

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe- Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

Prognostischer Einfluss von persistierenden isolierten Tumorzellen im  
Knochenmark von Mammakarzinom- Patientinnen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Elke Sienel

aus

Tübingen

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. W. Janni

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. St. K. Bohlander

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. B. Rack

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
<b>3 Grundlagen</b> .....	<b>8</b>
3.1 EPIDEMIOLOGIE .....	8
3.2 HISTOLOGIE UND TNM- KLASSIFIKATION DES MAMMAKARZINOMS .....	9
3.3 DIAGNOSTIK UND THERAPIE .....	12
3.3.1 Diagnostik.....	12
3.3.2 Therapie.....	12
3.4 PROGNOSE UND PRÄDIKTION .....	17
3.5 METASTASIERUNG .....	19
3.6 MIKROMETASTASEN.....	19
3.7 ISOLIERTE TUMORZELLEN .....	20
3.8 NACHWEISMETHODEN ISOLIRTER TUMORZELLEN.....	21
3.8.1 Immunhistochemische Nachweismethoden.....	21
3.8.2 Polymerasekettenreaktion.....	23
<b>4 Patienten und Methoden</b> .....	<b>24</b>
4.1 PATIENTEN.....	24
4.2 METHODEN .....	29
4.2.1 Knochenmarkaspiration.....	29
4.2.2 Knochenmarkaufbereitung und Immunzytochemie.....	30
4.3 KLINISCHER VERLAUF .....	32

4.4 STATISTISCHE ANALYSE .....	35
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
5.1 PERSISTENZ ISOLIERTER DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK	37
5.2 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN .....	43
5.3 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND FERNMETASTASENFREIES ÜBERLEBEN .	45
5.5 ZEITPUNKT DER KNOCHENMARKNACHPUNKTION .....	47
5.4 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND GESAMTÜBERLEBEN.....	50
5.5 MULTIVARIATE ÜBERLEBENSANALYSE.....	52
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>68</b>
<b>10 Danksagung .....</b>	<b>70</b>

## 1 Einleitung

Die Einschätzung der Prognose ist für die Therapie des Mammakarzinoms von großer Bedeutung. Bei etwa einem Drittel nodalnegativer Mammakarzinom-Patientinnen metastasiert der Tumor im Verlauf, obwohl zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Tumorzelldisseminierung in die axillären Lymphknoten nachgewiesen werden konnte (42). Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gelten als Ursprungsort für die Fernmetastasierung (7, 22). Die Hauptursache für ein tumorabhängiges Sterben von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ist die Metastasierung. Derzeit basiert die Entscheidung über Therapiewahl und Therapiedauer auf empirischen Daten.

Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko können jedoch zum Zeitpunkt der Primärdiagnose durch den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark identifiziert werden (7). Mit den konventionellen Screening- Methoden können isolierte disseminierte persistierende Tumorzellen im Knochenmark nicht entdeckt und nicht im Verlauf beobachtet werden. Die immunzytochemische Untersuchung des Knochenmarks nach Knochenmarkaspiration könnte eine Möglichkeit sein, um auch nach Resektion des Primärtumors bei krankheitsfreien Patientinnen noch eine Einschätzung der weiteren Prognose vorzunehmen. Des weiteren könnte durch den Nachweis isolierter disseminierter Tumorzellen eine Verlaufskontrolle der Tumorlast und der Therapieeffizienz erfolgen.

Disseminierte Tumorzellen könnten einen Angriffspunkt der adjuvanten Therapie darstellen. Da disseminierte Tumorzellen sich jedoch häufig in einem nicht proliferativen Status befinden und somit zum Teil möglicherweise wenig durch proliferationshemmende Zytostatika angegriffen werden (37), könnte eine Antikörpertherapie die adjuvante Therapie verbessern.

Einen ersten Hinweis für den Benefit adjuvanter Antikörpertherapie zeigen aktuelle Daten einer randomisierten, multizentrischen Vergleichsstudie (HERA TRIAL) (40). Patientinnen mit

HER2-neu positivem primärem Mammakarzinom profitierten nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie von einer sekundären Antikörpertherapie mit Trastuzumab (40). Im Anschluss an die adjuvante Chemotherapie wurde Trastuzumab ein Jahr lang alle drei Wochen verabreicht. Es zeigte sich ein signifikant verlängertes krankheitsfreies Überleben sowie ein signifikant vermindertes Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne Trastuzumab- Therapie. Die Wirkung von Trastuzumab war unabhängig von Tumorcharakteristika und der adjuvanten Chemotherapie (40). In dieser Studie wurde nicht der Zusammenhang mit isolierten disseminierten Tumorzellen untersucht. Um neue adjuvante Therapieformen zu evaluieren und zu etablieren könnte das Wissen um ihren Einfluss auf die Persistenz von disseminierten isolierten Tumorzellen im Knochenmark jedoch hilfreich sein.

## **2 Fragestellung**

Diese Studie wurde initiiert, um den prognostischen Einfluss von persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zu untersuchen. Hierzu sollte untersucht werden, ob eine Persistenz isolierter disseminierter Tumorzellen vorliegen kann, und falls ja, welchen Einfluss sie auf das krankheitsfreie Überleben, auf das fernmetastasenfreie Überleben und auf das Gesamtüberleben haben. Beim Vorliegen eines prognostischen Einflusses sollte zudem der Nachpunktionszeitpunkt mit dem höchsten prognostischen Einfluss persistierender Tumorzellen im Knochenmark bestimmt werden.

## **3 Grundlagen**

### **3.1 EPIDEMIOLOGIE**

Mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom weltweit der häufigste bösartige Tumor der Frau (46). In Deutschland erkrankt etwa jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Unter einem primärem Mammakarzinom versteht man das erstmalige Auftreten von einem malignen Tumor in der Brustdrüse.

Bei etwa 45.000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Deutschland und 19.000 Patientinnen, die an dieser Erkrankung versterben erscheint es sicher, dass diese Problematik auch noch in Zukunft einen großen Stellenwert in der Humanmedizin einnehmen und eine Herausforderung für die Wissenschaft bleiben wird.

### **3.2 HISTOLOGIE UND TNM- KLASSIFIKATION DES MAMMAKARZINOMS**

Invasiv-duktales Karzinome sind mit 65-80% der Mammakarzinome die häufigste histologische Variante, gefolgt von den lobulären (6-15%), den medullären (3%), den tubulären (1-15%), den muzinösen (1-2%) und den papillären Karzinomen (1-7%) (48). Die TNM- Klassifikation ist eine von der "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC) vorgeschlagene Stadieneinteilung von malignen Tumoren (55). Dabei beschreibt T (Tumor) die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) das von Fernmetastasen. Durch Hinzufügen von Zahlen wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben.

Die pTNM- Klassifikation der Karzinome erfolgt postoperativ anhand des histopathologischen Befundes. Die pathologische Klassifikation erfordert die Untersuchung des exstirpierten Primärtumors. Seit 01.01.2003 wurden Mikrometastasen in die TNM- Klassifikation des Mammakarzinoms aufgenommen (47, 55).

**Tabelle 1:** TNM- Klassifikation nach (55)

**pT - Primärtumor**

pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1b	mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut (Anmerkung: Die Brustwand schließt die Rippen, die interkostalen Muskeln und den vorderen Serratus-Muskel mit ein, nicht aber die Pectoralis-Muskulatur.)
pT 4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT 4b	mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT 4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT 4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

### **pN - Regionale Lymphknoten**

- pNX Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
- pN0 keine regionären Lymphknotenmetastasen (Anmerkung: Fälle mit isolierten Tumorzellen in regionären Lymphknoten werden als pN0 klassifiziert. Isolierte Tumorzellen (ITC) sind definiert als einzelne Tumorzellen oder kleine Kluster von Zellen, die nicht größer als 0,2 mm in der größten Ausdehnung sind und die üblicherweise durch immunhistochemische oder molekulare Methoden entdeckt und manchmal in der HE-Färbung verifiziert werden können. Typischerweise zeigen ITCs keine metastatische Aktivität, zum Beispiel Proliferation oder Stromareaktion.)
- pN1mi Mikrometastasen (größer als 0,2 mm, aber nicht größer als 2 mm)
- pN1 Metastase(n) in 1–3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Wächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar *b*
- pN1a Metastasen in 1–3 axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 0,2 cm in größter Ausdehnung
- pN1b Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Wächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar *b*
- pN1c Metastasen in 1–3 axillären Lymphknoten *und* Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), nachgewiesen durch Untersuchung des Wächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar *b*
- pN2 Metastase(n) in 4–9 axillären Lymphknoten *oder* in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen *c*
- pN2a Metastasen in 4–9 axillären Lymphknoten, zumindest eine Metastase mehr als 0,2 cm in größter Ausdehnung
- pN2b Metastase(n) in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
- pN3 Metastasen in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten *oder* in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten *oder* in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase *oder* mehr als 3 axillären Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht auffälligen, mikroskopischer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna *oder* Metastase(n) in supraklavikulären Lymphknoten.
- pN3a Metastasen in 10 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 0,2 cm) *oder* in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten.
- pN3b Metastasen in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei mindestens einem klinisch auffälligen Lymphknoten *oder* Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, nachgewiesen durch Untersuchung des Wächterlymphknotens, aber nicht klinisch erkennbar *b*
- pN3c Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.
- (Anmerkungen: *b* Nicht klinisch auffällig = nicht entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) *c* klinisch auffällig = entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) oder makroskopisch sichtbar)

### **pM - Fernmetastasen**

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

### **3.3 DIAGNOSTIK UND THERAPIE**

#### **3.3.1 Diagnostik**

Für die Früherkennung sind die Selbstuntersuchung der Brust, die ärztliche Untersuchung, die Mammasonografie sowie die Mammografie von Bedeutung. Bei unklarem bzw. suspektem Befund werden invasive Methoden wie Feinnadelpunktion, Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie oder Probeexstirpation angewendet.

#### **3.3.2 Therapie**

##### **3.3.2.1 Operative Therapie**

Derzeit lassen sich 60-70 % aller Mammakarzinome brusterhaltend operieren (21). Bei der Resektion palpabler Tumoren ist zu beachten, dass diese sicher im Gesunden entfernt werden, ohne dass unnötig viel gesundes Gewebe reseziert wird. Eine modifiziert radikale Mastektomie (mit oder ohne Wiederaufbau) ist in folgenden Situationen indiziert: multizentrisches Wachstum, ungünstiges Verhältnis Tumor-/Brustvolumen, fehlende Tumorfreiheit trotz mehrfacher Nachresektion, Wunsch der Patientin, ausgedehnter Hautbefall/inflammatorische Komponente (21). Die Skin-sparing-Mastektomie, also die Entfernung des gesamten Brustdrüsenparenchyms unter Erhalt des Hautmantels, hat im Wesentlichen dieselben Indikationen wie auch die modifiziert radikale Mastektomie (21).

Neben der Resektion des Primärtumors ist die systematische regionale Lymphadenektomie ein weiterer zentraler Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms. Für eine zuverlässige

Beurteilung der axillären Lymphknoten ist die Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten aus Level I und II erforderlich (21). Bei kleinen Tumoren <2cm ist zur Beurteilung des Lymphknotenstatus die selektive Entfernung des Wächterlymphknotens (Sentinel lymph node, SLN) ausreichend. Der SLN ist der erste vom Tumor drainierte und durch Patentblau und/ oder Technetium markierte axilläre Lymphknoten (17, 51). Eine Indikation für eine SLN- Exzision besteht bei folgenden Patientinnen (27): klinischen Tumoren <2cm, bei fehlendem klinischem axillären Lymphknotenbefall, bei fehlender inflammatorischer Tumorausbreitung und wenn keine Voroperationen im Bereich der Axilla durchgeführt wurden. Bei Nachweis axillärer Lymphknotenmetastasen durch SLN- Exzision oder bei Kontraindikationen gegen eine SLN- Exzision ist eine systematische axilläre Dissektion durchzuführen (21).

### **3.3.2.2 Adjuvante Strahlentherapie**

Die Strahlentherapie trägt wesentlich zur lokalen Tumorkontrolle bei und beeinflusst bei vielen Patientinnen auch das Gesamtüberleben nachweislich positiv (39). Die Bestrahlung des restlichen Brustdrüsenkörpers ist bei brusterhaltender Operation grundsätzlich obligat. Die Bestrahlung der Thoraxwand und/oder der infra-/ und supraclaviculären Lymphabflussgebiete ist nur bei ausgedehntem Lymphknotenbefall oder anderen Risikofaktoren notwendig. Eine Bestrahlung nach axillärer Dissektion ist in der Regel nicht notwendig (21).

### **3.3.2.3 Adjuvante Chemotherapie**

Auf eine adjuvante Systemtherapie kann generell nur bei Patientinnen mit einem minimalen Rezidivrisiko verzichtet werden (Tabelle 2). Diese Patientinnen müssen laut Konsensusempfehlungen von St. Gallen (Tabelle 2) alle folgenden Kriterien erfüllen: Nodal-negativer Axillastatus, Alter  $\geq$  35 Jahre, Hormonrezeptorstatus positiv, Tumor  $\leq$  2 cm, histopathologisches Grading 1, kein Nachweis einer HER2-Überexpression oder vaskulären Invasion am Primärtumor.

Für eine adjuvante Chemotherapie stehen verschiedene Schemata zur Verfügung. Das CMF-Schema war eine der ersten Kombinationstherapien, welche bei Patientinnen mit lokoregionär fortgeschrittener Erkrankung einen Vorteil sowohl bezüglich des rezidivfreien, wie auch bezüglich des Gesamtüberlebens zeigen konnte (3, 4). Auch derzeit ist CMF immer noch eine mögliche Therapieoption für Patientinnen mit niedrigem Risikoprofil (17, 29). Bei Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko ist derzeit eine Dreifach-Anthracyklinkombination ( $\geq$  30 mg Etoposin/Woche über 6 Zyklen die adjuvante Standardchemotherapie. Taxane in der

adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms können die adjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom optimieren, sollten aber wegen noch offener Fragen innerhalb von Studien eingesetzt werden (21).

