

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. mult. D. Wallwiener

**Histopathologische und biologische Prognosefaktoren
für den immunzytologischen Nachweis von Tumorzellen
im Knochenmark beim Mammakarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Ihsan Nurali

aus

Freudenstadt

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. h. c. mult. D. Wallwiener

2. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Stenzl

Meiner lieben Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	6
1.1. Allgemeines zum Mammakarzinom.....	6
1.2. Die Ätiologie des Mammakarzinoms.....	8
1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren	12
1.4. Bedeutung der Metastasierung	20
1.5. Bedeutung der Knochenmarkzytologie.....	23
1.6. Bedeutung der panzytokeratin- positiven Zelle(n) und die Abgrenzung zur Mikro-/ Metastase.....	25
 <u>II. Material und Methoden</u>	 30
2.1. Patientenkollektiv.....	30
2.2. Erhebungsbogen	30
2.3. Histologische und biologische Parameter	31
2.4. Statistische Auswertung [univariate Analyse]	38
 <u>III. Ergebnisse</u>	 40
<u>3.1. Nachweis eines Karzinombefalles für das Gesamtkollektiv.....</u>	<u>40</u>
- stationäre-Gruppe (adjuvant+neoadjuvant), ambulante-Gruppe & DCIS-Gruppe	
3.1.1. Axillärer Nodalstatus bzw. KM-Status in Abhängigkeit entfernter Nodi.....	40
3.1.2. Lymphknotenstatus vs. KM-Status	41
3.1.3. Histologie vs. KM-Status.....	41
3.1.4. Alter vs. KM-Status.....	43

3.1.5. Tumorgröße bzw. Tumorstadium (T-Stadium) vs. KM-Status	43
3.1.6. Fokalität vs. KM-Status	45
3.1.7. Grading vs. KM-Status	45
3.1.8. Lymphgefäßdurchbruch vs. KM-Status	46
3.1.9. PgR- bzw. EgR-Status, p53, Mib1/ki67, cerbB2 & bcl2 vs. KM-Status.....	47
3.1.10. Menopausenstatus vs. KM-Status	48
<u>3.2. Nachweis eines Karzinombefalles für ein ausgewähltes Patientengut.....</u>	49
- stationäre-Gruppe (adjuvant) & DCIS-Gruppe	
3.2.1. <u>Univariate Analysen.....</u>	49
3.2.2. Tab. 1 (T -Stadium & Nodalstatus)	49
3.2.3. Tab. 2 (T-Stadium & KM -Status)	50
3.2.4. Tab. 3 (Nodalstatus & KM-Status)	50
3.2.5. Tab. 4 (Alter & KM-Status).....	51
3.2.6. Tab. 5 (ER-Status & KM-Status).	52
3.2.7. Tab. 6 (PR-Status & KM-Status)	52
3.2.8. Tab. 7 (Her2/neu-Status & KM-Status)	53
3.2.9. Tab. 8 (Bcl2-Status & KM-Status)	54
3.2.10. Tab. 9 (Lymphangiosis & KM-Status)	54
3.2.11. Tab.10 (p53-Status & KM-Status)	55
3.2.12. Tab.11 (Tumorgröße [cm] & KM-Status)	56
3.2.13. Tab.12 (Menopausen-Status & KM-Status)	56
<u>IV.Diskussion</u>	58
4.1.1. Lymphknotenstatus (LK-Status) vs. Knochenmarkstatus (KM-Status)	58
4.1.2. Bedeutung der Anzahl entfernter Lymphknoten.....	59
4.2. Einfluss des Lymphknotenstatus auf den KM-Status.....	60
4.3. Einfluss des Alters auf den KM-Status	61

4.4. Einfluss des Menopausenstatus auf den KM-Status	61
4.5. Einfluss der Tumorgröße bzw. des Tumorstadiums auf den KM-Status	62
4.6. Einfluss des Tumorgradings auf den KM-Status	63
4.7. Einfluss des Lymphgefäßdurchbruches auf den KM-Status	64
4.8. Einfluss des Hormonrezeptorstatus auf den KM-Status	65
4.9. Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 auf den KM-Status	66
4.10. Einfluss der bcl-2-Expression auf den KM-Status	66
4.11. Einfluss der Her2/Neu-Expression auf den KM-Status	67
<u>V. Zusammenfassung</u>	68
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	71

I. EINLEITUNG

1.1. Allgemeines zum Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist trotz zahlreicher prophylaktischer Maßnahmen der häufigste maligne Organkrebs der Frau in der westlichen Welt (*Blot et al. 1977*) und daran hat sich bis heute nichts wesentliches geändert. Es sterben nach Einschätzungen der WHO jährlich ca. 250.000 Frauen an dieser Tumorerkrankung weltweit. Allein in der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich mehr als 41000 Neuerkrankungen diagnostiziert (*Pesch et al. 1994*). Diese Erkrankung macht 25% der weiblichen Karzinome aus und ist verantwortlich für 18% der Karzinomtode in Deutschland (*Rosenquist, Lindfors 1994*). Trotz einer verbesserten Frühdiagnostik ist die standardisierte Mortalitätsrate in den letzten 15 Jahren leicht gestiegen (*Statistisches Bundesamt 1998*). Somit zählt das Mammakarzinom in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten malignen Tumoren der Frau mit einem ersten Häufigkeitsgipfel um das 45. Lebensjahr und einem zweiten um das 70. Lebensjahr (*Koslowski et al. 1988*).

Neue Fortschritte in Diagnostik und Forschung seit der letzten 20 Jahre scheinen jedoch eine Kehrtwende einzuleiten. Nach Schätzungen durch Oxford Metaanalysen [EBCTCG] wird die Brustkrebssterblichkeit im Jahr 2010 um die Hälfte geringer sein (*Peto, Dalesio 2003*).

Bei bösartigen Tumoren ist nach heutigem Kenntnisstand der Medizin die Heilung eines Erkrankten grundsätzlich möglich, wenn die Krankheit in einem sehr frühen, nicht-invasiven Stadium erkannt und richtig behandelt wird, wobei der Tumor chirurgisch "in sano", d.h.vollständig im Gesunden, entfernt werden muß (*Buchali, Budach 2000; Schmidt-Matthiesen et al. 2002*).

Wird ein bösartiger Tumor in einem zu späten Stadium erkannt oder nicht bedarfsgerecht behandelt, ist keine kurativ intendierte Behandlung und somit keine Tumorheilung mehr möglich. Der Sinn der Therapie besteht dann lediglich

in der Erhöhung der Lebenserwartung und Verbesserung der Lebensqualität, im Sinne einer palliativen Therapie (*Schwenzer, Ehrenfeld 2002*).

Wichtige Maßnahmen um das Mammakarzinom in einem möglichst frühen Stadium zu erkennen sind, die Förderung der Teilnahme an ärztlichen Früherkennungsuntersuchungen und qualitätsgesicherte Mammographie-Screening-Maßnahmen (nach deren Einführung) sowie das Unterweisen der Patientinnen zur regelmäßigen Selbstuntersuchung der Brust, welches ein unerlässlicher Bestandteil der Beratung im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen sein sollte (*Koslowski et al. 1988; Pschyrembel 1998*).

In Deutschland gehört die Mammographie noch nicht zum Bestandteil der empfohlenen Vorsorgeuntersuchung, obwohl ihr Routinegebrauch von mehreren Organisationen empfohlen wird (*Kreienberg et al. 2003*). Randomisierte Studien aus verschiedenen Ländern zeigen eine mögliche Mortalitätsreduktion durch Einführung der Früherkennungsmammographie bei 50 -70 jährigen Frauen um 20 - 30% (*Nekolla et al. 2005*). Bei der zusätzlichen Kombination der Mammographie mit einer Mammasonographie ist es sogar möglich alle nonpalpablen Karzinome richtig zu erkennen, das entspricht einer Sensitivität von 100% (*Ruhland et al. 2000*).

Trotz der Einführung von Untersuchungsprogrammen zur Krebsvorsorge werden die meisten Karzinome der Brust von den Patienten selbst entdeckt. Eine Therapie wird oftmals nach einer großen Verzögerung begonnen, so dass der Tumor in einem weiter fortgeschrittenen Stadium gefunden wird und eine schlechtere Prognose zeigt als jene die durch klinische Untersuchung oder Mammographie entdeckt werden. Eine Untersuchung von 1050 Patientenfällen mit Brustkrebs zwischen Januar 1990 und Dezember 1994 kam zu folgendem Ergebnis: 72% der Tumoren wurden von den Patienten selbst entdeckt, 12% durch den Arzt bei der Routineuntersuchung oder durch andere Gründe, und 16% wurden durch Mammographie gefunden die ohne einen klinischen Verdacht auf Krebs durchgeführt wurde. Tumore die durch den Arzt oder durch Mammographie entdeckt wurden, hatte man viel früher behandelt als jene, die zuerst vom

Patienten entdeckt wurden, und hatten folglich ein niedrigeres T - und N -Stadium (*Schleicher, Ammon 1998; Kreienberg et al. 2002*).

Ein häufiges Erstsymptom von Mammakarzinomen ist eine knotige Verhärtung in der Brust, die von der Patientin ertastet wird und teilweise auch mit Spannungsgefühl oder Schmerzen einhergeht. Sind solche tastbaren Veränderungen vorhanden, gilt die Tripelkombination aus klinischer Untersuchung [Inspektion, Palpation], Mammographie und Feinnadelbiopsie für die weitere diagnostische Vorgehensweise als sichere Methode. Damit kann man, sofern die Ergebnisse aller 3 Komponenten hinsichtlich benigne oder maligne übereinstimmen, eine offene Biopsie ersetzen.

Aus diesem Hintergrund wurde 1998 der so genannte Triple Test Scoring (TTS) eingeführt, bei dem jede Komponente des Dreifachtests in benigne, verdächtig bzw. maligne eingeteilt werden kann und entsprechend mit 1, 2 oder 3 Punkten versehen wird (*Schmid et al. 1994; Kreienberg et al. 2002*).

In einer Studie von *Morris et al. 2001* wurde die Anwendung des TTS bei 479 Patienten mit 484 palpablen Brustläsionen geprüft wobei man zu folgendem Ergebnis kam: Durch den gestaffelten Dreifachtest in Kombination mit diesem Punktesystem konnten die meisten Brustläsionen hoch verlässlich als gut oder bösartig identifiziert werden. Ein anschließender histologischer Befund bestätigte dieses Ergebnis. Lediglich bei 8% (39 von 484) der Brustläsionen mit einem TTS-Score von 5 war eine weitere Biopsie zur abschließenden Diagnose erforderlich.

1.2. Die Ätiologie des Mammakarzinoms

Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell und die Ursache der Erkrankung ist bisher nicht vollständig geklärt. Die Proliferation der Drüsenzellen des Brustgewebes hängt insbesondere von der Anwesenheit von Östrogenen ab. Die nachfolgend aufgeführten Risikofaktoren lassen zum Teil einen hormonellen Einfluß [veränderte Östrogenwirkung] auf die Entstehung des Brustkrebses

vermuten. Diese Hypothese wird durch die niedrige Brustkrebsinzidenz bei Männern bekräftigt.

1.2.1 Gesicherte Risikofaktoren

Als gesicherte Risikofaktoren der Erkrankung sind zu nennen (*Kreienberg et al. 2002*):

- a) Alter
- b) familiäre Disposition
- c) Mastopathien mit Zellatypie
- d) primäres Mammakarzinom oder Zustand nach therapeutischer Mastektomie

zu a)

Das Alter ist ein prognostischer Indikator und stellt bei über 60-jährigen eine Disposition für ein Mammakarzinom dar (*Schmidt-Matthiesen et al. 2002*).

zu b)

Die Erforschung der erblichen Faktoren stellt einen eigenständigen Forschungszweig dar. Die Häufigkeit des Auftretens dieser Erkrankung wird in der Literatur unterschiedlich beziffert. Nach *Kreienberg et al. (2002)* sind etwa 5% der Brustkrebserkrankungen genetisch bedingt und werden autosomal dominant an die Nachkommen weitergegeben. Für diese Erkrankung sind hauptsächlich Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 ursächlich, wobei Tumoren mit BRCA1-Mutationen im allgemeinen negativ für den Östrogen- und Progesteronrezeptor sind und jene mit BRCA2-Mutationen meistens für beide Hormonrezeptoren positiv sind (*Dahija, Deng 1998; Hedenfalk et al. 2001*).

1.2.2 Wahrscheinliche Risikofaktoren

Als wahrscheinliche Risikofaktoren der Erkrankung zählen (*Kreienberg et al. 2002*):

- a) frühe Menarche
- b) späte Menopause
- c) Kinderlosigkeit
- d) späte erste Geburt
- e) Hormonsubstitution
- f) Ernährung und Übergewicht
- g) Sozialstatus

zu b) Ein frühe Menopause hat einen protektiven Effekt auf die Entstehung des Brustkrebses. Ein Eintritt in die Menopause im Alter von weniger als 50 Jahren zeigt ein geringeres Risiko als im Alter von 55 Jahren und älter. Dieser risiko - mindernde Effekt scheint zudem bei mageren Frauen stärker ausgeprägt zu sein (*Monninkhof et al. 1999*).

zu c) und d) Die endgültige Differenzierung des Brustdrüsengewebes erfolgt erst mit einer ausgetragenen Schwangerschaft und der nachfolgenden Stillzeit, daher ist die Brust gerade in den Stadien ihrer Entwicklung für schädigende Einflüsse besonders anfällig (*Russo u. Russo 1995*). Kinderlosigkeit und eine verspätete Erstgeburt werden mit einer Überexpression des HER-2/neu-Proteins in Zusammenhang gebracht (*Bernstein et al. 1999*).

zu e) Durch eine kurzfristige Hormoneinnahme (< 5 Jahre) ergibt sich keine nennenswerte Risikozunahme, das Risiko ist vergleichbar dem einer verspätet einsetzenden Menopause, welches durch eine Reanalyse zahlreicher Studien aufgezeigt werden konnte (*Kreienberg et al. 2002*). Bei einer längerfristigen Verabreichung von Östrogenen muß jedoch mit einem gering erhöhten, mit

Therapiedauer zunehmendem Brustkrebsrisiko ausgegangen werden, das sich nach Absetzen der Östrogengabe wieder normalisiert (*Colditz et al. 1995*).

