

Universitätsfrauenklinik Ulm
Leiter: Prof. Dr. med. R. Kreienberg

Immunzytochemischer Tumorzellnachweis im Knochenmark
in Abhängigkeit histomorphologischer und prognostischer
Kriterien beim primären Mammakarzinom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Sandra Nicole Bossert
Geburtsort: Pforzheim
2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Kreienberg

2. Berichterstatter: PD Dr. Hans Werner Gottfried

Tag der Promotion: 15.12.2005

Inhaltsverzeichnis

X	Abkürzungsverzeichnis	iii
1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	3
2	Material und Methoden	4
2.1	Patientengut	4
2.2.1	Staging	4
2.1.2	Postoperative Tumorklassifikation	4
2.1.3	Ausschlusskriterien	5
2.2	Knochenmarkaspirate	6
2.2.1	Gewinnung des Knochenmarkes	6
2.2.2	Aufarbeitung der Knochenmarksuspension	7
2.3	Immunzytochemischer Tumorzellnachweis	10
2.3.1	Verwendeter monoklonaler Antikörper	10
2.3.2	Durchführung der immunzytochemischen Markierung	10
2.4	Statistik	13
3	Ergebnisse	14
3.1	Inzidenz CK-positiver Knochenmarkbefunde bei 83 Patientinnen mit Mammakarzinom	14
3.2	Patientencharakteristik und Ergebnis der Knochenmarkpunktion zum Zeitpunkt der Primäroperation	15
3.3	Knochenmarkbefund und Tumorgroße	16
3.4	Knochenmarkbefund und Nodalstatus	17
3.5	Knochenmarkbefund und Menopausenstatus	18
3.6	Knochenmarkbefund und Grading	19
3.7	Knochenmarkbefund und histologische Differenzierung	20
3.8	Knochenmarkbefund und Hormonrezeptorstatus	21
3.9	Knochenmarkbefund und Tumormarkerstatus	22
3.10	Knochenmarkbefund und p53-Expression	23
3.11	Knochenmarkbefund und mib-1-Expression	24

3.12	Knochenmarkbefund und HER2/neu-Expression	25
3.13	Übersichtstabelle der Ergebnisse	26
4	Diskussion	27
4.1	Diskussion der Methode	28
4.1.1	Knochenmark als Ort der disseminierten Tumorzellaussaat	28
4.1.2	Konventionelle histologische Methoden	30
4.1.3	Immunzytochemische Verfahren mit monoklonalen Antikörpern	31
4.1.4	Antikörper zur immunzytochemischen Darstellung von epithelialen Tumorzellen	32
4.1.5	Beurteilung der immunzytochemischen Färbemethode und Verbesserungsmöglichkeiten	35
4.2	Diskussion der Ergebnisse	37
4.2.1	Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit Mak 5D3	37
4.2.2	Einfluss der TumorgroÙe auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	38
4.2.3	Einfluss des axillären Lymphknotenstatus auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	39
4.2.4	Einfluss des Alters auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	39
4.2.5	Einfluss des Tumorgradings auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	40
4.2.6	Einfluss der histopathologischen Differenzierung auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	40
4.2.7	Einfluss des Hormonrezeptorstatus auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	41
4.2.8	Einfluss der Tumormarker auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	41
4.2.9	Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	42
4.2.10	Einfluss der mib-1 Expression auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	43
4.2.11	Einfluss der HER2/neu Expression auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	43
4.3	Tumorbiologische und klinische Bedeutung der im Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen	45
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	47
5	Zusammenfassung	49
6	Literatur	50
7	Danksagung	72
8	Lebenslauf	73

X Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
CK	Cytokeratin
EMA	Epithelial Membrane Antigen
ER	Estrogenrezeptor
Et al.	Et alii
Fa.	Firma
G	Grading
G.	Gauge
HR	Hormonrezeptor
I.E.	Internationale Einheit
Inv.	Invasiv
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
LSB	Labelled Streptavidin Biotin Technique
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Neg.	Negativ

Nr.	Nummer
N. sign.	Nicht signifikant
Pat.	Patienten/-innen
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pos.	Positiv
PR	Progesteronrezeptor
Sign.	Signifikant
TBS	Tris Buffered Saline
TM	Tumormarker
u.a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
Verd.	Verdünnung
Vs.	Versus
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter

1 Einleitung

There is growing evidence that breast cancer is a systemic disease more often than can be detected by routine staging procedures. Up to one third of node negative patients receiving only local treatment will relapse and die from metastatic disease.

Nemeto et al. (1980)

Brustkrebs ist die Hauptursache für krebsbedingte Todesfälle bei Frauen in den westlichen Industrienationen [3]. Insgesamt erkranken rund 8% -10% aller Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom [64]. Allein in Deutschland rechnet man jährlich mit über 46.000 Neuerkrankungen und ca. 19.000 Todesfällen, wobei die Erkrankungshäufigkeit weiter zunimmt [46, 130]. Diese Zunahme lässt sich aufgrund der verbesserten Vorsorgeprogramme und der steigenden Lebenserwartung der Patientinnen erklären. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Mammakarzinome zu verzeichnen waren, stieg die Brustkrebssterblichkeit in Deutschland in den letzten zwanzig Jahren deutlich an [3, 122].

Die frühzeitige hämatogene Streuung gilt bis heute als eines der ungelösten Probleme bei der Diagnostik des Mammakarzinoms und ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung von Fernmetastasen und krebsbedingter Todesfälle [10, 19, 62, 120, 129]. Tatsächlich entwickeln ca. 30% der initial nodalnegativen Patientinnen nach 10 Jahren ein Rezidiv und 10%-20% der Patientinnen mit primären Fernmetastasen weisen keine Lymphknotenmetastasen auf [41]. Dies führt zu der Annahme, dass einzelne Tumorzellen in der Lage sind, den Tumor zu verlassen und metastatisches Potential besitzen [92].

Zur Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufes und weiteren Therapieplanung werden Prognosefaktoren herangezogen. Im Idealfall wäre die Identifizierung aller Patientinnen mit einem späteren Rezidiv möglich, somit auch jener Patientinnen, die durch die Primäroperation allein geheilt wären. Zu den etablierten Prognosefaktoren gehören das Ausbreitungsstadium des Tumors

(pTNM-Status), die Tumorgöße, sein Wachstumsmuster (histopathologischer Typ, Grading), der axilläre Lymphknotenstatus und die Steroidhormonrezeptoren [68].

Dem axillären Lymphknotenstatus wird dabei die größte Bedeutung beigemessen [41, 42, 73, 74, 102, 103, 133, 150]. Das Rezidiv- und Todesrisiko korreliert mit der Anzahl tumorbefallener Lymphknoten [41] und mit dem Bezug dieser Lymphknoten zu ihrer Umgebung, wie Kapseldurchbruch oder extranodale Ausbreitung mit Invasion des Fettgewebes [68]. Aufgrund dieser Voraussagekraft dient der axilläre Lymphknotenstatus als wichtigste Grundlage für eine Indikation zur systemischen adjuvanten Therapie [6, 73, 74]. Bei nodal-negativen Patientinnen ist die Entscheidung zur adjuvanten Therapie schwieriger, da bei 70% dieser Patientinnen primär eine lokale Erkrankung vorliegt, die durch die chirurgische Entfernung des Tumors geheilt werden kann [68]. Dennoch erleiden fast 30% dieser Frauen nach 10 Jahren ein Rezidiv [41]. Zur eindeutigen Identifizierung dieses Risikokollektivs reicht somit der axilläre Lymphknotenstatus – auch in Verbindung mit etablierten Prognosefaktoren – nicht aus [82]. Die Notwendigkeit, weitere Faktoren als Entscheidungshilfe heranzuziehen, wird somit offensichtlich. Dies führte in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Reihe neuer möglicher Prognosefaktoren, wie z. B. die Bestimmung von Proliferationsmarkern (Ki67, mib-1, PCNA) und molekularbiologischen Parametern (EGF-R, HER2/neu, p53), die Untersuchung der Angiogenese des Primärtumors oder dem immunzytochemischen Tumorzellnachweis im Knochenmark.

In den letzten Jahren haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit dem immunzytochemischen Tumorzellnachweis im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom beschäftigt [9, 19, 27, 30, 32, 33, 34, 35, 39, 41, 45, 51, 53, 55, 56, 61, 73, 74, 75, 84, 85, 88, 89, 90, 91, 100, 102, 103, 109, 124, 126, 133, 143, 145, 146, 147, 158, 160]. Die Ergebnisse der einzelnen Studien differierten jedoch bezüglich der Detektionsrate und der prognostischen Relevanz erheblich, was u.a. auf mangelnde Standardisierung der Studienprotokolle zurückzuführen ist. So zeigten sich erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Tumorstadien, der histomorphologischen Kriterien und der Knochenmarkpräparate sowie der Anzahl ausgewerteter Präparate. Als Hauptproblem stellte sich jedoch die Wahl des verwendeten Antikörpers heraus.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl sich schon mehrere Arbeitsgruppen mit dem immunzytochemischen Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark beschäftigt haben, bleibt die Frage nach der prognostischen Wertigkeit dieser Methode aufgrund bisher uneinheitlicher Studienprotokolle weiterhin offen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, unter standardisierten Bedingungen den Nachweis auf Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom mit Hilfe immunzytochemischer Methoden zu führen. Darüber hinaus soll überprüft werden, welche Beziehungen zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und histomorphologischen Kriterien (Tumorstadium, Grading, histologische Tumordifferenzierung), etablierten Prognosefaktoren (Lymphknotenstatus, Menopausenstatus und Hormonrezeptorstatus), den Tumormarkern (CEA und MCA) sowie den neueren Prognosefaktoren (p53, mib-1, HER2/neu) bestehen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Zwischen Oktober 1998 und Dezember 1999 wurde an der Universitätsfrauenklinik Ulm (Leiter: Prof. Dr. med. R. Kreienberg) bei insgesamt 90 Patientinnen mit primären Mammakarzinom der immunzytochemische Nachweis auf Tumorzellen im Knochenmark geführt.

2.1.1 Staging

Um eine Fernmetastasierung auszuschließen, wurde bei allen Patientinnen routinemäßig postoperativ eine Röntgen-Aufnahme des Thorax in zwei Ebenen, eine Oberbauchsonographie sowie eine Skelettszintigraphie durchgeführt.

2.1.2 Postoperative Tumorklassifikation

Das histologische Grading erfolgte nach der Gradingklassifikation von Bloom und Richardson (1957) [11].

Die Stadieneinteilung der Primärtumore erfolgte nach der von der UICC empfohlenen TNM-Klassifikation [157].

Tabelle 2.1.: TNM-Klassifikation

<i>Stadium</i>	<i>Definition</i>
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 2 cm
T2	Tumor >2 cm und < 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor mit Infiltration in Brustwand oder Haut
No	Kein Anhalt für Befall regionärer LK
N1	Invasion beweglicher homolateraler axillärer LK
N2	Invasion fixierter homolateraler axillärer LK
N3	Invasion homolateraler supra- oder infraclavikulärer LK
M0	Keine Fernmetastasen

2.1.3 Ausschlusskriterien

Patientinnen, die eines der folgenden Kriterien erfüllten, wurden von der Studie ausgeschlossen:

- eine nachgewiesene Metastasierung (2 Pat.)
- eine vorangegangene oder simultane Neoplasie anderer Herkunft (1 Pat.)
- schwere Funktionsstörungen des Herzens, der Leber oder der Niere
- chronisch persistierende Erkrankungen, einschließlich Diabetes mellitus (1 Pat.)
- St.n. einer Chemotherapie (3 Pat.)
- eine bestehende Schwangerschaft

2.2 Knochenmarkaspirate

2.2.1 Gewinnung des Knochenmarkes

Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patientin sowie ein positives Votum der lokalen Ethikkommission lag vor. Die Knochenmarkpunktion wurde einmalig intraoperativ in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Es wurde bilateral im Bereich der Cristae iliacae anteriores punktiert. Die Punktion erfolgte mit einer Jamshidi Nadel (*10 cm (4''), 11 G., Firma Allegiance Healthcare Deutschland GMBH, München). Von jeder Punktionsstelle wurde ca. 10 ml Knochenmark aspiriert.

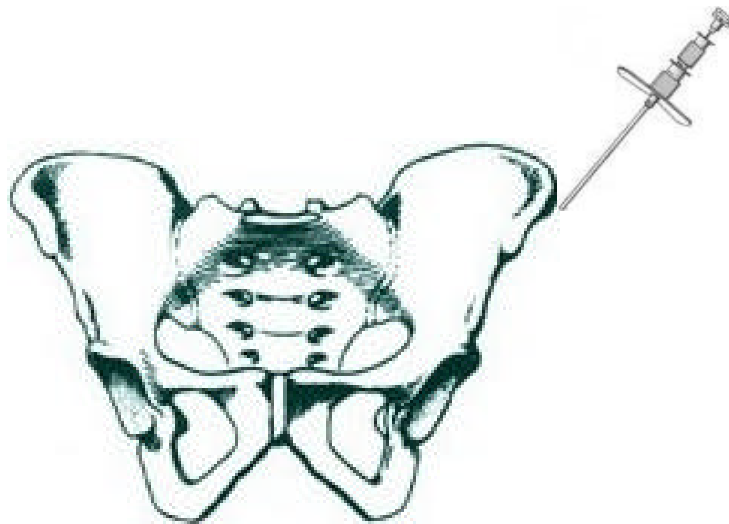


Abbildung 2.1.: Knochenmarkpunktion mit Jamshidi-Nadel

Die Zellausbeute betrug zwischen 1.8×10^6 und 192.0×10^6 Zellen. Das Aspirat wurde unter sterilen Bedingungen sofort in das Transportmedium gegeben, in welches zur Antikoagulation 5000 IE Heparin vorgelegt wurden. Danach erfolgte zur weiteren Verarbeitung der Transport in das endokrinologisch-onkologische Labor der Universitätsfrauenklinik Ulm.

Transportmedium

25 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies Gibco BRL)

mit 20 mM HEPES (Life Technologies Gibco BRL)

in 50 ml Falcon-Tubes (Falcon Blue Max™ sterile 50 ml, Becton Dickinson Labware)

2.2.2 Aufarbeitung der Knochenmarksuspension

Die Tumorzellisolierung erfolgte über eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum [14].

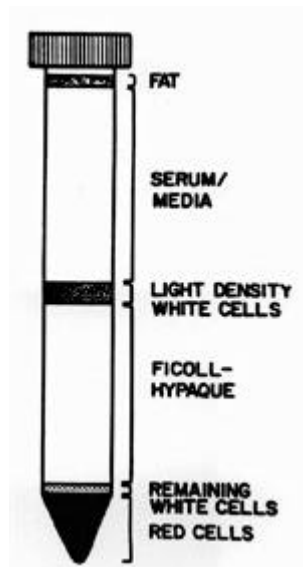


Abbildung 2.2.: Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Separation der Knochenmarkbestandteile

Von beiden Knochenmarkspiraten Schichtung von jeweils 25 ml Knochenmarksuspension über 15 ml Ficoll (Ficoll Separating Solution, Dichte 1,077g/μl, Fa. Biochrom KG, Berlin) und 15-minütige Zentrifugation mit 2400 U/min und Bremse bei Raumtemperatur (Megafuge 1,0 Fa. Heraeus Sepatech, Osterode am Harz).

Abnehmen der Interphasezellen

Nach Absaugen der Fettschicht Abpipettieren und Verwerfen des Plasmas. Durch vorsichtiges Pipettieren Entnahme der Interphasezellen aus der Suspension. Pooling der Interphasezellen der bis dahin getrennt aufgearbeiteten Knochenmarkspirate. Darauf Waschschrift mit Waschpuffer im Verhältnis 1:5 (10 min mit 1300 U/min).

Waschpuffer:

500 ml Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) nach Dulbecco ohne Mg^{++} und Ca^{++} , pH 7,2 (Fa. Life Technologies, Gibco BRL)

25 ml Fötale Kälberserum (FCS) (Fa. Life Technologies, Gibco BRL)

Hämolyse

Zur vollständigen Elimination der Erythrozyten 5-minütige Inkubation des Zellpellets mit 5 ml Hämolysepuffer auf Eis. Danach erneuter Waschschrift mit Waschpuffer im Verhältnis 1:10 (10 min mit 1300 U/min).

Hämolysepuffer:

150 mM HN_4CL (Sigma Chemical Co., St. Louis USA)

10 mM $KHCO_3$ (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

0,1 mM EDTA (Unites States Biochemicals, Cleveland Ohio)

Einstellen der Zellzahl

Bestimmung der absoluten Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Blaubrand® Fa. Brand, Wertheim). Danach Einstellen der Zellsuspension auf 1×10^6 Knochenmarkzellen pro ml.

