegend in der Leber, in der Lunge und im Skelett auftreten, konzentrieren sich heutzutage die Forschung, die klinische Diagnostik und die Therapie vorwiegend auf das intraperitoneale Geschehen. Diese Fokussierung der therapeutischen Ansätze auf lediglich einen Teilaspekt des Krankheitsgeschehens entspringt der Vorstellung, dass zumindest im Frühstadium der Erkrankung keine systemische Streuung erfolgt und falls doch eine auftritt, diese erklärt wird durch einen direkten Eintritt der Tumorzellen in das arterio-venöse System aufgrund der lokoregionären Ausdehnung des Primärtumors im fortgeschrittenen Stadium<sup>1</sup>.

Dieser Vorstellung widerspricht aber die Tatsache, dass in der untersuchten Patientinnengruppe sogar bei Tumoren die als Figo Ic eingeteilt wurden, eine Streuung bis ins Knochenmark nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausdehnung und Lage des lokoregionären Befundes einschließlich des Lymphknotenbefundes und dem späteren Auftreten von Fernmetastasen. Im Gegensatz dazu zeigte sich der Nachweis von ZIK als der einzige relevante Prognosefaktor für Fernmetastasen. Die Tatsache, dass bei fast 90 % der Patientinnen, bei denen im Verlauf ihrer Erkrankung Fernmetastasen auftraten, zum Zeitpunkt der Primäroperation bereits der Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark gelang, spricht für die hohe Aussagekraft der oben beschriebenen Methodik. Alle diese Daten legen den Schluss nahe, dass die Fernmetastasierung beim Ovarialkarzinom nicht einer zufälligen

Einschwemmung von Tumorzellen in das arterio-venöse System entspricht, sondern dass vielmehr die hämatogene Streuung eine dem jeweils individuellen Tumor eigene angeborene Fähigkeit ist und deren Quantität mittels des oben beschriebenen Verfahrens gut eingeschätzt werden kann. Diese Betrachtungsweise liefert auch eine Erklärung für die schon von Tarin beschriebene Beobachtung<sup>61</sup>, dass perito-venöse Shunts, die bei Patientinnen mit größeren Ovarialkarzinomen dazu dienen, den dabei auftretenden Aszites abzuleiten, keine signifikante Erhöhung der Lungenmetastasen zeigen. Würde man der gängigen Ansicht der Fernmetastasierung folgen, so wäre als Folge der Shunts und dem dabei massiven Einschwemmen von Tumormaterial in die Blutbahn im ersten folgenden Kapillarbett, in diesem Fall die Lunge, eine erhöhte Metastasierungsrate zu erwarten. Diese für das Ovarialkarzinom eindeutig festgestellte, allen bisherigen Untersuchungsmethoden überlegene prognostische Relevanz des Nachweises von DTZ im Knochenmark in Bezug auf ein späteres Auftreten von Fernmetastasen, stellt einen interessanten Aspekt in der klinischen Beurteilung der Aggressivität eines Tumors dar. Dabei darf aber die offensichtlich dominierende Bedeutung der intraperitonealen Ausdehnung des Tumors für das tumorbedingte Ableben der Patientinnen nicht außer Acht gelassen werden. Man geht heute davon aus, dass vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum erstmaligen Auftreten von Fernmetastasen ein Zeitraum zwischen 23 Monaten (Figo III) und 56 Monaten (Figo I)<sup>14</sup> vergeht, wohingegen das lokoregionäre Geschehen meist sehr viel rascher fortschreitet, so dass die Metastasen in der Regel die Überlebensraten der Patientinnen nicht wesentlich beeinflussen. Klinische Bedeutung kann diese Untersuchungsmethode also erst erlangen, wenn der Einfluss des lokoregionären Geschehens an Bedeutung verliert. Dies kann heutzutage, bei frühzeitig erkannten, möglichst vollständig operativ entfernten Ovarialkarzinomen, eine Möglichkeit sein, um das dann an