Harris et al. (1996) beschreiben insbesondere für schlanke Frauen (niederer BMI) ein erhöhtes Brustkrebsrisiko unter postmenopausaler Substitutionstherapie mit normal hoher Dosierung gegenüber einem ebenfalls schlanken, nicht substituierten Vergleichskollektiv.

zu f) Ernährung und Übergewicht zählen zu den zivilisatorischen Faktoren die in deutlicher Abhängigkeit von der Geographie sind. Eine fettreiche, ballaststoffarme sowie gemüse- und selenarme Ernährung bergen ein Risiko (*Schmidt-Matthiesen et al. 2002*). Im Gegensatz dazu scheinen milchhaltige Produkte eine protektive Wirkung zu besitzen. Bei prämenopausalen Frauen, nicht aber bei postmenopausalen, wurde bei vermehrtem Konsum fettarmer milchhaltiger Nahrungsmittel, insbesondere für entrahmte/ fettarme Milch, ein reduziertes Brustkrebsrisiko festgestellt.

Ähnliches wurde beobachtet mit Bestandteilen [Kalzium und Vitamin D] milchhaltiger Nahrungsmittel (*Shin et al. 2002*).

1.2.3 Fragliche Risikofaktoren

Zu den fraglichen Risikofaktoren zählen (*Kreienberg et al. 2002*):

a) Nikotin- und Alkoholabusus

Eine Studie von *Kropp und Chang-Claude (2002)* bekräftigt die Hypothese eines kausalen Zusammenhanges zwischen aktivem sowie passivem Rauchen und dem Brustkrebsrisiko. Das Risiko erhöht sich mit zunehmender Dauer des Rauchens und sinkt nach Einstellung desselben. Nach den Ergebnissen von *Egan et al. (2002)* vermutet man, dass passives Rauchen in keinem Zusammenhang mit Brustkrebs steht, jedoch aktives Rauchen mit einer leichten Erhöhung des Risikos verbunden ist, wenn das Rauchen in jungen Jahren (< 17 Jahre) begonnen wird.

Nach vermehrtem Alkoholkonsum beobachtet man ein steigendes Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Bei der Einnahme von ≥ 15 g Ethanol/Tag erhöht sich das Erkrankungsrisiko, verglichen mit Nichtkonsumenten, um den Faktor 1,26. Dabei wird ein Zusammenhang zu lokoregionären In-Situ-Erkrankungen beobachtet (*Feigelson et al. 2003*).

b) Kaffeekonsum (mit/ohne Koffein)

Es wird keine Beziehung zwischen Kaffeekonsum und dem Erkrankungsrisiko an Brustkrebs festgestellt. Selbst Frauen mit einer Kaffeeinnahme von ≥ 4 Tassen/Tag sind keinem größeren Risiko ausgesetzt (*Tavani et al. 1998, Michels et al. 2002*).

c) Pharmakaeinwirkung

d) Einwirkung elektromagnetischer Felder

Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der Brustkrebsentstehung ist bisher noch nicht abschließend geklärt.

1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren

1.3..1 Definition

Prognostische Faktoren können vorhersagen, welches Risiko für ein späteres Wiederauftreten der Erkrankung [Rezidiv, Metastasierung] oder den Tod durch die Erkrankung gegeben ist. Sie informieren somit über die Agressivität des Tumors und damit über die wahrscheinliche zukünftige Entwicklung des Krankheitsverlaufes.

Prädiktive Faktoren hingegen sind therapierelevante Faktoren, die Aufschluss über das zu erwartende Ansprechen des Tumors auf eine bestimmte Therapie [zytostatisch oder endokrin] geben können und beschreiben somit die Wahr-

scheinlichkeit der Reduktion eines vorhergesagten Risikos (*Kreienberg et al. 2002*).

1.3.2 Etablierte Prognosefaktoren

Zu den etablierten Prognosefaktoren zählen das Grading, die Tumorgröße, der Nodalstatus [TNM-Klassifikation], der Steroidhormonrezeptorstatus und der Menopausenstatus.

Mit dem **Grading** (*Bloom, Richardson 1957*) wird der histologische Entwicklungsgrad eines Tumors erfasst, der Aussagen über die tubuläre Differenzierung, Zellkernpolymorphie und Mitosenanzahl liefert. Nach einem festgelegten Schema wird in drei Differenzierungsgrade: G1, G2 und G3 eingeteilt. Die Prognose verschlechtert sich kontinuierlich von Grad 1 bis Grad3 (*Contesso et al. 1987*).

Diese Klassifikation ist jedoch mit den Schwachpunkten einer vagen Gradeinteilung und einer unobjektiven Beurteilungsgrundlage verbunden (*Page et al. 1998*). In der neuen TNM-Klassifikation maligner Tumoren [6.Aufl. 2002] wird für invasive Karzinome deshalb das Grading nach *Ellston und Ellis (1991)* empfohlen, das ein modifiziertes Grading nach Bloom und Richardson ist.

Die **Tumorgröße** korreliert positiv mit dem Risiko einer Fernmetastasierung (*Cowen et al. 1998*). Eine Untersuchung von *Carter et al. (1989)* zeigte, dass Patientinnen mit einer Tumorgröße von mehr als 2 cm eine deutlich schlechtere Überlebensprognose haben, wobei auch sehr kleine Tumoren bereits Fernmetastasen aufweisen können. In einer anderen Studie mit einem Follow-up von 5 Jahren erwies sich die Tumorgröße als signifikanter prognostischer Indikator für das rezidivfreie Überleben (*Volpi et al. 2000*).

Ein positiver **Hormonrezeptorstatus** korreliert mit günstigen prognostischen Merkmalen wie einer geringen Proliferationsrate und geringerem Differenzierungsgrad des Tumors. Patientinnen mit Tumoren die sowohl Östrogenrezeptoren als auch Progesteronrezeptoren exprimieren, haben den größten Nutzen von einer Hormontherapie, aber die Ansprechrate der Tumoren, die nur einen Rezeptortyp exprimieren ist immer noch signifikant. Der Rezeptorstatus ist hilfreich Patientengruppen zu selektieren, die wahrscheinlich nicht von einer Hormontherapie profitieren (*Osborne 1998*).

Der **axilläre Lymphknotenbefall** ist nach wie vor der aussagekräftigste Prognosefaktor beim Mammakarzinom und der Standardeingriff zu seiner Erhebung ist die Lymphonodektomie. Zum exakten Staging eines Mammakarzinoms ist eine Axilladisektion unumgänglich, die zudem von therapeutischer Bedeutung ist (*Buchali, Budach 2000*). Für eine exakte Beurteilung müssen jedoch mindestens 10 Lymphknoten entfernt und histologisch aufgearbeitet werden. Nodalpositive Tumoren, insbesondere ab 4 positiven Lymphknoten, bedeuten im Vergleich zu nodalnegativen Tumoren eine wesentlich schlechtere Prognose für die Patientin (*Rakowsky et al. 1992*).

Patienten mit einem T1N0M0-Stadium haben eigentlich einer sehr gute Überlebensprognose und bedürfen nicht in jedem Fall einer adjuvanten Therapie, jedoch eine kleine Subgruppe dieser Patienten entwickelt ein Rezidiv (*Ciatto et al. 1990*).

Nicht nur die Anzahl tumorbefallener Lymphknoten ist bedeutend, sondern auch die Intaktheit der Lymphknotenkapsel. Ein Durchbruch des Karzinoms durch die Kapsel und eine Invasion ins axilläre Fettgewebe ist gleichfalls mit einer Prognoseverschlechterung verbunden.

Die axilläre Lymphonodektomie ist eine für die Patientin mit einer erheblichen Morbidität behaftete chirurgische Intervention, deshalb wird ihre Notwendigkeit kontrovers diskutiert. Die Entfernung eines sogenannten Wächterlymphknotens

(Sentinel Lymph Node \cong erster Abfluss-LK) anstelle der Durchführung einer Axilladisektion könnte eine schonendere Option sein. Ob diese Maßnahme jedoch ausreichend ist zeigte folgende Untersuchung von *Veronesi et al. (1997)*. Ein Sentinel-Node der per Lymphabstromszintigrafie mit Technetium 99 sowie intraoperativ durch Farbstoffmarkierung bestimmt und dann histologisch untersucht wurde, sagte in 97,5% den axillären Lymphknotenstatus voraus. Nach Parafineinbettung wiesen 24% der im Schnellschnittverfahren zunächst tumorfrei beurteilten Lymphknoten mikrofokale Metastasen auf, weswegen anzustreben ist, durch Zytokeratinmarkierung diese Frequenz zu minimieren.

Trotz Berücksichtigung der genannten Faktoren sind die Möglichkeiten, die Prognose der einzelnen Patientin und vor allem ihr Ansprechen auf eine systemische Therapie vorherzusagen, noch sehr limitiert.

1.3.3. Neue Prognosefaktoren

Neben den "gesicherten" Prognosefaktoren werden zahlreiche neuere Faktoren hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Relevanz untersucht. Diese berücksichtigen genetische, biochemische und zellkinetische Aspekte.

Die Untersuchung neuer prognostischer und prädiktiver Faktoren soll dazu beitragen, insbesondere bei nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen effektivere individuelle Therapieentscheidungen zu treffen.

Im folgenden sollen einige dieser Faktoren kurz dargestellt werden, die zum Teil im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden:

- p53 [Tumorsuppressorgen]

Das p53-Gen kodiert für ein nukleäres Protein und ist praktisch in geringen Mengen in allen Zellen zu finden. Dieses Protein [p53] wirkt als Wachstumsinhibitor indem es an spezifische DNA-Regionen bindet, von wo es die Exprimierung anderer Gene regulieren kann. Die genauen Mechanismen darüber sind jedoch bisher unbekannt. Mutationen im Bereich des Tumorsuppressorgens

p53 führen zu einem inaktiven Suppressorprotein, das sich immunhistochemisch nachweisen lässt. Das mutierte p53 ist im Gegensatz zum Wildtyp-p53-Gen dann nicht mehr in der Lage eine Reparatur geschädigter Erbsubstanz zu bewirken, die Folge ist eine maligne Transformation. Problematisch im Hinblick auf die prognostische Wertigkeit ist, dass Diskrepanzen von 25- 30 % zwischen der Analyse auf DNA-Ebene und der Immunhistochemie bestehen. Trotz dieser Tatsache haben verschiedene Studien die p53-Proteinexpression als unabhängigen prognostischen Faktor bei Karzinomen der Brust und bei Tumoren anderer Lokalisation gewertet. Studien haben auch gezeigt, dass p53-Mutationen mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall und/ oder Gesamtüberleben assoziiert sind (*Dahija, Deng 1998; Elledge, Allred 1998; Tsuda et al. 1998; Bernstein et al. 1999*).

Ein luminometrischer Assay zur Quantifizierung der p53-Proteinkonzentration in Mammakarzinomgeweben ergab, dass Mammakarzinome höheren histologischen Malignitätsgrades deutlich höhere p53-Proteinkonzentrationen aufweisen als Tumoren geringerer Malignität und zeigen ebenfalls Diskrepanzen, und sogar erhebliche, zu der von anderen Autoren berichteten Mutationsfrequenz der proteincodierenden Regionen des p53-Gens (*Westhof et al. 1997*).

Bei jungen Tumorpatientinnen ist eine leicht erhöhte Inzidenz einer p53-Positivität auffällig, die wahrscheinlich mit der signifikant höheren Inzidenz von Grad 3 Tumoren bei diesen Patienten assoziiert ist (*Pratap, Shousha 1998*).

- **Ki-67/ (MIB1)** [Proliferationsmarker]

Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, das nur von proliferierenden Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen [späte G1, S, M, G2] exprimiert wird (*Gerdes et al. 1984*). Ein Nachweis dieses Antigens wird am häufigsten in schlecht differenzierten Tumoren beobachtet, die eine hohe mitotische Aktivitätsrate aufweisen, und scheint daher unabhängig von der Tumorgöße, dem Lymphknotenstatus und der Östrogenexpression zu sein. Ein hoher immunhistochemischer Nachweisspiegel

an Ki-76 soll zudem oft mit einem frühen Rezidiv nach Mastektomie assoziiert sein (*Bouzubar et al. 1989*).

Frauen ≥ 50 Jahre mit einem MIB-1- Index von weniger oder gleich 30% bilden eine Subgruppe mit einem geringen Risiko für ein ipsilaterales Rezidiv (*Dalberg et al. 1999*).

- **bcl-2** [Onkogen]

Das bcl-2 ist ein Protein welches sich auf der Mitochondrienmembran befindet und zu den Protoonkogenen zählt. Als Apoptoseinhibitor wirkt es protektiv gegen exogene Zellschäden (*Reed 1994*).

Das Genprodukt von bcl-2 ist in ca. 70 % der Mammakarzinome positiv und korreliert mit Hormonrezeptorpositivität, einer niedrigen Proliferationsrate und dem Fehlen von p53.

Die Expression von bcl-2 läßt sich charakteristischerweise bei langsam proliferierenden, gut differenzierten, rezeptorpositiven Mammakarzinomen nachweisen (*Henderson, Patek 1998*).