**Tabelle 2:** Risikogruppen nach St. Gallen Konsensus 2005

Risikokategorie	hormonsensibel	nicht hormonsensibel
niedriges Risiko	nodal negativ: ER und/oder PgR positiv, und <u>alle</u> der folgenden Kriterien:  pT ≤ 2 cm und Grading 1 und Alter ≥ 35 Jahre und keine vaskuläre Invasion und HER-2/neu negativ	nicht anwendbar*
mittleres Risiko	nodal negativ ER und/oder PgR positiv, und <u>mindestens eines</u> der folgenden Kriterien:  pT > 2 cm oder Grading 2 - 3, oder Alter < 35 Jahre oder HER-2/neu positiv oder vaskuläre Invasion oder nodal positiv 1 – 3 LK mit HER- 2/neu negativ und ohne vaskuläre Invasion	gleiche Kriterien aber hormonrezeptornegativ
hohes Risiko	nodal positiv < 3 LK oder nodal positiv mit extensiver vaskulärer Invasion oder HER-2/neu positiv	gleiche Kriterien aber hormonrezeptornegativ

\*Mikroinvasive Karzinome oder spezifischer Tumorphänotyp (z.B. medulläre oder apokrine oder myoepitheliale Karzinome) ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen

### **3.3.2.4 Adjuvante endokrine Therapien**

Grundvoraussetzung für das Ansprechen jeder endokrinen Therapie ist ein hormonrezeptorpositives, also ein hormonsensitives Mammakarzinom. Im Wesentlichen gibt es drei Möglichkeiten für eine adjuvante endokrine Therapie.

#### **3.3.2.4.1 Ovarsuppression (Prämenopause)**

Neben der Ovarektomie stellt die Therapie mit GnRH- Agonisten wie Goserelin oder Leuprorelin eine weitere Therapieoption dar. Mit GnRH- Agonisten besteht die Möglichkeit einer zeitlich begrenzten Suppression der Ovarialfunktion. Die zeitlich begrenzte Ausschaltung der Ovarialfunktion (mindestens zwei Jahre) ist einer Chemotherapie mit CMF äquivalent (21). Bei einer endokrinen Therapie mit GnRH- Agonisten sollte nach Abschluss Tamoxifen 20 mg pro Tag für weitere fünf Jahre verabreicht werden (21).

#### **3.3.2.4.2 Tamoxifen (Prä- und Postmenopause)**

Alle Patientinnen mit einem hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom, die nicht die Kriterien für ein niedriges Rezidivrisiko nach St. Gallen aufweisen, werden obligat über fünf Jahre mit Tamoxifen behandelt (16).

#### **3.3.2.4.3 Aromataseinhibitoren (Postmenopause)**

In der Postmenopause sollte die Hormontherapie des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms initial oder im Anschluss an eine Behandlung mit Tamoxifen einen Aromataseinhibitor wie Anastrozol oder Letrozol beeinhaltet (54). In der Prämenopause werden Aromataseinhibitoren nur innerhalb von Studien verabreicht.

### **3.4 PROGNOSE UND PRÄDIKTION**

Prognosefaktoren dienen dazu, den von einer Therapie unbeeinflussten Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung möglichst genau abzuschätzen (Rezidiv-, Todesrisiko). Beim Mammakarzinom lassen sich etablierte und neuere Prognosefaktoren unterscheiden (Tabelle 3). Etablierte Prognosefaktoren müssen routinemäßig bestimmt werden. Sie werden für Therapieentscheidungen benötigt. Die mehr als 100 beschriebenen neueren Faktoren sind noch unzureichend untersucht. Prädiktive Faktoren sollen Therapieerfolg und Therapieansprechen vorhersagen.

**Tabelle 3:** Übersicht über die wichtigsten Prognosefaktoren/ prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

Prognosefaktoren	Prädiktive Faktoren
Etablierte (Bestimmung obligat)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter (&lt; 35 Jahre ungünstige Prognose)</li> <li>• Tumorgroße</li> <li>• Nodalstatus</li> <li>• Hormonrezeptorstatus</li> <li>• histologischer Tumortyp</li> <li>• Grading</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonrezeptorstatus für Ansprechen einer endokrinen Therapie</li> <li>• HER2 für das Ansprechen einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin)</li> <li>• Menopausenstatus: Hormonentzug bei hormonsensitiven Mammakarzinomen</li> </ul>
Neuere (Bestimmung nicht obligat)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitose-Index, S-Phase, Ki-67, MIB, PCNA, TLI</li> <li>• EGF, IGF1, IGF2, pS2, TSP</li> <li>• Cathepsin D, B und L, uPA, PAI-1</li> <li>• Adhäsionsmoleküle</li> <li>• Chemokine, Ep-CAM, CD-44 codierte Glykoproteine, E-Cadherin, Lamininrezeptor</li> <li>• Angiogenese</li> <li>• VEGF</li> <li>• Apoptose</li> <li>• TNF, FasL, TRAIL, bcl-2, bax,</li> <li>• Onkogene /Tumorsuppressorgene</li> <li>• p53, c-myc, BRCA 1, BRCA 2</li> <li>• Immunhistologischer Tumorzellnachweis in Knochenmark, Lymphknoten</li> </ul>	

### **3.5 METASTASIERUNG**

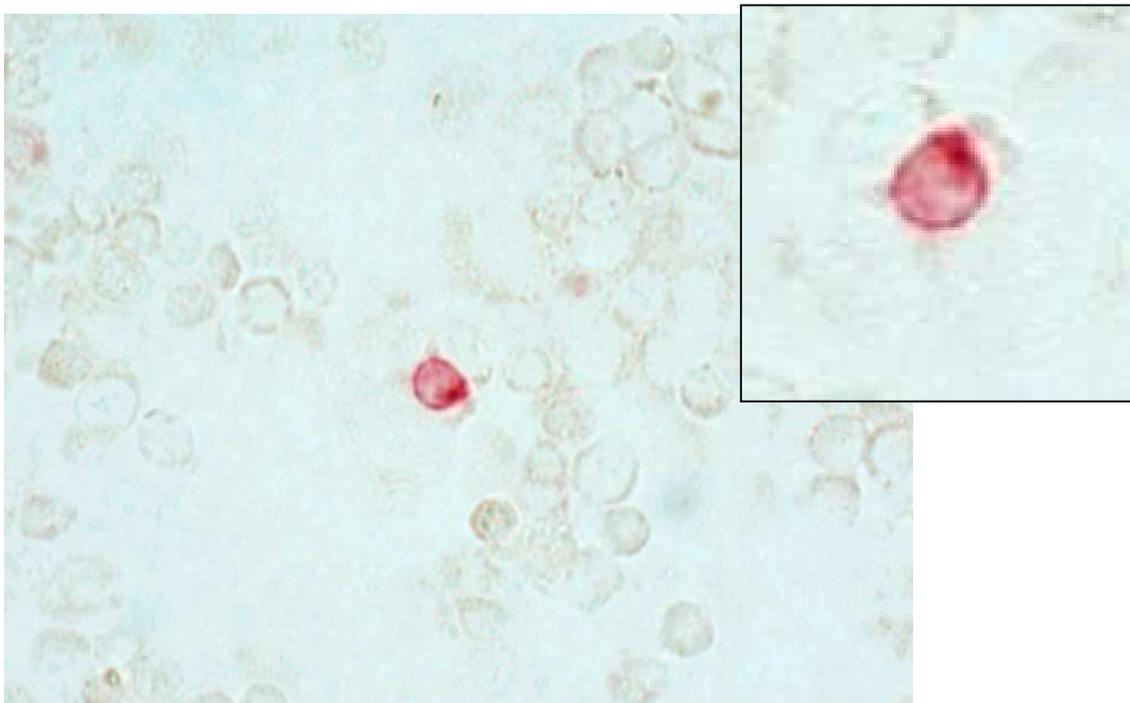
Das Mammakarzinom metastasiert frühzeitig in Knochen (25%), in die Lunge (15%), in Pleura (12%), in supraklavikuläre Lymphknoten (10%), Leber (8%), ZNS (5%) und ins Ovar (3%). Bei vielen Frauen besteht zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine systemische Erkrankung. Die Hauptursache für ein tumor- abhängiges Versterben ist die Metastasierung.

### **3.6 MIKROMETASTASEN**

Gemäß den Vorgaben der 6. Auflage der TNM-Klassifikation (55) muss eine Unterscheidung zwischen "isolierten Tumorzellen" und "Mikrometastasen" erfolgen (siehe Kapitel 1.2). Der Begriff "Mikrometastasen" ist definiert als metastatische Infiltration, die in ihrer größten Ausdehnung mehr als 0,2 mm aber nicht mehr als 2 mm beträgt (20). Sie unterscheiden sich von disseminierten isolierten Tumorzellen. Die derzeitige TNM- Klassifikation sieht diese Definitionen für Tumorzellen in Lymphknoten vor. In dieser Studie wurden die Begriffsdefinitionen für Tumorzellen im Knochenmark in Analogie übernommen.

### 3.7 ISOLIERTE TUMORZELLEN

Isolierte Tumorzellen werden definiert als einzelne Tumorzellen (Abbildung 1) oder kleine Ansammlungen von Zellen, die in ihrer größten Ausdehnung 0,2 mm nicht überschreiten und nur mittels Immunhistochemie oder mit Hilfe molekularer Methoden wie reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR) entdeckt werden können (20, 32). Allerdings können isolierte Tumorzellen gegebenenfalls mittels HE-Färbung verifiziert werden. Isolierte Tumorzellen zeigen typischerweise keine Hinweise für eine metastatische Aktivität (d.h. Proliferation oder Stromareaktion) oder eine Penetration von Sinuswänden (20). Fälle mit isolierten Tumorzellen in Lymphknoten werden als N0 klassifiziert. Patientinnen mit disseminierten isolierten Tumorzellen im Knochenmark werden als M0 klassifiziert (20, 47, 55).



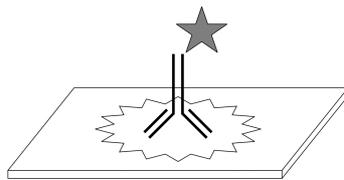
**Abbildung 1:** Isolierte Tumorzelle im Knochenmarkspirat mit Detailansicht

### 3.8 NACHWEISMETHODEN ISOLIERTER TUMORZELLEN

#### 3.8.1 Immunhistochemische Nachweismethoden

##### Die direkte Nachweismethode

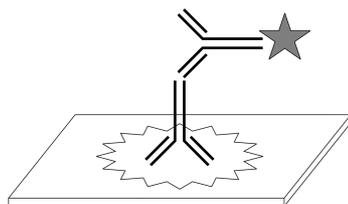
Bei der direkten Nachweismethode ist der primäre Antikörper mit einem Fluorochrom oder Enzym markiert (Abbildung 2). Diese Methode beinhaltet zwei Nachteile. Zum einen ist das Färbesignal meist schwach, weil nicht so viele Fluorochrome bzw. Enzyme pro Antikörper zur Verfügung stehen wie bei der indirekten Methode. Zum anderen muß jeder Antikörper mit einem Fluorochrom oder Enzym konjugiert werden. Dies ist einerseits sehr aufwendig und teuer.



**Abbildung 2:** Immunhistochemische Nachweismethoden: Direkte Nachweismethode

##### Die indirekte Nachweismethode

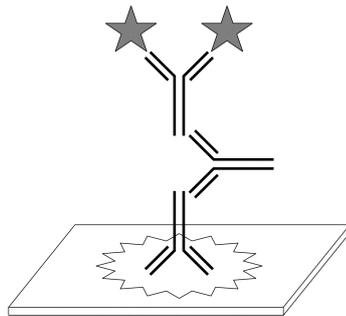
Bei der indirekten Nachweismethode wird der unmarkierte Antikörper über einen Fluorochrom- oder Enzym-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist nachgewiesen (Abbildung 3). Da die primären Antikörper aus wenigen Tierarten stammen wie Maus, Kaninchen oder Ziege genügt eine relativ geringe Anzahl konjugierter Sekundärantikörper.



**Abbildung 3:** Immunhistochemische Nachweismethoden: Indirekte Nachweismethode

### Die APAAP-/PAP-Methode

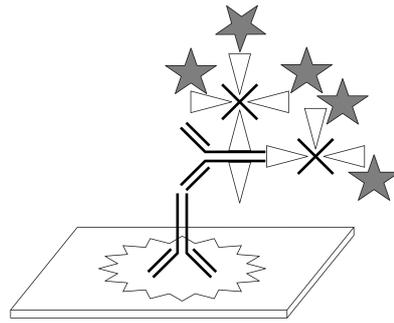
Bei dieser indirekten Nachweismethode wird ein Brückenantikörper verwendet, der den Primärantikörper mit dem Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-/ Peroxidase anti-Peroxidase-Komplex verbindet. Dieser Komplex bestehend aus Antikörper und Enzym (Alkalische Phosphatase oder Peroxidase) ist gegen den Primärantikörper gerichtet (Abbildung 4). Es handelt sich also um einen Enzym anti-Enzym Komplex. Der primäre und der gegen das Enzym gerichtete Antikörper stammen von der gleichen Tierart, der Brückenantikörper ist gegen Immunglobuline dieser Tierart gerichtet. Die Intensität und Sensitivität der Immunfärbung ist der direkten und der indirekten Nachweismethode deutlich überlegen.



