Meinen Eltern
Heidrun Wingengfeld
und
Dieter Spengler

und
meinem zukünftigen Mann
Patrick Weber

Ludwig-
Maximilians-
Universität
München

LMU

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

WERTIGKEIT DES AUTOMATISIERTEN MIKROSKOPSCREENINGS ZUR DETEKTION ISOLIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK VON MAMMAKARZINOMPATIENTINNEN

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

Vorgelegt von

Bettina Susanne Spengler

aus München

München

2008

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	**PD Dr. med. Wolfgang Janni**
Mitberichterstatter:	**PD Dr. med. P. Kufer**
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	**Dr. med. Brigitte Rack**
Dekan:	**Prof. Dr. med. D. Reinhardt**
Tag der mündlichen Prüfung:	**06.03.2008**

INHALTSVERZEICHNIS:

1.EINLEITUNG 6

1.1 EINFÜHRUNG 6
1.2 DISSEMINIERTE TUMORZELLEN IN DER TUMORDIAGNOSTIK 7
1.2.1 DEFINITION UND HISTORISCHER HINTERGRUND 7
1.2.2 DETEKTIONSMETHODEN 9
1.2.2.1 Zytopathologie 9
1.2.2.2 Immunzytochemie 11
1.2.2.2.1 Monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine 12
1.2.2.2.2 EMA und Mucin-Antikörper 15
1.2.2.2.3 Kombination von Antikörpern 17
1.2.2.3 Molekularbiologische Methoden 22
1.2.3 SCREENINGMETHODEN 28
1.2.3.1 Manuelle Screeningmethoden 29
1.2.3.2 Automatisierte Screeningmethoden 30
1.2.4 PROGNOSTISCHE RELEVANZ 34
1.2.4.1 Prognostische Relevanz zum Zeitpunkt der Primärdiagnose 34
1.2.4.2 Prognostische Relevanz im Follow-Up 35

2 ZIELSETZUNG 38

3 MATERIAL UND METHODEN 40

3.1 PATIENTINNEN UND MATERIALIEN 40
3.1.1 PATIENTINNEN 40
3.1.2 THERAPIERICHTLINIEN 41
3.1.3 GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DES KNOCHENMARKS 43
3.1.3.1 Gewinnung des Knochenmarks 43
3.1.3.2 Weiterverarbeitung und Färbung 44
3.1.4 AUSWERTUNG DER KNOCHENMARKSBEFUNDE 47
3.1.4.1 Morphologische Beurteilung 47
3.1.4.2 Screening 49
3.1.4.2.1 Manuelles Screening 49
3.1.4.2.2 Automatisiertes Screening 50
3.2 STATISTIK 52

4 ERGEBNISSE 53

4.1 GESAMTKOLLEKTIV DER PATIENTINNEN MIT KNOCHENMARKPUNKTION: CHARAKTERISTIKA ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 53
4.1.1 TUMORGRÖßE ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 53
4.1.2 LYMPHKNOTENBEFALL ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 55
4.1.3 HISTOPATHOLOGISCHES GRADING ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 56
4.1.4 MENOPAUSENSTATUS UND ALTER DER PATIENTINNEN ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 58
4.2 PRIMÄRTHERAPIE 60
4.2.1 PRIMÄROPERATION 60
4.2.2 ADJUVANTE SYSTEMISCHE THERAPIE 62
4.2.3 ADJUVANTE RADIOTHERAPIE 63
4.3 HISTOLOGISCHE ZUSATZKRITERIEN ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 64
4.3.1 HISTOLOGIE ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 65
4.3.2 LYMPHANGIOSIS CARCINOMATOSA ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 66
4.3.3 HÄMANGIOSIS CARCINOMATOSA ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 67
4.3.4 ÖSTROGENREZEPTORSTATUS ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 68
4.3.5 PROGESTERONREZEPTORSTATUS ZUM ZEITPUNKT DER PRIMÄRTHERAPIE 69
4.4 ERGEBNISSE DES MANUELLEN UND AUTOMATISIERTEN MIKROSKOPSCREENINGS 70
4.4.1 ERGEBNISSE DES MANUELLEN MIKROSKOPSCREENINGS 70
4.4.2 ERGEBNISSE DES AUTOMATISIERTEN SCREENINGS 73
4.4.3 VERGLEICH VON MANUELLEM UND AUTOMATISIERTEN MIKROSKOP 76
4.4.3.1 Prävalenzvergleich der Methoden 76
4.4.3.2 Vergleich der Anzahl der detektierten Zellen 78
4.4.3.3 Negativkontrollen 78

5 DISKUSSION 80

5.1 AUSWAHL VON MATERIAL UND METHODEN 81
5.1.1 MATERIAL 81
5.1.1.1 Auswahl des Patientenkollektivs 81
5.1.1.2 Material 81
5.1.2 METHODIK 83
5.1.2.1 Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark 83
5.1.2.2 Auswahl des Antikörpers 87
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE DES MIKROSKOPSCREENINGS 89
5.2.1 INZIDENZ 89

5.2.2 TUMORZELLENANZAHL 92
5.2.3 VERGLEICH DER SCREENINGMETHODEN 94
5.2.4 SPEZIFITÄT DER FÄRBUNG 96

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK 99

7 ZUSAMMENFASSUNG 100

8 ANHANG 101

9 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN, ABBILDUNGEN UND TABELLEN 103

9.1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN 103
9.2 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN 104
9.3 VERZEICHNIS DER TABELLEN 105

10 LITERATURVERZEICHNIS 106

11 DANK 117

12 LEBENSLAUF 119

1.EINLEITUNG

1.1 *Einführung*

Der häufigste maligne Tumor der Frau ist das Mammakarzinom, an dem in Deutschland fast jede 10. Frau erkrankt (Engel J *et al*, 2005; Weyerstahl & Genz, 2001). So stellt das Mammakarzinom für Frauen zwischen dem 35.-und 55. Lebensjahr in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar (Weyerstahl & Genz, 2001). Insgesamt ist das Mammakarzinom in Deutschland die häufigste Krebstodesursache (Engel J *et al*, 2005). Die 5-Jahres-Gesamt-Überlebensrate liegt bei 76,4% und die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 59,4% (Engel J *et al*, 2005).

Während das Auftreten und die Häufigkeit von Lokalrezidiven solider Tumoren durch Operateur und Strahlentherapeut beeinflussbar sein können, sind Fernrezidive nach derzeitigem Kenntnisstand auf die bereits prä- oder perioperativ erfolgte, systemische Disseminierung von Tumorzellen zurückzuführen. Das Vorliegen von einzelnen, disseminierten Tumorzellen z.B. im Knochenmark als Indikatororgan ist im Rahmen eines erweiterten Tumorstagings durch sensitive immunzytochemische und molekulare Methoden nachweisbar und wird zunehmend als klinisch relevanter Prognosefaktor angesehen (Pantel *et al*, 1997). Das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Braun *et al*, 2005). So zeigte sich im Rahmen einer kürzlich publizierten Pooled Analysis mit einer Beobachtungszeit von über zehn Jahren, dass Patientinnen mit Befall des Knochenmarks durch disseminierte Tumorzellen eine schlechtere Gesamtüberlebenszeit und eine geringere metastasenfreie Zeit aufwiesen als Patientinnen mit negativen Knochenmarksstatus (Braun *et al*, 2005; Janni *et al*, 2001).

Im Vergleich zu den „klassischen“, tumorassoziierten Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Grading und Rezeptorstatus bietet die Untersuchung des Knochenmarks

auf disseminierte Tumorzellen den Vorteil, dass der Befund zu jedem Zeitpunkt im Verlauf der Erkrankung erhoben werden kann (Janni *et al*, 2001; Janni *et al*, 2005b). Mit der Hilfe disseminierter Tumorzellen im Knochenmark kann möglicherweise die therapeutische Effektivität von adjuvanten Therapieverfahren frühzeitig beurteilt werden. So können Kontrolluntersuchungen des Knochenmarks unter einer Therapie Hinweise auf die Wirksamkeit des jeweiligen therapeutischen Ansatzes geben. (Janni *et al*, 2001; Weitz *et al*, 1999a). Des weiteren ist das Auffinden von disseminierten Tumorzellen nach Abschluss der Primärtherapie und einer adjuvanten Therapie mit einer schlechten Prognose assoziiert (Braun *et al*, 2000a). Die „klassischen" Prognosefaktoren hingegen können nur einmalig zum Zeitpunkt der Operation untersucht werden.

Allerdings sind die Nachweismethoden disseminierter Tumorzellen bisher wenig standardisiert und die Sensitivität der Methoden steigerungsfähig (Funke & Schraut, 1998). Die Problematik der Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark liegt in der geringen Anzahl dieser Zellen im Knochenmark, dem hohen Zeitaufwand bei der Befundung und im Ermüdungsfaktor des Befunders. Dies führte bisher zu einer relativ geringen, bzw. uneinheitlichen Sensitivität bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Als weitere Schwierigkeit stellte sich bisher die mangelnde Standardisierung sowohl der Detektions- als auch der Screeningmethode dar. Eine bessere Standardisierung, die den Einsatz von sensitiveren Methoden beinhaltet, sollte zu einer einheitlicheren und gesteigerten Sensitivität führen, was die Aussagefähigkeit des Auffindens von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bezüglich Prognose und Therapiemonitoring verbessern kann.

1.2 *Disseminierte Tumorzellen in der Tumordiagnostik*

1.2.1 Definition und historischer Hintergrund

Als disseminierte Tumorzellen bezeichnet man einzelne gestreute Zellen epithelialer Herkunft, die bei Karzinompatienten mit epithelialen Tumoren völlig unabhängig vom

Primärtumor in verschiedenen Kompartimenten des Körpers, z.B. im Knochenmark, aufgefunden werden.

Das Phänomen der disseminierten Tumorzellen wurde erstmalig im 19. Jahrhundert beschrieben. Damals wurden disseminierte Tumorzellen im Rahmen einer „diathèse cancéreuse“ bzw. einer „cancer infection“ diskutiert (Sanson, 1834). Zwischen 1940 und 1960 wurde das Thema wieder aufgenommen. Die Forschung in dieser Zeit beschäftigte sich vor allem mit der zytologischen Beschaffenheit der Zellen (Christopherson W., 1965). Seit den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erschienen etliche Publikationen, die disseminierte Tumorzellen im Hinblick auf ihre verschiedenen Nachweismethoden und ihrer Relevanz hinsichtlich Prognosestellung und Therapiemonitoring untersuchten. Dabei wurde vielfach von „Mikrometastasen“ gesprochen, obwohl hierbei die für Metastasen erforderlichen Kriterien der Tumorzelladhäsion an der Gefäßwand, deren Penetration und extravasales Wachstum nicht vorlagen. Vielmehr handelt es sich bei disseminierten Tumorzellen um einzelne oder in kleinen Clustern zusammenliegende Zellen, die keinen Kontakt zu Gefäßen und Lymphknoten besitzen und weder eine extravaskuläre Tumorzellproliferation noch eine extravasale Stromareaktion hervorrufen (Hermanek, 1997; Hermanek *et al*, 1999). Charakteristisch für diese Zellen ist das Vorkommen von Cytokeratinen im Zellskelett, was die epitheliale Herkunft der Zellen beweist und für ihre Diagnostik genutzt wird (Pantel & von Knebel, 2000). Aufgrund von Analysen an Einzelzellen ist anzunehmen, dass die Mehrzahl der isolierten Tumorzellen im Knochenmark nicht proliferieren, sondern in einem so genannten *‚dormant state’* verharren (Pantel *et al*, 1993b). Unklar ist, warum die Tumorzellen während der rezidivfreien Latenzzeit nicht vom körpereigenen Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Ferner müssen Vermutungen, welche Faktoren die Dauer der Latenzzeit beeinflussen und die Auslösung der makroskopischen Fernmetastasierung verursachen, spekulativ bleiben. Weiterhin muss noch ermittelt werden, ob die isolierten Tumorzellen, die während des Follow-Ups detektiert werden, entweder Ableger eines noch

unsichtbaren Rezidivs darstellen, oder ob sie der Ursprung für den folgenden Rezidivs sind (Janni *et al*, 2005b).

In den letzten Jahren haben die Immunzytochemie und molekularbiologische Methoden die Nachweismöglichkeiten für isolierte Tumorzellen wesentlich verbessert. Hintergrund der vermehrten Forschung in diese Richtung ist die Frage, ob disseminierte Tumorzellen prognostische und/oder prädiktive Relevanz besitzen. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz geht man davon aus, dass mit dem Auffinden von disseminierter Tumorzellen das Risiko einer Metastasenentwicklung erhöht ist (Janni *et al*, 2001; Braun *et al*, 2005). Somit wäre eine Aussage bezüglich des weiteren Verlaufs der Erkrankung möglich und damit könnten Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko definiert werden (Janni *et al*, 2005a). Der prädiktive Faktor berücksichtigt hingegen den zu erwartenden Therapieerfolg (Janni *et al*, 2005a) und bringt die Frage auf, ob die betroffenen Patienten möglicherweise von einer zusätzlichen postoperativen adjuvanten Therapie profitieren können (Braun *et al*, 2003). Man nimmt dabei an, dass sich die Dissemination der Tumorzellen bereits prä- oder perioperativ vollzieht, und deshalb der Nachweis schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt möglich ist (Muller & Schlimok, 2000).

1.2.2 Detektionsmethoden

Isolierte disseminierte Tumorzellen können prinzipiell mit folgenden Techniken nachgewiesen werden: Zytopathologie, Immunzytochemie und molekularbiologische Methoden.

1.2.2.1 Zytopathologie

Bereits mit zytologischen Methoden lassen sich im Knochenmark einzelne Tumorzellen nachweisen. Die Technik hierbei besteht darin, erst einmal die in der Probe unerwünschten Zellen mit Hilfe einer Lösung (z.B. Streptolysin O) zu zerstören und anschließend von der Probe einen Ausstrich anzufertigen, der daraufhin mit Hilfe eines Filters mikroskopisch

beurteilt wird. Hierbei geht man zur Identifizierung der Tumorzelle von den morphologischen Charakteristika von Tumorzellen, wie einen besonders großen und chromatindichten Kern und der Verschiebung der Kern-Zytoplasma-Relation zugunsten des Kerns aus (Thomas, 1992). Nach Engells Entdeckung von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Krebspatienten im Jahre 1955 (Engell, 1955) erschienen in den 60er Jahren einige Arbeiten, die sich mit dem zytomorphologischen Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen beschäftigten (Christopherson W., 1965; de Mello, 1963; Raker *et al*, 1960). Der Prozentsatz, in dem positive Ergebnisse gefunden wurden, könnte jedoch kaum unterschiedlicher sein. Raker et al (Raker *et al*, 1960) berichteten bei 1,5% der 144 von ihnen untersuchten Krebspatienten von einem positiven Ergebnis, während de Mello (de Mello, 1963) in 96,5% seiner untersuchten Fälle Tumorzellen fand. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass diese Autoren zu Beginn ihrer Studien in 42% ihrer Fälle zirkulierende Megakaryozyten für Tumorzellen gehalten haben. Allerdings sind die Ergebnisse der hier aufgeführten Studien schwer miteinander vergleichbar, da sowohl im Hinblick auf die Art des Tumors wie auch auf das Patientenkollektiv und die Technik große Unterschiede vorlagen.

Chistopherson untersuchte mit einer modifizierten Methode das periphere Blut von 192 Lungenkrebs-Patienten und konnte bei nur zwei (1%) Patienten Krebszellen auffinden. Mit der gleichen Methode wurden 1380 Kontroll-Patienten, von denen angenommen wurde, dass sie tumorfrei seien, untersucht und nur in zwei Fällen (0,14%) wurden Krebszellen gefunden (Christopherson W., 1965).

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen in konventionellen zytologischen Präparaten des Knochenmarks auf Grund zytomorphologischer Kriterien hat sich als ausgesprochen schwierig herausgestellt (Schlimok *et al*, 1987). Um die Zellausstriche richtig beurteilen zu können, benötigt man extensive Erfahrung in der Zytologie, Hämatologie und Pathologie (Christopherson W., 1965). Und selbst dann ist mit der konventionellen histopathologischen Methodik zwar der Nachweis von mikrometastatischen Tumorzellaggregaten einwandfrei

möglich, einzelne disseminierte Karzinomzellen im Knochenmark entziehen sich jedoch weitgehend einer zytologischen Identifizierung (Pantel *et al*, 1997). Wie oben angeführte Studien zeigen ist sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität als nicht zufriedenstellend zu werten (Leather *et al*, 1993; Weitz *et al*, 1999a). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Qualität der Zellkonservierung und Zellaufarbeitung und die anschließende Beurteilung von Labor zu Labor sehr unterschiedlich einzuschätzen ist (Christopherson W., 1965). Die mangelnde Spezifität rein zytomorphologischer Nachweismethoden mit falsch-positiven Nachweisraten bis 96% führte deshalb dazu, dass die Detektion disseminierter Tumorzellen als nicht durchführbar beurteilt wurde.

1.2.2.2 Immunzytochemie

Die Problematik der hämatogen disseminierten Tumorerkrankung wurde etwa 20 Jahr später mit den nun zur Verfügung stehenden immunzytochemischen Nachweismethoden erneut verfolgt. Grundlage der Immunzytochemie ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Für den immunzytochemischen Nachweis epithelialer Tumorzellen benutzt man Antikörper, welche ihr passendes Antigen in der Tumorzelle finden, z.B. Antikörper gegen Bestandteile des Zellskeletts, gegen Mucin oder gegen Bestandteile der Zellmembran. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch spezielle, an den Antikörper gekoppelte Farbstoffe sichtbar gemacht. Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist der spezifische Antikörper an eine Peroxidase gekoppelt und reagiert mit dem Antigen. Ein nachfolgend zugefügtes Substrat färbt den Immunkomplex. Bei der indirekten Methode bindet ein unkonjugierter Antikörper das Antigen. Um den Immunkomplex zu lokalisieren wird ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher an den Primärantikörper bindet und der nach Zugabe eines Substrats die Reaktion sichtbar macht. Bei beiden Methoden kann die spezifisch angefärbte Zelle mit Hilfe eines Mikroskops beurteilt werden (Borgen *et al*, 1999).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von monoklonalen Antikörpern eine klinisch gut durchführbare Methode ist (Diel *et al*, 1996; Harbeck *et al*, 1994; Mansi *et al*, 1991). Diese Studien erbrachten den Nachweis, dass die Immunzytochemie der konventionellen Zytologie und Histologie überlegen ist (Molino *et al*, 1991; Schlimok *et al*, 1987). Die meisten Studien, die eine Korrelation zwischen disseminierten Tumorzellen und der Prognose der Patienten zeigten, haben immunzytochemische Methoden benutzt und sie ist somit laut Janni der Goldstandard (Janni *et al*, 2005a). Mittels der Immunzytochemie ist man derzeit in der Lage, eine Tumorzelle unter $1x10^5$ bis 10^6 (Weitz *et al*, 1999a) mononuklearen Zellen zu identifizieren, die Methode besitzt damit eine hohe Sensitivität.

Die Auswahl des Antikörpers muss sehr sorgfältig vorgenommen werden. Zur Auswahl stehen drei Gruppen von Antikörpern: Antikörper gegen Zytokeratine, Antikörper gegen andere Bestandteile der Zelle als Zytokeratine, wie z.B. gegen epitheliale Membranantigen (EMA), Tumor-assoziertes Glykoprotein und gegen Mucin, und schließlich die Kombinationen verschiedener Antikörper.

1.2.2.2.1 Monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine

In dem Großteil der veröffentlichten Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bei epithelialen Tumoren werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen die Zytokeratine (CK) des Zytoskeletts der Tumorzelle gerichtet sind. Diese Proteine werden regelmäßig und reichlich sowohl von den ursprünglichen epithelialen Zellen als auch von den maligne veränderten Zellen epithelialer Herkunft exprimiert, nicht jedoch von Zellen des jeweiligen Zielgewebes (z.B. dem Knochenmark) (Weitz *et al*, 1999a; Janni *et al*, 2005a). Gewebsfremde epitheliale Tumorzellen können somit durch Antikörper gegen epitheliale Markerantigene von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterschieden werden.

Neben dem Mammakarzinom wurden Antikörper gegen CK in soliden Tumoren wie dem Ovarial-, dem Kolorektalen-, dem Magen-, dem Ösophagus- und dem Lungenkarzinom zur

Detektion von Mikrometastasen im Knochenmark untersucht. Hier lag die Detektionsrate zwischen 25 und 67%, wobei am häufigsten CK 18 benutzt wurde.

Im Zeitraum zwischen 1987 und 1999 wurden in 4 großen Studien CK 18 als Antikörper bei Mammakarzinompatientinnen untersucht.

Tabelle 1: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die den Antikörper gegen CK18 einsetzten

Autor	Jahr	Patientinnen gesamt	Knochenmark-positiv	Prozent
Schlimok	1987	155	28	18
Funke	1996	234	89	38
Untch	1999	581	163	28
Pantel	1999	116	35	30
Total		1086	315	29

In einer sehr frühen Studie konnten Schlimok et al. bei einer 155 Patientinnen umfassenden Untersuchung zum Zeitpunkt der Primäroperation eine Detektionsrate von 18% feststellen. In dieser Studie wurde ein Antikörper gegen CK 18 eingesetzt (Schlimok *et al*, 1987). Pantel et al. beobachteten 1999 in seiner Studie, dass, wenn Antikörper gegen Cytokeratin 18 eingesetzt wurden, 30% der 116 untersuchten Patienten mit einem primären Karzinom ohne Fernmetastasierung als knochenmarkspositiv eingestuft wurden (Pantel *et al*, 1999). Die umfassendste Studie zum CK18-Antikörper stammt von Untch et al., die 581 Patienntinnen untersuchten und eine Detektionsrate von 28% erzielten (Untch M *et al*, 1999).

Zu den oben angeführten Studien kann nur in zwei Fällen eine Angabe zur Spezifität der Methode gemacht werden, da in den übrigen Studien keine Negativ-Kontrolle durchgeführt

wurde. Schlimok et al. überprüften das Knochenmark von 75 Kontrollpatienten, die unter keiner malignen Erkrankung litten. Bei keiner der Negativ-Kontrollen wurde eine Tumorzelle detektiert (Schlimok *et al*, 1987). Pantel et al. fanden im Knochenmark von 4 der 75 nicht maligne erkrankten Kontrollpatienten Tumorzellen (Pantel *et al*, 1999). Im Vergleich zu den unten näher beschriebenen Antikörper gegen epitheliale Muzine liefern Anti-CK Antikörper ein höheres Maß an Spezifität (Braun *et al*, 2000b; Pantel *et al*, 1996; Schlimok *et al*, 1987).

Bezüglich der Anzahl der detektierten Zellen pro Patientin gibt nur Pantel Auskunft. Der Großteil der von Pantel et al. als positiv getesteten Patienten wiesen weniger als 10 gefärbte Zellen pro $8x10^5$ Knochenmarkszellen auf, und Pantel et al. schliessen daher daraus, dass es sich bei der Immunzytochemie um eine extrem sensitive Methode handelt (Pantel *et al*, 1999).

Als Kritik an den Antikörpern gegen Zytokeratin ist einzuwenden, dass häufig aus unerklärtem Grund eine Down-Regulation des Zytokeratinisomers 18 in Tumorzellen zu beobachten ist, welche die Sensitivität der Nachweismethode beeinträchtigt (Jauch *et al*, 1996; Schlimok *et al*, 1991; Pantel *et al*, 1993a; Lindemann *et al*, 1992). Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die Detektionsrate zwischen den einzelnen Studien schwankt.

Als weiterer Kritikpunkt wird angeführt, dass eine ektope oder illegitime Zytokeratin- mRNA Expression in mesenchymalen Zellen mittels der im nächsten Kapitel beschriebenen Nachweismethode PCR nicht auszuschließen ist. Dies liegt daran, dass CK-Antigene nur sehr selten in hämatopoetischen Zellen aufgefunden werden (Braun *et al*, 1998;Cote *et al*, 1988; Janni *et al*, 2005a; Pantel *et al*, 1994;Pantel *et al*, 1996; Pantel *et al*, 1997).

Als Rechtfertigung für den Einsatz von CK-Antikörpern zur Detektion von Mikrometastasen im Knochenmark kann man die Untersuchungsergebnisse von Klein et al. sowie Müller et al. heranziehen, die mittels Gen-Analyse in CK-positiven Zellen im Knochenmark Kerncharakteristika identifizierten, die normalerweise in Brustkrebszellen gefunden werden,

und damit einen Nachweis für den maligne Charakter dieser Zellen erbringen (Klein *et al*, 1999; Muller & Schlimok, 2000).

1.2.2.2.2 EMA und Mucin-Antikörper

Die zweite Gruppe von Antikörpern in der Immunzytologie umfasst Antikörper gegen epitheliale Membranantigen (EMA), Tumor-assoziertes Glykoprotein und gegen Mucin. Allerdings ist zu beachten, dass einige Antigene, wie z.B. epitheliale Membranantigene oder Mucin-I, nicht für den Routine-Gebrauch geeignet sind. Während die Studien mit Antikörpern gegen solche mucin-ähnlichen Membranproteine die derzeit längsten Nachbeobachtungszeiten aufweisen und deshalb bezüglich der Einschätzung der prognostischen Relevanz von besonderer Bedeutung sind, wird Kritik an der Spezifität der in diesen Studien verwendeten Antikörper geäußert.

Tabelle 2: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die einen EMA/ Mucin-ähnlichen Antikörper einsetzten

Autor	Jahr	Antikörper	Patientinnen gesamt	Knochenmark-positiv	Prozent
Berger	1988	EMA	285	77	27
Dearnaley	1991	EMA	39	13	33
Diel	1996	2E11 (TAG 12)	727	315	43
Mansi	1999	EMA	350	89	25
Gebauer	2001	EMA	393	166	42
TOTAL			1794	660	37

Die Prävalenz von isolierten Tumorzellen ist in den verschiedenen Studien unterschiedlich. So konnten Berger et al. bei 285 Patientinnen mit primären Mammakarzinom eine Prävalenz von 27,0% feststellen (Berger *et al*, 1988). Dearnaley konnte mittels Einsatz von EMA-Antikörpern in einer Studie, die allerdings nur 39 Patientinnen umfasste, eine Prävalenz von 33,3% erreichen (Dearnaley *et al*, 1981). Die von1988-1994 durchgeführte Studie von Mansi et al. umfasste 350 Patientinnen, deren Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose mit Hilfe des EMA-Antikörpers untersucht wurde. 89 Patientinnen wurden als positiv eingestuft, was einer Prävalenz von 25% entspricht (Mansi *et al*, 1999). In den Jahren von 1999 bis 2003 wurden noch viele weitere Studien zum Thema veröffentlicht. Gebauer et al untersuchten 393 Brustkrebspatientinnen mittels EMA, von denen 166 mindestens eine positiv gefärbte Zelle im Knochenmark aufwiesen, was einer Prävalenz von 42,2 % entspricht (Gebauer *et al*, 2001). Der Unterschied im Studienaufbau der beiden letztgenannten Studien liegt darin, dass Gebauer et al. jeweils 25 Zytospinns untersuchten, die Anzahl der Zytospinns in der viel früher durchgeführten Studie von Mansi et al. jedoch zwischen 10 und 25 variierten. In einem 2001 veröffentlichten Review berichteten Pantel et al unter dem Einsatz von EMA-Antikörpern von einer Detektionsrate von 25% bei Mammakarzinom-Patientinnen (Pantel & Otte, 2001). Die Detektionsrate, bei dem als Marker-Protein TAG 12 (tumour-associated glykoprotein) benutzt wurde, lag bei 43% (Diel *et al*, 1996).

Diese variierenden Detektionsraten können auf die oben erwähnte mangelnde Spezifität und Reproduzierbarkeit der Methode hinweisen. Zu zwei der oben zitierten Studien existiert eine Negativ-Kontrollgruppe, allerdings ist die Fallzahl mit 20 bzw. 21 Kontrollen sehr gering. Es wurde in keiner der beiden Negativkontrollgruppen ein positives Ereignis detektiert (Diel *et al*, 1996; Gebauer *et al*, 2001). Aufgrund dieser kleinen und für jeden Antikörper nur einmalig durchgeführten Negativkontrolle ist eine Aussage zur Spezifität der Methode bzw. der eingesetzten Antikörper schwer zu treffen. Die jeweilige Anzahl der detektierten Zellen wurde nicht publiziert.

Als Kritikpunkt wird angeführt, dass die Expression der mucin-ähnlichen Membranproteine durch hämatopoetische Stammzellen (Pantel & von Knebel, 2000; Pantel *et al*, 1994; Schlimok *et al*, 1987) zu einer Positivfärbung von 2-10 % der mesenchymalen mononukleären Zellen von tumorfreien Probanden führen kann (Brugger *et al*, 1999). Das bedeutet, dass diese Antigenmarker nicht nur spezifisch von epithelialen Zellen wie den Tumorzellen, sondern auch von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Pantel *et al*, 1999; Pantel & von Knebel, 2000). Es ist auch nicht gesichert, dass diese Antigene von undifferenzierten Tumoren exprimiert werden (Mansi *et al*, 1999), weshalb heute oft andere Antikörper benutzt werden (Janni *et al*, 2005a).

1.2.2.2.3 Kombination von Antikörpern

Die Expression der mehr als 20 unterschiedlichen Zytokeratinisomere in Tumorzellen unterliegt einer komplexen Regulation. Dies führt zu einer großen Heterogenität der Tumorzellen. In der Mehrzahl jener Studien, bei denen anti-zytokeratin Antikörper verwendet wurden, kamen Antikörper gegen das Zytokeratinisomer 18 zum Einsatz (Jauch *et al*, 1996; Schlimok *et al*, 1991; Pantel *et al*, 1993a; Lindemann *et al*, 1992). Allerdings kann durch die schon oben erwähnte häufige Down-Regulation des Zytokeratinisomers 18 in Tumorzellen die Sensitivität der Nachweismethode beeinträchtigt sein. Um diesen Verlust der Sensitivität entgegenzuwirken und Tumorzellen noch spezifischer identifizieren zu können, kann eine Kombination von Antikörpern eingesetzt werden. Diese so genannten Panzytokeratin-Antikörper richten sich gegen verschiedene Antigene einer Tumorzellen (Pantel *et al*, 1999).

Tabelle 3: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die Kombinationen von Antikörpern einsetzten

Autor	Jahr	Antikörper	Patientinnen gesamt	Knochenmark-positiv	Prozent	Positive Negativkontollen
Braun S	2000	A45-B/B3	552	199	36	2/191
Braun S, pooled analysis	2005					
- Augsburg(Braun et al)		A45-B/B3	917	297	32,4	2/221
- München (Braun et al)		A45-B/B3	431	92	21,4	2/221
- Paris (Pierga et al)		A45-B/B3	270	103	38,2	Ø
- Oslo (Wieswang et al)		AE1/AE3	758	94	12,4	4/98
- New York (Wong et al)		AE1/AE3	371	124	33,4	0/45

Braun et al hat in den letzten Jahren zahlreiche Studien zur Problematik der disseminierten Tumorzellen bei Brustkrebspatienten veröffentlicht. Seine Arbeitsgruppe stellte fest, dass sich unter Berücksichtigung des immunozytochemischen Ansatzes und dem Einsatz des Antikörpers A45-B/B3 (Stigbrand *et al*, 1998), der gegen ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 gerichtet ist (Pantel *et al*, 1994), mit standardisiert kontrollierten Variablen ein Sensitivitätsniveau von einer Tumorzelle pro 2x 10^6 untersuchten Knochenmarkszellen festschreiben lässt (Braun & Pantel, 1999). 2005 veröffentlichten Braun et al eine Pool-Analyse, welche die Daten von 4703 Patienten mit primären Mammakarzinom aus den Jahren 1985-2002 umfasst (Braun *et al*, 2005). Die Prävalenz für das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten lag in Abhängigkeit von der Studiengruppe mit Hilfe der Antikörperkombination A45-B/B3 bei 32,4% (Braun *et al*, 2000b), 21,4% (Braun *et al*, 2000b), bzw. 38,2% (Pierga *et al*, 2004). Die durchschnittliche Anzahl der gefundenen Tumorzellen betrug in allen drei Studien 3 Zellen. Braun et al beobachteten, dass die

Mehrzahl der untersuchten Patienten mit positiven Knochenmarksbefund 1-5 zytokeratin-positive Zellen aufweist, wobei die Anzahl der gefundenen Zellen vom Tumorstadium abhängig ist: so wurden im Stadium I durchschnittlich 5 Tumorzellen, im Stadium II 9 und im Stadium III 86 Zellen gefunden (Braun *et al*, 2000b). Genaue Angaben zum Risikokollektiv, wie z.B. Tumorgröße, Lymphknoten-Status und Menopausenstatus kann man den aufgeführten Studien nicht entnehmen.

Bei zwei der oben genannten Studien wurde eine Negativ-Kontrolle durchgeführt, die eine sehr hohe Spezifität nachwies; nur eine der 221 untersuchten Negativkontrollen zeigte ein positiv gefärbtes Ereignis (Braun & Pantel, 1999; Braun *et al*, 2001; Braun & Pantel, 2000; Braun *et al*, 2001; Braun *et al*, 2000b). Die Fallzahl lag bei 917, 431 bzw. 270 Patientinnen, mit dem durchschnittlichen Alter von 58, 56, bzw. 53 Jahren. Allein die Anzahl der untersuchten Zellen war unterschiedlich. So wurden in den ersten beiden Studien jeweils $2x10^6$ Zellen bei jeder Patientin untersucht, in der dritten Studie betrug die Zellzahl $3x10^6$ Zellen.

Eine sehr viel geringere Prävalenz war das Ergebnis einer weiteren Studie, die in die oben genannte Pool-Analyse mit einbezogen war, jedoch AE1/AE3 als Antikörper bei gleicher Färbemethode benutzten. In der Studie von Wiedswang et al konnten bei 758 Patientinnen in nur 12,4% der Fälle Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Durchschnittlich wurde eine Zelle gefunden, die Anzahl der untersuchten Zellen lag bei $2x10^6$ (Wiedswang *et al*, 2003), die Negativkontrolle umfasste 98 Fälle, von denen 4 positiv getestet wurden. Wong et al, deren Ergebnisse ebenfalls in die o.g. Pool-Analyse einbezogen wurden, verwendeten in ihrer Studie aus den Jahren 1985-1991 den gleichen Antikörper und die gleiche Färbemethode, kamen jedoch bei 371 Patienten auf eine Prävalenz von 33,4%. Die genaue Anzahl der detektierten Zellen wurde nicht untersucht. Die Negativkontrolle ergab bei 45 Kontrollen kein positives Ergebnis (Wong, 2003). Der Unterschied zu der Studie von Wiedswang et al. lag darin, dass Wong et al. neben dem sonst gebräuchlichen Zytospinn auch

Zellabstriche untersuchten, was wahrscheinlich die unterschiedliche Prävalenz erklären kann (Wiedswang *et al*, 2003). Natürlich kann der Unterschied in der Prävalenz auch auf einem unterschiedlichen Patientenkollektiv beruhen. Im Patientenkollektiv von Wiedswang et al befanden sich 61% der Patientinnen mit einem T1 Tumor, 31% mit einem T2 Tumor und 6% mit einem T3-4 Tumor. Bei 3% der Patientinnen war das Tumorstadium unbekannt. Das Lymphknotenstadium der Patientinnen war in 63% negativ, in 34% positiv und in 3% unbekannt. Das Patientenkollektiv von Wong et al umfasste zu 99% Patientinnen im Tumorstadium T1-2, und nur 1% im Tumorstadium T3-4. Nodalnegativ waren 56%, nodalpositiv 43% der Patientinnen. Weitere Angaben zum Patientenkollektiv, wie z.B. zum Menopausenstatus und zur Histologie, kann man dem Artikel von Wong et al nicht entnehmen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die immunzytochemischen Detektion eine bewährte Methode zum Nachweis von isolierten Tumorzellen darstellt, deren Sensitivität durch den Einsatz von kombinierten Antikörpern noch gesteigert werden konnte. Die variierenden Detektionsraten hängen einerseits stark von dem jeweils eingesetzten Antikörper ab, andererseits treten trotz identischer Studienprotokolle interlaborielle Diskrepanzen auf. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, ein international standardisiertes Protokoll einzuführen, um die Einführung in die klinische Praxis voranzutreiben (Braun & Pantel, 1999; Passlick *et al*, 2000).

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der europäischen ISHAGE Arbeitsgruppe eine Studie veröffentlicht, die die Standardisierung der immunzytologischen Detektion von Tumorzellen im Knochenmark etablieren soll (Borgen *et al*, 1999). Es wurde ein interlaborieller Ringversuch durchgeführt, um das Screening und die Detektion der isolierten Tumorzellen in den verschiedenen Laboratorien zu vergleichen. Als immunzytochemischer Marker diente die A45-B/B3 Antikörperkombination. Jedes der 7 beteiligten Labore erhielt

Zytospinns, die Knochenmark derselben 18 Karzinompatienten und 7 nicht maligne erkrankten Spendern enthielten. 12 Zytospinns von Karzinompatienten enthielten positive Zellen. Nur drei davon wurden einheitlich von allen Teilnehmern der Studie als positiv bewertet, und einer wurde von allen einheitlich als negativ eingestuft. Die Restlichen wurden sowohl positiv wie negativ eingeordnet. Von den sechs Knochenmarksproben von Karzinompatienten die keine isolierten Tumorzellen enthielten, wurden zwei als positiv eingestuft. Die sieben Kontroll-Zytospinns von Spendern ohne maligne Erkrankung wurden von den meisten Studienteilnehmern als negativ bestätigt, nur vier Gruppen diagnostizierten im Rahmen von insgesamt 48 Evaluationen 1-2 Tumorzellen. Dieses Ergebnis zeigte wiederum, dass obwohl die Vorraussetzungen und auch der Antikörper für jedes Labor identisch waren, die Detektionsrate zwischen den einzelnen Laboratorien variierte. Deshalb wurde von einer deutschen Expertengruppe ein Konsensus erarbeitet mit dem Ziel einheitlichere Ergebnisse zu produzieren. Basierend auf dieser Standardisierung der Methode wurde 2006 für den deutschsprachigen Raum ein Standardisierungskonzept veröffentlicht, in dem sowohl die vorhandenen Methoden diskutiert und ein neuer überarbeiteter Konsensus bezüglich der Detektion isolierter Tumorzellen festgelegt wurde, als auch die Möglichkeiten für die klinische Durchführung evaluiert wurden (Fehm *et al*, 2006).

Die Sensitivität der Methode ist noch nicht einheitlich und noch zu verbessern, dennoch ist die Kombination von Antikörpern zum Aufsuchen von DTC im Knochenmark ein großer Fortschritt. So konnten internationale Studien mit dem höchsten Level of Evidence beweisen, dass das Auffinden von DTC im Knochenmark durch die Kombination von Antikörpern ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Braun et al., 2005). Die Autoren des kürzlich publizierten Konsensus erwarten sich unter anderem durch die Berücksichtigung der von ihnen erarbeiteten Vorgaben einheitlichere Ergebnisse (Fehm et al., 2006).

1.2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Seit den späten 80er Jahren wird die hochsensitive Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von MRD bei verschiedenen Malignomen eingesetzt (Lee *et al*, 1987; Negrin & Blume, 1991). Der Ansatz zum Nachweis von MRD basiert auf der Annahme, dass maligne Zellen mittels Transkription Marker exprimieren, die typisch für ihr Ursprungsgewebe sind. Die PCR ist eine in vitro Methode, welche durch Anwendung von Oligonukleotidprimern in der Lage ist, spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und anschließend durch Färbung nachzuweisen. Prinzipiell kann die DNA disseminierter Tumorzellen mittels der Polymerasekettenreaktion millionenfach vermehrt werden, so dass auch geringste Mengen solcher Tumorzellen für ihren Nachweis ausreichen (Pantel *et al*, 1997). Vorraussetzung hierfür ist jedoch, dass die Tumorzelle spezifische Veränderungen in ihrem Genom oder ihrem mRNA-Expressionsmuster aufweist, die sie von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterscheidet (Pantel *et al*, 1997). Das veränderte mRNA-Expressionsmuster macht sich auch die vielversprechende Weiterentwicklung der konventionellen PCR-Methode zunutze, welche die ‚reverse transcriptase' (RT)-PCR einsetzt, die tumorspezifische mRNA amplifizieren kann. Diese Methode wurde erstmals zur Detektion von t(9,22)-Translokationen bei chronisch myeloischer Leukämie eingesetzt, dem so genannten Philadelphia-Chromosom (Kawasaki *et al*, 1988).

Die PCR stellt sich als polyzyklische Reaktion dar, die in jedem Zyklus drei Schritte durchläuft (B.Alberts *et al*, 1994):

1. Denaturierung: Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzung auf 95°C in ihre zwei komplementären Einzelstränge gespalten.

2. Annealing (Hybridisierung): An die einzelsträngigen Sequenzen können nun die oft 15-40 Basenpaare langen Oligonukleotide (Primer) hybridisieren. Die Primer müssen spezifisch und absolut komplementär zur Zielsequenz gewählt sein. Der Hybridisierungsschritt findet

abhängig von der Basensequenz und Länge des Primers bei Temperaturen zwischen 37-70°C statt.

3. Extensionsschritt / Syntheseschritt: Die Primer dienen als Ansatzpunkte der DNA-Polymerase für den Synthesestart. Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert nun in 3´-Richtung bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C in Anwesenheit von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten und zweiwertigem Magnesium die hybridisierten Primer. Jeder angelagerte Primer resultiert also in einem neuen Einzelstrang. Die synthetisierte Doppelstrang-DNA wird wieder durch Erwärmen getrennt und die Reaktion beginnt erneut.

Das Prinzip der PCR besteht darin, dass neu synthetisierte DNA nach der Spaltung sofort wieder Ziele für die Primer-Anlagerung und deren Verlängerung darstellen. Üblicherweise werden in PCRs 20-50 Zyklen durchlaufen. Die neu synthetisierten Stränge weisen von der zweiten Generation an eine einheitliche, definierte Länge auf und lassen sich folglich durch Gelelektrophorese als Bande definierter Länge visualisieren. Die Spezifität der Reaktion lässt sich mittels Southern-Blot Analyse, Sequenzierung oder Restriktionsverdau verifizieren.

Insgesamt bietet die PCR drei verschiedene Nachweismethoden:

- Nachweis tumorspezifischer Rearrangements
- Nachweis tumorspezifischer DNA-Mutationen (z.B. k-ras oder p53-Mutationen).
- Nachweis der Expression eines Markergens (m-RNA) durch die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR), welches in den Tumorzellen, nicht aber in gesunden Kochenmarkszellen exprimiert wird (Weitz *et al*, 1999b). RNA-Transkripte können mit Hilfe der reversen Transkription in DNS-Sequenzen umgeschrieben werden und die PCR kann anschließend zum Nachweis der Transkription von tumorspezifischen oder –assoziierten Genen eingesetzt werden. Ein Vorteil der RT-PCR gegenüber der konventionellen PCR ist, dass die extrazelluläre RNA instabil ist und damit weniger falsch-positive Resultate erzielt werden. Ferner besteht die Möglichkeit, die Anzahl der RNA-Transkripte zu quantifizieren (Qiu *et al,* 1990).

Tabelle 4: Übersicht über PCR-Arbeiten zur Detektion von ITC im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen

	Jahr	Gen	Patientinnen gesamt	Positiv	Kontrolle	Falsch positiv
Datta	1994	CK 19	6	6 (100%)	39	1 (3%)
Zhong	1999	CK 19	115	47 (40,9%)	8	0
Bossolasco	2002	Mammaglobin	17	2 (12%)	11	0
Janku	2004	Mammaglobin A Mammaglobin B	34	4 (12%) 0 (0%)	Keine	
Silva	2002	Mammaglobin	7	6 (86%)	Keine	
Gerhard	1994	CEA	6	4 (66%)	56	0
Varangot	2005	CK 19 CEA MG MUC 5B	80	39 (49%) 19 (24%) 10 (12,5%) 6 (7,5%)	Keine	
Total			265	108 (40,8%)	114	1 (1%)

Die derzeitige PCR-Technologie ist in der Lage, 1 Tumorzelle in 10^5 bis 10^7 mononukleären Zellen nachzuweisen (Ghossein *et al*, 1995; Baker *et al*, 2003; Berois *et al*, 2003; Muller & Schlimok, 2000; Ozbas *et al*, 2003; Pantel & von Knebel, 2000; Weitz *et al*, 1999a; Wormann *et al*, 1997; Zhong *et al*, 1999; Gerhard *et al*, 1994) und besitzt somit eine sehr hohe Sensitivität. Die umfangreichste Erfahrung beim molekularen Nachweis von disseminierten Tumorzellen besteht mit den epithelialen Markern CK-19 und CK-20, wobei allerdings Uneinigkeit darüber herrscht, welcher der beiden Cytokeratine besser geeignet ist (Pantel *et al*, 1999; Fishman *et al*, 2000; Slade *et al*, 1999; Smith *et al*, 2000; Zhong *et al*, 1999). Fast

jede Zelle exprimiert irgendeine Form von Zytokeratinen, aber nur epitheliale Zellen exprimieren CK 8, 18, 19, 20. Von diesen potenziellen Brustkrebs-Markern, wird CK19 sowohl von primären Brustkrebs-Gewebe, als auch von normalen Brust-Gewebe überexprimiert (Baker *et al*, 2003). CK 19 stellt somit einen Genmarker dar, der auch in gesundem Gewebe vorhanden ist. Mit Hilfe des Cytokeratin 19-Gens führte die Arbeitsgruppe um Datta et al einen Vergleich zwischen der immunhistologischen Methode und der PCR durch. Sie untersuchte das Knochenmark von 6 Brustkrebspatientinnen sowohl mit Hilfe der Immunhistologie als auch mit Hilfe der RT-PCR. Fünf dieser sechs Patientinnen wurden immunhistologisch als negativ eingestuft, die PCR brachte in den identischen Fällen jedoch ein positives Ergebnis. Von den 39 Kontrollpatientinnen wurde nur eine als positiv eingestuft (Datta *et al*, 1994). Zhong et al untersuchten insgesamt 115 Patientinnen auf CK19 mRNA. In 40,9% der Fälle zeigte die RT-PCR ein positives Ergebnis, wohingegen bei 8 gesunden Spendern keine CK19 mRNA nachgewiesen werden konnte (Zhong *et al*, 1999).

Zusammenfassend kann man zu den beiden erwähnten Markern festhalten, dass RT-PCR Positivität für CK19 der sensitivste (Berois *et al*, 2000; Stathopoulou *et al*, 2003) Detektionsmarker für disseminierte Tumorzellen in operablen und metastasierten Mammakarzinom ist, obwohl RT-PCR für Maspin mRNA spezifischer zu sein scheint (Stathopoulou *et al*, 2003).

Im Knochenmark findet man desweiteren folgende Marker für das Mammakarzinom: das Material wird auf CK-19, CEA, ß-HCG, erbB2, EGF-R und Mammoglobin hin untersucht (Pantel *et al*, 1999; Pantel & Otte, 2001; Pantel & von Knebel, 2000). Bossolasco et al untersuchten das Knochenmark von 17 Mammakarzinompatientinnen mittels RT-PCR auf das Mammaglobin-Gen. In 2 Fällen erhielten sie ein positives Ergebnis. Bei den 11 Negativ-Kontroll-Proben fand sich kein Nachweis für das Mammaglobin-Gen (Bossolasco *et al*, 2002). Auch Janku et al untersuchten Knochenmark auf das Mammaglobin-Gen hin. An dieser Studie nahmen 34 Patientinnen teil, die an Brustkrebs im Stadium I-III litten. Als

Ergebnis zeigte sich, dass bei 4 der Patientinnen das Mammaglobin-Gen A gefunden wurde, wohingegen alle Patientinnen negativ für das Mammaglobin B waren (Janku *et al*, 2004). Eine weitere Studie, die Mammaglobin als Marker benutzte, beinhaltete 7 Knochenmarksproben von Brustkrebspatientinnen, von denen 6 das Mammaglobin-Gen aufwiesen. Weitere 2 von insgesamt 5 Knochenmarksproben von Kontrollpatientinnen ohne maligne Erkrankung zeigten sich positiv, aber die 2 Patientinnen mit einem Mammakarzinom in der Vorgeschichte und einer Thrombozytopenie waren beide negativ (Silva *et al*, 2002; Weitz *et al*, 1999a; Soeth *et al*, 1997). In der Literatur ist Mammaglobin als guter Marker für die Detektion von disseminierten Tumorzellen beschrieben (Zach *et al*, 1999). Einige Autoren berichteten, dass die Detektion von Mammoglobin-mRNA mit einer schlechten Prognose korreliert (Ooka *et al*, 2001). Aktuellere Studien weisen jedoch eher darauf hin, dass eine hohe Expression von Mammoglobin mit einem weniger aggressiven Tumor assoziiert ist, da diese Expression für einen Tumor-Phenotyp verantwortlich ist, welcher ein besseres Outcome zeigt (Span *et al*, 2004; Varangot *et al*, 2005). Dies bedeutet, dass Mammaglobin einerseits einen guten Marker darstellt, die Aussagekraft hinsichtlich der Prognose jedoch nicht eindeutig ist.

Eine Studie, die mittels RT-PCR den Marker CEA untersuchte, beinhaltete 6 Brustkrebspatientinnen, von denen 4 ein positives RT-PCR-Ergebnis zeigten. Die 56 Negativkontrollen von Patienten mit entweder malignen hämatologischen Erkrankung, nichtmalignen Erkrankungen oder ohne Erkrankung stellten sich alle als negativ heraus (Gerhard *et al*, 1994). Dies deutet auf eine gute Spezifität hin. Desweiteren zeigt eine aktuelle Studie, die die 4 mRNA-Marker CK19, CEA, MG und MUC5B verglich, dass das beste klinische Ergebnis bezüglich der Prognose mittels CEA mRNA erreicht werden konnte (Varangot *et al*, 2005).

Auch Mucine, d.h. hochmolekulare Glykoproteine, die in epithelialen Zellen gefunden werden, können als Marker für Brustkrebszellen dienen, da verschiedene Veränderungen an

der Biosynthese von Mucinen in Krebszellen beobachtet wurden. Berois et al. analysierten in ihrer Studie 5 Mucin-Gene (MUC2, MUC3, MUC5B, MUC6 und MUC7) und deren Expressionsverhalten in Gewebe von Patienten mit operablen Brustkrebs unter Einsatz der RT-PCR-Technik (Berois *et al*, 2003). Das beste Ergebnis in Bezug auf Sensitivität und Spezifität erzielte MUC5B, bei 7 von 15 Probanden und bei keinem der gesunden Probanden wurde dieses veränderte Glykoprotein gefunden. Daraufhin entwickelte die Arbeitsgruppe eine bebrütete RT-PCR, bei der MUC5B in 9 von 46 Fällen positiv war. Bemerkenswert ist, dass diese RT-PCR-Ergebnisse nicht mit Ergebnissen von Untersuchungen, die andere Marker, z.B. MUC1, CEA und CK19 verwendet haben, identisch sind, was auf die unterschiedliche Sensitivität und Spezifität zurückzuführen ist (Berois *et al*, 2003). Zhong et al untersuchten mit Hilfe des Markers MUC1 12 Brustkrebspatientinnen, von denen 83,3% diesen Marker aufwiesen. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte weitere 33 Brustkrebspatientinnen auf EGP 40 hin, wobei sich mittels dieses Markers eine Prävalenz von 100% herausstellte. Aus diesen Ergebnissen und daraus, dass sich beide Marker auch in gesunden hämatopoetischen Gewebe nachweisen ließen, schlossen die Autoren, dass es sich bei MUC1 und EGP 40 um nichtspezifische Marker handelt (Zhong *et al*, 2001).

Das Ergebnis der PCR-Untersuchung hängt stark von den spezifischen Untersuchungsbedingungen ab (Muller & Schlimok, 2000). So hat die Temperatur, die Wahl des Amplifikations-Primers und die definierten Konditionen der Amplifikations-Reagenzien einen großen Einfluss auf den Ausgang der Untersuchung (Pantel & von Knebel, 2000). Die Heterogenität der einzelnen Tumoren stellt eine zusätzliche Herausforderung an den Untersucher dar. Jeder Primärtumor muss genotypisiert werden, was einen sehr aufwändigen Arbeitsschritt nach sich zieht (Muller & Schlimok, 2000; Pantel *et al*, 1997; Pantel *et al*, 1999; Pantel & von Knebel, 2000; Pantel & Otte, 2001). Auch die in einigen Studien eingesetzten Anreicherungsmethoden sind ein sehr zeitaufwändiger Prozess (Becker *et al*, 2004). Es sind hohe Qualitätsanforderungen einzuhalten: Vor der Analyse der

Patientenproben ist die Sensitivität des gewählten PCR-Systems durch Verdünnungsexperimente und die Spezifität durch eine adäquate Zahl von Negativkontrollen nachzuweisen (Weitz *et al*, 1999a). Zudem ist im Gegensatz zur immunzytochemischen Nachweismethode eine unmittelbare Aufarbeitung der Proben notwendig, auch wenn inzwischen Zellstabilisatoren erhältlich sind, die eine Degradation der Zellen verhindern sollen. Durch diesen mit der PCR verbundenen erheblichen technischen Aufwand wird der Rahmen der klinischen Routinediagnostik bisher gesprengt (Pantel *et al*, 1997). Limitierend wirken hierbei die geringe Standardisierung und der Mangel eines spezifischen Markers für den Einsatz bei Mammakarzinom-Patientinnen. Diese Tatsache kann als eine Ursache für die teilweise kontroversen Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Prognose der knochenmarks-positiven Patientinnen angesehen werden. Mittels m-RNA Marker epithelialer Herkunft können nicht genügend Informationen über die Proliferationsfähigkeit von disseminierten Tumorzellen gewonnen werden (Varangot *et al*, 2005). Hier bedarf es noch eines erheblichen Forschungsaufwands, um Prognosefaktoren zu etablieren, die auf den individuellen Patienten anwendbar sind (Varangot *et al*, 2005). In Bezug auf den enormen Zeit- und Arbeitsaufwand ist hervorzuheben, dass die Methode der PCR generell gut für eine Automatisierung zugänglich ist, und damit die Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte in Zukunft möglich sein wird (Weitz *et al*, 1999a) und somit der Einsatz in der Routinediagnostik durchaus in Zukunft denkbar erscheint.

1.2.3 Screeningmethoden

Wenn man nun eine der Nachweismethoden durchgeführt hat, so besteht der nächste Schritt in der Detektion der Tumorzellen. Zytopathologisch und immunzytochemisch erfolgt dies im Rahmen einer morphologischen Beurteilung durch den Einsatz eines Mikroskops. Bisher benutzte man dafür ein manuelles Mikroskop. Aus verschiedenen Gründen, wie der geringen

Reproduzierbarkeit, hohem Zeit- und Arbeitsaufwand und hoher Fehlerquote, versuchte man in jüngster Zeit ein System zu entwickeln, mit dem eine höhere Sensitivität und ein geringerer Fachpersonalaufwand angestrebt wird. Dies könnte mit Hilfe eines automatisierten Mikroskops gelingen.

1.2.3.1 Manuelle Screeningmethoden

Das Routine-Vorgehen bei der Befundung der gefertigten Nachweispräparate beinhaltet die Beurteilung von zwei unabhängigen Gutachtern mit einem manuellen Mikroskop. Die Befundung erfolgt an einem laborgebräuchlichen Lichtmikroskop.

Abbildung 1: manuelles Mikroskop

Bei diesem Vorgehen zeigte sich immer wieder, dass die Ergebnisse von Gutachten desselben Präparats, welche mit einem manuellen Mikroskop durchgeführt wurden, stark variieren können und somit ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit nicht immer gewährleistet ist (Rack *et al*, 2003; Kraeft *et al*, 2000; Mansi *et al*, 1988; Mehes *et al*, 2000; Mesker *et al*, 1994). Es wurde ein interlaborieller Ringversuch durchgeführt (Borgen *et al*, 1999), um das Screening mittels manuellem Mikroskops und die Detektion der isolierten Tumorzellen in den verschiedenen Laboratorien zu vergleichen. Als immunzytochemischer Marker diente die

A45-B/B3 Antikörperkombination. Es beteiligten sich 7 Labore. Obwohl jedes Labor die identischen Proben untersuchte und unter den gleichen Vorraussetzungen arbeitete, waren die Ergebnisse der Untersuchung sehr uneinheitlich. So wurden von 12 Zytospinns von Krebspatientinnen, die positive Zellen enthielten, nur drei einheitlich von allen Teilnehmern der Studie als positiv bewertet. Einer dieser Zytospinns wurde von allen Teilnehmern negativ eingestuft. Die restlichen Zytospinns wurden sowohl positiv wie negativ eingordnet. Es wurden weiterhin sieben Kontroll-Zytospinns von Spendern ohne maligne Erkrankung untersucht. Diese wurden von den meisten Studienteilnehmern als negativ eingeordnet.

Die Schwierigkeit, die zum Auftreten von falschen Ergebnissen führt, besteht darin, dass bei einem Drittel der positiven Fälle nur eine einzige Tumorzelle im jeweiligen Präparat zu finden ist (Mehes *et al*, 2000). Dies beinhaltet die Gefahr, dass der jeweilige Begutachter bei 1 Million Zellen pro Knochenmarksprobe diese eine angefärbte Zelle möglicherweise übersehen kann (Mehes *et al*, 2000; Kraeft *et al*, 2000; Mansi *et al*, 1988; Mesker *et al*, 1994).

In dem nachfolgenden Kapitel sind die einzelnen Studien angeführt, die den direkten Vergleich von manuellen und automatisierten Mikroskop untersuchen.

1.2.3.2 Automatisierte Screeningmethoden

Durch den Einsatz eines automatisierten Mikroskop wird die Wahrscheinlichkeit reduziert, angefärbte Zellen zu übersehen, da der Ermüdungsfaktor als Fehlerquelle beim menschlichen Begutachter ausgeschaltet wird (Bauer *et al*, 2000; Birdsong, 1996; Borgen *et al*, 2001). Dies bedeutet vermutlich eine Steigerung der Sensitivität der Methode. Ein weiterer Vorteil des automatisierten Mikroskopscreenings ist der geringere Zeit- und Laboraufwand des Fachpersonals. Dieser wird vor allem dadurch gesenkt, dass durch den Einsatz eines automatisierten Mikroskops der Begutachter nur noch vom Computer vorselektierte Zellen bezüglich ihrer Morphologie und Färbung beurteilen muss. Die Schwierigkeit der Befundung

mit einem automatisiertem Mikroskop liegt darin, dass die Parameter für die Suche nach disseminierten Tumorzellen einerseits so eingestellt sein müssen, dass weder Tumorzellen übersehen werden. Andererseits darf die Einstellung nicht so sensitiv gewählt wird, dass der Befunder wieder unzählige Zellen begutachten muss. Eine solche zu sensitive Einstellung würde dem weiteren wichtigen Vorteil des geringeren Zeitaufwandes eines automatisierten Screenings nicht entsprechen (Bauer *et al*, 2000; Birdsong, 1996; Borgen *et al*, 2001; Makarawicz *et al*, 1997; Mehes *et al*, 2000; Mesker *et al*, 1994; Mehes *et al*, 2001). Es gilt also hier eine einheitliche Einstellung zu etablieren, deren Ziel eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität sein muss. Eine solche Einstellung wäre ein weiterer wichtiger Schritt im Rahmen der Standardisierung der Methode.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, um das Screening von disseminierten Tumorzellen zu automatisieren. Die seit 1988 entwickelten Systeme sind alle ähnlich aufgebaut und bestehen aus einem Mikroskop, einer angeschlossenen Kamera und einem Computer mit entsprechender Software zum Scannen und Analysieren.

Die erste Studie mit einem automatisierten Mikroskop wurde 1988 durchgeführt. Mit Hilfe des Leytas Systems (Leyden Television Analysis System) wurden 97 Knochenmarkspräparate von Brustkrebspatientinnen, die mit dem Antikörper EMA gefärbt wurden, sowohl lichtmikroskopisch als auch mit einem automatisierten Mikroskop untersucht (Mansi *et al*, 1988). Die Ergebnisse stimmten zu 100% überein, allerdings nur bei den Präparaten, die eine mittlere (11-50 positive Zellen pro 10^6 Zellen) oder hohe Anzahl (51-1000 positive Zellen pro 10^6 Zellen) von Tumorzellen enthielten und bei den Präparaten, die keine Tumorzellen enthielten. Bei den 20 Knochenmarksproben, die pro 10^6 Knochenmarkszellen nur eine Tumorzelle enthielten, konnte für das automatisierte Mikroskop nur eine Sensitivität von 91% festgestellt werden. Die genaue Anzahl der identifizierten Tumorzellen stimmte allerdings nicht überein, die Anzahl der gefundenen Zellen mit dem Leytas-System war in den meisten

Proben geringer als mittels des manuellen Screenings, was in den meisten Fällen auf die Anwesenheit von Zellklumpen und atypische Zellen zurückzuführen war.

Eine gut Korrelation der Ergebnisse der beiden Screeningmethoden zeigte 1994 die Studie der Gruppe um Mesker, in der 29 Präparate mit Hilfe des „Discovery Fluorbance"-Systems (Becton Dickinson Cellular Imaging System) untersucht wurden. Der Vergleich zwischen manuellem und automatisierten Mikroskop zeigte eine Korrelation von 0,9998 bei einem Tumorzellnachweis von einer zytokeratin-positiven Zelle pro $1{,}87 \times 10^6$ negativer Zellen (Mesker *et al*, 1994).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die folgende 1997 publizierte Studie. Unter dem Einsatz eines „Automated Intelligent Microscopy System" (AIMS, Microvision, Dallas, TX, and Centocor, Malvern, PA) zeigte sich mittels des Antizytokeratin-Antikörper-Cocktails AE-1/Cam5.2 eine Übereinstimmung der Ergebnisses in allen Fällen (Makarawicz *et al*, 1997). Als zu untersuchendes Material dienten Proben mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, denen Tumorzellen der Brustkrebs-Zellreihe MDA-MB-468 zugesetzt wurden. Den einzelnen Proben wurden eine unterschiedliche Anzahl von Tumorzellen von 1 bis 1000 hinzugefügt, und sowohl das manuelle wie das automatisierte Mikroskop konnten in allen Verdünnungsreihen Tumorzellen detektieren. In der niedrigsten Verdünnung enthielt die Probe nur noch eine Tumorzelle pro 10^6 peripherer mononukleärer Blutzellen, und auf 2 der 3 Slides konnten beide Mikroskope eine Tumorzelle entdecken.

Im Jahr 2000 fand eine Arbeitsgruppe mit dem „Automated Cellular Image Analysis system" (ACIS; Chroma Vision Medical System, Inc.) bei einer 39 Patientinnen umfassenden Studie erstmalig in einer größeren Anzahl Tumorzellen als bei der Begutachtung mit einem manuellen Mikroskop (Bauer *et al*, 2000). Untersucht wurden Knochenmarksproben von Patientinnen, die an primären Brustkrebs litten. Diese Proben wurden mit dem monoklonalen Antikörper 2E11, der das carcinom-assozierte Mucin1 erkennt, angefärbt. Es fanden sich in 17 von 39 Proben eine oder mehrere Tumorzellen, welche vom gleichen Gutachter mittels des

manuellen Mikroskops nicht gefunden wurden. 2001 untersuchten Borgen et al. 120 Knochenmarksproben mittels manuellem und automatisierten Mikroskop (Borgen *et al*, 2001). Die Färbung erfolgte mit Hilfe der panantizytokeratinen monoklonalen Antikörper AE1 und AE3. Für den klinischen Test wurden 120 Slides ausgewählt, von denen einer von vier zumindest eine positiv gefärbte Zelle enthielt, die anderen drei Slides waren in vorherigen manuellen Untersuchungen als negativ befundet worden. 5 der 120 Präparate enthielten mehr als 5 Tumorzellen, die restlichen 115 enthielten bis zu 5 Zellen. Von diesen 120 Präparaten wurden mit Hilfe des automatisierten Mikroskops (MDS™, Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA) 50 (41,67%) als positiv bewertet, wohingegen bei der manuellen Untersuchung nur 32 (26,67%) Präparate als positiv befundet wurden. Dies bedeutet eine signifikante Zunahme der Inzidenz. 2 Präparate wurden durch das automatische Mikroskop fälschlicherweise nicht als positiv erkannt (3,8%).

In einer weiteren Studie kam 2004 ein automatisiertes Mikroskop in Einsatz, jedoch ohne Vergleich mit einem manuellen Mikroskop. Diese Studie brachte im Hinblick auf die Inzidenz gute Ergebnisse: Pierga JY et al untersuchten das periphere Blut und das Knochenmark von 114 Brustkrebspatientinnen im Stadium I-IV vor dem Beginn der Chemotherapie (Pierga *et al*, 2004). Als Färbemethode wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3 eingesetzt. Die gefärbten Zellen wurden mit dem „Automated Cellular Imaging System“ (Chroma Vision Medical System) detektiert. Bei 28 (24,5%) Patienten wurden zytokeratinpositive Zellen im Blut und bei 67 (59%) Patienten wurden zytokeratinpositve Zellen im Knochenmark gefunden.

Die zitierten neueren Studien (Bauer *et al*, 2000; Borgen *et al*, 2001; Pierga *et al*, 2004; Weaver *et al*, 2003) ab dem Jahr 2000 weisen darauf hin, dass mit Hilfe eines automatisierten Mikroskops die Sensitivität in der Tumorzelldetektion erhöht werden kann. So konnte im besten Fall eine Sensitivitätsteigerung durch die automatisierte Technologie um 43,6% beobachtete werden (Bauer *et al*, 2000). Auch die Inzidenz der Tumorzelldetektion zeigte mit

Hilfe des automatisierten Mikroskops eine deutliche Steigerungstendenz auf bis zu 59% (Pierga *et al*, 2004). Die beschriebene Entwicklung zu besserer Sensitivität und höherer Inzidenz ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die fortschreitende technische Entwicklung zurückzuführen.

1.2.4 Prognostische Relevanz

1.2.4.1 Prognostische Relevanz zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

In zahlreichen Studien hat sich gezeigt, dass bei soliden Tumoren wie dem Mammakarzinom (Janni et al, 2001) der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark einen prädiktiven Wert bezüglich des weiteren Verlaufs der Erkrankung besitzt. Bei etwa einem Drittel der Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Fernmetastasierung aufweisen, manifestieren sich während der Nachbeobachtungszeit Fernmetastasen, oftmals auch erst nach langem rezidivfreien Zeitintervall (Weyerstahl & Genz, 2001). Man geht davon aus, dass sich in diesen Fällen disseminierte Tumorzellen erst über mehrere Jahre in einem „Winterschlaf"-Zustand befinden, um dann reaktiviert zu werden und ein klonogenetisches Potenzial zu entwickeln (Janni et al, 2001). Janni et al konnten nachweisen, dass Brustkrebspatienten mit negativen Knochenmarksbefund eine signifikant erhöhte Überlebenszeit erzielen als Patienten, bei denen im Knochenmark isolierte Tumorzellen gefunden wurden (mediane Überlebenszeit 66 vs. 61 Monate, p=0,045) (Janni et al, 2001). Janni et al konnten auch eine signifikant bessere Rezidivfreiheit bei knochenmarksnegativen als bei knochenmarkspositiven Patienten nachweisen (57 vs. 65 Monate; p = 0,04) (Janni et al, 2001). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Pool-Analyse von Braun et al.(Braun et al, 2005). Sie stellten fest, dass sowohl die Todesrate aufgrund des Brustkrebs als auch die allgemeine Todesrate bei Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant erhöht waren im Gegensatz zu den Todesraten der Patientinnen ohne positiven Knochenmarksbefund. Sie untersuchten hierzu das Verhältnis von Todesrate bei Patientinnen

mit Mikrometastasen im Vergleich zu denen ohne Mikrometastasen (MR: mortality rate). Für die allgemeine Todesrate ergab sich eine MR von 2,15, für die spezifische Todesrate aufgrund von Brustkrebs eine MR von 2,44, jeweils $p < 0.001$. Die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen blieb auch dann ein signifikanter Prognosefaktor im Hinblick auf die Überlebenszeit, wenn Tumorgröße, Grading, Lymphknotenmetastasen und Hormonrezeptorstatus berücksichtigt wurden. Auch für die rezidivfreie Zeit kann, nach der Pool-Analyse, der Knochenmarksstatus als Prognosefaktor herangezogen werden, da der rezidivfreie Zeitraum unter den Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen signifikant kürzer war als in der Vergleichsgruppe. Das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose kann somit als Hinweis auf eine klinisch okkulte hämatogene Tumorzellstreuung und damit auf eine systemische Ausbreitung des Karzinoms gewertet werden und beinhaltet ein erhöhtes Risiko für die spätere Entwicklung von Fernmetastasen (Rack *et al*, 2003).

1.2.4.2 Prognostische Relevanz im Follow-Up

Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark kann, anders als die etablierten Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen, bestimmte histopathologische Kriterien und der Hormonrezeptorstatus, auch während der Nachbeobachtungszeit als Verlaufskontrolle herangezogen werden (Janni *et al*, 2001; Wiedswang *et al*, 2004; Diel *et al*, 1996). So können Kontrolluntersuchungen des Knochenmarks unter einer Therapie Hinweise auf die Wirksamkeit des jeweiligen therapeutischen Ansatzes geben. Bisherige Erfahrungen weisen darauf hin, dass ein immunzytochemisches oder molekulares Monitoring der disseminierten Zellen in individuellen Patienten prinzipiell möglich ist (Braun *et al*, 2003).

So zeigte eine Studie, deren mittlere Beobachtungszeit knapp 50 Monate nach der Primärdiagnose betrug, dass das Risiko eines Rückfalls für die Patienten signifikant erhöht

war, die im Follow-Up einen positiven Knochenmarksbefund aufwiesen (Janni *et al*, 2005b). Bei 27,6% der Patienten mit positiven Knochenmarksstatus trat ein Rückfall auf, im Gegensatz dazu erlitten nur 11,1% der knochenmarksnegativen Patienten einen Rückfall (27,6% vs. 11,1%, p = 0,014). Auch das rückfallfreie Intervall zeigte einen Zusammenhang zum Knochenmarksstatus im Follow-Up: So betrug dieses Intervall bei knochenmarksnegativen Patienten im Durchschnitt 149,7 Monate, bei knochenmarkspositiven Patienten jedoch nur 86,5 Monate (p = 0,0003). Auch die Überlebensdaten der untersuchten Mammakarzinompatientinnen korrelieren mit dem Knochenmarksbefund während der Nachbeobachtungszeit. Patienten mit positiven Follow-Up-Knochenmarksstatus wiesen ein signifikant erhöhtes Risiko auf, am Brustkrebs zu versterben, als Patientinnen mit negativen Knochenmarksbefund (17,2% vs. 4,5%, p = 0.006). Die Gesamtüberlebenszeit der in der zitierten Studie untersuchten Patienten betrug 98,7 Monate bei knochenmarkspositiven Patienten, verglichen mit 162,1 Monate bei knochenmarksnegativen Patienten. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie von Wiedswang et al. (Wiedswang *et al*, 2004). In dieser Studie wurde das Knochenmark von 365 Mammakarzinompatienten nach 3 Jahren Nachbeobachtungszeit erneut untersucht. Unter den Patienten mit negativen Knochenmarksbefund erlitten nur 7% einen Rückfall, wohingegen bei 21% der knochenmarkspositiven Patienten die Krankheit erneut auftrat (p = 0,001).

Zusätzlich zu diesen vielversprechenden Ergebnissen ist durch Langzeitbeobachtungen zu klären, ob die therapieassoziierte Reduktion einzelner disseminierter Tumorzellen auch mit einer besseren Prognose der Patienten korreliert (Pantel *et al*, 1997). Sollte dies zutreffen, und die Wirksamkeit der adjuvanten Therapie somit frühzeitig leichter abschätzbar werden, so hätte dies auf die Entwicklung weiterer diagnostischer und therapeutischer Ansätze einen wesentlichen Einfluss (Pantel *et al*, 1997; Janni *et al*, 2005b). So könnte beispielsweise die regelmäßige Untersuchung des Knochenmarks einer Patientin nach Abschluss der adjuvanten Therapie und vor einem Rückfall dabei helfen, das ganz individuelle Risiko eines Rückfalls

einzuschätzen. Dies wäre in Hinblick auf die jeweilige Dosierung, Medikamentenauswahl und Dauer der Therapie von großer Bedeutung (Janni *et al*, 2001). Desweiteren wird derzeit innerhalb von Studien überprüft, ob Patienten mit persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark eventuell von einer zweiten adjuvanten Therapie profitieren könnten (Janni *et al*, 2005b).

2 ZIELSETZUNG

Die Problematik der Detektion disseminierten Tumorzellen im Knochenmark liegt darin, dass sie in nur sehr geringer Anzahl im Knochenmark vorhanden sind und dadurch der Nachweis mit einem enormen Zeitaufwand und möglicherweise falsch negativen Ergebnissen durch Ermüdung des Befunders verbunden ist. Eine weitere Schwierigkeit stellt die mangelnde Standardisierung und die geringe Reproduzierbarkeit der Detektion dar.

Daher liegt die Zielsetzung dieser Arbeit darin, zu überprüfen, ob der Einsatz eines automatisierten Mikroskops im Vergleich zur ausschließlich manuellen Befundung anhand eines konventionellen Mikroskops bei der Untersuchung von Knochenmarksproben auf disseminierte Tumorzellen die Sensitivität erhöhen kann.

In dieser Arbeit soll ermittelt werden:

1. Wird durch den Einsatz des automatisierten Mikroskops die Inzidenz von Patientinnen mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark gesteigert?
2. Kann durch den Einsatz des automatisierten Mikroskops die Anzahl der detektierten disseminierten Tumorzellen pro Patientin gesteigert werden?
3. Entgehen dem automatisierten Mikroskop isolierte Tumorzellen, die mit dem manuellen Mikroskop nachgewiesen wurden?
4. Wird durch den Einsatz des automatisierten Mikroskops die Postivitätsrate in tumorzellfreie Knochenmarksproben zur Kontrolle der Methodik beeinflusst?

Man erwartet durch den Einsatz eines automatisierten Mikroskops einerseits eine erhöhte Detektionsrate. Andererseits könnte mit Hilfe eines automatisierten Systems die Ermüdung des Untersuchers als Fehlerquelle ausgeschaltet werden und somit eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Desweiteren bedeutet ein automatisiertes Mikroskopscreening einen weiteren Schritt auf dem Weg zu einer Standardisierung der Methode. Dies ist besonders wichtig, da bezüglich der immunzytochemischen Färbung und der Morphologiekriterien eine Standardisierung bereits vorhanden ist (Borgen *et al*, 1999; Fehm *et al*, 2006), während zu den Methoden des Screenings zwar Empfehlungen existieren (Fehm *et al*, 2006), diese jedoch nicht von allen Labors angewendet werden. Eine bessere Standardisierung sollte zu einer einheitlicheren Sensitivität führen, was die Aussagefähigkeit des Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bezüglich Prognose und Therapiemonitoring verbessern kann.

Inwieweit die Ergebnisse der Studie die bisher angenommene prognostische Relevanz verändern, muss im Rahmen zukünftiger prospektiver Studien noch überprüft werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 *Patientinnen und Materialien*

3.1.1 Patientinnen

Im Zeitraum von April 1995 bis November 1999 wurde an der I. Frauenklinik bei 268 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vor Beginn der Primärtherapie eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Eingeschlossen werden konnte in die Untersuchung jede Patientin mit primären Mammakarzinom im Stadium I-III. Patientinnen, bei denen eine primäre Fernmetastasierung oder ein Zweitmalignom vorlagen, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Alle Patientinnen mussten vor dem geplanten Eingriff eine Einverständniserklärung unterschreiben. Diese beinhaltet sowohl das Einverständnis zu dem Eingriff, als auch die Zustimmung zur wissenschaftlichen Auswertung des Ergebnisses. Außerdem müssen die Patientinnen über die Risiken des Eingriffs, wie Infektion, Blutung Wundheilungsstörung und eine Osteomyelitis aufgeklärt werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Aufklärungsblattes. Selten klagen die Patientinnen als Folge der Punktion über kutane Hämatome und zeitweilige Reizungen des Periosts. Diese vorübergehenden Beschwerden ziehen aber keine schwerwiegenderen Folgen nach sich.

Es konnten 19 Patientinnen aus verschiedenen Gründen nicht in die Statistik der vorliegenden Studie aufgenommen werden: Bei 15 Patientinnen war aufgrund schlechter Präparatqualität mit zu vielen Färbeartefakten eine automatisierte Auswertung nicht möglich. Weitere 4 Patientinnen wurden aufgrund des Zustandes der Präparate als nicht mehr beurteilbar eingestuft. Hierbei war die Färbung im Laufe der Zeit verblasst, so dass keine Zellen mehr zu erkennen waren.

3.1.2 Therapierichtlinien

Die Primäroperation, bestehend aus brusterhaltender Segmentektomie (BET) oder aus primärer oder sekundärer modifiziert radikaler Mastektomie, führte bei allen Patientinnen zu einer R_0-Resektion. Es wurde routinemäßig eine axilläre Dissektion mit systematischer Entfernung der Lymphknoten der Level I-II durchgeführt. Bei makroskopischem Befall der Lymphknoten auf Level I oder II wurde auch Level III medial den Musculus pectoralis minor reseziert. Alle entfernten Lymphknoten wurden durch lamellierte Paraffinschnitttechnik sorgfältig histologisch untersucht. Dieses operative Vorgehen war zum Zeitpunkt der Studie Standard. Heute kommt bei brusterhaltender Therapie die Sentinellymphonodektomie zum Einsatz, wobei nach präoperativer Markierung des Wächterlymphknotens dieser intraoperativ durch histologische Schnellschnittuntersuchung beurteilt wird. Bei histologisch negativen Sentinellymphknoten, kann auf eine systematische Lymphonodektomie verzichtet werden (Engel J *et al*, 2005).

Alle Patientinnen mit brusterhaltender Operation unterzogen sich einer adjuvanten Telekobaltbestrahlung der Brust. Diese wurde mittels tangentialer Gegenfelder mit Einzelfraktionen von 1,8 bis 2,0 Gray bis zu einer Gesamtdosis von 50 Gray oder 50,4 Gray durchgeführt. Bei Patientinnen nach Mastektomie erfolgte bei Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa, oder bei mehr als vier positiven Lymphknoten, am Absetzungsrand eine Bestrahlung der Thoraxwand. Eine retrosternale Bestrahlung der Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna wurde bei medialem Tumorsitz angewandt. Die Infra-/Supraclavicularregion wurde bei metastatischem Befall von mehr als drei axillären Lymphknoten bestrahlt. Eine Bestrahlung der Axilla wurde im Regelfall nicht durchgeführt. Die Bestrahlungsplanung erfolgte rechnergestützt individuell mit Hilfe der Computertomographie in mehreren Schnittebenen. Die Bestrahlung begann in der Regel 4-6 Wochen nach Abschluss der operativen Primärtherapie in Abhängigkeit von der Wundheilung bzw. nach Abschluss der Chemotherapie.

Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie wurde bei den Patientinnen mit Mammakarzinom in der Regel aufgrund des positiven Lymphknotenbefalls gestellt. Lediglich bei postmenopausale Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptor wurde ggf. zusätzlich zur Chemotherapie eine Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen in Erwägung gezogen und, in Abhängigkeit von den weiteren Daten der Patientin, eingesetzt.

Patientinnen mit bis zu 3 metastatisch befallenen axillären Lymphknoten wurden mit dem CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5 -Fluorouracil) behandelt. Patientinnen mit mehr als 3 befallenen Lymphknoten erhielten entweder das EC/CMF-Schema (Epirubicin und Cyclophosphamid, gefolgt von CMF) oder das Taxotere/Epirubicin-Schema.

Einige Patientinnen erhielten im Rahmen einer Studie eine Hochdosischemotherapie (HD) nach dem VIP-E/VIC-Schema.

Die aufgeführten Therapieschemata entsprachen zum Zeitpunkt der Therapie, d.h. vor 1999 dem „state of the art“ und entsprechen nicht mehr den derzeitigen Richtlinien. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie.

Die Dosierung und Therapieintervalle sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Zytostatische Therapieregime bei Patientinnen dieser Untersuchung

Schema	Substanz	Dosierung	Wiederholung
CMF	Cyclophosphamid	600 mg/m²*	6xq3w
	Methotrexat	40 mg/m²*	6xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m²*	6xq3w
EC/CMF	Epirubicin	90 mg/m²*	4xq3w
	Cyclophosphamid	600 mg/m²*	4xq3w, anschl.
	Cyclophosphamid	600 mg/m²*	3xq3w
	Methotrexat	40 mg/m²*	3xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m²*	3xq3w
Taxotere/Epirubicin	Taxotere	75 mg/m²*	6xq3w
	Epirubicin	60 mg/m²*	6xq3w
HD	Etoposid	745 mg/m²*	2+3x, dazwischen autologe Stammzelltransplantation
	Cisplatin	75 mg/m²*	2+3x, dazwischen autologe Stammzelltransplantation
	Epirubicin	75 mg/m²*	2+3x, dazwischen autologe Stammzelltransplantation
	Ifosfamid	6 g/m²*	2+3x, dazwischen autologe Stammzelltransplantation

* Bezogen auf die Körperoberfläche

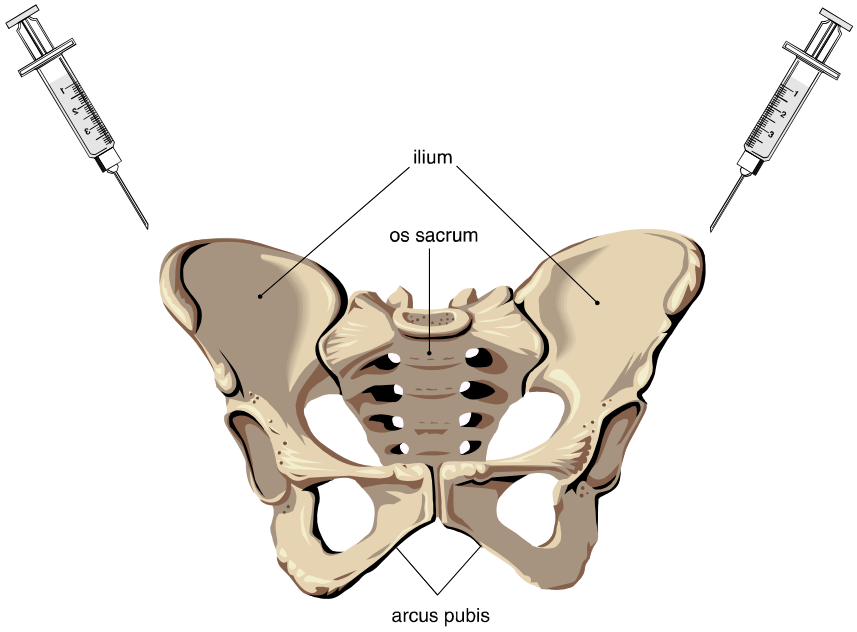
3.1.3 Gewinnung und Aufarbeitung des Knochenmarks

3.1.3.1 Gewinnung des Knochenmarks

Die Punktion wurde als Primärscreening entweder im Rahmen der Primäroperation bei Verdacht auf Brustkrebs, oder in Lokalanästhesie vor der ersten Chemotherapie-Gabe vorgenommen.

Der Zeitpunkt der Entnahme lag nach Einleitung der Narkose, aber vor der Operation des Mammakarzinoms. Der Eingriff beginnt mit der Desinfektion der Punktionsstelle. Der genaue Punktionsort wird palpiert und mit Hilfe einer kleinen Schnittinzision wird die Haut für die Punktionsnadel geöffnet, um eine Verunreinigung der Probe mit Epithelzellen der Dermis zu vermeiden. Zur Gewinnung des Knochenmarks wird das Becken in der Region der Spina iliaca anterior superior beidseitig punktiert. Aus jedem Beckenkamm werden 3-5ml Knochenmark in eine 20ml Spritze mit 0,5-1ml Natrium- Heparin aspiriert.

Abbildung 2: Gewinnung des Knochenmarks



3.1.3.2 Weiterverarbeitung und Färbung

Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgt in zwei Schritten. Als erstes werden Zytospinns angefertigt, welche dann im zweiten Schritt immunzytochemisch angefärbt werden (Pantel *et al,* 1994). Zur Anfertigung der Zytospinns wird das aspirierte Knochenmark in ein 50ml Falconröhrchen umgefüllt und mit Hanckscher Lösung (Biochrom, Berlin) auf 50ml aufgefüllt. Nun folgt die 10minütige Zentrifugation in einer Hettich Zentrifuge Universal 30 F

bei 21°C und 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei r = 16 (entsprechend 160g). Der Auslauf ist ungebremst. In den Zentrifugenröhrchen bildet sich ein Überstand, der aus Plasma, Fettpartikeln und Zelldetritus besteht. Dieser Überstand wird mit einer Pipette abgetragen und die übrigbleibende Zellsuspension in ein 15ml Falconröhrchen überführt. Der nächste Schritt besteht aus der Überschichtung der Suspension mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Dichte 1,077 g/mol). Nun folgt die Dichtegradientenzentrifugation, wieder bei 21°C und ungebremsten Auslauf, diesmal jedoch bei 900g (2300 rpm) und einer Dauer von 30 Minuten. Während dieses Vorgangs entstehen verschiedene Phasen im Röhrchen: in der Interphase werden Knochenmarks-, Tumor- und leukozytäre Zellen angereichert, das Pellet (Zellsuspension) besteht aus Erythrozyten und Thrombozyten. Zum nächsten Zentrifugationsdurchlauf pipettiert man die Interphase und die obere Phase ab und füllt diese beiden Phasen wiederum in ein 50ml Röhrchen. Dieses wird dann mit Phosphatpuffer (PBS, pH = 7,4) aufgefüllt. Die Zentrifugation dauert diesmal 10 min bei rpm 1600 und 4°Celsius (Auslauf gebremst). Nach Entfernung des Überstands wird das Sediment mit PBS auf 2-3ml wiederaufgeschwemmt. Von der so entstandenen Suspension werden 10µl mit 10µl Trypanblau gemischt. Es entsteht eine Farbsuspension, die man sowohl mikroskopisch in Bezug auf die Vitalität der Zellen, als auch mit Hilfe einer Zählkammer auf die Zelldichte beurteilen kann. Es ist wichtig, bei der Auszählung der Zellen einen Sollwert von 50-300 Zellen/Quadrat zu erreichen. Man benutzt für die Auszählung eine Neubauer Zählkammer (Thomakreuz 25 Quadrate ausgezählt). Auf jedem Zytospin sollten ca. 10^6 Zellen aufgetragen werden. Um diese Zellzahl möglichst genau zu erreichen, berechnet man das Aspirationsvolumen der Pipette mit folgender Formel: $Volumen = \frac{10^6 \cdot Gesamtvolumen}{Gesamtzellzahl}$.

Das errechnete Volumen gibt man in eine 15ml Zentrifugationstube und füllt diese mit PBS auf 4ml auf. Es schließt sich eine weitere Zentrifugation über 3 min, 1000 rpm,

Raumtemperatur und gebremsten Auslauf an. Zum Abschluss müssen die nun angefertigten Zytospins bei Raumtemperatur über 12-24 Stunden trocknen.

Der nächste Vorgang ist die **Immunzytochmische Färbung** der Tumorzellen. Es werden jeweils mindestens 4 Präparate angefertigt. Hierfür benutzt man den monoklonalen Antikörper A45/B/B3 und die alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik. Bevor man die Antikörper über einen Zeitraum von 45 min appliziert, muss das Antikörperserum mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Der verwendete Antikörper A45/B/B3 (Firma Micromet, Martinsried), Isotyp: IgG 1 ist ein muriner, monoklonaler Antikörper, welcher als gemeinsames Epitop die Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 erkennt.

Bevor sich nun eine 30minütige Inkubation mit dem Rabbit-Mouse Brückenantikörper ZO2593 (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 anschließt, muss das Präparat dreimalig mit PBS gewaschen werden. Auch vor der darauffolgenden Inkubation mit dem APAAP-System (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1 (kappa) steht ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS. Bei der Inkubation mit dem APAAP-System entsteht ein Immuno-Enzym-Konjugat mit der alkalischen Phosphatase. Die hierfür benutzte Substratlösung beinhaltet drei separat anzusetzende Lösungen, welche nacheinander zugesetzt werden: Lösung 1: 90mg Levamisole [L-2,3,5,6-Tetrahydo-6-phneylimidazo 2,1-b thiazole] und 62,5ml 0,2-molare Trislösung (Firma Sigma, Deisenhofen) in 250ml destilliertem H_2O, Lösung 2: 50mg Na NO_2 (Firma Merck, Darmstadt) in 1250 µl Aqua dest. und 500 µl 5% Neufuchsin (Firma Serva, Heidelberg) in 2-molarer HCL-Säure (Firma Merck, Darmstadt), dieser Farbstoff färbt die Tumorzellen rot an.

Lösung 3: 125mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Firma Sigma, Deisenhofen) gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid (Firma Sigma, Deisenhofen).

Diese gefilterte Substratlösung muss 30 Minuten einwirken. Dann schließt sich die Applikation von wässrigem Eindeckmittel Aquatex (Firma Merck, Darmstadt) auf die noch feuchten Präparate an, welche nun am Ende mit einem Deckgläschen abgedeckt werden. Neben den Zytospins, die aus Knochenmarkproben von Mammakarzinom-Patientinnen hergestellt wurden, wurden von gleicher Zellzahl Negativ-Kontroll-Zytospinns hergestellt (Mouse-IgG1κ (MOPC-21), Purified Immunoglobulin, Sigma®). Bei dieser Isotyp-Kontrolle setzt man statt dem CK-Antikörper A45/B/B3 das MOPC-21, ein IgG von Mäusen, ein. Da dieser Antikörper nicht mit epithelialen Antigenen reagiert, weist eine Farbreaktion auf eine unspezifische Anfärbung von Zellen hin.

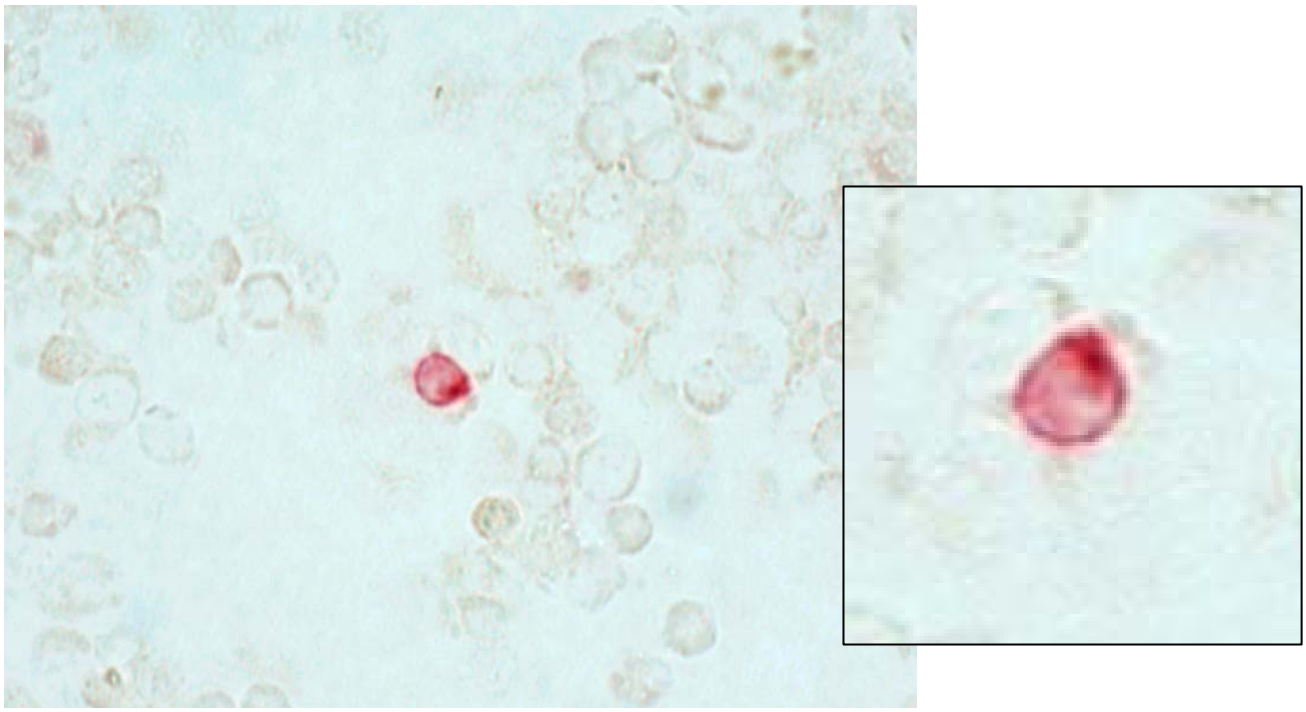
3.1.4 Auswertung der Knochenmarksbefunde

3.1.4.1 Morphologische Beurteilung

Um zu beurteilen, ob es sich bei einer angefärbten Zelle tatsächlich um eine Tumorzelle handelt, muss man alle folgende Kriterien zur Klassifikation beachten:

- Die Zelle muss eine intakte Zellmembran besitzen und der Zellkern muss abgrenzbar sein.
- Die Zelle darf intrazelluläre Granula besitzen, muss jedoch gleichmäßig angefärbt sein.
- Die gefärbte Zelle muss in der gleichen Ebene wie die ungefärbten Zellen liegen.
- Zudem orientiert man sich an weiteren pathomorphologischen Kriterien wie dem Zellkern/Plasma Verhältnis, welches bei Tumorzellen zu Gunsten des Zellkerns verschoben sein kann..

Abbildung 3: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat (mit Detailansicht)



Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle mit dem Antikörper A45B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik; zu beachten ist vor allem die fehlende Anfärbung der im Hintergrund erkennbaren Knochenmarkszellen

Es kommt vor, dass angefärbte Tumorzellen nicht nur einzeln isoliert aufgefunden werden, sondern auch so genannte Cluster auftreten, d.h. zu Zellhaufen gegliederte Tumorzellen. Auch für diese gelten die oben genannten Kriterien.

Allerdings entdeckt man auch immer wieder Strukturen, die zwar angefärbt wurden, aber nicht den genannten Kriterien entsprechen. Diese Strukturen sind als Artefakte einzustufen. Dass es sich um ein Artefakt handelt, kann man häufig an folgenden Kriterien festmachen:

- Die Struktur ist unregelmäßig angefärbt.
- Man entdeckt Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche, z.B. kantige oder bizare Formen.
- Das Färbeereignis liegt auf einer anderen Ebene als die Knochenmarkszellen.

3.1.4.2 Screening

Nach erfolgreichem Abschluss des Färbevorgangs folgt die mikroskopische Detektion der Präparate. Hierfür wurde jedes Präparat zweimal beurteilt. Zuerst erfolgte ein systematisches, manuelles Screening in der Durchlichtmikroskopie. Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte dann die erneute Befundung mittels eines automatisierten Screenings mit dem MDS^{TM} System (Applied Imaging, GB). Die Befundung mit dem manuellem Mikroskop erfolgte in den Jahren 1995 bis 1999, das automatisierte Screening wurde in den Jahren 2001 und 2002 durchgeführt.

Alle Präparate mit einem positiven Färbeereignis wurden an jedem der beiden Mikroskope von zwei unabhängigen Befundern ohne vorherige Kenntnis der Tumorentität und des Tumorstadiums beurteilt. Nur wenn beide Befunder darin übereinstimmten, dass es sich bei der angefärbten Zelle um eine Tumorzelle handelte, wurde die Zelle als Tumorzelle gewertet. Zudem durften sich auf der Negativ-Kontrolle keine positiven Färbeereignisse finden die auf unspezifische Färbereaktionen hinweisen würden. Der Nachweis mindestens einer CK-positiven Zelle wurde als positiver Befund erachtet.

3.1.4.2.1 Manuelles Screening

Zum manuellen Screening wurde ein konventionelles Lichtmikroskop (Zeiss) verwendet.

Das Screening selber erfolgte mittels Hellfeldmikroskopie mit einer 20x Linse, wobei man zur zytomorphologischen Beurteilung der verdächtigen Zellen eine 40x Linse benutzte. Um die Position der zytokeratin-positiven Tumorzellen zu definieren, wurden die Positionen mittels eines in das Mikroskop integrierten Koordinatensystems festgehalten.

3.1.4.2.2 Automatisiertes Screening

Dieselben Präparate, die im Zeitraum von 1995-99 mit dem manuellen Mikroskop befundet worden waren, wurden in der vorliegenden Studie noch einmal mit Hilfe des automatisierten Mikroskops MDS™ untersucht. Beim MDS™ System (Applied Imaging, GB) handelte es sich um ein Gerät, welches aus Mikroskop, Kamera, Computer, Bildschirm und geeigneter Software zum Scannen und Analysieren besteht. Als Kamera diente eine Schwarzweißkamera, die mit verschiedenen Farbfiltern ausgestattet ist.

Abbildung 4: Automatisiertes Zelldetektionssystem MDS® der Firma Applied Imaging

Bevor der Scann-Vorgang beginnt, wird der Bereich, der untersucht werden soll, festgelegt. Man scannt nur den Teil des Objektträgers ein, auf dem sich auch Zellen befinden. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass sich außerhalb des Scannbereichs keine Zellen befinden. Anschließend wird die Schärfe der Kamera eingestellt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde das jeweilige Scannfeld jeweils mit grünem und rotem Filter untersucht. Jede ungefärbte Knochenmarkszelle ist durch beide Filter gleichmäßig stark erkennbar. Eine rote zytokeratin-positive Zelle ist jedoch auf dem Bild

durch den grünen Filter klar erkennbar, während sich die Zelle aufgrund ihrer Anfärbung durch den roten Filter nicht darstellt. Diese Zellen werden deshalb selektiert und als Bild gespeichert. Vor Beginn des Scannvorgangs muss festgelegt werden, wie groß der Unterschied zwischen Bildern durch den grünen und den roten Filter sein muss, damit die Zelle als gefärbte Zelle gilt. Neben Farbe und Farbintensität wurden Größe, Form, Kompaktheit und Rundung als Selektionskriterien festgesetzt und für alle weiteren Scannvorgänge beibehalten. In der vorliegenden Studie wurde eine sehr sensitive Einstellung gewählt (Einstellung siehe Anhang), um keine Tumorzelle zu übersehen. Eine möglichst sensitive Einstellung hat zur Folge, dass eine sehr hohe Anzahl an Zellen von bis zu mehreren Hundert selektiert wird. Dies bedeutet wiederum eine Zunahme der Dauer des Scannvorgangs, die in der vorliegenden Studie bei ungefähr 45 Minuten pro Objektträger lag.

Nachdem der Scannvorgang abgeschlossen war, wurden alle vom MDS^{TM}–System gefundenen und gespeicherten Zellen von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Zuerst auf dem Bildschirm und, falls das Bildschirmbild Tumorzellmerkmale aufwies, durch das angeschlossene Licht-Mikroskop (Zeiss). Alle Befunde wurden in Unkenntnis der Ergebnisse des manuellen Screenings erhoben.

Der Vorgang der Beurteilung wird dadurch vereinfacht, dass per Mausklick die Lokalisation jedes gespeicherten Ereignisses auf dem Objektträger angesteuert werden kann. Außerdem verfügt das System über eine Sortierfunktion, welche die gespeicherten Bilder aufgrund der jeweiligen Tumorzellmerkmale in eine absteigende Reihenfolge bringt.

Wurde eine positive Zelle gefunden, so wurde die dazugehörige negative Kontrolle auch eingescannt und entsprechend beurteilt.

Anschließend wurden die Ergebnisse in die Immunzytologische Datenbank eingegeben und ausgewertet. Die Immunzytologische Datenbank umfasst retrospektive Daten zur Person und zur Erkrankung der Patientin. Bezüglich des Tumors werden Menopausenstatus, Zeitpunkt

der Erstdiagnose, Histologie, TNM-Stadium, Grading, Rezeptorstatus, Therapie und Knochenmarksstatus erfasst.

3.2 *Statistik*

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware ‘Statistical Package for the Social Sciences 10.0’ (SPSS Inc., Chicago, USA) und dem SAS 9.1 for Linux. Die Signifikanzprüfung zwischen kategorialen Variablen wurde mit dem McNemar’s Test durchgeführt, der Vergleich von Mittelwerten kontinuierlicher Größen mit dem Willcoxon-Test. Ein signifikanter Unterschied wurde beim einem p-Wert < 0,05 angenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 *Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Knochenmarkpunktion: Charakteristika zum Zeitpunkt der Primärtherapie*

In der vorliegenden Studie wurden die Daten von 249 Brustkrebspatientinnen bearbeitet, bei denen im Zeitraum von April 1995 bis November 1999 an der I. Frauenklinik eine Knochenmarksaspiration durchgeführt wurde.

Die Tumorstadien wurden gemäß der TNM-Einteilung der Union International Contre le Cancer (UICC) eingeteilt (Sobin & Fleming ID, 1997).

4.1.1 Tumorgröße zum Zeitpunkt der Primärtherapie

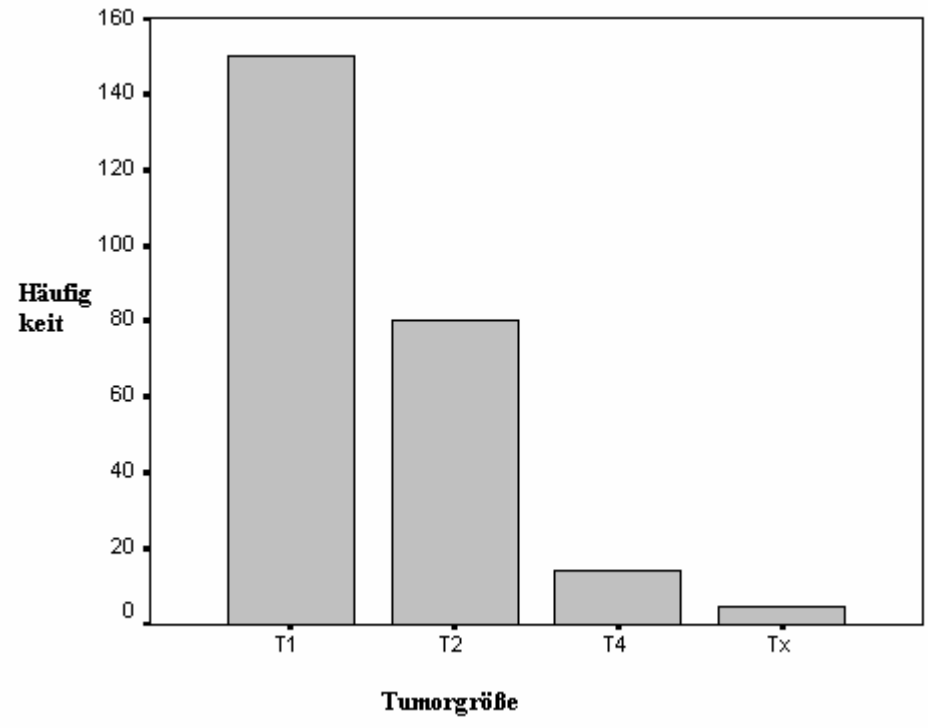
Die Größe des Tumors befand sich bei 150 (60,2%) Patientinnen im Stadium pT1. Bei 80 Patientinnen wurde der Tumor ins Stadium pT2 eingestuft, die Tumorgröße der restlichen 14 Patientinnen stellte sich als zu den Stadien pT4 zugehörig heraus. Kein Tumor wurde als pT3 eingruppiert. Bei fünf Patientinnen waren die Mindesterfordernisse zur Erfassung der Tumorgröße nicht erfüllt (pTx).

Tabelle 6: Tumorgröße zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Tumorgröße	Häufigkeit	Prozent
pT1	150	60,2
pT2	80	32,1
pT3	0	0,0
pT4	14	5,6
pTx	5	2,0
Gesamt	249	100,0

p = nach chirurgischer/ histopathologischer Untersuchung, T1 < 2cm, T2: > 2 < 5 cm, T3 > 5cm, T4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder die Haut, Tx Mindesterfordernisse zur Erfassung des Primärtumors nicht erfüllt (nicht bestimmt, nicht ausreichend Material, nicht dokumentiert).

Abbildung 5: Tumorgröße zum Zeitpunkt der Primärdiagnose



T1 < 2cm, T2: > 2 < 5 cm, T3 > 5cm, T4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder die Haut, Tx Mindesterfordernisse zur Erfassung des Primärtumors nicht erfüllt

4.1.2 Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Primärtherapie

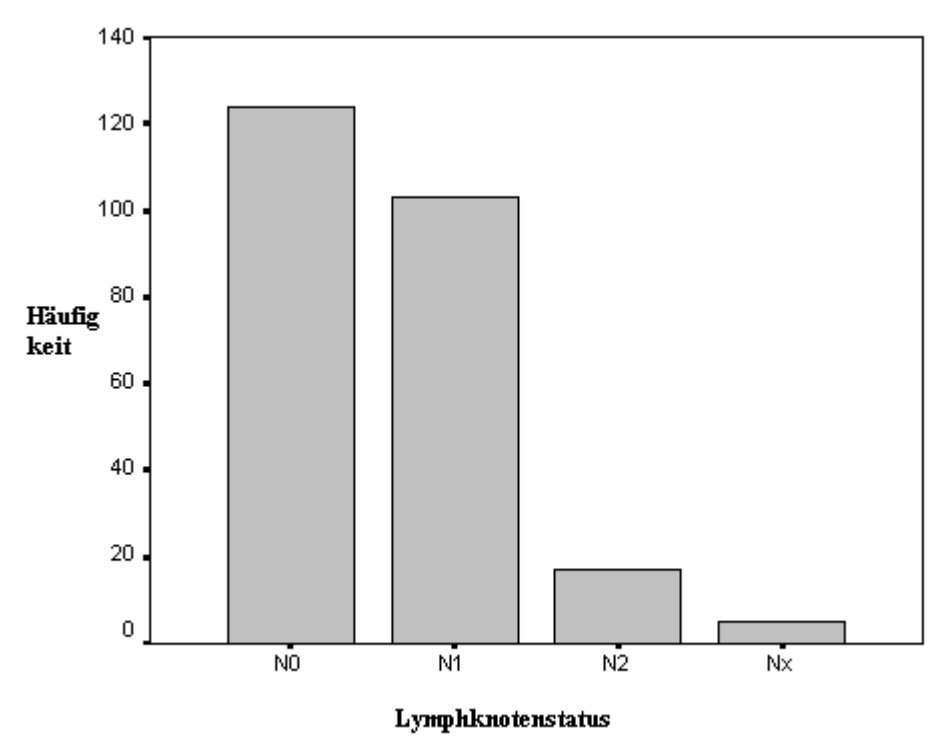
Bei 124 (49,8%) der Patientinnen stellte sich die Untersuchung der axillären Lymphknoten als negativ heraus (pN0). Bei fünf Patientinnen waren die Mindesterfordernisse zur Erfassung der Lymphknotenbeteiligung nicht erfüllt Die Lymphknotenstatus der restlichen 120 Patientinnen befand sich im Bereich von pN1-pN2.

Tabelle 7: Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Lymphknotenbefall	Häufigkeit	Prozent
pN0	124	49,8
pN1	103	41,4
pN2	17	6,8
pNx	5	2,0
Gesamt	249	100,0

p = nach chirurgischer/ histopathologischer Untersuchung,
N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen,
N1 Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillaren Lymphknoten,
N2 Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert,
Nx Mindesterfordernisse zur Erfassung von Lymphknotenbeteiligung nicht erfüllt.

Abbildung 6: Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie



N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen,
N1 Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillaren Lymphknoten,
N2 Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert,
Nx Mindesterfordernisse zur Erfassung von Lymphknotenbeteiligung nicht erfüllt.

4.1.3 Histopathologisches Grading zum Zeitpunkt der Primärtherapie

53,4% der Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Primärtherapie den Grading-Grad G1-2.

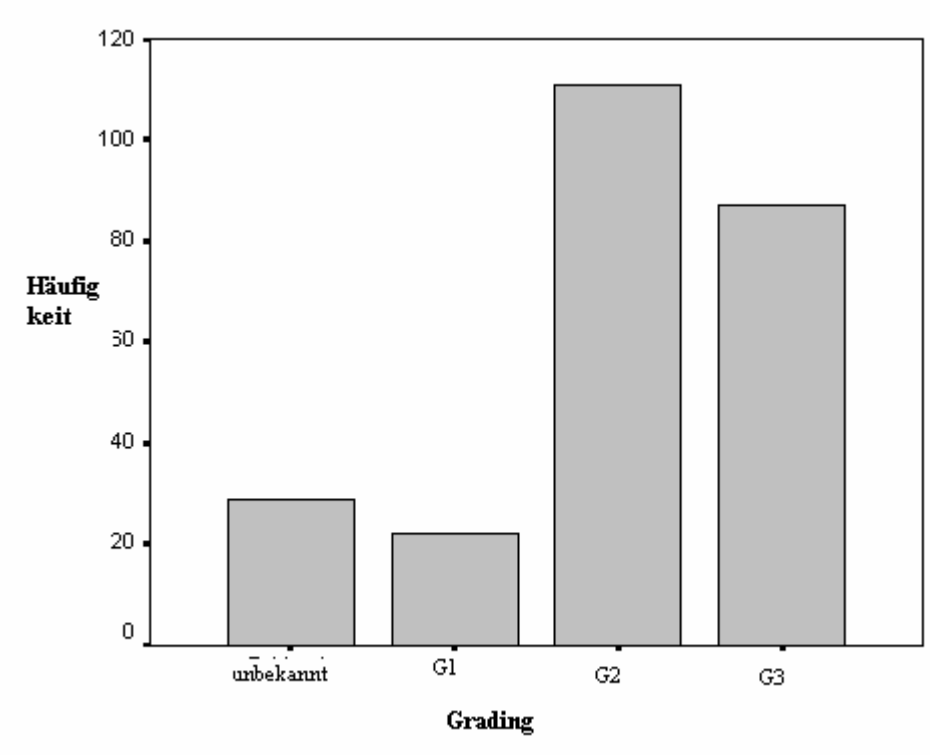
87 Patientinnen (34,9%) befanden sich im Stadium G3, 29 Patientinnen (11,6%) konnten nicht eingestuft werden.

Tabelle 8: Histopathologisches Grading zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Grading	Häufigkeit	Prozent
G1	22	8,8
G2	111	44,6
G3	87	34,9
Gx	29	11,6
Gesamt	249	100,0

G1 hoher Differenzierungsgrad,
G2 mittlerer Differenzierungsgrad,
G3 niedriger Differenzierungsgrad,
Gx Differenzierungsgrad nicht bestimmbar.

Abbildung 7: Grading zum Zeitpunkt der Primärtherapie



Gx Differenzierungsgrad nicht bestimmbar, G1 hoher Differenzierungsgrad,
G2 mittlerer Differenzierungsgrad, G3 niedriger Differenzierungsgrad.

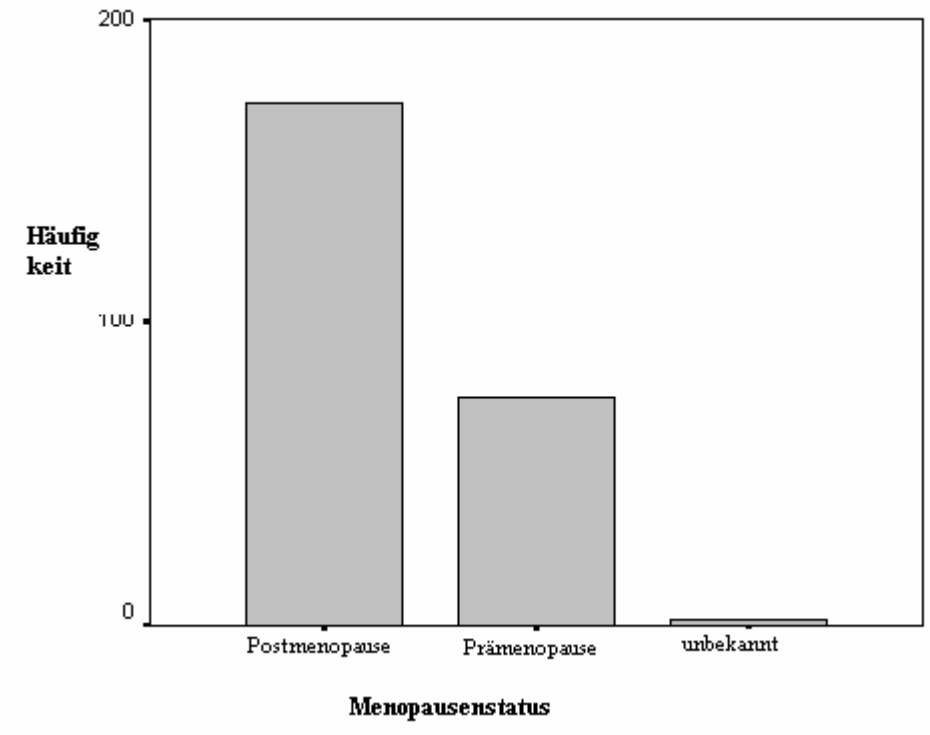
4.1.4 Menopausenstatus und Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Der Großteil der Patientinnen (69,08%) befand sich zum Zeitpunkt der Primärtherapie in der Postmenopause. 30,12% der untersuchten Frauen waren prämenopausal. Zu zwei Patientinnen wird keine Aussage gemacht.

Tabelle 9: Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Menopausenstatus	Häufigkeit	Prozent
Postmenopause	172	69,08
Prämenopause	75	30,12
Nicht bekannt	2	0,8
Gesamt	249	100,0

Abbildung 8: Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

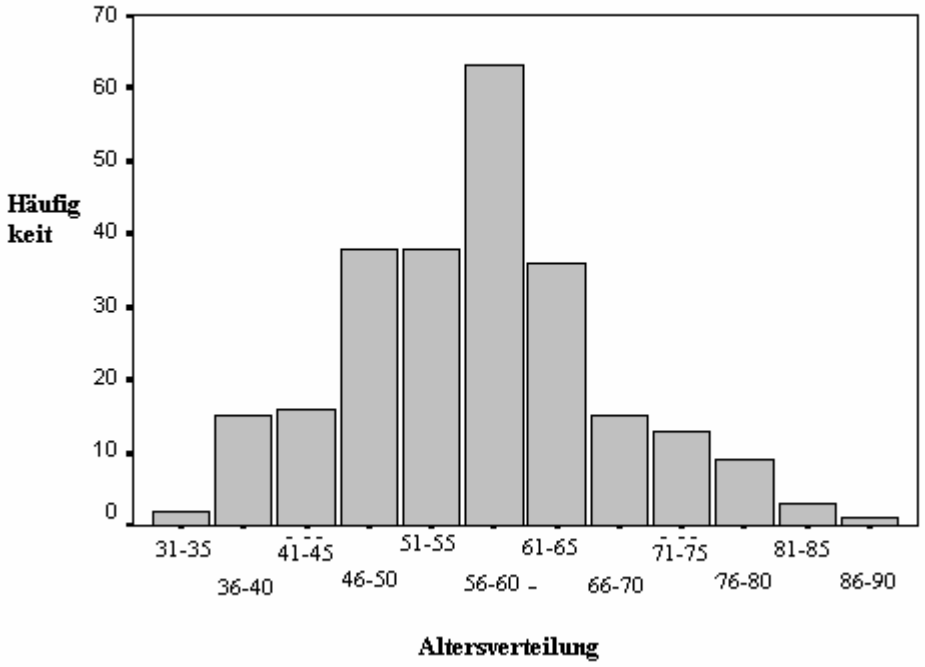


70,4% aller Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zwischen 46 und 65 Jahre alt.

Tabelle 10: Altersverteilung des Patientenkollektiv

Alter (Jahre)	Häufigkeit	Prozent
31-35	2	0,8
36-40	15	6,0
41-45	16	6,4
46-50	38	15,3
51-55	38	15,3
56-60	63	25,3
61-65	36	14,5
66-70	15	6,0
71-75	13	5,2
76-80	9	3,6
81-85	3	1,2
86-90	1	0,4
Gesamt	249	100,0

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Altersverteilung des Patientenkollektiv



4.2 *Primärtherapie*

4.2.1 Primäroperation

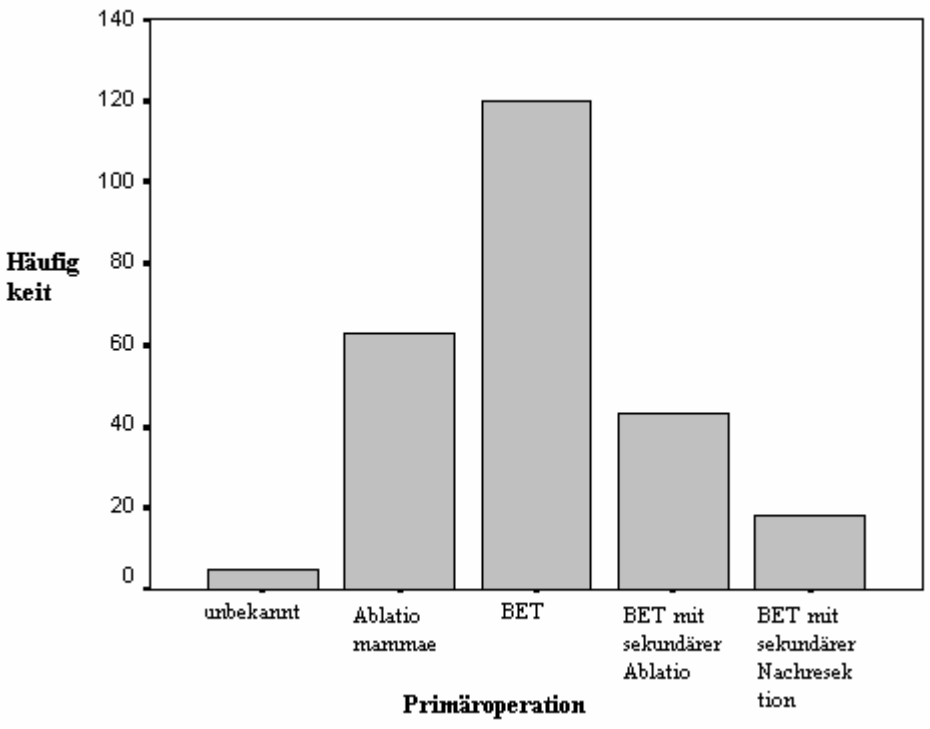
Die Primäroperation bestand bei 63 Patientinnen in einer Ablatio mammae (25,3%),

181 Patientinnen konnten brusterhaltend operiert werden (72,7%), wobei bei 43 dieser Patientinnen (17,3%) eine sekundäre Ablatio vorgenommen wurde. Bei fünf Patientinnen kann die Primärtherapie nicht mehr eruiert werden.

Tabelle 11: Primäroperation

Primäroperation	Häufigkeit	Prozent
Ablatio mammae	63	25,3
BET	120	48,2
BET mit sekundärer Ablatio	43	17,3
BET mit sekundärer Nachresektion	18	7,2
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 10: Primäroperation



4.2.2 Adjuvante systemische Therapie

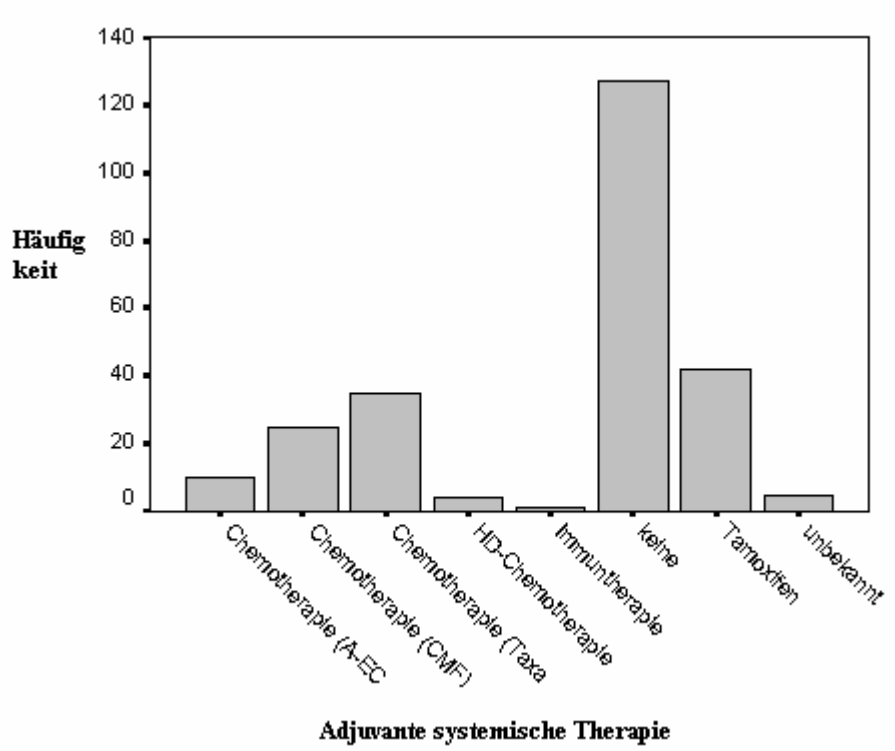
Von den 249 untersuchten Patientinnen unterzogen sich 117 (47,0%) einer adjuvanten systemischen Therapie. Hiervon wurden 42 Patientinnen (16,9%) endokrin behandelt, bei 74 Patientinnen (29,7%) wurde eine Chemotherapie eingesetzt und eine Patientin (0,4%) bekam eine Immuntherapie. Zu fünf Patientinnen (2,0%) kann keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 12: Adjuvante Therapie

Adjuvante Therapie	Häufigkeit	Prozent
Anthracyclinhaltige CT (A-EC)	10	4,0
Taxanhaltige CT	35	14,1
CT HD	4	1,6
CMF	25	10,0
Immuntherapie	1	0,4
Tamoxifen	42	16,9
Keine	127	51,0
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

CT: Chemotherapie, Therapieschemata siehe Kapitel 2.1.2 Therapierichtlinien

Abbildung 11: Adjuvante systemische Therapie



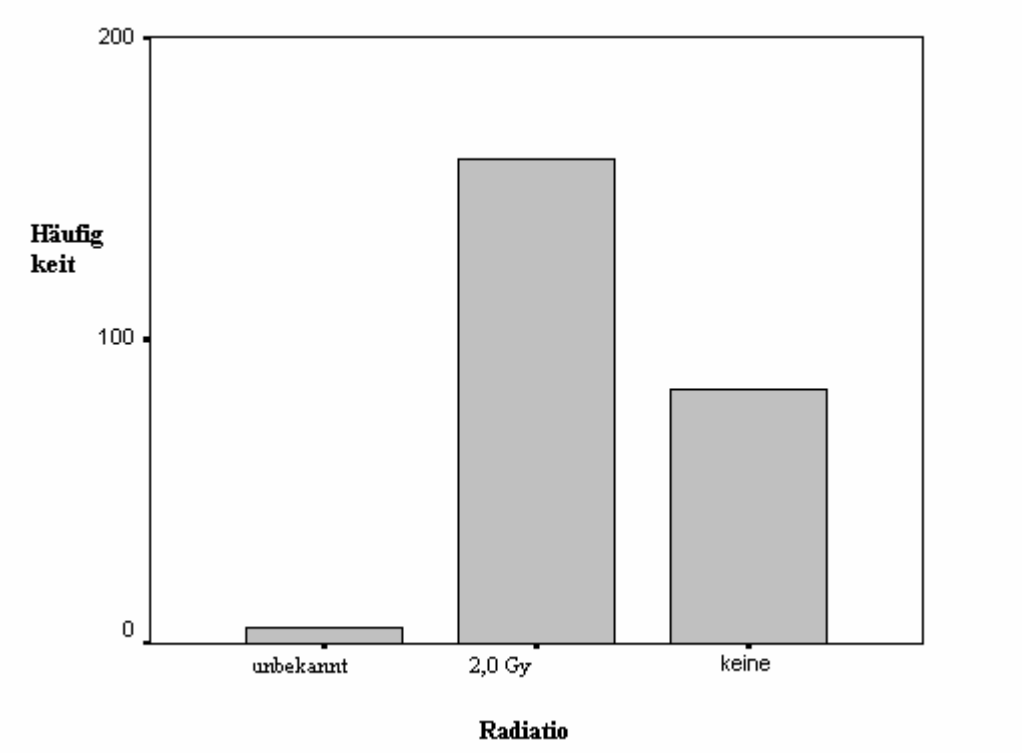
4.2.3 Adjuvante Radiotherapie

160 Patientinnen wurden nach der Primäroperation mittels Bestrahlung behandelt. Bei 5 Patientinnen kann über eine adjuvante Radiotherapie keine Aussage gemacht werden. Die restlichen 84 Patientinnen wurden ohne Radiatio weiter betreut.

Tabelle 13 adjuvante Radiotherapie

Adjuvante Radiotherapie	Häufigkeit	Prozent
2,0 Gy	160	64,3
Keine	84	33,7
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 12: Adjuvante Radiotherapie



4.3 *Histologische Zusatzkriterien zum Zeitpunkt der Primärtherapie*

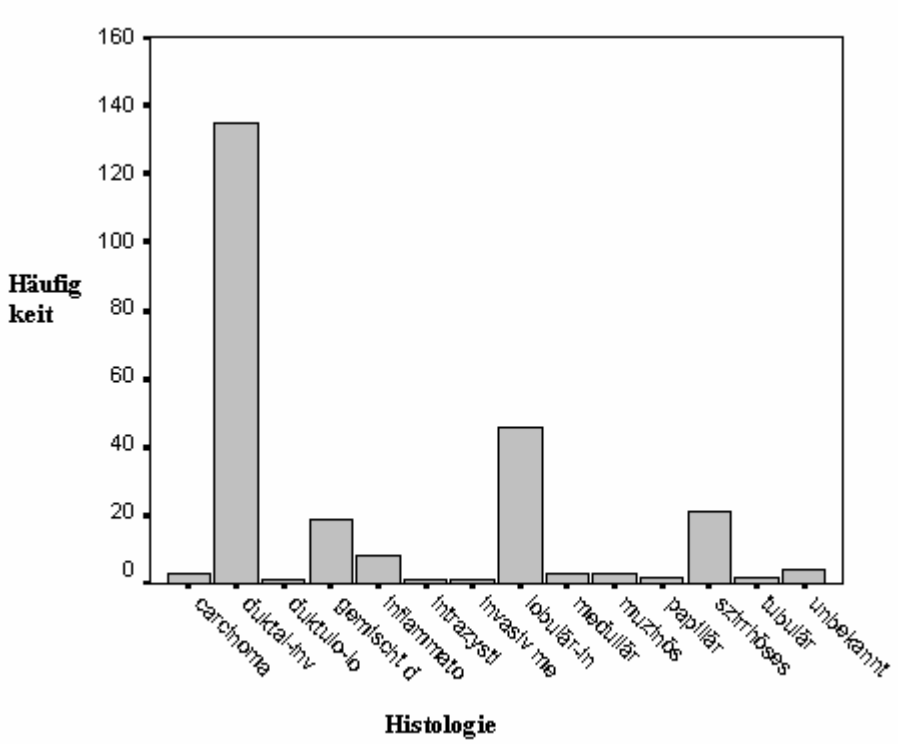
Pathohistologische Zusatzkriterien des Primärtumors wie der histologische Subtyp und die Präsenz einer den Tumor umgebenden Lymphangiosis carcinomatosa und Hämangiosis carcinomatosa sowie der Hormonrezeptorstatus sind in den folgenden Tabellen und Grafiken zusammengefasst.

4.3.1 Histologie zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Tabelle 14: Tumorhistologie zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Histologie	Häufigkeit	Prozent
Duktal- invasiv	134	53,8
Lobulär- invasiv	46	18,5
Szirrhös	21	8,4
Gemischt	19	7,6
Inflammatorisch	8	3,2
Medullär	4	1,6
Muzinös	3	1,2
Carcinoma in situ	3	1,2
Papillär	2	0,8
Tubulär	2	0,8
Intrazystisch	1	0,4
Duktulo-lobulär	1	0,4
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 13: Postoperative Histologie zum Zeitpunkt der Primärtherapie



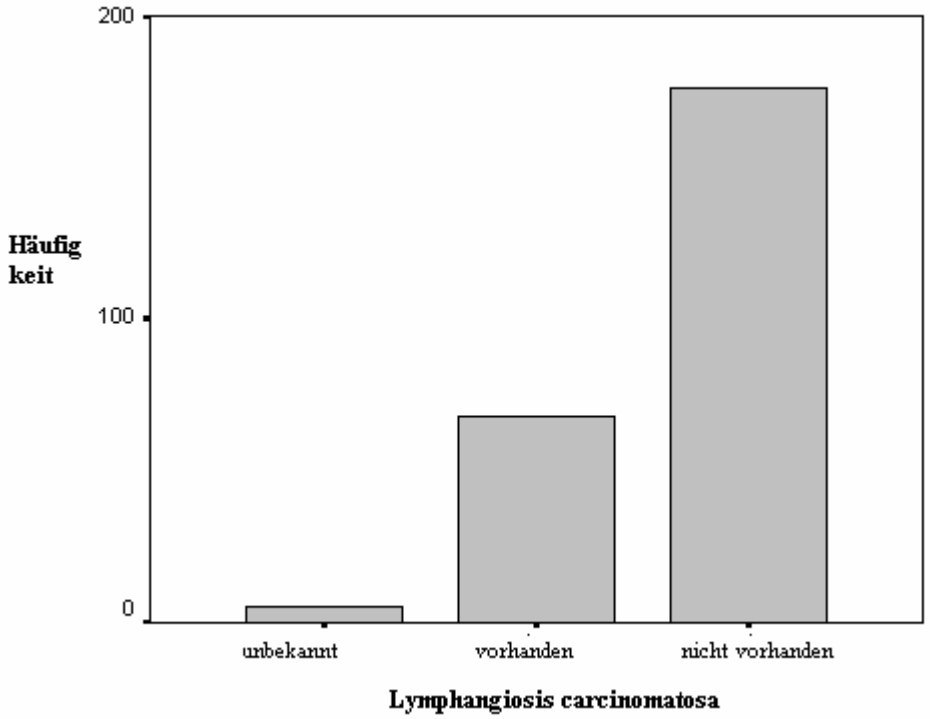
4.3.2 Lymphangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Bei 68 Patientinnen konnte eine Lymphangiosis carcinomatosa nachgewiesen werden.

Tabelle 15: Lymphangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Lymphangiosis carcinomatosa	Häufigkeit	Prozent
Vorhanden	68	27,3
Nicht vorhanden	176	70,7
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 14: Lymphangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie



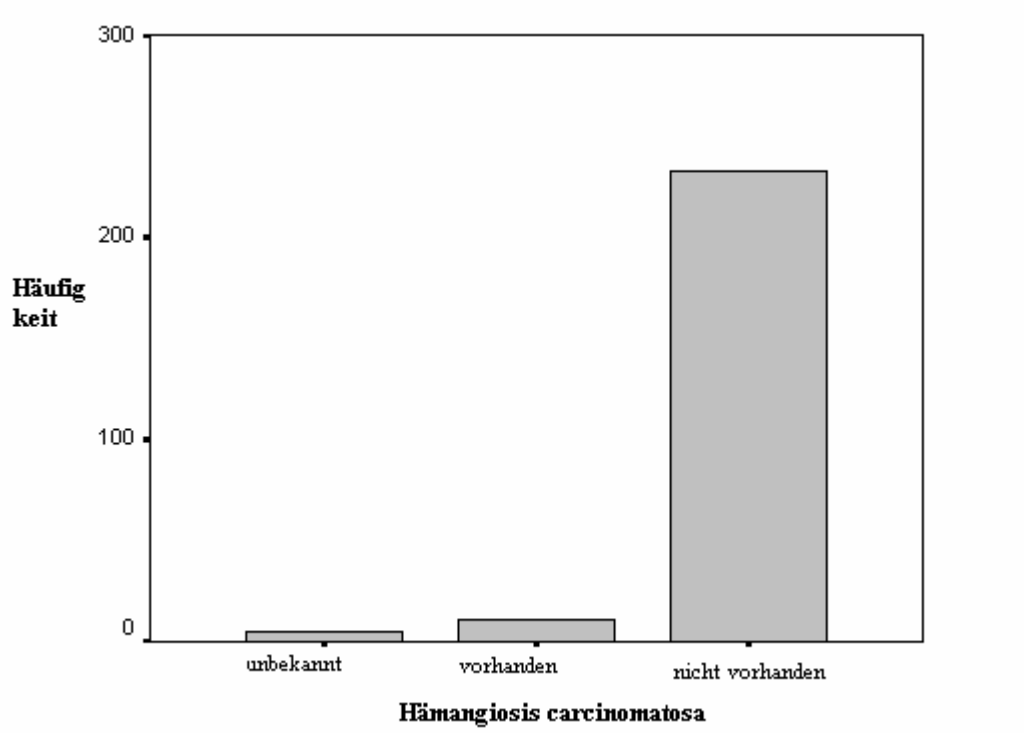
4.3.3 Hämangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Es konnte nur bei 11 Patientinnen eine Hämangiosis carcinomatosa nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Hämangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Hämangiosis carcinomatosa	Häufigkeit	Prozent
Vorhanden	11	4,4
Nicht vorhanden	233	93,6
Unbekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 15: Hämangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie



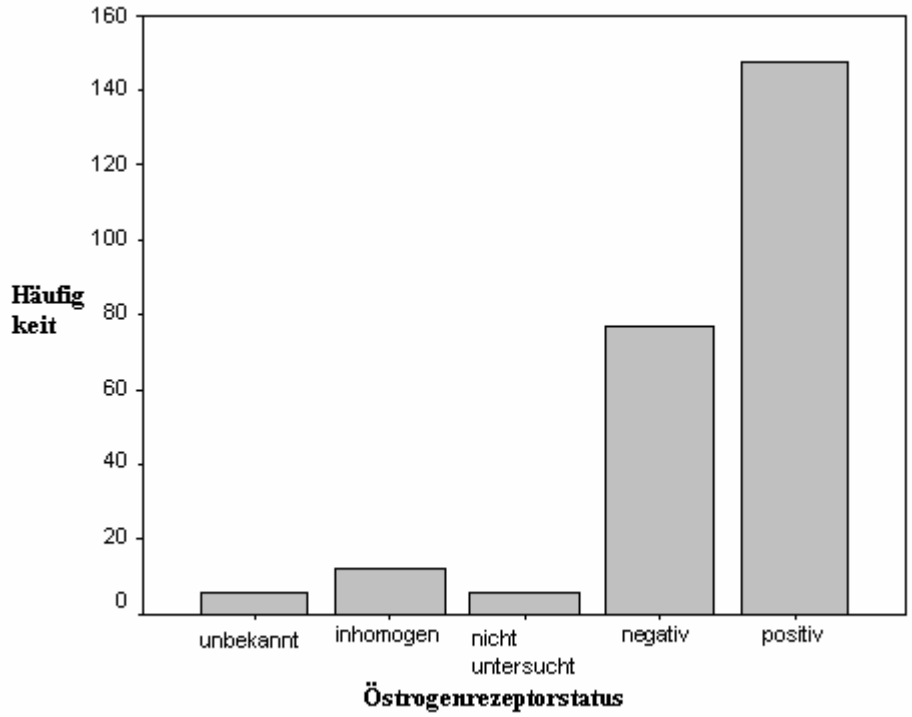
4.3.4 Östrogenrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Der Östrogenrezeptorstatus war bei 148 Patientinnen positiv, bei 77 negativ und bei 12 Patientinnen inhomogen. Bei 7 Patientinnen wurde der Hormonrezeptorstatus nicht untersucht. Zu 5 Patientinnen kann keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 17: Östrogenrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Östrogenrezeptorstatus	Häufigkeit	Prozent
Positiv	148	59,4
Negativ	77	30,9
Inhomogen	12	4,8
Nicht untersucht	7	2.8
Nicht bekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 16: Östrogenrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie



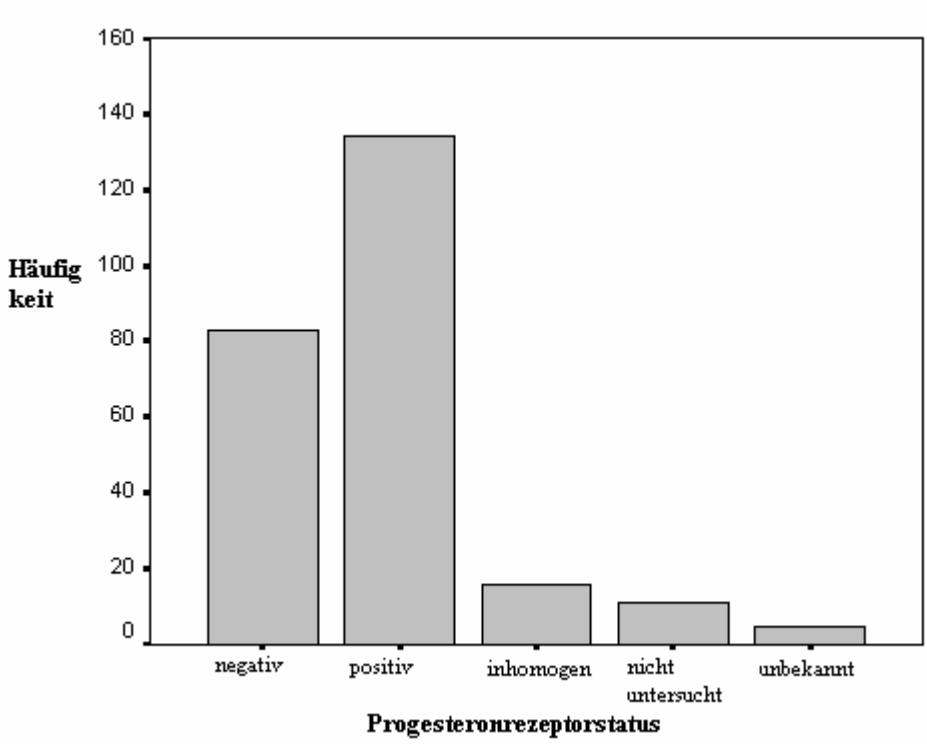
4.3.5 Progesteronrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Bei 134 Patientinnen wurde ein positiver Progesteronrezeptorstatus festgestellt, bei 83 ein negativer und bei 16 Patientinnen war der Progesteronrezeptorstatus inhomogen. Bei 11 Patientinnen wurde der Progestoronstatus nicht untersucht, bei weiteren 5 Patientinnen kann diesbezüglich keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 18: Progesteronrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Progesteronrezeptorstatus	Häufigkeit	Prozent
Positiv	134	53,8
Negativ	83	33,3
Inhomogen	16	6,4
Nicht untersucht	11	4,4
Unbekannt	5	2,0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 17: Progesteronrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie



4.4 *Ergebnisse des manuellen und automatisierten Mikroskopscreenings*

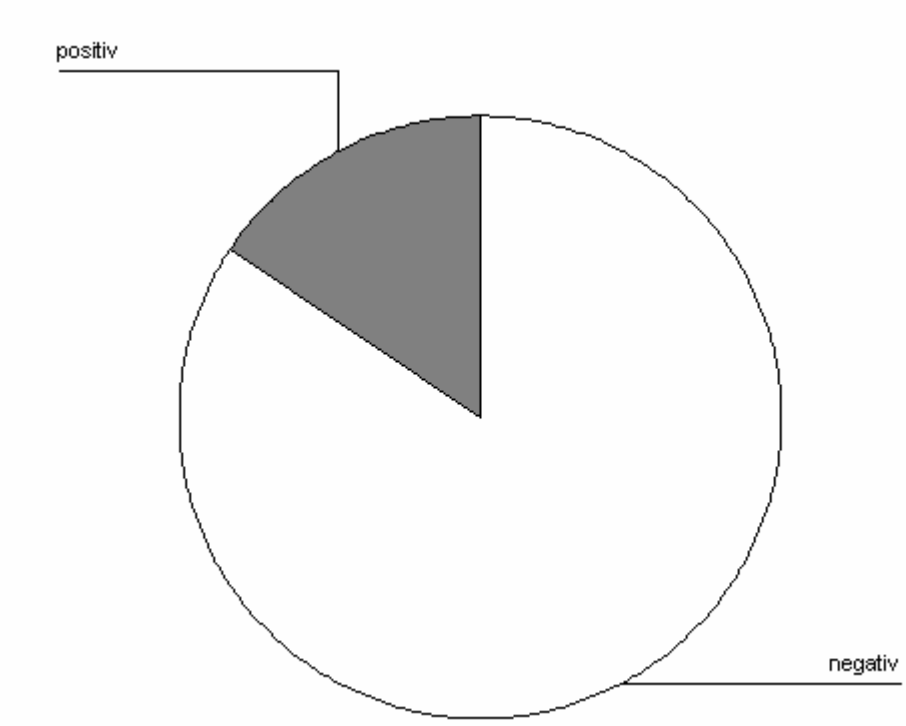
4.4.1 Ergebnisse des manuellen Mikroskopscreenings

Es wurden Knochenmarksproben von 249 Patientinnen untersucht. Die Befunder kamen in 15,7% der Fälle zu einem positiven Ergebnis, d.h. dass bei 39 der 249 untersuchten Patientinnen mindestens eine positiv gefärbte disseminierte Tumorzellen gefunden wurde. Bei den Proben der restlichen 210 (84%) Patientinnen konnten die Begutachter keine disseminierte Tumorzelle feststellen. In keiner der Negativkontrollen konnte eine positive Zelle nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Ergebnisse manuelles Mikroskop

Manuelles Mikroskop	Häufigkeit	Prozent
Positiv	39	15,7
Negativ	210	84,3
Positive Negativkontrollen	0	0
Gesamt	249	100,0

Abbildung 18: Ergebnisse manuelles Mikroskop

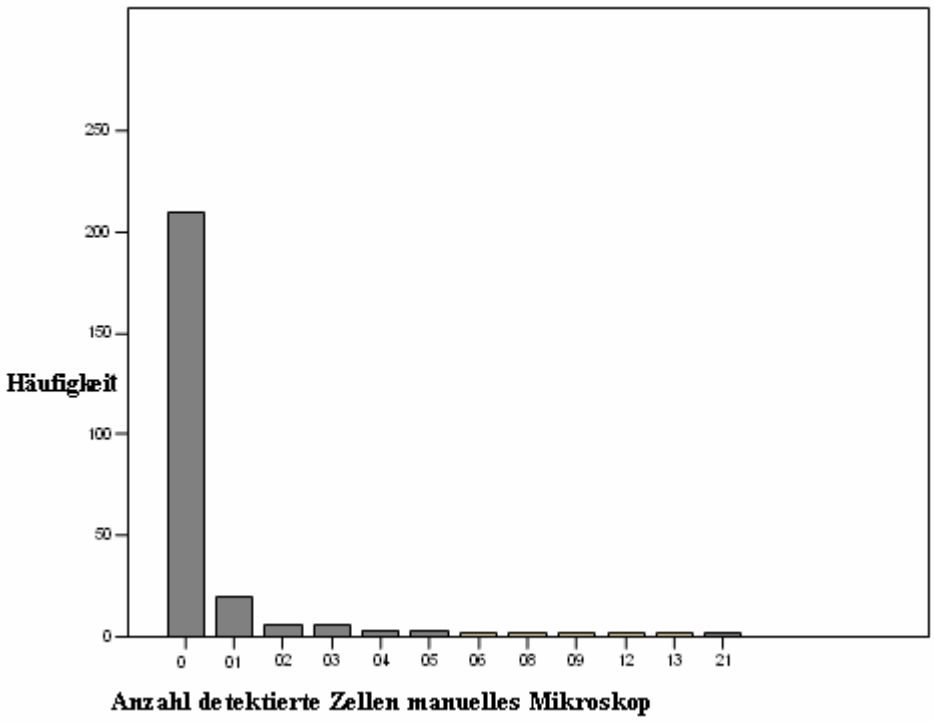


Beim manuellen Mikroskop lag die Spanne der Anzahl der detektierten Zellen zwischen einer und 21 Zellen (Median: 2).

Tabelle 20: Anzahl der detektierten Tumorzellen mittels manuellen Mikroskops

Zellenanzahl	Häufigkeit	Prozent
Keine	210	83,6
1	19	7,6
2	5	2,0
3	5	2,0
4	3	1,2
5	1	0,4
6	1	0,4
7	1	0,4
8	1	0,4
9	1	0,4
12	1	0,4
13	1	0,4
21	1	0,4
Gesamt	249	100,0

Abbildung 19: Anzahl der detektierten Zellen mit dem manuellen Mikroskop



4.4.2 Ergebnisse des automatisierten Screenings

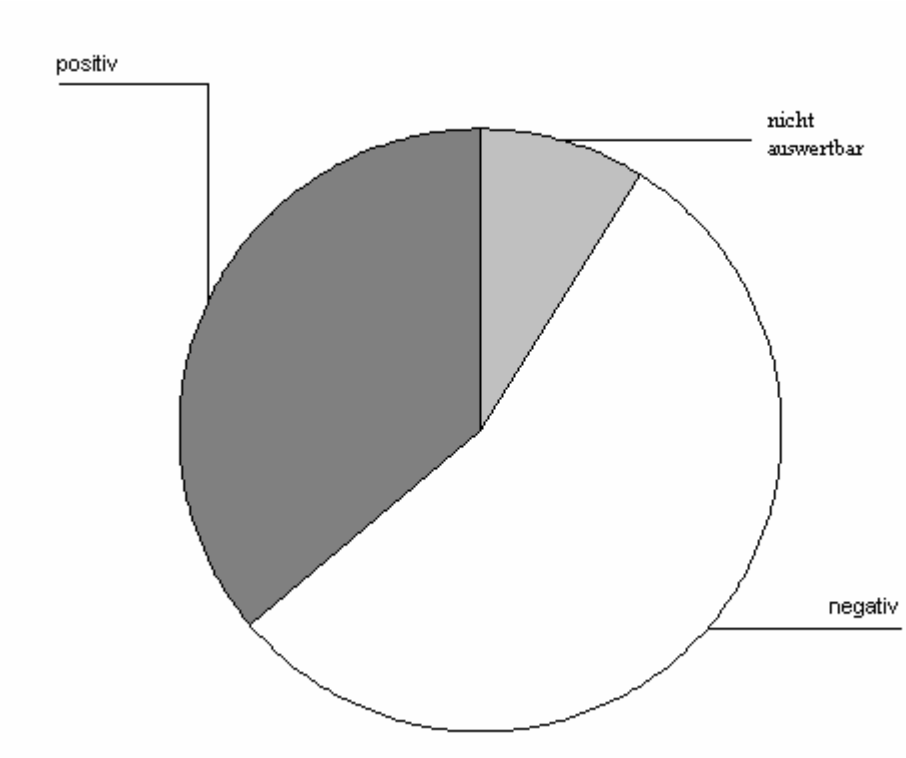
Mit Hilfe des automatisierten Mikroskops wurden in 90 Fällen (36,1%) angefärbte Tumorzellen entdeckt. 137 (55,0%) der 249 Patientinnen wurden als negativ befundet.

In 22 Fällen stellte sich die Negativkontrolle als positiv heraus, d.h. es befanden sich auf den Objektträgern der Negativkontrollen positive Zellen. Von diesen 22 Fällen waren 13 primär mit dem manuellem Mikroskop als negativ eingestuft worden. Die restlichen 9 Fälle wurden mit dem manuellen Mikroskop positiv bewertet.

Tabelle 21: Ergebnisse automatisiertes Mikroskop

Automatisiertes Mikroskop	Häufigkeit	Prozent
Negativ	137	55,0
Positiv	90	36,1
Negativkontrollen positiv, d.h. nicht auswertbar	22	8,8
Gesamt	249	100,0

Abbildung 20: Ergebnisse automatisiertes Mikroskop

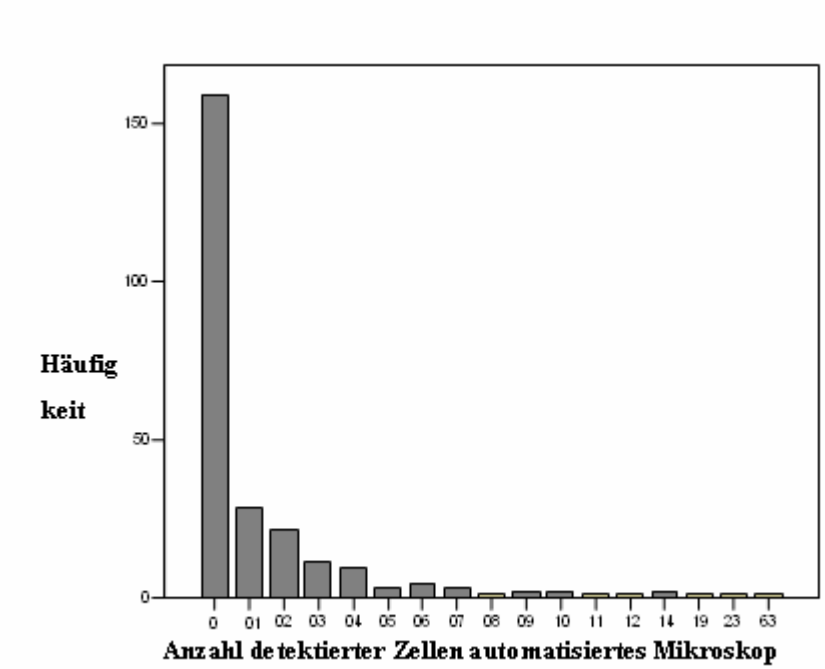


Die Anzahl der detektierten Zellen beim automatisierten Screening lag zwischen einer und 63 Zellen pro Objektträger (Median: 2).

Tabelle 22: Anzahl detektierter Tumorzellen mittels automatisierten Mikroskops

Zellenanzahl	Häufigkeit	Prozent
Keine	159	63,9
1	28	11,2
2	20	8,0
3	11	4,4
4	9	3,6
5	3	1,2
6	4	1,6
7	3	1,2
8	1	0,4
9	2	0,8
10	2	0,8
11	1	0,4
12	1	0,4
14	2	0,8
19	1	0,4
23	1	0,4
63	1	0,4
Gesamt	249	100,0

Abbildung 21: Anzahl detektierter Zellen automatisiertes Mikroskop



4.4.3 Vergleich von manuellem und automatisierten Mikroskop

4.4.3.1 Prävalenzvergleich der Methoden

Mittels automatisierten Screenings stieg die Anzahl der Patientinnen mit positivem Knochenmarks-Status auf mehr als das doppelte. Das entspricht einer Inzidenz beim manuellen Screening von 15,7% und beim automatisierten Screening von 36,1%. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p<0,0001$, McNemar's Test). Die 22 Fälle mit positiven Negativkontrollen sind nicht aussagekräftig und können deshalb bei der Statistik nicht ausgewertet werdent.

4 positive Ereignisse wurden durch das automatisierte Screeningssystem nicht detektiert, d.h. in 1,6% der Fälle wird das Ergebnis mit dem manuellen Mikroskop als positiv bewertet und vom automatisierten Screening als negativ. Umgekehrt wurden aber auch 64 Patientinnen vom automatisierten Mikroskop als positiv eingeschätzt, die beim manuellen als negativ eingeschätzt worden waren. Die Ursache für das nicht Auffinden der positiven Zellen mittels

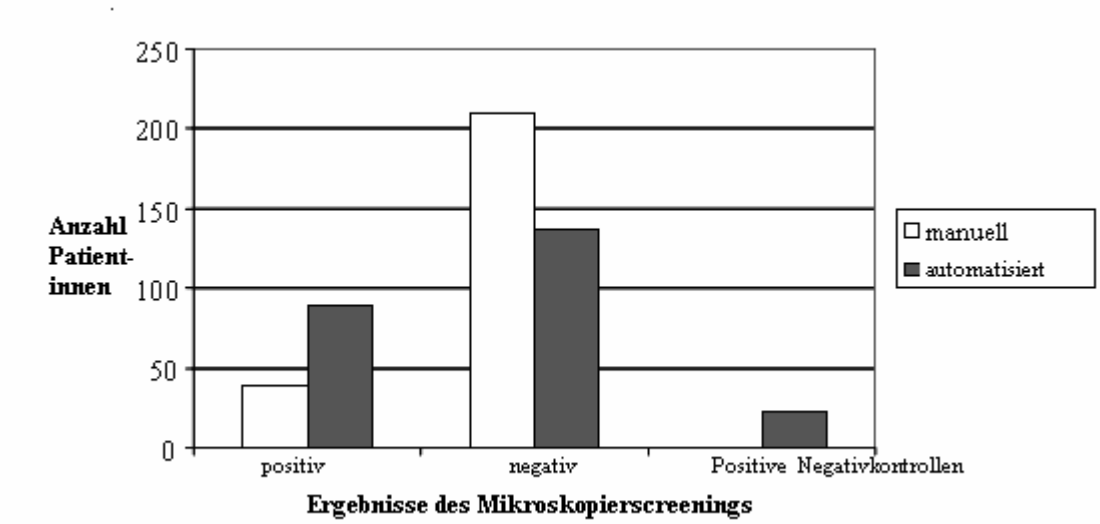
des automatisierten Systems lag in drei von vier Fällen darin, dass die Präparate vollständig verblasst waren, so dass durch das automatisierte System überhaupt kein Zelle registriert werden konnte. In einem Fall wurde die Zelle zwar mittels des automatisierten Mikroskops detektiert, jedoch vom Befunder als negativ bewertet.

Da es für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark keinen Goldstandard gibt, wurde zum Vergleich der beiden Methoden der Kappa Test gewählt. Der Kappa-Koeffizient lag bei 0,29 (95% Konfidenzintervall: 0,18-0,40). Dies entspricht nur einer schwachen Korrelation zwischen den beiden Methoden.

Tabelle 23: Inzidenzvergleich zwischem automatisiertem und manuellem Mikroskop

		Manuelles Mikroskop			Gesamt
		negativ	positiv	Negativkontrolle positiv	
Automatisiertes Mikroskop	Negativkontrollen positiv	13	9	0	22
	Negativ	133	4	0	137
	positiv	64	26	0	90
Gesamt		210	39	0	249

Abbildung 22: Inzidenzvergleich zwischem automatisiertem und manuellem Mikroskop



4.4.3.2 Vergleich der Anzahl der detektierten Zellen

Mittels manuellen Mikroskop wurden insgesamt bei 39 Patientinnen 137 Zellen detektiert, beim automatisierten waren es 399 Tumorzellen bei 90 Patientinnen. Die Spannweite beim manuellen Mikroskop reichte von einer Tumorzelle zu 21 (Median: 2), beim automatisierten von einer zu 63 (Median: 2). Der Mittelwert ohne Berücksichtigung der Nullwerte liegt für das MDS bei 4,43, für das manuelle Mikroskop bei 3,33. Der Willcoxon-Test zeigt eine statistische Signifikanz zwischen der Anzahl der detektierten Tumorzellen der beiden Methoden (p-Wert=0,001).

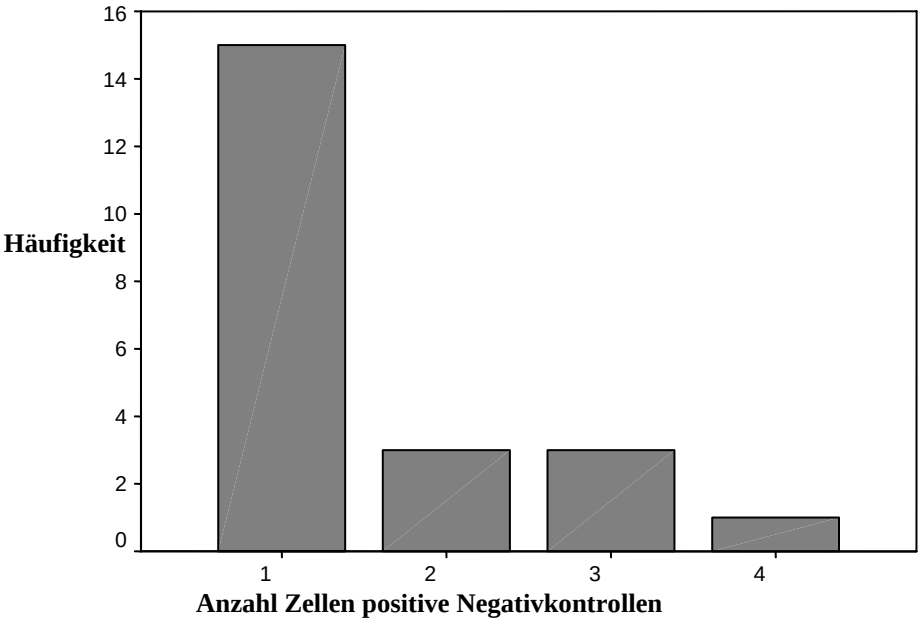
4.4.3.3 Negativkontrollen

Mittels des manuellen Mikroskops wurde in keiner Negativkontrolle eine Tumorzelle detektiert, im automatisierten Screening wurden hingegen auf 22 Negativkontrollen Tumorzellen entdeckt. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p<0,01$, McNemar's Test). Die Spannweite der Zellzahl in den positiven Negativkontrollen reichte von einer Zelle bis zu vier Zellen.

Tabelle 24: Anzahl der Zellen bei den positiven Negativkontrollen

Zellenanzahl	Häufigkeit	Prozent
1	15	68,2
2	3	13,6
3	3	13,6
4	1	4,5
Gesamt	22	100,0

Abbildung 23: Anzahl der Zellen bei den positiven Negativkontrollen



5 DISKUSSION

Eine der wichtigsten Fragen, die sich im Rahmen einer Mammakarzinom-Erkrankung stellt, ist die nach dem zu erwartenden Verlauf und nach der Prognose der Patientin. Dabei ist es für den Verlauf der Erkrankung v.a. ausschlaggebend, ob Metastasen auftreten oder nicht. Die Abschätzung dieses Risikos erfolgte bisher mit Hilfe der so genannten „klassischen" Prognosefaktoren, wie z.B. dem TNM-Status, dem Grading und der Beurteilung der Hormonrezeptoren. Verantwortlich für eine Metastasierung kann aber eine frühzeitige, d.h. oft schon vor dem Zeitpunkt der Primärdiagnose bestehende Tumorzelldissemination in verschiedene Organe des Körpers, z.B. in die Lymphknoten und das Knochenmark, sein (Redding *et al*, 1983). Mit Hilfe des immunzytochemischen Nachweises dieser frühzeitig disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gibt es die Möglichkeit, eine zusätzliche Prognoseabschätzung vorzunehmen und somit möglicherweise Risikopatientinnen zu identifizieren und adäquat behandeln zu können.

Da die Nachfrage nach Methoden zur Untersuchung von Knochenmarksproben, um den Verlauf von malignen Erkrankungen zu diagnostizieren und zu verfolgen, stetig wächst, ist die Notwendigkeit gegeben, die Methode so optimal wie möglich zu modifizieren, um sie für den klinischen Alltag kompatibel zu machen. Die Untersuchung der Knochenmarksproben mittels Immunzytochemie stellt sich bedingt durch die zahlreichen Arbeitsschritte vom Färben bis zur Klassifizierung der Zellen als sehr zeit- und arbeitsintensiv dar. Ein weiteres Problem stellt die sehr geringe Zahl an Tumorzellen innerhalb einer hohen Anzahl von Knochenmarkszellen in einer Knochenmarksprobe dar, was die Gefahr des Übersehens einer Tumorzelle und somit eines falsch-negativen Ergebnisses beinhaltet (sampling error). Desweiteren könnte ein automatisiertes System dazu beitragen, die Reproduzierbarkeit des manuellen Mikroskopscreenings zur verbessern und einen Beitrag zur weiteren Standardisierung der Detektionsmethode zu leisten. Mit der vorliegenden Arbeit konnte

gezeigt werden, dass mit Hilfe des Einsatzes eines automatisierten Mikroskops die Detektionsrate für isolierte Tumorzellen im Knochenmark und somit die Sensitivität der Methode signifikant gesteigert werden konnte. So konnte eine Inzidenzsteigerung von positiven Knochenmarksbefunden von 15,7% auf 36,1% erreicht werden. Auch bei der Anzahl der detektierten isolierten Tumorzellen ließ sich eine Steigerung beobachten: der Mittelwert ohne Berücksichtigung der Nullwerte lag für das MDS bei 4,43 Zellen, für das manuelle Mikroskop bei 3,33 Zellen.

Eine weitere Verbesserung ergibt sich zudem aus der Verminderung des Arbeitsaufwandes sowie der Möglichkeit für eine gesteigerte Standardisierung der Methodik.

5.1 *Auswahl von Material und Methoden*

5.1.1 Material

5.1.1.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Die Knochenmarksuntersuchung erfolgte an einem Kollektiv von 249 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vor Beginn der Primärtherapie. Patientinnen, bei denen eine primäre Metastasierung oder ein Zweitmalignom vorlag, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Der TNM-Status der Patientinnen beinhaltete T1-T4, N0-N2 und M0. Das Grading, mit dem die Erkrankung der einzelnen Patientin eingeschätzt wurde, reichte von G1-G3. Das Patientenkollektiv bestand aus sowohl prä-, wie auch postmenopausalen Patientinnen. Diese Daten sind daher als repräsentativ für die Situation bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom zu betrachten.

5.1.1.2 Material

In der vorliegenden Studie wurde als Untersuchungsmaterial das Knochenmark gewählt, da es sich einerseits aufgrund des speziell beim Mammakarzinom häufigen Vorkommens von Metastasen im Knochenmark (Kamby *et al*, 1987; Singletary *et al*, 1991) als

Untersuchungsgewebe anbietet, andererseits handelt es sich beim Knochenmark um ein mesenchymales Gewebe, welches sich aufgrund seiner Merkmale deutlich vom epithelialen Gewebe des Mammkarzinoms unterscheidet. So werden sowohl von den ursprünglichen epithelialen Zellen als auch von den maligne veränderten Zellen epithelialer Herkunft regelmäßig und reichlich Zytokeratine exprimiert, nicht jedoch von Zellen des mesenchymalen Gewebes des Knochenmarks (Weitz *et al*, 1999a; Janni *et al*, 2005a). Gewebsfremde epitheliale Tumorzellen können somit durch Antikörper gegen epitheliale Markerantigene von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterschieden werden.

Bezüglich des geeignetesten Materials zur Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen wurden im Rahmen von zahlreichen Studien verschiedene Gewebe untersucht. De Mascarel et al untersuchten die axillären Lymphknoten von Patientinnen mit invasiv duktalen und invasiv lobulären Mammakarzinom. Sie konnten jedoch bei keiner der beiden Gruppen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Gesamtüberlebenszeit und dem Auffinden von immunzytochemisch positiv gefärbten Zellen in den Lymphknoten feststellen (De, I *et al*, 1992). Diese Aussage unterstützen auch die neuesten Studien zu diesem Thema von Chagpar et al und Kahn et al (Chagpar *et al*, 2005; Kahn *et al*, 2006). Insgesamt ist die Aussagekraft von isolierten Tumorzellen in axillären Lymphknoten jedoch umstritten, da auch Daten existieren, die darauf schließen lassen, dass ein Zusammenhang zu einem erhöhten Risiko eines Rückfalls oder einer verringerten Gesamtüberlebenszeit besteht (Cserni *et al*, 2006; Kahn *et al*, 2006; Mullenix *et al*, 2005; Umekita *et al*, 2002).

Eine weitere Arbeitsgruppe verglich die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung von Knochenmark, Leber und Lymphknoten und stellte dabei fest, dass nur bei den Ergebnissen im Knochenmark eine deutliche Sensitivitätssteigerung im Vergleich zur einfachen Histologie ereicht werden konnte (Sloane *et al*, 1980). Das Knochenmark hielt auch dem Vergleich zum Blut stand: Ross et al. fanden in einer vergleichenden Studie heraus, dass im Knochenmark ein höherer Prozentsatz an Tumorzellen gefunden werden konnte (Ross *et al*, 1993). Dies

erklärt sich aufgrund der Tatsache, dass der hämatogene Metastasierungsweg über das Knochenmark führt und dies wohl der entscheidende Bezug auf die Fernmetastasierung ist.

Des weiteren spricht für Knochenmark als geeignetes Untersuchungsmaterial, dass inzwischen die prognostische Bedeutung für das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen wurde. In zahlreichen Studien hat sich gezeigt, dass bei soliden Tumoren wie dem Mammakarzinom (Janni *et al*, 2001) der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark einen prädiktiven Wert bezüglich des weiteren Verlaufs der Erkrankung besitzt.

5.1.2 Methodik

5.1.2.1 Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Da Tumorzellen nur in sehr geringer Anzahl im Knochenmark zu erwarten sind, muss eine äußerst hohe Sensitivität der Untersuchungsmethode gefordert werden. Für die Untersuchung des Knochenmarks stehen v.a. zwei Methoden zur Diskussion: die Immunzytochemie und molekularbiologische Methoden.

Die Arbeitsgruppe dieser Studie hat zur Analyse von Knochenmarksproben die Immunzytochemie ausgewählt. Sie gilt z.Z. als die Standardmethode zum Nachweis einer okkulten Frühdisseminierung solider Tumorzellen (Pantel *et al*, 1997; Fehm *et al*, 2006), nachdem sie in den letzten 15 Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt und in Bezug auf ihre klinische Relevanz validiert worden ist (Janni *et al*, 2005a).

Heute liegt die Sensitivität der immunzytochemischen Methode bei $1x10^5$ bis 10^6 Zellen (Weitz et al, 1999a). Ihr Vorteil liegt darin, dass mit ihrer Hilfe Tumorzellen mikroskopisch identifizierbar und beurteilbar gemacht werden. Nachteile sind falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindungen und Farbstoffablagerungen (Wormann *et al*, 1997). Die Detektionsrate ist immer noch beeinflusst von Blut-Kontaminationen des Knochenmarks, der Anzahl der analysierten Aspirationen und der Anzahl der mononukleären

Knochenmarkszellen, die pro Aspiration beurteilt werden. Ein weiteres Problem stellt die sehr labor- und arbeitsintensive Verarbeitung des Knochenmarks dar. Um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, muss ein hohes Zellvolumen analysiert werden, wobei einige Autoren darauf hinweisen, dass der Zellverlust der Methode nicht genug beachtet wird, der durch die vielen verschiedenen labortechnischen Arbeitsschritte entsteht. Des weiteren wurde bisher beim Mammakarzinom kein Antikörper entwickelt, der 100% tumor- und gewebsspezifisch ist. Diesem Problem kann man aber mit Hilfe von Antikörper-Kombinationen und Antikörper gegen verschiedene Epitope entgegenwirken (Goeminne *et al*, 2000).

Die Sensitivität der molekularbiologischen Methode liegt bei einer Tumorzelle in 10^5 bis 10^7 mononukleären Zellen (Ghossein *et al*, 1995; Baker *et al*, 2003; Berois *et al*, 2003; Muller & Schlimok, 2000; Ozbas *et al*, 2003; Pantel & von Knebel, 2000; Weitz *et al*, 1999a; Wormann *et al*, 1997; Zhong *et al*, 1999; Gerhard *et al*, 1994). Allerdings ist die in den letzten Jahren vermehrt zum Einsatz kommende PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bisher so aufwendig, dass sie für den Einsatz in der Routinediagnostik nicht geeignet ist. Dies hängt damit zusammen, dass solide Tumore eine ausgeprägte genetische Heterogenität aufweisen, und dadurch ein erheblicher technischer Aufwand notwendig ist, um tumorspezifische genomische Veränderungen auf Einzelzellebene nachzuweisen (Pantel *et al*, 1997). Der Nachweis tumorspezifischer exprimierter mRNA-Species erscheint dagegen für eine breitere Anwendung der PCR-Methodik weniger problematisch zu sein. Dieser Ansatz besitzt für eine zukünftige klinische Anwendung mit Sicherheit ein großes Potenzial, die Spezifität der Methode scheint aber momentan ein großes Problem darzustellen. Da als Ausgangsmaterial in einem PCR-Reaktionsgefäß neben der mRNA der wenigen Tumorzellen auch die mRNA der im Überschuss vorhandenen hämatopoetischen Zellen vorliegt, kann selbst bei einer geringfügigen Expression der entsprechenden Marker-mRNA in diesen hämatopoetischen Zellen ein falsch-positives Resultat entstehen (Pantel *et al*, 1997). Dieses

Problem kann umgangen werden, indem die sog. Einzelzell-PCR angewendet wird, bei der die Zelle per Mikrodissektion vom Objektträger entfernt und untersucht wird. Obwohl bisher eine Reihe von RT-PCR-Assays zum Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark entwickelt worden sind, existiert eine Reihe von Berichten, die die Spezifität dieser Ansätze in Frage stellen (Krismann *et al*, 1995; Zippelius *et al*, 1997).

Vorteil der Methode der PCR gegenüber der Immunzytochemie ist die Möglichkeit des direkten Nachweises von potenziell kausalen genetischen Alterationen. Nachteile der PCR sind die Schwierigkeiten in der Quantifizierung (Baker *et al*, 2003; Pantel & Otte, 2001; Weitz *et al*, 1999a; Wormann *et al*, 1997), die im Gegensatz zur Immunzytochemischen Methode keine morphologische Beurteilbarkeit der nachgewiesenen Tumorzellen gewährleistet (Weitz *et al*, 1999a; Wormann *et al*, 1997) und auch keine Aussage über die Menge der zirkulierenden Zellen zulässt (Goeminne *et al*, 2000), nur eine semiquantitative Erfassung ist möglich. Die Sensitivität der beiden Methoden ist durchaus vergleichbar. Allerdings fällt mit der wachsenden Sensitivität die Spezifität (Muller & Schlimok, 2000), d.h. dass eine hohe Sensitivität gegeben ist, wenn es sich um unspezifische Marker handelt (Braun *et al*, 2003). In vielen Untersuchungen ist dieses Problem der unspezifischen Marker aufgefallen (Berois *et al*, 2003; Bossolasco *et al*, 2002; Ozbas *et al*, 2003; Pantel *et al*, 1999; Pantel & Otte, 2001). Aber auch andere Faktoren haben einen Verlust der Spezifität der molekularbiologischen Methode zur Folge: Ein großes Problem stellt die Kontaminierung der DNA dar. Um eine Ausbreitung des DNA-Amplifikationsprodukts zu vermeiden, müssen rigorose Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Dies beinhaltet getrennte Räume für jeden RT-PCR-Schritt, Anti-Aerosol-Hauben und die regelmäßige Dekontaminierung der Arbeitsflächen (Goeminne *et al*, 2000). Weitere Gründe für das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen im Rahmen der molekularbiologischen Methode ist die Anwesenheit von Pseudogenen und die Expression von tumor-assoziierten oder epithelial-spezifischer Gene (Baker *et al*, 2003; Muller & Schlimok, 2000; Ozbas *et al*, 2003; Pantel *et al*, 1997;

Pantel *et al*, 1999 ;Pantel & von Knebel, 2000; Pantel & Otte, 2001; Weitz *et al*, 1999a). Verschiedene Zytokratine, CEA und Tyrosinase werden auch in der Epidermis exprimiert. Das Risiko eines falsch-positiven Ergebnisses kann enorm gesenkt werden, wenn man die Kontamination durch Hautzellen vermeidet, indem man die ersten Milliliter des Aspirats verwirft (Goeminne *et al*, 2000). Auch beweist das Auffinden von DNA-Mutationen nicht notwendigerweise die Anwesenheit von zirkulierenden Tumorzellen, da freie DNA im Serum oder den Lymphknoten gefunden werden kann (Goeminne *et al*, 2000).

Der Einsatz der RT-PCR beinhaltet ein weiteres Problem, da RNA sehr fragil ist und nur in lebenden Zellen enthalten ist. Dies hat zur Folge, dass die Proben sofort nach der Probenentnahme verarbeitet werden müssen, was sich als sehr unpraktisch für den klinischen Alltag erwiesen hat und eine Versendung an zentrale Laboratorien erschwert (Goeminne *et al*, 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die PCR eine sehr sensitive Methode darstellt, die jedoch derzeit durch den enormen Zeit- und Arbeitsaufwand den Rahmen einer Routinediagnostik sprengt, und somit der Immunzytochemie unterlegen ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der wiederum für den Einsatz der Immunzytochemie und gegen die molekularbiologische Methode spricht, ist die Einführung einer Standardisierung der Methode. 1996 wurde die European ISHAGE Arbeitsgruppe mit dem Ziel gegründet, den immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen zu standardisieren und zu optimieren. Mit Hilfe von interlaboriellen Vergleichen der Nachweistechniken wurden objektive Kriterien für die Evaluation von immunzytochemisch identifizierbaren Krebszellen festgelegt (Borgen *et al*, 1999).

Des weiteren ist eine prognostische Relevanz hinsichtlich des weiteren Verlaufs der Erkrankung bisher nur für Studien, die mit immunzytochemischen Methoden arbeiten, belegt (Braun *et al*, 2005).

Nicht zuletzt aufgrund dieser Kriterien ist die immunzytochemische Methode als Methode der Wahl anzusehen.

5.1.2.2 Auswahl des Antikörpers

Ein sehr wichtiger Aspekt bei einem immunzytochemischen Untersuchungsansatz stellt die Auswahl des geeigneten Antikörpers dar. Dabei kommt es neben der geforderten Sensitivität auch auf eine hohe Spezifität des Antikörpers an. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, sind im mesenchymalen Gewebe des Knochenmarks unter normalen Umständen keine epithelialen Zellen zu finden. Zu den epithelialen Zellen gehören u.a. Zellen des Brustdrüsengewebes und epithelialer Karzinome (Cordell *et al*, 1985; Dearnaley *et al*, 1981; Redding *et al*, 1983; Schlimok & Riethmuller, 1990). Diese epithelialen Zellen exprimieren entweder in der Zellmembran oder im Zytoplasma bestimmte Antigene, die den Ansatzpunkt für die Antikörper der immunzytochemischen Nachweismethode darstellen.

Die Antigene der Zellmembran (z.B. epithelial membran antigen) sind hochmolekulare Glykoproteine, die in der Mammakarzinomzelle sowohl in der Zellmembran, wie auch im Zytoplasma zu finden sind. Es hat sich allerdings herausgestellt, dass einige Antigenmarker, wie z.B. epitheliale Membranantigene oder Mucin-I nicht geeignet sind, da die Expression der mucin-ähnlichen Membranproteine durch hämatopoetische Stammzellen (Pantel & von Knebel, 2000; Pantel *et al*, 1994; Schlimok *et al*, 1987) zu einer Positivfärbung von 2-10% der mesenchymalen mononukleären Zellen von tumorfreien Probanden führen (Brugger *et al*, 1999) kann, und somit die angestrebte Spezifität nicht erreicht wird. Es ist auch nicht gesichert, dass diese Antigene von undifferenzierten Tumoren exprimiert werden (Mansi *et al*, 1999).

Die sich im Zytoplasma befindenden Antigene werden von den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts exprimiert. Aufgrund der spezifischen Proteinstruktur der einzelnen Gewebe lassen sich verschiedene Gewebetypen unterscheiden: Beim Epithelgewebe finden sich

Zytokeratine, beim Muskelgewebe Desmin, im Mesenchym Vimentin und im Nervengewebe Neurofilamente. Das in Frage kommende Antigen für die vorliegende Studie stellt also das Zytokeratin dar. Es ist bekannt, dass die Expression der mehr als 20 unterschiedlichen Zytokeratinisomere einer komplexen Regulation unterliegt. In der Mehrzahl jener Studien, bei denen Anti-Zytokeratin-Antikörper verwendet wurden, kamen monoklonale Antikörper gegen das Cytokeratinisomer 18 zum Einsatz.(Jauch *et al*, 1996; Schlimok *et al*, 1991; Pantel *et al*, 1993a; Lindemann *et al*, 1992) und auch für das Brustdrüsengewebe bieten sich v.a. die Zytokeratine CK18 und 19 an. Die Ausprägung dieser Zytokeratine bleibt laut unterschiedlicher Studien (Altmannsberger *et al*, 1984; Moll *et al*, 1982) auch während der Tumorgenese konstant und selbst Metastasen behalten das ursprüngliche Zytokeratin-Muster bei.

Um Tumorzellen, die eine große Heterogenität aufweisen, noch spezifischer identifizieren zu können, kann eine Kombination verschiedener Antikörper oder Antikörper, die gegen verschiedene Zytokeratin-Antigene gerichtet sind, benutzt werden (Pantel *et al*, 1999). Auch der in der vorliegenden Untersuchung verwendete anti-zytokeratine Antikörper A45-B/B3 (Stigbrand *et al*, 1998) ist gegen ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 gerichtet (Pantel *et al*, 1994). Durch diese Antikörper A45-B/B3-Färbung konnte in Kombination mit der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik die Sensitivität gegenüber einer Färbung mit Immunperoxidase-Techniken erhöht werden (Pantel *et al*, 1994). In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass die Zytokeratin-Antikörper-Untersuchung der Muzin-Antikörper-Untersuchung überlegen ist. Ein weiterer Grund, welcher für die Verwendung eines Antikörpers spricht, der gegen verschiedene Zytokeratin-Antigene gerichtet ist, ist die Tatsache, dass durch häufige Down-Regulation des Zytokeratinisomers 18 in Tumorzellen die Sensitivität der Nachweismethode beeinträchtigt sein kann (Pantel *et al*, 1994). Der Einsatz der Antikörper-A45-B/B3-Färbung

hat in der Vergangenheit eine Spezifität von ca. 98% unter Beweis gestellt (Braun *et al*, 2000b).

5.2 *Diskussion der Ergebnisse des Mikroskopscreenings*

Ziel dieser Arbeit ist es, zu überprüfen, ob mit Hilfe eines automatisierten Mikroskopscreenings die Sensitivität der immunzytochemischen Knochenmarksbeurteilung verbessert werden kann. Dabei wurden sowohl die Inzidenz von positiven Färbeereignissen, als auch die genaue Tumorzellanzahl und die Qualität der Negativkontrollen im Vergleich zum bisher üblichen manuellen Mikroskopscreening untersucht.

5.2.1 Inzidenz

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Hypothese, dass durch den Einsatz des automatisierten Mikroskops die Inzidenz, mit der disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom gefunden werden, gesteigert werden kann. So kann durch den Einsatz des MDS^{TM}-Systems in 36,1% der Fälle eine oder mehrere Tumorzellen entdeckt werden. Demgegenüber steht das Ergebnis des manuellen Mikroskopscreenings, bei dem nur in 16% der Fälle ein positives Färbeereignis detektiert werden konnte. Dies bedeutet eine signifikante Steigerung der Inzidenz auf das 2,3fache. Dieses Ergebnis liegt bezüglich der Steigerung der detektierten Inzidenzen im Bereich dessen, was bisher zum Thema publiziert wurde und bestätigt das Ergebnis von Borgen et al (Borgen *et al*, 2001). In der genannten Studie wird mit dem gleichen MDS^{TM}-System 120 Knochenmarkspräparate untersucht. Die analysierten Zytospinns enthielten Knochenmarksproben von Mammakarzinompatientinnen mit und ohne Nachweis von metastatischen Tumorzellen. Die Slides wurden von zwei Pathologen zuerst manuell in ihrem eigenen Laboren begutachtet, und anschließend zweimal mit dem MDS^{TM}-System gescannt, einmal für jeden der beiden Gutachter. Die Konkordanz zwischen manuellem und automatisierten Screening wird für jeden Pathologen protokolliert. Hierbei fielen große

interpathologische Variationen beim manuellen Screening auf. So wurden vom 1. Gutachter alle 26 positiven Zytospinns erkannt, Gutachter 2 ordnete hingegen nur 6 von 26 positiven Zytospinns richtig ein. Im automatisierten Screening hingegen kamen beide Gutachter zu einem übereinstimmenden Ergebnis von jeweils 25 Zytospinns, die als positiv eingestuft wurden. Jeweils ein Zytospinn wurde fälschlicherweise als negativ bewertet. Bei Gutachter 1 war dies darauf zurückzuführen, dass die betreffende Zelle außerhalb des Scannbereichs lag. Bei Gutachter 2 lag das Problem darin, dass die betreffende positive Zelle zwar vom MDS^{TM}-System registriert und in der „picture-gallery“ präsentiert wurde, aber während der Begutachtung übersehen wurde. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der beiden Pathologen zusammengenommen, dass mittels des automatisierten Mikroskops 50 von möglichen 52 positiven Proben identifiziert werden konnten, wohingegen nur 32 von 52 mittels des manuellen Mikroskops identifiziert wurden. Dies bedeutet eine Inzidenzsteigerung auf das 1,9fache. Der Unterschied zum Versuchsaufbau unserer Studie liegt erstens in der um mehr als doppelt so hohen Fallzahl unserer Studie und vor allem darin, dass in der vorliegenden Studie die Anzahl der positiven Fälle unbekannt war, jedoch wurde in unserer Studie keine Rücksicht auf interpathologische Differenzen genommen. Desweiteren wurde im Gegensatz zu unserer Studie in keiner der zitierten Studien die genaue Anzahl der gefundenen Tumorzellen eruiert.

Auch die Studie von Bauer et al (Bauer *et al*, 2000) kommt zu einem ähnlichen Ergebnis wie die vorliegende Studie. Bei einer relativ geringen Fallzahl von n=39 konnte eine Inzidenzsteigerung von 30,77% auf 66,67% (2,16fach) beobachtet werden. Hierbei wurden die Knochenmarksproben wiederum von zwei unabhängigen Gutachtern erst durch ein manuelles Mikroskop und anschließend durch ein automatisiertes Mikroskop (ACIS) beurteilt. Die Knochenmarksproben der beiden genannten Studien von Borgen et al und Bauer et al stammten von Mammakarzinom-Patientinnen, deren genaues Krankheitsstadium unbekannt ist. Deshalb ist eine Wertung bezüglich der genauen Inzidenzzahl unergiebig. Eine

weitere Studie, deren Ergebnis mit denen der vorliegenden Untersuchung übereinstimmt ist die Arbeit von Weaver et al (Weaver *et al*, 2003). Allerdings wurden in dieser Arbeit anstelle von Knochenmarkspräparaten Lymphknoten immunzytochemisch untersucht. Einbezogen in die Untersuchung wurden die zytokeratin-gefärbten Slides von Sentinel-Lymphknoten von 100 Brustkrebspatientinnen. Die ausgewählten Slides waren bereits mit einem manuellen Licht-Mikroskop befundet worden. Es wurden 20 positiv bewertete Slides und 80 negativ bewertete Slides ausgewählt. Diese wurden mit einem automatisieren Computer assistierten Zell-Detektionssystem erneut untersucht. 3 Slides mussten aufgrund technischer Probleme aus der Untersuchung ausgeschlossen werden. Das automatisierte Mikroskop erbrachte in 19 der 20 positiven Fälle ebenfalls ein positives Ergebnis. Die isolierte Tumorzelle, welche mit dem automatisierten Mikroskop übersehen wurde, lag außerhalb des festgelegten Scann-Feldes. Zusätzlich wurden mittels des automatisierten Systems in 8 Fällen positive Ereignisse detektiert. Es wurde im Vergleich zum manuellen Screening also eine Inzidenzsteigerung um 10,4% beobachtet. Diese Studie bestätigt aufgrund der Fragestellung die Tendenz, dass die Sensitivität der immunzytochemischen Nachweismethode von disseminierten Tumorzellen mittels eines automatisierten Mikroskopscreeenings verbessert werden kann. Eine weitere Studie, bei der sich diese Tendenz auch beobachten lässt, ist die von Hilbe et al (Hilbe *et al*, 2003). Auch diese eignet sich nicht zum direkten Vergleich, weil das Untersuchungsmaterial in diesem Fall Lungengewebe von Lungenkarzinompatienten darstellt. Hierbei wurde Lungengewebe von 52 Patienten, die an kleinzelligen Lungenkarzinom litten, analysiert. Das Lungengewebe wurde mit monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die angefertigten Slides wurden daraufhin mit einem manuellen und mit einem automatisierten Mikroskop (ACIS) beurteilt. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungen korrelierten signifikant miteinander ($p < 0{,}001$). Der Vergleich der Ergebnisse von manuellem und automatisiertem Mikroskop zeigen eine Steigerung der Inzidenz um 6,8% bei Einsatz des automatisierten Mikroskops. Das automatisierte Mikroskop zeigte somit eine höhere Sensitivität als das manuelle Mikroskop.

Die Ergebnisse der aufgeführten Studien widersprechen den Ergebnissen der frühen Studien zum Thema, die zu Beginn der Entwicklung automatisierter Mikroskope durchgeführt wurden. In diesen Studien brachte der Einsatz von automatisierten Mikroskopen keine Steigerung der Inzidenz, wobei es entweder keinen Unterschied zwischen manuellem und automatisierten Screenig bezüglich der Inzidenz zu verzeichnen gab (Mansi *et al*, 1988; Mesker *et al*, 1994; Makarawicz *et al*, 1997), oder sogar mittels des automatisierten Mikroskop seltener positive Ereignisse zu beobachten waren (Mansi *et al*, 1988). Es ist anzunehmen, dass die Tatsache, dass in den frühen Studien die Sensitivität der immunzytochemischen Methode mit Hilfe eines automatisierten Mikroskop nicht gesteigert werden konnte, damit zusammen hängt, dass zwischen 1980 und 1999 der Stand der Technik noch nicht so weit entwickelt war wie heute. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Studien mit einer Sensitivitätssteigerung bezüglich der Fragestellung aus den Jahren 2000-2003 stammen (Bauer *et al*, 2000; Borgen *et al*, 2001; Hilbe *et al*, 2003; Weaver *et al*, 2003).

5.2.2 Tumorzellenanzahl

Auch die Hypothese, dass mit Hilfe des automatisierten Mikroskopscreenings eine höhere Tumorzellanzahl detektiert werden kann als mit dem manuellen Mikroskop, wird durch die vorliegende Studie unterstützt. So konnten mittels des MDS^{TM}-Systems im Durchschnitt bei jeder Patientin, bei der sich Tumorzellen nachweisen ließen, 4,41 Zellen identifizieren. Im Vergleich dazu detektierten die Befunder mittels dem manuellem Mikroskop nur 3,3 Zellen pro positiven Fall. Auch die Spannweite, innerhalb der die Tumorzellzahl lag, konnte mittels des automatisierten Gerätes stark erweitert werden. So fanden sich in der vorliegenden Studie bis zu 63 positive Zellen mittels automatisierten Vorgehens bei einer Patientin, wohingegen die höchste Anzahl beim manuellen Screening bei 21 Zellen lag. Die Studie von Borgen et al. unterstützt die Hypothese, dass die Detektion der Zellanzahl gesteigert werden kann. Die

Zellzahl lag in einer ihrer Untersuchungen der Studie beim manuellem Mikroskop bei 545 Zellen, beim automatisierten Mikroskop bei 615 Zellen. Bei den 20 untersuchten tumorzellhaltigen Objektträgern kann in 13 Fällen mehr Zellen als mit dem manuellen Mikroskop detektiert werden, und in sechs Fällen die gleiche Anzahl (Borgen *et al*, 2001). Leider ist auch hier kein direkter Vergleich mit der vorliegenden Studie möglich, weil die Objektträger der Untersuchung von Borgen et al. mit Tumorzellen aus Tumorzelllinien präpariert waren. Tumorzelllinien sind leichter zu befunden, da sie weniger fragliche Zellen enthalten.

So lässt sich aus den beiden Untersuchungen der gleiche Trend ablesen, allerdings ist der Vorteil der vorliegenden Studie der, dass der Studienaufbau stark am klinischen Verlauf orientiert ist, und somit der Nutzen eines automatisierten Mikroskopscreenings für den klinischen Alltag gut eingeschätzt werden kann. Die übrigen Studien zum Thema machen keine Aussage zur genauen Tumorzellanzahl (Bauer *et al*, 2000; Hilbe *et al*, 2003; Makarawicz *et al*, 1997; Mansi *et al*, 1988; Pierga *et al*, 2004; Weaver *et al*, 2003).

Es bleibt in zukünftigen Studien zu klären, ob nicht nur die Anwesenheit von Tumorzellen, sondern auch deren Anzahl klinisch relevant sein könnte. Eine Tendenz lässt sich hierbei vermuten, da die Anzahl der detektierten Zellen mit dem Tumorstadium ansteigt. So finden Braun et al im Durchschnitt bei Patientinnen im Stadium I fünf disseminierte Tumorzellen, im Stadium II neun und im Stadium III 86 disseminierte Tumorzellen pro $2x10^6$ Knochenmarkszellen (Braun *et al*, 2000b).

Ein anderer Aspekt bezüglich der Tumorzellanzahl ist der, ob der Einsatz eines automatisierten Mikroskops eine bessere Reproduzierbarkeit als ein manuelles Vorgehen aufweist. Dieser Punkt wurde von der Arbeitsgruppe um Borgen et al. mit dem gleichen automatisierten Mikroskop (MDS^{TM}) wie in der vorliegenden Studie untersucht. Es wurden innerhalb von drei Tagen drei repräsentative Objektträger an drei automatisierten Geräten eingescannt und von zwei Befundern untersucht. Hierbei wurden die exakt detektierten

Tumorzellanzahlen verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die Anzahl an Zellen die bei jedem Scandurchgang gefunden wurden, entweder gar nicht oder nur sehr geringfügig variieren (Borgen *et al*, 2001). Auch Bauer et al untersuchen mit Hilfe der Tumorzellanzahl die Reproduzierbarkeit mittels eines automatisierten Mikroskops (ACIS; ChromaVision Medical Systems Inc.). Hierbei wurden 2 Objektträger 15 mal separat analysiert mit dem Ergebnis, dass bei beiden Präparaten in jeder Untersuchung die exakt gleiche Tumorzellanzahl detektiert wurde (Bauer *et al*, 2000). Diese Studien weisen auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der automatisierten Detektionsmethode hin. Deshalb wurde die Untersuchung auf die Verbesserung der Reproduzierbarkeit im Rahmen der vorliegenden Studie nicht erneut durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die einzelnen Tumorzellen, der für den Einsatz eines automatisierten Mikroskopscreenings spricht, ist, dass die Ergebnisse besser archiviert werden können. So können die Bilder der einzelnen Tumorzellen in einer Bildergalerie gespeichert werden und sind somit jederzeit abrufbar. Dies bedeutet, dass der Untersucher die gefundenen Ereignisse in Hinblick auf die Morphologie der einzelnen Tumorzellen bei einem Patienten oder die verschiedenen Karzinom Typen von verschiedenen Patienten vergleichen kann. Die Bildergalerie kann somit ein wertvolles Werkzeug darstellen für die Standardisierung der diagnostischen Entscheidungen und für die Qualitätskontrolle für inter- und intralaborielle Studien.

5.2.3 Vergleich der Screeningmethoden

Ein weiterer Punkt den es im Rahmen der Fragestellung zu überprüfen galt, ist der, ob das automatisierte System alle positiv gefärbten Tumorzellen registriert, oder ob auch trotz der automatisierten Unterstützung Zellen nicht detektiert werden. In der vorliegenden Studie

wurden 4 positive Ereignisse durch das automatisierte Screeningsystem übersehen, d.h. in 1,6% der Fälle wird mit dem manuellen Mikroskop ein positives Ergebnis beobachtet, welches dem automatisierten Screening entging. In einem Fall ist dieser Fehler wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass der Zustand des Präparats sehr schlecht war. Durch ein erneutes Scannen der genannten vier Präparate wurde versucht, dem Fehler auf den Grund zu gehen. Dabei stellte sich heraus, dass drei der vier Präparate vollständig verblasst waren, so dass das MDS-System überhaupt keine Zelle registrieren konnte. Beim vierten Präparat wurde die Zelle zwar mittels des automatisierten Mikroskops detektiert, jedoch vom Befunder als negativ bewertet. Die Verblassung der Präparate ist darauf hinauszuführen, dass zwischen dem Färben der Präparate und dem 2. Scannvorgang mit dem MDS-System bis zu sechs Jahre liegen.

Als Erklärung für das Nichtauffinden von Zellen gibt es weitere potenzielle Möglichkeiten. Erstens ist es möglich, dass das Scannfeld so eingestellt wurde, dass sich die angefärbte Zelle außerhalb dieses Feldes befindet und so nicht vom MDS^{TM}-System registriert werden konnte. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Parameter, mit denen das automatisierte System nach angefärbten Zellen sucht, nicht sensitiv genug eingestellt ist. Allerdings wäre diese Erklärung für die vorliegenden Studie sehr unwahrscheinlich, da die Parameter so eingestellt wurden, dass einen hohe Sensitivität gegeben ist, um alle disseminierte Tumorzellen aufzufinden. Und schließlich kann auch beim automatisierten System immer der menschliche Fehler auftreten und eine Zelle bei der Befundung übersehen werden, insbesondere, wenn sehr sensitive Einstellungen in einer relative hohen Anzahl zu befundender Ereignisse resultieren.

Auch in anderen Studien zeigte sich, dass das automatisierte Vorgehen keine Garantie dafür ist, dass wirklich alle positiven Ereignisse aufgespürt werden. So übersahen die Gutachter in der Studie von Borgen et al. 2 positive Ereignisse. Einmal war dies darauf zurück zu führen, dass sich die entsprechende Zelle außerhalb des eingescannten Feldes befand. Im zweiten Fall befand sich die Zelle in der Bildergallerie des automatisierten System, wurde also vom

Mikroskop erfasst. Allerdings wurde sie dann während der Phase der Befundung übersehen (Borgen *et al*, 2001). Auch in der Studie von Bauer et al. konnte das automatisierte System nicht alle positiven Ergebnisse des manuellen Screenings bestätigen. Dies war bei drei Objektträgern der Fall. Allerdings stellte sich bei einer zusätzlichen Untersuchung dieser Präparate dann heraus, dass keine der manuell gefundenen Zellen wirklich eine Tumorzelle war. Die Arbeitsgruppe schloss daraus, das solche falsch-positive Ereignisse mit einem automatisierten System nicht auftreten (Bauer *et al*, 2000). Weaver et al führen das Übersehen von Tumorzellen in einem Fall auch darauf zurück, dass die Zellen außerhalb des eingescannten Feldes lagen (Weaver *et al*, 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden und der genannten Studien lassen darauf schließen, dass mit Hilfe eines automatisierten Mikroskopscreenings die Sensitivität der immunzytochemischen Detektion isolierter Tumorzellen zwar stark gesteigert werden kann, dieses System jedoch keine Garantie für ein fehlerloses Ergebnis darstellt.

5.2.4 Spezifität der Färbung

Der letzte Punkt der Fragestellung umfasst die Untersuchung nach der Spezifität der Färbung. Zur Klärung dieser Frage werden in der vorliegenden Studie für jeden untersuchten Fall eine Negativkontrolle hergestellt bei der anstatt dem CK-Antikörper A45/B/B3 das MOPC-21, ein IgG von Mäusen, eingesetzt wird. Da dieser Antikörper nicht mit epithelialen Antigenen reagiert, weist eine Farbreaktion auf eine unspezifische Anfärbung von Zellen hin.

Es stellte sich heraus, dass in 22 (8,8%) der mit dem automatisierten Mikroskop untersuchten Fällen die Negativkontrollen als positiv anzusehen waren, d.h. dass angefärbte Zellen in der Negativkontrolle zu finden waren. Die Spannweite bezüglich der Anzahl der gefärbten Zellen lag zwischen einer und vier Zellen. Diese Vorfälle wurden als unspezifische Färbung interpretiert. Interessant ist hierbei der Vergleich zum manuellen Screening. Beim manuellen Screening wurde keine der Negativkontrollen positiv befundet., obwohl alle

Negativkontrollen unabhängig vom positiven oder negativen Ergebnis analysiert wurden . Dies weist wiederum auf eine höhere Sensitivität des automatisierten Screenings hin. Andererseits könnte die Ursache auch einfach ein Präparatfehler sein, da das automatisierte Screening erst einige Zeit später als das manuelle Screening durchgeführt wurde und es zu einer Veränderung des Materials gekommen sein könnte.

Im Vergleich zu anderen Studien, die auch mit Hilfe der immunzytochemischen Färbung durchgeführt wurden, zeigt sich, dass die Ergebnisse zur Spezifität der Färbung stark variieren. So wird in Studien, die nur ein manuelles Screening durchgeführt haben, von falsch-positiven Ergebnissen von einem bis zu über 80% berichtet (Muller & Schlimok, 2000), allerdings wurden in den eingeschlossenen Studien nicht nur Brustkrebspatientinnen untersucht. Andere Studien berichten über eine falsch-positiv-Rate von 1-3 %, abhängig vom eingesetzten Antikörper (Weitz *et al*, 1999a).

In weiteren manuell durchgeführten Untersuchungen wurde zur Feststellung der Spezifität das Knochenmark von einem gesunden Kontrollkollektiv untersucht. Hierbei lag die Rate der positiven Befunde bei 1-3% (Braun & Pantel, 1999; Braun *et al*, 2001; Braun & Pantel, 2000; Braun *et al*, 2001; Braun *et al*, 2000b; Passlick *et al*, 2000). Es ist jedoch zu beachten, dass bei weitaus nicht allen Studien überhaupt eine Kontrolle der Spezifität durchgeführt wurde. In der Meta Analyse von Funke et al. stellte sich heraus, dass nur in 50% der Fälle eine Kontrolle der Spezifität mittels Untersuchung des Knochenmarks eines gesunden Kontrollkollektivs durchgeführt wurde. In der größten Kontrollgruppe wurden bei 215 Proben 6 falsch-positive Ergebnisse beschrieben, was einer Spezifität von 97,2% entspricht (Pantel *et al*, 1996). Bei den restlichen 9 Studien mit Kontrollgruppe wurde die Spezifität noch höher eingeschätzt, was jedoch auf die relativ kleine Anzahl an Kontrollfällen zurückzuführen ist und auch die Tatsache mitspielt, dass in 4 Studien als Kontrollgruppe eine Ausweitung früherer Studien diente und die Kontrollgruppe deshalb als nicht unabhängig anzusehen ist.

Bei einer der zwei Studien, die sowohl das automatisierte Screening als auch eine Kontrolle der Spezifität durchführte, schliessen die Verfasser auf eine 100% Spezifität. Bei 10 Kontrollpräparaten von einem gesunden Kontrollkollektiv fand sich in keinem ein positiv gefärbtes Ereignis (Bauer *et al*, 2000).

In den Studien, die wie die vorliegende ein automatisiertes Screeningsystem einsetzten, wurde nur in einem Fall eine vergleichbare Kontrolle der Spezifität durchgeführt. Die Falsch-Positiv-Rate aufgrund inkompletter Färbung in der Studie von Mansi et al lag bei 3,7% (Mansi *et al*, 1988).

Ein Grund für die relativ hohe Falsch-Positiv-Rate der vorliegenden Studie, die jedoch einem realistischen Wert entspricht, liegt wahrscheinlich darin, dass in der vorliegenden Studie die Sensitivität sehr hoch gewählt wurde.

6 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen, dass es mit dem automatisierten Mikroskop möglich ist, mit höherer Sensitivität disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen als mit dem parallelen manuellen Screenig.

Ein großer Vorteil des automatisierten Screenings liegt darin, dass dieses System ein Mittel bietet, das Laborscreening so zu verändern, dass bei der Untersuchung von Knochenmark in Hinblick auf disseminierte Tumorzellen, die Arbeitszeit des Pathologen stark reduziert wird. Damit ist der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark für die klinische Routine besser zugänglich.

Als weiterer Vorteil kann gelten, dass die Ergebnisse besser archiviert werden können. So können die Bilder der einzelnen isolierten Tumorzellen in einer Bildergalerie gespeichert werden und sind jederzeit für den Begutachter abrufbar. Der Untersucher kann die gefundenen Ereignisse in Hinblick auf die Morphologie der einzelnen Tumorzellen bei einem Patienten oder die verschiedenen Karzinom Typen von verschiedenen Patienten vergleichen. Desweiteren kann die Bildergalerie ein wertvolles Werkzeug für die Standardisierung der diagnostischen Entscheidungen und für die Qualitätskontrolle im Rahmen von zukünftigen inter- und intralaborielle Studien darstellen.

Im Gegensatz zum Screening mit einem manuellen Mikroskop ist bisher für das automatisierte Mikroskopscreenings die klinische Relevanz noch nicht belegt. Daher ist der Nachweis der klinischen Relevanz für das automatisierte Mikroskop Aufgabe von weiteren Studien.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung von Prognosefaktoren beim Mammakarzinom hat das Ziel, den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv möglichst genau abzuschätzen. Es gibt nur wenige neuere Prognosefaktoren, deren klinischer Nutzen durch entsprechende Studien evidenz-begründet ist und deren Bestimmung beim primären Mammakarzinom sinnvoll erscheint. Einer dieser Prognosefaktoren ist der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Die Problematik der Detektion disseminierten Tumorzellen im Knochenmark liegt darin, dass disseminierte Tumorzellen in nur sehr geringer Anzahl im Knochenmark vorhanden sind und dadurch der Nachweis mit einem enormen Zeitaufwand und möglicherweise falsch negativen Ergebnissen verbunden ist. Eine weitere Schwierigkeit stellt die mangelnde Standardisierung und die geringe Reproduzierbarkeit dar.

Zusammenfassend kann zu der vorliegenden Studie gesagt werden, dass bewiesen wurde, dass der Einsatz eines automatisierten Mikroskops qualitativ und quantitativ bessere Ergebnisse im Hinblick auf das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark geliefert hat als der Einsatz eines manuellen Mikroskops. In der vorliegenden Studie stieg die Detektionsrate für disseminierte Tumorzellen um das 2,3fache von 15,7% auf 36,1%. Die Erfahrungen im Rahmen dieser Studie konnten zeigen, dass durch den Einsatz eines automatisierten Mikroskops der menschliche Fehler bei der Befundung der Präparate zu einem großen Teil ausgeschaltet werden konnte, so entgingen den Befundern mittels des automatisierten Mikroskops nur in 4 Fällen eine isolierte Tumorzelle, mittels des manuellen Screenings wurden hingegen in 64 Fällen isolierte Tumorzellen übersehen.

Inwieweit die Ergebnisse der Studie die bisher angenommene prognostische Relevanz verändern, muss im Rahmen zukünftiger prospektiver Studien noch überprüft werden.

8 ANHANG

Einstellung der Sensitivitäts-Parameter der MDS™-Software unter dem Menü-Punkt INISCN01.SSH

INISCN01.SSH		REC	MIN	MAX
THRESH1#1	25			
THRESH2#1	46			
THRESHRELATIVE	40			
TRESCHDARK	200			
X		2		
Y		2		
Z		2		
D1		2	20	255
D2		2	5	255
AREA		2	20	700
COM		2	30	100
RAX		2	10	100
MAX1		2	0	255
MAX2		2	0	255
CV1		2	0	10000
CV2		2	0	10000
DDR		2	50	25500
BGR1		2	0	100

BGR2		2	0	100
CIR		2	0	100
HCP		2	0	100
LSA		2	0	100
DIR		2	0	100
CLR		2	35	100
PRP		2	0	100
CLP			4	100
BB			2	100
FILT1	F10B02			
FILT”	F10B01			
FILTFOC	F10B02			
PICTFRAGSIZE	48			

9 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN, ABBILDUNGEN UND TABELLEN

9.1 *Verzeichnis der Abkürzungen*

APAAP	alkalischen-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
BET	Brusterhaltende Therapie
CK	Zytokeratin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	epithelial membrane antigen
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factors
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
MRD	Minimal Residual Disease
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SERMS	selektive Östrogenrezeptormodulatoren

9.2 *Verzeichnis der Abbildungen*

Abbildung 1: manuelles Mikroskop *29*
Abbildung 3: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat (mit Detailansicht) *48*
Abbildung 4: Automatisiertes Zelldetektionssystem MDS® der Firma Applied Imaging *50*
Abbildung 5: Tumorgröße zum Zeitpunkt der Primärdiagnose *54*
Abbildung 6: Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie *56*
Abbildung 7: Grading zum Zeitpunkt der Primärtherapie *57*
Abbildung 8: Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie *58*
Abbildung 10: Primäroperation *61*
Abbildung 11: Adjuvante systemische Therapie *63*
Abbildung 12: Adjuvante Radiotherapie *64*
Abbildung 13: Postoperative Histologie zum Zeitpunkt der Primärtherapie *66*
Abbildung 14: Lymphangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie *67*
Abbildung 15: Hämangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie *68*
Abbildung 16: Östrogenrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie *69*
Abbildung 17: Progesteronrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie *70*
Abbildung 18: Ergebnisse manuelles Mikroskop *71*
Abbildung 19: Anzahl der detektierten Zellen mit dem manuellen Mikroskop *73*
Abbildung 20: Ergebnisse automatisiertes Mikroskop *74*
Abbildung 21: Anzahl detektierter Zellen automatisiertes Mikroskop *76*
Abbildung 22: Inzidenzvergleich zwischem automatisiertem und manuellem Mikroskop *78*
Abbildung 23: Anzahl der Zellen bei den positiven Negativkontrollen *79*

9.3 *Verzeichnis der Tabellen*

Tabelle 1: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die den Antikörper gegen CK18 einsetzten 13
Tabelle 2: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die einen EMA/ Mucin-ähnlichen Antikörper einsetzten 15
Tabelle 3: Übersicht über Mammakarzinom-Studien, die Kombinationen von Antikörpern einsetzten 18
Tabelle 4: Übersicht über PCR-Arbeiten zur Detektion von ITC im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen 24
Tabelle 5: Zytostatische Therapieregime bei Patientinnen dieser Untersuchung 43
Tabelle 6: Tumorgröße zum Zeitpunkt der Primärtherapie 54
Tabelle 7: Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Primärtherapie 55
Tabelle 8: Histopathologisches Grading zum Zeitpunkt der Primärtherapie 57
Tabelle 9: Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie 58
Tabelle 10: Altersverteilung des Patientenkollektiv 59
Tabelle 11: Primäroperation 61
Tabelle 12: Adjuvante Therapie 62
Tabelle 13 adjuvante Radiotherapie 63
Tabelle 14: Tumorhistologie zum Zeitpunkt der Primärtherapie 65
Tabelle 15: Lymphangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie 66
Tabelle 16: Hämangiosis carcinomatosa zum Zeitpunkt der Primärtherapie 67
Tabelle 17: Östrogenrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie 68
Tabelle 18: Progesteronrezeptorstatus zum Zeitpunkt der Primärtherapie 69
Tabelle 19: Ergebnisse manuelles Mikroskop 71
Tabelle 20: Anzahl der detektierten Tumorzellen mittels manuellen Mikroskops 72
Tabelle 21: Ergebnisse automatisiertes Mikroskop 74
Tabelle 22: Anzahl detektierter Tumorzellen mittels automatisierten Mikroskops 75
Tabelle 23: Inzidenzvergleich zwischem automatisiertem und manuellem Mikroskop 77
Tabelle 24: Anzahl der Zellen bei den positiven Negativkontrollen 79

10 LITERATURVERZEICHNIS

Altmannsberger,M., Osborn,M., Droese,M., Weber,K., & Schauer,A. (1984) Diagnostic value of intermediate filament antibodies in clinical cytology
Klin.Wochenschr., **62**, 114-123.

B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, & J.D.Watson (1994) *Biologie Molécular de la Cellule,* 3 edn, Flammarion Médicine-Sciences, Paris.

Baker,M., Gillanders,W.E., Mikhitarian,K., Mitas,M., & Cole,D.J. (2003) The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am.J.Surg.*, **186**, 351-358.

Bauer,K.D., Torre-Bueno,J., Diel,I.J., Hawes,D., Decker,W.J., Priddy,C., Bossy,B., Ludmann,S., Yamamoto,K., Masih,A.S., Espinoza,F.P., & Harrington,D.S. (2000) Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin.Cancer Res.*, **6**, 3552-3559.

Becker,S., Becker-Pergola,G., Fehm,T., Wallwiener,D., & Solomayer,E.F. (2004) Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR
Clin.Chem., **50**, 785-786.

Berger,U., Bettelheim,R., Mansi,J.L., Easton,D., Coombes,R.C., & Neville,A.M. (1988) The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis
Am.J Clin.Pathol., **90**, 1-6.

Berois,N., Varangot,M., Aizen,B., Estrugo,R., Zarantonelli,L., Fernandez,P., Krygier,G., Simonet,F., Barrios,E., Muse,I., & Osinaga,E. (2000) Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR
Eur.J Cancer, **36**, 717-723.

Berois,N., Varangot,M., Sonora,C., Zarantonelli,L., Pressa,C., Lavina,R., Rodriguez,J.L., Delgado,F., Porchet,N., Aubert,J.P., & Osinaga,E. (2003) Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA
Int.J.Cancer, **103**, 550-555.

Birdsong,G.G. (1996) Automated screening of cervical cytology specimens. *Hum.Pathol.*, **27**, 468-481.

Borgen,E., Naume,B., Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel I, Solomayer E-F, Theocharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder W, Marolleau J-P, Garcia J, & Pantel,K. (1999) Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: 1. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*, **1**, 377-388.

Borgen,E., Naume,B., Nesland,J.M., Nowels,K.W., Pavlak,N., Ravkin,I., & Goldbard,S. (2001) Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry*, **46**, 215-221.

Bossolasco,P., Ricci,C., Farina,G., Soligo,D., Pedretti,D., Scanni,A., & Deliliers,G.L. (2002) Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene
Cancer Detect.Prev., **26**, 60-63.

Braun,S., Kentenich,C., Janni,W., Hepp,F., de Waal,J., Willgeroth,F., Sommer,H., & Pantel,K. (2000a) 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.*, **18**, 80-86.

Braun,S., Muller,M., Hepp,F., Schlimok,G., Riethmuller,G., & Pantel,K. (1998) Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status
J Natl.Cancer Inst., **90**, 1099-1101.

Braun,S. & Pantel,K. (1999) Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance
Med.Oncol., **16**, 154-165.

Braun,S. & Pantel,K. (2000) [Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow]. *Dtsch.Med.Wochenschr.*, **125**, 1237-1239.

Braun,S., Pantel,K., Muller,P., Janni,W., Hepp,F., Kentenich,C.R., Gastroph,S., Wischnik,A., Dimpfl,T., Kindermann,G., Riethmuller,G., & Schlimok,G. (2000b) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, **342**, 525-533.

Braun,S., Schindlbeck,C., Hepp,F., Janni,W., Kentenich,C., Riethmuller,G., & Pantel,K. (2001) Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J.Clin.Oncol.*, **19**, 368-375.

Braun,S., Vogl,F.D., Janni,W., Marth,C., Schlimok,G., & Pantel,K. (2003) Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy
Breast, **12**, 397-404.

Braun,S., Vogl,F.D., Naume,B., Janni,W., Osborne,M.P., Coombes,R.C., Schlimok,G., Diel,I.J., Gerber,B., Gebauer,G., Pierga,J.Y., Marth,C., Oruzio,D., Wiedswang,G., Solomayer,E.F., Kundt,G., Strobl,B., Fehm,T., Wong,G.Y., Bliss,J., Vincent-Salomon,A., & Pantel,K. (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer
N.Engl.J Med., **353**, 793-802.

Brugger,W., Buhring,H.J., Grunebach,F., Vogel,W., Kaul,S., Muller,R., Brummendorf,T.H., Ziegler,B.L., Rappold,I., Brossart,P., Scheding,S., & Kanz,L. (1999) Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J.Clin.Oncol.*, **17**, 1535-1544.

Chagpar,A., Middleton,L.P., Sahin,A.A., Meric-Bernstam,F., Kuerer,H.M., Feig,B.W., Ross,M.I., Ames,F.C., Singletary,S.E., Buchholz,T.A., Valero,V., & Hunt,K.K. (2005) Clinical outcome of patients with lymph node-negative breast carcinoma who have sentinel lymph node micrometastases detected by immunohistochemistry. *Cancer*, **103**, 1581-1586.

Christopherson W. (1965) Cancer cells in the peripheral blood: a second look. *Acta Cytol*, **9**, 169-174.

Cordell,J., Richardson,T.C., Pulford,K.A., Ghosh,A.K., Gatter,K.C., Heyderman,E., & Mason,D.Y. (1985) Production of monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in diagnostic immunocytochemistry
Br.J Cancer, **52**, 347-354.

Cote,R.J., Rosen,P.P., Hakes,T.B., Sedira,M., Bazinet,M., Kinne,D.W., Old,L.J., & Osborne,M.P. (1988) Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease
Am.J Surg.Pathol., **12**, 333-340.

Cserni,G., Bianchi,S., Vezzosi,V., Peterse,H., Sapino,A., Arisio,R., Reiner-Concin,A., Regitnig,P., Bellocq,J.P., Marin,C., Bori,R., Penuela,J.M., & Iturriagagoitia,A.C. (2006) The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma
J Clin Pathol., **59**, 518-522.

Datta,Y.H., Adams,P.T., Drobyski,W.R., Ethier,S.P., Terry,V.H., & Roth,M.S. (1994) Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction
J.Clin.Oncol., **12**, 475-482.

de Mello,R.P. (1963) A new method for detection of cancer cells in peripheral blood using Bertalanffy fluorchrome method. *Acta Cytol*, **7**.

De,M., I, Bonichon,F., Coindre,J.M., & Trojani,M. (1992) Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluation with longer follow-up
Br.J Cancer, **66**, 523-527.

Dearnaley,D.P., Sloane,J.P., Ormerod,M.G., Steele,K., Coombes,R.C., Clink,H.M., Powles,T.J., Ford,H.T., Gazet,J.C., & Neville,A.M. (1981) Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen
Br.J Cancer, **44**, 85-90.

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

Engel J, Hölzel D, & Schubert-Fritschl G (2005) *Manual, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*, 10 edn, Zuckerschwerdt Verlag, München.

Engell,H.C. (1955) Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Acta Chir Scand.Suppl*, **201**, 1-70.

Fehm,T., Braun,S., Muller V, Janni,W., Gebauer,G., Marth,C., Schindlbeck,C., Wallwiener,D., Borgen,E., Naume,B., Pantel,K., & Solomayer E-F (2006) A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells im bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer*, **107**, 885-892.

Fishman,A., Klein,A., Zemer,R., Zimlichman,S., Bernheim,J., Cohen,I., & Altaras,M.M. (2000) Detection of micrometastasis by cytokeratin-20 (reverse transcription polymerase chain reaction) in lymph nodes of patients with endometrial cancer *Gynecol.Oncol.*, **77**, 399-404.

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

Gebauer,G., Fehm,T., Merkle,E., Beck,E.P., Lang,N., & Jager,W. (2001) Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up *J.Clin.Oncol.*, **19**, 3669-3674.

Gerhard,M., Juhl,H., Kalthoff,H., Schreiber,H.W., Wagener,C., & Neumaier,M. (1994) Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction *J.Clin.Oncol.*, **12**, 725-729.

Ghossein,R.A., Scher,H.I., Gerald,W.L., Kelly,W.K., Curley,T., Amsterdam,A., Zhang,Z.F., & Rosai,J. (1995) Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications *J.Clin.Oncol.*, **13**, 1195-1200.

Goeminne,J.C., Guillaume,T., & Symann,M. (2000) Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells *Ann.Oncol.*, **11**, 785-792.

Harbeck,N., Untch,M., Pache,L., & Eiermann,W. (1994) Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up *Br.J.Cancer*, **69**, 566-571.

Hermanek,P. (1997) [Disseminated breast carcinoma in bone marrow; prognostic significance compared with lymph node status]. *Strahlenther.Onkol.*, **173**, 707-708.

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

Hilbe,W., Gachter,A., Duba,H.C., Dirnhofer,S., Eisterer,W., Schmid,T., Mildner,A., Bodner,J., & Woll,E. (2003) Comparison of automated cellular imaging system and

manual microscopy for immunohistochemically stained cryostat sections of lung cancer specimens applying p53, ki-67 and p120
Oncol.Rep., **10**, 15-20.

Janku,F., Kleibl,Z., Novotny,J., Tesarova,P., Petruzelka,L., & Matous,B. (2004) Mammaglobin A, a novel marker of minimal residual disease in early stages breast cancer
Neoplasma, **51**, 204-208.

Janni,W., Hepp,F., Rjosk,D., Kentenich,C., Strobl,B., Schindlbeck,C., Hantschmann,P., Sommer,H., Pantel,K., & Braun,S. (2001) The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer*, **92**, 46-53.

Janni,W., Rack,B., Lindemann,K., & Harbeck,N. (2005a) Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time?
Oncologist., **10**, 480-492.

Janni,W., Rack,B., Schindlbeck,C., Strobl,B., Rjosk,D., Braun,S., Sommer,H., Pantel,K., Gerber,B., & Friese,K. (2005b) The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence
Cancer, **103**, 884-891.

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

Kahn,H.J., Hanna,W.M., Chapman,J.A., Trudeau,M.E., Lickley,H.L., Mobbs,B.G., Murray,D., Pritchard,K.I., Sawka,C.A., McCready,D.R., & Marks,A. (2006) Biological significance of occult micrometastases in histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer patients using the recent American Joint Committee on Cancer breast cancer staging system
Breast J, **12**, 294-301.

Kamby,C., Guldhammer,B., Vejborg,I., Rossing,N., Dirksen,H., Daugaard,S., & Mouridsen,H.T. (1987) The presence of tumor cells in bone marrow at the time of first recurrence of breast cancer
Cancer, **60**, 1306-1312.

Kawasaki,E.S., Clark,S.S., Coyne,M.Y., Smith,S.D., Champlin,R., Witte,O.N., & McCormick,F.P. (1988) Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, **85**, 5698-5702.

Klein,C.A., Schmidt-Kittler,O., Schardt,J.A., Pantel,K., Speicher,M.R., & Riethmuller,G. (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 4494-4499.

Kraeft,S.K., Sutherland,R., Gravelin,L., Hu,G.H., Ferland,L.H., Richardson,P., Elias,A., & Chen,L.B. (2000) Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin.Cancer Res.*, **6**, 434-442.

Krismann,M., Todt,B., Schroder,J., Gareis,D., Muller,K.M., Seeber,S., & Schutte,J. (1995) Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J.Clin.Oncol.*, **13**, 2769-2775.

Leather,A.J., Gallegos,N.C., Kocjan,G., Savage,F., Smales,C.S., Hu,W., Boulos,P.B., Northover,J.M., & Phillips,R.K. (1993) Detection and enumeration of circulating tumour cells in colorectal cancer. *Br.J.Surg.*, **80**, 777-780.

Lee,M.S., Chang,K.S., Cabanillas,F., Freireich,E.J., Trujillo,J.M., & Stass,S.A. (1987) Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification
Science, **237**, 175-178.

Lindemann,F., Schlimok,G., Dirschedl,P., Witte,J., & Riethmuller,G. (1992) Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*, **340**, 685-689.

Makarawicz,K., McDuffie,L., Shi,S.-R., Chatterjee,S., Yang C, Taylor,C., & Cote,R.J. (1997) Immunohistochemical detection of occult micrometastases using an automated intelligent microscopy system. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, **38**, 269.

Mansi,J.L., Easton,D., Berger,U., Gazet,J.C., Ford,H.T., Dearnaley,D., & Coombes,R.C. (1991) Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur.J.Cancer*, **27**, 1552-1555.

Mansi,J.L., Gogas,H., Bliss,J.M., Gazet,J.C., Berger,U., & Coombes,R.C. (1999) Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study
Lancet, **354**, 197-202.

Mansi,J.L., Mesker,W.E., McDonnell,T., Driel-Kulker,A.M., Ploem,J.S., & Coombes,R.C. (1988) Automated screening for micrometastases in bone marrow smears. *J.Immunol.Methods*, **112**, 105-111.

Mehes,G., Lorch,T., & Ambros,P.F. (2000) Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis. *Cytometry*, **42**, 357-362.

Mehes,G., Luegmayr A, Ambros I M, Ladenstein R, & Ambros,P.F. (2001) Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in bone marrow. *Clin.Cancer Res.*, **7**, 1969-1975.

Mesker,W.E., vd Burg,J.M., Oud,P.S., Knepfle,C.F., Velzen,M.C., Schipper,N.W., & Tanke,H.J. (1994) Detection of immunocytochemically stained rare events using image analysis. *Cytometry*, **17**, 209-215.

Molino,A., Colombatti,M., Bonetti,F., Zardini,M., Pasini,F., Perini,A., Pelosi,G., Tridente,G., Veneri,D., & Cetto,G.L. (1991) A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer*, **67**, 1033-1036.

Moll,R., Franke,W.W., Schiller,D.L., Geiger,B., & Krepler,R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells *Cell*, **31**, 11-24.

Mullenix,P.S., Brown,T.A., Meyers,M.O., Giles,L.R., Sigurdson,E.R., Boraas,M.C., Hoffman,J.P., Eisenberg,B.L., & Torosian,M.H. (2005) The association of cytokeratin-only-positive sentinel lymph nodes and subsequent metastases in breast cancer *Am J Surg.*, **189**, 606-609.

Muller,P. & Schlimok,G. (2000) Bone marrow "micrometastases" of epithelial tumors: detection and clinical relevance. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, **126**, 607-618.

Negrin,R.S. & Blume,K.G. (1991) The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease *Blood*, **78**, 255-258.

Ooka,M., Tamaki,Y., Sakita,I., Fujiwara,Y., Yamamoto,H., Miyake,Y., Sekimoto,M., Ohue,M., Sugita,Y., Miyoshi,Y., Ikeda,N., Noguchi,S., & Monden,M. (2001) Bone marrow micrometastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer *Breast Cancer Res Treat.*, **67**, 169-175.

Ozbas,S., Dafydd,H., & Purushotham,A.D. (2003) Bone marrow micrometastasis in breast cancer *Br.J.Surg.*, **90**, 290-301.

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

Pantel,K., Izbicki,J., Passlick,B., Angstwurm,M., Haussinger,K., Thetter,O., & Riethmuller,G. (1996) 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.

Pantel,K., Izbicki,J.R., Angstwurm,M., Braun,S., Passlick,B., Karg,O., Thetter,O., & Riethmuller,G. (1993a) Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer *Cancer Res.*, **53**, 1027-1031.

Pantel,K. & Otte,M. (2001) Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells *Semin.Cancer Biol.*, **11**, 327-337.

Pantel,K., Schlimok,G., Angstwurm,M., Weckermann,D., Schmaus,W., Gath,H., Passlick,B., Izbicki,J.R., & Riethmuller,G. (1994) Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J.Hematother.*, **3**, 165-173.

Pantel,K., Schlimok,G., Braun,S., Kutter,D., Lindemann,F., Schaller,G., Funke,I., Izbicki,J.R., & Riethmuller,G. (1993b) Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells *J Natl.Cancer Inst.*, **85**, 1419-1424.

Pantel,K. & von Knebel,D.M. (2000) Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr.Opin.Oncol.*, **12**, 95-101.

Pantel,K., von Knebel,D.M., Izbicki,J.R., & Riethmuller,G. (1997) [Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies]. *Chirurg*, **68**, 1241-1250.

Passlick,B., Kubuschok,B., Izbicki,J.R., Thetter,O., & Pantel,K. (2000) [Isolated tumor cells in bone marrow predicts reduced survival in lymph node-negative non-small-cell lung cancer]
Pneumologie, **54**, 355-360.

Pierga,J.Y., Bonneton,C., Vincent-Salomon,A., de Cremoux,P., Nos,C., Blin,N., Pouillart,P., Thiery,J.P., & Magdelenat,H. (2004) Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients
Clin.Cancer Res., **10**, 1392-1400.

Qiu,S.D., Young,C.Y., Bilhartz,D.L., Prescott,J.L., Farrow,G.M., He,W.W., & Tindall,D.J. (1990) In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate
J.Urol., **144**, 1550-1556.

Rack,B., Janni,W., Kentenich,C., Schaffer,P., Sykes R, Spengler B, Thieler S, Sommer,H., Braun,S., & Friese K (2003) Critical evaluation of digital microscopy for the detection of isolated tumor cells (ITC) in the bone marrow (BM). *Proceedings of the American Association for Cancer Research?*

Raker,J.W., TAFT,P.D., & EDMONDS,E.E. (1960) Significance of megakaryocytes in the search for tumor cells in the peripheral blood
N.Engl.J.Med., **263**, 993-996.

Redding,W.H., Coombes,R.C., Monaghan,P., Clink,H.M., Imrie,S.F., Dearnaley,D.P., Ormerod,M.G., Sloane,J.P., Gazet,J.C., Powles,T.J., & . (1983) Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer
Lancet, **2**, 1271-1274.

Ross,A.A., Cooper,B.W., Lazarus,H.M., Mackay,W., Moss,T.J., Ciobanu,N., Tallman,M.S., Kennedy,M.J., Davidson,N.E., Sweet,D., & . (1993) Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques
Blood, **82**, 2605-2610.

Sanson,M. (1834) Fait remarkable de diathèse cancereuse. *Gaz.med.de Paris 2*, **74**, 2403-2413.

Schlimok,G., Funke,I., Holzmann,B., Gottlinger,G., Schmidt,G., Hauser,H., Swierkot,S., Warnecke,H.H., Schneider,B., Koprowski,H., & . (1987) Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 8672-8676.

Schlimok,G., Funke,I., Pantel,K., Strobel,F., Lindemann,F., Witte,J., & Riethmuller,G. (1991) Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance

Eur.J.Cancer, **27**, 1461-1465.

Schlimok,G. & Riethmuller,G. (1990) Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow
Semin.Cancer Biol., **1**, 207-215.

Silva,A.L., Tome,M.J., Correia,A.E., & Passos-Coelho,J.L. (2002) Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products
Ann.Oncol., **13**, 422-429.

Singletary,S.E., Larry,L., Tucker,S.L., & Spitzer,G. (1991) Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients
J Surg.Oncol., **47**, 32-36.

Slade,M.J., Smith,B.M., Sinnett,H.D., Cross,N.C., & Coombes,R.C. (1999) Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer
J.Clin.Oncol., **17**, 870-879.

Sloane,J.P., Ormerod,M.G., Imrie,S.F., & Coombes,R.C. (1980) The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections
Br.J Cancer, **42**, 392-398.

Smith,B.M., Slade,M.J., English,J., Graham,H., Luchtenborg,M., Sinnett,H.D., Cross,N.C., & Coombes,R.C. (2000) Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques
J.Clin.Oncol., **18**, 1432-1439.

Sobin,L.H. & Fleming ID (1997) TNM Classification of malignant tumors, fifth edition. *Cancer*, **80**, 1803-1804.

Soeth,E., Vogel,I., Roder,C., Juhl,H., Marxsen,J., Kruger,U., Henne-Bruns,D., Kremer,B., & Kalthoff,H. (1997) 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.

Span,P.N., Waanders,E., Manders,P., Heuvel,J.J., Foekens,J.A., Watson,M.A., Beex,L.V., & Sweep,F.C. (2004) Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time
J Clin.Oncol., **22**, 691-698.

Stathopoulou,A., Mavroudis,D., Perraki,M., Apostolaki,S., Vlachonikolis,I., Lianidou,E., & Georgoulias,V. (2003) Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers
Anticancer Res., **23**, 1883-1890.

Stigbrand,T., Andres,C., Bellanger,L., Bishr,O.M., Bodenmuller,H., Bonfrer,H., Brundell,J., Einarsson,R., Erlandsson,A., Johansson,A., Leca,J.F., Levi,M., Meier,T., Nap,M., Nustad,K., Seguin,P., Sjodin,A., Sundstrom,B., van Dalen,A., Wiebelhaus,E.,

Wiklund,B., Arlestig,L., & Hilgers,J. (1998) Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour.Biol.*, **19**, 132-152.

Thomas,C. (1992) *Histopathologie*, Schattauer.

Umekita,Y., Ohi,Y., Sagara,Y., & Yoshida,H. (2002) Clinical significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes in "node-negative" breast cancer patients. *Jpn.J Cancer Res*, **93**, 695-698.

Untch M, Kahlert S, Funke,I., & et al. (1999) Detection of cytokeratin (CK) 18 positive cells in bone marrow (BM) of breast cancer patients-no prediction of bad outcome (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol*, **18**.

Varangot,M., Barrios,E., Sonora,C., Aizen,B., Pressa,C., Estrugo,R., Lavigna,R., Muse,I., Osinaga,E., & Berois,N. (2005) Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer *Oncol.Rep.*, **14**, 537-545.

Weaver,D.L., Krag,D.N., Manna,E.A., Ashikaga,T., Harlow,S.P., & Bauer,K.D. (2003) Comparison of pathologist-detected and automated computer-assisted image analysis detected sentinel lymph node micrometastases in breast cancer *Mod.Pathol.*, **16**, 1159-1163.

Weitz,J., Koch,M., & von Knebel Doeberitz,M. (1999a) Bedeutung disseminierter Tumorzellen bei gastrointestinalen Tumoren. *Chir Gastroenterol*, **15**, 173-180.

Weitz,J., Koch,M., & von Knebel Doeberitz,M. (1999b) Bedeutung disseminierter Tumorzellen bei gastrointestinalen Tumoren. *Chir Gastroenterol*, **15**, 173-180.

Weyerstahl,T. & Genz,T. (2001) Erkrankungen der Mamma, maligne Tumoren, Mammakarzinom. Gynäkologie und Geburtshilfe (ed. by Stauber M. & T. Weyerstahl), pp. 366-389. Thieme, Stuttgart.

Wiedswang,G., Borgen,E., Karesen,R., Kvalheim,G., Nesland,J.M., Qvist,H., Schlichting,E., Sauer,T., Janbu,J., Harbitz,T., & Naume,B. (2003) Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer *J Clin.Oncol.*, **21**, 3469-3478.

Wiedswang,G., Borgen,E., Karesen,R., Qvist,H., Janbu,J., Kvalheim,G., Nesland,J.M., & Naume,B. (2004) Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome *Clin.Cancer Res*, **10**, 5342-5348.

Wong,G. (2003) Bone marrow micrometastasis is a significant predictor of long-term relapse-free survival for breast cancer by non-proportional hazards model. *Breast Cancer Res Treat.*, S99.

Wormann,B., Wulf,G.G., Griesinger,F., & Hiddemann,W. (1997) [Sensitive detection of disseminated tumor cells--prognostic significance and therapeutic approaches]. *Internist (Berl)*, **38**, 1083-1091.

Zach,O., Kasparu,H., Krieger,O., Hehenwarter,W., Girschikofsky,M., & Lutz,D. (1999) Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA
J Clin.Oncol., **17**, 2015-2019.

Zhong,X.Y., Kaul,S., & Bastert,G. (2001) Evaluation of MUC1 and EGP40 in bone marrow and peripheral blood as a marker for occult breast cancer
Arch.Gynecol.Obstet., **264**, 177-181.

Zhong,X.Y., Kaul,S., Diel,I., Eichler,A., & Bastert,G. (1999) Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products
J.Cancer Res.Clin.Oncol., **125**, 286-291.

Zippelius,A., Kufer,P., Honold,G., Kollermann,M.W., Oberneder,R., Schlimok,G., Riethmuller,G., & Pantel,K. (1997) Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J.Clin.Oncol.*, **15**, 2701-2708.

11 DANK

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Wolfgang Janni von der 1. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ganz herzlichen Dank an Frau Dr. med. Brigitte Rack für die Betreuung, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Frau Beate Zill vom tumorimmunologischen Labor der 1. Frauenklinik München sei gedankt für die immer freundliche und konstruktive Hilfe bei der praktischen Arbeit.

Herrn Dr. med. Alexander Crispin vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München vielen Dank für die freundliche Unterstützung in der statistischen Auswertung der gewonnen Daten.

Vielen herzlichen Dank an meinen Schwager Herrn Dr. rer. pol. Wolfgang Kossa für die Durchsicht und das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie. Meinen Geschwistern Julia Spengler, Britta Kossa und Johannes Wingenfeld, die mir während der gesamten Arbeit eine moralische Unterstützung waren und die verstanden, welche Herausforderung diese Arbeit für mich darstellte.

Meinen Eltern Heidrun Wingenfeld und Dieter Spengler danke ich von ganzen Herzen für ihre Liebe und Unterstützung auf meinem Lebensweg. Sie sind mir in vielen Bereichen große

Vorbilder. Durch ihre liebevolle Erziehung habe ich das Selbstvertrauen gewonnen, meine Ziele zu verwirklichen und ein glückliches Leben zu führen.

Meinem Verlobten Dr. med. Patrick Weber kann ich gar nicht genug danken für seine unermüdliche Geduld, die schwierigen Phasen während dieser Arbeit mit mir durchzustehen. Ohne seine Zuversicht, sein technisches und fachliches Wissen und vor allem seine Liebe wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen. Vielen Dank.

12 LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name:	Bettina Susanne Spengler
Wohnort:	Reitmorstr. 15 80538 München
Geburtsdatum und- ort:	09.11.1976 in München
Familienstand:	ledig
Eltern:	Heidrun Wingenfeld, Dipl.-Bibliothekarin Dieter Spengler, Dipl. Kfm. Wirtschaftsprüfer, Steuerberater
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

09.1983-07.1996	Rudolf-Steiner-Schule in München-Schwabing Abschluss: Abitur im Juni 1996

Studium:

09.1996- 03.1998	Studium der Tourismusbetriebswirtschaft an der Berufsakademie Ravensburg, inkl. 11-monatigem Praktikum in Hotelbetrieben in Tralee/Irland und Rottach-Egern
03.1998- 11.1998	Studium der Neuen Deutschen Literaturwissenschaft an der Ludwig-Maximilans-Universität München
11. 1998- 05.2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität, München
09. 2000	Ärztliche Vorprüfung
09. 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09. 2002- 03.2003	Auslandssemester an der Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, Brasilien, im Rahmen des UNIBRAL-Programms
04. 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.2005	Approbation als Ärztin

Berufstätigkeit:

07.2005- 10.2005	Assistenzärztin Frauenklinik Prien
10.2005- 04.2006	Assistenzärztin Kreiskrankenhaus Eggenfelden, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
04.2006-	Assistenzärztin Krankenhaus Landshut-Achdorf, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

München, 20.11.2007