- **HER-2/neu** (*c-erbB-2*) [Onkogen]

Das Her-2-Protoonkogen kodiert für einen Wachstumsrezeptor auf der Zellmembran. Strukturell normales Her-2/neu-Protein wird in einer bedeutenden Menge (20-30%) aller Mammakarzinome überexprimiert (2-40 fach). Eine Überexpression resultiert gewöhnlich durch eine Gen-Amplifikation, aber in einigen Fällen besteht dies trotz einer normalen Anzahl von Genkopien. Dass eine verstärkte HER-2/neu-Biosynthese bei Brustkrebs mit aggressiverem biologischen Verhalten und schlechter Überlebensprognose verbunden ist, wurde in den meisten Studien aufgezeigt. Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen der Überexpression dieses Onkogens und frühen Stadien der Karzinogenese bei verschiedenen Arten des Brustkrebses gefunden, was vielleicht auf eine wichtige Rolle bei der Auslösung von invasivem Wachstum hinweist (*Dahiya, Deng 1998; Pegram et al. 1998; Bernstein et al. 1999*).

Volpi et al. (2000) zeigten an nodalnegativen Patientinnen bei einem Follow-up von 5 Jahren lediglich einen Kurzzeit-Effekt der Her-2-Expression auf das rezidivfreie Überleben. Die Her-2 Amplifikation ist ein Indikator für eine schlechte Prognose bei nodalnegativen Karzinomen mit einem Grading von G3 (*Tsuda et al. 1998*) und bei jungen Brustkrebspatientinnen (*Agrup et al. 2000*). Her-2-positive Patienten sprechen häufig nicht auf eine chemoendokrine Therapie an und haben ein verkürztes rezidivfreies Überleben. Her-2-negative Patienten, die eine neoadjuvante chemoendokrine Therapie erhalten hatten, zeigten eine bessere Prognose als adjuvant chemoendokriner behandelte Patienten sowie ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben (*Gregory et al. 2000; Agrup et al. 2000*).

Press et al. (1993) zeigten in einer multivariaten Analyse die HER-2/neu-Überexpression als Prognosefaktor der unabhängig von Grading, Tumorgröße und Nodalstatus ist.

Der Nachweis des membranständigen Proteins kann immunhistochemisch oder durch fluoreszente In-situ-Hybridisierung (FISH) erbracht werden, wobei letztere überlegener zu sein scheint. Erst durch diese Bestimmung der HER-2/neu-Alteration ist eine Aussage über die prognostische bzw. prädiktive Wertigkeit möglich, welche die Voraussetzung für die jeweilige Therapie darstellt.

Seit einigen Jahren ist ein monoklonaler HER-2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) erhältlich wodurch eine effektive systemische Immuntherapie möglich wurde, nunmehr kann Her-2 auch als prädiktiver Faktor genutzt werden. Dass neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen der Tumorbologie die Entwicklung neuer, effektiver, an der Tumorbologie orientierter Therapieformen vorantreiben können, wurde somit gezeigt.

- **uPA** , PAI-1[tumorassoziierte Proteasen]

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor [PAI-1] sind tumorassoziierte Proteasen die in einem komplexen Zusammenwirken rezeptorvermittelt durch Umwandlung von Plasminogen in

Plasmin den Abbau von Proteinen des Tumorstromas und der Basalmembran bewirken. Die Tumorzelle wird dadurch zur Invasion, Infiltration und Zellmigration [Metastasierung] befähigt. Durch Bestimmung dieser beiden Parameter können Subgruppen nodalnegativer Patienten mit sehr niedrigem Rezidivrisiko ermittelt werden, denen eine adjuvante Chemotherapie erspart bleiben kann (*Kreienberg et al. 2002*). Eine Studie von *Fisher et al. (2000)* zeigte eine vermehrte Bildung von uPA und PAI-1-mRNA in malignen Tumoren verglichen mit normalem Brustdrüsengewebe, wobei sich jedoch keine Unterschiede zwischen bösartigen und gutartigen Tumoren zeigten. Zusätzlich analysierten sie den spezifischen uPA-Rezeptor [uPAR] und stellten insgesamt fest, dass der uPAR- und die PAI-1 mRNA-Bildung variabler ist als die für uPA-mRNA und folgerten daher eine mögliche Rolle des Rezeptors und Inhibitors in der Regulation der uPA-Aktivität.

Zuletzt ist als vielbedeutender weiterer neuer Prognosefaktor der *Tumorzellnachweis im Knochenmark [KM-Status]* zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zu erwähnen. Dieser Prognosefaktor ist deshalb so wichtig, weil er neue Möglichkeiten im Hinblick auf die Erforschung verschiedener tumorbiologischer Eigenschaften [z.B. Invasivität, metastatische Kapazität] eröffnet, nicht auf den proliferativen Eigenschaften der Tumorzelle basiert und somit zu den Faktoren [z.B. uPA/PAI-1, Angiogenese, Kathepsin D (*Solomayer et al. 2000 b*)] zählt die vorrangig das weitere Schicksal der Tumorpatientin prägen. Diese Eigenschaften der Tumorbiologie können dann zur gezielten Beeinflussung der "Mikrometastasierung" als Zielstrukturen für neue adjuvante Therapiemaßnahmen herangezogen werden.

Dieser Parameter wird in Kapitel 1.5. bzw. 1.6. noch ausführlich beschrieben und ist auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4. Bedeutung der Metastasierung

1.4.1 Definition von Metastasen

Der Vorgang, wenn sich Zellen oder kleine Gewebereinheiten eines malignen Tumors in den Organismus absiedeln (Tumoraussaat) und an anderer Stelle zu wachsen beginnen wird als Metastasierung bezeichnet, es entstehen dabei *Metastasen* [Tochtergeschwülste] (*Schwenzer, Ehrenfeld 2002*).

Bis Mitte der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts war die Rotter-Halsstedsche-Operation die favorisierte Operationsmethode. Aufgrund der unnötigen Radikalität und der damit einhergehenden Morbidität sowie der schlechten Gesamtergebnisse wurde sie durch zunehmend brustschonendere Operationsverfahren abgelöst (*Grischke, Wallwiener 2000*).

Eine Ebenbürtigkeit speziell der brusterhaltenden Therapie zur modifiziert radikalen Mastektomie in frühen Stadien ist inzwischen in vielen Publikationen dargelegt. Ihr sollte in den meisten Fällen der Vorzug gegeben werden. Die den "Halstedt-Doktrin" zugrundeliegende tumorbiologische Vorstellung basierte auf der Hypothese, daß sich das Mammakarzinom nur schrittweise ausdehnt, somit die Tumorzellen erst über die Lymphknoten in den Gesamtorganismus gelangen. Jeder Lymphknoten wurde als Barriere gegen eine weitere Tumorzellaussaat gesehen. Die hämatogene Aussaat hat in diesem Tumorkonzept eine geringe Bedeutung, das operable Mammakarzinom wird als lokoregionale Erkrankung angesehen und der Tumor in seiner Beziehung zum Patienten als autonom. Das Schicksal der Patientinnen hing dabei vom Ausmaß der Operation ab (*Koslowski et al. 1988*).

Nach heutiger Auffassung stellt das Mammakarzinom bei vielen Patientinnen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine systemische Erkrankung dar. Das Ausmaß der lokoregionalen Therapie hat deshalb wenig Einfluß auf die Überlebensrate. Die regionalen Lymphknoten sind als Barrieren nicht effektiv, sie sind jedoch von biologischer Bedeutung. Der befallene lokoregionale Lymphknoten

ist ein Indikator des Tumorstadiums bzw. der Generalisation. Die hämatogene Metastasierung spielt für die Prognose des Karzinoms die entscheidende Rolle (*Buchali, Budach 2000*).

Krebs metastasiert üblicherweise in den Knochen und bis zu 80% der Patienten mit Brustkrebs, Prostatakrebs und Lungenkrebs erleiden Knochenmetastasen (*Janjan 2001*).

Skelettmetastasen werden von zahlreichen Karzinomen z.B. von der Brust (*Johnston et al. 1970*), Prostata (*Pantel et al. 1995; Jeffrey et al. 1998; Weckermann et al. 2001*), Schilddrüse (*Galasko, Doyle 1987*), Niere und Lunge (*Johnston, Smith 1968; Pantel et al. 1996*) gebildet. Die metastatische Affinität zum Skelettsystem ist sehr ausgeprägt bei Brustkrebs, und die Mehrzahl der Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs haben Knochenmetastasen zum Zeitpunkt des Todes (*Galasko 1986*).

Metastatische Knochenerkrankungen führen zu typischen Komplikationen wie Knochenschmerz, Hyperkalzämie, pathologischen Knochenbrüchen, Myelopathie und Wirbelsäulenkompressionen, die eine bedeutende Ursache für Morbidität und Mortalität sind (*Nielsen et al. 1991; Janjan 2001; Lipton et al. 2001*).

Im Gegensatz zu Patienten mit Brustkrebs und viszerale Metastasen, haben Patienten mit Metastasen die auf das Skelettsystem beschränkt sind eine günstigere Lebenserwartung. Die Wahrscheinlichkeit von Skelettkomplikationen allerdings ist hoch, und viele Patienten leiden an den Folgen von Skelettkomplikationen (*Yamashita et al 1991; Solomayer et al. 2000*). Lokale (Radiatio und Operation) und systemische (Hormontherapie, Chemotherapie und antiosteolytische Therapie) Behandlungsmodalitäten sind verfügbar, aber die Bestrahlung bleibt die Behandlung der Wahl (*Nielsen et al. 1991; Janjan 2001*).

Im fortgeschrittenen Stadium von Krebs ist das Immunsystem häufig geschwächt, entweder durch Einflüsse des Tumors selbst oder durch Nebenwirkungen der Behandlungsmethoden Chemotherapie und/oder Strahlentherapie. Ein vielver-

sprechender neuer Ansatz bei der Krebsbehandlung umfaßt die sogenannten aktiv spezifischen Immuntherapien mit Impfstoffen aus inaktivierten -möglichst patienteneigenen- Tumorzellen oder Teilen davon. Durch sie soll das Immunsystem des Patienten gezielt gegen Antigene des individuellen Tumors oder zumindest desselben Typs von Tumor mobilisiert werden. Durch Infektionen der Zellen mit bestimmten Viren oder durch Zugabe bestimmter als Verstärker wirksamer Hilfsprodukte, sogenannter Adjuvantien, wird versucht die mangelnde Immunogenität der Tumorzellen zu verbessern. Solche Manipulationen der Tumorzellen sind auch auf chemischem, enzymatischem oder heutzutage sogar gentechnischem Weg möglich (*Schirrmacher 1990*).

In den letzten Jahren ist gezeigt worden, daß Bisphosphonate die Rate von Skelettkomplikationen reduzieren können (*Body et al. 199; Perez 2000*). Bisphosphonate sind nicht für eine kurativ intendierte Behandlung bestimmt, deshalb sind Tolerierbarkeit und Patientenfreundlichkeit sehr wichtige Faktoren in der Therapie mit Bisphosphonaten. Dieser Erkenntnis wird Rechnung getragen durch hochwirksame Bisphosphonate der dritten Generation die bedeutende Vorteile aus der Sicht der Patienten bieten, solche wie die Möglichkeit der ambulanten Patientenbehandlung durch verkürzte Infusionszeiten für intravenöse Verabreichungen, und die Verfügbarkeit von täglich einmaligen oralen Verabreichungen (*Untch et al. 2000; Body 2001; Perez 2001*). Das Pamidronat® und Clodronat® sind die meist verwendeten Bisphosphonate in der Onkologie. Neuere, wirkungsvollere chemische Verbindungen die sich in Studie befinden sind das Ibandronat® und Zoledronat®. Die Erwartungen von den neueren, effektvolleren Substanzen sind komfortablere therapeutische Schemata zur Erhöhung der Compliance des Patienten, Verbesserungen der skelettalen Morbiditätsrate und eine Erhöhung der Überlebensrate (*Body 2001*).

Bisphosphonate haben einen starken inhibitorischen Effekt auf die Osteoklastenaktivität und haben gezeigt, dass sie die Frequenz skelettaler Komplikationen bei Patienten mit Brustkrebs und metastatischen Knochenerkrankungen reduzieren. Zudem haben Labormodelle dargelegt, dass Bisphosphonate die Tumorlast im

Knochenmark reduzieren können, also einen Antitumoreffekt besitzen. (*Untch et al. 2000; Diel 2001; Tripathy 2001*).

Obwohl sich Verbesserungen bezüglich des Gesamtüberlebens bei Untergruppen von Patienten mit Brustkrebs zeigten, sind nur drei größere Studien durchgeführt worden, um das Gesamtüberleben als einen Endpfeiler der primären Wirksamkeit zu beurteilen. Die Ergebnisse dieser Studien waren widersprüchlich, ein Phänomen welches im wesentlichen auf methodische Unterschiede zwischen Studienentwurf und Patientenauswahl zurückzuführen ist (*Patterson 2001; Tripathy 2001*).

Diese Substanzen sind umso wirksamer je eher sie gegeben werden und desto länger die Behandlungsdauer ist. Es ist deshalb wichtig, Faktoren zu finden, die die Entwicklung von Knochen(mark)metastasen vorhersagen können.

1.5. Bedeutung der Knochenmarkszytologie

Seit den frühen 80er Jahren wird in vielen Kliniken und Institutionen der immunzytologische Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Brustkrebs durchgeführt. Trotz zahlreicher Publikationen zum Thema ist es relativ lange Zeit nicht gelungen, die Methode zu standardisieren und den "idealen" Antikörper zu etablieren.

Eine ausreichende methodische Validierung liegt bisher hauptsächlich für die immunzytochemische Detektion mit Zytokeratinantikörpern vor, die an Bestandteile des epithelialen Zytoskeletts binden (*Schlimok et al. 1987; Pantel et al. 1994; Braun, Pantel 1998*).