**Abbildung 4:** Immunhistochemische Nachweismethoden: APAAP-/PAP-Methode

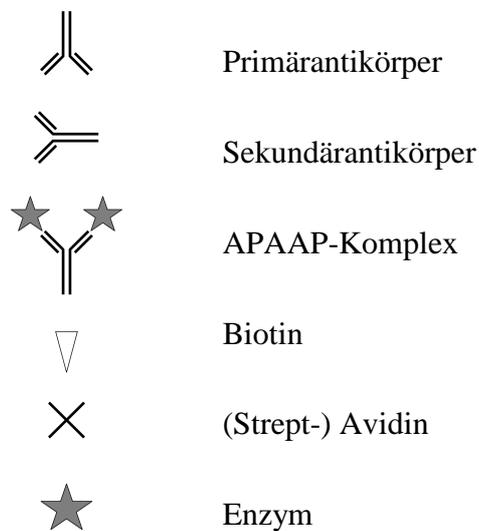
### Die ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Enzym-Komplex Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß-Glykoprotein, zum Biotin (Vitamin H). Der ABC-Komplex ist ein Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym. Dieser Komplex wird über einen biotinylierten Sekundärantikörper an den Primärantikörper (indirekte Nachweismethode) oder über einen biotinylierten Primärantikörper direkt an das Antigen gekoppelt (direkte Nachweismethode). Meistens binden mehrere ABC-Komplexe am Primär- oder Sekundärantikörper (Abbildung 5). Es werden somit mehrere Marker-Enzymmoleküle am Ort des gewebsgebundenen Antigens nachweisbar und dadurch die Sensitivität erhöht.



**Abbildung 5:** Immunhistochemische Nachweismethoden: ABC-Methode

**Legende:**



### 3.8.2 Polymerasekettenreaktion

Neben dem immunhistochemischen Ansatz ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) das zweite Standardverfahren, um einzelne disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Prinzipiell muss hier unterschieden werden zwischen dem Nachweis von spezifischen Mutationen auf DNA-Ebene (p53, k-ras) mittels PCR und dem Nachweis von m-RNA tumorassoziierter (CEA) bzw. gewebsspezifischer Marker (Zytokeratin) mittels RT-PCR (32). Das Hauptproblem der RT-PCR sind zur Zeit falsch positive Befunde, bedingt u. a. durch Amplifikation von Pseudogenen oder durch illegitime Expression kleiner Mengen tumorassoziierter m-RNA in gesundem menschlichen Gewebe (32).

## **4 Patienten und Methoden**

### **4.1 PATIENTEN**

Im Rahmen dieser Studie zum prognostischen Einfluss von persistierenden isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurden insgesamt 228 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (pT<sub>1-2</sub> pN<sub>0-3</sub> M<sub>0</sub> R<sub>0</sub>) untersucht (23). Alle Patientinnen wurden in der I. Frauenklinik der Ludwig- Maximilians- Universität München behandelt. Sie wurden ärztlich über die Studie aufgeklärt und nur in die Studie aufgenommen, wenn sie den Aufklärungs- und Einverständnisbogen unterschrieben hatten. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig- Maximilians-Universität München lag vor.

Von den 228 Brustkrebspatientinnen wurden 67,1% brusterhaltend operiert (n=153) und 32,9% modifiziert radikal mastektomiert (n=75). Diese Operationen haben bei allen Patientinnen zu kompletten Resektionen geführt (R<sub>0</sub>). Die pTNM- Klassifikation erfolgte postoperativ anhand des histopathologischen Befundes gemäß der Einteilung der TNM- Klassifikation der UICC (55) (Tabelle 1). Das histopathologische Grading erfolgte nach Bloom und Richardson (28): G1 gut differenziert, G2 mäßig differenziert, G3 gering differenziert, G4 entdifferenziert.

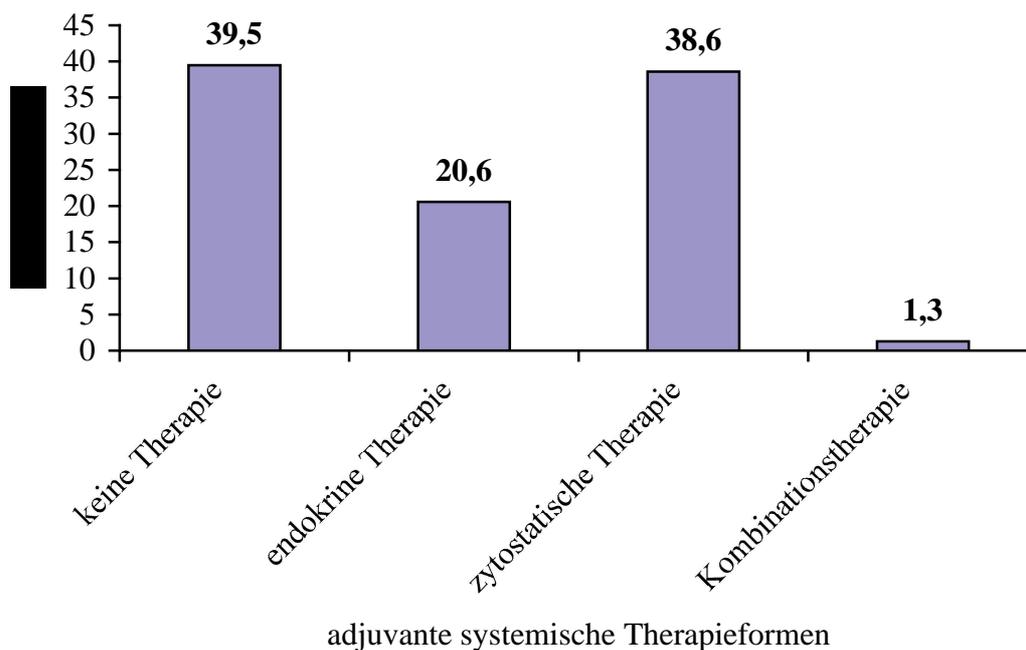
Die routinemäßig durchgeführte axilläre Lymphadenektomie umfasste die Dissektion von Lymphknoten der Level I und II. Nur wenn in Level I oder II makroskopisch ein Tumorbefall vorlag, wurde auch Level III disseziert.

Alle 153 Patientinnen, die brusterhaltend operiert wurden, erhielten im Anschluss an die operative Therapie eine Telekobaltbestrahlung der betroffenen Mamma. Nach den Leitlinien des Tumorzentrums München (TZM) (43) wurde die Radiotherapie der betreffenden Mamma einschließlich der Thoraxwand bei allen Tumoren unabhängig von der T- und N-Kategorie und auch unabhängig von der adjuvanten systemischen Therapie durchgeführt. Eine Brustwandbestrahlung nach Mastektomie wurde bei 29 Patientinnen (38,7%) vorgenommen. Nach Mastektomie wurde eine Bestrahlung der Thoraxwand bei T2-Tumoren > 3cm, bei T3- und T4-Tumoren, bei knappem Resektionsrand (< 5mm), Non-in-sano-Resektion (R1, R2, n=0) sowie bei Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa, bei Gefäßeinbrüchen, bei axillärem Lymphknotenbefall (zumindest bei mehr als drei befallenen Lymphknoten) und bei jugendlichem Alter der Patientinnen (< 35 Jahre) gemäß der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Senologie (44) vorgenommen.

Die Bestrahlung der Mammaria-interna-Lymphknoten erfolgte bei Tumorbefall der medialen Quadranten. Bei keiner der Studienpatientinnen wurde das axilläre Lymphabflussgebiet bestrahlt. Die mittlere applizierte Strahlendosis des Zielvolumens der Mamma betrug 50 Gy in 25 Fraktionen.

Gemäß der Richtlinien des Tumorzentrums München (43) erhielten alle prämenopausalen Patientinnen mit axillären Lymphknotenmetastasen eine adjuvante Chemotherapie (n=88, 38,6%), während die postmenopausalen Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus adjuvant mit Tamoxifen (20 mg/Tag,) therapiert wurden (n=47, 20,6%). Die am häufigsten angewandte adjuvante Chemotherapie bei Patientinnen bis zu drei befallenen Lymphknoten bestand aus sechs Zyklen CMF [Cyclophosphamid (600mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche), Methotrexat

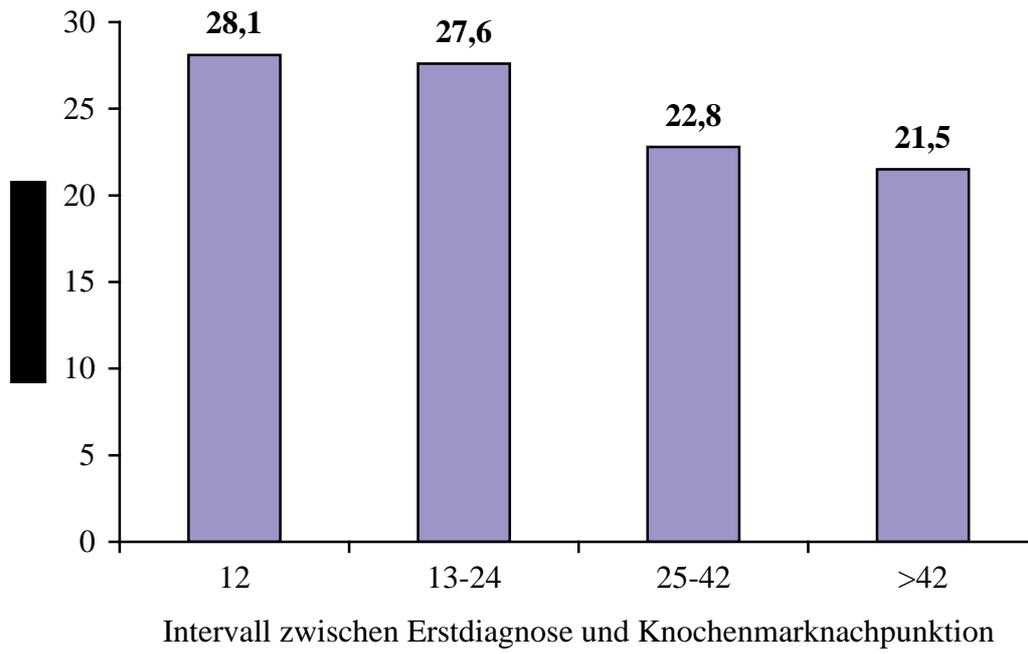
(40 mg/m<sup>2</sup>) und 5- Fluoruracil (600 mg/m<sup>2</sup>)] dreiwöchentlich. Patientinnen mit vier bis neun befallenen Lymphknoten bekamen sequenziell vier Zyklen EC [Epirubicin (90mg/m<sup>2</sup>) und Cyclophosphamid (600mg/m<sup>2</sup>)] gefolgt von drei Zyklen CMF; oder entweder gefolgt von sechs Zyklen DE [Docetaxel (75mg/m<sup>2</sup>), Epirubicin (90mg/m<sup>2</sup>)]. 86 Patientinnen ohne Lymphknotenbeteiligung und vier lymphknotenpositive Patientinnen erhielten keine adjuvante Chemotherapie (39,5%, n=90). 1,3% der Patientinnen (n=3) wurde eine Kombination aus zytostatischer und endokriner Therapie verabreicht (Abbildung 6). Aus heutiger Sicht würden diese Therapien anders erfolgen. Der derzeit gültige Therapiestandard wurde auf der Konsensuskonferenz in Sankt Gallen 2005 neu definiert (Tabelle 2).



**Abbildung 6:** Häufigkeitsverteilung adjuvanter systemischer Therapieformen

Zur Untersuchung der Persistenz isolierter disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurden Knochenmarkpunktionen aus den oberen Beckenkämmen beidseitig vorgenommen. Bei jeder

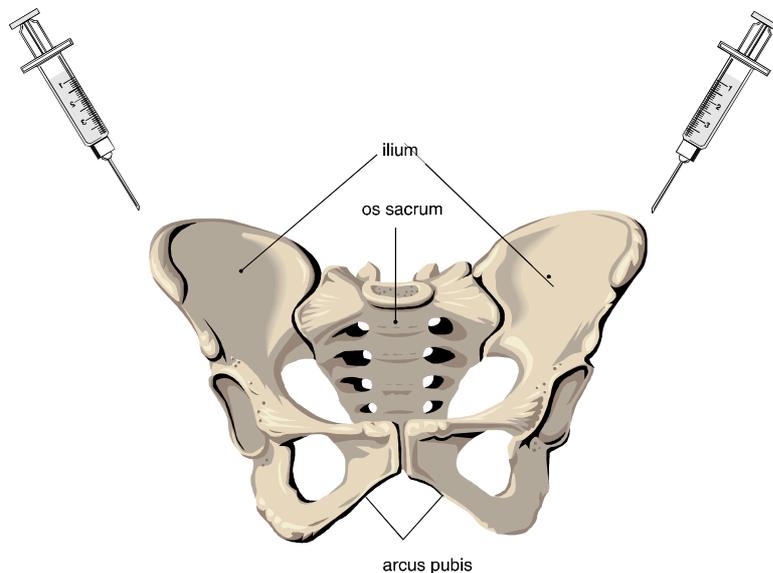
Patientin wurden mindestens zwei Knochenmarkpunktionen durchgeführt. Die erste Punktion wurde als Primärpunktion definiert, die spätere Knochenmarkpunktion als Nachpunktion. Bei 133 Patientinnen (58,3%) wurde die erste Knochenmarkpunktion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Resektion des Primärtumors in Vollnarkose durchgeführt. Unabhängig vom histopathologischen Befund wurde eine immunzytochemische Analyse des Knochenmarkspirates durchgeführt. Nach einer Zeitspanne von mindestens 20 Wochen nach Diagnosestellung erfolgte eine Knochenmarkpunktion in Lokalanästhesie. Das mediane Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Nachpunktion betrug 21,3 Monate (Minimum: 5 Monate, Maximum 175,4 Monate). Um die zeitliche Abhängigkeit der Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auszuwerten, wurden vier etwa gleich große Gruppen gebildet: bei 64 Patientinnen (28,1%) wurde innerhalb von einem Jahr eine Knochenmarknachpunktion durchgeführt, bei 63 (27,6%) im zweiten Jahr. 52 Patientinnen (22,8%) wurden innerhalb von 25- 42 Monaten und 49 Patientinnen (21,5%) wurden nach 42 Monaten nachpunktiert (Abbildung 7). In den Fällen mit mehreren Nachpunktionen pro Patientin wurde immer das Ergebnis der letzten Nachpunktion gewertet. Alle Patientinnen waren gemäß der Nachsorgeleitlinien des Tumorzentrum München (TZM) (43) zum Zeitpunkt der Nachpunktion rezidivfrei.