Bedeutung gewinnende Fortschreiten der Erkrankung an anderen Stellen im Körper beurteilen zu können. Das zentrale Problem bei der Therapie des Ovarialkarzinoms ist aber gerade der späte Zeitpunkt der Diagnosestellung und das daraus resultierende fortgeschrittene Stadium des Tumors. So berichtet Harris<sup>26</sup> in einer Studie von 2003 noch von 80 % der Patientinnen, die bei der Primäroperation eines Ovarialkarzinoms unter einen Tumor mindestens der Figo Stufe III oder IV litten. Bei Figo IV-Patientinnen beträgt die mittlere Überlebensdauer lediglich 9 Monate<sup>46</sup>, so dass metastatische Komplikationen keine tragende Rolle spielen können. Sollten in der Zukunft effizientere Methoden der Frühdiagnostik, neue Operationstechniken, verbesserte Chemotherapeutika oder sonstige diagnostische oder therapeutische Maßnahmen es ermöglichen, das intraperitoneale Wachstum besser zu kontrollieren, so ist es denkbar, dass die Fernmetastasen und damit der Nachweis von DTZ im Knochenmark an Bedeutung für die Überlebenswahrscheinlichkeit gewinnen kann.

Bei der Klassifizierung des Mammakarzinoms nimmt - neben der histologischen Beurteilung und der ursprünglichen Größe des Primärtumors - der Lymphknotenstatus zurzeit eine zentrale Rolle ein. Diese Einteilung nach dem klassischen TNM-Schema, die auch bei den Patientinnen dieser Untersuchungsgruppe angewandt wurde, soll dem Therapeuten bei der Auswahl der adäquaten adjuvanten Therapien helfen. Wie bereits oben beschrieben, ist die Aussagekraft des Lymphknotenstatus auf die Vorhersagbarkeit des Auftretens späterer Fernmetastasen begrenzt. Bei nahezu einem Drittel der Patientinnen entwickelt sich trotz negativem Lymphknotenstatus im weiteren Verlauf der Erkrankung eine oder mehrere Fernmetastasen, während mehr als 40% der Patientinnen, denen ein positiver Lymphknotenbefund eine scheinbar schlechte Prognose ausstellt, nach zehn Jahren immer noch leben. Sehr

aussagekräftig ist die Tatsache, dass wenn man die nodal negative Gruppe mit Nachweis von DTZ im Knochenmark mit der Untergruppe der nodal positiven Gruppe, bei denen kein Nachweis von DTZ gelang vergleicht, die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit beides Mal annähernd gleich war. Dies legt den Schluss nahe, dass, wie bereits Menard et al<sup>42</sup> vermuteten, der Lymphknotenbefund keine abschließende Aussage über eine mögliche Streuung des Tumors treffen kann. Beim Mammakarzinom ist, im Gegensatz zum Ovarialkarzinom, das lokoregionäre Geschehen in der Regel nicht die Hauptursache für ein tumorbedingtes Ableben der Patientinnen. Vielmehr sind die auftretenden Fernmetastasen ursächlich für die verkürzte Lebenserwartung. Deshalb dürften, falls der Nachweis von ZIK ein Gradmesser für die hämatogene Streuung des Primärtumors darstellt, CK+ Zellen mit einer verkürzten Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen. In dem beobachteten, medianen Vierjahreszeitraum zeigten Patientinnen mit CK- Befunden eine Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von 93%, wogegen lediglich 68 % der Patientinnen mit positiven Befunden des Knochenmarks zu Untersuchungsende noch lebten. Gerade ossäre Metastasen waren in ihrem Auftreten eng korreliert mit dem Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark, was den Verdacht weiter erhärtet, dass diese DTZ die Keimzellen späterer makroskopisch auftretender Fernmetastasen sind.

Bei den Untergruppen der Ovarialkarzinompatientinnen zeigte sich, dass die Aufteilung in  $R_{0-1}$  und  $R_2$  keine Verbesserung, sondern eine deutliche Verschlechterung der prognostischen Aussagekraft des Knochenmarksstatus brachte. Der Nachweis von ZIK im Knochenmark zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben, das Auftreten von Fernmetastasen bzw. lokoregionärer Rezidive der Patientinnen mit  $R_{0-1}$ . Der Umkehrschluss, dass die Unterschiede der Gesamtgruppe deshalb

umso deutlicher in der R<sub>2</sub>-Gruppe zu Tage treten müssen, deutet sich zwar in den Daten an, ist aber leider nicht zu erbringen, da diese Gruppe für eine fundierte statistische Aussage zu dieser Fragestellung zu klein ist.

In der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen war, aufgrund der Anzahl der Patientinnen, die statistische Aussagekraft der Analysen der einzelnen Untergruppen besser. Für die kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen zeigte sich keine relevante Verbesserung der Prognosekraft des Knochenmarkstatus für die einzelnen Untergruppen im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Lediglich in der Untergruppe der G<sub>3-4</sub> Patientinnen lag der Unterschied zwischen der weiteren Lebenserwartung der Patientinnen mit und ohne ZIK deutlich über der der Gesamtgruppe. Diese Aussage gilt auch für die Analyse der Fernmetastasenhäufigkeit und das Auftreten von lokoregionären Rezidiven bei dieser Untergruppe. Für beide Merkmale zeigte sich wieder nur in der Gruppe der G<sub>3-4</sub>-Patientinnen eine gesteigerte Prognosekraft der ZIK im Vergleich zur Gesamtgruppe der Mammakarzinompatientinnen. Diese Zahlen deuten darauf hin, dass lediglich das histopathologische Grading eine sinnvolle Ergänzung ist, die prognostische Aussagekraft der DTZ weiter zu steigern. Unabhängig von den Untergruppen bleibt die Bestimmung der ZIK für die Gesamtzahl der Patientinnen mit Mammakarzinom ein wichtiges Kriterium zur weiteren Prognosebeurteilung.

### **4.3. Die klinisch-therapeutischen Konsequenzen**

Wie bereits oben beschrieben, ist beim Ovarialkarzinom heutzutage das lokoregionäre Geschehen der Hauptgrund für das frühzeitige tumorbedingte Ableben der Patientinnen so dass der ZIK nur bei optimal operierten Patientinnen, bei denen die Erkrankung im Frühstadium erkannt wurde, eine

signifikante Rolle spielen kann. Durch zu erwartende zukünftige Therapieverbesserungen, die das intraperitoneale Wachstum verlangsamen könnten, würde die Fernmetastasierung und damit das Erkennen der DTZ wieder mehr an Bedeutung gewinnen. Für die Mehrzahl der heute leider immer noch erst in einem relativ fortgeschrittenen Stadium erkannten Ovarialkarzinome hat der Knochenmarksstatus keine klinische Aussagekraft in Bezug auf das weitere Überleben der Patientinnen. Einfluss auf therapeutische Maßnahmen ist aber, wie schon von Braun et al<sup>7</sup> beschrieben hat, denkbar, wenn der Knochenmarksstatus als Mittel zur Überprüfung des Ansprechens eines Tumors auf die jeweils angewandte Chemotherapie verwendet wird. Bei den in dieser Studie untersuchten Hochrisikopatientinnen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Knochenmarkbefunde, die jeweils prä- und postchemotherapeutisch erhoben wurden. Eine Erklärung für diese Beobachtung liegt in der Tatsache, dass, wie Pantel et al<sup>50</sup> zeigen konnte, diese CK+ Zellen in den frühen Stadien einer Tumorerkrankung nicht proliferieren und deshalb auch nicht chemotherapiesensibel sind. Damit erklärt sich auch das oftmalige Versagen einer hochdosierten Chemotherapie zur Verhinderung späterer Fernmetastasen. Die monoklonale Antikörpertherapie geht mit ihrem Ansatz, die einzelne Tumorzelle zu eliminieren, bereits auf Überlegungen Paul Ehrlich und seiner Zauberkugeln, den so genannten „magic bullets“<sup>58</sup> zurück, deren Aufgabe es sein sollte, Medikamente gezielt an ihren Wirkort zu transportieren. Trotz anfänglicher Euphorie konnte dieser Therapieansatz bei fortgeschrittenen Mamma- und Kolonkarzinomen die in ihn gesetzte Hoffnung in den ersten klinischen Studien<sup>55 59</sup> nicht erfüllen. Der fehlende Therapieerfolg, gerade bei fortgeschrittener Erkrankung, ist wahrscheinlich auf den mangelnden Zugang der Makromoleküle zu den einzelnen Zellen in großen soliden Tumoren zurückzuführen. Gerade die zu Beginn einer Erkrankung meist singulär

auftretenden okkulten Tumorzellen versprechen aufgrund ihrer leichteren Zugänglichkeit ein höheres Ansprechen auf solche Therapieansätze. Auch in der klinischen Forschung ist ein Einsatz denkbar, bei dem der Effekt neuer Pharmaka auf die einzelne im Knochenmark isolierte Tumorzelle überprüft werden könnte und damit langjährige und kostenintensive klinische Studien vereinfachen oder gar überflüssig machen könnte.

Aufgrund der größeren Bedeutung der Fernmetastasierung für die Pathologie des Mammakarzinoms im Vergleich zum Ovarialkarzinom, kommt hierbei dem Nachweis residualer Tumorzellen mehr Aussagekraft zu. Der Beobachtungszeitraum von lediglich 4 Jahren ist für eine eindeutige Aussage über die prognostische Relevanz des Nachweises von DTZ im Knochenmark für die Fernmetastasierung, die teilweise 15 Jahre und länger nach Diagnose des Primärtumors auftreten kann, zu kurz. Das verbesserte Verständnis für die Mechanismen der Metastasierung ermöglicht jedoch neue Forschungsansätze und Anhaltspunkte für eine möglichst effektive und zugleich schonende Therapie. Dies bedeutet, dass das Vorhandensein von CK+ Zellen im Knochenmark eine erhöhte systemische Streufähigkeit des Primärtumors nahe legt, so dass in diesen Fällen eine aggressivere, adjuvante Therapie indiziert scheint. Welcher Art diese Therapien sein sollen und in welcher Kombination diese idealerweise zu erfolgen haben, konnte mit dieser Untersuchung nicht ermittelt werden und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Im Gegensatz dazu ist der Nutzen weitergehender Therapien und deren Auswirkung auf die Lebensqualität der Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus bei gleichzeitig negativem Knochenmarksstatus kritischer abzuwägen als bisher. All diese Schlussfolgerungen sind nur Anleitungen für ein therapeutisches Vorgehen und müssen der jeweiligen Situation des Einzelfalles angepasst und hinterfragt werden.

Für beide Gruppen kann gesagt werden, dass der Knochenmarkstatus in seiner Vorhersagekraft für das spätere Auftreten von Fernmetastasen den Lymphknotenstatus übertrifft. Aufgrund der unterschiedlichen Bedeutung des lokoregionären Geschehens für die weitere Entwicklung der Krankheitsgeschichte kommt dieser Erkenntnis der Therapie von Ovarialkarzinompatientinnen heute zumindest eine geringere Bedeutung zu als bei der Therapie des Mammakarzinoms.

## **5. Zusammenfassung**

Bei 552 Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom und 96 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die sich in der I. Frauenklinik München Innenstadt bzw. der Frauenklinik des Zentralklinikums Augsburg aufgrund ihres Tumors operieren ließen, wurde der Einfluss des immunzytochemischen Nachweises einzelner CK+ Zellen im Knochenmarkspunktat auf die weitere Entwicklung der Krankengeschichte untersucht. Zum Zytokeratinnachweis wurde der mononukleäre Antikörper A45-B3 verwendet, der sich gegen die in Tumorzellen häufig auftretende Zytokeratinpolypeptide, unter anderem die Heterodimere 8/18 und 8/19, richtet. Der dabei gewählte Nachuntersuchungszeitraum betrug 4 Jahre. Die hierbei gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier-Diagrammen statistisch ausgewertet. Es zeigte sich in beiden Gruppen eine deutliche und alleinige Vorhersagefähigkeit für das weitere Überleben, das spätere Auftreten von Fernmetastasen und möglicher lokoregionärer Rezidive. Bei der Analyse mehrerer Untergruppen konnte lediglich für die Patientinnen mit G<sub>3-4</sub> eine Verbesserung der Prognosefähigkeit gegenüber der Hauptgruppe nachgewiesen werden. Diese Daten lassen sich erklären, wenn man die einzelnen CK+ Zellen als erste Vorläufer und Keime einer späteren Fernmetastasierung sieht. Das maligne Potenzial des jeweiligen Tumors, in Bezug auf die Bildung von Fernmetastasen, scheint mit dieser Methode zu einem sehr frühen Stadium, bei dem sonst klinisch die Fernmetastasierung noch keine Rolle spielt, bereits abschätzbar zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik des lokoregionären Wachstums spielt diese Erkenntnis in den beiden Tumorarten eine unterschiedliche Rolle. Während beim Mammakarzinom die Metastasen oft

Ursache für das tumorbedingte Ableben der Patientinnen darstellen, zeigt sich bei Ovarialkarzinompatientinnen der intraperitoneale Zustand als kritische Einflussgröße für die Lebenserwartung. Daraus ergibt sich, dass zum heutigen Zeitpunkt dem Nachweis von CK+ Zellen im Knochenmark bei der Therapieentscheidung für das Mammakarzinom eine große Bedeutung für das Ovarialkarzinom im frühen Stadium eine geringe und im fortgeschrittenen Stadium keine Bedeutung zukommt. Seine Bedeutung in der Kontrolle adjuvanter Therapien, sowohl für ganze Untersuchungsgruppen als auch später zur Überprüfung des unterschiedlichen Ansprechens von Tumoren auf spezielle Therapien im Einzelfall, sind mögliche weitere Anwendungsgebiete der oben beschriebenen Färbemethode. Diese Ausweitung des Anwendungsgebietes dieser Methode bedarf jedoch einer Überprüfung in weiterführenden Studien.

## **6. Literaturverzeichnis**

---

<sup>1</sup> Abdul-Karim F., Kida M., Wentz W. et al: Bone metastasis from gynecologic carcinomas: a clinopathologic study; *Gynecological Oncology*;39:442-445;1990

<sup>2</sup> Bonnhaim DC, Petrelli NJ et al, Osseous metastases from colorectal carcinoma, *Am J Surgery*;151:457-9;1986

<sup>3</sup> Borgen E., Naume B., Nesland J., et al: Standardisation of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood: I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*; 1:377-88;1999

<sup>4</sup> Braun S, Mikrometastasen im Knochenmark – ein Therapiekriterium? 54. Kongress der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Springer S 219-221;2003

<sup>5</sup> Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, 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.* Mar 1;19(5):1468-75;2001

<sup>6</sup> Braun S., Harbeck N., Recent advances in technologies for the detection of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients, *Breast Cancer Res*; 3 (5): 285–288;2001

<sup>7</sup> Braun S., Kentenich C., Janni W., 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.*; Jan;18(1):80-6;2000

---

<sup>8</sup> Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G.N Engl J Med Jul 27;343(4):308 Erratum; 2000

<sup>9</sup> Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kentenich C, Riethmuller G, Pantel K.; Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. J Clin Oncol. Jan 15;19(2):368-75; 2001

<sup>10</sup> Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, Bogelman G, Zemer R, Zimlichman S, Klein A; Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung; Cancer. Dec 1;86(11):2398-405;1999

<sup>11</sup> Courtemanche DJ., Worth A., Coupland R., Rowell J., Macfarlane J., : Monoclonal antibody licr-lon-m8 does not predict the outcome of operabel breast cancer. Canadian Journal of Surgery;34:21-6;1991

<sup>12</sup> Cox DR: Regression Models and life-tables; J R Stat Soc; 34:187-220,1972

<sup>13</sup> Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS; Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction; J Clin Oncol. Mar;12(3):475-82;1994

<sup>14</sup> Dauplat J., Hacker N., Nieberg R., et al: Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. Cancer;60:1561-66;1987

<sup>15</sup> Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Lumley H, Imrie S, Jones M, Coombes RC, Neville AM; Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer; J R Soc Med. May;76(5):359-64;1983

---

**<sup>16</sup> Deng H, Shu XJ, Zhen HY, Deng L, Chen Y, Liu LJ; Prognostic significance of lymph node micrometastasis in colorectal cancer; Ai Zheng. Jul;22(7):762-6;2003**

**<sup>17</sup> Doglioni C., Dell'Orto P., Zanetti G., Iuzzolino P., Coggi g., Viale G., Cytokeratin-immunoreactive cells of human lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions: an immunocytochemical study. Virchows Arch.;416:479-90;1990**

**<sup>18</sup> Donovan JA, Simmons FA, Esrason KT, Jamehdor M, Busuttil RW, Novak JM, Grody WW; Donor origin of a posttransplant liver allograft malignancy identified by fluorescence in situ hybridization for the Y chromosome and DNA genotyping; Transplantation. Jan 15;63(1):80-4;1997**

**<sup>19</sup> 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 Natl Cancer Inst. Nov 20;88(22):1652-8;1996**

**<sup>20</sup> Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC; Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation; J Clin Oncol. Jun;14(6):1868-76;1996**

**<sup>21</sup> Funke I, Schraut W; Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated; J Clin Oncol. 1998 Feb;16(2):557-66;1998**

**<sup>22</sup> Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Jaeger W, Mitze M; Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients- prognostic relevance after 10 years; Anticancer Res. Sep-Oct;23(5b):4319-24;2003**

- 
- <sup>23</sup> 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.* Aug 15;19(16): 3669-74.;2001
- <sup>24</sup> Gerber B, Krause 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.* Feb 15;19(4):960-71;2001
- <sup>25</sup> Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W; Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up; *Br J Cancer.* Mar;69(3):566-71;1994
- <sup>26</sup> Harris MA, Delap LM, Sengupta PS, Wilkinson PM, Welch RS, Swindell R, Shanks JH, Wilson G, Slade RJ, Reynolds K, Jayson GC; Carcinosarcoma of the ovary; *Br J Cancer.* Mar 10;88(5):654-7;2003
- <sup>27</sup> Hermanek P; Wittekind C; Seib HJ, TNM Aktuell. 5. TNM-Klassifikation und Stadiengruppierung, *Zentralbl Chir*;122(10):934-7;1997
- <sup>28</sup> Ikawa K, Terashima Y, Sasaki K, Tashiro S; Genetic detection of liver micrometastases that are undetectable histologically; *J Surg Res.* Jul;106(1):124-30; 2002
- <sup>29</sup> Jonas S, Weinrich M, Tullius SG, Al-Abadi H, Steinbrich R, Radke C, Klupp J, Neuhaus P; Microscopic tumor cell dissemination in gastric cancer; *Surg Today.*;34(2):101-6;2004
- <sup>30</sup> Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, Yim HE, Park JS, Soh EY, Kim MW, Park HB; Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients; *Jpn J Clin Oncol.* Apr;33(4):167-72;2003

- 
- <sup>31</sup> **Takeji Y, Maehara Y, Shibahara K, Hasuda S, Tokunaga E, Oki E, Sugimachi K; Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation to angiogenesis; Gastric Cancer. May;2(1):46-51;1999**
- <sup>32</sup> **Kaplan EL, Meier P; Nonparametric estimation from incomplete observations; J Am Stat Assoc 53:457-481,1958**
- <sup>33</sup> **Klein C., Schmidt-Kittler O., Schardt J., Pantel K., Speicher M., Riethmüller G., Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA Sequence analysis of single cells. Proc Natl Acad Sci USA;96:4494-9;1999**
- <sup>34</sup> **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. May;49(1):27-33;1998**
- <sup>35</sup> **Lindemann F, Schliemok G, et al, Prognostic Significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients, Lancet;340:685-9;1992**
- <sup>36</sup> **Loh E, Couch FJ, Hendricksen C, Farid L, Kelly PF, Acker MA, Tomaszewski JE, Malkowicz SB, Weber BL; Development of donor-derived prostate cancer in a recipient following orthotopic heart transplantation; JAMA. Jan 8;277(2):133-7;1997**
- <sup>37</sup> **Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel K, Rusch V; Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors; J Clin Oncol. Jul 1;21(13):2609-15; 2003**
- <sup>38</sup> **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. Jul 17;354(9174):197-202;1999**

- 
- <sup>39</sup> Mathieu MC, Friedman S, Bosq J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, Contesso G; Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer; *Breast Cancer Res Treat.* Jan;15(1):21-6;1990
- <sup>40</sup> Matsunami K, Nakamura T, Oguma H, Kitamura Y, Takasaki K; Detection of bone marrow micrometastasis in gastric cancer patients by immunomagnetic separation; *Ann Surg Oncol.* Mar;10(2):171-5;2003
- <sup>41</sup> Mapara MY, Körner IJ Hildebrandt M Bargou R, Krahl D, Reichardt P, Dörken B: Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis Products in breast cancer Patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood*;89:337-344;1997
- <sup>42</sup> Menard S., Bufalino R., Rilke F., Cascinelli N., Veronesi U., Colnaghi M., Prognosis based on Primary breast carcinoma instead of pathological nodal status *British Journal of Cancer*;70:709-12;1994
- <sup>43</sup> Nakamura T, Matsunami K, Hayashi K, Ota M, Ide H, Takasaki K; Detection of bone marrow micrometastasis in esophageal cancer patients by immunomagnetic separation; *Oncol Rep.* May;11(5):999-1003;2004
- <sup>44</sup> Noack F, Schmitt M, Bauer J, Helmecke D, Kruger W, Thorban S, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H, Harbeck N., A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications., *Int J Biol Markers.* Jan-Mar;15(1):100-4;2000
- <sup>45</sup> Nogi H, Takeyama H, Uchida K, Agata T, Horiguchi-Yamada J, Yamada H; Detection of MUC1 and keratin 19 mRNAs in the bone marrow by quantitative RT-PCR predicts the risk of distant metastasis in breast cancer patients; *Breast Cancer.*;10(1):74-81;2003

- 
- <sup>46</sup> O'Malley CD, Cress RD, Campleman SL, Leiserowitz GS; Survival of Californian women with epithelial ovarian cancer, 1994-1996: a population-based study; *Gynecol Oncol.* Dec;91(3):608-15;2003
- <sup>47</sup> Paget, The distribution of secondary growth in cancer of the breast, *Lancet*; 1:571-3,1889
- <sup>48</sup> Pantel K, Cote RJ, Fodstad O, Detection and Clinical Importance of Mikrometastatic Disease, *Journal of the National Cancer Institute*, 1113-1123;1999
- <sup>49</sup> Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G; Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow; *J Hematother.* Fall;3(3):165-73;1994
- <sup>50</sup> 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.* Sep 1;85(17):1419-24;1993
- <sup>51</sup> Pecorelli S, Benedet JL, Creasman WT, Shepherd JH; FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynaecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics; *Int J Gynaecol Obstet.* Jun;65(3):243-9;1999
- <sup>52</sup> Pfisterer J., Systematik der Ovarialkarzinom-Therapie, 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Springer S 183-185;2003
- <sup>53</sup> Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, et al; Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer; *Lancet.* Dec 3;2(8362):1271-4;1983

- 
- <sup>54</sup> Ridwelski K, Meyer F, Fahlke J, Kasper U, Roessner A, Lippert H.; Value of cytokeratin and Ca 19-9 antigen in immunohistological detection of disseminated tumor cells in lymph nodes in pancreas carcinoma; *Chirurg. Aug;72(8):920-6;2001*
- <sup>55</sup> Riethmuller G, Johnson JP; Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers; *Curr Opin Immunol. Oct;4(5):647-55;1992*
- <sup>56</sup> Ryan P, McCarthy S, Kelly J, Collins JK, Dunne C, Grogan L, Breathnach O, Shanahan F, Carey PD, Walsh TN, O'Sullivan GC; Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy; *J Surg Res. Mar;117(1):121-6;2004*
- <sup>57</sup> Schünemann, Possinger, Scheidel, Willich, Gynäkologische Malignome Therapie und Nachsorge bei Mamma- und Genitalmalignomen, Zuckerschwert; S 92;1999
- <sup>58</sup> Schwartz RS; Paul Ehrlich's magic bullets; *N Engl J Med. Mar 11;350(11):1079-80; 2004*
- <sup>59</sup> Scott AM, Welt S; Antibody-based immunological therapies; *Curr Opin Immunol. Oct;9(5):717-22;1997*
- <sup>60</sup> Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC; Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer; *J Clin Oncol. Mar;17(3):870-9;1999*
- <sup>61</sup> Tarin D., Price J., Kettlewell M., et al: Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritovenous shunts. *Cancer Research;44:3584-3592;1984*
- <sup>62</sup> Thorban S, Roder JD, Siewert JR.; Detection of micrometastasis in bone marrow of pancreatic cancer patients; *Ann Oncol.;10 Suppl 4:111-3; 1999*

---

<sup>63</sup> UICC TNM classification of malignant tumors, 5th ed. Wiley-Liss, Inc, New York; 1997

<sup>64</sup> Untch M, Kahlert S, Funke I, Boettcher B, Konecny G, Nestle-Kraemling C, Bauernfeind I: Detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow of breast cancer patients: no prediction of bad outcome. Proc ASCO; 18:639a; 1999

<sup>65</sup> Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci L, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P; Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA; Br J Haematol. Dec; 103(3):610-7; 1998

<sup>66</sup> Wiedswang, E. Borgen, R. Kåresen, G. Kvalheim, J.M. Nesland, H. Qvist, E. Schlichting, T. Sauer, J. Janbu, T. Harbitz, Detection of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer, J Clin Oncol. Sep 15; 21(18):3469-78.; 2003

<sup>67</sup> Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S; Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer; Ann Surg Oncol. May; 8(4):300-4; 2001

---

## **7. Lebenslauf**

### **August Andreas Trimpl**

|                     |  |
|---------------------|--|
| Eltern              | Dr. med. dent. August Trimpl, Zahnarzt<br>Helga Trimpl, geb. Unger, Diplomkauffrau |
| Geburtsdatum        | 11. August 1972  |
| Geburtsort          | München  |
| Familienstand       | verheiratet mit Banu Semeni Cevatli-Trimpl   |
| Kinder              | Tochter, Amelie Trimpl<br>Sohn, Julius August Trimpl                               |
| Staatsangehörigkeit | deutsch  |
| Adresse             | Amselweg 2, 83253 Rimsting   |
| Ausbildungsstand    | approbierter Zahnarzt, selbstständig   |

### **Schulbildung**

|           |   |
|-----------|---|
| 1978-1980 | Grundschule Markt Schwaben                  |
| 1980-1982 | Grundschule Grassau                         |
| 1982-1991 | staatliches Landschulheim Marquartstein     |
| 1991      | Absolvierung der allgemeinen Hochschulreife |

### **Universitätsausbildung**

|      |   |
|------|---|
| 1992 | Immatrikulation für Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München |
| 1993 | naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung   |
| 1994 | zahnärztliche Vorprüfung  |
| 1997 | Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität  |
| 1997 | Approbation als Zahnarzt  |

### **Beruflicher Werdegang**

|           |   |
|-----------|---|
| 1997-1999 | Assistententätigkeit bei Dr. Strziga, München       |
| Seit 2000 | Niederlassung in eigener Praxis in Grassau/Chiemgau |