Brustkrebspatienten haben ein Risiko von mehr als 50% für ein systemisches Rezidiv, sogar wenn der Tumor im Stadium I, II, oder III diagnostiziert wird, trotz kompletter Resektion des Primärtumors und (potentieller) axillärer Lymphknotenmetastasen. Durch die immunzytologische Detektion disseminierter Zellen im Knochenmark könnten diese Rezidive vorhergesagt werden und die betreffenden Patienten einer adjuvanten Therapie zugeführt werden. Für den Nachweis von

disseminierten Zellen im Knochenmark sind in der Vergangenheit verschiedene technische Konzepte angewandt worden. Diese Ansätze erbrachten widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Prävalenz und damit der prognostischen Bedeutung solcher isolierter Tumorzellen (*Braun, Janni 2003*). Um dieser Heterogenität und dem Mangel an Standardisierung entgegenzutreten führten internationale Bemühungen zu der Entwicklung und Evaluation standardisierter Immunoassays zur Bestimmung solcher Zellen (*Borgen et al. 1999*; *Wiedswang et al. 2003a*). Neuere Studien mit ausreichend großen Patientenkollektiven, bedeutsamen Beobachtungszeiten und validierter Methodik (*Mansi et al. 1999*; *Braun et al. 2000b*; *Gebauer et al. 2001*; *Gerber et al. 2001*; *Solomayer et al. 2001*) demonstrierten, dass der Nachweis solcher Zellen ein unabhängiger Prognosefaktor eines schlechten klinischen Krankheitsverlaufes ist.

Eine frühe Diagnostik von Knochenmarkmetastasen ist mittels bildgebenden Verfahren, wie Skelettszintigramm, Röntgenaufnahmen (*Solomayer et al. 1998*) und Computertomographie möglich, jedoch weisen diese Methoden nur manifeste Metastasen nach und sind daher zur Frühdiagnostik nicht geeignet. Zudem kann es auch schwierig sein das Ansprechen des Patienten auf die Behandlung bei Verwendung der genannten Methoden zu bewerten, weil diese relativ unempfindliche Verfahren sind. Deshalb besteht eine Forderung nach neuen Methoden zur Einschätzung des Ansprechens im Knochenmark, um den Nutzen für den Patienten durch eine optimale Art und Dauer der Behandlung zu garantieren (*Lipton et al. 2001*).

Auch durch konventionelle histologische Auswertungen von Beckenkammbiopsien ist es unmöglich einzelne Tumorzellen, oder Tumorzellgruppen ohne Stromabeteiligung [minimale Tumorresiduen] zwischen der Vielzahl von hämatopoetischen Zellen zu erkennen, lediglich Makro- und Mikrometastasen können aufgefunden werden (*Solomayer et al. 1998a*).

Die immunhistochemische Analyse von KM-Aspiraten jedoch erlaubt die Detektion von isolierten Tumorzellen, aber diese repräsentieren nur die Anfangsstadien des

metastatischen Geschehens und sind nicht gleichzusetzen mit Mikrometastasen (*Diel et al. 1996; Solomayer et al. 1997*)

Zur Untersuchung des Knochenmarks nach disseminierten Tumorzellen wird während der Erstoperation eine Knochenmarkspunktion an den Spinae iliacae anteriores superiores durchgeführt. Aus dem Knochenmarksaspirat kann dann der Nachweis mittels monoklonalen Antikörpern geführt werden, die Epitope eines von Mammakarzinomen exprimierten Glykoproteins erkennen. Die Häufigkeit positiver Knochenmarksbefunde im Rahmen der Primäroperation von Mammakarzinom-Patientinnen schwankt in der Literatur meistens zwischen 30 % und 40 %.

1.6. Bedeutung der zytokeratin-positiven Zelle(n) im Knochenmark und die Abgrenzung zur Mikro-/ Metastase

Eine Mikrometastase ist heutzutage allgemein als ein Tumorzellverband definiert der eine Größe von 0,2 bis 2 mm erreicht hat (*Wittekind et al. UICC 2002*).

Problematisch bei der Benutzung des Begriffes Mikrometastase war, dass es bisher keine einheitliche Definition dafür gab. Eine früher oft gebräuchliche Definition beschreibt Mikrometastasen als eine Tumorzellgruppe mit Stromabeteiligung die kleiner als 3 mm ist (*Frisch et al. 1984*).

Der Begriff "Mikrometastase(n)" sollte zudem nicht für isolierte Tumorzellen verwendet werden, da nicht alle Patientinnen mit Tumorzellnachweis im Knochenmark später Metastasen entwickeln (*Solomayer et al. 1998a*).

In Anbetracht dieser Problematik u.a. sind im Sinne eines erweiterten Tumorstagings die Bezeichnungen „mi“ [für Mikrometastasen] und „i“ [für isolierte Tumorzellen] optional in die Staging-Nomenklatur der UICC aufgenommen worden (*Wittekind et al. UICC 1998*).

Krebszellen lösen sich schon im frühen Stadium vom Tumor [okkulte hämatogene Streuung] und siedeln sich u.a. in Nischen der Blutgefäße an. Dort sterben sie ab oder "schlafen", um später, manchmal erst nach Jahren wieder aktiv zu werden. Auf dem hämatogenen Weg *disseminierte Tumorzellen [DTZ]* finden sich im

Knochenmark wieder, hier sind sie immunchemisch nachweisbar.

Den Angaben von *Abati & Liotta (1996)* zufolge gehen 99,95 % der hämatogen disseminierten Tumorzellen z. B. durch die körpereigene Immunabwehr oder Apoptoseinduktion zugrunde.

Nicht aus jeder disseminierten Tumorzelle entsteht eine Metastase, jedoch kann nach einem Stimulus eine Metastase entstehen. Es wird vermutet, dass sich die DTZ in einem inaktiven Zustand, der G₀-Phase des Zellzyklus ["tumor cell dormancy"] befinden. Dennoch reifen einige zu Metastasen heran und beeinflussen damit deutlich die Prognose für das Überleben des Patienten. Das Vorhandensein sogenannter "Mikrometastasen" spricht für eine ungünstigere Prognose und beeinflusst deshalb das Therapiekonzept (*Untch et al. 2000*).

Etwa 80 % der DTZ im Knochenmark sollen sich in einem nicht proliferierenden Status [Dormant state] befinden (*Pantel et al. 1993*), weshalb angenommen wird, dass diese durch proliferationshemmende Chemotherapeutika nicht oder nur unzureichend bekämpft werden können (*Braun, Pantel 1999*).

In zahlreichen Studien (*u.a. Braun et al. 2000a; Monson 1996*) konnte ein schlechtes Ansprechen [relative Resistenz] einzelner Tumorzellen im Knochenmark nach adjuvanter Chemotherapie aufgezeigt werden, womit die Hypothese der "tumor cell dormancy" auch die für das Mammakarzinom charakteristisch lange Latenzzeit bis zur Rezidivmanifestation erklären könnte.

In Zellkulturexperimenten konnte ein zeitlich limitiertes proliferatives Potential [abnehmende Ki-67 -Expression] ins Knochenmark disseminierter Tumorzellen gezeigt werden (*Pantel et al. 1995*).

Zusätzlich wird die Fähigkeit der Tumorzellen immunsuppressive Faktoren und Zytokine zu produzieren und somit eine Umgebung der Immunsuppression zu schaffen [z.B. auch durch defiziente MHC-I-Expression], als weitere potentielle Ursache für die mitunter lange Latenzphase gesehen (*Hosch et al. 1997; O' Sullivan et al. 1997; Karrison et al. 1999*).

Aufgrund dieser relativen Resistenz einzelner Tumorzellen stellen wahrscheinlich zellzyklusunabhängige Wirkstoffe wie Antikörper (*Schlimock et al. 1995*;

Dresemann, Gerhards 1998; Braun et al. 1999) oder Bisphosphonate (*Fromigue et al. 2000; Senaratne et al. 2000*) eine sinnvolle Therapieoption in diesen Patientinnen dar. Außerdem kann versucht werden über die selektive Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika eine bessere Wirksamkeit zu erreichen (*Klein-Bauernschmidt et al. 1996*).

Die Möglichkeiten wie ruhende DTZ wieder aktiv werden könnten, wären zum einen die Reaktivierung zum anderen die Entwicklung von metastatischem Potential. Dieser Prozeß der (Re)aktivierung könnte durch folgende Mechanismen und/oder Gegebenheiten eingeleitet werden: Aktivierung der Synthese autologer Wachstumsfaktoren (*Goustin et al. 1986*), organspezifische Faktoren [z.B. Ädhäsionsmoleküle, chemotaktische Signale und Zytokine] (*Krempien 1995*) oder günstige Bedingungen des Wirtsgewebes/ Umfeldes (*Alexander 1985*).

Den letztgenannten Punkt scheint das Knochenmark beim Mammakarzinom zu erfüllen, da insbesondere das Skelettsystem häufig von Metastasen betroffen ist. Es wurde nachgewiesen, dass DTZ aus dem Knochenmark in die Peripherie abgegeben werden (*Brugger et al. 1994; Shpall et al. 1996*) und dieses Kompartiment somit als Reservoir dieser Zellen im Ruhezustand dienen könnte, von wo aus andere Orte besiedelt werden können (*O' Sullivan et al. 1997*).

Die genauen tumorbiologischen Vorgänge der Aktivierung ruhender DTZ sind bisher noch nicht geklärt, daher ist es unklar, wie aus einigen Zellen eine manifeste Metastase entsteht, aus anderen aber nicht.

Aktive bzw. aktiv gewordene DTZ durchbrechen die Gefäßwand und gelangen in das angrenzende Gewebe und regen dort die Produktion von Gefäßen und Bindegewebe an, anschließend entsteht im Bereich der angesiedelten Krebszellen eine kleine Metastase (Mikro- oder Prämetastase), welche ab einer Größe von 3 mm durch eine Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden kann.

Solide Tumoren benötigen für ihr Wachstum die Neubildung von Blutgefäßen [Neoangiogenese], da ab einer Tumorgöße von ca. 3 mm die Ernährung der Tumorzellen durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist.

In einem Tierexperiment konnte die Neoangiogenese untersucht werden, indem

Zellen einer Tumorzelllinie in die avaskuläre Kaninchen Cornea implantiert wurden. Nach einem initialen Wachstum des Tumorknotens auf ca. 1 bis 2 mm trat ein Wachstumsstillstand ein, wobei erst nach dem Einsprossen neuer Blutgefäße in die Cornea eine Größenzunahme des Tumors erfolgte (*Hossfeld et al. 2001*).

Die meisten Studien unterstützen die Hypothese, dass die Disseminierung isolierter Tumorzellen ins Knochenmark eine Vorstufe auf dem Weg zur klinischen evidenten Metastasierung darstellt und prognoserelevant ist (*Schlimock et al. 1987; Cote et al. 1991; Datta et al. 1994; Harbeck et al. 1994; Diel et al. 1996; Diel et al. 1998; Fields et al. 1996; Landys et al. 1998; Vannucchi et al. 1998; Mansi et al. 1999; Gebauer et al. 2001; Gerber et al. 2001; Braun et al. 2003; Wiedswang et al. 2003 b*).

Untersuchungen die keine prognostische Relevanz isolierter Tumorzellen belegen konnten (*Porro et al. 1988; Mathieu et al. 1990; Salvadori et al. 1990; Courtemanche et al. 1991; Singletary et al. 1991; Funke et al. 1996; Molino et al. 1997 a, 1997 b; Funke, Schraut 1998; Slade et al. 1999; Untch et al. 1999*), sind zumeist älteren Datums und daher u. a. problematisch bezüglich der angewandten Methodik [z.B. Auswahl der Antikörper bzw. Markerantigene].

Darüber hinaus weisen vier neuere Studien auf die unabhängige prognostische Relevanz dieser Zellen für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse hin (*Braun et al. 2000 b; Gerber et al. 2001; Gebauer et al. 2001; Wiedswang et al. 2003 b*).

Zu dem selben Ergebnis kam auch eine Poolanalyse von *Braun et al. (2003 b)* in der 4199 Patientinnen aus acht Zentren zusammengefasst wurden. Ein positiver KM-Status wurde neben der Tumorgröße, dem Lymphknotenbefall, niedrigem Grading und negativem Hormonrezeptorstatus als negativer Vorhersagewert bestätigt.

Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit, Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko zum Zeitpunkt der Primärdiagnose durch Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu identifizieren.

Außerdem könnte der KM-Status bzw. der Nachweis von Tumorzellen im

Knochenmark folgendermaßen genutzt werden: als Entscheidungshilfe zur adjuvanten Systemtherapie bei nodalnegativen Patientinnen, zur Kontrolle des Therapieerfolges bei minimaler Resterkrankung [Zytoreduktion], zur Erforschung der Pathogenese der Metastasierung [z.B. durch Phänotypisierung dieser Zellen]. Die KM-Nachpunktion könnte demnach zum Einsatz kommen, wenn nach Abschluß der Primärtherapie die klassischen Prognosefaktoren nicht mehr zur weiteren prognostischen Einschätzung genutzt werden können. Bei Nachsorgeuntersuchungen könnten dadurch Patientinnen ermittelt werden, die trotz scheinbar "erfolgreicher" Primärtherapie einem erhöhten Rezidivrisiko ausgesetzt sind.

In einer kleinen Studie an 59 Hochrisikopatientinnen (*Braun et al. 2000 a*) sowie in zwei anschließenden größeren Studien (*Wiedswang et al. 2003 b; Janni et al. 2004*) konnte dargelegt werden, dass Frauen mit positivem KM-Status direkt nach Beendigung der Chemotherapie bzw. während der onkologischen Nachsorge eine signifikant schlechtere Überlebensprognose hatten als jene mit negativem Knochenmarkbefund.

Als ein günstiger Zeitpunkt für eine KM-Nachpunktion werden derzeit ca. 3 Jahre nach Erstdiagnose angegeben, weil scheinbar dann die prognostische Aussagekraft der KM-Nachpunktion hinsichtlich einer Risikoeinschätzung für das rezidivfreie Überleben und Gesamtüberleben am größten sein soll (*Wiedswang et al. 2003 b; Janni et al. 2004*).