Herstellung, Fixierung und Lagerung der Zytozentrifugenpräparate

Herstellung der Zytozentrifugenpräparate durch 5-minütige Zentrifugation von je 1 ml der Zellsuspension, entsprechend 1×10^6 Knochenmarkzellen, mit 2200 U/min mit Hilfe einer Zytozentrifuge (Cytospin 3, Fa. Shandon, Pittsburgh) auf Objektträger vom Typ Super Frost[®] (Fa. Menzel, Braunschweig). Zur Kontrolle der optimalen Zelldichte lichtmikroskopisch grobe Durchsicht der Präparate. Insgesamt Anfertigung von 12 Präparaten pro Patientin.

Nach Trocknen der Präparate über Nacht, Fixation von 8 Präparaten 5 min lang in -20°C gekühltem Methanol (Fa. Merck, Darmstadt). Fixation der restlichen 4 Präparate 15 min lang in 3,7% Formalin in PBS und Nachfixation 5 min lang in -20°C gekühltem Methanol.

Aufbewahrung der methanolfixierten Präparate in luftdichten Objektträgerkästen bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Lagerung der formalinfixierten Präparate in Glasküvetten mit Aufbewahrungsmedium bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Aufbewahrungsmedium

120 g Saccharose (Fa. Merck, Darmstadt)

0,8 g MgCl_2 (Fa. Merck, Darmstadt)

500 ml PBS (Fa. Life Technologies, Gibco, BRL)

Glycerol (Fa. J. T. Baker, Deventer Holland)

2.3 Immunzytochemischer Tumorzellnachweis

2.3.1 Verwendeter monoklonaler Antikörper

Verwendung des monoklonalen Antikörpers Mak5D3 gegen die Cytokeratin-komponenten 8, 18 und 19 (Fa. BioGenex, San Ramon, CA).

2.3.2 Durchführung der Immunzytochemischen Markierung

Durchführung der immunzytochemischen Färbung mit der markierten Streptavidin-Biotin-Technik (LSB) mit Alkalischer-Phosphatase-konjugiertem-Streptavidin.

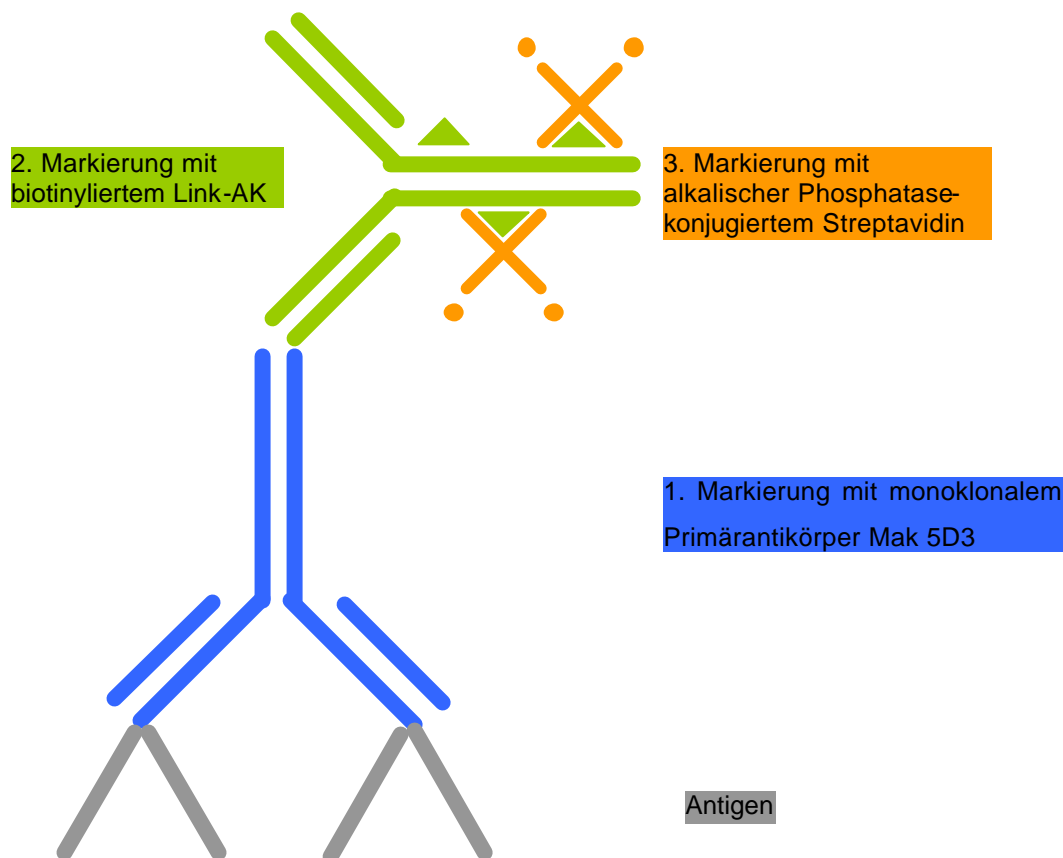


Abbildung 2.3.: Markierte Streptavidin-Biotin-Technik

Pro Patientin Färbung von 2-6 Objektträger in jeweils unabhängigen Färbedurchgängen. Mitführung einer Positivkontrolle mit zugesetzten Mammakarzinomzellen der Zelllinie T-47D bei jedem Färbedurchgang.

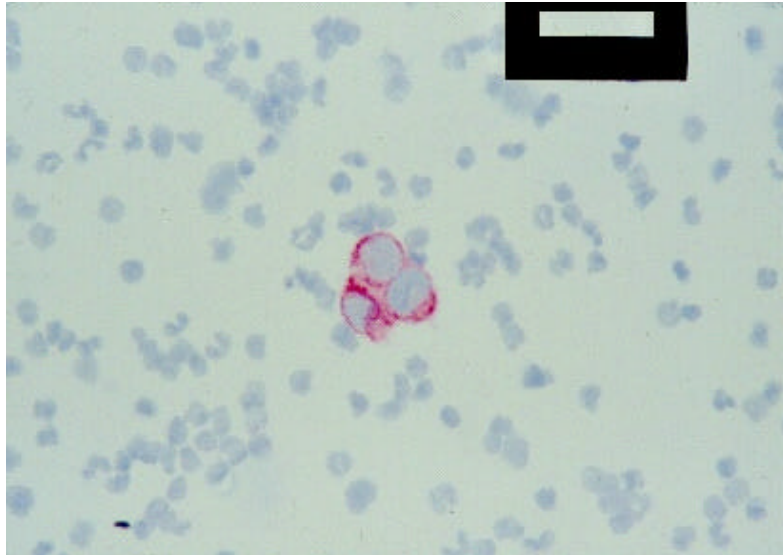


Abbildung 2.4.: Positivkontrolle Mammakarzinomlinie T-47D

Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase

Zur Vermeidung einer unspezifischen Farbreaktion, Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase der Knochenmarkzellen durch Zugabe von Levamisol (Fa. BioGenex, San Remo, CA) im Substratansatz und durch Inkubation mit 20%-iger Essigsäure (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe), sowie mit 2,28%-iger Perjodsäure (Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für einen Zeitraum von jeweils 10 min.

Blockierung der unspezifischen Proteinbindung

Zur Hemmung der unspezifischen Bindung des Primär-Antikörpers, Auftragen von jeweils 100 µl einer Suspensionslösung, bestehend aus Proteinblock (Power-Block, Fa. BioGenex, San Ramon, CA) und Aqua dest. (Fa. Delta Pharma,

Boehringer Ingelheim) im Verhältnis 1:10 in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 10 min.

Erste Markierung mit dem Primärantikörper

Auftragen von 100 µl der Antikörperlösung, bestehend aus Primär-AK (monoklonaler Antikörper Mak 5D3, Fa. BioGenex, San Ramon, CA) und BSA (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in einem Verhältnis von 1:100, auf die Objektträger. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 35 min. Danach dreimaliges Waschen in TBS (United States Biochemicals, Cleveland Ohio).

Zweite Markierung mit dem biotinylierten Link-Antikörper

Beschichtung der Objektträger mit 100 µl des gebrauchsfertigen Link-Antikörpers (Fa. BioGenex, San Ramon, CA) und Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 20 min. Entfernung des Überstands durch dreimaliges Waschen in TBS.

Dritte Markierung mit dem enzymmarkierten Streptavidin

Beschichtung der Objektträger mit 100 µl des gebrauchsfertigen, mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (Fa. BioGenex, San Ramon, CA) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für einen Zeitraum von 20 min. Danach dreimaliges Waschen in TBS.

Farbreaktion durch Zugabe von Substratlösung

Zubereitung der Substratlösung durch Auflösen einer Tablette Fast Red Chromogen (Fa. BioGenex, San Ramon, CA) in 5 ml Naphtol-AS-MX-Phosphat (mit N,N-Dimethylformamid als Lösungsvermittler (Fa. BioGenex, San Ramon, CA) eine Stunde vor Gebrauch und Lagerung im Dunkeln. Kurz vor Verwendung, Zugabe von zwei Tropfen Levamisol (Fa. BioGenex, San Ramon, CA) zur zusätzlichen Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase. Reaktion des

Substrats mit alkalischer Phosphatase zu einem intensiv roten Farbstoff. Zur Vermeidung von Trübungen Filtration der Substratlösung vor dem Auftragen.

Auftragen von jeweils 1-2 Tropfen der Substratlösung. Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur und Dunkelheit für einen Zeitraum von 15 min. Danach mikroskopische Kontrolle der Farbreaktion. Anschließend Entfernen des Überstands durch einmaliges Waschen in TBS 1% Triton x100 (Fluca Chemie AG, CH-Buchs).

Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Gegenfärbung in Hämatoxylin II nach Gill (Verd. 1:10) (Fa. Merck, Darmstadt) für einen Zeitraum von 5 min. Danach Bläuen in Ammoniakwasser (Suprapur®, Fa. Merck, Darmstadt) für einen Zeitraum von 10 s sowie in Leitungswasser für einen Zeitraum von 10 min. Zuletzt Eindecken der Objektträger mit wasserlöslichem Aquatex (Fa. Merck, Darmstadt).

Präparatauswertung

Durchsicht der eingedeckten Zytozentrifugenpräparate bei 10-facher Vergrößerung mit einem Durchlichtmikroskop der Firma Nikon. Genaue Identifizierung der Tumorzellen bei 40-facher Vergrößerung aufgrund der immunzytochemischen Farbreaktion und morphologischer Malignitätskriterien [60]. Pro Patientin Beurteilung von vier Zytozentrifugenpräparate durch jeweils zwei unabhängige Personen. Die Patientendaten waren den Untersuchern nicht bekannt.

2.4 Statistik

Die statistische Analyse der Patientendaten wurde mit dem SAS-System für Windows Release 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC; USA) vorgenommen.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen Tumorzellnachweis und klinischen Parametern wurde der Fisher's Exact-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Inzidenz CK-positiver Knochenmarksbefunde

Von 90 untersuchten Patientinnen gingen 83 in die abschließende Auswertung ein, 7 Patientinnen wurden aufgrund der Ausschlusskriterien nicht gewertet. Bei 17/83 (20,5%) Patientinnen waren maligne epitheliale Zellen im Knochenmark nachweisbar.

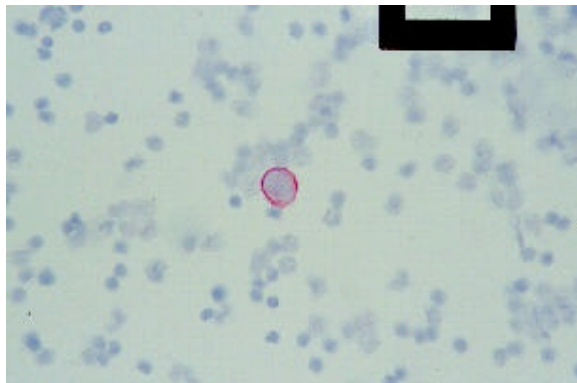


Abbildung 3.1.:CK-positiver Knochenmarkbefund

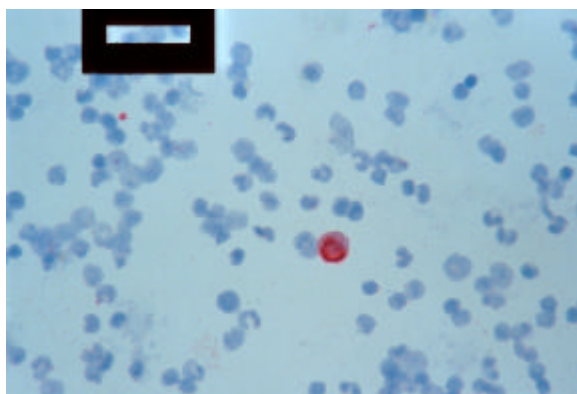


Abbildung 3.2.: CK-positiver Knochenmarkbefund

3.2 Patientencharakteristik und Ergebnis der KM-Punktion zum Zeitpunkt der Primäroperation

Tabelle 3.1.: Patientencharakteristik und Ergebnis der KM-Punktion zum Zeitpunkt der Primäroperation

	<i>Anzahl der Pat. mit CK-pos. Zellen (%)</i>	<i>Anzahl der Pat. ohne CK-pos. Zellen (%)</i>
Tumorgroße		
T1	2/28 (7,1%)	26/28 (92,95%)
T2	9/33 (27,3%)	24/33 (72,7%)
T3	1/6 (16,7%)	5/6 (83,3%)
T4	5/16 (31,2%)	11/16 (68,8%)
Nodalstatus		
No	5/42 (11,9%)	37/42 (88,1%)
N1	11/36 (30,5%)	25/36 (69,5%)
N2	1/5 (20,0%)	4/5 (80,0%)
Menopausenstatus		
Prämenopausal	6/25 (24,0%)	19/25 (76,0%)
Postmenopausal	11/58 (19,0%)	47/58 (81,0%)
Nukleäres Grading		
G1	0/5 (0,0%)	5/5 (100,0%)
G2	7/49 (14,3%)	42/49 (85,7%)
G3	10/29 (34,5%)	19/29 (65,5%)
Hormonrezeptorstatus		
HR positiv	16/73 (21,9%)	57/73 (78,1%)
HR negativ	1/10 (10,0%)	9/10 (90,0%)
Tumormarkerstatus		
TM positiv	10/54 (18,5%)	44/54 (81,5%)
TM negativ	7/29 (24,1%)	22/29 (75,9%)
p53 Gehalt		
p53 positiv	10/37 (27,0%)	27/37 (73,0%)
p53 negativ	7/46 (15,2%)	39/46 (84,8%)
mib-1 Gehalt		
mib-1 stark positiv	7/24 (29,2%)	17/24 (70,8%)
mib-1 positiv	3/20 (15,0%)	17/20 (85,0%)
mib-1 negativ	7/39 (18,0%)	32/39 (82,0%)
HER2/neu Expression		
c-neu positiv	1/3 (33,3%)	2/3 (66,6%)
c-neu negativ	16/80 (20,0%)	64/80 (80,0%)

3.3 Knochenmarkbefund und Tumorgröße

In der Gruppe mit T1-Tumorstadien zeigten 2/28 (7,1%) Patientinnen CK-positive Zellen im Knochenmark. In der Gruppe mit T2-T4-Tumorstadien wurden 15/55 (27,3%) Patientinnen CK-positiv gewertet.

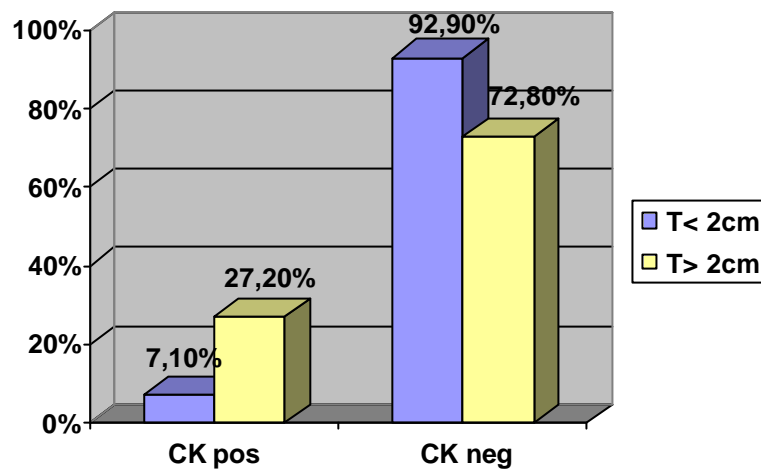


Abbildung 3.3.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei Tumorgröße T1 und T2-T4

Es besteht eine signifikante Korrelation ($p=0,026$) zwischen der Tumorgröße und dem Auftreten CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.4 Knochenmarkbefund und Nodalstatus

Bei 5/42 (11,9%) Patientinnen mit negativem Nodalstatus fanden sich CK-positive Zellen im Knochenmark. Die Gruppe mit positivem Nodalstatus zeigte in 17/41 (49,4%) Fällen CK-positive Zellen im Knochenmark.

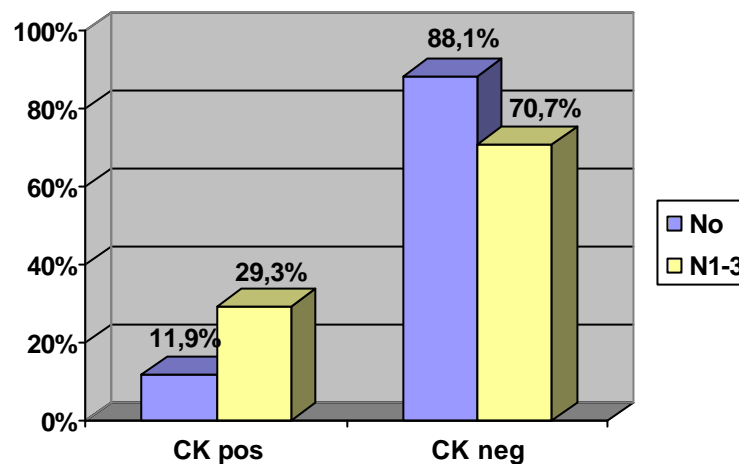


Abbildung 3.4.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei negativem und positivem Nodalstatus

Es besteht eine signifikante Korrelation ($p=0,045$) zwischen einem positiven Lymphknotenstatus und dem Nachweis von CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.5 Knochenmarkbefund und Menopausenstatus

Bei 6/25 (24,0%) prämenopausalen Patientinnen wurden CK-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. 11/58 (19,0%) postmenopausalen Patientinnen zeigten einen positiven Knochenmarkbefund.

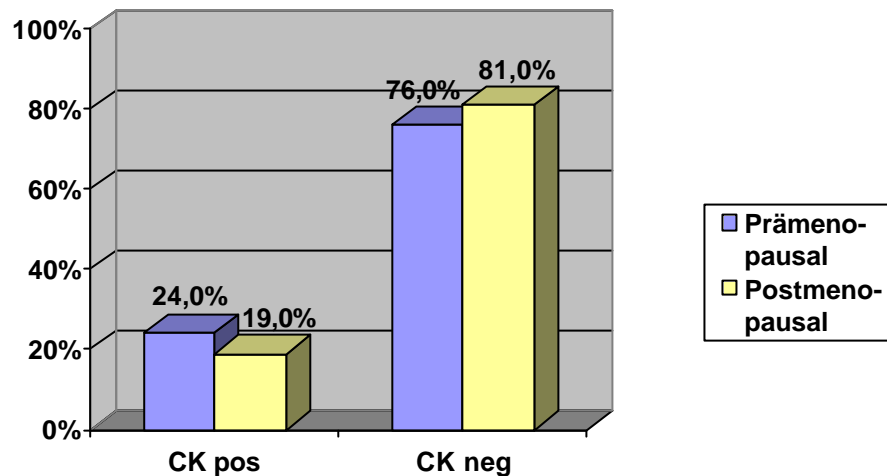


Abbildung 3.5.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation ($p=0,403$) zwischen dem Auftreten CK-positiver Zellen im Knochenmark und Menopausenstatus.

3.6 Knochenmarkbefund und Grading

7/54 (13,0%) der Patientinnen mit gut bis mäßig (G1/G2) differenzierten Tumoren wiesen CK-positive Zellen im Knochenmark auf. 10/29 (34,5%) der Patientinnen mit schlecht differenzierten Tumoren (G3) waren positiv.

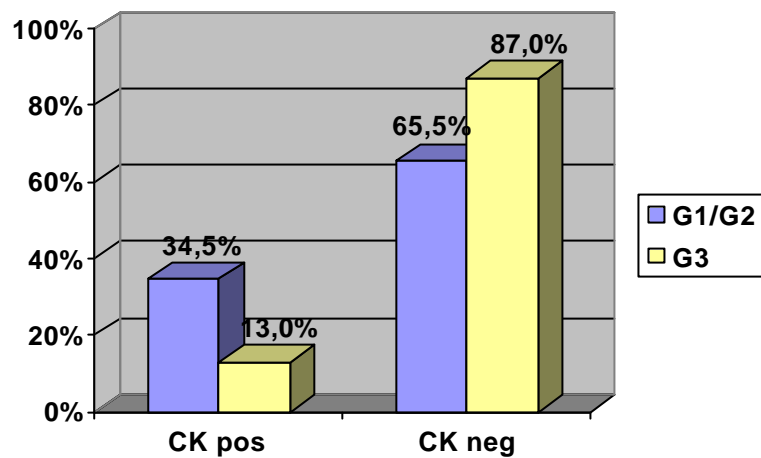


Abbildung 3.6.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei gut bis mäßig bzw. schlecht differenzierten Tumoren

Es besteht eine signifikante Korrelation ($p=0,023$) zwischen Grading und Knochenmarkbefund.

3.7 Knochenmarkbefund und histologische Differenzierung

Bei 3/7 (42,9%) der Patientinnen mit lobulär-invasiven Karzinomen wurden CK-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. Bei 14/76 (18,4%) der Patientinnen mit duktal-invasiven Mammakarzinomen fanden sich CK-positive Zellen im Knochenmark.

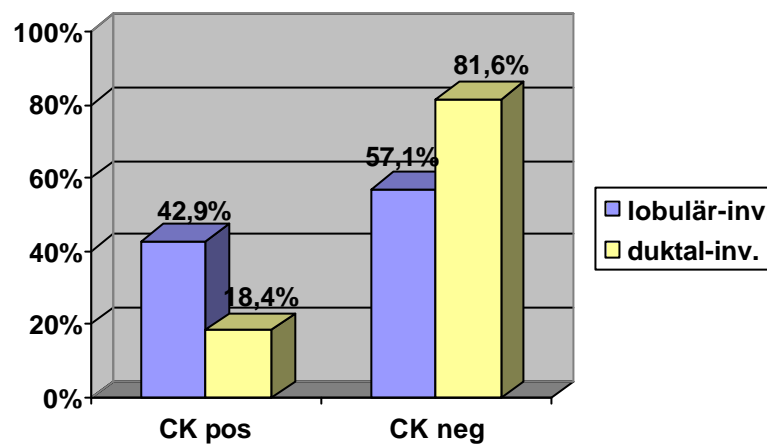


Abbildung 3.7.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei lobulär-invasiven sowie duktal-invasiven Tumoren

Es ergibt sich keine signifikante Korrelation ($p=0,148$) zwischen histologischer Differenzierung und dem Auftreten CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.8 Knochenmarkbefund und Hormonrezeptorstatus

Bei 1/10 (10,0%) Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus wurden CK-positive Zellen im Knochenmark gefunden. Bei 16/73 (21,9%) Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus ließen sich CK-positive Zellen im Knochenmark feststellen.

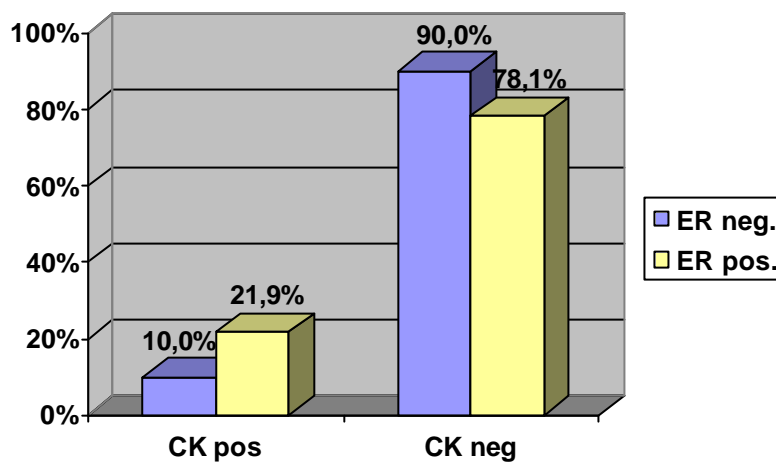


Abbildung 3.8.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei negativem sowie positivem Östrogenrezeptorstatus

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation ($p=0,345$) zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und dem Nachweis CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.9 Knochenmarkbefund und Tumormarkerstatus

Bei 10/54 (18,5%) Patientinnen ohne erhöhte Tumormarker fand sich ein positiver Knochenmarkbefund. 7/29 (24,1%) Patientinnen mit initial erhöhten Werten zeigten CK-positive Zellen im Knochenmark.

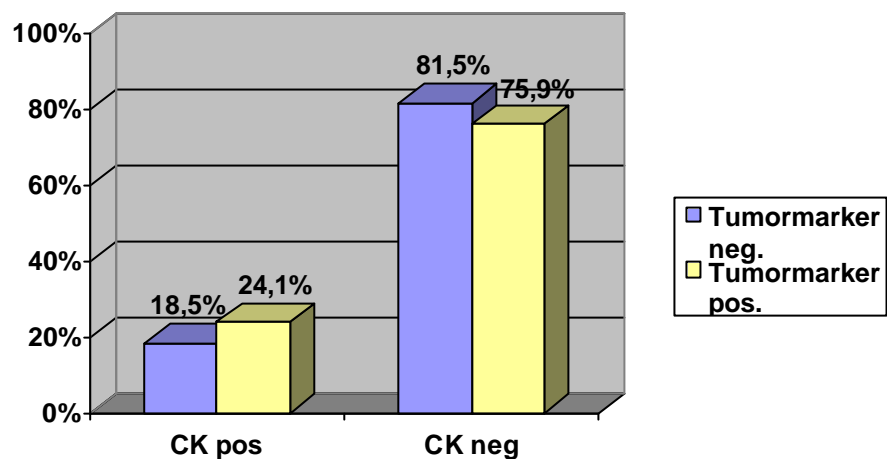


Abbildung 3.9.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei negativem sowie positivem Tumormarkerstatus

Es besteht keine signifikante Korrelation ($p=0,369$) zwischen Tumormarkerstatus und dem Nachweis CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.10 Knochenmarkbefund und p53-Expression

10/37 (27,0%) Patientinnen mit p53-Expression wiesen CK-positive Zellen im Knochenmark auf. 7/46 (15,2%) Patientinnen ohne p53-Expression zeigten einen positiven Knochenmarkbefund.

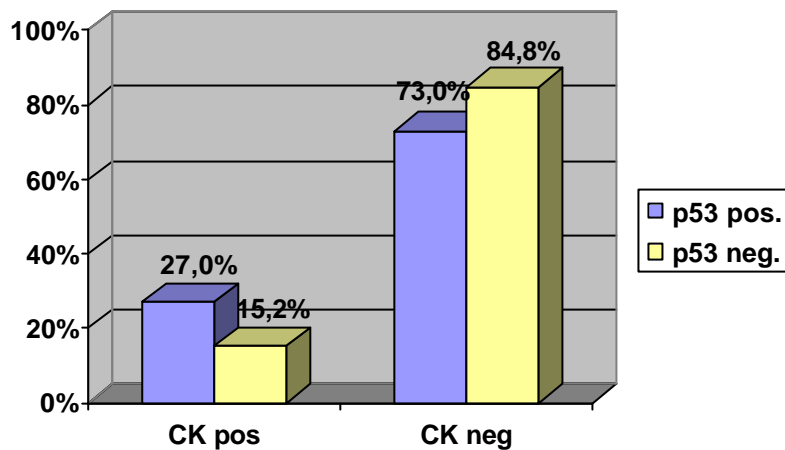


Abbildung 3.10.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei positiver sowie negativer p53-Expression

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation ($p=0,147$) zwischen p53-Expression und dem Auftreten CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.11 Knochenmarkbefund und mib-1-Expression

Bei 10/44 (22,7%) Patientinnen mit mib-1-Expression wurden CK-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. Bei 7/39 (18,0%) Patientinnen ohne mib-1-Expression fanden sich CK-positive Zellen im Knochenmark.

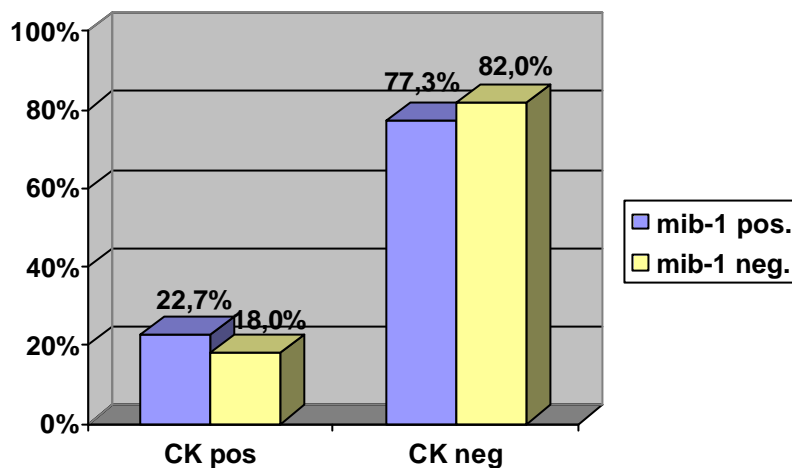


Abbildung 3.11.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen bei positiver sowie negativer mib-1-Expression

Es ergibt sich keine signifikante Korrelation ($p=0,791$) zwischen mib-1-Expression und positivem Knochenmarkbefund.

3.12 Knochenmarkbefund und HER2/neu-Expression

Lediglich 3/83 (3,6%) Patientinnen exprimierten das Protein c-neu. Davon zeigte eine Patientin (33,3%) einen positiven Knochenmarkbefund. 16/80 (20,0%) Patientinnen ohne HER2/neu-Expression wiesen CK-positive Zellen im Knochenmark auf.

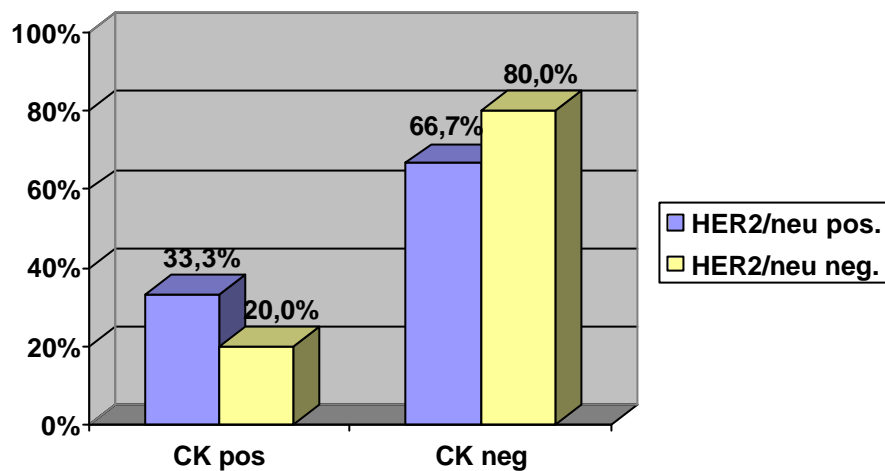


Abbildung 3.12.: Prozentualer Anteil der Patientinnen mit bzw. ohne CK-positive Zellen

Es besteht keine signifikante Korrelation ($p=0,502$) zwischen HER2/neu-Expression und dem Nachweis CK-positiver Zellen im Knochenmark.

3.13 Übersicht der Ergebnisse

Tabelle 3.2.: Übersicht der p-Werte für Korrelation zwischen CK-positiven Zellen und klinischen Variablen

<i>KM-Befund und Prognosefaktoren</i>	<i>Signifikanz</i>
KM-Befund und Tumorgroße	sign., p=0,026
KM-Befund und Nodalstatus	sign., p= 0,045
KM-Befund und Menopausenstatus	n. sign., p=0,403
KM-Befund und Grading	sign., p=0,023
KM-Befund und histologische Differenzierung	n. sign., p=0,148
KM-Befund und Hormonrezeptorstatus	n. sign., p=0,345
KM-Befund und Tumormarkerstatus	n. sign., p=0,369
KM-Befund und p53-Expression	n. sign., p=0,147
KM-Befund und mib-1-Expression	n. sign., p=0,791
KM-Befund und HER2/neu-Expression	n. sign., p=0,502

4 Diskussion

In den letzten Jahren haben sich bereits mehrere Arbeitsgruppen mit dem Nachweis einzelner Tumorzellen im Knochenmark beschäftigt. Wegen mangelnder Standardisierung der verwendeten Antikörper und unterschiedlicher Selektion des Patientenkollektivs war es allerdings bisher nicht möglich, Aussagen über die prognostische Relevanz dieses Verfahrens zu treffen.

Das Interesse dieser Arbeit galt insbesondere

- der Etablierung der immunzytochemischen Färbemethode mit Antikörpern gegen Cytokeratine an der Universitätsfrauenklinik Ulm,
- der Durchführung dieser Methode unter standardisierten Bedingungen zur besseren Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode und der prognostischen Relevanz,
- der Korrelation des Tumorzellnachweises im Knochenmark mit den gesicherten Prognosefaktoren (Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading, Histologie, Menopausenstatus, Hormonrezeptorstatus) , den Tumormarkern (CEA und CA 15-3) sowie mit neuen Prognosefaktoren wie mib1, HER2/neu und p53,
- der Erstellung eines Basiskollektivs, das für follow-up-Untersuchungen herangezogen werden kann.

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Knochenmark als Ort der disseminierten Tumorzell- aussaat

Wie Obduktionsstudien zeigten, ist das Skelett beim Mammakarzinom der Prädilektionsort einer Fernmetastasierung [40, 54, 121]. Diese Erkenntnis führte zu der Überlegung, dass die frühe Untersuchung des Knochenmarkes hilfreich bei der Diagnose einer okkulten Tumorausbreitung sein könnte. Bemerkenswerterweise konnten auch bei gastrointestinalen Karzinomen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden [53, 135, 136, 137]. Dieser Befund ist insofern überraschend, da jene Tumoren ein anderes Metastasierungsmuster zeigen und primär in die Leber und nur in 6-8 % der Fälle in das Skelett metastasieren [136, 137]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass einzelne maligne Zellen im Knochenmark ein Indiz für eine Generalisation der Erkrankung sein können.

Die Untersuchung des Knochenmarkes bietet sich noch aus weiteren Gründen an. Das Knochenmark ist ein leicht zugängliches Kompartiment. Die Knochenmarkpunktion ist deshalb eine etablierte Methode, die in vielen Fachgebieten, vor allem der Hämatologie, Endokrinologie und Osteologie routinemäßig zur Diagnosesicherung angewandt wird [7, 23, 84]. Der Eingriff ist darüber hinaus für die Patientinnen wenig belastend, da er in Lokalanästhesie durchgeführt werden kann und mit einer geringen Komplikationsrate und Morbidität einhergeht. So berichten Diel et al. bei 2052 Punktionen lediglich über eine stärkere Nachblutung aus dem Stichkanal, die intraoperativ ligiert werden musste [41, 42]. Weitere seltene Komplikationen waren Hämatome und länger als drei Tage andauernde Schmerzen. Aufgrund der geringen Morbidität kann die Knochenmarkpunktion im Krankheitsverlauf mehrfach eingesetzt werden.

Neben der Blutbildung fungiert das Knochenmark als Filterstation. Aufgrund eines einzigartigen sinusoidalen Systems im Markraum findet ein intensiver

Zellaustausch zwischen zirkulierendem Blut und Stroma statt, wodurch es zu einer Anreicherung von Tumorzellen kommt [18, 30]. Im Gegensatz dazu finden sich in peripherem Blut, aufgrund des großen Verteilungsraumes deutlich weniger maligne Zellen [92]. Knochenmark ist Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Somit finden sich dort auch in der Regel keine epithelialen Zellen, wie sie z. B. für Zellen solider Tumoren wie dem Mammakarzinom charakteristisch sind.

Über die, für eine maximale Zellausbeute notwendige Anzahl der Punktionsstellen, herrschte lange Zeit Unklarheit. Prinzipiell ist die Entnahme von Knochenmark an mehreren Stellen des Körpers möglich: dorsaler sowie ventraler Beckenkamm, Sternum, Wirbelkörper und Femurdiaphyse. Die Punktion des Beckenskeletts erscheint hinsichtlich der Detektion disseminierter Tumorzellen sehr gut geeignet, da dort in 70% der Fälle Metastasen nachweisbar sind [37, 149]. Außerdem fiel die Trefferquote an disseminierten Tumorzellen bei Knochenmarkpunktionen aus dem Sternum oder der Femurdiaphyse wesentlich geringer aus [159]. Allerdings favorisiert eine neue Studie von Relihan et al. die Knochenmarkpunktion der Rippe, welche hinsichtlich der Detektionsrate disseminierter Zellen jener des Beckenkamms überlegen sein soll. [127].

Für eine repräsentative Probe erwies sich die unilokuläre Knochenmarkpunktion als ungenügend [94, 136]. Pantel et al zeigten, dass sich die Anzahl tumorzellpositiver Proben bei Punktion des linken bzw. rechten Beckenkammes von 36% bzw. 38% auf 56% bei beidseitiger Punktion erhöht [118]. In der Untersuchung von Kasimir-Bauer war in 67% der tumorzellpositiven Fälle nur eine der beiden Aspiate positiv [74]. Dies lässt sich mit der geringen absoluten Zahl an Tumorzellen im Knochenmark und ihrer uneinheitlichen Verteilung im Skelettsystem erklären [34, 92, 135]. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wird daher die multilokuläre Gewinnung von Knochenmark empfohlen. In mehreren Studien wurden deshalb Knochenmarkpunktionen an 6-8 Stellen durchgeführt [9, 34, 39, 90, 126]. Zur Anwendung der Knochenmarkpunktion als Verlaufsparmeter wäre die Punktion an solch vielen Stellen für die Patientinnen aber unzumutbar. Außerdem zeigten Dearnaley et al. und Pantel et al., dass schon mit zwei Aspiate – jeweils eines von der rechten und der linken Spina iliaca anterior oder posterior – 80% bzw. 90% der malignen Zellen bei Mammakarzinompatientinnen identifiziert werden können [34, 118]. Daher gilt die bilaterale

Knochenmarkpunktion derzeit als Standard und zeichnet sich darüber hinaus durch eine gute Patientencompliance aus [2, 53, 136].

Unklarheit herrschte ebenfalls bezüglich des idealen Zeitpunktes der Knochenmarkentnahme, also inwieweit die prä- oder postoperative Knochenmarkpunktion die Nachweisrate maligner Zellen im Knochenmark beeinflusst. Fraglich war, ob das Streuen von Tumorzellen durch chirurgische Manipulation am Primärtumor (Tumorzell-Shedding) die Detektionsrate beeinflusst. Singhal überprüfte daher die Detektionsrate von 116 Mammakarzinompatientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme der Tumor bereits entfernt war, mit 260 Patientinnen mit vorhandenem Tumor [142]. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied dieser beider Gruppen. Dieses Ergebnis bestätigen Diel et al. bei Patientinnen mit Mammakarzinom sowie Pantel et al. bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom [41, 117]. Demzufolge wird die absolute Zahl an Tumorzellen im Knochenmark durch das Tumorzell-Shedding nicht beeinflusst; der Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme ist somit zu vernachlässigen.

Des Weiteren muss man die Möglichkeit der Verdünnung der Knochenmarkaspirate durch peripheres Blut berücksichtigen. Aufgrund des sinusoidalen Systems des Knochenmarkraumes ist die Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung sehr hoch [92].

4.1.2 Konventionelle histologische Methoden

Mit konventionellen bildgebenden Methoden wie Röntgen, Computertomographie, Sonographie und Szintigraphie ist erst ein Gewebeumbau oder eine Gewebezerrstörung zu erkennen [27, 98, 103]. Die Nachweisgrenze liegt bei 1-2 cm. Zur Diagnostik kleinerer Metastasen oder einzelner Tumorzellen sind diese Verfahren deshalb nicht geeignet [25, 27, 65, 71, 98, 103, 135, 149]. So blieben bei kolorektalen Karzinomen 10% Prozent der Leberfiliae und 40% Prozent der peritonealen Filiae durch Sonographie, Computertomographie- und Magnetresonanz- Untersuchungen unerkant [111].

Ebenso zeigt die konventionelle histologische Aufarbeitung von Knochenmarksausstrichen und Zytozentrifugenpräparaten nur in seltenen Fällen eine Tumordinfiltration. Der Nachweis kleiner Tumorzellansammlungen oder einzelner Tumorzellen wird sogar als rein zufällig beschrieben und gelingt nur ausnahmsweise [33, 34, 126, 145] oder nur in einem deutlich geringeren Prozentsatz verglichen mit immunzytochemischen Methoden [30, 113, 116].

Das Problem bei konventioneller histologischer und zytologischer Diagnostik von Zellausstrichen und Zytozentrifugenpräparaten des Knochenmarkes liegt darin, dass die Identifizierung maligner Zellen allein aufgrund ihrer Morphologie erfolgt. Jedoch liegen im Knochenmark stets zahlreiche Zellreihen unterschiedlicher Reife vor, die rein morphologisch oft nicht von den sehr heterogenen malignen Zellen unterschieden werden können. Somit ist es häufig nicht möglich die Herkunft des Tumors allein aufgrund morphologischer Merkmale festzustellen. Erschwerend kommt die niedrige Anzahl maligner Zellen im Knochenmark hinzu.

4.1.3 Immunzytochemische Verfahren mit monoklonalen Antikörpern

Ein neuer diagnostischer Ansatz zum Nachweis einzelner Tumorzellen ist die Anwendung der Immunzytochemie, deren Anfänge auf Coons zurückgehen [28]. Ihm gelang es bereits in den vierziger Jahren, Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren. Der entscheidende Durchbruch war jedoch die Entwicklung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein im Jahre 1975 [78]. Monoklonale Antikörper besitzen gegenüber polyklonalen Antikörpern den Vorteil, spezifisch für ein einziges Epitop zu sein und bei gleichbleibender Qualität unbegrenzt produzierbar zu sein.

Auf diese Weise ließen sich in verschiedenen Kompartimenten, wie Knochenmark, Blut oder Lymphknoten Tumorzellen nachweisen, die durch konventionelle Methoden nicht erfasst wurden [9, 34, 39, 51, 85, 89, 90, 105, 115, 126, 135, 136, 139]. Osborne et al. zeigten anhand statistischer Analyse, dass es mit Hilfe der monoklonalen Antikörper-Technik möglich ist, eine einzelne maligne Zelle in 1×10^6 Knochenmarkszellen zu identifizieren [113].

4.1.4 Antikörper zur immunzytochemischen Darstellung von epithelialen Tumorzellen

Im Jahre 1979 entwickelten Heyderman et al. ein Antiserum gegen Membranen, die sich von human milk fat-Globulinen ableiten und nannten die davon erkannten Antigene „epithelial membrane antigen“ (EMA) [63]. Diese Antigene sind auf der Oberfläche luminaler Membranen lokalisiert und gehören zu der tumorassoziierten Muzinfamilie. Mehrere Studien zeigten, dass EMA von normalen Epithelien sowie von epithelialen Tumoren exprimiert werden [29, 63, 123, 145, 146, 147, 152]. Mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen EMA war es möglich, maligne Zellen epithelialen Ursprungs zu erkennen. 1980 setzten Sloane et al. erstmals diesen Antikörper erfolgreich zum Nachweis maligner Zellen im Knochenmark mittels eines neuen immunzytochemischen Verfahrens ein [145]. Dies veranlasste eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen, die Bedeutung des Nachweises einzelner maligner Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen unter Verwendung des anti-EMA-Antikörpers zu untersuchen [9, 32, 34, 52, 75, 88, 100, 102, 124, 126, 133, 158]. Sie erzielten dabei Detektionsraten zwischen 2% und 48%. Diese Ergebnisse wurden jedoch in Frage gestellt, da nachgewiesen wurde, dass nicht-epitheliale Gewebe, wie Plasmazellen und Erythrozytenvorstufen ebenfalls von anti-EMA-Antikörpern angefärbt werden [38, 83, 153].

Die Arbeitsgruppe um Diel verwendete für ihre Untersuchungen den selbst entwickelten murinen monoklonalen Antikörper 2E11. Dieser Antikörper bindet an das Coreprotein des tumorassoziierten Glykoproteins TAG12 [41]. TAG12 ist homogen in 96% der Mammakarzinome sowie in hoher Konzentration in Zellmembranen, im Zytoplasma und in Sekreten zu finden und gehört wie EMA zur Superfamilie der polymorphen epithelialen Muzine. Diel et al. untersuchten mit diesem Antikörper 1026 Patientinnen und wiesen bei 42% davon Tumorzellen im Knochenmark nach [41]. Diese Ergebnisse wurden jedoch durch den Nachweis von Kreuzreaktionen mit hämatopoetischen Zellen in Frage gestellt [2, 16, 22, 116, 165]. Diel et al. wiesen selbst auf 22 Patientinnen hin, bei denen basophile Myelozyten und Monozyten mit dem Antikörper 2E11 angefärbt wurden. Da diese Patientinnen zusätzlich morphologisch eindeutig als Tumorzellen identifizierte Zellen im Knochenmark aufwiesen, sei allerdings keine Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten. Jedoch ergab eine von Braun et al. durchgeführte Kontrollfärbung bei

über 60% gesunder Patientinnen eine falsch positive Reaktion. Weiter zeigte eine durchgeführte Doppelfärbung eine Koexpression zwischen TAG12-positiven Zellen und dem allgemeinen Leukozyten-Antigen CD45 [16]. Dieses Ergebnis bestätigten Zhong et al. mittels der PCR-Methode [166], sowie Ahr et al. durch immunzytochemischen Nachweis [2]. Letztere untersuchten zusätzlich den Zusammenhang zwischen der Dosierung des Antikörpers und dem Auftreten einer unspezifischen Farbreaktion. Demnach kann durch eine niedrige Dosierung des Antikörpers die unspezifische Reaktion nahezu eliminiert werden [2].

Ein weiterer Fortschritt war die Entwicklung von Antikörpern, die nicht gegen Muzine, sondern gegen Cytokeratin, die Intermediärfilamente des epithelialen Gewebes, gerichtet sind. Debus et al. entwickelten den monoklonalen Antikörper CK2 gegen die Cytokeratinkomponente Nr. 18 [36]. Dieses Cytokeratinpeptid wird von allen *einfachen* Epithelien sowie davon abgeleiteten Tumoren exprimiert. In mehrschichtigen, squamösen Epithelien wie Epidermis, Oropharynx und Ösophagus ist es allerdings nicht nachweisbar [104]. Somit ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination mit Hautpartikeln, die bei der Knochenmarkpunktion in das Aspirat gelangen könnten, ausgeschlossen. Mehrere Studien belegten, dass der Antikörper gegen die Cytokeratinkomponente Nr. 18 eine höhere Spezifität im Vergleich zu anti-Muzin-Antikörpern aufweist, ohne Kreuzreaktionen mit hämatopoetischen Zellen zu zeigen [115, 135, 153].

Pantel et al. und Schaller et al. berichteten jedoch über eine mögliche, durch das myk-Protoonkogen vermittelte, posttranskriptionale Downregulation von CK18 [116, 134]. Ein Antikörpervergleich erhärtete diese These. Die Verwendung eines Pancytokeratin-Antikörpers gegen die Cytokeratinkomponenten 8, 18 und 19 (Mak A45-B/B3) führte zu einem signifikant höheren Nachweisergebnis cytotkeratinmarkierter Zellen (43.0%) im Vergleich zum Gebrauch eines anti-CK18-Antikörpers (25.6%) [116]. Die Pancytokeratin-Antikörper berücksichtigen durch ihr breites Spektrum die antigene Heterogenität der einzelnen Tumorzellen und erreichen dadurch die höchste Sensitivität [13, 15, 17, 18, 19, 21, 73, 74, 131, 135, 136, 153]. Mehrere Studien bestätigen die Überlegenheit der Pancytokeratin-Antikörper, die sich als Standard zum Nachweis maligner epithelialer Zellen durchgesetzt haben [15, 16, 19, 53, 56, 61, 67, 69, 74, 85, 87, 109, 119, 161]. Allerdings wird auch hier über die Möglichkeit unspezifischer Reaktionen mit anti-

Cytokeratin-Antikörpern berichtet. Einige Arbeitsgruppen wiesen aberrante Reaktionen durch inflammatorisch aktivierte Plasmazellen nach [44, 69]. Diese Reaktion tritt jedoch im Vergleich mit der bekannten Kreuzreaktion muriner Antikörper wesentlich seltener auf (1%). Ebenfalls wird eine direkte Reaktion mit alkalischer Phosphatase für falsch-positive Ergebnisse verantwortlich gemacht [12]. Demgegenüber belegten mehrere Arbeitsgruppen, dass die pancytokeratin-markierten Zellen eine zum Primärtumor passende zytogenetische Instabilität aufweisen [76, 106], was durch Zellkulturstudien verifiziert werden konnte [125]. Somit wurden die mit Pancytokeratin-Antikörpern markierten Zellen eindeutig als Tumorzellen identifiziert.

4.1.5 Beurteilung der immunzytochemischen Färbemethode und Verbesserungsmöglichkeiten

Mit dem Pancytokeratin-Antikörper scheint somit ein geeigneter Marker zum immunzytochemischen Nachweis maligner epithelialer Zellen im Knochenmark gefunden zu sein. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Visualisierung und somit direkten Beurteilung der einzelnen Tumorzellen. Jedoch stellt die subjektive Einschätzung des Betrachters auch eines der größten Probleme dar. Beachtet werden muss auch der große zeitliche Aufwand der Methode, so nahm die Aufarbeitung der Knochenmarkspirate sowie die immunzytochemische Färbung bei unserer Untersuchung einen ganzen Arbeitstag in Anspruch. Zudem erwies sich die mikroskopische Durchsicht der Präparate mit durchschnittlich 2×10^6 Knochenmarkzellen pro Patientin als sehr zeitaufwendig. Um diese Methode auch im klinischen Alltag durchführen zu können, bietet sich daher die Verwendung eines Färbeautomaten an. Hinsichtlich der Objektivierung der Knochenbefunde erprobt die Heidelberger Arbeitsgruppe um Diel den Einsatz von Chromavision, eines Scanners, der unterschiedliche Farbreaktionen erkennt [5, 73, 74]. Auf diese Weise können positive Befunde präsentiert werden und die Durchsicht des kompletten Präparates könnte entfallen. Dadurch ließe sich der Arbeitsaufwand auf ein Minimum reduzieren und die Durchführung des immunzytochemischen Nachweises von epithelialen Tumorzellen in der Routinediagnostik ermöglichen.

Eine weitere Verbesserung der Methode könnte durch die Anreicherung der sehr niedrigen Konzentration von Tumorzellen mittels immunomagnetischer Beads erreicht werden. Mehrere Arbeitsgruppen untersuchen dies derzeit [74, 93, 107, 108, 109, 141, 166]. Allerdings zeigt sich bisher kein eindeutiger Vorteil im Vergleich zur konventionellen Immunzytochemie. Die Arbeitsgruppe um Kasimir-Bauer konnten keine höheren Detektionsraten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark nachweisen [74], während Naume et al. eine 67%-ige Steigerung positiver Knochenmarkbefunde erreichten [109]. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Stellenwert dieser Methode zu verifizieren.

Von größter Bedeutung ist jedoch die Einführung standardisierter Studienprotokolle für den immunzytochemischen Nachweis epithelialer Zellen im

Knochenmark, um in Zukunft vergleichbare Daten zu erhalten. Entscheidend ist die einheitliche Verwendung eines validierten Antikörpers; aktuell gelten Pancytokeratin-Antikörper als die dafür am besten geeigneten Marker. Des Weiteren müssen die Mindestanzahl ausgewerteter Zellen (2×10^6 Zellen), definierte Patientenkollektive und morphologische Charakteristika maligner Zellen festgelegt werden. Um endgültige Aussagen über die prognostische Relevanz treffen zu können, sind Studien mit großen Patientenzahlen und langem Beobachtungszeitraum notwendig.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit Mak 5D3

In der Literatur wird die durchschnittliche Detektionsrate maligner epithelialer Zellen im Knochenmark bei Brustkrebspatientinnen mit 35% angegeben [53]. In unserer Studie wurden 20,5% (17/83) der Patientinnen positiv gewertet. Die Detektionsraten tumorzell-positiver Zellen im Knochenmark zeigten eine sehr große Bandbreite und reichten von 1%-48% [9, 19, 30, 32, 33, 34, 35, 39, 41, 45, 52, 53, 55, 56, 61, 69, 73, 74, 75, 84, 85, 88, 89, 90, 91, 100, 102, 103, 109, 124, 126, 133, 142, 143, 158, 160]. Allerdings wurden diese Ergebnisse unter Verwendung verschiedener Antikörper erzielt. Aufgrund der inzwischen bekannten Kreuzreaktion muriner Antikörper mit hämatopoetischen Zellen gingen möglicherweise falsch-positive Befunde in die Wertung ein und die Detektionsrate maligner epithelialer Zellen im Knochenmark wurde dadurch zu hoch angegeben. Die höchsten Detektionsraten von 48% bzw. 43.3% wurden mit einem murinen Antikörper erzielt. Die Ergebnisse mit Cytokeratin-Antikörpern liegen bei maximal 37.6% [53].

Neben dem Mammakarzinom wurde die Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auch bei anderen epithelialer Tumoren, wie dem Bronchialkarzinom, dem Pankreaskarzinom bei gastro-intestinalen Tumoren sowie bei Tumoren im Gesicht- und Halsbereich untersucht [31, 53, 70, 87, 92, 112, 117, 131, 136, 137, 154, 155, 164]. Diese Arbeitsgruppen verwendeten die auch von uns eingesetzten Antikörper gegen Cytokeratine. Die Nachweisrate maligner epithelialer Zellen lag bei diesen Untersuchungen zwischen 26,9% und 59,7% und mit durchschnittlich 38,5% etwas höher als bei Patientinnen mit Mammakarzinom.

4.2.2 Einfluss der Tumorgröße auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Die Tumorgröße ist ein anerkannter Prognosefaktor des Mammakarzinoms. Eine große Tumorausdehnung führt signifikant häufiger zum Auftreten axillärer Lymphknotenmetastasen und einer kürzeren Überlebensrate [47, 110]. Es ist vermutlich davon auszugehen, dass Patientinnen mit fortgeschrittenen Tumorstadien ebenfalls häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufweisen als Patientinnen mit kleinen Primärtumoren. In unserer Untersuchung zeigten nur 7,1% der Patientinnen mit Tumoren <2cm (T1) einen positiven Knochenmarkstatus, während 27,2% der Patientinnen mit großen Primärtumoren (T2, T3, T4) maligne epitheliale Zellen im Knochenmark aufwiesen. Diel et al. fanden ebenfalls bei zunehmender Tumorgröße signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, so stiegen die Detektionsraten von 30% bei T1-Karzinomen bis 75% bei T4-Karzinomen [41]. Diesen Zusammenhang bestätigten weitere Arbeitsgruppen [19, 25, 51, 53, 56, 91, 109, 119, 140, 151]. Keine Signifikanz dieser Parameter zeigten andere Untersuchungen [9, 20, 35, 61, 69, 85, 100, 102, 113, 137].

Diel et al. betonen die besondere Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark bei Patientinnen mit kleinen Primärtumoren (T1) [41]. Hiermit könnte eine frühe hämatogen Zellaussaat und spätere Metastasierung erfasst und somit Risikopatientinnen erkannt werden. Die Autoren zeigen, dass in diesem Patientenkollektiv der Nachweis maligner epithelialer Zellen im Knochenmark der wichtigste Prognoseparameter für das Auftreten einer subsequenten Metastasierung war. In unserem Kollektiv wiesen 2/28 (7.1%) Patientinnen mit T1-Tumoren einen positiven Tumorzellnachweis im Knochenmark auf, wobei beachtet werden muss, dass nur ein Drittel unseres Patientenkollektivs (28/83) primär ein T1-Stadium aufwies. Der Grund dafür könnte das ländliche Einzugsgebiet der Universitäts-Frauenklinik Ulm sein. Aufgrund der geringen Anzahl tumorzellpositiver Patientinnen mit kleinen Primärtumoren können wir keine Aussage über die prognostische Relevanz dieses Verfahrens bei diesem Patientenkollektiv treffen.

4.2.3 Einfluss des axillären Lymphknotenstatus auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Der axilläre Lymphknotenstatus gilt derzeit als wichtigster prognostischer Faktor hinsichtlich des rezidivfreien sowie des Gesamtüberlebens [24, 26, 48, 163]. In unserer Untersuchung zeigten 11,9% der nodalnegativen und 29,3% der nodalpositiven Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark. Somit besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen positivem Nodalstatus und dem Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Während einige Arbeitsgruppen diesen Zusammenhang bestätigten, [9, 20, 35, 39, 41, 42, 53, 55, 56, 85, 91, 109, 151] fanden andere keine signifikante Korrelation zwischen dem axillären Lymphknotenstatus und dem Nachweis maligner epithelialer Zellen im Knochenmark [20, 30, 61, 69, 75, 100, 102, 103, 113, 133, 135].

4.2.4 Einfluss des Menopausenstatus auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Der Menopausenstatus wird in der Literatur ebenfalls als ein wichtiger Prognosefaktor des Mammakarzinoms aufgeführt. Demnach ist ein prämenopausaler Erkrankungsbeginn mit einem häufigeren Auftreten von Rezidiven und einer geringeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert [80]. In unserem Patientenkollektiv zeigten 24,0% der prämenopausalen und 19,0% der postmenopausalen Patientinnen einen positiven Knochenmarkstatus. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Zusammenhang dieser Parameter. Dieses Ergebnis bestätigen mehrere Arbeitsgruppen [56, 61, 69, 91, 102]. Lediglich eine Arbeitsgruppe konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Menopausenstatus und dem Auffinden maligner epithelialer Zellen im Knochenmark nachweisen [41]. Die Ergebnisse waren allerdings insofern überraschend, da entgegen der Erwartung postmenopausale Patientinnen signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufwiesen.

4.2.5 Einfluss des Tumorgradings auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Generell zeichnen sich schlecht- und undifferenzierte Tumore durch aggressives Wachstum aus und sind dadurch mit einer schlechteren Prognose assoziiert [138]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Bedeutung des Tumorgradings für den Nachweis maligner epithelialer Zellen im Knochenmark. Unsere Auswertung zeigte signifikant häufiger maligne epitheliale Zellen im Knochenmark bei schlecht differenzierten Mammakarzinomen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich dieses Zusammenhangs. Während einige Arbeitsgruppen unser Ergebnis bestätigen [42, 56, 151], konnten andere keine Signifikanz aufzeigen [61, 69, 102].

Man muss jedoch bei der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigen, dass das histologische Grading von der Subjektivität des jeweiligen Betrachters abhängig ist. Zur besseren Reproduzierbarkeit beschränkten wir uns deshalb auf die Gegenüberstellung von nur zwei Differenzierungskategorien (G1/G2-Tumore vs. G3/G4-Tumore), da die Einteilung in die beiden „Extremgruppen“ „hoch und mittel differenziert“ und „schlecht differenziert“, unserer Meinung nach, eine höhere diagnostische Sicherheit bietet.

4.2.6 Einfluss der histopathologischen Differenzierung auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Invasive Mammakarzinome lassen sich histologisch zwei Hauptformen zuordnen: zum einen der großen Gruppe dukta-invasiver Karzinome, zum anderen den selteneren lobulär-invasiven Mammakarzinomen. Letztere fallen durch ein diffuses Wachstumsmuster auf, was die radiologische Früherkennung erschwert. Trotz häufig fortgeschrittener Tumorstadien bei der Erstdiagnose ist die Prognose günstig, da nur selten aggressive Tumorvarianten auftreten [101]. Hinsichtlich des Auftretens disseminierter Tumorzellen im Knochenmark lieferte unsere Untersuchung allerdings keine signifikanten Ergebnisse. Einschränkend kommt

die geringe Fallzahl lobulär-invasiver Mammakarzinome hinzu, so enthielt unser Kollektiv nur 7 lobulär differenzierte Karzinome bei einer Gesamtzahl von 83 invasiver Mammakarzinome. Vergleichbare Resultate zeigten Harbeck et al. mit 11 von 100, Berger et al. mit 14 von 283, sowie Landys et al. mit 3 von 128 invasiven Mammakarzinomen [9, 61, 85].

4.2.7 Einfluss des Hormonrezeptorstatus auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Mehrere Arbeitsgruppen konnten die unabhängige prognostische Bedeutung des Östrogen- und Progesteron-Rezeptors im Hinblick auf die Gesamtüberlebenszeit nachweisen [26, 49, 50, 96, 132]. Der Östrogenrezeptorstatus erlaubt eine Entscheidung hinsichtlich des möglichen Nutzens einer adjuvanten endokrinen Therapie, da rezeptornegative Karzinome im Gegensatz zu östrogenrezeptorpositiven nur selten auf eine endokrine Therapie ansprechen [95]. Darüber hinaus erhöht der Progesteronrezeptor die Aussagekraft des Östrogenrezeptors bezüglich einer erfolgreichen endokrinen Therapie [128].

Der Hormonrezeptorstatus hatte in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf das Auftreten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Bestätigt werden unsere Ergebnisse von mehreren Arbeitsgruppen [9, 41, 42, 35, 61, 102, 103, 151]. Mansi et al. sowie Gerber et al. wiesen jedoch signifikant häufiger disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei negativem Hormonrezeptorstatus nach [56, 88, 91]. Naume et al. bestätigten dies bei nodalnegativen Patientinnen, während der Vergleich zwischen Hormonrezeptorstatus und Knochenmarkbefund allerdings keine Signifikanz zeigte [109].

4.2.8 Einfluss der Tumormarker auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Tumormarker unterscheiden sich qualitativ zum Teil nur gering von normalen Gewebsantigenen, werden aber von Tumorträgern intensiver gebildet als von gesunden Personen [4, 59, 156]. Beim Mammakarzinom haben die Tumormarker

CEA und CA15-3 eine besondere Bedeutung erlangt. Die Tumormarkerbestimmung im Serum ist aber kein unabhängiger Prognosefaktor und dient auch nicht der Entscheidung zur Anwendung einer lokalen oder systemischen Therapie. Dennoch ist die initiale Bestimmung der Tumormarker zur Therapiekontrolle und als Verlaufspareter sinnvoll. Präoperativ erhöhte Tumormarkerspiegel sind häufig ein Indiz für eine bereits fortgeschrittene Erkrankung. In der Regel gehen Markeranstiege der klinisch manifesten Generalisierung um Monate voraus [8].

Aus diesem Grund schien es uns interessant, dem Einfluss präoperativ erhöhter Tumormarkerwerte auf den Tumorzellnachweis im Knochenmark nachzugehen. Dieser Zusammenhang wurde von uns erstmals untersucht. Unsere Auswertung zeigte allerdings keinen signifikanten Einfluss erhöhter Tumormarkerwerte auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Es wäre jedoch interessant, diesen Zusammenhang weiter zu beobachten.

4.2.9 Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Das Tumorsuppressorgen p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [86]. Durch Blockade des Zellzyklus ist das p53 Protein in der Lage, Reparaturen an der DNA durchzuführen und dadurch Mutationen zu verhindern. Ist das p53-Gen allerdings selbst durch Mutationen verändert, führt dies zur Expression eines stabilen mutierten Proteins [66], dessen Anreicherung als Marker für eine maligne Erkrankung gilt. Der Nachweis von p53-Protein als Ausdruck einer stattgefundenen Mutation gelingt heute bei ca. 40%-50% aller Mammakarzinome. Ein positiver p53-Status korreliert mit einer hohen S-Phasen-Fraktion, großen Primärtumoren und einem negativen Hormonrezeptorstatus [99]. Inwieweit auch ein Zusammenhang mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark besteht, wurde durch statistische Analyse geprüft. Unsere Untersuchung zeigte keinen signifikanten Zusammenhang dieser Parameter. Dieses Ergebnis bestätigen Gerber et al. und Naume et al. [56, 109].

4.2.10 Einfluss der mib-1-Expression auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Die Proliferationsaktivität von Tumorzellen kann durch mehrere Nachweissysteme bestimmt werden. Zum einen stehen Proliferationsmarker wie mib-1 und Ki67 zur Verfügung. Diese Marker erkennen Zellkernantigene in Tumorzellen, die nur während der Zellteilung (S-Phase) exprimiert werden. Zum anderen gibt die Bestimmung des S-Phasen-Gehaltes Aufschluss über das aggressive Wachstum maligner Tumoren [99].

Die Bedeutung der Proliferationsaktivität von Mammakarzinomen bezüglich des Auftretens disseminierter Tumorzellen im Knochenmark war ein weiterer Aspekt unserer Arbeit. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Zusammenhang dieser Parameter feststellen. Dies bestätigen Diel et al. 1996, sowie Molino et al. 1997 und 1999 [41, 102, 103]. Bei Gerber et al. hingegen zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen Proliferationsgrad und dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark [56].

4.2.11 Einfluss der HER2/neu-Expression auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Das Protein HER2/neu wird durch das c-erbB-2-Onkogen kodiert und ähnelt dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EDGF). Eine Überexpression dieses Proteins ist bei ca. 20% - 30% der Patientinnen mit Mammakarzinom nachweisbar und zeichnet sich durch besonders aggressives Tumorstadium aus [144]. Deshalb schien es uns interessant, inwieweit eine HER2/neu-Überexpression häufiger mit einem positiven Knochenmarkbefund einher geht. Allerdings enthielt unser Patientenkollektiv nur drei Patientinnen mit einer HER2/neu-Überexpression (2+,3+), davon waren nur bei einer Patientin disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar. Aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen mit HER2/neu-Überexpression zeigte die statistische Auswertung keine Signifikanz.

Gerber et al. stimmen mit unserem Ergebnis überein, während Naume et al. einen signifikanten Zusammenhang dieser Parameter aufzeigen konnten [56, 109].

4.3 Tumorbiologische und klinische Bedeutung der im Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen

Die Ausstreuung von Tumorzellen vom Ausgangsherd ist ein ausgesprochenes „Verlustgeschäft“ [162]. So gehen nach Abati und Liotta 99,95% der hämatogenen disseminierten Tumorzellen zugrunde [1]. Verantwortlich hierfür ist möglicherweise ein permanentes „Tumorzell-Shedding“ vom Primärtumor, wobei nicht jede Zelle metastatisches Potential besitzt [112]. Die gewonnenen Knochenmarkaspirate können demnach sowohl nicht überlebensfähige Tumorzellen enthalten als auch solche mit der Möglichkeit zur ungehemmten Proliferation. Das Mammakarzinom ist darüber hinaus für die Entwicklung eines Spätrezidivs, bis zu 15 Jahre nach der Primärdiagnose, bekannt. Eine Erklärung hierfür ist die sogenannte „Tumorzell-Dormancy“. Demnach können sich Tumorzellen jahrelang in einem Ruhestadium (G0) des Zellzyklus befinden, um dann plötzlich, aus bisher unbekanntem Gründen, wieder in eine proliferative Phase einzutreten [119, 120]. Als eine mögliche Ursache für die mitunter lange Latenzphase gilt die Fähigkeit der Tumorzellen, immunsuppressive Faktoren und Cytokine zu produzieren und somit eine Umgebung der Immunsuppression zu schaffen [72, 112, 151]. Für die Entstehung manifester Metastasen aus einzelnen Tumorzellen sind nach Paget allerdings nicht nur die Tumorzellaussaat des Primärherdes („seed“), sondern auch die Umgebungsbedingungen des Wirtsgewebes („soil“) verantwortlich [114]. Das Knochenmark scheint diese Bedingungen beim Mammakarzinom zu erfüllen, da das Skelettsystem einer der häufigsten Metastasierungsorte ist. Aber auch bei primär nicht ossär metastasierenden Karzinomen waren disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar [53, 131, 137]. Brugger et al. und Shpall et al. erbrachten den Nachweis, dass disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie abgegeben werden können [21, 140]. Das Knochenmark könnte somit als Reservoir für disseminierte Tumorzellen im Stadium der „Dormancy“ dienen, von wo aus andere Orte besiedelt werden können [112]. Mehrere Studien belegten das metastatische Potential, der im Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen [76, 77, 106, 115, 125, 137, 148, 150]. Somit kann man einen positiven Knochenmarkstatus als eine „minimal residual disease“ betrachten.

Auch klinische Langzeitstudien sprechen für eine maligne Aktivität der Tumorzellen. So wurde der positive Knochenmarkstatus in multivariaten Analysen als unabhängiger Prognosefaktor in bezug auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben identifiziert [20, 56, 69, 85, 91, 151]. In der Untersuchung von Braun et al. erwies sich der disseminierte Tumorzellnachweis im Knochenmark nach multivariater Analyse sogar als einzig stabiler Prognosefaktor im Gegensatz zu Nodalstatus und Östrogenrezeptorstatus [19]. Mansi et al. verifizierten den positiven Knochenmarkstatus ebenfalls als stärksten Prognoseparameter innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Nach 10 Jahren sank jedoch der Effekt des Knochenmarkstatus und war nicht weiter signifikant [91]. Andere Arbeitsgruppen stellten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Knochenmarkstatus und rezidivfreiem sowie Gesamtüberleben fest [32, 75, 94, 102, 133]. Eine 1998 von Funke und Schraut durchgeführte Meta-Analyse mit 2494 Patientinnen aus 20 Studien konnte den immunzytochemischen Tumorzellnachweis im Knochenmark nicht als unabhängigen Prognosefaktor bezüglich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens identifizieren [53]. Die Aussagekraft dieser Meta-Analyse wird jedoch stark eingeschränkt, da die eingegangenen Studien hinsichtlich der verwendeten Antikörper, Färbemethoden, Anzahl ausgewerteter Zellen und der Patientenkollektive stark differieren.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Der standardisierte immunzytochemische Nachweis von Tumorzellen mit einem monoklonalen Pancytokeratin-Antikörper gegen die Cytokeratinkomponenten 8, 18 und 19 hat sich beim Mammakarzinom als ein sensibles und sensitives Verfahren zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark erwiesen. In unserer Untersuchung war ein positiver Knochenmarkstatus mit einem höheren T-Stadium, positivem Nodalstatus und einem höheren Grading assoziiert und korrelierte gut mit den klinischen Daten. Generell sind bei einer fortgeschrittenen Erkrankung häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen, was auf eine Generalisierung der Erkrankung hindeutet. Jedoch ist vor allem bei kleinen Primärtumoren und negativem Nodalstatus ein positiver Knochenmarkstatus von besonderem Interesse. Ist doch gerade dieses Patientenkollektiv mit den bisher zur Verfügung stehenden Prognosefaktoren nur unzureichend charakterisiert. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark kann bei diesen Patientinnen als Hinweis auf eine „minimal residual disease“ gewertet werden und könnte somit eine besonders gefährdete Patientengruppe hinsichtlich eines späteren Rezidivs oder einer Metastasierung des Primärtumors identifizieren. Mehrere Langzeituntersuchungen bestätigen diese These. Danach ist ein positiver Knochenmarkstatus mit einem verminderten rezidivfreien- und Gesamtüberleben assoziiert [20, 56, 69, 85, 91, 151]. Da diese Ergebnisse allerdings unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper und uneinheitlichen Studienprotokolle gewonnen wurden, müssen diese durch weitere Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen verifiziert werden. Unsere Untersuchung trägt dazu als Grundlage für eine weitere Nachbeobachtung bei.

Einen interessanten Ansatz bietet die Untersuchung von Diel et al. 1996. Sie zeigten, dass vor allem das schwierige Patientenkollektiv mit Tumoren <2cm möglicherweise am meisten vom Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark profitieren könnte. In diesem Tumorstadium war ein positiver Knochenmarkstatus dem bisher wichtigsten Prognoseparameter Lymphknotenstatus hinsichtlich der prognostischen Relevanz weit überlegen. Die

Autoren warfen daraufhin die Frage auf, ob – nicht zumindest bei T1-Karzinomen – auf die Lymphonodektomie zugunsten der Knochenmarkaspiration und des Tumorzellnachweises verzichtet werden könnte. Ein Nachteil der Lymphonodektomie ist die hohe postoperative Morbidität mit Gefühlsstörungen, Schmerzen, Ödemen, Kraftminderung und Bewegungseinschränkung [43, 81]. Besonders Patientinnen mit negativem Nodalstatus und guter Prognose sind durch diese Komplikationen stark beeinträchtigt und profitieren weder im Hinblick auf eine lokale Tumorkontrolle noch auf eine adjuvante Therapieplanung von der Entfernung axillärer Lymphknoten [43, 79]. Daher besteht großes Interesse an der Entwicklung weniger invasiver Verfahren. Eine Weiterentwicklung der Lymphonodektomie ist die „Sentinel-Node-Biopsie“, die nur den erstdrainierten Wächterlymphknoten entfernt, ohne die axilläre Integrität zu verletzen [57, 97]. Bei negativem Befund kann dann auf eine komplette Lymphonodektomie verzichtet werden. Da jedoch 30% der nodalnegativen Patientinnen innerhalb von 10 Jahren ein Rezidiv erleiden, wäre die Kombination der Sentinel-Node-Biopsie mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark der ideale Stagingparameter, womit sowohl die lokale als auch die hämatogene Dissemination bei minimaler Morbidität erfasst werden könnte.

5 Zusammenfassung

Etwa 30% der primär nodalnegativen Patientinnen mit Mammakarzinom erleiden innerhalb von 10 Jahren ein Fernrezidiv. Die frühzeitige hämatogene Tumorzell dissemination ist durch Immunzytologie von Knochenmarkspiraten nachzuweisen. Ziel unserer Arbeit war, durch immunzytochemische Färbung die Prävalenz von Tumorzellen im Knochenmark und deren Korrelation mit histomorphologischen und prognostischen Kriterien des Primärtumors zu untersuchen.

In unserer Untersuchung wurde bei 90 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom der immunzytologische Nachweis auf Tumorzellen im Knochenmark geführt. Zur Detektion cytokeratinpositiver Zellen wurde der monoklonale Panzytokeratin-Antikörper, Mak 5D3, spezifisch für CK 8/18/19, eingesetzt. Als Nachweissystem diente die Biotin-Streptavidin-Methode.

83 Patientinnen gingen in die Beurteilung ein. 17/83 (20%) wiesen bei Diagnosestellung Tumorzellen im Knochenmark auf. Ein positiver Knochenmarkstatus ließ sich in Abhängigkeit der Tumorgöße ($p=0,026$), des Nodalstatus ($p=0,045$) und des Kerngradings ($p=0,023$) beobachten. Die histologische Differenzierung des Primärherdes, der Rezeptor- und Menopausenstatus, sowie die mib-1- und p53 Expression und HER2/neu Überexpression waren statistisch nicht signifikant.

Der standardisierte immunzytochemische Nachweis von Tumorzellen mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper gegen die Cytokeratinkomponenten 8, 18 und 19 hat sich beim Mammakarzinom als ein sensibles und sensitives Verfahren zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark erwiesen. Man erhält damit einen histomorphologischen Disseminationsmarker, der gut mit den klinischen Daten korreliert. Die prognostische Wertigkeit im Vergleich zum Nodalstatus hinsichtlich rezidivfreiem- und Gesamtüberleben muss weiter geprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

1. ABATI A., LIOTTA L.A.:
Looking forward in diagnostic pathology. The molecular superhighway.
Cancer 78: 1-3 (1996)
2. AHR A., SCHARL A., MÜLLER M., VON MINCKWITZ G., GÄTJE R., PANTEL K.,
KAUFMANN M.:
Cross-reactive staining of normal bone-marrow cells by monoclonal antibody 2E11.
Int J Cancer 84: 502-505 (1999)
3. ARBEITSGEMEINSCHAFT BEVÖLERUNGSBEZOGENER KREBSREGISTER
DEUTSCHLAND
IN ZUSAMMENARBEIT MIT DEM ROBERT KOCH-INSTITUT:
Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends.
3. Erweiterte, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken: 48-51 (2002)
4. BASTERT G., SCHMIDT-MATTHIESEN H.:
Neue Methoden zur Charakterisierung von Tumorzellen und Tumoren sowie deren
klinische Relevanz.
Arch Gynecol Obstet 242: 227-231 (1987)
5. BAUER K.D., DE LA TORRE-BUENO J., DIEL I.J., WILLIAMS D.H., DECKER W. J.,
PRIDY C., BOSSY B., LUDMANN S., YAMAMOTO K., MASIH A., ESPINOZA F.P.,
HARRINGTON D.S.:
Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular
imaging.
Clin Cancer Res 6: 3552-3559 (2000)
6. BECK T., POLLOW K.:
Prognosefaktoren der Mammakarzinomerkrankung.
In: BECK T., KNAPSTEIN P.G., KREIENBERG R. (Hrsg.)
Das Mammakarzinom: interdisziplinäre Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
Enke, Stuttgart: S.37 (1994)
7. BECKSTEAD J.H.:
The bone marrow biopsy. A diagnostic strategy.
Arch Pathol Lab Med 110: 175-179 (1986)

8. BENZ J., KÖCHLI O.R.:
Mammakarzinom.
In: KÖCHLI O.R.; SEVIN B.-U., BENZ J., PETRU E., HALLER U.:
Gynäkologische Onkologie.
2. Aufl. Springer Berlin, Heidelberg, New York: S. 3-86 (1998)
9. BERGER U., BETTELHEIM R., MANSI J. L, EASTEN D., COOMBES R.C., NEVILLE A.M.:
The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of
the primary tumour in breast cancer and prognosis.
Am J Clin Pathol 90: 1-6 (1988)
10. BLACK R.J., BRAY F., FERLAY J., PARKIN D.M.:
Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates
of national incidence for 1990.
Eur J Cancer 33:1075-1107 (1997)
11. BLOOM H.J., RICHARDSON W.W.:
Histological grading and prognostic in breast cancer.
Br J Cancer 11: 359-377 (1957)
12. BORGES E., BEISKE K., TRACHSEL S., NESLAND J.M., KVALHEIM G., HERSTAD T.K.,
SCHLICHTING E., QVIST H., NAUME B.:
Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific
staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase.
J Pathol 185: 427-434 (1998)
13. BORGES E., NAUME B., NESLAND J.M., KVALHEIM G., BEISKE K., FODSTAD Ø, DIEL
I., SOLOMAYER E.-F., THEOCHAROUS P., COOMBES R.C., SMITH B.M., WUNDER E.,
MARROLEAU J.-P., GARCIA J., PANTEL K. THE EUROPEAN ISHAGE WORKING
GROUP FOR STANDARDIZATION OF TUMOR CELL DETECTION:
Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and
blood: I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells.
Cytother 1: 377-388 (1999)
14. BOYUM A.:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand J Clin Lab Invest 21: 97-99 (1968)
15. BRAUN S., MÜLLER M., HEPP F., SCHLIMOK G., RIETHMÜLLER G., PANTEL K.:
Re: Micrometastatic breast-cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic
value in comparison with nodal status.
J Natl Cancer Inst 90:1099-101(1998)

16. BRAUN S., HEPP F., SOMMER H.L., PANTEL K.:
Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease.
Int J Cancer 84:1-5 (1999)
17. BRAUN S., KENTENICH C., JANNI W., HEPP F., DE WAAL J., WILLGEROTH F., SOMMER H., PANTEL K.:
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 (2000a)
18. BRAUN S., PANTEL K.:
Diagnostik und klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.
Dtsch Med Wochenschr 125: 1237-1239 (2000b)
19. BRAUN S., PANTEL K., MÜLLER P., JANNI W., HEPP F., KENTENICH C.R., GASTROPH S., WISCHNIK A., DIMPFL T., KINDERMANN G., RIETHMÜLLER R., SCHLIMOK G.:
Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer.
N Engl J Med 342: 525-533 (2000c)
20. BRAUN S., CEVATLI B.S., ASSEMI C., JANNI W., KENTENICH C.R., SCHINDLBECK C., RJOSK D., HEPP F.:
Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy.
J Clin Oncol 19: 1468-1475 (2001)
21. BRUGGER W., BROSS K.J., GLATT M., WEBER F., MERTELSMANN R., KRANZ L.:
Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors.
Blood 83: 636-640 (1994)
22. BRUGGER W., BÜHRING H.J., GRÜNEBACH F., VOGEL W., KAUL S., MÜLLER R., BRUMMENDORF T.H., ZIEGLER B.L., RAPPOLD I., BROSSART P., SCHEDING S., KANZ L.:
Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells.
J Clin Oncol 17: 1535-1544 (1999)
23. BURKHARDT R., KETTNER G., MAHL G., JÄGER K.:
Grenzen und Möglichkeiten der Knochenmarkbiopsie (Ungezielte Beckenkamm-Biopsie).
Internist 26: 478-490 (1985)

24. CARTER C.L., ALLEN C., HENSON D.E.:
Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24.740 breast cancer cases.
Cancer 63: 181-187 (1989)
25. CECI G., FRANCIOSI V., NIZZOLI R., DE LISI V., LOTTICI R., BONI C., DI BLASIO B.,
PASSALACQUA R., GUAZZI A., COCCONI G.:
The value of bone marrow biopsy in breast cancer at time of diagnosis.
Cancer 61: 96-98 (1988)
26. CLARK G.M.:
Prognostic and predictive factors.
In: HARRIS J. R., LIPPMAN M. E., MORROW M., HELLMAN S. (eds):
Disease of the breast.
Lippincott-Raven, Philadelphia: p 462 (1996)
27. COOMBES R.C., DEARNALEY D.P., BUCKMAN R.:
Detection of bone metastases in patients with breast cancer.
Invasion Metastasis 2: 177-184 (1982)
28. COONS A.H., CREECH H.J., RONES R.N.:
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.
Proc Soc Exp Biol 47: 200-202 (1941)
29. CORDELL J., RICHARDSON T.C., PULFORD K.A.F., GHOSH A.K., GATTER K.C.,
HEYDERMAN E., MASON D.Y.:
Production of monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in
diagnostic immunocytochemistry.
Br J Cancer 52: 347-354 (1985)
30. COTE R.J., ROSEN P.P., LESSER M., OLD L.J., OSBORNE M.P.:
Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult
bone marrow micrometastases.
J Clin Oncol 9: 1749-1756 (1991)
31. COTE R.J., BEATTIE E.J., CHAIWUN B., SHI S.R., HARVEY J., CHEN S.C., SHERROD
A.E., GROSHEN S., TAYLOR C.R.:
Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung
carcinoma.
Ann Surg 222: 415-423 (1995)
32. COURTEMANCHE D.J., WORTH A.J., COUPLAND R.W., ROWELL J.L., MAC FARLANE
J.K.:
Monoclonal antibody LICR-LON-M8 does not predict the outcome of operable breast

- cancer.
Can J Surg 34: 21-26 (1991)
33. DEARNALEY D.P., SLOANE J.P., ORMEROD M.G., STEELE K., COOMBES R.C., CLINK H.M.D., POWLES T.J., FORD H.T., GAZET J.-C., NEVILLE A.M.:
Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen.
Br J Cancer 44: 85-90 (1981)
34. DEARNALEY D.P., SLOANE J.P., IMRIE S., COOMBES R.C., ORMEROD M.G., LUMLEY H., NEVILLE A.M.:
Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer.
J R Soc Med 76: 359-364 (1983)
35. DEARNALEY D.P., ORMEROD M.G., SLOANE J.P.:
Micrometastases in breast cancer: Long-term follow-up of the first patient cohort.
Eur J Cancer 27: 236-239 (1991)
36. DEBUS E., WEBER K., OSBORNE M.:
Monoclonal cytoke­ratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissue.
EMBO J 1: 1641-1647 (1982)
37. DELLING G.:
Diagnostik generalisierter Osteopathien – methodische Voraussetzungen und Aussagemöglichkeiten.
Pathologie 1: 86-92 (1980)
38. DELSOL G., GATTER K. C., STEIN H., ERBER W.N., PULFORD K.A., ZINNE K., MASON D.Y.:
Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen: implications for diagnosis of human neoplasms.
Lancet 2: 1124-1129 (1984)
39. DIEI I. J., KAUFMANN M., GOERNER R., COSTA S. D., KAUL S., BASTERT G.:
Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis.
J Clin Oncol 10: 1534-1539 (1992)

40. DIEL I.J., KAUFMANN M., COSTA S.D., BASTERT G.:
Monoclonal antibodies to detect breast cancer cells in bone marrow.
Important Adv Oncol: 143-164 (1994)
41. DIEL I.J., KAUFMANN M., COSTA S. D., HOLLE R., VON MINCKWITZ G., SOLOMAYER E. F., KAUL S., BASTERT G.:
Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.
J Natl Cancer Inst 88: 1652-1658 (1996)
42. DIEL I.J., COTE R.J.:
Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer.
Cancer Treat Rev 26: 53-65 (2000)
43. DIEL I.J.:
Bone marrow staging for breast cancer: is it better than axillary node dissection?
Semin Oncol 28: 236-244 (2001)
44. DOGLIONI C., DELL'ORTO P., ZANETTI G., IUZZOLINO P., COGGI G., VIALE G.:
Cytokeratin-immunoreactive cells of human lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions. An immunocytochemical study.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 416: 479-490 (1990)
45. ELLIS G., FERGUSON M., YAMANAKA E., LIVINGSTON R.B., GOWN A.M.:
Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients.
Cancer 63: 2509-2514 (1989)
46. ENGEL J., SCHMIDT M., SCHUBERT-FRITSCHLE G., TRETTER W., HÖLZEL D.:
Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München – Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren.
Zuckerschwerdt, München Bern, Wien: 60-64 (2000)
47. FISHER B., SLACK N.H., BROSS I.D.:
Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis.
Cancer 24: 1071-1080 (1969)
48. FISHER B., BAUER M., WICKERHAM D.L., REDMOND C.K., FISHER E.R., CRUZ A.B., FOSTER R., GARDNER B., LERNER H., MARGOLESE R. et al.:
Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update.
Cancer 52: 1551-1557 (1983)

49. FISHER B., REDMOND C., FISHER E. R., CAPLAN R.:
Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06.
J Clin Oncol 6:1076-1087 (1988)
50. FOEKENS J. A., PORTENGEN H., VAN PUTTEN W. L. J., PETERS H. A., KRIJNEN H.L., ALEXIEVA-FIGUSCH J., KLIJN J.G.:
Prognostic value of estrogen and progesterone receptors measured by immunoassays in human breast cancer cytosols.
Cancer Res 49: 5823-5828 (1989)
51. FOX S.B., LEEK R.D., BLISS J., MANSI J.L., GUSTERSON B., GATTER K.C., HARRIS A.L.:
Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients.
J Natl Cancer Inst 89: 1044-1049 (1997)
52. FRANKLIN W.A., SHPALL E. J., ARCHER P., JOHNSTON C. S., GARZA-WILLIAMS S., HAMI L., BITTER M. A., BAST R. C., JONES R. B.:
Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support.
Breast Cancer Res Treat 41: 1-13 (1996)
53. FUNKE I., FRIES S., ROLLE M., HEISS M., UNTCH M., BOHNERT H., SCHILDBERG F. W., JAUCH K. W.:
Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer.
Int J Cancer 65: 755-761 (1996)
54. GALASKO C.S.:
Skeletal metastasis and mammary cancer.
Ann R Coll Surg Engl 50: 3-28 (1972)
55. GEBAUER G., FEHM T., MERKLE E., BECK E.P., LANG N., JAGER W.:
Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up.
J Clin Oncol 19:3669-3674 (2001)
56. GERBER B., KRAUSE A., MÜLLER H., RICHTER D., REIMER T., MAKOVITZKY J., HERRNRING C., JESCHKE U., KUNDT G., FRIESE K.:
Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors.
J Clin Oncol 19: 960-971 (2001)

-
57. GIAI M., NATOLI C., SISMONDI P., BIGLIA N., LESTI G., MULIERI M., IACOBELLI S.:
Bone marrow micrometastases detected by a monoclonal antibody in patients with breast cancer.
Anticancer Res 10: 119-121 (1990)
58. GIULIANO A.E., HAIGH P.I., BRENNAN M.B., HANSEN N.M., KELLEY M.C., YE W.,
GLASS E.C., TURNER R.R.:
Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary
dissection in patients with sentinel-negative breast cancer.
J Clin Oncol 18: 2553-2559 (2000)
59. GROSS R.:
Tumormarker: eine kritische Zwischenbilanz.
Dtsch Ärztebl 83: 2289 (1986)
60. GRUNDMANN E.:
Einführung in die allgemeine Pathologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck: S.152-192 (1996)
61. HARBECK N., UNTCH M., PACHE L., EIERMANN W.:
Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy:
results of a 3-year median follow-up.
Br J Cancer 69: 566-571 (1994)
62. HELLMAN S.:
Stopping metastases at their source.
N Engl J Med 337: 996-997 (1997)
63. HEYDERMAN E., STEELE K., ORMEROD M.G.:
A new antigen on the epithelial membrane: its immunoperoxidase localisation in normal
and neoplastic tissue.
J Clin Pathol 32: 35-39 (1979)
64. HOFFMEISTER H.:
Bevölkerungsbezogenes Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland
MMV; München (1987)
65. INGLE J.N., TORMEY D.C., TAN H.K.:
The bone marrow examination in breast cancer: diagnostic considerations and clinical
usefulness.
Cancer 41: 670-674 (1978)

-
66. IGGO R., GATTER K., BARTEK J., LANE D., HARRIS A.L.:
Increase expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer.
Lancet 335: 675-679 (1990)
67. IZBICKI J.R., HOSCH S.B., PICHLMEIER U., REHDERS A., BUSCH C., NIENDORF A.,
PASSLICK B., BROELSCH C.E., PANTEL K.:
Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of
patients with completely resected esophageal cancer.
N Engl J Med 337:1188-94 (1997)
68. JÄNICKE F.:
Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom.
In: KREIENBERG R., MÖBUS V., ALT D.:
Management des Mammakarzinoms.
2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: S. 144-159 (2002)
69. JANNI W., GASTROPH S., HEPP F., KENTENICH C., RJOSK D., SCHINDLBECK C.,
DIMPFL T., SOMMER H., BRAUN S.:
Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone
marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma.
Cancer 88: 2252-2259 (2000)
70. JAUCH K.W., HEISS M.M., GRUETZNER U., FUNKE I., PANTEL K., BABIC R., EISSNER
H.J., RIETHMÜLLER G., SCHILDBERG F.W.:
Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer.
J Clin Oncol 14: 1810-1817 (1996)
71. KAMBY C., VEJBORG I., DAUGAARD A., GULDHAMMER B., DIRKSEN H., ROSSING
N., MOURIDSEN H.T.:
Clinical and radiologic characteristics of bone metastases in breast cancer.
Cancer 60: 2524-2531 (1987)
72. KARRISON T. G., FERGUSON D. J., MEIER P.:
Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy.
J Natl Cancer Inst (Bethesda) 91: 80-85 (1999)
73. KASIMIR-BAUER S., OBERHOFF C., SLIWINSKA K., NEUMANN R., SCHINDLER A.E.,
SEEBER S.:
Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and
bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use?
Breast Cancer Res Treat 69: 123-132 (2001)

-
74. KASIMIR-BAUER S., OBERHOFF C., SCHINDLER A.E., SEEGER S.:
A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: Methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols (Review).
Int J Oncol 20: 1027-34 (2002)
75. KIRK S.J., COOPER G.G., HOPER M., WATT P.C., ROY A.D., ODLING-SMEE W.:
The prognostic significance of marrow micrometastases in women with early breast cancer.
Eur J Surg Oncol 16: 481-485 (1990)
76. KLEIN C.A., SCHMIDT K.O., SCHARDT J.A., PANTEL K., SPEICHER M.R.,
RIETHMÜLLER G.:
Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells.
Proc Natl Acad Sci USA 96: 4494-4499 (1999)
77. KLEIN C.A., BLANKENSTEIN T.J.F., SCHMIDT-KITTLER O., PETRONIO M., POLZER B.,
STOECKLEIN N.H., RIETHMÜLLER G.:
Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual disease.
Lancet 360: 683-689 (2002)
78. KÖHLER G., MILSTEIN C.:
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256: 495-497 (1975)
79. KREIENBERG R., VOLM T., BECK T.:
Operative Therapie.
In: KREIENBERG R., MÖBUS V., ALT D.:
Management des Mammakarzinoms.
2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg New York: S. 183-191 (2002)
80. KROMAN N., JENSEN M.-B., WOHLFART J., MOURIDSEN H.T., ANDERSEN P.K.,
MELBYE M.:
Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study.
BMJ 320: 474-478 (2000)
81. KÜHN T., KLAUSS W., DARSOW M., REGELE S., FLOCK F., MAITERTH C.,
DAHLBENDER R., WENDT I., KREIENBERG R.:
Long-term morbidity following axillary dissection in breast cancer patients-clinical assessment, significance for life quality and the impact of demographic, oncologic and therapeutic factors.
Breast Cancer Res Treat 64: 275-286 (2000)

-
82. KVALHEIM G., NAUME B., NESLAND J.M.:
Minimal residual disease in breast cancer.
Cancer Metastasis Rev 18: 101-108 (Review) (1999)
83. LAGRANGE M., FERRERO J.M., LAGRANGE J.L., MACHIAVELLO J.C., MONTICELLI J.,
BAYLE C., CREISSON A., NAMER M., THYSS A., BOURCIER C., GIOANNI J.,
SCHNEIDER M.:
Non-specifically labelled cells that simulate bone marrow metastases in patients with non-
metastatic breast cancer.
J Clin Pathol 50: 206-211 (1997)
84. LANDYS K.:
Prognostic value of bone marrow biopsy in breast cancer.
Cancer 49: 513-518 (1982)
85. LANDYS K., PERSSON S., KOVARIC J., HULTBORN R., HOLMBERG E.:
Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of
initial diagnosis : Results of a 20-year median follow-up.
Breast Cancer Res Treat 49: 27-33 (1998)
86. LANE D. P., BENCHIMOL S.:
p53: oncogene or anti-oncogene?
Genes Dev 4: 1-8 (Review) (1990)
87. LINDEMANN F., SCHLIMOK G., DIRSCHEDL P., WITTE J., RIETHMÜLLER G.:
Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal
cancer patients.
Lancet 340: 685-689 (1992)
88. MANSI J. L., BERGER U., EASTEN D., MC DONNEL T., REDDING W. H., GAZET J. C.,
MC KINNA A., POWELS T. J.:
Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an
early predictor of bone metastases.
BMJ 295: 1093-1096 (1987)
89. MANSI J. L., BERGER U., WILSON P., SHEARER R., COOMBES R. C.:
Detection of tumor cells in bone marrow of patients with prostatic carcinoma by
immunocytochemical techniques.
J Urol 139: 545-548 (1988)

-
90. MANSI J. L., BERGER U., MC DONNEL T., POPLE A., RAYTER Z., GAZET J. C., COOMBES R. C.:
The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer.
J Clin Oncol 7: 445-449 (1989)
91. MANSI J.L., GOGAS H., BLISS J.M., GAZET J.-C., BERGER U., COOMBES R.C.:
Outcome of primary -breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study.
Lancet 354: 197-202 (1999)
92. MAGUIRE D., O`SULLIVAN G.C., COLLINS J.K., MORGAN J., SHANAHAN F.:
Bone marrow micrometstases and gastrointestinal cancer detection and significance.
Am J Gastroenterol 95:1644-1651 (Review) (2000)
93. MARTIN V.M., SIEWERT C., SCHARL A., HARMS T., HEINZE R., OHL S., RADVRUCH A., MILTENYI S., SCHMITZ J.:
Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS.
Exp Hematol 26: 252-264 (1998)
94. MATHIEU M.C., FRIEDMAN S., BOSQ J., CAILLOU B., SPIELMANN M., TRAVAGLI J.P., CONTESSO G.:
Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer.
Breast Cancer Res Treat 15: 21-26 (1990)
95. MC GUIRE W.L.:
Estrogen receptor versus nuclear grade as prognostic factors in axillary node negative breast cancer.
J Clin Oncol 6: 1071-1072 (Review) (1988)
96. MC GUIRE W.L., TANDON A.K., ALLRED D.C., CHAMMES G.C., CLARK G.M.:
How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients.
J Natl Cancer Inst 82: 1006-1015 (1990)
97. MC MASTERS K.M., TUTTLE T.M., CARLSON D.J., BROWN C.M., NOYES R.D., GLASER R.L., VENNEKOTTER D.J., TURK P.S., TATE P.S., SARDI A., CERRITO P.B., EDWARDS M.J.:
Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used.
J Clin Oncol 18: 2560-2566 (2000)

-
98. MC NEIL B.J., PACE P.D., GRAY E.B., ADELSTEIN S.J., WILSON R.E.:
Preoperative and follow-up bone scans in patients with primary carcinoma of the breast.
Surg Gynecol Obstet 147: 745-748 (1978)
99. MEERPOHL H.-G., BALTZER J., BAHNSEN J. (Hrsg.):
Praxis der Frauenheilkunde: in 3 Bänden.
Bd. 3 Praxis der gynäkologischen Onkologie.
Mammakarzinom. Prognose und therapierelevante (prädiktive) Faktoren.
2. Akt. Auflage Thieme, Stuttgart: 282-287 (2000)
100. MENARD S., SQUICCIARINI P., LUINI A., SACCHINI V., ROVINI D., TAGLIABUE E.,
VERONESI P., SALVADORI B., VERONESI U., COLNAGHI M.I.:
Immunodetection of bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients and its
correlation with primary tumour prognostic features.
Br J Cancer 69: 1126-1129 (1994)
101. MITZE M.:
Morphologische Grundlagen.
In: KREIENBERG R., VOLM T., MÖBUS V., ALT D.:
Management des Mammakarzinoms: ein Leitfaden für die Praxis
2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: S. 125-140 (2002)
102. MOLINO A., PELOSI G., TURAZZA M., SPEROTTO L., BONETTI A., NORTILLI R.,
FATTOVICH G., ALAIMO C., PIUBLLO Q., PAVANEL F., MICCIOLO R., CETTO L. G.:
Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: Correlations with clinical and
pathological features and prognosis.
Breast Cancer Res Treat 42: 23-30 (1997)
103. MOLINO A., PELOSI G., MICCIOLO R., TURAZZA M., NORTILLI R., PAVANEL F.,
CETTT G. L.:
Bone marrow micrometastases in breast cancer patients.
Breast Cancer Res Treat 58: 123-130 (1999)
104. MOLL R., FRANKE W.W., SCHILLER D.L., GEIGER B., KREPLER R.:
The catalogue of human cytokeratin polypeptides: Patterns of expression of cytokeratins in
normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell 31: 11-24 (Review)(1982)
105. MOSS T.J., REYNOLDS C.P., SATHER H.N., ROMANSKY S.G., HAMMOND G.D.,
SEEGER R.C.:
Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in
neuroblastoma.

- New Engl J Med 324: 219-226 (1991)
106. MUELLER P., CAROLL P., BOWERS E., MOORE D., CHER M., PRESTI J, WESSMAN M., PALLAVICINI M.G.:
Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant.
Cancer 83: 538-46 (1998)
107. NAUME B., BORGEN E., BEISKE K., HERSTAD T.K., RAVNAS G., RENOLEN A., TRACHSEL S., THRANE-STEEN K., FUNDERUD S., KVALHEIM G.:
Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood.
J Hematother 6: 103-114 (1997)
108. NAUME B., BORGEN E., NESLAND J.M., BEISKE K., GILEN E., RENOLEN A., RAVNAS G., QVIST H., KARESEN R., KVALHEIM G.:
Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone marrow / peripheral blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation.
Int J Cancer 78: 556-560 (1998)
109. NAUME B., BORGEN E., KVALHEIM G., KARESEN R., QVIST H., SAUER T., KUMAR T., NESLAND J.M.:
Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients. Comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics.
Clin Cancer Res 7: 4122-4129 (2001)
110. NEMOTO T., VANA J., BEWANI R.N.:
Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons.
Cancer 45: 2917-2924 (1980)
111. O'BRIEN M.G., FITZGERALD E.F., LEE G., CROWLEY M., SHANAHAN F., O'SULLIVAN G.C.:
A prospective comparison of laparoscopy and imaging in the staging of esophagogastric cancer before surgery.
Am J Gastroenterol 90: 2191-2194 (1995)
112. O'SULLIVAN G.C., COLLINS J.K., KELLY J., MORGAN J., MADDEN M., SHANAHAN F.:
Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease?
Gut 40: 512-515 (1997)

-
113. OSBORNE M.P., ROSEN P.P.:
Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer.
Oncology 8: 25-31 (Review) (1994)
114. PAGET S.:
The distribution of secondary growth in cancer of the breast.
Cancer Metastasis Rev 8: 98-101(1889)
115. PANTEL K., IZBICKI J.R., ANGSTWURM M., BRAUN S., PASSLICK B., KARG O.,
THETTER O., RIETHMÜLLER G.:
Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell
lung cancer.
Cancer Res 53: 1027-1031 (1993)
116. PANTEL K., SCHLIMOK G., ANGSTWURM M., WECKERMANN C., SCHMAUS W., GATH
H. PASSLICK B., IZBICKI J.R., RIETHMÜLLER G.:
Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial
tumor cells in bone marrow.
J Hematother 3: 165-173 (1994)
117. PANTEL K., IZBICKI J., PASSLICK B., ANGSTWURM M., HAUSSINGER K., THETTER
O., RIETHMÜLLER G.:
Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients
with non-small-cell lung cancer without overt metastases.
Lancet 347: 649-653 (1996a)
118. PANTEL K., BRAUN S., PASSLICK B., SCHLIMOK G.:
Minimal residual epithelial cancer: diagnostic approaches and prognostic relevance.
Prog Histochem Cytochem 30: 1-60 (Review) (1996b)
119. PANTEL K., COTE R.J., FODSTAD O.:
Detection and clinical importance of micrometastatic disease.
J Natl Cancer Inst 91: 1113-1124 (Review) (1999)
120. PANTEL K., BRAUN S.:
Molecular determinants of occult metastatic tumor cells in bone marrow.
Clin Breast Cancer 2: 222-228 (Review) (2001)
121. PAPAC R.:
Bone marrow metastases. A review.
Cancer 74: 2403-2413 (Review) (1994)

-
122. PATEROK E.M., SIEBZEHRÜBL E., MEYER M.:
Altersspezifische und alterskorrigierte Mortalität gynäkologischer Karzinome -
einschließlich Mammakarzinom.
Geburtsh Frauenheilkd 55: 177-181 (1995)
123. PINKUS G.S., KURTIN P.:
Epithelial membrane antigen – a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohisto-
chemical profile in epithelial, mesenchymal and hematopoietic neoplasms using paraffin
sections and monoclonal antibodies.
Hum Pathol 16: 929-940 (1985)
124. PORRO G. MENARD S., TAGLIABUE E., OREFICE S., SALVADORI B., SQUICCIARINI
P., ANDREOLA S., RILKE F., COLNAGHI M.I.:
Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from
breast cancer patients.
Cancer: 61: 2407-2411 (1988)
125. PUTZ E., WITTEW K., OFFNER S., STOSIEK P., ZIPPELIUS A., JOHNSON J., ZAHN
R., RIETHMÜLLER G., PANTEL K.:
Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone
marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human
micrometastases.
Cancer Res 59: 241-248 (1999)
126. 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.,
NEVILLE A.M.:
Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer.
Lancet 2: 1271-1274 (1983)
127. RELIHAN N., MC GREAL G., KELLY J., RYAN D., O'SULLIVAN G.C., REDMOND H.P.:
Combined sentinel lymph-node mapping and bone-marrow micrometastatic analysis for im-
proved staging in breast cancer.
Lancet 354: 129-130 (1999)
128. REINER A., NEUMEISTER B., SPONA J., REINER G., SCHEMOER M., JAKESZ R.:
Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in
human primary breast cancer.
Cancer Res 50: 7057-7061 (1990)

-
129. RIETHMÜLLER G., JOHNSON J. P.:
Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancers.
Curr Opin Immunol 4: 647-655 (1992)
130. Robert Koch Institut:
Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland.
Robert Koch Institut, Berlin: 1-6 (1999)
131. RODER J.D., THORBAN S., PANTEL K., SIEWERT J.R.:
Micrometastases in bone marrow. Prognostic indicators for pancreatic cancer.
World J Surg 23: 888-891 (2001)
132. RUTSCH M.T.:
Prognosefaktoren beim operablen Mammakarzinom: Histologisches Grading versus
Hormonrezeptorstatus.
Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich (1995)
133. SALVADORI B., SQUICCIARINI P., ROVINI D., OREFICE S., ANDREOLA S., RILKE F.,
BARLETTA L., MENARD S., COLNAGHI M.I.:
Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of
breast cancer patients.
Eur J Cancer 26: 865-867 (1990)
134. SCHALLER G., FUCHS I., PRITZE W., EBERT A., HERBST H., PANTEL K.:
Elevated keratin-18-protein expression indicates a favourable prognosis in patients with
breast cancer.
Clin Cancer Res 2: 1879-1885 (1996)
135. SCHLIMOK G., FUNKE I., HOLZMANN B., GÖTTLINGER G., SCHMIDT G., HÄUSER H.,
SWIERKOT S., WARNECKE H. H., SCHNEIDER B., KOPROWSKI H., RIETHMÜLLER G.:
Micrometastatic cancer cells in bone marrow: In vitro detection with anti-cytokeratin and in
vivo labelling with anti-17-1A monoclonal antibodies.
Proc Natl Acad Sci USA 84: 8672-8676 (1987)
136. SCHLIMOK G., FUNKE I., BOCK B., SCHWEIBERER B., WITTE J., RIETHMÜLLER G.:
Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer:
immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance.
J Clin Oncol 8: 831-837 (1990)

137. SCHLIMOK G., FUNKE I., PANTEL K., STROBEL F., LINDEMANN F., WITTE J., RIETHMÜLLER G.:
Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance.
Eur J Cancer 27: 1461-1465 (1991)
138. SEER CANCER STATISTIC REVIEW 1973-1991.
Natl Cancer Inst NIH 94: 2789 (1994)
139. SEDMAK D.D., MEINECKE T.A., KNECHTGES D.S.:
Detection of metastatic breast carcinoma with monoclonal antibodies to cytokeratins.
Arch Pathol Lab Med 113: 786-789 (1989)
140. SHPALL E.J., GEE A.P., HOGAN C., CAGNONI P., GEHLING U., HAMI L., FRANKL W., BEARMAN S.I., ROSS M., JONES R.B.:
Bone marrow micrometastases.
Hematol Oncol Clin North Am 10: 321-343 (Review) (1996)
141. SIMMONS R., HODA S., OSBORNE M.:
Bone marrow micrometastases in breast cancer patients.
Am J Surg 180: 309-312 (Review) (2000)
142. SINGHAL H., COTE R.J., POTTER C., OSBORNE M.P.:
Bone marrow micrometastases in breast cancer: relationship to local regional disease status.
Abstract. Proceedings of SCO 13: A215 (1994)
143. SINGLETARY S.E., LARRY L., TUCKER S.L., SPITZER G.:
Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients.
J Surg Oncol 47: 32-36 (1991)
144. SLAMON J.D., GODOLPHIN W., JONES L.A., HOLT J.A., WONG S.G., KEITH D.E., LEVIN W.J., STUART S.G., UDOVE J., ULLRICH A., PRESS M.F.:
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer and ovarian cancer.
Science 244: 707-712 (1989)
145. SLOANE J.P., ORMEROD M.G., IMRIE S.F., COOMBES R.C.:
The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections.
Br J Cancer 42: 392-398 (1980)

-
146. SLOANE J.P., ORMEROD M.G.:
Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissue and its value in diagnostic tumor pathology.
Cancer 47: 1786-1795 (1981)
147. SLOANE J.P., ORMEROD M.G., CARTER R.L., GUSTERSON B.A., FOSTER C.S.:
An immunohistochemical study of the distribution of epithelial membrane antigen in normal and disordered squamous epithelium.
Diagn Histopathol 5: 11-17 (1982)
148. SOLAKOGLU O., MAIERHOFER C., LAHR G., BREIT E., SCHEUNEMANN P., HEUMOS I., PICHLMEIER U., SCHLIMOK G., OBERNE DER R., KÖLLERMANN M.W., KÖLLERMANN J., SPEICHER M.R., PANTEL K.:
Heterogenous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors.
Proc Natl Acad Sci USA 99: 2246-2251 (2002)
149. SOLOMAYER E.-F., DIEI I.J., KREMPIEN B., MEYBERG G.C., GOOLAN C., KRAINICK U., WALLWIENER D., BASTERT G.:
Results of iliac crest biopsies taken from 1465 patients with primary breast cancer.
J Cancer Res Clin Oncol 124: 44-48 (1998a)
150. SOLOMAYER E.F., DIEI I.J., MEYBERG G.C., GOLLAN C., BODE S., WALLWIENER D., BASTERT G.:
Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer.
Breast Cancer Res Treat 49: 145-154 (1998b)
151. SOLOMAYER E.F., DIEI I.J., SALANTI G., HAHN M., GOLLAN C., SCHÜTZ F., BASTERT G.:
Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients.
Clin Cancer Res 7: 4102-4108 (2001)
152. TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., PERTERSON J.A., ARKLIE J., BURCHELL J., CERIANI R.L. BOBMER W.F.:
Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture.
Int J Cancer 28: 17-21 (1981)

-
153. THOR A., VIGLIONE M.J., OHUCHI N., SIMPSON J., STEIS R., COUSAR J., LIPPMAN M., KUFE D.W., SCHLOM J.:
Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow.
Breast Cancer Res Treat 11: 133-145 (1988)
154. THORBAN S., RODER J.D., NEKARDA H., FUNK A., SIEWERT J.R., PANTEL K.:
Immunocytochemical detection of disseminated tumour cells in the bone marrow of patients with esophageal cancer.
J Natl Cancer Inst 88: 1222-1227 (1996a)
155. THORBAN S., RODER J.D., PANTEL K., SIEWERT J.R.:
Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining.
Eur J Cancer 32A: 636-635 (1996b)
156. UHLENBRUCK G.:
Tumormarker: Biochemische Aspekte und neue Perspektiven.
Med Klin (München) 81 :174-180 (1986)
157. UICC (Hrsg: WITTEKIND C., MEYER H.-J., BOOTZ F.):
TNM-Klassifikation maligner Tumoren
6. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 121-130 (2005)
158. UNTCH M., HARBECK N., EIERMANN W.:
Micrometastases in bone marrow in patients with breast cancer.
BMJ 296: 290 (1988)
159. UNTCH M.:
Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark mittels monoklonaler Antikörper bei Mammakarzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Primärtherapie.
Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München (1989)
160. UNTCH M., KAHLERT A., FUNKE I.:
Detection of cytokeratin 18-positive cells in bone marrow of breast cancer patients: no prediction of bad outcome.
Proc Am Soc Clin Oncol: 18 639a (1999)

-
161. WECKERMANN D., MÜLLER P., WAWROSCHEK F., HARZMANN R., RIETHMÜLLER G., SCHLIMOK G.:
Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value.
J Urol 166: 699-703 (2001)
162. WEISS L.:
Principles of Metastasis.
Academic Press, New York: 34-46 (1985)
163. WILSON R.E., DONEGAN W.L., METTLIN C., NATARAJAN N., SMART C.R., MURPHY G.P.:
The 1982 national survey of carcinoma of the breast in the United States by the American College of Surgeons.
Surg Gynecol Obstet 159: 309-318 (1984)
164. WOLLENBERG B., OLLESCH A., MAAG K., FUNKE I., WILMES E.:
Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches.
Laryngorhinootologie 73: 88-93 (1994)
165. ZHONG X.Y., KAUL S., EICHLER A., BASTERT G.:
Low specificity of MUC1 as a marker to detect epithelial-cancer dissemination in human bone marrow and blood.
Clin Lab 44: 151-163 (1998)
166. ZHONG X.Y.:
Tumorzellnachweis im Knochenmark, peripherem Blut und Leukaphereseprodukten bei Patientinnen mit Mammakarzinom.
Dtsch Med Wochenschr 125: 840-844 (2000)

7 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. R. Kreienberg, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung wissenschaftlich tätig zu sein, indem er mir die vorstehende Arbeit anvertraute.

Herrn Dr. med. Ch. Jäger bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Er hat die Planung, Durchführung und Auswertung der Untersuchungen intensiv begleitet. Das Gelingen der Arbeit wurde wesentlich durch seine stete Hilfsbereitschaft, sein großes Engagement und seine umfangreiche kritische Anregung beeinflusst.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern des endokrinologisch-onkologischen Labors der Universitätsfrauenklinik, insbesondere Frau Regina Grundmann und Frau Agnes Fehlings für ihre Unterstützung bei der Aufarbeitung der Präparate danken.

Für die private und moralische Unterstützung sowie die Hilfe beim Layout möchte mich ganz herzlich bei Stefan Vinaricky bedanken.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Bossert
Vorname: Sandra, Nicole
Wohnort: Eichenlaubweg
75181 Pforzheim
Geburtstag: 17.08.1975
Geburtsort: Pforzheim
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1982-1986 Grundschule in Pforzheim-Eutingen
1986-1995 Gymnasium in Pforzheim
23.06.1995 Abitur

Studium

Okt. 1995 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Ulm
Aug. 1997 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1998 1. Staatsexamen
April 2001 2. Staatsexamen
April 2001 Wechsel an die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
4/2003-3/2004 Praktisches Jahr, Hegau-Klinikum Singen und Kantonsspital Schaffhausen (Schweiz)
14.05.2002 Drittes Staatsexamen, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
01.01.2004 Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

- 01.07.2002-31.12.2003 Ärztin im Praktikum Abteilung für Anästhesie,
Kantonsspital Schaffhausen (Schweiz)
- 01.01.2004-30.09.2005 Assistenzärztin Abteilung für Innere Medizin,
Kantonsspital Schaffhausen (Schweiz)
- seit 01.11.2005 Assistenzärztin Abteilung für Anästhesiologie,
Kantonsspital St. Gallen (Schweiz)

Pforzheim, den 10. Januar 2006

.....

(Sandra Bossert)