**Abbildung 7:** Häufigkeitsverteilung der Punktionsintervalle

## 4.2 METHODEN

### 4.2.1 Knochenmarkaspiration



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung einer Knochenmarkaspiration aus beiden Spinae iliacae anteriores superiores

Die Knochenmarkaspiration erfolgte entweder aus den beiden Spinae iliacae anteriores superiores (Abbildung 8) oder aus den Spinae iliacae posteriores superiores. Es wurden pro Seite 3 bis 5ml Knochenmark aspiriert und mit je 1 ml Heparin versetzt. Dieser Eingriff erfolgte unter sterilen Bedingungen in Lokalanästhesie bzw. vor der Operation des Primärtumors in Intubationsnarkose.

#### 4.2.2 Knochenmarkaufbereitung und Immunzytochemie

Das heparinisierte Aspirat wurde mittels HANKS-Salzlösung (Promega, Berlin) gewaschen um Lipide abzutrennen. Anschließend wurde mittels Ficoll- Hypaque (Pharmacia, Freiburg) Dichtegradientenzentrifugation (Dichte 1.077 g pro Mol, 30 Minuten bei 900 x g) die mononukleäre Zellfraktion, welche die disseminierten Tumorzellen enthält (36), isoliert. Nach der Dichtegradientenzentrifugation der Knochenmarksprobe wurde die mononukleäre Zellfraktion abpipettiert, gewaschen, in einer Zählkammer quantifiziert und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden diese Zellen mittels einer Zytozentrifuge (Hettich, Tuttlingen) fünf Minuten lang bei 150 x g auf Objektträger zentrifugiert ( $10^6$  Zellen pro Objektträger) Die Zytospinpräparate wurden über Nacht getrocknet und dann entweder gefärbt oder bei -80C gelagert.

Der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmarkaspirat erfolgte durch immunzytochemische Färbung mit dem Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (Micromet, München). Dieser Antikörper (Konzentration  $c=1,0-2,0 \mu\text{g/ml}$ ) bindet spezifisch an das Zytokeratin-Skelett epithelialer Zellen, einschließlich der Zytokeratin- Heterodimere 8-18 und 8-19 (49). Die Antikörperbindung wurde durch die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)- Methode (Abbildung 4) mit Neufuchsin sichtbar gemacht (10). Bei dieser Nachweismethode kommt ein Antikörper-Enzymkomplex bestehend aus Anti-Alkalische-Phosphatase Antikörpern und Alkalischer Phosphatase (APAAP- Komplex) zum Einsatz.. Es wird ein Brückenantikörper verwendet, der den Primärantikörper (A45-B/B3, Micromet München) mit dem APAAP- Komplex (D651, Dako) verbindet. Der Brückenantikörper (Z259, Dako) ist gegen den Anti-Alkalische-Phosphatase Antikörpern und gegen den Primärantikörper

gerichtet (Kaninchen Anti-Maus) (Abbildung 4). Primärantikörper und Anti-Alkalische-Phosphatase Antikörpern stammen von der gleichen Tierart (Maus).

Zur Überprüfung der Spezifität der immunzytochemischen Färbung wurde bei jedem Färbegang ein Zytospinpräparate pro Patient als Negativkontrolle mit Isotyp-IgG (MOPC 21, Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Als Positivkontrolle diente die Mammakarzinom Zelllinie BT-20 (36). Mittels Lichtmikroskopie wurden  $2 \times 10^6$  Knochenmarkszellen pro Patientin untersucht. Die Zytospinpräparate wurden von zwei unabhängigen Personen ausgewertet, die keinerlei Informationen über die klinischen Daten besaßen. Bei unterschiedlichen Mikroskopieergebnissen (5% der Präparate) wurde ein Konsens der beiden befundenen Beobachtern gewertet. Als Kontrollgruppe dienten 203 Patientinnen mit benignen Leiden aus früheren Untersuchungen (7).

### **4.3 KLINISCHER VERLAUF**

Die Patientinnen stellten sich je nach Bedarf, mindestens jedoch alle drei Monate, zur Nachsorgeuntersuchung in der onkologischen Ambulanz der I. Frauenklinik der LMU München vor. Die Nachsorge wurde gemäß den Leitlinien des TZM durchgeführt (Tabelle 4)(43). Eine weitergehende Diagnostik wurde je nach Symptomen und/oder Befunden veranlasst (Tabelle 5).

Wenn die Patientinnen nicht bei den Ärzten der onkologischen Ambulanz der I. Frauenklinik der LMU München in Betreuung waren, wurden die Daten von den behandelnden Gynäkologen erhoben und weitergeleitet. Alle Todesursachen und Sterbedaten wurden mit dem bayerischen Tumorregister verglichen, überprüft und nach tumorabhängiger Todesursache klassifiziert. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Median 49,8 Monate (Minimum: 6,93 Monate, Maximum: 175,4 Monate, Standardabweichung  $s= 32,1$  Monate).

**Tabelle 4:** Mammakarzinomnachsorge nach (43): Empfehlungen für symptomfreie Frauen nach abgeschlossener Primärbehandlung eines Mammakarzinoms.

a) Klinische Nachsorge							
Jahre nach Primärtherapie	Nachsorge					Früherkennung	
	1	2	3	4	5	6	und weitere
Anamnese							
Körperliche Untersuchung	alle 3 Monate			alle 6 Monate		alle 12 Monate	
Information							
Selbstuntersuchung	monatlich						

Alle anderen technischen Untersuchungen einschließlich Labor und Tumormarkern (Ausnahme Mammographie: s.u.) nur bei klinischem Verdacht auf Rezidiv und/oder Metastasen

b) Mammographie							
Jahre nach Primärtherapie	Nachsorge			Früherkennung			
	1	2	3	4 und weitere			
Nach brusterhaltender Operation							
Ipsilaterale Brust	alle 6 Monate			alle 12 Monate			
Kontralaterale Brust	alle 6 Monate			alle 12 Monate			
Nach Mastektomie							
kontralaterale Brust	alle 12 Monate			alle 12 Monate			

**Tabelle 5:** Abhängigkeit der Diagnostik von Symptomen und/oder Befunden nach (43).

Befund/Symptom	Diagnostik
Rezidiv, lokal oder lokoregional (möglichst durch Feinnadelbiopsie oder Op-Histologie gesichert)	1, 2, 3, 4, 6
Zweitumor in der kontralateralen Brust oder ipsilateral nach brusterhaltender Primärbehandlung	1, 2, 3, 4, 6
Fernmetastasen jeder Lokalisation	1, 2, 3, 4, 6
Neu aufgetretene bzw. im Charakter geänderte Knochenschmerzen, Muskelschmerzen, „Rheuma“, „Ischias“, „Hexenschuss“	2, 4, 6
Völlegefühl, Appetitlosigkeit	3, 4, 6
Husten, (Belastungs-) Dyspnoe	1, 4, 6
Kopfschmerzen, neurologische Symptome, Konzentrationsschwäche	4, 5, 6
Allgemeinsymptome (Gewichtsabnahme, Müdigkeit, Schwäche, Leistungsminderung)	4, 6
Andere Beschwerden	4, 6

1 = Röntgen-Thorax in 2 Ebenen (bei unklaren Befunden Computertomogramm);

2 = Skelettszintigramm und Röntgen eventueller Speicherherde (bei unklaren Befunden Computer- oder Kernspintomogramm);

3 = Abdomen-Sonographie (bei unklaren Befunden Computertomogramm);

4 = klinisch-chemische Untersuchungen: GOT, GPT,  $\gamma$ -GT, AP, LDH, Ca, CEA, CA15-3 und weitere je nach Klinik/Symptomatik;

5 = Schädel-Computertomogramm;

6 = spezielle Diagnostik je nach Klinik und Symptomatik.

#### 4.4 STATISTISCHE ANALYSE

Die Datenqualität wurde gesichert, indem während der Verlaufskontrolle alle Originalakten durchgesehen wurden. Um kategorische Variablen von klinisch-pathologischen Parametern mit dem Nachweis von persistierenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zu vergleichen, kam in Abhängigkeit von den Fallzahlen entweder ein zweiseitiger Chi<sup>2</sup>-Test oder ein Fischer-Exakt-Test zur Anwendung. Ein zweiseitiger t-Test wurde benutzt, um Mittelwerte von kontinuierlichen Variablen mit der Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu vergleichen.

Zur Analyse des prognostischen Einflusses von persistierenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurden das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht. Studienendpunkt für das krankheitsfreie Überleben war das Auftreten von Fernmetastasen oder Lokalrezidiven. Studienendpunkt für das Gesamtüberleben war das Versterben des Patienten. Die Überlebenszeit wurde als Zeitspanne zwischen Erstbehandlung und Datum der letzten Verlaufskontrolle oder Datum des Erreichens eines Studienendpunktes definiert. Es wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven (24) für Patienten mit und ohne persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark erstellt und mittels Log-Rank- Test verglichen. Es wurde eine multivariate Cox-Regressions-Überlebensanalyse durchgeführt, um zu untersuchen ob der prognostische Wert persistierender disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von bekannten Prognoseparametern abhängt oder ein eigenständiger unabhängiger Prognoseparametern ist. Dabei wurden die in der univariaten Analyse prognostisch signifikanten Parameter schrittweise in das Regressionsmodell eingefügt. Nicht signifikante Variable in der Regressionsanalyse wurden von einer weiteren multivariaten Analyse ausgeschlossen. *P*-Werte kleiner 0,05 wurden als

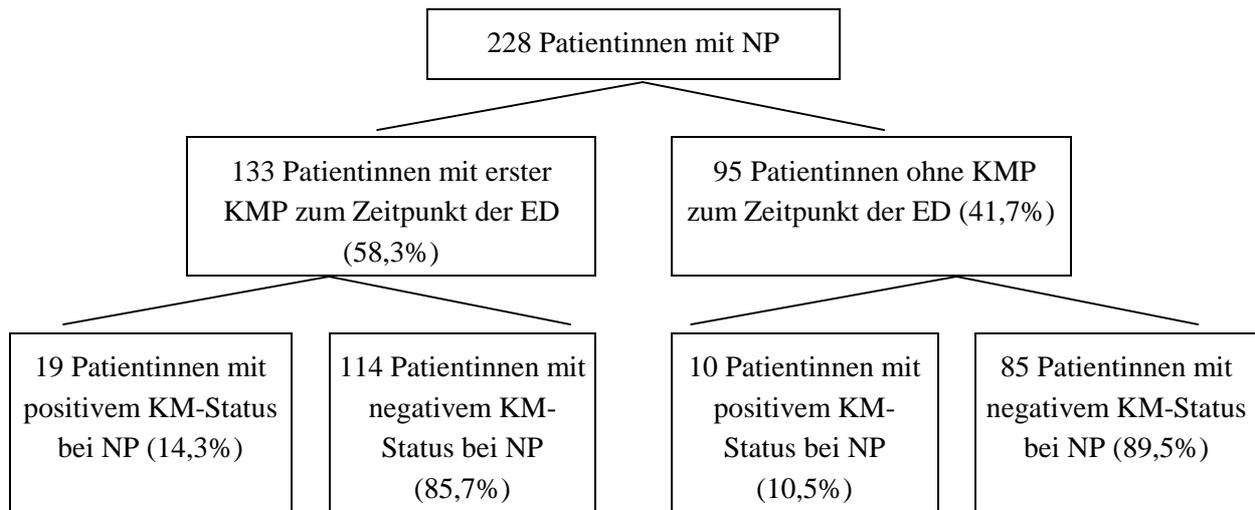
signifikant gewertet. Zur Datenauswertung wurde das Computersoftwarepaket "Software Package for Statistical Sciences" (SPSS) Version 11.5 verwendet.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 PERSISTENZ ISOLIERTER DISSEMINIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK**

Bei 228 Patientinnen wurden Nachpunktionen vorgenommen und der klinische Verlauf dokumentiert. 133 Patientinnen wurden bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Rahmen der Tumorresektion knochenmarkpunktiert. Bei 31 (23,3%) von diesen 133 Patientinnen wurden bei Primärdiagnose isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Neun Patientinnen (6,8%) der präoperativ positiven Patientinnen hatten auch bei der Nachpunktion einen positiven Knochenmarkbefund bezüglich isolierter disseminierter Tumorzellen. 22 (16,5%) von den präoperativ positiven Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Nachpunktion frei von isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

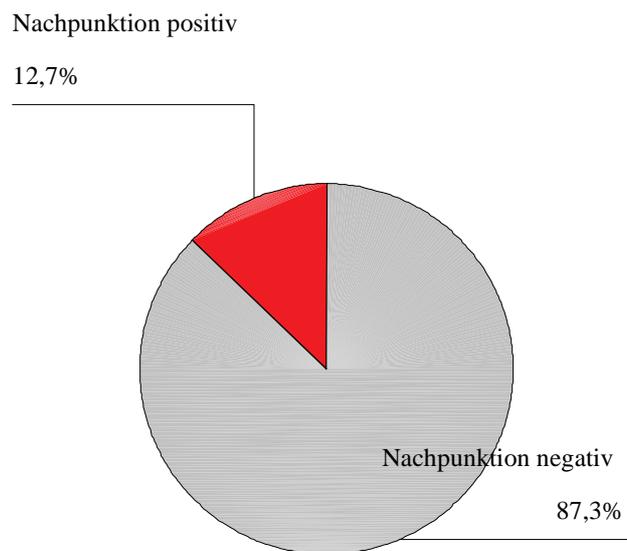
Bei 102 (76,7%) Patientinnen wurden bei Primärdiagnose keine isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Bei 92 (69,2%) Patientinnen von diesen präoperativ negativen Patientinnen wurden auch bei den Nachpunktionen keine isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark festgestellt. Bei 10 (7,5%) von den präoperativ negativen Patientinnen war die Nachpunktion positiv. Alles in allem konnten bei den Nachpunktion bei 19 (14,3%) von 133 bei Erstdiagnose punktierten Patientinnen ein positiver Knochenmarkbefund erhoben werden (Abbildung 9).



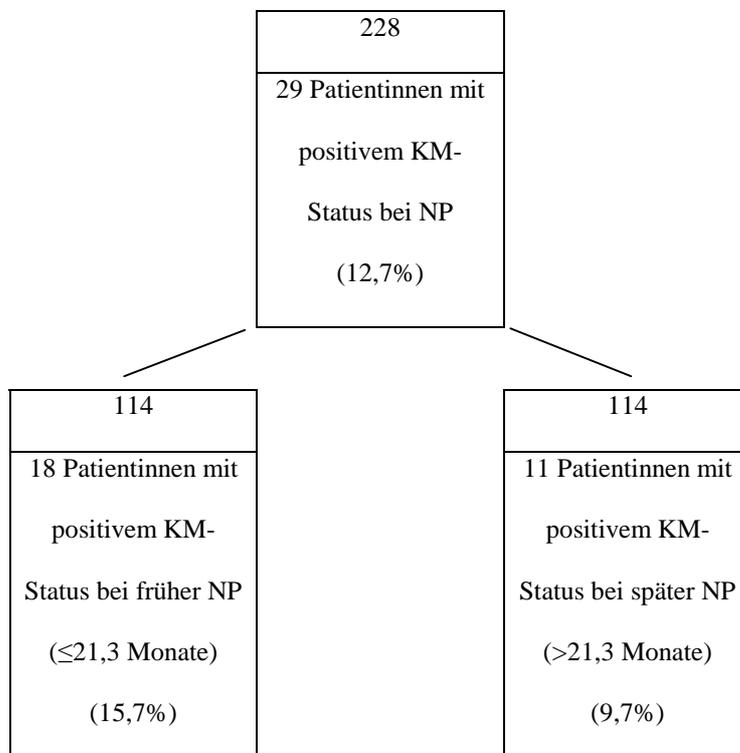
**Abbildung 9:** Knochenmarkbefunde bei Nachpunktion

NP= Nachpunktion; KM= Knochenmark; ED= Erstdiagnose; KMP= Knochenmarkpunktion

Insgesamt persistierten isolierte disseminierte Tumorzellen bei 29 (12,7%) der 228 Patientinnen (Abbildung 10). Das mediane Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Nachpunktion betrug 21,3 Monate. Um die zeitliche Abhängigkeit der Persistenz isolierter disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auszuwerten, wurden zwei gleich große Gruppen gebildet (Abbildung 11). Bei frühen Nachpunktionen bis zu 21,3 Monaten nach Erstdiagnose gab es mit 15,7% tendenziell häufiger positive Knochenmarkbefunde als bei späten Nachpunktionen nach 21,3 Monaten ab Primärdiagnose. In letzterem Zeitraum wurden bei 9,7% der Patientinnen isolierte disseminierte Tumorzellen festgestellt. Der Häufigkeitsunterschied nach früher oder später Nachpunktion war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,18$ ; Chi<sup>2</sup>- Test).



**Abbildung 10:** Prozentuale Verteilung der Knochenmarknachpunktionsergebnisse (n=228)



**Abbildung 11:** Prozentuale Verteilung der Knochenmarknachpunktionsergebnisse in Bezug auf das mediane Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Nachpunktion

Die 29 Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkbefund bei Nachpunktion waren im Mittel 55,8 Jahre alt, die 199 Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkbefund bei Nachpunktion waren im Mittel 54,3 Jahre alt (Tabelle 8). Das Alter korrelierte nicht mit dem Nachweis persistierender isolierter Tumorzellen ( $p=0,43$ ; T- Test).

Der Nachweis persistierender disseminierter Tumorzellen im Knochenmark korrelierte weder mit der Tumorausdehnung ( $p=0,26$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test) noch mit der Tumorgröße in mm ( $p=0,87$ ; T- Test) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose. Die Primärtumorausdehnung wurde bei 3,4% ( $n=1$ ) der 29 bei Nachpunktion positiven Patientinnen als pT1a klassifiziert, bei 31% ( $n=9$ ) als pT1b, bei 37,9% ( $n=11$ ) als pT1c und bei 27,6% als pT2 ( $n=8$ ). Der Nachweis persistierender isolierter disseminierter Tumorzellen im Knochenmark korrelierte auch nicht mit dem Lymphknotenstatus ( $p=0,26$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test): 48,3% der Patientinnen ( $n=14$ ) hatten keine Lymphknotenmetastasen (pN0), 6,9% ( $n=2$ ) zeigten 1-3 axilläre Lymphknotenmetastasen (pN1), 24,1% der positiven Nachpunktions- Patientinnen ( $n=7$ ) hatten 4-9 axilläre Lymphknotenmetastasen (pN1), und 20,7% ( $n=6$ ) hatten 10 oder mehr Lymphknotenmetastasen bei Primärdiagnose.

Auch die weiteren Tumorcharakteristika bei Primärdiagnose wie histopathologisches Grading ( $p=0,97$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test) oder Hormonrezeptorstatus ( $p=0,25$ ,  $\text{Chi}^2$  - Test) korrelierten nicht mit einem positiven Knochenmarkstatus bei Nachpunktion: 15 (51,7%) der 29 positiven Patientinnen hatten ein duktales Mammakarzinom, acht (27,6%) ein lobuläres Karzinom und bei zwei Patientinnen (6,9) wurde in der Histologie ein gemischt duktal- lobuläres Karzinom gefunden. Der  $p$ - Wert für den Häufigkeitsunterschied der histologischen Typen betrug  $p=0,63$  ( $\text{Chi}^2$  - Test). Keinen signifikanten Einfluss auf den Knochenmarkstatus bei Nachpunktion hatten eine brusterhaltende Operation, eine Mastektomie, eine adjuvante Strahlentherapie, keine Strahlentherapie, eine adjuvante zytostatische oder endokrine Therapie oder keine systemische

Therapie: 19 (65,5%) von 29 Patientinnen mit einem positiven Ergebnis bei der Knochenmarknachpunktion wurden brusterhaltend operiert, 10 Patientinnen (34,5%) erhielten eine modifizierte radikale Mastektomie ( $p=0,85$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test). 24 von 29 (82,8%) Frauen erhielten eine adjuvante Strahlentherapie und 5 Patientinnen (17,2%) keine ( $p=0,67$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test). 11 (37,9%) von 29 Patientinnen mit einem positiven Ergebnis bei der Knochenmarknachpunktion wurden adjuvant zytostatisch behandelt, 7 Patientinnen (24,1%) erhielten eine adjuvante Hormontherapie und 11 Patientinnen (37,9%) keinerlei adjuvante systemische Therapie ( $p=0,88$ ;  $\text{Chi}^2$  - Test) (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Patientendaten bei Primärdiagnose in Bezug auf den Knochenmarkstatus

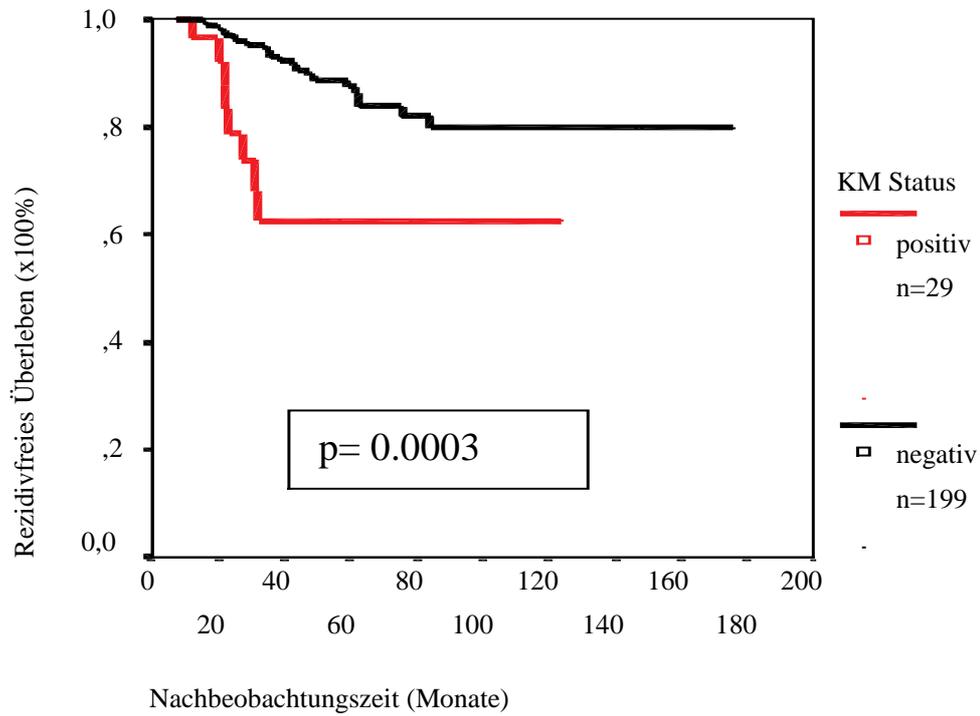
	NP negativ*	NP positiv*	p-Wert
Anzahl der Patienten	199 (87,3%)	29 (12,7%)	
<b>Alter (Mittelwert)</b>	54.3	55.8	<b>0.43</b>
<b>Tumorgröße</b>			<b>0.26</b>
pT1a	10 (5.0%)	1 (3.4%)	
pT1b	32 (16.1%)	9 (31.0%)	
pT1c	98 (49.2%)	11 (37.9%)	
pT2	59 (26.9%)	8 (27.6%)	
<b>Lymphknotenstatus</b>			<b>0.26</b>
Metastasenfrei (pN0)	96 (48.2%)	14 (48.3%)	
1-3 axilläre LKM (pN1)	41 (20.6%)	2 (6.9%)	
4-9 axilläre LKM (pN2)	32 (16.1%)	7 (24.1%)	
≥ 10 axilläre LKM (pN3)	30 (15.1%)	6 (20.7%)	
<b>Grading</b>			<b>0.97</b>
G1 – G2	102 (51.3%)	14 (48.3%)	
G 3 - G4	97 (48.7%)	15 (51.7%)	
<b>Hormonrezeptorstatus<sup>§</sup></b>			<b>0.25</b>
Negativ	39 (19.6%)	9 (31.0%)	
Positiv	153 (76.9%)	20 (69.0%)	
<b>Histologischer Typ</b>			<b>0.63</b>
Duktal	124 (62.3%)	15 (51.7%)	
Lobulär	36 (18.1%)	8 (27.6%)	
Duktal-Lobulär	15 (7.5%)	2 (6.9%)	
andere	24 (12.1%)	4 (13.8%)	
<b>Menopausalstatus</b>			<b>0.86</b>
Prämenopausal	65 (32.7%)	9 (31.0%)	
Postmenopausal	134 (67.3%)	20 (69.0%)	
<b>Primäroperation</b>			<b>0.85</b>
Brusterhaltend	134 (67.3%)	19 (65.5%)	
Mastektomie	65 (32.7%)	10 (34.5%)	
<b>Strahlentherapie</b>			<b>0.67</b>
Durchgeführt	158 (79.4%)	24 (82.8%)	
Nicht durchgeführt	41 (20.6%)	5(17.2%)	
<b>Systemische Therapie</b>			<b>0.88</b>
Keine	79 (39.7%)	11 (37.9%)	
Hormontherapie	40 (20.1%)	7 (24.1%)	
Zytostatisch	77 (38.7%)	11 (37.9%)	
Kombination	3 (1.5%)	0	

NP= Nachpunktion; LKM= Lymphknotenmetastasen; \*Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde definiert als ≥ 1 Tumorzelle in10<sup>6</sup> mononukleären Knochenmarkszellen; § Entweder Östrogen- oder Progesteronrezeptor waren positiv, in sieben Fällen waren keine Daten über den Rezeptorstatus vorhanden.

## 5.2 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN

30 (13,2%) Patientinnen erlitten im Verlauf einen Rückfall ihrer Krankheit. Bei zehn Patientinnen (4,4%) trat ein lokoregionäres Rezidiv und bei 20 Patientinnen (8,8%) traten Fernmetastasen auf. Ein Krankheitsrückfall war bei Patientinnen mit persistierenden Tumorzellen im Knochenmark (27,6%; n=8) signifikant häufiger als bei Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus bei Nachpunktion (11,1%; n=22) ( $p=0,014$ ;  $\chi^2$ - Test).

Das krankheitsfreie Überleben war signifikant mit dem Knochenmarkstatus bei Nachpunktion assoziiert. Zum Zeitpunkt der Knochenmarknachpunktion betrug das mittlere krankheitsfreie Überleben von Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkstatus 149,7 Monate (95% Konfidenzintervall (KI): [139,6- 159,8]). Bei Patientinnen mit persistierenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark betrug das mittlere krankheitsfreie Überleben 86,5 Monate (95% Konfidenzintervall: [65,7- 107,4]) und war signifikant verkürzt ( $p=0,0003$ ; Log- Rank- Test) (Abbildung 12).

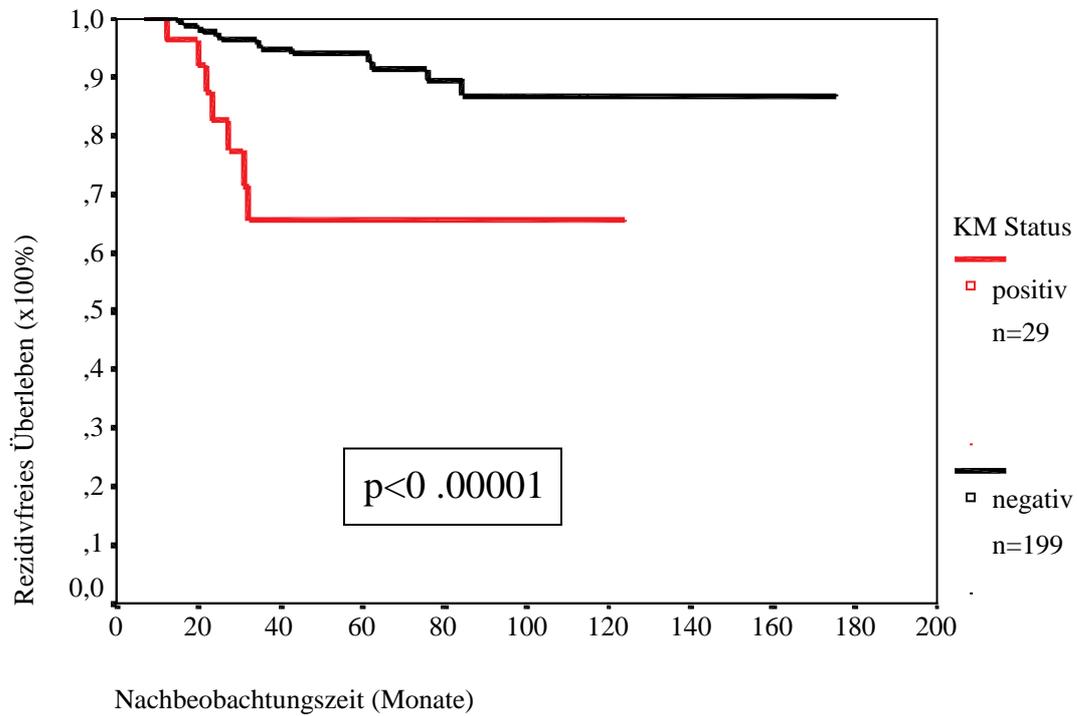


**Abbildung 12:** Krankheitsfreies Überleben bei positivem und negativem Nachpunktionsergebnis ( $p=0,0003$ ; Log- Rank- Test)

KM Status = Knochenmarkstatus; Positiver KM Status: Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde definiert als  $\geq 1$  Tumorzelle in  $10^6$  mononukleären Zellen im Aspirat der Knochenmarknachpunktion

### **5.3 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND FERNMETASTASENFREIES ÜBERLEBEN**

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Knochenmarkbefund und Zeitraum bis zum Auftreten von Fernmetastasen zeigte sich, dass ein Auftreten von Fernmetastasen bei Patientinnen mit persistierenden Tumorzellen im Knochenmark signifikant ( $p=0,00001$ ; Abbildung 13) häufiger war. Patientinnen ohne persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark hatten im Schnitt 159,3 Monate keine Fernmetastasen (95% Konfidenzintervall: [150,5- 168,1]). Im Vergleich traten bei Patientinnen mit einem positiven Nachpunktionsergebnis im Mittel nach 89,8 Monate Fernmetastasen auf (95% Konfidenzintervall: ([68,9- 110,7]).



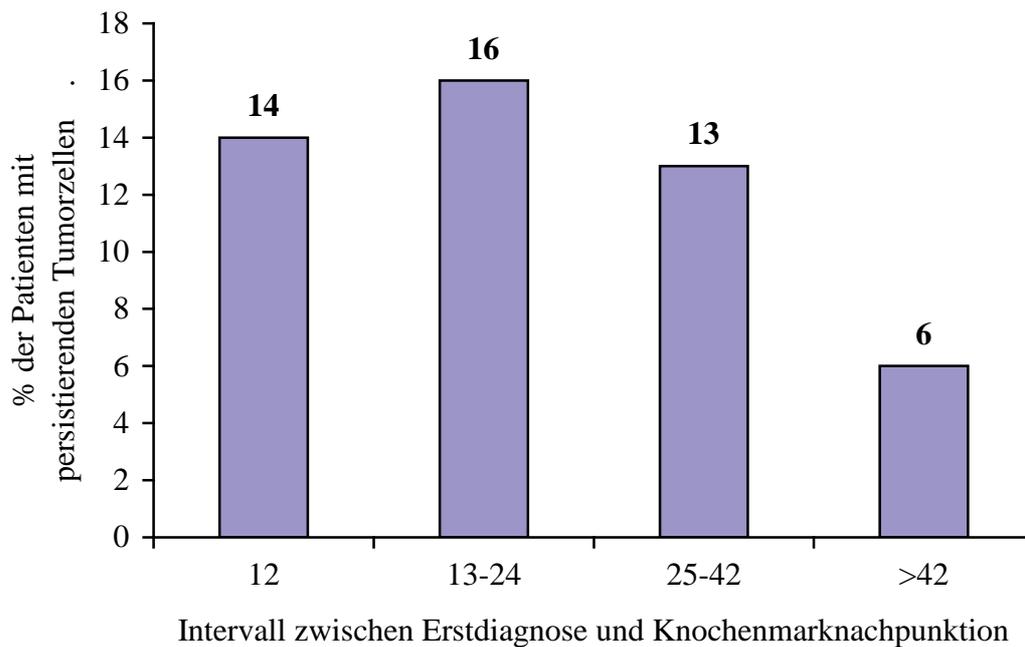
**Abbildung 13:** Fernmetastasenfreies Überleben bei positivem und negativem Nachpunktionsergebnis ( $p < 0,00001$ ; Log- Rank- Test)

KM Status = Knochenmarkstatus; Positiver KM Status: Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde definiert als  $\geq 1$  Tumorzelle in  $10^6$  mononukleären Zellen im Aspirat der Knochenmarknachpunktion

## **5.5 ZEITPUNKT DER KNOCHENMARKNACHPUNKTION**

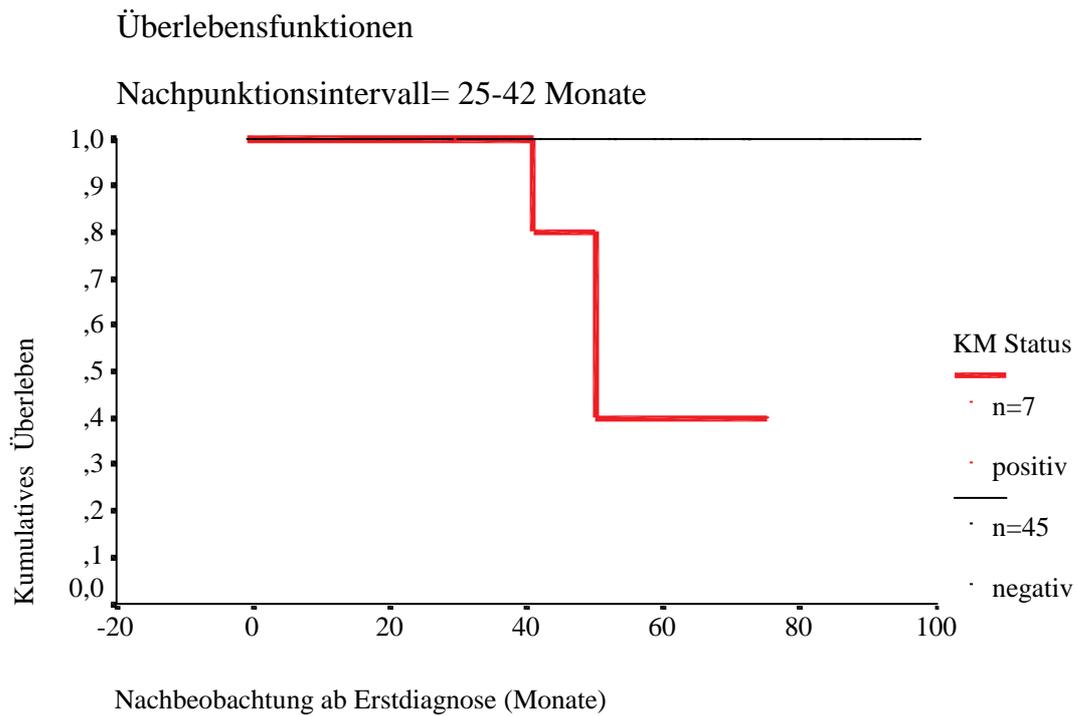
Um den Nachpunktionszeitpunkt mit dem höchsten prognostischen Einfluss persistierender Tumorzellen im Knochenmark zu identifizieren, wurden vier annähernd gleich große Gruppen gebildet: bei 64 Patientinnen (28,1%) wurde innerhalb von einem Jahr nach Erstdiagnose eine Knochenmarknachpunktion durchgeführt, bei 63 (27,6%) im zweiten Jahr. 52 Patientinnen (22,8%) wurden innerhalb von 25- 42 Monaten und 49 Patientinnen (21,5%) wurden nach 42 Monaten nachpunktiert (Abbildung 7).

Bei neun von 64 Patientinnen (14,1%), die innerhalb eines Jahres nach Erstdiagnose nachpunktiert wurden, fanden sich persistierende isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (Abbildung 14). Im zweiten Jahr hatten zehn von 63 Patientinnen einen positiven Knochenmarkstatus bei Nachpunktion (15,9%). Im Zeitraum von 25-42 Monaten nach Erstdiagnose wurde bei sieben von 52 Patientinnen (13,5%) ein positiver Knochenmarknachpunktionsbefund erhoben und nach 42 Monaten konnten bei 6,1% der Patientinnen (n= 3) persistierende isolierte disseminierte Tumorzellen festgestellt werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Positiver Knochenmarkstatus bei Knochenmarknachpunktion

Bei Knochenmarknachpunktion im Zeitraum von 25 bis 42 Monaten bestand ein signifikanter Einfluss persistierender disseminierter Tumorzellen auf das krankheitsfreie Überleben nach Primärdiagnose ( $p=0,013$ ; Log- Rank- Test) (Abbildung 15). Dies konnte durch eine multivariate Subgruppenanalyse bestätigt werden (RR 7,68; 95% Konfidenzintervall: [1,53-38,61]). Die Knochenmarknachpunktionen im ersten Intervall (innerhalb eines Jahres;  $p=0,16$ ; Log- Rank- Test), im zweiten (innerhalb von 13- 24 Monaten,  $p=0,19$ ; Log- Rank- Test) und im vierten Intervall (>42 Monaten,  $p=0,85$ ; Log- Rank- Test) nach Primärdiagnose waren hingegen nicht von signifikantem prognostischem Wert.



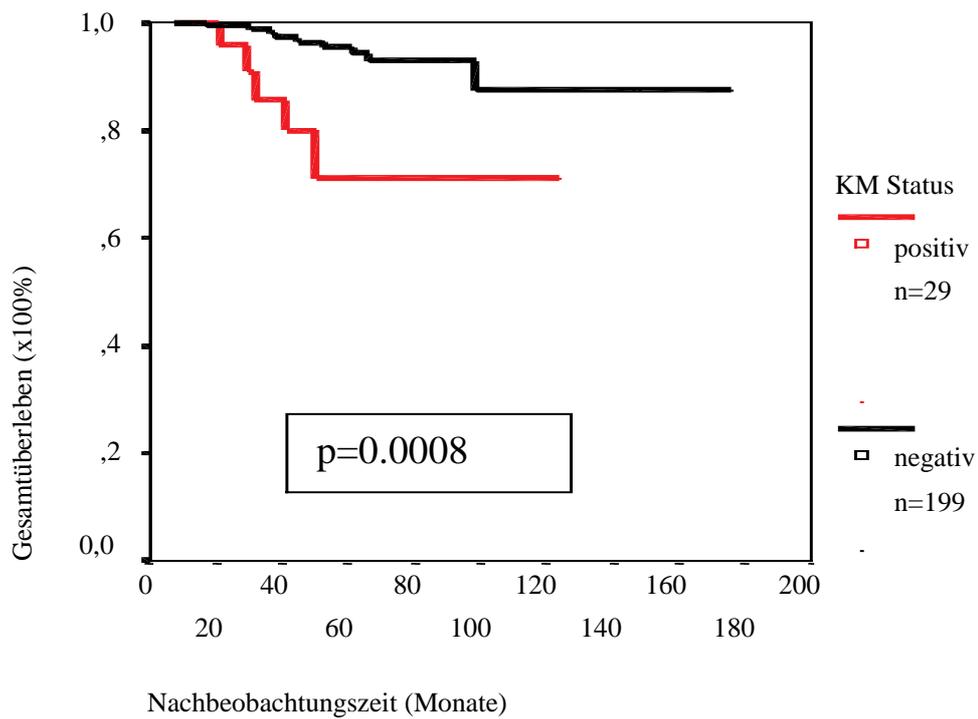
**Abbildung 15:** Prognostischer Wert der Knochenmarknachpunktion im Punktionsintervall 25-42 Monaten nach Primärdiagnose ( $p=0,013$ ; Log- Rank- Test)

KM Status = Knochenmarkstatus; Positiver KM Status: Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde definiert als  $\geq 1$  Tumorzelle in  $10^6$  mononukleären Zellen im Aspirat der Knochenmarknachpunktion

#### 5.4 KNOCHENMARKNACHPUNKTION UND GESAMTÜBERLEBEN

14 Patientinnen (6,1%) verstarben innerhalb der Studiennachbeobachtungszeit. Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkbefund bei Nachpunktion hatten ein signifikant höheres Risiko infolge des Mammakarzinoms zu versterben (17,2%) als Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkbefund (4,5%;  $p=0,006$ ; Chi<sup>2</sup>- Test). Die mittlere Gesamtüberlebenszeit von Patientinnen mit einem positivem Ergebnis bei Knochenmarknachpunktion machte 98,7 Monate aus (95% Konfidenzintervall: [79,4-117,9]). Die mittlere Gesamtüberlebenszeit von Patientinnen mit einem negativem Ergebnis bei Knochenmarknachpunktion betrug 162,1 Monate (95% Konfidenzintervall [152,1-172,0]) und war somit signifikant länger ( $p=0,0008$ ; Chi<sup>2</sup>- Test)(Abbildung 16).

Die multivariate Analyse (Tabelle 7) bestätigte den Knochenmarkstatus bei Nachpunktion als signifikanten unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (RR 5,57; 95% Konfidenzintervall: [1,83-16,92];  $p=0,002$ ). Für eine Subgruppenanalysen war die Anzahl der Ereignisse zu gering.



**Abbildung 16:** Gesamtüberlebenszeit und Knochenmarkstatus

KM Status = Knochenmarkstatus; Positiver KM Status: Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde definiert als  $\geq 1$  Tumorzelle in  $10^6$  mononukleären Zellen im Aspirat der Knochenmarknachpunktion.

## 5.5 MULTIVARIATE ÜBERLEBENSANALYSE

Um zu untersuchen, ob der prognostische Wert persistierender disseminierter Tumorzellen von bekannten Prognoseparametern wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus und histopathologischem Grading abhängt, wurde eine multivariate Cox- Regressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) prognostischen Faktor für einen verkürzten Zeitraum bis zum Auftreten eines Krankheitsrückfalls darstellen (Relatives Risiko (RR) 4,57; 95% Konfidenzintervall: [1,99-10,51]). Es stellte sich heraus, dass der Knochenmarkstatus bei Nachpunktion eine vergleichbare prognostische Relevanz hat wie der Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose (RR 4,53; 95% Konfidenzintervall: [1,84-11,1];  $p=0,001$ ; Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Multivariate Cox- Regressionsanalyse des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens des gesamten Patientenkollektivs (n=228)

	Krankheitsfreies Überleben		Gesamtüberleben	
	<i>p</i> -Wert*	RR (95% KI)	<i>p</i> -Wert*	RR (95% KI)
<b>Tumorgröße</b>				
pT1 (161/228) vs. pT2 (67/228)	0,59	§	0,47	§
<b>Knochenmarkstatus bei Nachpunktion</b>				
CK negativ (199/228) vs. CK positiv (29/228)	<0,0001	4,57 (1,99 – 10,50)	0,002	5,57 (1,83 – 16,92)
<b>Lymphknotenstatus</b>				
pN0 (110/228) vs. pN1 (118/228)	0,001	4,53 (1,84 – 11,13)	0,017	6,51 (1,40 – 30,20)
<b>Histopathologisches Grading</b>				
G1-2 (116/228) vs. G3-4 (112/228)	0,54	§	0,14	§

\* Es wurden die in der univariaten Analyse prognostisch signifikanten Parameter schrittweise in das Regressionsmodell eingefügt. Nicht signifikante Variablen in der Regressionsanalyse wurden von einer weiteren multivariaten Analyse ausgeschlossen. Signifikante Unterschiede bestehen für *p*-Werte < 0,05; RR= Relatives Risiko, KI= Konfidenzintervall

## 6 Diskussion

Diese Studie zeigt, dass persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen signifikanten Prognosefaktor für das weitere Überleben darstellen (23). Die Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark geht mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer verminderten Gesamtüberlebensrate einher. Der optimale Zeitpunkt für eine Knochenmarknachpunktion liegt vermutlich im Zeitraum zwischen 25 und 42 Monaten nach Erstdiagnose eines Mammakarzinoms (Abbildung 15).

Der prognostische Einfluss disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert (11-14, 50). Hinsichtlich des prognostischen Wertes gab es widersprüchliche Studien. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark einen wesentlichen prognostischen Einfluss auf eine frühzeitige Rezidivmanifestation und auf das Gesamtüberleben besitzen (11, 13). Andere konnten diese Ergebnisse nicht reproduzieren und bestätigen (14, 50).

Mögliche Ursachen für diese unterschiedlichen Studienergebnisse könnten in unterschiedlichen Studienfallzahlen oder in ungleichen Nachweismethoden zur Tumorzelldetektion begründet sein. Von großer Bedeutung für die Nachweismethode ist beispielsweise die Sensitivität und die Spezifität der Nachweisantikörper und die Anzahl der analysierten Tumorzellen (34). Eine ausreichende methodische Validierung der Nachweisantikörper wurde bisher nur für die anti-Cytokeratin- Antikörper erbracht (5, 33, 35, 38, 45). Auch die "International Society of Cell Therapy" und das "National Cancer Institute" haben erkannt, dass es einer Standardisierung der immunzytochemischen Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark Bedarf. Die Kriterien für eine gute Tumorzellnachweismethode sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10:** Kriterien der "International Society of Cell Therapy", Arbeitsgruppe zur Standardisierung der immunzytochemischen Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

- 1.) Hohe Spezifität und Sensitivität
- 2.) Reproduzierbarkeit
- 3.) Robustheit
- 4.) Objektive Auswertung
- 5.) Möglichkeit einer automatischen Auswertung der Präparate
- 6.) Quantifizierung der Tumorlast
- 7.) Charakterisierung der Tumorzellen
- 8.) Erwiesene klinische Bedeutung

Eine stetig ansteigende Anzahl neuer Techniken erweitern das Verständnis um Tumorbiologie und die Klassifizierung maligner Tumoren. Durch verbesserte, standardisierte Nachweismethoden konnten neuere Studien ebenfalls einen unabhängigen prognostischen Wert disseminierter Tumorzellen im Knochenmark aufzeigen (7, 15, 52). An einer kürzlich veröffentlichten multivariaten Poolanalyse zum prognostischen Einfluss von Mikrometastasen im Knochenmark waren neun unabhängige Studien miteinbezogen (8). Es wurden Daten von 4703 Patientinnen ausgewertet. Die Prävalenz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark betrug 30,6 Prozent. Sie wurden häufiger bei ausgedehnter Tumorgröße, fortgeschrittenem Lymphknotenbefall, höherem Grading und negativem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen und waren für den gesamten 10-jährigen Nachbeobachtungszeitraum signifikant mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark hatten ein 2,15-fach höheres Risiko zu versterben als Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkstatus (95% Konfidenzintervall: [1,87-2,47];  $p < 0,001$ ; Log- Rank- Test). Das relative Risiko zu versterben, betrug für Patientinnen mit isolierten disseminierten Tumorzellen in den ersten fünf Jahren 1,81 (95% Konfidenzintervall: [1,51-2,16]) und später als fünf Jahre 1,58 (95% Konfidenzintervall: [1,12-2,22]). Ein Krankheitsrückfall war bei Patientinnen mit isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark 2,13-fach häufiger als bei Patientinnen

mit negativem Knochenmarkstatus (95% Konfidenzintervall: [1,89-2,39]). Bei Patientinnen mit isolierten disseminierten Tumorzellen im Knochenmark war das krankheitsfreie Überleben signifikant verkürzt ( $p < 0,001$ ; Log- Rank- Test).

Die vorliegende Studie zeigt, dass der persistierende positive Knochenmarkstatus als unabhängiger prognostischer Parameter gewertet werden kann. Das relative Risiko für einen Krankheitsrückfall betrug 7,68 bei Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus bei Nachpunktion. Auch eine norwegischen Studie zum prognostischen Einfluss von persistierenden isolierten Tumorzellen zeigte, dass persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen signifikanten Prognosefaktor für das weitere Überleben darstellen. In dieser Studie wurden 356 Mammakarzinom-Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 40 Monaten knochenmarkpunktiert soweit sie krankheitsfrei waren (53). Bei Patientinnen mit persistierenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Nachpunktion war das mittlere krankheitsfreie Überleben signifikant verkürzt und das Auftreten von Fernmetastasen signifikant häufiger (53).

Eine routinemäßige Knochenmarknachpunktion ist daher sinnvoll und sollte angestrebt werden. Folglich stellt sich die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt für eine Knochenmarknachpunktion. Hierzu lagen bisher jedoch keine genauen Hinweise vor. Zwar wurde in einer norwegischen Studie zum prognostischen Einfluss von persistierenden isolierten Tumorzellen ein Zeitpunkt der Knochenmarknachpunktion nach drei Jahren gewählt, die Entscheidung zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch mitunter aufgrund logistischer Gründe und der großen Anzahl an Spätrezidiven bei Mammakarzinom-Patientinnen (53) gewählt. In der vorliegenden Studie war es aufgrund der zeitlich breit gefächerten Punktionsintervalle zwischen Erstdiagnose und Knochenmarknachpunktion nicht möglich das volle Ausmaß des prognostischen Einflusses der

Knochenmarkpunktion in Relation zur Zeit zu erfassen. Es deutete sich jedoch an, dass der beste Zeitpunkt für eine Knochenmarknachpunktion zwischen 25 und 42 Monaten liegt. Deshalb sollte nach dem derzeitigen Erkenntnisstand eine routinemäßige Knochenmarkpunktion etwa drei Jahre nach Erstdiagnose erfolgen.

Von besonderer Bedeutung ist der Knochenmarkstatus unter anderem, weil die Knochenmarkpunktion die einzige Methode ist, bei krankheitsfreien Patientinnen auch nach Resektion des Primärtumors noch eine Einschätzung der weiteren Prognose und eine Verlaufkontrolle der Tumorlast vorzunehmen. Die Bestimmung von Prognosefaktoren ist essentiell um den Krankheitsverlauf abzuschätzen und somit die richtige, individuell angepasste Therapiewahl zu treffen.

Zum Zeitpunkt der Primärdiagnose gibt es mehrere prognostische Faktoren. Man zählt den TNM-Status (siehe Kapitel 1.2), die Morphologie (Grading, Lymphangiosis carcinomatosa, Gefäßinvasion) und den Steroidhormonrezeptorstatus (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor) zu den Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz (9, 17, 30). Diese Prognosefaktoren können jedoch nach Abschluss der Primärtherapie nicht mehr zur weiteren prognostischen Einschätzung genutzt werden. Hier könnte die Knochenmarknachpunktion zum Einsatz kommen. Durch das Einbeziehen der Knochenmarknachpunktion in die Nachsorgeuntersuchungen könnten die Patientinnen ermittelt werden, die trotz erfolgreicher Primärtherapie einem erhöhten Rezidivrisiko ausgesetzt sind.

Da Patientinnen mit persistierenden disseminierten Tumorzellen im Knochenmark eine ungünstige Prognose haben, könnte der Knochenmarknachpunktionsstatus eine Indikation zur sekundären adjuvanten Therapie darstellen. In einer doppelblinden Studie von Goss et al. (30) wurden 5187 Frauen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom in zwei Gruppen

randomisiert. Nach fünfjähriger Therapie mit Tamoxifen erhielt eine Gruppe eine sekundäre adjuvante Therapie mit dem Aromase- Inhibitor Letrozol, die andere Gruppe erhielt ein Placebo. Bei der Verlaufskontrolle fanden sich 207 Rezidivfälle, davon 75 in der Gruppe mit Letrozol (4-Jahres-Überlebensrate 93%) und 132 in der Placebo- Gruppe (4-Jahres-Überlebensrate 87%, ) (18). Diese Studienbeschreibung zeigt, dass es Patientinnen gibt, die von einer ‚erweiterten‘ oder sekundären adjuvanten Therapie profitieren. Auch Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus könnten von einer zweiten adjuvanten Behandlung profitieren, was noch in zukünftigen Studien untersucht werden muss.

In der aktuellen Studie hatte die adjuvante systemische Therapie keinen Einfluss auf die Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Ein Grund für das schlechte Ansprechen auf die adjuvante systemische Therapie könnte sein, dass sich die Tumorzellen in einem ruhenden „schlafendem“ Zustand befinden (6, 33, 37). Diese Theorie erklärt auch die für das Mammakarzinom so charakteristisch lange Latenzzeit bis zur Rezidivmanifestation (25). Um aus dem ruhenden Zustand heraus aktiv zu werden, bedarf es entweder einer Reaktivierung oder der Entwicklung von klonogenem Potential. Es könnte hierbei eine Abhängigkeit von folgenden Mechanismen bestehen: Aktivierung der Synthese autologer Wachstumsfaktoren (19, 31), günstige Umfeldbedingungen (1), organspezifische Faktoren wie zum Beispiel Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Signale und Zytokine (26). Die genauen tumorbiologischen Mechanismen der Aktivierung von ruhenden disseminierten Tumorzellen sind jedoch noch nicht geklärt. Etwa 80% der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark befinden sich in einem nicht proliferierenden Status (37). Daher besteht die Hypothese, dass einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark durch proliferationshemmende Chemotherapeutika nicht gut angegriffen werden können (6). Diese Hypothese könnte erklären, warum in der vorliegenden

Studie die adjuvante systemische Therapie keinen Einfluss auf die Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark hatte.

Diese Beobachtung der aktuellen Studie spricht beim Vorliegen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark für den Einsatz von neueren adjuvanten Therapieoptionen, die ihre Wirkung unabhängig von der Proliferationsrate der Tumorzellen entfalten. Immuntherapien richten sich gegen Antigene von Tumorzellen und wirken somit unabhängig von der Proliferationsrate (2). Dementsprechend wurde der Benefit einer adjuvanten Immuntherapien beim Mammakarzinom in einer aktuellen randomisierten, multizentrischen Vergleichsstudie (HERA TRIAL) untersucht (40). Patientinnen mit HER2-neu positivem primärem Mammakarzinom profitierten nach Abschluss der adjuvanten Therapie von einer sekundären Antikörpertherapie mit Trastuzumab (40). Im Anschluss an die adjuvante Chemotherapie wurde Trastuzumab ein Jahr lang alle drei Wochen verabreicht. Es zeigte sich ein signifikant verlängertes krankheitsfreies Überleben sowie ein signifikant vermindertes Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne Trastuzumab- Therapie. Die Wirkung von Trastuzumab war unabhängig von Tumorcharakteristika und der adjuvanten Chemotherapie (40). Eine weitere aktuelle Studie mit einer sekundären Antikörpertherapie mit Trastuzumab (41) zeigte folgende Ergebnisse: Patientinnen mit nodalpositivem, HER2-neu positivem primärem Mammakarzinom wurden mit Trastuzumab nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie oder mit Paclitaxel nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie behandelt. Die erstere Kombination reduzierte das Risiko eines ersten Rückfalls innerhalb von drei Jahren um 53% und das Fernmetastasierungsrisiko schien mit der Zeit weiter abzunehmen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit war bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 2 Jahren im Trastuzumab- Arm um 33% signifikant erhöht. Allerdings zeigten beide Studien eine erhöhte kardiotoxische Wirkung von Trastuzumab (40,41). Derzeit wird an unserer Klinik eine Studie zur adjuvanten Immuntherapie unter Berücksichtigung einer Persistenz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark geplant.

## 7 Zusammenfassung

Die Einschätzung der Prognose ist für die Therapie des Mammakarzinoms von großer Bedeutung und basiert heutzutage noch auf empirischen Daten. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gelten als Ursprungsort für die Fernmetastasierung (7). Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko können zum Zeitpunkt der Primärdiagnose durch den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark individuell identifiziert werden (7). Mit konventionellen Screening- Methoden können persistierende isolierte Tumorzellen im Knochenmark nicht entdeckt und nicht im Verlauf beobachtet werden. Die immunzytochemische Untersuchung des Knochenmarks könnte eine Möglichkeit sein, um auch nach Resektion des Primärtumors bei krankheitsfreien Patientinnen noch eine Einschätzung der weiteren Prognose vorzunehmen. Daher wurde diese Studie initiiert, um den prognostischen Einfluss von persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zu untersuchen. Bei 228 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (pT1-2 pN0-3 M0 R0) wurden Nachpunktionen vorgenommen und der klinische Verlauf dokumentiert. Der Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmarkspirat erfolgte durch immunzytochemische Färbung mit dem Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (Micromet, München). Das mediane Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Nachpunktion betrug 21,3 Monate. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Median 49,8 Monate.

Insgesamt persistierten isolierte disseminierte Tumorzellen bei 29 (12,7%) der 228 Patientinnen. Das krankheitsfreie Überleben war signifikant mit dem Knochenmarkstatus bei Nachpunktion assoziiert. Das mittlere krankheitsfreie Überleben von Patientinnen mit einem negativen Knochenmarkstatus betrug 149,7 Monate. Bei Patientinnen mit persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark betrug das mittlere krankheitsfreie Überleben 86,5 Monate und

war signifikant verkürzt ( $p=0,0003$ ; Log- Rank- Test). Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Knochenmarkbefund und Zeitraum bis zum Auftreten von Fernmetastasen zeigte sich, dass ein Auftreten von Fernmetastasen bei Patientinnen mit persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant ( $p=0,00001$ ;  $\text{Chi}^2$ - Test) häufiger war. Im Vergleich traten bei Patientinnen mit einem positiven Nachpunktionsergebnis im Mittel nach 89,8 Monate Fernmetastasen auf. Es zeigte sich, dass isolierte persistierende disseminierte Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen signifikanten ( $p < 0,0001$ ; Log- Rank- Test) prognostischen Faktor für einen verkürzten Zeitraum bis zum Auftreten eines Krankheitsrückfalls darstellen. Der prognostische Wert persistierender Tumorzellen war bei einem Nachpunktionszeitraum von 25 bis 42 Monaten nach Primärdiagnose signifikant ( $p=0,013$ ; Log- Rank- Test). Die multivariate Analyse bestätigte den Knochenmarkstatus bei Nachpunktion als signifikanten unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben ( $p=0,002$ ).

Schlussfolgernd ist die Knochenmarkpunktion im rezidivfreien Intervall von prognostischer Bedeutung für das rezidivfreie und Gesamtüberleben von Mammakarzinom-Patientinnen. Da Patientinnen mit isolierten persistierenden Tumorzellen im Knochenmark eine ungünstige Prognose haben, könnte der Knochenmarknachpunktions- Status zukünftig eine Indikation zur sekundären adjuvanten Therapie darstellen. Der therapeutische Benefit einer solchen sekundär-adjuvanten Therapieintervention muss in prospektiven Studien untersucht werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) Alexander P. Do cancers arise from a single transformed cell or is monoclonality of tumours a late event in carcinogenesis? *Br J Cancer* 1985; 51(4):453-457.
- (2) Berinstein N. Overview of therapeutic vaccination approaches for cancer. *Semin Oncol* 2003; 30(3 Suppl 8):1-8.
- (3) Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnattelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med* 1976; 294(8):405-410.
- (4) Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995; 332(14):901-906.
- (5) Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller 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* 1998; 90(14):1099-1101.
- (6) Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18(1):75-90.
- (7) Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8):525-533.
- (8) Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8):793-802.
- (9) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1):181-187.

- (10) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32(2):219-229.
- (11) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9(10):1749-1756.
- (12) Courtemanche DJ, Worth AJ, Coupland RW, MacFarlane JK. Detection of micrometastases from primary breast cancer. *Can J Surg* 1991; 34(1):15-19.
- (13) Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, 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* 1992; 10(10):1534-1539.
- (14) Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998; 16(2):557-566.
- (15) Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):960-971.
- (16) Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. V: Update 1998. *Recent Results Cancer Res* 1998; 152:481-497.
- (17) Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(17):3357-3365.
- (18) Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Therasse P, Palmer MJ, Pater JL. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(19):1793-1802.

- (19) Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986; 46(3):1015-1029.
- (20) Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86(12):2668-2673.
- (21) Janni W, Gerber B, Sommer H, Untch M, Krause A, Dian D, Runnebaum I, Rack B, Friese K. Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 2005;102:A 2795-2804
- (22) Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck C, Sommer H, Gerber B, Friese K. Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen. *Dtsch Arztebl* 2004; 101(51-52):3496-3502.
- (23) Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103(5):884-891.
- (24) Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistic Association* 1958;(53):457-481.
- (25) Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(1):80-85.
- (26) Krempien B. Pathogenesis of bone metastasis and tumor osteopathies. *Radiologe* 1995; 35(1):1-7.
- (27) Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005; 103(3):451-461.
- (28) Le D V, Tubiana HM, Friedman S, et al. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64:1914-1921.
- (29) Lenaz L, Page JA. Cardiotoxicity of adriamycin and related anthracyclines. *Cancer Treat Rev* 1976; 3(3):111-120.
- (30) McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83(3):154-155.

- (31) McLeskey SW, Zhang L, Kharbanda S, Kurebayashi J, Lippman ME, Dickson RB, Kern FG. Fibroblast growth factor overexpressing breast carcinoma cells as models of angiogenesis and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39(1):103-117.
- (32) Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6):448-456.
- (33) Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother* 1994; 3(4):315-322.
- (34) Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(17):6326-6334.
- (35) Pantel K, Riethmuller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213:1-18.
- (36) Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3(3):165-173.
- (37) Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(17):1419-1424.
- (38) Pantel K, von Knebel DM, Izbicki JR, Riethmuller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 1997; 68(12):1241-1250.
- (39) Peto R. Meta-analysis on local therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88.
- (40) Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell J, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Giatromanolaki S, Ward C, Straehle C, McFadden E, Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16):1659-1672.

- (41) Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman V, Geyer CE, Davidson N, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman P, Swain SM, Pisansky T, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel V, Visscher D, Yothers G, Jenkins R, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas E, Lingle WL, Klein PM, Ingle JM, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2- positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16): 1673-1684.
- (42) Rosner D, Lane WW. Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25(2):127-139.
- (43) Sauer H, editor. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Manual Tumorzentrum München. 9. Auflage. W. Zuckschwerdt Verlag; München 2003
- (44) Sauer R, Schulz KD, Hellriegel KP. Radiation therapy after mastectomy-interdisciplinary consensus puts and end to a controversy. *German Society of Senology. Strahlenther Onkol* 2001; 177(1):1-9.
- (45) Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, . Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(23):8672-8676.
- (46) Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002; 2:37.
- (47) Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer* 2003; 98(12):2740-2741.
- (48) Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Bocker W, Bussolati G, Connolly CE, De Miguel C, Dervan P, Drijkoningen R, Elston CW, Faverly D, Gad A, Holland R, Jacquemier J, Lacerda M, Lindgren A, Martinez-Penuela J, Peterse JL, Rank F, Tsakraklides V, de Wolf C, Zafrani B. Guidelines for pathology- supplement to European guidelines for quality assurance in mammography screening. Report by the Pathology Working Group of the European Community. *Pathologie* 1997; 18(1):71-88.
- (49) Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr OM, Bodenmuller H, Bonfrer H, Brundell J, Einarsson R, Erlandsson A, Johansson A, Leca JF, Levi M, Meier T, Nap M, Nustad K, Seguin P, Sjodin A, Sundstrom B, van Dalen A, Wiebelhaus E, Wiklund B, Arlestig L, Hilgers J. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol* 1998; 19(2):132-152.

- (50) Untch M, Harbeck N, Eiermann W. Micrometastases in bone marrow at the time of primary treatment of breast cancer: a new prognostic criterion? *Gynakol Rundsch* 1989; 29 Suppl 2:231-233.
- (51) Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(6):546-553.
- (52) Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3469-3478.
- (53) Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16):5342-5348.
- (54) Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, Chlebowski RT, Gelber R, Edge SB, Gralow J, Cobleigh MA, Mamounas EP, Goldstein LJ, Whelan TJ, Powles TJ, Bryant J, Perkins C, Perotti J, Braun S, Langer AS, Browman GP, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):619-629.
- (55) Wittekind C, Bootz F, Meyer HJ. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 6. Auflage. Springer Verlag; Berlin 2003

## 9 Lebenslauf

ELKE SIENEL, GEB. KOHLE

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

- Geburtsdatum: 22.05.1979
- Geburtsort: Tübingen
- Familienstand: verheiratet

### AUSBILDUNG

---

- 1985 - 1989 - Grundschule Haigerloch
- 1989 - 1995 - Progymnasium Haigerloch
- 1995 -1998 - Gymnasium Hechingen  
Abitur 1998, Note: 2,1
- 1998 -1999 - Ausbildung zur staatlich geprüften Krankenpflegehelferin, Note: 2,0  
(Asklepios Fachkliniken München-Gauting)
- WiSe 1999/  
2000 - Medizinstudium an der Universität Ulm
- SoSe 2000 -  
SoSe 2004 - Medizinstudium an der LMU München  
- August 2002: 1. Staatsexamen, Note: 2,0  
- September 2004: 2. Staatsexamen, Note: 3,0
- ab WiSe 2004/  
2005 - Praktisches Jahr an der Albert- Ludwigs- Universität Freiburg  
1.Tertial: Innere Medizin, ev. Diakoniekrankenhaus Freiburg  
2.Tertial: Augenheilkunde, Universitätsklinikum Freiburg  
3.Tertial: Chirurgie, ev. Diakoniekrankenhaus Freiburg  
- Oktober 2005: Studienabschluss, Gesamtnote: 2,83  
- November 2005: Approbation als Ärztin

## PROMOTION

---

SoSe 2003-  
SoSe 2004      Thema: Prognostischer Einfluss von persistierenden, isolierten Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen, Betreuer: PD. Dr. med. Wolfgang Janni, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe- Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

## FAMULATUREN

---

Feb. - März  
2002      – Praxisfamulatur Pädiatrie und Neonatologie

Sept. 2002      – Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe in der Universitätsklinik Vilnius, Litauen

Feb. - März  
2003      – Famulatur Chirurgie und Notfallmedizin im Rot-Kreuz Krankenhaus Guadalajara, Mexiko

Sept. - Okt.  
2003      – Famulatur gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe- Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

März 2004      – Praxisfamulatur Pädiatrie und Neonatologie

## TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

---

Feb. - April  
2000      – Pflegedienst in der Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe- Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Aug. 2000,  
Sept. 2001      – Pflegedienst in der Ambulanz der Dermatologischen Klinik der Universität München

April 2000 -  
Sept. 2004      – Sitzwachentätigkeit im Universitätsklinikum München

## 10 Danksagung

Herzlichst danken möchte ich zuallererst PD Dr. W. Janni für das Thema dieser Dissertationsarbeit sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotionsphase.

Auch Frau Dr. B. Rack gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Mitbetreuung. Frau Dr. B. Strobl war ebenfalls eine sehr gute Ansprechpartnerin, der ich vielmals zu Dank verpflichtet bin. Ich möchte mich bei allen beteiligten Patientinnen, Ärztinnen und Ärzten der I. Frauenklinik- Innenstadt für die Ermöglichung und Durchführung der Knochenmarkpunktionen bedanken. Ferner möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des immunologischen Labors der Frauenklinik für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders danken möchte ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen für die Aufbereitung des Knochenmarks.

Mein Dank gilt außerdem meinem Mann Wulf Siemel sowie meinen Eltern Erich und Erika Kohle, die mir durch Ihre Unterstützung im Alltag diese Dissertation ermöglicht haben.