Anhand dieser Sachverhalte könnte der KM-Nachpunktionsstatus eine Indikation für eine "erweiterte" oder sekundär adjuvante Therapie begründen und Anlaß sein, zukünftig sogar für neoadjuvante Therapieansätze obligate Indikationsstellungen abzuleiten.

II. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden retrospektiv Daten von 310 Patientinnen erhoben, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren und sich im Jahr 2001 in der Frauenklinik der Universität Tübingen zur primären operativen Therapie bzw. zur Nachsorge nach einer auswärts durchgeführten Operation vorgestellt hatten. Diese Patientinnen, die zum Teil neoadjuvant therapiert wurden, haben sich einer Axilladisektion sowie einer Ablatio oder brusterhaltenden Therapie und einer Knochenmarks-Immunzytologie (APAAP-Technik) unterzogen. Von den ursprünglich 310 Patientinnen mußten 38 aufgrund fehlender Angaben in der Krankenakte von der Untersuchung ausgeschlossen werden. Ausgewertet wurden letztlich Daten eines verbliebenen Gesamtkollektives von 272 Fällen.

Zur besseren Beurteilung der Falldaten unterteilte man das Gesamtkollektiv (n=272) in vier Untergruppen:

- a) stationäre-Gruppe (adjuvant) (n=186),
- b) stationäre-Gruppe (neoadjuvant) (n= 46),
- c) ambulante-Gruppe (n= 16),
- d) DCIS-Gruppe (n= 24).

2.2. Erhebungsbogen

Zur Datenerfassung wurde ein eigens entwickelter Erhebungsbogen verwendet. Die persönlichen und klinischen Daten der Patientinnen wurden den archivierten Krankenakten (Immunzytologie-Befundblatt, Pathologie-Archiv, Arztbriefe/OP-Berichte) entnommen und verschlüsselt in den Erhebungsbogen eingetragen. Diese Angaben wurden später in eine Excel-Tabelle übertragen.

Die Verschlüsselung erfolgte bei qualitativen Merkmalen je nach Status oder Ausprägung durch definierte Begriffe bzw. prozentuale Angaben (z.B. *pos bzw. negativ und ja bzw. nein für "vorhanden"/ "nicht vorhanden" oder 0% bis 100% für zunehmende Positivität*), bei quantitativ faßbaren Merkmalen durch ganze Zahlen (z.B. OP-Alter oder Grading).

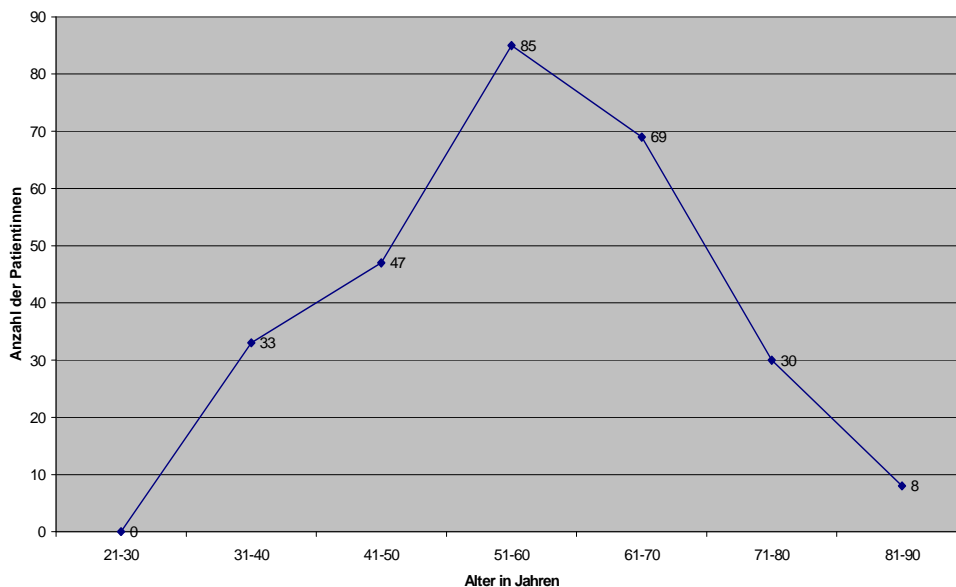
Zur Patientenidentifikation wurden das Geburtsdatum und der Name dokumentiert.

2.3. Histopathologische und biologische Parameter

2.3.1. Alter

Geburtsdatum und Operationszeitpunkt wurden erhoben, so daß daraus das Patientenalter zum Operationszeitpunkt errechnet werden konnte. Das Durchschnittsalter betrug 57 Jahre und bewegte sich zwischen 32 und 84 Jahren. Das mediane Alter war 58 Jahre. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, dass das Erkrankungsmaximum in der 6. Lebensdekade lag. Die Altersverteilung entsprach nicht ganz den Angaben der Literatur.

Abb.1: Altersverteilung im Patientenkollektiv



2.3.2. Knochenmarkstatus (Tumorzellnachweis im Knochenmark)

Erfasst wurde die Anzahl der immunzytologisch mittels monoklonaler Antikörper (APAAP-Technik) nachgewiesenen Tumorzellen aus dem Knochenmark zum Zeitpunkt der Primäroperation. Als immunzytochemischer Marker diente dabei das epithelspezifische Panzytokeratin [Typen 8, 18, 19]. Die untersuchte Zellzahl betrug 2×10^3 mononukleäre Zellen.

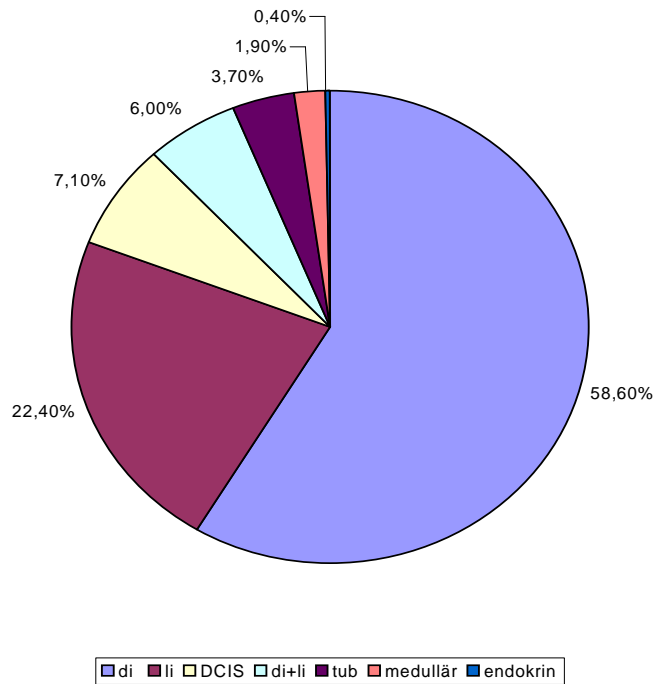
2.3.2. Lymphknotenstatus

Dokumentiert wurde die Anzahl der entfernten Lymphknoten sowie der Anteil an befallenen Lymphknoten zum Zeitpunkt der primären Operation. Um eine zuverlässige Beurteilung des Lymphknotenstatus zu gewährleisten, wurden nur die Fälle betrachtet, in denen mindestens zehn Lymphknoten der Level I [lateral und caudal des M. pectoralis minor] und II [dorsal des M. pectoralis minor] entfernt und untersucht worden waren.

2.3.4. Histologie

Anhand der histopathologischen Befunde wurde das Tumorstadium, das Grading sowie der histologische Karzinomtyp erfasst. Die histologische Klassifikation der untersuchten Mammakarzinome erfolgte nach der Nomenklatur der WHO aus dem Jahre 1981. Eine Übersicht der erhobenen histologischen Karzinomtypen zeigt die Abbildung 1.

Abb.1: Verteilung der unterschiedlichen Karzinomtypen (n=272)



Histologisch handelte es sich in den meisten Fällen um ein invasives duktales Adenokarzinom (58,6 %), gefolgt vom invasiven lobulären Karzinom (22,4%). In etwa gleicher Häufigkeit traten das präinvasive Ductale carcinoma in situ [DCIS] und die beiden erstgenannten Karzinome zusammen [di+li] auf (7,1% bzw. 6 %) auf. Bei den Tumoren mit einer Häufigkeit unter 5% befanden sich in absteigender Rangfolge das tubuläre, medulläre und das äußerst seltene neuroendokrine Karzinom. Bei fünf Patientinnen wurden innerhalb des DCIS Mikroinvasionen oder millimetergroße invasive Bereiche [pT1mic mit $\varnothing < 1\text{mm}$ bzw. »minimal cancer« mit $\varnothing < 5\text{mm}$] nachgewiesen und folgerichtig als invasiv duktales Karzinome klassifiziert. Aufgrund dieser potentiellen okkulten Karzinome sind die gebräuchlichen Begriffe präinvasiv bzw. noninvasiv mit Vorsicht zu benutzen. Bei DCIS von $< 2,5\text{ cm}$ Größe sind Mikroinvasionen nicht zu erwarten, wohingegen bei Größen von $> 5\text{ cm}$ bis zu 60% mit invasiven Bereichen zu rechnen ist.

Eine axillärer Lymphknotenbefall ist bei einem positiven Nachweis okkulten Karzinome zwar relativ selten aber nicht auszuschließen. Die Überlebenschancen beim DCIS beträgt bei adäquater Therapie 94-96% (*Schmidt-Matthiesen et al. 2002*).

2.3.5. Tumorstadium

Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome erfolgte nach der TNM-Klassifikation der UICC (gemäß deutscher Ausgabe, 5. Auflage 1997).

Für die **pT-Klassifikation** wurde die Tumorgöße nach Messung der invasiven Komponente des Primärtumors im OP-Präparat bestimmt und verschlüsselt (**Tx**: Tumor nicht beurteilbar, **T0**: kein Anhalt für Tumor, **Tis**: Tumor in situ, **T1mic**: <1 mm, **T1a**: 1-4 mm, **T1b**: 5-10 mm, **T1c**: 11-20 mm, **T2**: 21-50 mm, **T3**: > 50 mm). Unabhängig von der Tumorgöße erfolgte bei Tumoren mit Brustwandinfiltration [nicht Pectoralmuskel], Ödembildung, Hautulzeration und entzündlichen (inflammatorischen) Karzinomen eine Einstufung als **T4**.

Eine Übersicht über die verschiedenen T-Stadien bei adjuvant-(stationär) behandelten Patientinnen und neoadjuvant-(stationär) behandelten Patientinnen zeigt die Abbildung 2 bzw. Abbildung 3.

Abb.2: Häufigkeitsverteilung der T-Stadien in der Adjuvant-Gruppe (stationär) [n=186]

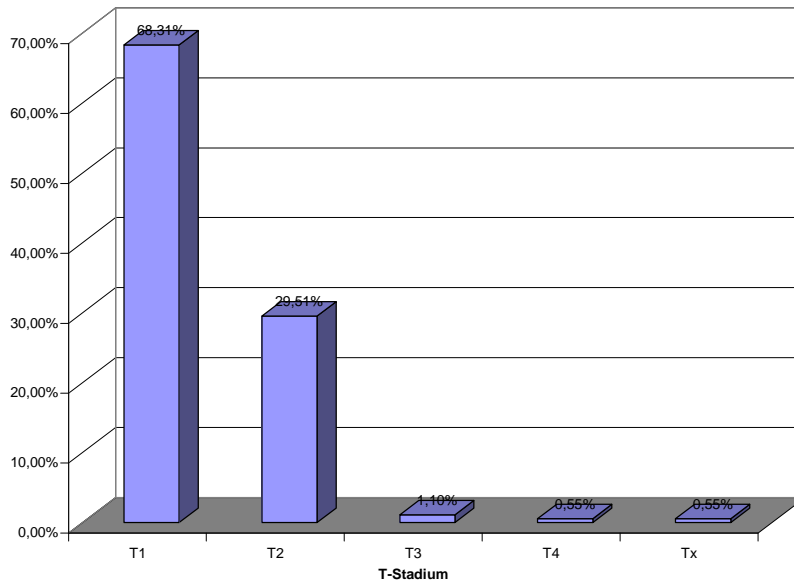
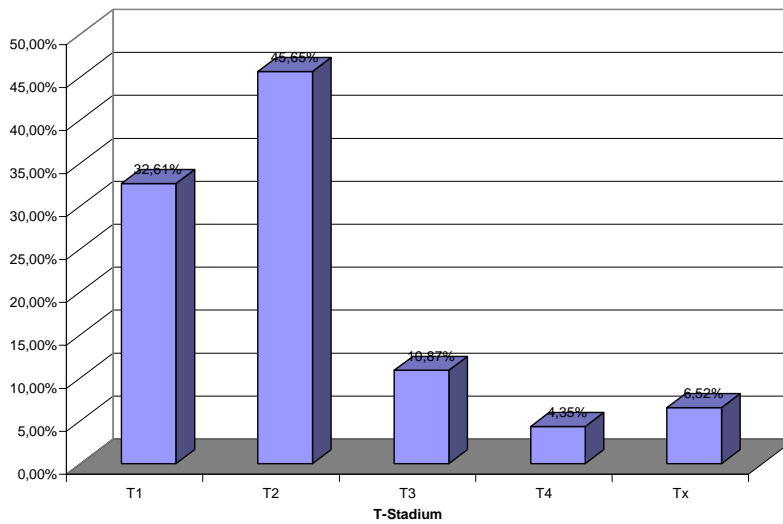


Abb.3: Häufigkeitsverteilung der T-Stadien in der Neoadjuvant-Gruppe (stationär) [n=46]



Der regionäre Lymphknoten[LK]-Status wurde über die **N-Kategorie** codiert:

- **Nx**: axilläre LK nicht beurteilbar,
- **N0**: kein LK-Befall,
- **N1a**: nur Mikrometastasen <2 mm,
- **N1bi**: ≤ 3 axilläre LK und **N1bii**: ≥ 4 axilläre LK befallen / eine Metastase >2 mm aber alle <20 mm,
- N1biii**: LK-Kapseldurchbruch/Metastasen <20 mm,
- N1biv**: alle LK-Metastasen ≥ 20 mm,
- N2**: fixierte LK-Metastasen.

Lymphknotenmetastasen entlang der A. mammaria interna wurden als **N3** und nicht regionäre Lymphknotenmetastasen als Fernmetastasen eingestuft.

Über die **M-Kategorie** schließlich wurden Informationen zum Status der Fernmetastasierung [**M0**: keine Fernmetastasen, **M1**: nachgewiesene Fernmetastasen] erbracht.

2.3.6. Tumorgroße

Im pathologischen Präparat wurde der maximale Durchmesser des Primärtumors in Millimeter bestimmt, wobei bei einem DCIS mit invasivem Anteil lediglich die größte invasive Komponente angegeben wurde.

2.3.7. Fokalität

Verschlüsselt wurden die Ausprägungen " multifokal [= ja] " und "nicht multifokal [=nein] ". Multifokalität lag vor, wenn mehrere Karzinome innerhalb des betroffenen Quadranten vorhanden waren und vom Primärherd entfernt lagen [i.d.R. ≤ 2 cm entfernt].

2.3.8. Grading

Wie bereits angesprochen wird der histologische Differenzierungsgrad durch das Grading charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die häufig verwendete modifizierte Einteilung, das Scarff-Bloom-Richardson-Grading, verwendet [Mod. nach *Bässler et al. 1992*]. Ebenso häufig findet das nukleäre Grading nach Fisher Anwendung (*Fisher et al. 1990*), jedoch haften beiden Systemen Schwachpunkte an, die einer zugrunde liegenden subjektiven Beurteilung und die Tatsache, dass etwa 60% aller Tumoren in ein mittleres Grading (G2) eingestuft werden (*Bässler 1998, Kreienberg et al. 2002*).

2.3.9. Lymphangiosis carcinomatosa

Wenn beim routinemäßigen Durchmustern der Präparate das Vorliegen von Tumorzellen in den peritumoralen Lymphgefäßen festgestellt werden konnte, wurde der Parameter als positiv [=pos], andernfalls als negativ [=neg] gewertet.

2.3.10. Steroidhormonrezeptorstatus

Der Östrogenrezeptorstatus [ER] und Progesteronrezeptorstatus [PR] wurden nach der semiquantitativen Methode nach *Remmele und Stegner (1987)* als immunreaktiver Score [IRS] angegeben. Der IRS-Wert ergibt sich als Produkt aus dem jeweiligen Score-Wert [0-4] der Anzahl positiver Zellen [PP] und dem jeweiligen Score-Wert (0-3) der Färbeintensität [staining intensity = SI] nach der Formel: **IRS =SI x PP** [0-12]. Der immunreaktive Score wurde folgendermaßen bewertet : Ein IRS-Wert von 0, 1 oder 2 entsprach einem negativen Rezeptorstatus [ER-IRS /PR-IRS= neg] ein IRS-Wert von 3 bis 12 einem positiven Rezeptorstatus [ER-IRS /PR-IRS= pos].

2.4. Statistische Auswertung [univariate Analyse]

Es wurde im Kapitel 3.2. die χ^2 -Vierfeldertafel [Chi-Quadrat-Verteilung] zum Vergleich zweier unabhängiger Häufigkeitsverteilungen eingesetzt. Wenn für die unabhängigen Variablen die Hypothese, daß ihre jeweiligen Ausprägungen keinen Einfluß auf die abhängige Variable hatten [Nullhypothese] mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ [**p-Wert = 0,05**] verworfen werden konnte, wurde die Variable als signifikant gewertet, andernfalls als nicht signifikant. Die **Nullhypothese H_0** besagt, daß beide Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Falls also bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ die Testgröße χ^2 [**Chi-Square**] gleich oder größer als der feste Tabellenwert $\chi^2(1; 0,05)$ bzw. $\chi^2(2; 0,05)$ ist, so ist die Nullhypothese abzulehnen, andernfalls anzunehmen. Der Wert von $\chi^2(1; 0,05)$ bzw. $\chi^2(2; 0,05)$ liegt fest und beträgt **3,8415** bzw. **5,9915** (Ramm et al. 1987).

Demnach ist ein Chi-Square-Wert $\geq 3,8415$ für 1 Freiheitsgrad [FG=1] und $\geq 5,9915$ für 2 Freiheitsgrade [FG=2] auf dem 5%-Niveau statistisch signifikant. Zusätzlich wurde für nur zwei Parameter [Alter, max.Tumorgroße] der Wilcoxon-Rangsummentest angewandt. Dieser Test ist ein parametrischer (verteilungs-unabhängiger) Test, d.h. er kann auch eingesetzt werden wenn die Daten nicht intervall- bzw. verhältnisskaliert sind, und ist für den Vergleich der Mediane zweier abhängiger Zufallsgrößen geeignet. Ein äquivalenter Test ist der Mann-Whitney-U-Test. Es wird untersucht ob zwei unabhängige Gruppen aus der selben Population stammen oder nicht, wobei die Daten dafür mindestens auf dem Ordinalniveau vorliegen müssen.

Ist die Anzahl der Fälle in der jeweiligen Gruppe größer als 10 nähert sich die Verteilung der Teststatistik bei wachsendem Umfang rasch gegen eine Normalverteilung mit einem bestimmten Erwartungswert bzw. bestimmten Varianz. Um die Signifikanz zu bestimmen, muss daher standardisiert werden. Die Prüfgröße Z ist normalverteilt mit einem Mittelwert von Null und einer Varianz von Eins. Dieser Test kann einseitig oder zweiseitig angewandt werden. Der hier eingesetzte

zweiseitige Test testet einfach auf einen Unterschied in den Populationen. Die Nullhypothese **H₀** besagt hierbei, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt, das heißt z.B. Gruppe A = Gruppe B. Falls also bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$ [p-Wert =0,05] die Prüfgröße **Z** gleich oder größer **bzw.** kleiner als der feste Tabellenwert **Z 0,05 ; zweiseitig = $\pm 1,9600$** ist, so ist die Nullhypothese abzulehnen, andernfalls anzunehmen. Bei dieser ausgewählten Schranke der Standardnormalverteilung für die zweiseitige Fragestellung ist ein Z- Wert $\geq 1,9600$ bzw. ein Z- Wert $\leq - 1,9600$ auf dem 5% - Niveau statistisch signifikant (*Sachs 1997*).

II. Ergebnisse

a) Nachweis eines Karzinombefalles für das Gesamtkollektiv

3.1.1. Axillärer Lymphknotenstatus bzw. KM-Status in Abhängigkeit entfernter Nodi

Grundlage der Berechnungen waren **231 Fälle** mit Mammakarzinom, bei denen mindestens zehn axilläre Lymphknoten entfernt und untersucht worden waren. In 40,7% dieser Fälle lagen Lymphknotenmetastasen und in 28,6% dieser Fälle Tumorzellen im Knochenmark vor.

Tab.1 a) : Zusammenhang zwischen der Anzahl der entfernten Lymphknoten und der Diagnose von axillären Lymphknotenmetastasen sowie von zytokeratinpositiven KM-Zellen (n=272).

Anzahl der entfernten Lymphknoten	n	davon N+	davon KM+
> 0	264	101 (38,3%)	83 (31,4%)
≥ 4	258	101 (39,1%)	80 (31,0%)
≥ 10	231	94 (40,7%)	66 (28,6%)
≥ 15	155	69 (44,5%)	46 (29,7%)
≥ 20	81	28 (34,6%)	22 (27,2%)

n = Anzahl der erhobenen Fälle

N+ = positiver axillärer Nodalstatus

KM+ = positiver Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark

Die Anzahl der entfernten Lymphknoten hatte im untersuchten Krankengut nur **geringe** Auswirkungen auf den Anteil der diagnostizierten nodalpositiven und zytokeratinpositiven Fälle. In nahezu 2/5 der Fälle (**n=231**) waren Lymphknotenmetastasen und in nahezu 1/3 dieses Kollektives Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen worden [Tab. 1].

3.1.2. Lymphknotenstatus vs. KM-Status

Tab.1 b) : Zusammenhang zwischen Lymphknoten [LK]-Status und dem Knochenmark [KM]-Status (**n=272**)

	Nodal-Status		Total
	negativ	positiv	
KM-Status negativ	129	60	189
positiv	43 (25%)	40 (40%)	83
Total	172	100	272

Bei negativem Nodalstatus sind mit einer Häufigkeit von 25% Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen, bei positivem Nodalstatus erhöht sich die Nachweisfrequenz panzytokeratinpositiver Zellen auf 40%. Somit ist das Knochenmark im positiven Falle um den Faktor 1,6 häufiger positiv für zytokeratinpositive Zellen.

3.1.3. Histologie vs. KM-Status

In Tabelle 2 werden die Metastasierungsfrequenzen der verschiedenen Mammakarzinome aufgeschlüsselt.

Tab.2 : Zusammenhang der unterschiedlichen histologischen Karzinomtypen mit dem KM-Status (n=268)

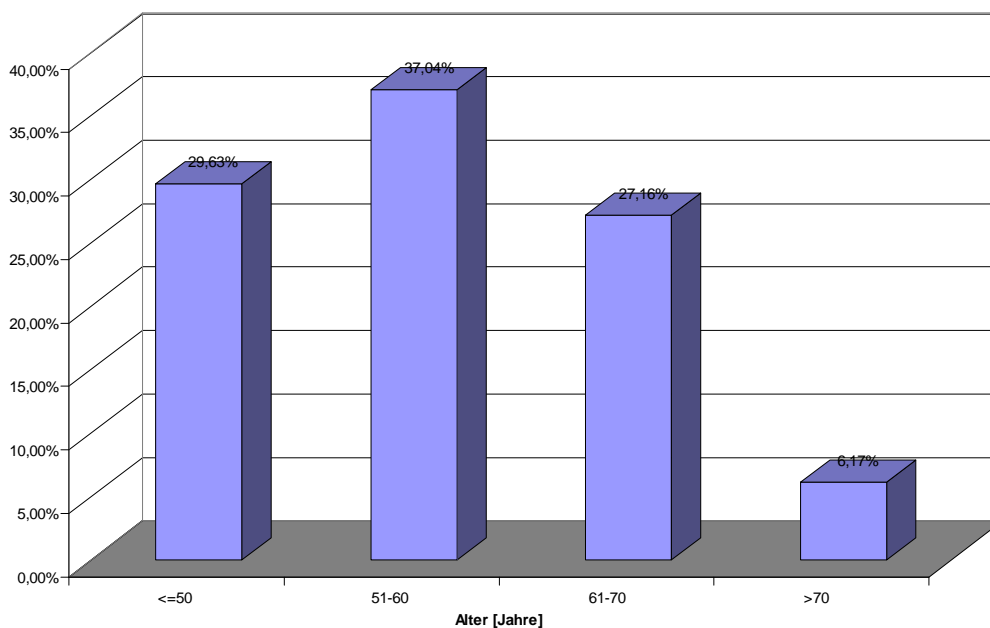
Histologie	n	davon KM+
duktal invasiv	157 (58,6%)	53 (33,8%)
lobulär invasiv	60 (22,4%)	15 (25,0%)
duktal carcinös in situ	19 (7,1%)	3 (15,8%)
duktal + lobulär invasiv	16 (6,0%)	8 (50,0%)
tubulär invasiv	10 (3,7%)	2 (20,0%)
medullär invasiv	5 (1,9%)	2 (40,0%)
neuroendokrin	1 (0,4%)	-

Ein Knochenmarksbefall fand sich bei duktal invasiven Karzinomen [di] in 33,8% der Fälle [davon zwei Fälle mit pT1mic], bei lobulär invasiven Karzinomen [li] in 25,0%. Der prozentual häufigste KM-Befall ergab sich bei gleichzeitigem Vorliegen der beiden erstgenannten Karzinomtypen [di+li] mit 50,0% und beim medullär invasiven Karzinom mit 40,0%. Relativ selten resultierte ein KM-Befall bei tubulär invasiven Karzinomen (tub), dies war interessanterweise auch bei präinvasiven Karzinomen [DCIS] der Fall, mit 20,0 % vs. 15,8%.

In keinem der drei duktaalen Carcinoma in situ zeigten sich befallene Lymphknoten. In zwei dieser DCIS wurden eine relativ hohe Anzahl zytokeratinpositiver KM-Zellen [17 bzw. 10] nachgewiesen, wobei in einem Fall "non in sano" resektiert wurde und im anderen Fall die maximale Tumorgöße bei 8,5 cm lag. Weniger zytokeratinpositive KM-Zellen (n=3) diagnostizierte man in dem übrigen Fall bei einer maximalen Tumorgöße von lediglich 0,5 cm. In beiden erstgenannten Fällen war der Her2/neu-Faktor stark positiv [80% Membranfärbung] und im letztgenannten Fall schwach positiv [10% Membranfärbung].

3.1.4. Alter vs. KM-Status

Abb.2: Häufigkeit zytokeratinpositiver KM-Zellen in Abhängigkeit vom Alter bzw. in verschiedenen Altersgruppen (n=272)



Die Häufigkeit des Knochenmarkbefalls stieg anfänglich mit höherem Alter auf einen Gipfel im Alter von 51-60 Jahren (37,0%) und sank danach unterschiedlich stark ab, besonders stark bei Patientinnen über 70 Jahren (6,2%) [Abb. 2].

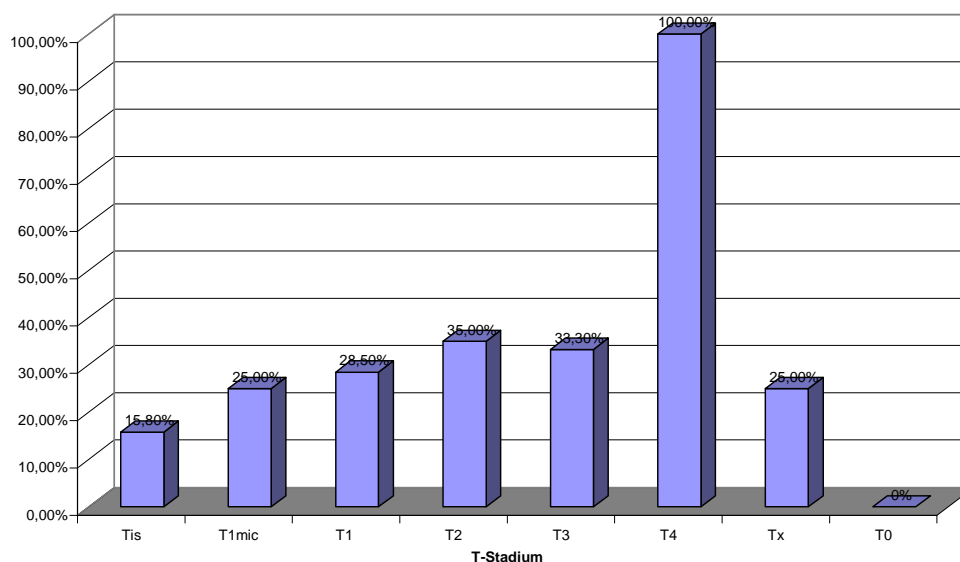
3.1.5. Tumorgröße bzw. Tumorstadium (T-Stadium) vs. KM-Status

In 272 Fällen lag das Tumorstadium vor. Die entsprechende Verteilung kann in Tabelle 3 abgelesen werden. Ihr Zusammenhang mit dem Knochenmarksbefall [KM+] ist aus Tabelle 3 ersichtlich und zudem in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Tab.3 : Verteilung des T-Stadiums und ihr Zusammenhang mit dem Knochenmarkstatus (n=272)

Tumorstadium	n	davon KM+
Tis	19 (7,00%)	3 (15,8%)
T1mic	4 (1,47%)	1 (25,0%)
T1	151 (55,51%)	43 (28,5%)
T2	80 (29,41%)	28 (35,0%)
T3	9 (3,30%)	3 (33,3%)
T4	4 (1,10%)	4 (100%)
Tx	4 (1,47%)	1 (25,0%)
T0	1 (0,37%)	-

Abb.3: Häufigkeit zytokeratinpositiver KM-Zellen in Abhängigkeit vom T-Stadium (n=272)



Die Häufigkeit panzytokeratiner Zellen im Knochenmark [KM] stieg mit zunehmendem T-Stadium von T1mic (25%) bis T2 (35%) an, und sank leicht bei T3-Tumoren auf einen Wert von 33,3%. Patientinnen mit Tumoren die als T4 klassifiziert worden sind, zeigten alle einen Nachweis panzytokeratiner Zellen im KM. Bei 3 (15.8%) von 19 Tumoren im Tis-Stadium ließen sich auch panzytokeratinpositive Zellen im Knochenmark detektieren.

3.1.6. Fokalität vs. KM-Status

Tab.4: Verteilung der Fokalität und ihr Zusammenhang mit dem KM-Status (n=272)

Fokalität	n	davon KM+
unifokal	190	60 (31,6%)
multifokal	82	23 (28,0%)

Plurifokale Tumoren gingen in etwa genauso häufig wie unifokale Tumoren mit einem Knochenmarksbefall einher.

3.1.7. Grading vs. KM-Status

Tab.5: Verteilung des Gradings und sein Zusammenhang mit dem KM-Status (n=272)

Parameter	n	davon KM+
hoch differenziert (G1)	12	3 (25,0%)
mittel differenziert (G2)	180	56 (31,1%)
gering differenziert (G3)	57	21 (36,8%)
DCIS	19	3 (15,8%)
keine Angaben	4	-

Mit zunehmender Differenzierung bzw. ansteigendem Grading zeigte sich ein vermehrter Knochenmarksbefall. Mehr als zwei Drittel aller Tumoren waren als G2 eingestuft worden.

3.1.8. Lymphgefäßdurchbruch vs. KM-Status

Tab.6: Verteilung der Lymphangiosis carcinomatosa und ihr Zusammenhang mit dem KM-Status (n=272)

Parameter	n	davon KM+
Lymphangiosis neg.	232	66 (28,4%)
Lymphangiosis pos.	40	17 (42,5%)

Die Invasion von Tumorzellen in die peritumoralen Lymphgefäße war, wie erwartet, mit einem vermehrten Knochenmarksbefall verbunden. Umgekehrt konnte bei negativem KM-Befall nur in 12,2 % der Fälle eine Lymphangiosis carcinomatosa nachgewiesen werden.

3.1.9. Progesteronrezeptor [Pgr]- bzw. Östrogenrezeptor [Egr]- Status, p53, Mib1/ki67, Her2/neu und bcl2 vs. KM-Status

Tab.7: Verteilung von Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus [PgR bzw. EgR], P53, Mib1/ki67, Her2/neu, bcl2 und ihr Zusammenhang mit dem KM-Status (n=272)

Parameter	n	davon KM+
EgR negativ	47	20 (42,6%)
EgR positiv	225	63 (28,0%)
PgR negativ	92	34 (37,0%)
PgR positiv	160	49 (30,6%)
p53 negativ	130	38 (29,2%)
p53 positiv	135	42 (31,1%)
keine Angaben	7	3
Mib-1 ≤ 20% positiv	166	47 (28,3%)
Mib-1 > 20% positiv	99	34 (34,3%)
keine Angaben	7	2
Her2/neu < 10% positiv	176	26 (14,8%)
Her2/neu ≥ 10% positiv	90	51 (56,7%)
keine Angaben	6	6
bcl-2 negativ	37	8 (21,6%)
bcl-2 positiv	226	71 (31,4%)
keine Angaben	9	4

Ein prozentual deutlich häufiger KM-Befall trat auf wenn der Östrogenrezeptor negativ war, bei negativem Progesteronrezeptor hingegen war der KM-Befall nur leicht erhöht. Bei einem positiven Nachweis von p53, Mib-1 und bcl-2 war der Tumorzellnachweis im Knochenmark etwas häufiger, bei positivem Her2/neu-Status war der KM-Befall besonder stark und übertraf damit sogar den KM-Befall bei positivem Östrogenrezeptorstatus mit 56,76% vs. 42,6%.

3.1.10. Menopausenstatus vs. KM-Status

Tab.8: Verteilung des Menopausenstatus und sein Zusammenhang mit dem KM-Status (n=272)

	Menopausen-Status			Total
	prä	peri	post	
KM-Status negativ	32	51	106	189
positiv	14(30,4%)	22(30,1%)	47(30,7%)	83
Total	46	73	153	272

In allen Stadien der Menopause (prä, peri,post) ist die Nachweisfrequenz für Tumorzellen im Knochenmark in etwa gleich [~30%]. Es ist kein Zusammenhang zwischen Menopausen-Status und KM-Status ersichtlich.

3.2. Nachweis eines Karzinombefalles für ein ausgewähltes Patientengut
 - stationäre-Gruppe (adjuvant) [n=186] und DCIS-Gruppe [n= 24] [Total n=210]

3.2.1. Univariate Analysen

3.2.2. Tab.1 (T -Stadium & Nodal -Status):

X² = 29,14 X²(2; 0,05) =5,9915	T-Stadium			Total
	pT1	pT2	pT3/4	
LK-Status negativ	95	30	0	125
positiv	35	39	8	82
Total	130	69	8	207

X² -Test [nach Pearson] im Gesamtkollektiv: p = 0,000 (signifikant)

Im T-Stadium pT1 trat nur in ca. 1/3 der Fälle ein Lymphknotenbefall ein, beim pT2-Stadium stellte sich einen Befall derselben von bereits > 50% heraus. Alle Patienten mit den Tumorstadien pT3/4 waren nodalpositiv.

Statistik:

Der Chi-Square-Wert beträgt hier 29,14. Um klinisch aussagekräftig zu sein muß dieser Wert mindestens bei **X²(2; 0,0 5) = 5,9915** liegen. **X²** liegt hierbei deutlich über dem genannten Grenzwert. Es besteht daher eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und Nodalstatus und die Aussage hat klinische Relevanz.

3.2.3. Tab. 2 (T -Stadium & KM -Status):

X² = 4, 03 X²(2; 0,05)=5,9915	T-Stadium			Total
	pT1	pT2	pT3/4	
KM-Status negativ	94	49	3	146
positiv	39	20	5	64
Total	133	69	8	210

X² -Test [nach Pearson] im Gesamtkollektiv: p = 0,133 (nicht signifikant)

In den T-Stadien pT1/pT2 waren in weniger als 1/3 der Fälle das Knochenmark tumorzellpositiv, jedoch fanden sich im pT3/4-Stadium bei ca. 60% der Patienten panzytokeratinpositive Zellen im Knochenmark.

Statistik:

Bezüglich eines Tumorzellbefalles im Knochenmark fand sich ein tendentiell höheres Risiko bei großen Tumoren (pT3/4), das aber nicht statistisch signifikant war. Der X²-Wert mit 4,03 lag leicht unter dem Mindestwert von X² (2; 0,0 5) = 5,9915 !

3.2.4. Tab. 3 (Nodal -Status & KM -Status):

X² = X²(1; 0,05)= 3,8415	Nodal-Status		N
	negativ	positiv	
KM-Status negativ	102	44	146
positiv	37	27	64
Total	139	71	210

X² -Test im Gesamtkollektiv: p = 0,262 (nicht signifikant)

Bei positivem Nodal-Status war das Knochenmark wider Erwarten nur zu 42,2% zytokeratinpositiv, wohingegen bei negativem Nodal-Status die Häufigkeit zytokeratinpositiver Tumorzellen im Knochenmark bei 57,8% lag.

Statistik:

Der Chi-Square-Wert mit $\chi^2 = 2,81$ liegt hier erkennbar unter dem Mindestwert von $\chi^2 (2; 0,05) = 5,9915$. Es besteht keine Korrelation zwischen Nodalstatus und KM-Status und die Aussage ist daher nicht klinisch relevant.

3.2.5. Tab. 4 (ALTER & KM -Status):

Z = - 0,553			
Z 0,05 ; zweiseitig = ± 1,9600	KM - Status	N	Mean Rank
ALTER	negativ	146	107,03
	positiv	64	102,00
	Total	210	
Wilcoxon –Test: p = 0,580 (nicht signifikant)			

Am Durchschnitts-Rangwert [Mean-Rank] ist zu erkennen, dass sich die Rangsumme für ein negativen KM-Status gegenüber der für einen positiven KM-Status in Bezug auf das Alter kaum unterscheiden, weil die Gruppen durchschnittlich ähnliche Werte für das Alter aufweisen. Würde das Alter eine klinische Aussagekraft besitzen, müsste bei **zweiseitiger** Fragestellung mit einem Schrankenwert von **1,9600** die Prüfgröße **Z** oberhalb von **Z 0,05 = 1,9600** und unterhalb von **Z 0,05 = - 1,9600** liegen. Somit ist keine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und dem KM-Status anzunehmen.

3.2.6. Tab. 5 (ER -Status & KM -Status):

X² = 0, 883 X² (1; 0,0 5) =3,8415	ER		Total
	negativ	positiv	
KM -Status negativ	18	128	146
positiv	11	53	64
Total	29	181	210
X² -Test im Gesamtkollektiv: p = 0,348 (nicht signifikant)			

Bei einem negativem Wert für den Östrogenrezeptor [ER] sind ca.1/3 der Patienten tumorzellpositiv, andererseits sind bei positivem ER-Wert sogar nur knapp 30% des Kollektives tumorzellpositiv.

Statistik:

Der Chi-Square-Wert beträgt 0,883. Um klinisch aussagekräftig zu sein, müsste dieser mindestens bei **X² (1; 0,0 5) = 3,8415** liegen. Somit zeigte der Östrogenrezeptorstatus keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit einem Knochenmarksbefall.

3.2.7. Tab. 6 (PR -Status & KM -Status):

X² = 0, 839 X² (1; 0,0 5) =3,8415	PR		Total
	negativ	positiv	
KM -Status negativ	41	105	146
positiv	22	42	64
Total	63	147	210
X² -Test im Gesamtkollektiv: p = 0,360 (nicht signifikant)			

Genauso wie für den ER-Status sind, bei einem negativem Wert für den Progesteronrezeptor (PR), ca. 1/3 der Patienten tumorzellpositiv. Andererseits sind bei positivem PR-Wert sogar nur knapp 30% des Kollektives tumorzellpositiv.

Statistik:

Der Chi-Square-Wert beträgt 0,839. Um klinisch aussagekräftig zu sein, müsste dieser mindestens bei $\chi^2(1; 0,05) = 3,8415$ liegen. Somit zeigte auch der Progesteronrezeptorstatus keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit einem Knochenmarksbefall.

3.2.8. Tab.7 (Her2/Neu -Status & KM -Status):

$\chi^2 = 6,756$ $\chi^2(1; 0,05) = 3,8415$	KM - Status		Total
	negativ	positiv	
Her2-Status negativ	115	40	155
positiv	32	23	55
Total	147	63	210

χ^2 -Test im Gesamtkollektiv: $p = 0,009$ (signifikant)

Bei Patienten mit negativem Her2-Parameter sind lediglich ca. 1/4 der Patienten tumorzellpositiv. Hingegen sind Patienten mit positivem Her2-Parameter fast doppelt (42%) so oft von Tumorzellen befallen. Ein negativer Parameter spricht eher für einen negativen TZ-Nachweis, wobei bei einem positivem Parameter ein Knochenmarksbefall wahrscheinlich ist, da annähernd die Hälfte der Patienten tumorzellpositiv sind.

3.2.9. Tab. 8 (bcl 2 -Status & KM -Status):

X² = 3, 287 X²(1; 0,0 5) = 3,8415	Bcl 2		Total
	negativ	positiv	
KM -Status negativ	22	118	140
positiv	4	58	62
Total	26	176	202

X² -Test im Gesamtkollektiv: p = 0,070 (nicht signifikant)

Bei negativem bcl 2 -Status sind nur 15,4 % des Kollektives von Tumorzellen befallen, bei einer positiven Variable steigt die Anzahl der Fälle mit Knochenmarksbefall auf ungefähr das Doppelte (33%). Bezüglich eines Tumorzellbefalles im Knochenmark fand sich ein tendentiell höheres Risiko bei positivem bcl 2 -Wert , welcher jedoch nicht statistisch signifikant war. Der X² -Wert mit 3, 287 lag leicht unter dem Mindestwert von X² (1; 0,0 5) mit 3, 8415 !

3.2.10. Tab. 9 (Lymphangiosis & KM -Status):

X² = 0, 189 X²(1; 0,0 5) =3,8415	Lymphangiosis		Total
	negativ	positiv	
KM -Status negativ	124	22	146
positiv	52	11	63
Total	176	33	209

X² -Test im Gesamtkollektiv: p = 0,663 (nicht signifikant)

Bei einem negativem Lymphgefäßbefall [LC] ist zu 30 % der Tumorzell [TZ]-nachweis positiv. Ist der Wert für LC positiv ist gleichfalls mit genau 33 % der TZ-Nachweis auch positiv.

Unabhängig vom Zustand der Lymphgefäße lässt sich keine klinisch relevante Aussage in Bezug auf einen Knochenmarksbefall ableiten.

Statistik:

Der Chi-Square- Wert beträgt 0,19. Relevant wäre ein Wert für χ^2 von größer oder gleich $\chi^2 (1; 0,05)$ mit **3,8415** gewesen.

3.2.11. Tab. 10 (p53 -Status & KM -Status):

$\chi^2 = 1,60$ $\chi^2(1; 0,05) = 3,8415$	P 53		Total
	negativ	positiv	
KM -Status negativ	118	26	144
positiv	46	16	62
Total	164	42	206

χ^2 -Test im Gesamtkollektiv: $p = 0,205$ (nicht signifikant)

Bei negativem p53 -Wert ist zu 30% der TZ-Nachweis negativ. Ist dieser Wert positiv, steigt die Frequenz eines TZ- Befalls mit 40 % etwas an. Sowohl bei negativem als auch bei positivem p53-Wert ist in mehr als 60% der Fälle das Knochenmark panzytokeratinnegativ.

Statistik:

Der Chi-Square- Wert beträgt 1,60. Relevant wäre ein Wert für χ^2 von größer oder gleich $\chi^2 (1; 0,05)$ mit **3,8415** gewesen.

3.2.12. Tab. 11 (Tumorgröße [cm] & KM -Status):

Z = - 0,168			
Z 0,05 ; zweiseitig = ± 1,9600	KM - Status	N	Mean Rank
Max. Tumorgröße	negativ	146	105,03
	positiv	64	106,56
	Total	210	
Wilcoxon –Test: p = 0,867 (nicht signifikant)			

Am Durchschnitts-Rangwert (Mean-Rank) ist zu erkennen, dass sich die Rangsumme für einen negativen KM-Status gegenüber der für einen positiven KM-Status in Bezug auf die Tumorgröße kaum unterscheiden, weil die Gruppen durchschnittlich ähnliche Werte für die Tumorgröße aufweisen.

Würde die Tumorgröße eine klinische Aussagekraft besitzen, müsste bei **zweiseitiger** Fragestellung mit einem Schrankenwert von **1,9600** die Prüfgröße **Z** oberhalb von **Z 0,05 = 1,9600** und unterhalb von **Z 0,05 = - 1,9600** liegen. Somit ist keine Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem KM-Status ersichtlich.

3.2.13. Tab. 12 (Menopausen-Status & KM-Status):

X² = 1,32	Menopausen-Status			
X²(2; 0,05) = 5,9915	prä	peri	post	Total
KM -Status negativ	25	36	85	146
positiv	7	17	40	64
Total	32	53	125	210
X² -Test [nach Pearson] im Gesamtkollektiv: p = 0,517 (nicht signifikant)				

In der prämenopausalen sowie in der perimenopausalen Phase ist zu 22% das Knochenmark positiv für Tumorzellen, und in der postmenopausalen Phase ist mit 32% ein leichter Anstieg der Häufigkeit eines Tumorzellnachweises in diesem Kompartiment festzustellen.

Es läßt sich erkennen, daß in allen Phasen der Menopause die Wahrscheinlichkeit eines positiven KM-Statuses relativ gering ist.

Statistik:

Der Chi-Square- Wert beträgt 1,32. Bedeutsam wäre ein Wert für χ^2 von größer oder gleich $\chi^2(2; 0,05)$ mit **5,9915** gewesen.

IV. Diskussion

Trotz früherer und besserer Operationsmöglichkeiten sowie systemischer Behandlungsmöglichkeiten die im Laufe der letzten Jahrzehnte in die klinische Routine eingeführt wurden verbleibt eine Restmortalität, die als Folge der unheilbaren systemischen Metastasierung immer noch viele Menschenleben fordert. Als detektierbares Korrelat dieser zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits vorliegenden systemischen Streuung gilt die okkulte Tumorzell dissemination im Knochenmark, welche mit konventionellen histopathologischen Stagingmethoden sowie bildgebenden Stagingmodalitäten nicht nachzuweisen ist.

Ein besseres Verständnis dieser Tumorzell dissemination könnte zu neuen Therapieansätzen führen. Voraussetzung hierfür ist eine Einordnung des KM-Status in die Gesamtbiologie des Tumors, d.h. eine Zuordnung zu den bekannten histopathologischen und biologischen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms.

4.1.1. Lymphknotenstatus (LK-Status) vs. Knochenmarksstatus (KM-Status)

Unter allen Faktoren, die eine Vorhersage über das rezidivfreie und das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom treffen, ist der Stellenwert des Nodalstatus für eine entsprechende Therapieentscheidung am wichtigsten und wird allgemein als signifikanter Prädiktor gewertet (*Davies et al. 1980; Fisher et al. 1981; Ahlgren et al. 1994; Petrek 1994; Fehr et al. 1995; Recht, Houlihan 1995*). Allerdings erleiden selbst Patienten im nodalnegativen Zustand nicht selten Fernmetastasen. Es ist daher angebracht nach weiteren Prognosefaktoren wie z.B. dem KM-Status zu forschen, die uns zusätzliche Informationen über das jeweilige Patientenrisiko geben.

4.1.2. Bedeutung der Anzahl entfernter Lymphknoten

Bei einer Axilladisektion sollte eine ausreichende Anzahl von Lymphknoten entfernt werden, um eine relativ sichere Angabe über den Istzustand des Nodalstatus und möglicherweise auch des KM-Status zu erhalten. Die Mindestanzahl zu entfernender bzw. zu untersuchender Nodi wurde in der Literatur oft kontrovers diskutiert, die heutigen Empfehlungen sehen vor mindestens zehn Lymphknoten zu resektieren. *Nach Fisher et al. (1981)* ist die Anzahl für eine qualitative Aussage [N-/N+] unerheblich, für eine quantitative Aussage hingegen müssten mindestens zehn Nodi entfernt werden. Für einen negativen LK-Status hat sich die Stellung der Diagnose durch den Sentinel-Lymphknoten bereits etabliert [pN sent negativ = pNO] (*Konsensusdiskussion, St. Gallen 2003*). Die eigenen Untersuchungsergebnisse [3.1.1 Tab.1] zeigten keine wesentlichen Unterschiede für einen positiven Nodalstatus bei der Entfernung von mindestens einem, vier, 10, 15 oder 20 Lymphknoten und es ließ sich dabei auch kein relevanter Einfluß auf den KM-Status erkennen. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß es offenbar tumorindividuelle Faktoren gibt, die eine Einschätzung des KM-Status auch ohne Kenntnis einer pathologischen Untersuchung des Knochenmarks mittels immunhistochemischer Analyse von KM-Aspiraten erlauben. In der deskriptiven Auswertung der Ergebnisse zeigten sich zahlreiche aus unserer Sicht biologisch sinnvolle Korrelationen, so war z.B. für folgende Prüfgrößen ein Zusammenhang bezüglich eines KM-Befalles festzustellen:

- *Her2/Neu-Status*
- *Lymphknotenstatus*
- *Lymphangiosis carcinomatosa*
- *Tumorgrading / -stadium*
- *Östrogenrezeptorstatus*

In der univariaten Analyse für ein Subkollektiv der Patienten erwies sich lediglich der Her2/Neu-Status ($p= 0,009$) als Variable mit statistischer Signifikanz.

4.2. Einfluss des Lymphknotenstatus auf den KM-Status

Wie bereits oben angesprochen ist der prognostische Aussagewert des axillären LK-Status bezüglich krankheitsfreiem und Gesamtüberleben nach wie vor als Standardgröße anzusehen.

In den eigenen Untersuchungen zeigten im heterogenen Gesamt Kollektiv 25% der nodalnegativen und 40% der nodalpositiven Patienten Tumorzellen im Knochenmark. Dies zeigt einen klaren Zusammenhang dieser beiden Variablen. Dieser Sachverhalt ließ sich jedoch an einem Subkollektiv der Patienten in der univariaten Analyse ($p= 0,262$) nicht bestätigen [3.2.1 Tab.3]. Da sich das Subkollektiv nur aus der adjuvant behandelten Gruppe ($n=186$) und aus dem DCIS-Kollektiv ($n=24$) zusammensetzt, läßt sich der scheinbare Widerspruch möglicherweise erklären. Lediglich 0,024% der DCIS-Patienten waren nodalpositiv, aber 20,8% davon panzytokeratinpositiv. Zudem waren 47,8% der nicht einbezogenen neoadjuvanten Patienten ($n=46$) KM-positiv und 41,3% dieser nodalnegativ. Somit besteht, unter Berücksichtigung der Verhältnisse in der DCIS-Gruppe, eindeutig ein Zusammenhang der beiden Variablen bezogen auf das Gesamtkollektiv.

Mehrere Untersucher (*Berger et al. 1988; Deamaley et al. 1991; Diel et al. 1992; Diel et al. 1996; Funke et al. 1996; Landys et al. 1998; Mansi et al. 1999; Diel, Cote 2000; Braun et al. 2000 b; Gebauer et al. 2001; Gerber et al. 2001; Naume et al. 2001; Solomayer et al. 2001*) zeigten diesen Zusammenhang auch auf, wengleich es jene Gruppen gab (*Schlimock et al. 1987; Kirk et al. 1990; Salvadori et al. 1990; Cote et al. 1991; Harbeck et al. 1994; Menard et al. 1994; Molino et al. 1997a; Molino et al. 1999; Janni et al. 2000*) die dieses nicht feststellten.

4.3. Einfluss des Alters auf den KM-Status

Für das Alter konnte bei einem Altersintervall von 51-60 Jahren mit 37% ein noch häufiger KM-Befall im Vergleich zu den unter 51-jährigen [29,6%] bzw. über 60-jährigen [27,2%] und insbesondere gegenüber älteren Patienten [>70 Jahre] festgestellt werden, der jedoch nicht relevant zu sein scheint. Es muß beachtet werden, dass sich der größte Teil unserer Patienten 85/272 [31,3%] gerade im Altersbereich von 51-60 Jahren befand und ein relativ kleiner Anteil davon [14%] älter als 70 Jahre war [siehe Abb.1]. Auch die univariate Analyse der Daten für das Subkollektiv der Patienten erbrachte statistisch kein signifikant erhöhtes Risiko eines Knochenmarkbefalls ($p=0,580$).

4.4. Einfluss des Menopausenstatus auf den KM-Status

Auch der Menopausenstatus wird in der Literatur als ein bedeutender Prognosefaktor beschrieben. Ein prämenopausaler Erkrankungsbeginn soll mit einer gesteigerten Rezidivfrequenz sowie reduziertem Gesamtüberleben verbunden sein (*Kroman et al. 2000*).

In unserem Krankengut zeigten 30,4% der prä-, 30,2% der peri- und 30,7% der postmenopausalen Patienten einen positiven KM-Status. Die statistische Auswertung für das Subkollektiv erbrachte auch keine Korrelation dieser Variablen ($p=0,517$). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten ähnliche Ergebnisse (*Harbeck et al. 1994; Molino et al. 1997; Mansi et al. 1999; Janni et al. 2000; Gerber et al. 2001*), lediglich eine Untersuchung konnte eine Signifikanz zwischen Menopausenstatus und KM-Befall feststellen (*Diel et al. 1996*). Überraschenderweise wiesen dabei postmenopausale Patienten signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auf.

4.5. Einfluss der Tumorgröße bzw. des Tumorstadiums auf den KM-Status

Die Tumorgröße wird in der Literatur überwiegend als signifikanter Prognosefaktor gewertet, denn eine große Tumorausdehnung führt zum gehäuften Auftreten axillärer Lymphknotenmetastasen und einer verkürzten rezidivfreien bzw. Gesamtüberlebenszeit (*Volpi et al.2000*). Es wäre daher denkbar, dass dieser Umstand auch mit einem häufigem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark einhergeht. In den eigenen Untersuchungen zeigten 28,5% der Patienten mit Tumoren < 2cm [T1] einen positiven KM-Status, während 35,3% bzw. 33,3% der Patienten bei großen Primärtumoren [T2,T3] einen Befall aufwiesen. In allen T4-Fällen (100%) zeigte sich ein KM-Befall.

Im Gegensatz dazu fanden *Diel et al. (1996)* bei zunehmender Tumorgröße signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, so stiegen die Detektionsraten von 30% bei T1-Fällen bis 75% bei T4-Fällen. In weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet gab es Arbeitsgruppen (*Cecchi et al.1988; Franklin et al. 1996; Fox et al.1997; Mansi et al. 1999; