Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik, Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter
jetziger Vorstand: Prof. Dr. med. Ch. Stief

Prognostische Bedeutung des immunzytochemischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Nierenzellkarzinom - Endauswertung der prospektiven Studie

DISSERTATION
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Ines Kotter
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. I. Funke PD Dr. med. M. Kretzler Prof. Dr. med. D. Hölzel Prof. Dr. med. B. Gerber
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. R. Oberneder Dr. med. A. Buchner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	27.05.2004

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG..... 1

2. MATERIAL UND METHODEN..... 3

2.1. Patienten..... 3
2.2. Datenerhebung und Dokumentation..... 3
2.3. Tumornachsorge / Follow-up..... 4
2.4. Knochenmarkpunktionen..... 5
2.4.1. Gewinnung..... 5
2.4.2. Analyse des Knochenmarkaspirates..... 6
2.5. Statistische Methoden..... 7
2.6. Beschreibung des Patientenkollektives..... 8
2.6.1. Gesamtkollektiv..... 8
2.6.2. Untergruppen des Gesamtkollektives..... 8
2.6.2.1. Alter..... 8
2.6.2.2. Geschlecht..... 8
2.6.2.3. Tumorstadium (TNMG-Klassifikation)..... 8
2.6.2.4. Operationsverfahren..... 10

3. ERGEBNISSE..... 11

3.1. Knochenmarkbefunde..... 11
3.1.1.Alter..... 12
3.1.2. Geschlecht..... 12
3.1.3. Tumorklassifikation..... 12
3.1.4. Operationsverfahren..... 14
3.1.5. Blutwerte..... 15
3.2. Follow-up……..... 18
3.2.1. Übersicht..... 18
3.2.2. Tumorprogression und Alter / Geschlecht..... 20

3.2.3. Tumorprogression und TNG-Stadium..... 21
3.2.4. Tumorprogression und Operationsverfahren..... 23
3.2.5. Tumorprogression und Laborparameter..... 24
3.2.6. Tumorprogression und Knochenmarkbefund..... 26
3.2.7. Multivariate Analyse..... 29

4. DISKUSSION..... 30

4.1. Patienten..... 30
4.2. Knochenmarkpunktion und immunzytochemische Methode..... 30
4.3. Prognostische Relevanz der untersuchten Parameter..... 33
4.3.1. Alter und Geschlecht..... 33
4.3.2. Tumorstadium und Differenzierungsgrad..... 33
4.3.3. Operationsverfahren..... 34
4.3.4. Laborparameter..... 35
4.3.5. Knochenmarkergebnisse..... 37

5. ZUSAMMENFASSUNG..... 42

6. ABKÜRZUNGEN..... 44

7. LITERATURVERZEICHNIS..... 45

8. ANHANG..... 50

8.1. Dokumentationsbögen..... 50
8.2. Danksagung..... 53
8.3. Lebenslauf..... 54

1. EINLEITUNG

Das Nierenzellkarzinom stellt mit 3% aller bösartigen Tumoren das dritthäufigste Malignom des Erwachsenen dar, wobei jährlich 9 von 100000 Einwohnern in Deutschland neu erkranken. Die Inzidenz ist in den vergangenen Jahren steigend und das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt in etwa 2:1. Der Häufigkeitsgipfel liegt im 50. bis 70. Lebensjahr.
Durch die Möglichkeit von Ultraschalluntersuchungen und Computertomographie werden Nierenzellkarzinome zunehmend in frühen Stadien entdeckt [42; 58], so daß ca. 60 % der Betroffenen geheilt werden können. Die Standardtherapie stellt die radikale Tumornephrektomie einschließlich ipsilateraler Adrenalektomie und regionaler Lymphadenektomie dar, wobei aufgrund früher entdeckter Tumorstadien auch organerhaltende Operationsverfahren an Bedeutung gewinnen.
Die mittlere 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit lokal auf die Niere begrenzten Tumoren beträgt 86%, bei Infilration der Fettkapsel (64%), der Venen (41%) oder der Lymphknoten (N1:18%, N2: 20%, N3: 0%) sinkt die Überlebensrate allerdings drastisch ab [49].
20% der Patienten haben bereits bei Diagnosestellung Fernmetastasen mit entsprechend schlechter Prognose [56]. Die bevorzugten Metastasierungsorte sind Lunge (55-61%), Lymphknoten (26-34%), Leber (20-33%), Skelett (22-32%), Nebenniere (19%), kontralaterale Niere (11%) und Gehirn (3-6%).
Zur Charakterisierung des Progressions- bzw. Metastasierungsrisikos von Nierenzellkarzinomen werden das primäre Ausmaß der Erkrankung (T-Stadium), der Lymphknotenstatus (N-Stadium), die Fernmetastasierung (M-Stadium) und die Differenzierung des Tumors (G-Stadium) herangezogen [49].
Neben diesen gängigen Prognosefaktoren hat man in den letzten Jahren versucht, neue zu etablieren. Das Ziel hierbei ist es, eine zusätzliche Aussage über die Progressions- bzw. Metastasierungswahrscheinlichkeit treffen zu können und somit Risikogruppen zu identifizieren.
Besonderes Augenmerk sollte hier auf die Gruppe der radikal operierten Patienten ohne Fernmetastasen gerichtet werden, die zwar in kurativer Absicht behandelt wurden, bei denen jedoch bereits zum Zeitpunkt der Operation eine okkulte „minimal residuale Erkrankung“ vorlag. Disseminierte Tumorzellen können im Knochenmark der Patienten detektiert werden und führen möglicherweise im weiteren Verlauf zu einem Krankheitsrezidiv [35].
Da die frühe okkulte Disseminierung durch die gängigen diagnostischen Untersuchungsverfahren (Ultraschall, Computertomographie, konventionelles Röntgen, Skelettszintigraphie,

Magnetresonanztomographie) nicht erkennbar ist, wurden Verfahren entwickelt, disseminierte Tumorzellen immunzytochemisch mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im Knochenmark von Patienten nachzuweisen. Auch bei anderen urologischen Tumoren wie dem Prostatakarzinom und dem Urothelkarzinom, sowie bei verschiedenen Tumorentitäten (Mamma-, Bronchial-, Kolon- und Rektum-, Magen-, Pankreaskarzinom und Plattenepithelkarzinome im HNO- Bereich) ist der Nachweis dieser Tumorzellen Gegenstand laufender Untersuchungen [33].

Ziel dieser Studie war es, die prognostische Bedeutung und die Eignung zytokeratinhaltiger Zellen im Knochenmark von Patienten mit Nierenzellkarzinom als Zielzellen einer adjuvanten Therapie prospektiv zu evaluieren.

Bei nachgewiesenem hohen Risiko eines Rezidivs wäre der adjuvante Einsatz der bereits in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms eingesetzten Immunchemotherapie mit Zytokinen (alpha-Interferon, IL-2) und Chemotherapeutika (5-Fluoruracil, Vinblastin) in unterschiedlichen Kombinationen denkbar. Von Vorteil wäre die zu diesem Zeitpunkt meist geringe Tumorlast und der gute Allgemeinzustand des Patienten. Unter Immunchemotherapie können nach neuesten Veröffentlichungen Remissionsraten von bis zu 30% erreicht werden und bei etwa 30% der Patienten tritt eine Stabilisierung der Erkrankung ein [1; 25].

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten

Die Studie umfaßte Patienten, die seit Mai 1990 bis Juli 1998 in der urologischen Klinik Großhadern eine Tumornephrektomie erhielten.
Diese Patienten wurden im Rahmen einer prospektiven Studie zur Prüfung der prognostischen Bedeutung zytokeratinhaltiger Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Nierenzellkarzinom knochenmarkpunktiert.

Einschlußkriterien:

- Histopathologisch gesichertes Nierenzellkarzinom, T1-4, N+/-, M0, G1-3
- R0- Resektion
- Einverständniserklärung zu einer Knochenmarkpunktion

Ausschlußkriterien:

- Patienten mit bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bestehenden Fernmetastasen (M1)
- Patienten mit mikroskopischem (R1) oder makroskopischem (R2) Residualtumor
- Patienten mit Zweitmalignomen, die entweder bereits präoperativ bekannt waren, oder im Rahmen der Nachbeobachtungszeit in Erscheinung traten.

2.2. Datenerhebung und Dokumentation

Die Patienten wurden konsekutiv von Mai 1990 bis Juli 1998 für die Studie rekrutiert. Die Erfassung der Patientendaten erfolgte teils prospektiv, teils aus den Patientenakten. Für die vorliegende Auswertung relevant waren:

- Name, Geburtsdatum und Anschrift des Patienten
- Name und Anschrift des behandelnden Hausarztes bzw. Urologen
- Operationszeitpunkt
- Operationsverfahren
- Histologie mit postoperativer, histopathologischer Tumorklassifikation (TNM- Stadium)
- Differenzierungsgrad (G-Stadium) des Tumors
- Angaben über Residualtumor (R- Stadium)
- Ergebnis der Knochenmarkpunktion (bei positivem Befund Angabe der Anzahl positiver Zellen im Aspirat)
- Laborwerte des Patienten präoperativ (Hb, BKS, AP, LDH)
- Angaben zu einer eventuell durchgeführten postoperativen Nachbehandlung (Radiatio, Immunchemotherapie)

2.3. Tumornachsorge / Follow- up

Nach Erhebung der Primärdaten wurden die mit der Tumornachsorge betrauten, weiterbehandelnden Ärzte der Patienten angeschrieben, mit der Bitte einen entsprechenden Dokumentationsbogen zurückzusenden (siehe 8.1.). Ein Teil der Patienten konnte in der Urologischen Poliklinik im Klinikum Großhadern nachuntersucht werden.
Die Tumornachsorge folgte den Empfehlungen des Tumorzentrums München und wurde bei unauffälligem Verlauf im ersten und zweiten postoperativen Jahr vierteljährlich, im dritten bis fünften Jahr halb- bis einjährig und ab dem sechsten postoperativen Jahr in jährlichen Abständen durchgeführt [56]. Die Nachsorge beinhaltet Anamnese, körperliche Untersuchung, Labor (Blutbild, BKS, Kreatinin, Elektrolyte, AP, γ-GT, Urin) und eine Sonographie des Abdomens. In den ersten zwei Jahren sollte halbjährlich eine Röntgen-Thoraxaufnahme und eine Computertomographie bzw. eine Magnetresonanztomographie des Abdomens angefertigt werden, die im weiteren Verlauf bei unauffälligen Befunden nur noch einmal im Jahr nötig sind. Zusatzuntersuchungen, wie beispielsweise eine erweiterte Labordiagnostik, eine Skelettszintigraphie oder konventionelles Röntgen eines suspekten Skelettabschnittes wurden fakultativ veranlaßt.

Zielparameter des Follow-ups waren:

- Lokalrezidive
- Anzahl, Zeitpunkt und Lokalisation eventuell aufgetretener Fernmetastasen
- Art der Behandlung vorhandener Lokalrezidive/ Metastasen (chirurgische Intervention, Radiatio, Immunchemotherapie)
- Aktuelle Laborwerte zum Progressionszeitpunkt (Hb, BKS, AP, LDH)
- Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben
- Todesursache

Zur Ergänzung der Follow-up-Bögen dienten uns Daten des Tumorregisters München, insbesondere in Bezug auf das Überleben und eventuell vorhandene Zweitmalignome der Patienten.
Patienten mit unvollständigen Follow-up-Untersuchungen oder solche bei denen kein Hausarzt eruierbar war, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Ebenso fielen Personen mit unbekanntem neuen Wohnort aus der Studie.

Bei der Auswertung der Follow-up-Untersuchungen wurden folgende mögliche Zielereignisse unterschieden:
- Tumorbedingter Tod
- Lokalrezidiv
- Lymphknotenmetastasen
- Fernmetastasen

2.4. Knochenmarkpunktion

2.4.1. Gewinnung von Knochenmarkzellen

Das Knochenmark als Detektionsort einer frühen okkulten Metastasierung bietet gegenüber anderen Organen den Vorteil der leichteren Zugänglichkeit mit geringer Invasivität bei der Entnahme von Knochenmarkzellen.

Im Vergleich zu peripherem Blut stellt der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark einen späteren Zeitpunkt in der Metastasierungskaskade dar. Zudem können mit Hilfe von Antikörpern gegen Zytokeratine epitheliale Tumorzellen leicht detektiert werden.
Die Zellen wurden präoperativ, wenn der Patient bereits in Narkose lag, aus beiden Beckenkämmen unter sterilen Bedingungen entnommen. Mit einer Sternalpunktionskanüle wurden beide Spinae iliacae anteriores superiores punktiert und anschließend mit einer heparinisierten 10 ml Spritze in der Regel 5-6 ml Knochenmark pro Seite aspiriert.

2.4.2. Analyse des Knochenmarkaspirates

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratine lassen sich ortsfremde Tumorzellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark nachweisen, da Knochenmarkzellen kein Zytokeratin exprimieren.
Die Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgte nach einer standardisierten Methode. Zunächst erfolgte die Isolierung mononukleärer Zellen mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficollscher Lösung. Anschließend wurde die Interphase abpipettiert und mit Hilfe einer Zytozentrifuge auf Glasobjektträger aufgebracht. Im März 1993 wurde die Anzahl untersuchter mononukleärer Zellen von 4×10^5 auf 1×10^6 Zellen pro punktierte Seite erhöht. Nach Fixation wurden die Zellen mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern inkubiert. Anfangs wurde als Primärantikörper der Antikörper CK 2 (Boehringer, Mannheim) verwendet, der sich gegen die Zytokeratinkomponente 18 richtet. Seit Januar 1994 kam der Panzytokeratinantikörper A 45-B/B3 zum Einsatz. Ziel des Wechsels war die Überlegung, durch den A45-Antikörper die Sensitivität dieses immunzytochemischen Verfahrens und damit die Ausbeute positiver Zellen im Knochenmark zu erhöhen. Knochenmarkproben, die mit dem CK 2-Antikörper inkubiert wurden, zeigten in 22% (44/203) der Fälle CK-positive Zellen, bei Verwendung des neuen Antikörpers A 45 waren 23% (19/84) CK-positiv. Im Log-Rank-Test gab es zwischen den beiden Antikörpern hinsichtlich des Eintretens eines Zielereignisses (tumorbedingter Tod, Lokalrezidiv oder Fernmetastasen) keinen signifikanten Unterschied.
Die Antigen-Antikörperreaktion wurde mit Hilfe der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex), sichtbar gemacht [7]. Tumorzellen können anhand der Rotfärbung lichtmikroskopisch identifiziert werden.
Als Negativkontrolle (Isotypkontrolle) wurden Mäuse-IgG-Antikörper verwendet, denen die Fähigkeit fehlt, an spezifische humane Antigenstrukturen zu binden. Als Positivkontrolle

dienten Tumorzell-Linien humaner kolorektaler Karzinome, die bekanntermaßen Zytokeratin-18 exprimieren [55].

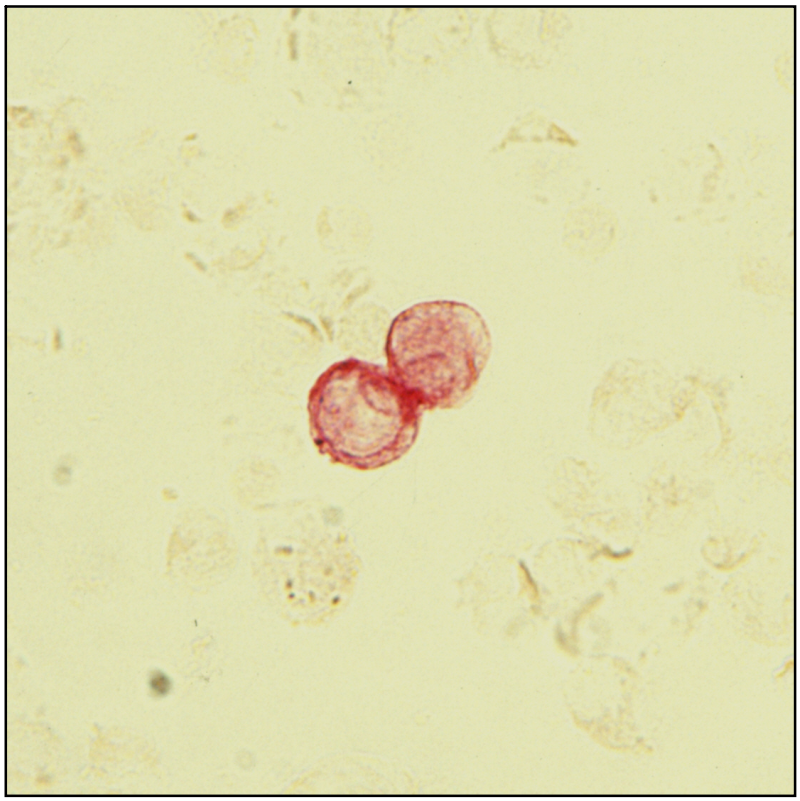

Abb.1: Nachweis zweier rotgefärbter, Zytokeratin-positiver Zellen aus einem Knochenmarkaspirat eines Patienten mit Nierenzellkarzinom

2.5. Statistische Methoden

Zunächst erfolgte die deskriptive Analyse der erhobenen Daten. Alle relevanten Erhebungsmerkmale wurden deskriptiv tabelliert und hinsichtlich prozentualer Verteilung der patienten- und tumorbezogenen Merkmale sowie der ermittelten Knochenmarkbefunde untersucht.
Die prognostische Aussagekraft eines positiven Knochenmarkbefundes bezüglich verschiedener Zielereignisse (definiert als tumorbedingter Tod, Rezidiv oder Auftreten von Fern- bzw. Lymphknotenmetastasen) wurde zunächst univariat exploriert.
Die graphische Darstellung der Überlebenskurven erfolgte in Form von Kaplan-Meier-Plots. Zum Vergleich der Überlebenskurven verwendeten wir den Logrank-Test.
Die prognostische Wertigkeit positiver Knochenmarkbefunde wurde multivariat anhand eines Proportional-Hazards- Regressionsmodelles nach Cox untersucht.

2.6. Beschreibung des Patientenkollektives

2.6.1. Gesamtkollektiv

Im Zeitraum Mai 1990 bis Juli 1998 wurde in der Urologischen Klinik, Klinikum Großhadern bei insgesamt 403 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom eine Knochenmarkpunktion vorgenommen. Von diesen 403 Patienten hatten 69 bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Fernmetastasen. 48 Patienten hatten ein bekanntes Zweitmalignom oder entwickelten im Verlauf der Studie einen Zweittumor. Bei 12 Patienten konnte nur eine R2-Resektion durchgeführt werden. Follow-up-Daten waren von 297 Patienten verfügbar.
Durch Anwendung der unter 2.1. aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien ergab sich ein Gesamtkollektiv von 287 Patienten.

2.6.2. Untergruppen des Gesamtkollektives

2.6.2.1. Alter

Der Altersmedian des gesamten Patientengutes lag bei 60.48 Jahre. Der jüngste Patient war 22, der älteste 84 Jahre alt.

2.6.2.2. Geschlecht

Von den 287 Patienten mit durchgeführter Knochenmarkpunktion waren 176 männlich und 111 weiblich. Somit ergab sich ein Verhältnis Männer zu Frauen von 1.59:1.

2.6.2.3. Tumorstadium

Die Einteilung des Tumorstadiums erfolgte gemäß der TNMG-Klassifikation [50].

T-Stadium:
Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Patienten hinsichtlich ihrer lokalen Tumorausbreitung (T-Stadium):

T	***1***	***2***	***3***	***3a***	***3b***	***4***	***Gesamt***
n	39	150	4	39	51	4	287
%	14	52	1	14	18	1	100

Tab.1: Verteilung der Tumorstadien

Anmerkung: Von vier Patienten liegt keine genauere Klassifikation als pT3 vor.

N-Stadium:

Bei 10 Patienten konnte ein Befall der Lymphknoten histopathologisch gesichert und bei 274 Patienten ausgeschlossen werden. Bei 3 Patienten fehlten Angaben zum Lymphknotenstatus.

N	***N+***	***N-***	***Nx***	***Gesamt***
n	10	274	3	287
%	4	96	1	100

Tab.2: Lymphknotenstatus

G-Stadium:

Der Differenzierungsgrad des Tumors wurde in fünf Gruppen unterteilt: G 1, G 1-2, G 2, G 2-3, G 3. Die Aufteilung ist in Tabelle 3 dargestellt:

G	***G1***	***G1-2***	***G2***	***G2-3***	***G3***	***Gesamt***
n	33	11	205	11	27	287
%	12	4	71	4	9	100

Tab. 3: Verteilung der G-Stadien

2.6.2.4. Operationsverfahren

Die Operationsverfahren wurden unterteilt in die radikale Tumornephrektomie und organerhaltende Verfahren:

OP-Verfahren	***n***	***%***
Radikale Nephrektomie	250	87
Organerhaltende Operation	37	13
Gesamt	287	100

Tab.4: Verteilung der OP- Verfahren

3. ERGEBNISSE

3.1. Knochenmarkbefunde

Bei 11% (31/287) der eingeschlossenen 287 Patienten war die Knochenmarkpunktion nicht auswertbar. Ursachen hierfür war einerseits zu wenig Material, d.h. das Knochenmarkaspirat enthielt zu wenig Zellen. Ein Teil der Untersuchungen musste wegen positiver Kontrollen als nicht verwertbar aus der Studie ausgeschlossen werden. Die nicht auswertbaren Knochenmarkpunktionen wurden bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.
25% (63/256) der auswertbaren Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Tumorentfernung zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark auf.
75% (193/256) hatten einen negativen Knochenmarkbefund, d.h. bei ihnen konnten keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmarkaspirat gefunden werden.

Von den 63 Patienten mit positivem Knochenmarkbefund konnte bei 41% (26/63) je eine zytokeratinpositive Zelle nachgewiesen werden und bei 59% (37/63) zeigte sich mehr als eine disseminierte Tumorzelle im Punktionsmaterial (vgl. Abb.2).

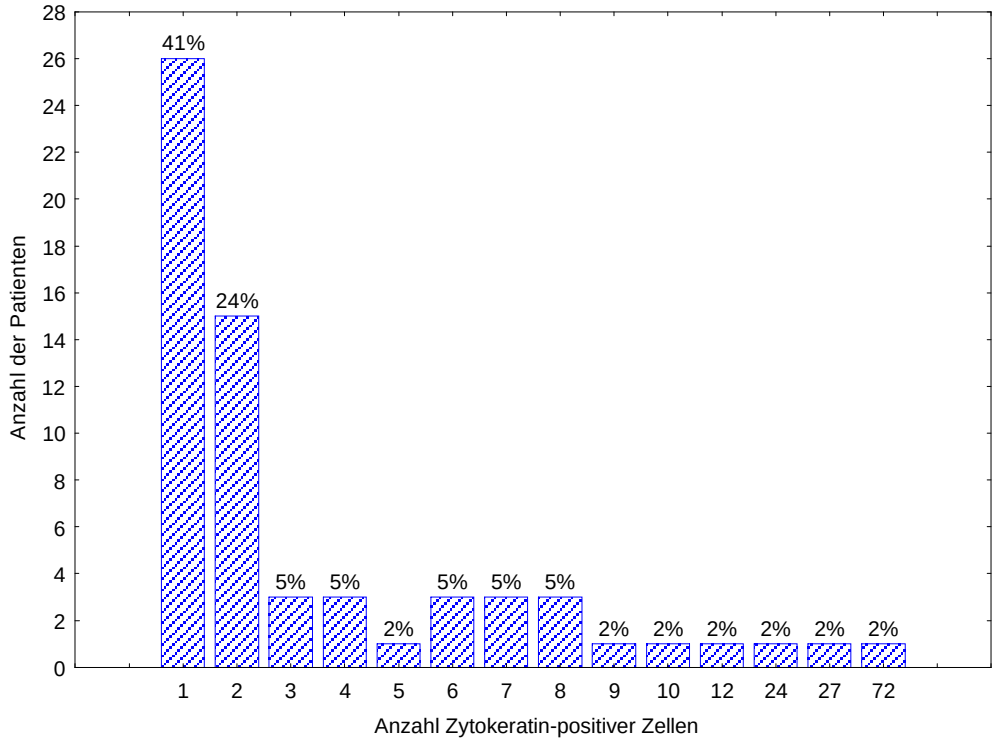

Abb. 2: Verteilung der Anzahl Zytokeratin-positiver Zellen

3.1.1. Alter

Der Altersmedian der Patienten mit negativem Knochenmarkbefund betrug 61 Jahre, während er bei Patienten mit positivem Knochenmarkbefund bei 60 Jahren lag. Die nicht auswertbaren Knochenmarkpunktionen wiesen einen Altersmedian von 57 Jahren auf.

3.1.2. Geschlecht

Von den Männern hatten 24% (38/157) und von den Frauen 25 % (25/99) Tumorzellen im Knochenmark.

3.1.3. Tumorklassifikation

T-Stadium:

Die Aufteilung der Knochenmarkbefunde entsprechend der jeweiligen Tumorgröße geht aus der folgenden Tabelle hervor:

T	***1***		***2***		***3***		***3a***		***3b***		***4***	
	n	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***
CK (+)	5	15	34	25	1	33	8	22	13	28	2	67
CK (-)	28	85	100	75	2	67	29	78	33	72	1	33
Gesamt	33	100	134	100	3	100	37	100	46	100	3	100

Tab.5: Knochenmarkbefund und T-Stadium

Unterteilt man das Gesamtkollektiv in zwei Gruppen von Patienten mit T<3b und T≥3b hatten 23% (48/207) der Patienten mit T<3b zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark und 31% (15/49) der Patienten mit T≥3b CK-positive Zellen.

Anmerkung: Die Patienten mit dem Tumorstadium T3, die vom Pathologen nicht genauer klassifiziert werden konnten, wurden in der Auswertung der Gruppe T<3b zugeordnet.

T	***T < 3b***		***T ≥ 3b***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	48	23	15	31
CK (-)	159	77	34	69
Gesamt	207	100	49	100

Tab.6: Knochenmarkbefund und T-Stadium

N-Stadium:

Von den Patienten, die bei Eintritt in die Studie keine nachweisbaren Lymphknotenmetastasen aufwiesen, hatten 24% (60/246) Tumorzellen im Knochenmark, während bei 30% (3/10) mit bereits initial vorhandenem Lymphknotenbefall Tumorzellen im Knochenmark detektiert werden konnten.

G-Stadium:

Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Knochenmarkergebnisse nach dem Differenzierungsgrad des Primärtumors:

G	***G1***		***G1-2***		***G2***		***G2-3***		***G3***	
	n	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***	***n***	***%***
CK (+)	4	13	3	27	41	23	6	54	9	39
CK (-)	27	87	8	73	139	77	5	46	14	61
Gesamt	31	100	11	100	180	100	11	100	23	100

Tab.7: Knochenmarkbefund und Differenzierungsgrad

Unterschied man beim Differenzierungsgrad des Nierenzellkarzinoms die gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G<2-3) von den mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren (G≥2-3), so hatten 222 Patienten einen Tumor mit G<2-3 und 34 Patienten ein G-Stadium von G≥2-3. Von den Patienten mit G<2-3 waren 22% (48/222) CK-positiv, während bei den Patienten mit G≥2-3 44% (15/34) CK-positiv waren:

	G < 2-3		***G ≥ 2-3***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	48	22	15	44
CK (-)	174	78	19	56
Gesamt	222	100	34	100

Tab.8: Knochenmarkbefund und G-Stadium

Es fand sich eine signifikante Assoziation ($p<0.01$) zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und einem niedrigen Differenzierungsgrad (hohes G-Stadium).

Histologischer Subtyp:

Bei der Datenerhebung wurden klarzellige von nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen unterschieden. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und dem histologischen Subtyp (siehe Tab. 9).

	klarzellig		**nicht-klarzellig**	
	n	***%***	***n***	***%***
CK(+)	52	27	8	21
CK(-)	140	73	30	79
Gesamt	192	100	38	100

Tab.9. Knochenmarkbefund und histologischer Subtyp

3.1.4. Operationsverfahren

Von den Patienten, die eine radikale Tumornephrektomie erhielten, hatten 25% (55/224) Tumorzellen im Knochenmark, bei organerhaltender Operation wiesen ebenfalls 25% (8/32) CK-positive Zellen auf.

Die Art des OP-Verfahrens stand in keinem Zusammenhang mit dem Knochenmarkbefund.

	Radikale Tumornephrektomie		**Organerhaltende Operation**	
	n	***%***	***n***	***%***
CK(+)	55	25	8	25
CK(-)	169	75	24	75
Gesamt	224	100	32	100

Tab.10: Knochenmarkbefund und Operationsverfahren

3.1.5. Blutwerte

Hinsichtlich der Laborparameter waren für die Studie von besonderem Interesse die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS), der Hämoglobinwert (Hb) und die Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase (AP) und der Laktatdehydrogenase (LDH).

Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit:

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) entspricht der Erythrozytensedimentationsrate und stellt einen unspezifischen Suchtest bei Verdacht auf entzündliche Erkrankungen dar. Außerdem können Tumorleiden, Autoimmunerkrankungen, Blutkrankheiten etc. mit einer stark erhöhten BKS einhergehen.
Die BKS stellt für das Nierenzellkarzinom einen Prognosefaktor dar [56].
Die Referenzwerte des 1h-Wertes liegen bei Männern bei ca. 15 mm/1h, bei Frauen bei ca. 20 mm/1h [19].
Bei insgesamt 96 Patienten konnten Werte für die BKS erhoben werden. Die durchschnittliche BKS bei Patienten ohne Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark lag bei 32mm/1h, bei Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark war die durchschnittliche BKS 20mm/1h. Von den Patienten mit normalen Werten für die Blutkörperchensenkung wiesen 38% (21/55) CK-positive Zellen im Knochenmark auf, während 34% (14/41) der Patienten mit erhöhter BKS CK-positive Zellen hatten (siehe Tab.11):

	BKS erhöht		***BKS normal***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	14	34	21	38
CK (-)	27	66	34	62
Gesamt	41	100	55	100

Tab. 11: KMP und BKS

Hämoglobin:

Die im Rahmen von metastasierten Tumorerkrankungen zum Teil auftretende und somit als Prognosepapameter zu wertende Anämie war Anlaß, bei Datenerhebung und Follow-up den Hämoglobinwert als wichtigen Laborparameter zu erfassen. Als Normwert galt bei Männern ein Hb von 14 –17 g/dl, bei Frauen ein Hb von 12 –16 g/dl [19].
Der durchschnittliche Hämoglobinwert der insgesamt 221 erhobenen Werte lag bei beiden Gruppen (CK-positiv, CK-negativ) zum Zeitpunkt der Operation bei ca.14 g/dl. Der niedrigste Hb war 9 g/dl, der höchste 19 g/dl.
27% (47/175) der Patienten ohne Anämie und 24% (11/46) der Patienten mit Anämie hatten zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark (siehe Tabelle 12):

	Anämie		***Hb normal***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	11	24	47	27
CK (-)	35	76	128	73
Gesamt	46	100	175	100

Tab. 12: KMP und Hb-Wert

Alkalische Phosphatase:

Eine Enzymaktivitätserhöhung der alkalische Phosphatase (AP) erwartet man generell bei einem gesteigerten Stoffwechsel innerhalb des Knochens, beispielsweise im Rahmen einer Skelettmetastasierung. Die Normwerte liegen nach Abschluß des Knochenwachstums bei Männern unter 175 U/l, bei Frauen sind Werte bis 170 U/l physiologisch [19].

Bei den 197 vorhandenen Werten für die alkalische Phosphatase lag der Durchschnitt bei den CK-negativen Patienten bei 142U/l, bei den CK-positiven Patienten bei 138U/l. Es konnte ein Maximalwert von 1161 U/l gefunden werden.
Von den Patienten mit normaler Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase hatten 28% (52/184) CK-positive Zellen und 23% (3/13) der Patienten mit erhöhten AP-Werten waren CK-positiv (siehe Tabelle 13):

	AP erhöht		***AP normal***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	3	23	52	28
CK (-)	10	77	132	72
Gesamt	13	100	184	100

Tab.13: KMP und AP

Laktatdehydrogenase:

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das bei gesteigertem Zellumsatz und Zelluntergang z.B. im Rahmen eines malignen Geschehens aus dem Zytoplasma der Zellen freigesetzt wird und somit eine erhöhte Aktivität im Serum aufweist. Eine über die Norm ansteigende Aktivität kann ein Hinweis sein auf eine Progression bzw. ein erneutes Aufflammen des Krankheitsgeschehens (z.B. durch eine Metastasierung).
Die obere Normgrenze für die LDH liegt gewöhnlich bei 240 U/l [19].
Bei der primären Labordiagnostik wurde die LDH in einem Großteil der Fälle nicht mitbestimmt, so daß insgesamt 75 LDH-Werte für die Auswertung zur Verfügung standen.
Die Werte lagen zwischen 75 und 486 U/l, der Mittelwert bei Patienten ohne Nachweis von Tumorzellen lag bei 191 U/l, bei Patienten mit Nachweis von Tumorzellen war der Mittelwert 157 U/l. 71 der 75 bestimmten LDH-Werte zeigten eine normale Enzymaktivität, während in 4 Fällen eine pathologisch gesteigerte Aktivität vorlag.
Von den Patienten mit normaler LDH waren 27% (19/71) CK-positiv und bei den Patienten mit erhöhter LDH konnte in keinem der Fälle (0/4) ein positiver Knochenmarkbefund erhoben werden (siehe Tabelle 14):

	LDH erhöht		***LDH normal***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	0	0	19	27
CK (-)	4	100	52	73
Gesamt	4	100	71	100

Tab.14: KMP und LDH

Bei keinem der vier untersuchten Laborparameter ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer pathologischen Abweichung des jeweiligen Wertes und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark feststellen.

3.2. Follow-up

3.2.1. Übersicht

Die maximale Nachbeobachtungszeit des Gesamtkollektivs war 114 Monate, der Median 40 Monate.
Die Verteilung der im Laufe der Studie eingetretenen Zielereignisse entsprach der vorliegenden Tabelle:

- Tumorbedingter Tod:	10.5 % (27/256)
- Lokalrezidiv:	2.0% (5/256)
- Fernmetastasen:	11.3% (29/256)
- LK-Metastasen:	2.7% (7/256)

Tab.15: Verteilung der Zielereignisse

<u>Tumorbedingter Tod und KMP:</u>

22% (6/27) der am Nierenzellkarzinom verstorbenen Patienten wiesen Tumorzellen im Knochenmark auf. 25 % (57/229) der Überlebenden oder nicht tumorbedingt verstorbenen Patienten waren CK-positiv.

Lokalrezidiv und KMP:

Patienten, die im Laufe der Nachbeobachtungszeit ohne Lokalrezidiv blieben, waren in 24% (61/251) der Fälle CK-positiv; von den Patienten mit Lokalrezidiv hatten 40% (2/5) Tumorzellen im Knochenmark.

Fernmetastasen und KMP:

31% (9/29) der Patienten mit im Studienverlauf auftretenden Fernmetastasen hatten CK-positive Zellen im Knochenmark, während 24% (54/227) der metastasenfreien Patienten CK-positiv waren.

LK-Metastasen und KMP:

Von den Patienten mit neu diagnostizierten Lymphknotenmetastasen wiesen 29% (2/7), von denen ohne Befall der Lymphknoten 25% (61/249) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auf.

Organ	***n***
Lunge	13
Leber	6
Knochen	15 (davon 5 x Wirbelsäule)
Intrakraniell	7 (6 x Großhirn, 1 x Kleinhirn)
Andere	15

Tab.16: Lokalisation der Fernmetastasen; bei insgesamt 32 Patienten mit hämatogenen Metastasen teilweise mehrere Lokalisationen gleichzeitig

Keines der einzelnen Zielereignisse wies einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Ergebnis der Knochenmarkuntersuchung auf.
Aufgrund relativ geringer Fallzahlen bezüglich der einzelnen Zielereignisse wurde die Tumorprogression untersucht. Dies beinhaltet tumorbedingten Tod, Lokalrezidiv oder Fernmetastasierung.

3.2.2. Tumorprogression und Alter / Geschlecht

Weder Alter noch Geschlecht der Patienten hatten in der Auswertung einen signifikanten Einfluß auf die Prognose des Patienten hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven, Metastasen oder tumorbedingtem Tod. Die 5-Jahresüberlebensraten von Personen unterschiedlichen Alters, bzw. von Männern und Frauen waren annähernd identisch (siehe Tab.17).

		5-JÜR (%)
Alter	< 60	83
	≥ 60	86
Geschlecht	m	85
	w	85

Tab. 17: 5-JÜR und Alter / Geschlecht

3.2.3. Tumorprogression und TNMG-Stadium

Erwartungsgemäß konnten die bereits etablierten Kriterien (TNMG-Stadien) hinsichtlich der Prognose einer Tumorerkrankung in der vorliegenden Auswertung bestätigt werden.

Die Tumorausdehnung (T-Stadium) korrelierte mit der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Lokalrezidiven, bzw. dem Auftreten von Fernmetastasen und war im Log-Rank-Test statistisch signifikant ($p<0.0001$).
Das 5-Jahresüberleben von Patienten mit T≥3b betrug 55%, während Patienten mit niedrigeren Tumorstadien (T<3b) mit 92% eine wesentlich bessere Prognose aufwiesen.

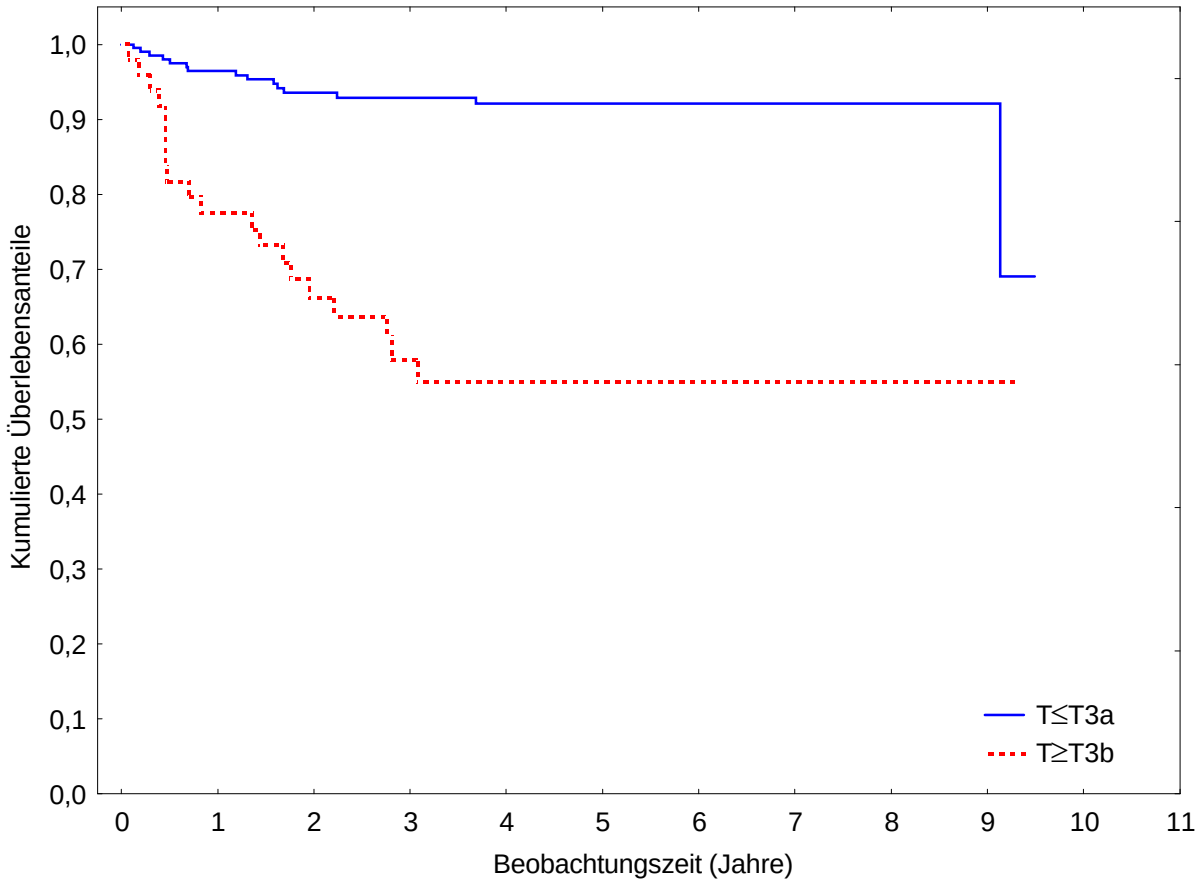

Abb. 3: Überlebenskurve in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Ebenso konnte die beim Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung auftretende ungünstigere Prognose nachgewiesen werden ($p<0.0001$). Patienten ohne Lymphknotenmetastasen überlebten fünf Jahre in 87% der Fälle, hingegen verringerte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen auf 25%.

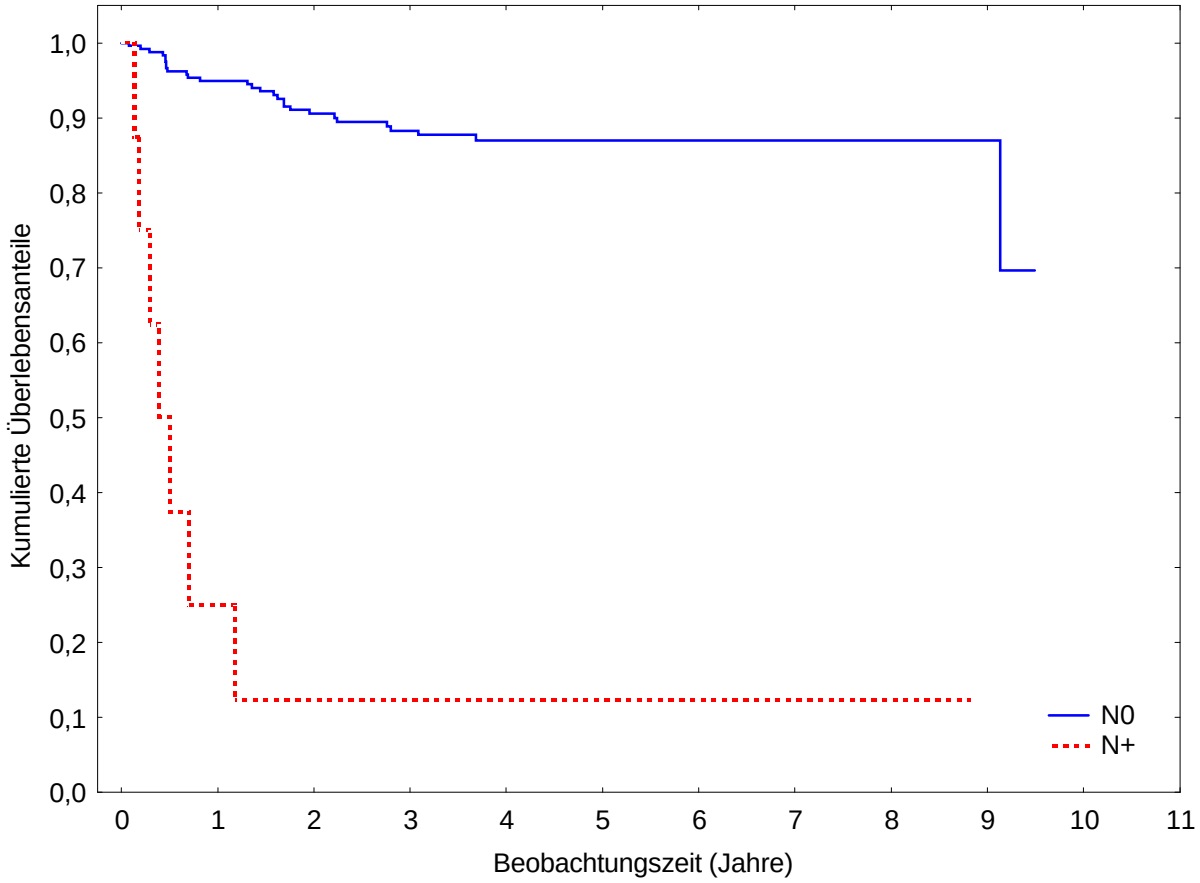

Abb. 4: Überlebenskurve in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

Auch der Differenzierungsgrad (G-Stadium) des Tumors stellte sich in der Auswertung als statistisch signifikant heraus ($p<0.0001$). Ein G-Stadium von G≥2-3 reduzierte die 5-Jahres-überlebensrate von 89% bei G<2-3 auf 58 %.

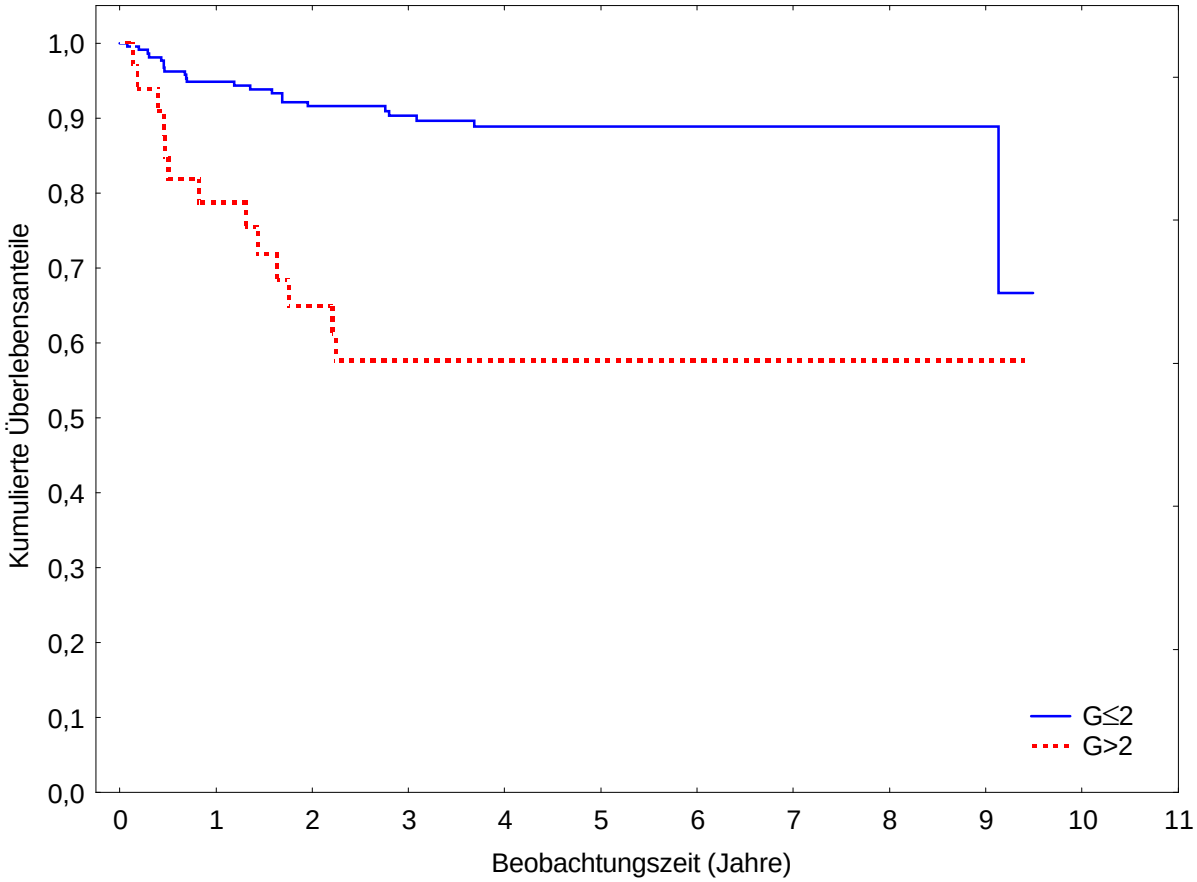

Abb.5: Überlebenskurve in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

3.2.4. Tumorprogression und Operationsverfahren

In der Auswertung der angewendeten Operationsverfahren wurde zwischen organerhaltenden Operationen (Tumorexzision, Heminephrektomie) und der radikalen Tumornephrektomie unterschieden. Weder konnte im Log-Rank-Test eine statistische Signifikanz hinsichtlich der Prognose aufgezeigt werden ($p=0.25$), noch wurde das 5-Jahresüberleben durch die Art der Operation beeinflußt (organerhaltende Operation 94% versus radikale Tumornephrektomie 84%).

3.2.5. Tumorprogression und Laborparameter

Die BKS, der Hämoglobinwert sowie die alkalische Phosphatase erwiesen sich als signifikante Prognosefaktoren beim Nierenzellkarzinom. Lediglich die LDH ließ keine signifikante Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Tumorprogression zu.
Der Log-Rank-Test ergab folgende Werte:

	Einfluß auf Prognose	***p-Wert***
BKS	signifikant	$p<0.01$
Hb	signifikant	$p<0.0001$
AP	signifikant	$p<0.0001$
LDH	nicht signifikant	$p=0.12$

Tab.18: Einfluß der untersuchten Laborparameter auf die Prognose

		5-JÜR (%)
BKS	Erhöht	73
	Normal	95
Hb	Anämie	64
	Normal	91
AP	Erhöht	47
	Normal	90

Tab.19: 5-JÜR und Blutwerte

Die folgenden Abbildungen zeigen die Überlebenskurven der Patienten in Abhängigkeit von den untersuchten Laborparametern:

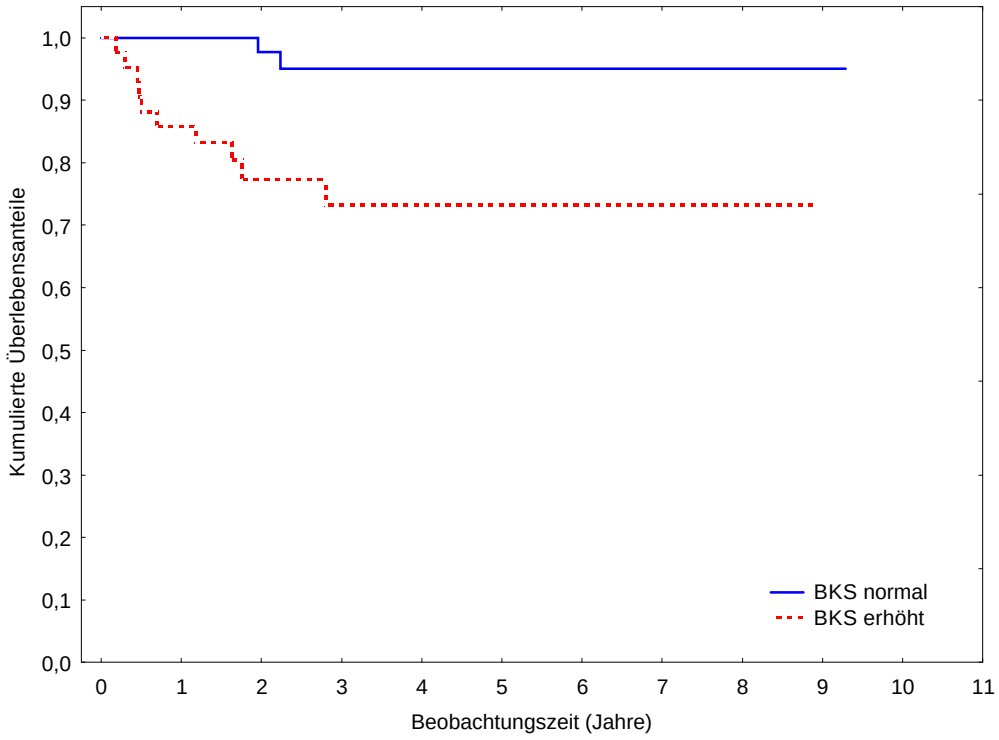

Abb.6: Überlebenskurven in Abhängigkeit von der BKS

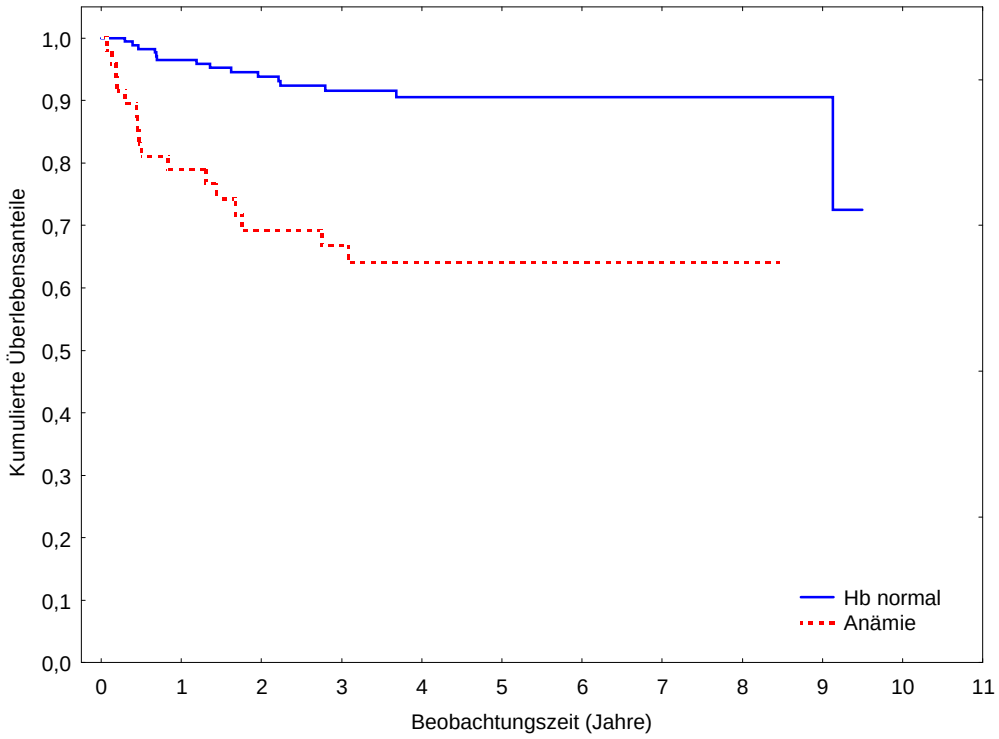

Abb.7: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Hb-Wert

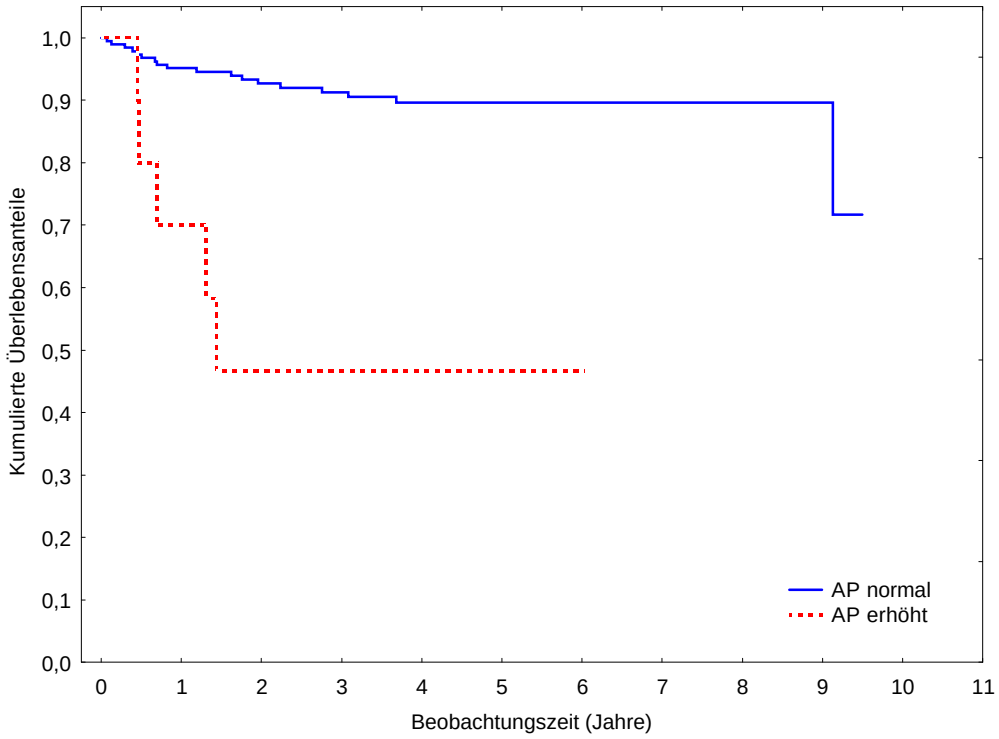

Abb.8: Überlebenskurven in Abhängigkeit von der AP

3.2.6. Tumorprogression und Knochenmarkbefund

Von allen 256 auswertbaren Patienten trat bei 12% (31/256) eines der definierten Zielereignisse (tumorbedingter Tod, Lokalrezidiv oder Metastasen) ein.

Die Verteilung des Knochenmarkbefundes hinsichtlich eines eintretenden Ereignisses (in der folgenden Tabelle dargestellt als Progression / keine Progression) entspricht Tabelle 20:

	Progression		***Keine Progression***	
	n	***%***	***n***	***%***
CK (+)	9	29	54	24
CK (-)	22	71	171	76
Gesamt	31	100	225	100

Tab.20: KMP und Progression / keine Progression

Im Log-Rank-Test erwies sich der Knochenmarkbefund hinsichtlich der prognostischen Relevanz als nicht signifikant (p=0.74).

Das 5-Jahresüberleben zeigte unabhängig vom Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark vergleichbare Werte.

Abbildung 9 zeigt die Überlebenskurven der Patienten je nach dem Befund der Knochenmarkuntersuchung:

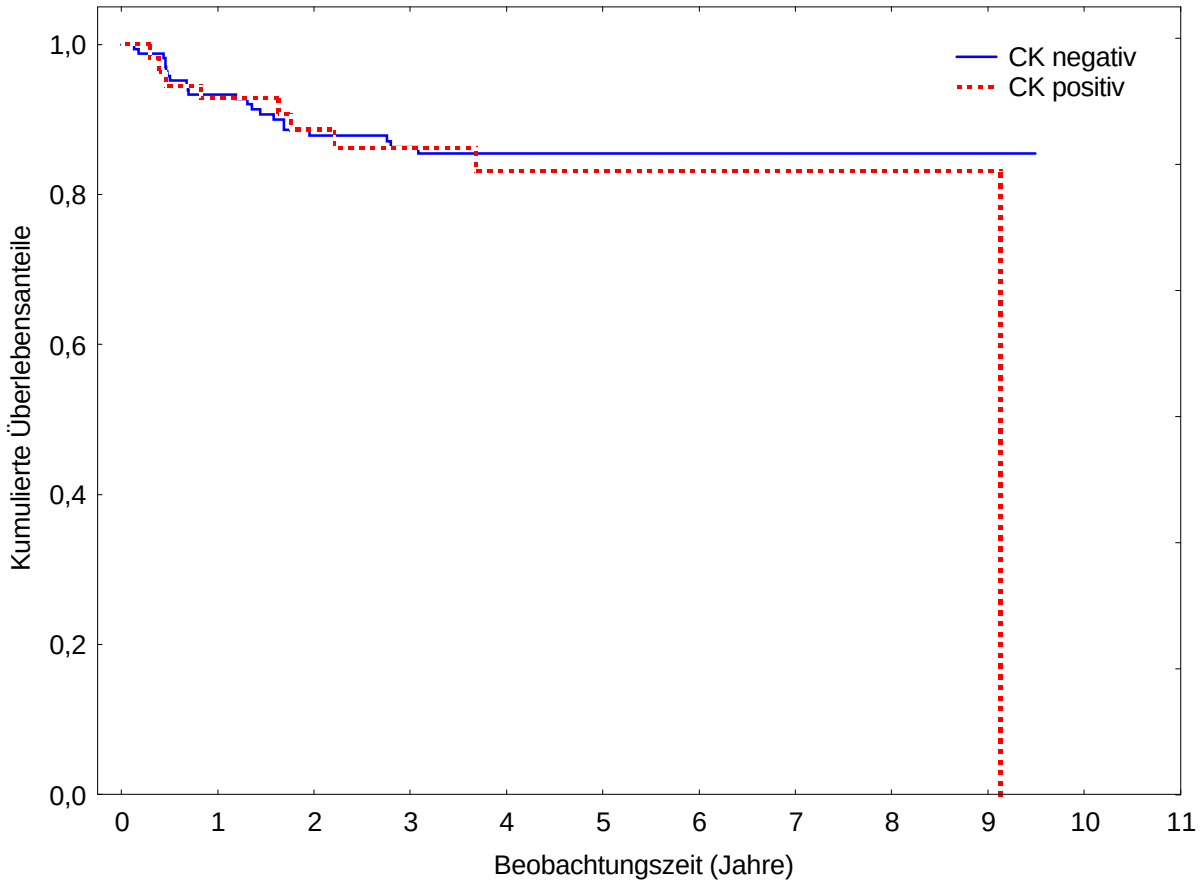

Abb. 9: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Knochenmarkbefund

Auch bei Vergleich der Patientengruppen mit Nachweis von 0 oder 1 gegenüber 2 oder mehreren Tumorzellen im Knochenmark war im Log-Rank-Test keine statistisch signifikante Aussage bezüglich der prognostischen Relevanz dieser Zellen möglich (p=0.77).
Patienten mit zwei oder mehreren CK-positiven Zellen hatten eine 5-Jahresüberlebensrate von 87%, während alle Patienten mit Nachweis einer, bzw. keiner zytokeratinhaltigen Zelle ein 5-Jahresüberleben von 85% aufwiesen.

3.2.7. Multivariate Analyse

Die Multivarianz-Analyse nach Cox ergab für die TNG-Stadien und den Knochenmarkbefund folgende Ergebnisse:

T-Stadium	***N-Stadium***	***G-Stadium***	***KMP***
T < 3b vs. T ≥ 3b	N (-) vs. N (+)	G < 2-3 vs. G ≥ 2-3	CK (+) vs. CK (-)
P < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.01	n.s. (p = 0.96)

Tab. 21: p-Wert und TNG-Stadien / KMP

Somit erwiesen sich T-, N- und G-Stadium als unabhängige prognostische Parameter.
Ein T-Stadium von T≥3b erhöhte das Risiko für ein Ereignis (tumorbedingter Tod, Lokalrezidiv oder Fernmetastasen) um den Faktor 5, der Befall regionärer Lymphknoten bei Diagnosestellung um den Faktor 19 und ein Differenzierungsgrad von G≥2-3 um den Faktor 3 (siehe Tabelle 22):

	Hazard Ratio	***Konfidenzintervalle (95%)***
T-Stadium	5.0	2.5-10.1
N-Stadium	18.9	7.3-49.0
G-Stadium	2.8	1.3-5.9
KMP	1.0	0.5-2.3

Tab. 22: Hazard-Ratio / Konfidenzintervalle und TNG / KMP

Der Nachweis zytokeratinhaltiger Zellen im Knochenmark war in der multivariaten Analyse nicht signifikant (p=0.96) und ist daher kein unabhängiger prognostischer Parameter beim Nierenzellkarzinom.

4. DISKUSSION

4.1. Patienten

In die Studie wurden nur Patienten ohne Fernmetastasen und ohne Residualtumor eingeschlossen (T1-4, N+/-, M0, G1-3, R0). Um sicherzustellen, daß die nachgewiesenen Tumorzellen nur vom Nierenzellkarzinom stammen, wurden Patienten mit bekannten oder später aufgetretenen Zweitmalignomen ausgeschlossen. Ein Problem beim Vergleich unterschiedlicher Studien zum Nachweis der prognostischen Relevanz CK-positiver Zellen bei verschiedenen Tumoren sind die oft heterogenen Patientengruppen hinsichtlich des Tumorstadiums, die stark variierenden Patientenzahlen und die unterschiedlichen Nachbeobachtungszeiträume. Der Umfang dieser prospektiven Studie war mit insgesamt 287 Patienten im Gegensatz zu vielen anderen Studien groß und es findet sich keine andere Studie zum Nierenzellkarzinom mit vergleichbaren Patientenzahlen und Nachbeobachtungszeiten.

4.2. Knochenmarkpunktion und immunzytochemische Methode

Da konventionelle radiologische Methoden zum Nachweis einer Metastasierung in frühen Erkrankungsstadien nicht ausreichen, wurde das Knochenmark als Sekundärorgan einer möglichen Metastasierung untersucht. Wie schon unter 2.4. beschrieben, eignet sich das Knochenmark aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit, der geringen Invasivität und der überschaubaren Risiken bei Entnahme der Zellen hervorragend zum Nachweis disseminierter Tumorzellen. Im Gegensatz zu Tumorzellen im Blut, die sich dort nur temporär aufhalten, haben Tumorzellen, die im Knochenmark zu finden sind, bereits ein Sekundärorgan erreicht und zeigen somit oft adaptive Veränderungen [33]. Trotzdem bleibt die biologische Relevanz dieser Zellen weiterhin unklar. Einerseits kann nach O´Sullivan et al. [29] das präoperative Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark Hinweise auf die Fähigkeit eines Tumors zur Metastasierung und somit auf das Vorliegen einer minimal residualen Erkrankung geben. Andererseits kann es sich auch um ein vorübergehendes Ausschwemmen von Tumorzellen handeln, die durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden können. Da sich aus diesen disseminierten Tumorzellen im späteren Verlauf eventuell

klinisch manifeste Metastasen entwickeln können, machten es sich viele Arbeitsgruppen der unterschiedlichsten Fachrichtungen in den letzten Jahren zur Aufgabe, nach diesen Zellen zu fahnden. Gemeinsames Ziel hierbei war, die prognostische Relevanz dieser Zellen zu überprüfen, um die bereits existierenden etablierten Risikofaktoren (TNMG-Klassifikation) möglicherweise um einen weiteren unabhängigen Prognoseparameter erweitern zu können. Außerdem hoffte man durch die Identifizierung einer neuen Risikogruppe das rezidivfreie Überleben dieser Patienten zu verbessern, indem man bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko frühzeitig eine adjuvante Therapie anwendet. Ziel einer adjuvanten Therapie ist nach Pantel [35] die komplette Eradikation aller Tumorzellen vor ihrer klinischen Manifestation in Form radiologisch faßbarer Fernmetastasen. Somit wäre es wünschenswert, mit Hilfe immunzytochemischer Methoden eine Patientengruppe definieren zu können, die am wahrscheinlichsten von einer Therapie profitiert.

Rohr und Hegglin beschrieben 1936 erstmals den Nachweis disseminierter Tumorzellen aus Knochenmarkaspiraten des Sternums [43]. Der Nachweis der Zellen erfolgte damals nach morphologischen Kriterien. Die Einführung monoklonaler Antikörper in die immunzytochemische Diagnostik [9; 26; 40] erbrachte große Fortschritte beim Nachweis dieser Tumorzellen, indem sie die Detektion tumorassoziierter Antigene ermöglichte.

In der vorliegenden Arbeit fanden sowohl der mAK CK2, der gegen die Zytokeratinkomponente 18, als auch der mAK A45-B/B3, der gegen multiple Zytokeratinkomponenten epithelialer Zellen (unter anderem gegen die Zytokeratinkomponenten 8, 18, 19) gerichtet ist, Verwendung. Die durch den Wechsel des mAK CK2 auf den mAK A45-B/B3 erhoffte höhere Ausbeute an CK-positiven Zellen konnte allerdings wie bereits in 2.4.2. beschrieben in dieser Auswertung nicht bestätigt werden. Die Inzidenz zytokeratinpositiver Tumorzellen im Knochenmark war bei Verwendung der beiden unterschiedlichen Antikörper vergleichbar (24% CK(+)-Zellen mit dem mAK CK2 versus 27% CK(+)-Zellen mit dem mAK A45-B/B3) und im Log-Rank-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Eintretens eines Tumorprogresses ($p=0.32$). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Braun et al. [3], der in einer Analyse von 185 Knochenmarkproben von Patientinnen mit Brustkrebs den CK2- mit dem A45-B/B3-Antikörper verglich. Die Autoren konnten mit dem A45-B/B3-Antikörper eine größere Anzahl CK-positiver Zellen detektieren und konstatierten somit eine erhöhte Sensitivität des mAK A45-B/B3 gegenüber dem CK2-Antikörper ($p<0.0001$). Auch Pantel zeigte in der Auswertung der Ergebnisse von mehr als 500 Mammakarzinompatientinnen, daß der CK2-Antikörper in nahezu der Hälfte der Fälle einen falschnegativen Befund liefert [33]. Eine mögliche Ursache hierfür kann die bei

Brustkrebspatientinnen beschriebene Down-Regulation von Zytokeratin 18 sein [38; 45]. Ebenso weisen neueste Untersuchungen von Weckermann et al. [59] darauf hin, daß die Down-Regulation von Zytokeratin 18 in Tumorzellen zu falsch-negativen Ergebnissen der Knochenmarkuntersuchung führen, und somit für die geringere Sensitivität des mAK CK2 verantwortlich sein könnte (Sensitivität von CK2: 0.28 versus 0.55 mit A45).
Die eigenen Daten lassen keinen Hinweis auf entsprechende Mechanismen in disseminierten Tumorzellen beim Nierenzellkarzinom zu. Die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers stellt eine der bedeutensten Variablen beim Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark dar, so daß die Verwendung einheitlicher Antikörper die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Studien deutlich verbessern würde.

Daß es sich bei den mit dem mAK gegen Zytokeratinkomponenten detektierten Zellen eindeutig um Zellen epithelialen Ursprungs und nicht um normale Knochenmarkzellen handelt, belegen Untersuchungen von Schlimok und Riethmüller et al. [46; 47]. Durch eine zusätzliche Färbung mit CD-45, die Oberflächenantigene auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs nachweist, konnte eine falsch-positive Anfärbung normaler Zellen der Hämatopoese mit dem CK2-Antikörper ausgeschlossen werden. Daß durch die Verwendung des mAK CK2 eine zuverlässige Markierung ortsfremder epithelialer Tumorzellen möglich ist, zeigten auch Untersuchungen von Riesenberg et al. [41], die eine organspezifische Zuordnung von CK2-markierten Prostatakarzinomzellen durch eine Doppelmarkierung der Antigene Zytokeratin und PSA ermöglichten.
In Kontrollgruppen (Patienten mit nicht malignen Erkrankungen) fanden sich nur sehr selten falsch-positive Befunde [28; 48; 54]. Ursachen für falsch-negative Ergebnisse der Knochenmarkuntersuchung können zum einen die große Heterogenität von Tumorzellen sein [62] und zum anderen die bereits erwähnte Down-Regulation von Zytokeratinen [38; 45], so daß eventuell vorhandene Tumorzellen nicht erfaßt werden.

Ein weiteres Problem liegt in der geringen Anzahl positiver Zellen im Knochenmark. Um in einem Zellpool von ein bis zwei Millionen Zellen eine einzige CK-positive Tumorzelle identifizieren zu können, ist ein Verfahren mit ausreichend hoher Sensitivität notwendig. Untersuchungen von Osborne et al. [32] belegen, daß man mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% eine Tumorzelle unter 10^6 Knochenmarkzellen detektieren kann. Zusätzliche Variabilität und damit Probleme in der Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im

Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren ergeben sich außerdem dadurch, daß die Anzahl der untersuchten Zellen zwischen 1.5×10^5 und 5×10^6 pro Patient variiert [12]. Um die Sensitivität des Verfahrens zu optimieren und Vergleichbarkeit zu gewährleisten, forderten Pantel und Riethmüller [37] das Untersuchen von mindestens 2×10^6 kernhaltiger Zellen aus mindestens zwei Knochenmarkaspiraten.
In der vorliegenden Arbeit hatte die zwischenzeitliche Erhöhung der untersuchten Zellzahl von 4×10^5 auf 1×10^6 pro punktierte Seite keinen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse der Knochenmarkuntersuchung.

4.3. Prognostische Relevanz der untersuchten Parameter

4.3.1. Alter und Geschlecht

Weder Alter noch Geschlecht des Patienten ließen Rückschlüsse auf den zu erwartenden Knochenmarkbefund zu. Das durchschnittliche Alter, bzw. das Geschlecht zeigten bei Nachweis von Tumorzellen keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Patienten ohne CK-positive Zellen. Auch die Progressionswahrscheinlichkeit des Tumors war im Log-Rank-Test von Alter und Geschlecht unbeeinflußt.
Ein Altersmedian von 60.48 Jahren und eine Gechlechtsverteilung von Männern zu Frauen von 1.59:1 deckt sich mit Literaturangaben [56].

4.3.2. Tumorstadium und Differenzierungsgrad

Sowohl das Tumorstadium (TNM-Klassifikation) als auch der Differenzierungsgrad (G1-3) des Primärtumors sind etablierte Prognoseparameter beim Nierenzellkarzinom. Dementsprechend konnte in der vorliegenden Auswertung deren statistische Signifikanz hinsichtlich des Eintretens eines definierten Zielereignisses (Lokalrezidiv, Fernmetastasen oder tumorbedingter Tod) eindeutig nachgewiesen werden. Tumorgröße (T-Stadium), Lymphknotenbefall (N-Stadium) und Differenzierungsgrad (G-Stadium) erwiesen sich in der multivariaten Analyse entsprechend gängigen Literaturangaben [56] als unabhängige Prognosepapameter beim Nierenzellkarzinom.

T-Stadium:

Patienten wurden je nach der lokalen Tumorausdehnung zwei Gruppen mit T<3b und T≥3b zugeordnet. Das T-Stadium korrelierte im Log-Rank-Test hochsignifikant mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Tumorprogresses ($p<0.0001$) und es zeigte sich eine deutlich reduzierte 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit einer Tumorausdehnung T≥3b.
Die Multivarianzanalyse bestätigte das T-Stadium als unabhängigen Prognoseparameter, außerdem erhöhte ein Tumorstadium von T≥3b die Wahrscheinlichkeit für Lokalrezidiv, Metastasierung oder tumorbedingten Tod um den Faktor 5.

N-Stadium:

In der Multivarianzanalyse erwies sich der Befall von Lymphknotenstationen als größter Risikofaktor für das Auftreten eines Progresses (Hazard Ratio 18.9). Die deutlich ungünstigere Prognose bei positivem Lymphknotenstatus spiegelte sich im massiv verkürzten 5-Jahresüberleben wider, auch hier korrelierten Lymphknotenstatus und Überleben signifikant miteinander ($p<0.0001$).

G-Stadium:

Zur Auswertung erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen, G<2-3 und G≥2-3. Patienten mit schlechtem Differenzierungsgrad ihres Tumors hatten eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten mit höher differenzierten Tumoren ($p<0.0001$). Erwartungsgemäß stellte auch der Differenzierungsgrad einen unabhängigen Prognosefaktor dar.

4.3.3. Operationsverfahren

Durch verbesserte diagnostische Untersuchungsverfahren kommen mehr Patienten mit Zufallsbefunden von Nierentumoren und vor Eintreten einer klinischen Symptomatik in die Klinik. Aufgrund des somit oft weniger fortgeschrittenen Tumorstadiums eröffnet sich die Möglichkeit von organerhaltenden Operationsverfahren.
Uzzo und Novick [57] halten das organerhaltende Operationsverfahren (Tumorenukleation, Heminephrektomie) für eine effektive Therapie bei Patienten mit organbegrenzten Nieren-

zellkarzinomen. Die elektive Teilnephrektomie bei unifokalen Tumoren mit einem Durchmesser kleiner gleich 4 cm und gesunder kontralateralen Niere weist ein Lokalrezidivrisiko zwischen 0% und 3% und eine tumorspezifische Überlebensrate zwischen 90 und 100% auf. Ebenso zeigt das Langzeitfollow-up (10 Jahre) beim Vergleich der radikalen mit der partiellen Nephrektomie vergleichbare 5-Jahresüberlebensraten. Untersuchungen von Hafez et al. [16] zur nierenerhaltenden Therapie bei lokal begrenzten Nierenzellkarzinomen konnten zeigen, dass bei Tumoren mit einem Durchmesser von kleiner gleich 4 cm eine signifikant geringere Rezidivrate und ein signifikant verbessertes Überleben im Vergleich zu Tumoren größer als 4 cm nachweisbar waren.
Andere Autoren heben neben den exzellenten Kurz- und Langzeitergebnissen der elektiven nierenerhaltenden Operation bezüglich des rezidivfreien Überlebens zusätzlich die funktionellen Vorteile durch den Erhalt von gesundem Nierenparenchym hervor [24].

In der vorliegenden Auswertung war der Anteil CK-positiver Patienten unabhängig vom gewählten Operationsverfahren in den jeweiligen Untergruppen vergleichbar und es zeigte sich kein Unterschied von Rezidiv- oder Metastasierungsrate in Abhängigkeit vom OP-Verfahren. Ebenso war auch das 5-Jahresüberleben unbeeinflußt.
Diese Beobachtungen zeigen, daß eine bei organerhaltenden Verfahren mögliche Tumorzellverschleppung in der Langzeitanalyse nicht mit einem höheren Progressionsrisiko einhergeht und somit keinen Risikofaktor für eine schlechtere Prognose darstellt.
Zur Klärung der Frage nach einer chirurgisch induzierten Tumorzelldissemination entnahmen Pantel et al. [36] bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom vor und nach der Operation Knochenmark und konnten nachweisen, daß es durch die Operation nicht zu statistisch signifikanten Unterschieden in der Detektionsrate von Tumorzellen kommt.

4.3.4. Laborparameter

Von Interesse waren die BKS, der Hämoglobinwert, die LDH und die AP. All diese Parameter können Veränderungen im Rahmen einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung aufweisen. Abgesehen von der LDH erwiesen sich die erhobenen Werte im Log-Rank-Test als statistisch signifikant und stellen Prognosefaktoren beim Nierenzellkarzinom dar.
Die BKS, die im Rahmen von entzündlichen oder auch tumorösen Geschehen beschleunigt sein kann, korrelierte signifikant mit einem verkürzten Überleben. Eine schlechtere Prognose

wurde durch einen erhöhten 1h-Wert für die Blutsenkung angezeigt und wies somit auf das Fortschreiten der Tumorerkrankung hin. Daß eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit mit einem verkürzten Überleben einhergeht deckt sich mit Literaturangaben [44; 51].

Die oft erst bei Patienten im metastasierten Stadium auftretende Anämie stellte einen weiteren Indikator für ein verkürztes Intervall bis zum Auftreten eines Progresses dar und korrelierte stärker als die BKS mit dem Eintreten eines Zielereignisses ($p<0.0001$). Yasunaga et al. [63] konnten einen Hämoglobinwert bei Männern kleiner 12g/dl und bei Frauen kleiner 11g/dl sowohl in der univariaten, als auch in der multivariaten Analyse als ungünstigen Prognoseparameter bestätigen. Allerdings beinhaltete diese Studie im Gegensatz zu unseren Untersuchungen Patienten jeglichen Tumorstadiums, daß heißt auch Patienten mit Fernmetastasen fanden Einschluß in diese Studie. Auch bei anderen Autoren [6; 14] wird einer auftretenden Anämie neben klinischen Symptomen wie Gewichtsverlust oder schlechtem Allgemeinzustand und einigen anderen ausgewählten Laborparametern wesentliche prognostische Bedeutung beigemessen.

Die AP korrelierte ebenso wie eine vorhandene Anämie hoch signifikant mit einer schlechteren Prognose ($p<0.0001$). Diese Beobachtungen decken sich mit der entsprechenden Literatur [6; 14; 44; 51]. Untersuchungen von Chuang et al. [5] zur paraneoplastischen Erhöhung der AP beim Nierenzellkarzinom umfassen 365 Patienten, bei denen keine offensichtliche Ursache für eine Enzymerhöhung vorlag (keine Metastasen, keine Leber- oder Knochenleiden, keine Schwangerschaft). Bei 21% der Patienten fand er eine paraneoplastische AP-Erhöhung, die jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien zeigte. Das 5-Jahresüberleben der Patienten mit normalen Werten für die AP war signifikant besser als das der Patienten mit erhöhter AP.

Bei Nachweis eines erhöhten Wertes für die LDH war keine statistisch signifikante Aussage hinsichtlich des Eintretens einer Tumorprogression möglich ($p=0.12$). Der Nachweis einer erhöhten Enzymaktivität durch gesteigerten Zellumsatz und Zelluntergang beispielsweise durch ein fortschreitendes Tumorleiden ließ keine Rückschlüsse auf eine schlechtere 5-Jahresüberlebensrate zu. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise damit zusammenhängen, daß aufgrund fehlender Bestimmung in einem Großteil der Fälle keine Werte für die LDH zur Verfügung standen und die vorhandenen 75 LDH-Werte eventuell keinen repräsentativen Ausschnitt aus dem Gesamtkollektiv darstellten. Allerdings erreichte auch bei Citterio et al. [6], der nur Patienten in bereits metastasierten Tumorstadien untersuchte, eine erhöhte Enzymaktivität der LDH nur in der univariaten Analyse statistische Signifikanz.

4.3.5. Knochenmarkergebnisse

Der Frage nach der statistischen Signifikanz eines positiven Nachweises von Tumorzellen im Knochenmark sind in den vergangenen Jahren viele Arbeitsgruppen unterschiedlicher Fachrichtungen nachgegangen [27; 34; 47]. Die jeweils zugrundeliegende Zielsetzung war, mit Hilfe des Knochenmarkstatus neben den bereits etablierten Risikofaktoren wie beispielsweise dem TNMG-Stadium einen zusätzlichen unabhängigen Prognoseparameter zu bestimmen.

Untersucht wurde in den meisten Studien:

- Anteil knochenmarkpositiver Patienten am Gesamtkollektiv und in jeweils definierten Untergruppen
- Anzahl disseminierter Tumorzellen im Knochenmarkaspirat des Patienten
- Anzahl falsch-positiver Befunde in Kontrollgruppen
- Korrelation zwischen Knochenmarkergebnis und etablierten Risikofaktoren (TNMG-Stadium, Tumortyp, Hormonrezeptorstatus, u.a.)
- Rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben in Korrelation zum Knochenmarkstatus
- Bei ausreichend großer Kohorte und ausreichend langer Nachbeobachtungszeit multivariate Analyse zur Prüfung des Knochenmarkstatus als unabhängigen Prognoseparameter

Der Anteil von Tumorpatienten mit CK-positiven Zellen im Knochenmark variiert in der Literatur zwischen ca. 20% und über 50% [18]. In der vorliegenden Arbeit lag der Anteil CK-positiver Knochenmarkproben im Kollektiv der auswertbaren Knochenmarkproben mit 25% (63/256) relativ niedrig, während er sich beipielsweise bei anderen Tumorentitäten wie dem Pankreaskarzinom auf bis zu 56% beläuft [54]. Trotz diesem relativ hoch erscheinenden Anteil disseminierter Tumorzellen beim Pankreaskarzinom handelt es sich auch hier um kurativ behandelte Patienten. Die unterschiedlichen Detektionsraten können möglicherweise Hinweise auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium oder die spezielle Tumorbiologie geben und somit eine erhöhte Aggressivität des jeweiligen Tumors anzeigen.

Tumorentität	***KM(+)***
Nierenzellkarzinom	~20% [31]
Mammakarzinom	~30% [10; 39]
Magenkarzinom	~30% [21; 39]
Kolorektales Karzinom	~30% [21; 39]
Prostatakarzinom	~35% [31]
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	~50% [36]
Pankreaskarzinom	~50% [21]
Ösophaguskarzinom	~40% [53]

Tab.23: Häufigkeit des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei unterschiedlichen Primärtumoren [*17*]

Ein Problem in der Deutung der Ergebnisse war die Tatsache, daß bei einem Großteil der Patienten (26/63) mit disseminierten Tumorzellen nur eine zytokeratinpositive Zelle im Knochenmarkaspirat nachweisbar war. Es erscheint daher schwierig, die prognostische Relevanz einer einzigen Zelle zu evaluieren. Untersuchungen von Weckermann et al. zur prognostischen Relevanz disseminierter Tumorzellen bei Prostatakarzinompatienten unter Verwendung des CK2-Antikörpers zeigen nur bei Patienten mit Nachweis von ≥3 CK-positiven Zellen einen Trend zu einer schlechteren Prognose, während die Detektion von weniger als 3 Zellen die Prognose von Patienten mit Prostatakarzinom nicht beeinflußt [61]. Ferner weisen auch hier die meisten Patienten mit positivem Tumorzellnachweis nur eine CK-positive Zelle auf.

Von den 256 untersuchten Patienten hatten Patienten mit größeren Tumoren (T≥3b) und positivem Lymphknotenstatus (N+) zwar einen höheren Anteil disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.
Ein hohes G-Stadium (G≥2-3) war in der Studie mit einem höheren Anteil von Tumorzellen im Knochenmark assoziiert.
Ebenso zeigten Weckermann et al. [60] beim lokal begrenzten Prostatakarzinom die fehlende Korrelation disseminierter Zellen bzw. Anzahl positiver Zellen im Knochenmark mit gängigen Prognosefaktoren wie TN-Stadium, PSA-Wert, Gleason-Score oder perineuraler Invasion. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Pantel et al. beim nicht-kleinzelligen

Bronchialkarzinom [36], Wollenberg et al. bei Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich [62] und Funke et al. bei Patientinnen mit Brustkrebs [13].
Im Gegensatz dazu stehen zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre bei anderen Tumorarten, bei denen ein Zusammenhang zwischen Tumorzellnachweis im Knochenmark und etablierten Risikofaktoren nachgewiesen werden konnte. Die Dissertation von Stefan Staudte [52], die sich ebenso wie die vorliegende Arbeit mit Nierentumorpatienten beschäftigt, stellt eine Zwischenauswertung mit teilweise überlappendem Patientengut dar. Hier zeigte sich ein größerer Anteil von CK-positiven Befunden bei Patienten mit höheren Tumorstadien. Auch fanden sich CK-18-positive Zellen im Knochenmark signifikant häufiger bei Patienten mit niedrig und entdifferenzierten Nierenzellkarzinomen. Oberneder und Kriegmair et al. [22; 30] beschrieben außerdem einen signifikant höheren Anteil CK-18-positiver Zellen bei Patienten mit Lymphknotenbefall und G3-Tumoren.

Zu ähnlich divergierenden Ergebnissen kommt es beim Vergleich der Studien zur prognostischen Aussagekraft des Knochenmarkbefundes [2-4; 8; 11].
In der vorliegenden Auswertung war mit Hilfe des Knochenmarkbefundes keine statistisch signifikante Aussage bezüglich des Eintretens eines Zielereignisses (Lokalrezidiv, Fernmetastasen oder tumorbedingter Tod) möglich (p=0.74). Das 5-Jahresüberleben zeigte unabhängig vom Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark vergleichbare Werte. Auch bei Patienten, die zwei oder mehr CK-positive Zellen hatten, war keine Aussage bezüglich der prognostischen Relevanz dieser Zellen möglich; die Patienten hatten keine schlechtere Prognose als die mit Nachweis maximal einer disseminierten Tumorzelle im Knochenmark. Der Knochenmarkstatus konnte in der Multivarianz-Analyse nicht als unabhängiger Prognoseparameter für das Nierenzellkarzinom etabliert werden (p=0.96).
Die Tatsache, daß die Zwischenauswertung von Staudte im Gegensatz zur jetzigen Auswertung die prognostische Relevanz dieser Zellen und damit ihre Bedeutung hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens belegte, kann sowohl auf die damals geringere Patientenzahl, als auch auf die kürzere Nachbeobachtungszeit zurückzuführen sein.
Vergleichbare Ergebnisse wie die hier vorliegende Auswertung erbrachte die Analyse von 119 Patienten mit Prostatakarzinom [23], die sich im Zeitraum von 1990 bis 1997 in der Urologischen Klinik Großhadern einer radikalen Prostatovesikulektomie unterzogen. Ein Tumorzellnachweis im Knochenmark war nicht mit einer verkürzten Latenz bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs (PSA-Anstieg) und somit nicht mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Weckermann et al. kommen allerdings zu abweichenden Ergebnissen [59; 61]. Bei

ersten Untersuchungen unter ausschließlicher Verwendung des mAK CK2 hatten die post-operative Persistenz bzw. das Neuauftreten CK-positiver Zellen im Verlauf der Nachbeobachtung keine prognostische Bedeutung für den Patienten. Andere Ergebnisse zeigten Färbungen mit dem CK2 und dem A45-B/B3-AK an 82 Knochenmarkproben. Patienten mit A45-B/B3-positiven Zellen im präoperativen Knochenmarkaspirat wiesen signifikant früher ein biochemisches Rezidiv (PSA-Anstieg) nach radikaler Prostatektomie auf, als Patienten ohne A45-B/B3-positiven Befund. In der multivariaten Analyse konnte der Knochenmarkbefund neben PSA-Wert, pathologischem Tumorstadium und Gleason-Score als zusätzlicher unabhängiger Prognoseparameter etabliert werden. Die erhöhte Sensitivität des A45-B/B3-Antikörpers gegenüber dem CK2-Antikörper führen die Autoren vor allem auf die bekannte Down-Regulation von Zytokeratin 18 in Tumorzellen zurück, die somit bei Verwendung des mAK CK2 möglicherweise zu falsch-negativen Befunden führen kann.

Bei anderen epithelialen Tumoren wie beispielsweise kurativ resezierten kolorektalen Tumoren korrelierte nach Grützner et al. [15] die Anwesenheit zytokeratinpositiver Zellen nur in Untergruppen mit dem rezidivfreien Überleben. Nur bei Patienten mit Lymphknoten-metastasen (Dukes C) und bei Patienten mit persistierend oder zunehmend hoher Anzahl positiver Zellen im Langzeitfollow-up war im Log-Rank-Test ein signifikanter Zusammen-hang mit einem früheren Auftreten eines Tumorrezidives festzustellen.

Die prospektive Studie von Funke et al. [13] zur minimal residualen Erkrankung bei 1045 nachuntersuchten Brustkrebspatientinnen bestätigte den Knochenmarkstatus in der multi-variaten Analyse als unabhängigen Prognoseparameter ($p=0.049$, RR 1.41). Im Gegensatz zu Untersuchungen von Diel et al. [10], bei dem ein positiver Knochenmarkbefund hinsichtlich der Prognose der Patientin sogar dem axillären Lymphknotenstatus überlegen war, rangierte der prognostische Einfluß CK-18-positiver Zellen bei Funke hinter dem der axillären Lymphknoten, des T-Stadiums und des Hormonrezeptorstatus.

In einer Meta-Analyse von Funke et al. [12], die 20 Studien mit insgesamt 2494 Patienten umfasste, fand sich in der univariaten Analyse bei 14 von 20 Studien ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und einem verkürzten rezidivfreien Überleben. Allerdings bestätigten nur 5 von 11 Studien den Knochenmarkstatus in der multivariaten Analyse als unabhängigen Prognoseparameter für ein verkürztes rezidiv-freies Überleben. Betrachtet man das Gesamtüberleben, konnte der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark univariat in 5 von 12 Studien, multivariat in nur zwei Studien als unabhängiger Prognoseparameter identifiziert werden.

Bei Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom [17; 20] zeigte sich der Knochenmarkstatus als zusätzlicher Prognoseparameter bei Patienten mit kurativ resezierten T1/T2-Tumoren ohne Lymphknotenbefall.

Die Probleme in der Vergleichbarkeit der zahlreichen Studien und die starke Varianz der gewonnenen Ergebnisse können folgende Ursachen haben:

- Stark variierende Patientenzahlen in den jeweiligen Studien
- Unterschiedliche Ein- und Auschlußkriterien (z.B. TNMG-Stadium)
- Verwendung unterschiedlicher Antikörper mit variierender Sensitivität und Spezifität (Antikörper gegen Zytokeratine oder Oberflächenantigene, monoklonale AK oder polyklonale AK)
- Anzahl untersuchter Zellen zwischen 1.5×10^5 und 5×10^6 Zellen pro Patient
- Unterschiedlich lange Nachbeobachtungszeit

Um dieser Varianz vorzubeugen und um die Validität der Ergebnisse zu steigern wäre eine Standardisierung der Methode mit Verwendung eines einheitlichen Antikörpers, Untersuchung identischer Zellzahlen und möglichst vergleichbarer Patientenkollektive (M0, R0) erforderlich [27;36].

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die prognostische Relevanz zytokeratinhaltiger Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit histologisch gesichertem Nierenzellkarzinom evaluiert werden. Hierfür wurde von 287 Patienten mit nichtmetastasierten Tumoren präoperativ Knochenmark aus den beiden vorderen Beckenkämmen entnommen. Die Knochenmarkaspirate wurden anschließend mit Hilfe eines standardisierten immunzytochemischen Verfahrens auf das Vorliegen von Tumorzellen untersucht. Verwendung fanden monoklonale Antikörper gegen Zytokeratinkomponenten (mAK CK2 gegen CK18 und mAK A45-B/B3 gegen CK8, 18, 19 und andere Zytokeratine), die Bindung des Antikörpers an die Bestandteile des Zytoskeletts wurde durch die APAAP-Methode sichtbar gemacht.
Daß es sich hierbei um ein tumorspezifisches Nachweisverfahren handelt, belegen Untersuchungen bei Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen, bei denen sich in der Regel keine CK-positiven Zellen finden lassen.
Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und des Log-Rank-Tests, die Überlebenskurven wurden in Form von Kaplan-Meier-Plots dargestellt und zur Prüfung des Knochenmarkstatus als unabhängigen Prognoseparameter wurde eine Multivarianzanalyse durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Knochenmarkstatus neben den bereits etablierten Risikofaktoren wie Tumorgröße, Lymphknotenbefall und histologischem Differenzierungsgrad als zusätzlichen unabhängigen Prognoseparameter zu etablieren.
Die Bedeutung des TNG-Stadiums hinsichtlich der Progressionswahrscheinlichkeit des jeweiligen Tumors wurde hier eindeutig bestätigt, außerdem konnten eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, eine Anämie und eine erhöhte Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall in Verbindung gebracht werden.
Bei 25% (63/256) der Nierentumorpatienten konnten zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark detektiert werden. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark korrelierte nicht mit T-und N-Stadium, allerdings ließen sich bei schlecht differenzierten Tumoren ($G \geq 2\text{-}3$) signifikant häufiger Tumorzellen im Knochenmark nachweisen als bei gut differenzierten Tumoren ($G < 2\text{-}3$).

Der Knochenmarkstatus war in der Studie kein Indikator für eine schlechtere Prognose. Das Vorliegen CK-positiver Zellen im Knochenmark von Tumorpatienten konnte in der Multivarianzanalyse nicht als unabhängiger Risikofaktor bestätigt werden (p=0.96) und somit war es nicht möglich, beim Nierenzellkarzinom die gängigen Risikofaktoren (TNMG-Klassifikation) um einen zusätzlichen Prognoseparameter zu erweitern.
Nierentumorpatienten, bei denen in der präoperativen Knochenmarkprobe eine oder mehr disseminierte Tumorzellen nachweisbar waren, stellen somit keine Hochrisikogruppe dar.
Das gewählte Operationsverfahren (Nephrektomie oder organerhaltende Operation) hatte keine Relevanz bezüglich des Auftretens von Tumorrezidiven bzw. einer Tumorprogression.

Die gewonnenen Daten aus Studien bei anderen epithelialen Tumoren (Brust-, Kolon-, Magen-, Prostata-, Urothel-, Bronchialkarzinom u.a.), die sich ebenfalls mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und deren prognostischer Relevanz befassen, liefern kontroverse Ergebnisse. Dies kann an der eingeschränkten Vergleichbarkeit der Daten liegen (starke Heterogenität der Patientenkollektive, Abweichungen bei den verwendeten Antikörpern, unterschiedlich lange Follow-up-Zeiten etc.), oder auch mit der jeweiligen Biologie der untersuchten Tumorentität zusammenhängen.
Denkbar für zukünftige Studien sind molekulare Techniken, wie etwa die Polymerasekettenreaktion (PCR), die mit einer höheren Sensitivität eine noch geringere Anzahl von Tumorzellen erkennen könnten. Hiermit wäre es möglich, tumorassoziierte Mutationen z. B. des kiras-Onkogens und des p53-Suppressorgens nachzuweisen und somit mehr Erkenntnisse über die Charakteristika der disseminierten Tumorzellen zu gewinnen.

6. ABKÜRZUNGEN

APAAP = Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase

BKS = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

Hb = Hämoglobin

AP = Alkalische Phosphatase

LDH = Laktatdehydrogenase

n. a. = nicht auswertbar (Knochenmarkpunktion)

CK(+) = Zytokeratin-positiv

CK(-) = Zytokeratin-negativ

KM(+) = Knochenmark-positiv =CK(+)

KMP = Knochenmarkpunktion

n.s. = nicht signifikant

LK = Lymphknoten

5-JÜR = 5-Jahresüberlebensrate

p = Wahrscheinlichkeit

OP = Operation

TNMG = Tumorklassifikation der UICC

vs = versus

(m)AK = (monoklonaler) Antikörper

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ, et al**. IL-2 in combination with IFN- alpha and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial. Br.J.Cancer 2001; 85: 1130-1136.

2. **Braun, S., Cevatli, B. S., Assemi, C., Janni, W., Kentenich, C. R. M., Schindlbeck, C., Rjosk, D., and Hepp, F.** Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. J.Clin.Oncol. 19(5), 1468-1475. 2001.

3. **Braun, S., Müller, M., Hepp, F., Schlimok, G., Riethmüller, G., and Pantel, K.** Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. 1099-1100. 1998.

4. **Broll, R., Lembcke, K., Stock, C., Zingler, M., Duchrow, M., Schimmelpenning, H., Strik, M., Müller, G., Kujath, P., and Bruch, H. P.** Tumorzelldissemination in das Knochenmark und in die Peritonealhöhle; eine immunzytochemische Untersuchung an Patienten mit einem Magen- oder kolorektalen Karzinom. Langenbecks Arch.Chir., Springer-Verlag 381, 51-58. 1996.

5. **Chuang, Y. C., Lin, A. T., Chen, K. K., Chang, Y. H., Chen, M. T., and Chang, L. S.** Paraneoplastic elevation of serum alkaline phosphatase in renal cell carcinoma: incidence and implication on prognosis. J.Urol. 158(5), 1684-1687. 1997.

6. **Citterio, G., Bertuzzi, A., Tresoldi, M., Galli, L., Di Lucca, G., Scaglietti, U., and Rugarli, C.** Prognostic factors for survival in metastatic renal cell carcinoma: retrospective analysis from 109 consecutive patients. Eur.Urol. 31(3), 286-291. 1997.

7. **Cordell, J. F., Falini, B., and et al.** Immunenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J.Histochem.Cytochem. 32, 219-229. 1984.

8. **Cote, R., Beattie, E. J., Chaiwun, B., Shi, S. R., Harvey, J., Chen, S. C., Sherrod, A. E., Groshen, S., and Taylor, C. R.** Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. Annals Surg. 222(4), 415-425. 1995.

9. **Dearnaley, D. P., Ormerod, M. G., and Sloane, J. P.** Micrometastasis in breast cancer: long-term follow-up of the first patient cohort. Eur.J.Cancer 27(3), 236-239. 1991.

10. **Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Holle, R., v.Minckwitz, G., Solomayer, E. F., Kaul, S., and Bastert, G.** Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. J.Nat.Cancer Inst. 88(22), 1652-1658. 1996.

11. **Funke, I., Fries, S., Rolle, M., Heiss, M. M., Untch, M., Bohmert, H., Schildberg, F. W., and Jauch, K. W.** Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. Int.J.Cancer 65, 755-761. 1996.

12. **Funke, I. and Schraut, W.** Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. J.Clin.Oncol. 16, 557-566. 1998.

13. **Funke, I., Schraut, W., Jauch, K. W., Untch, M., and Schildberg, F. W.** Prospective study on minimal residual disease in breast cancer. Abstract des 1st International Congress Molecular staging of Cancer, Klinikum Großhadern der LMU München, 6.-8.Dez.2001 . 2001.

14. **Gelb, A. B.** Renal cell carcinoma: current prognostic factors. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Cancer 80(5), 981-986. 1997.

15. **Gruetzner, K. U., Pietsch, A. R., Beyer, B. C. M., Allgayer, H., Heiss, M. M., and Schildberg, F. W.** Minimal residual disease as a potential staging entity in colorectal cancer. Abstract des 1st International Congress Molecular staging of Cancer, Klinikum Großhadern der LMU München, 6.-8.Dez.2001 . 2001.

16. **Hafez, K. S., Fergany, A. F., and Novick A.C.** Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. J.Urol. 162, 1930. 1999.

17. **Heiss, M. M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Babic, R., Jauch, K. W., and Schildberg, F. W.** Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor-associated proteases in gastric cancer. Annals Surg. 226(6), 736-744. 1997.

18. **Hermanek, P., Hutter, R. V. P., Sobin, L. H., and Wittekind, C.** Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. Cancer 86(12), 2668-2673. 1999.

19. **Herold G**. Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, 1999: 737-743.

20. **Jauch, K. W., Heiss, M. M., Gruetzner, K. U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R., Eissner, H. J., Riethmüller, G., and Schildberg, F. W.** Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. J.Clin.Oncol. 14(6), 1810-1817. 1996.

21. **Juhl, H., Stritzel, M., Wroblewski, A., Henne-Bruns, D., Kremer, B., and Schmiegel, W.** Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. Int.J.Cancer 57, 330-335. 1994.

22. **Kriegmair, M. and Oberneder, R.** Cytokeratin marking of disseminated tumor cells- a new prognostic parameter for urological tumors? Tumor associated antigens, oncogenes, receptors, cytokines in tumor diagnosis and therapy at the beginning of the ninties, Hrsg.Klapdor R., W.Zuckerschwerdt Verlag München , 490-492. 1992.

23. **Kuffer, A.** Die prognostische Bedeutung zytokeratinhaltiger Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit nichtmetastasiertem Prostatakarzinom.
Eine univariate und multivariate Analyse. 2002. Urologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation

24. **Lau, W., Blute, M. L., and Zincke, H.** Matched comparison of radical nephrectomy versus elective nephron sparing surgery for renal cell carcinoma: evidence for increased renal failure rate on long term follow-up (> 10 years). J.Urol. 163, 153, abstract 681. 2000.

25. **Lopez HE, Kirchner H, Atzpodien J**. Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. J.Urol. 1996; 155: 19-25.

26. **Mansi, J. L. and Berger, U.** Bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer: an early predictor of bone metastases. Br.Med.J. 295, 1093-1096. 1987.

27. **Mansi, J. L., Easton, D., Berger, U., Gazet, J. C., Ford, H. T., Dearnaley D.P., and Coombes, R. C.** Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: Prognostic significance after 6 years` follow-up. Eur.J.Cancer 27(12), 1552-1555. 1991.

28. **Melchior, S. W., Corey E., Ellis, W. J., Ross, A. A., Layton, T. J., Oswin, M. M., Lange, P. H., and Vessella, R. L.** Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. Clin.Cancer Res. 3, 249-256. 1997.

29. **O`Sullivan, G. C., Collins, J. K., Kelly, J., Morgan, J., Madden, M., and Shanahan, F.** Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? Gut 40(4), 512-515. 1997.

30. **Oberneder, R., Kriegmair, M., and Klammert, R.** Mikrometastasierung beim Nierenzellkarzinom. Klin.Exp.Urol. 24, 86-92. 1992.

31. **Oberneder, R., Kriegmair, M., Pantel, K., Staudte, S., Hofstetter, A., and Riethmüller, G.** Prognostic relevance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with genitourinary tract tumors. J.Urol. 151, 413A. 1994.

32. **Osborne, M., Wong, G., Asina, S., Old, L., Cote, R., and Rosen, P.** Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. Cancer Res. 51, 2706-2709. 1991.

33. **Pantel, K.** Residuale Tumorzellen: Diagnostische Ansätze, prognostische Relevanz, Biologie und Antikörpertherapie. Tumordiagnostik und Therapie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 20, 131-134. 1999.

34. **Pantel, K., Aignherr, C., Köllermann, J., Caprano, J., Riethmüller, G., and Köllermann, M. W.** Immuncytochemical detection of isolated tumour cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer. Eur.J.Cancer 31A(10), 1627-1632. 1995.

35. **Pantel, K., Cote, R. J., and Fodstad, O.** Detection and clinical importance of micrometastatic disease. J.Nat.Cancer Inst. 91(13), 1113-1124. 1999.

36. **Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Häussinger, K., Thetter, O., and Riethmüller, G.** Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. Lancet 347, 649-653. 1996.

37. **Pantel, K. and Riethmüller, G.** Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood and lymph nodes. Onkologie 18, 394-401. 1995.

38. **Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, C., Schmaus, W., and Gath, H.** Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. J.Hematother 3, 165-173. 1994.

39. **Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., and Schaller, G.** Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. J.Nat.Cancer Inst. 85, 1419-1424. 1993.

40. **Redding, W. H., Coombes, R. C., Monaghan, P., Clink, H., Imrie, S. F., Dearnaley D.P., Ormerod, M. G., Sloane, J. P., Gazet, J. C., Powles, T. J., and Neville, A. M.** Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. Lancet , 1271-1274. 1983.

41. **Riesenberg, R., Oberneder, R., Kriegmair, M., Epp, M., Bitzer, U., Hofstetter, A., Braun, S., Riethmüller, G., and Pantel, K.** Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells. Histochemistry 99, 61-66. 1993.

42. **Rodriguez, R., Fishman, E. K., and Marshall, F. F.** Differential diagnosis and evaluation of the incidentally discovered renal mass. Semin.Urol.Oncol. 13(4), 246-253. 1995.

43. **Rohr, K. and Hegglin, R.** Tumorzellen im Sternalpunktat. Metastasennachweis maligner Geschwülste im Knochenmark. Dt.Archiv f.Klin.Medizin 179, 62-79. 1936.

44. **Roosen, J. U., Engel, U., Jensen, R. H., Kvist, E., and Schou, G.** Renal cell carcinoma: prognostic factors. Br.J.Urol. 74(2), 160-164. 1994.

45. **Schaller, G., Fuchs, I., Pritze, W., Ebert, A., Herbst, H, and Pantel, K.** Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. Clin.Cancer Res. 2, 1879-1885. 1996.

46. **Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., and Riethmüller, G.** Monoklonale Antikörper-neue Sonden für Diagnose und Therapie. Drug Res. 38, 435-437. 1988.

47. **Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., Witte, J., and Riethmüller, G.** Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. J.Clin.Oncol. 8(5), 831-837. 1990.

48. **Soeth, E., Vogel, I., Röder, C., Juhl, H., Marxsen, J., Krüger, U., Henne-Bruns, D., Kremer, B., and Kalthoff, H.** Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. Cancer Res. 57, 3106-3110. 1997.

49. **Sökeland J, Schulze H, Rübben H**. Urologie. Verstehen - Lernen - Anwenden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001: 264

50. **Spiessl B, Beahrs OH, Hermanek P, et al**. UICC-TNM-Atlas. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1992:

51. **Srigley, J. R., Hutter, R. V. P., Gelb, A. B., Henson, D. E., Kenney, G., King, B. F., Raziuddin, S., and Pisansky, T. M.** Current prognostic factors- renal cell carcinoma. Cancer 80(5), 994-996. 1997.

52. **Staudte, S.** Die prognostische Bedeutung zytokeratinhaltiger Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit nichtmetastasiertem Nierenzellkarzinom-eine multivariate Analyse. Dissertation an der medizinischen Fakultät an der LMU München . 1998.

53. **Thorban S., Roder, J. D., Nekarda, H., Funk, A., Pantel, K., and Siewert, J. R.** Disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with esophageal cancer: detection and prognostic significance. World J.Surg. 20, 567-573. 1996.

54. **Thorban S., Roder, J. D., Pantel, K., and Siewert, J. R.** Immunzytochemischer Nachweis und prognostische Bedeutung von epithelialen Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Zentralbl.Chir. 121, 487-492. 1996.

55. **Trainer, D. L., Kline, T., and et al.** Biological characterization and oncogene expression in human colorectal cell lines. Int.J.Cancer 41, 287-296.

56. **Tumorzentrum München an den Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität München**. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Urogenitaltumoren. Hrsg.Tumorzentrum München , 74-93. 1997.

57. **Uzzo, R. G. and Novick A.C.** Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. J.Urol. 166, 6-18. 2001.

58. **Vallancien, G., Torres, L. O., Gurfinkel, E., Veillon, B., and Brisset, J. M.** Incidental detection of renal tumours by abdominal ultrasonography. Eur.Urol. 18(2), 94-96. 1990.

59. **Weckermann, D., Müller, P., Wawroschek, F., Harzmann, R., Riethmüller, G., and Schlimok, G.** Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. J.Urol. 166, 699-704. 2001.

60. **Weckermann, D., Müller, P., Wawroschek, F., Krawczak, G., Riethmüller, G., and Schlimok, G.** Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. J.Clin.Oncol. 17(11), 3438-3443. 1999.

61. **Weckermann, D., Wawroschek, F., Krawczak, G., Haude, K. H., and Harzmann, R.** Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time to biochemical relapse after radical prostatectomy? Urol.Res. 27, 285-290. 1999.

62. **Wollenberg, B., Ollesch, A., Maag, K., Funke, I., and Wilmes, E.** Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Laryngo-Rhino-Otol.,Georg Thieme Verlag Stuttgart,New York 73, 88-93. 1994.

63. **Yasunaga, Y., Shin, M., Miki, T., Okuyama, A., and Aozasa, K.** Prognostic factors of renal cell carcinoma: a multivariate analysis. J.Surg.Oncol. 68(1), 11-18. 1998.

8. ANHANG

8.1. Dokumentationsbögen

DATENERHEBUNG NIERENZELLKARZINOM Pat-IDNR:

Name _____ Vorname _____ Geburtsdatum _____

Straße _____ Ort:_____ Tel.:/Fax _____

Hausarzt _____ Tel:_____ Fax: _____

Straße:_____ Ort: _____

Vorbehandlung: _____ ☐ von: _____ bis: _____

_____ ☐ von: _____ bis: _____

OP Datum: _____

Nephrektomie ☐ Embolisation ☐

Tumorextinsion ☐ _____ ☐

Histologie T: ___ N: ___ M:___ G:___ Cavazapfen ja ☐ nein ☐

klarzellig ☐ chromophob ☐

papilär ☐ _____ ☐

OP-Ergebnis R0 ☐ R1 ☐ R2 ☐

KMP-Ergebnis Datum: _____ bei OP ja ☐ nein ☐

pos ☐ neg ☐ Anz. Zellen ____

Anz. Pos. Zellen ____ Cluster ja ☐ nein ☐

Bemerkungen: _____

Labor (prä OP) HB: ____ g/dl BKS: ____ mm n.W:

AP: ____ U/L LDH: ____ V/l

Nachbehandlung: Radiatio ja ☐ nein ☐ von: _____ bis: _____

Dosis: _____

Lok.:

_____

Immunchemo ja ☐ nein ☐ Dat.: _____

Schema:

_____

FOLLOW-UP NIERENZELLKARZINOM Pat-IDNR:

Name _____ Vorname _____ Geburtsdatum _____

Lokalrezidiv ja ☐ nein ☐ Untersuchungsdatum: _____

Metastasen ja ☐ nein ☐ Untersuchungsdatum: _____
Anzahl _____ Zahl der Organsysteme: _____

☐ Lymphknoten ☐ pelvin ☐ Aorta ☐ Cava
Anzahl _____ ☐ multipel

☐ Knochen ☐ WS Anzahl _____ ☐ multipel
☐ Becken Anzahl _____ ☐ multipel
☐ Extremit. Anzahl _____ ☐ multipel
☐ Schädel Anzahl _____ ☐ multipel
☐ _____ Anzahl _____ ☐ multipel

☐ Leber Anzahl _____ ☐ multipel
☐ Lunge Anzahl _____ ☐ multipel
☐ Hirn Anzahl _____ ☐ multipel
☐ _____ Anzahl _____ ☐ multipel

Untersuchungen: ☐ Rö-Thorax ☐ Szinti ☐ CT
☐ NMR ☐ TRUS ☐ rektale

Unt.

Labor: HB: ____ g/dl BKS: ____ mm
n.W:
AP: ____ U/L LDH: ____ V/l

Verstorben ja ☐ nein ☐ Datum: _____

Tumorbedingt ja ☐ nein ☐ andere Todesursache

_____

Behandlung: Radiatio ja ☐ nein ☐ von: _____ bis:
Dosis: _____
Lok.:

_____

Immunchemo ja ☐ nein ☐ Dat.: _____
Schema:

_____

Chir. Therapie Resektion Lokalrez. ☐ komplett ☐ inkomplett ☐
Lokalisation:

_____

Resektion Metastase ☐ komplett ☐ inkomplett ☐
Lokalisation:

_____

8.2. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. A. Hofstetter (Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum Großhadern) danke ich vielmals für die Überlassung des Themas, sowie für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Mitteln in der Urologischen Klinik und Poliklinik sowie dem Labor für Tumorimmunologie im LIFE-Zentrum der Urologischen Klinik.

Bei Herrn Dr. med. R. Oberneder möchte ich mich für die konstante Förderung sowohl im praktischen, wie auch im theoretischen Teil dieser Arbeit, für die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, die kritische Korrektur dieser Arbeit und die stets freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer persönlicher Dank gilt Herrn Dr. med. A. Buchner, der mit seiner fachlichen Kompetenz, seinem großen Engagement und seiner Geduld sehr viel zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. rer. nat. R. Riesenberg für die vielen konstruktiven Vorschläge und Anregungen zu dieser Arbeit herzlich danken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. A. Crispin für seine Betreuung bei der statistischen Auswertung und Darstellung der Daten.

Ich danke vielmals der Belegschaft der Urologischen Poliklinik und des Krankenhausarchivs für die freundliche und kollegiale Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn M. Antreich für die unermüdliche Hilfe beim theoretischen Teil dieser Doktorarbeit bedanken.

8.3. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Ines Kotter
Geburtsdatum:	02.03.76
Geburtsort:	München
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1982 – 1986	Besuch der Grundschule in Alling
1986 – 1992	Besuch des Max-Born-Gymnasiums in Germering
1992 – 1995	Besuch des Carl-Spitzweg-Gymnasiums in Germering
Juni 1995	Abitur

Studium und Beruf:

1995/96	Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
September 1997	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
August 1998	1.Staatsexamen
seit Oktober 1998	Doktorand an der Urologischen Klinik im Klinikum Großhadern
August 2000	2.Staatsexamen
September 2001	3.Staatsexamen
März 2002 – Februar 2003	Ärztin im Praktikum in der Chirurgischen Privatklinik München-Bogenhausen
März 2003 – August 2003	Ärztin im Praktikum in der Urologischen Klinik München-Planegg
September 2003	Approbation als Ärztin
Seit September 2003	Assistenzärztin in Weiterbildung in der Urologischen Klinik München-Planegg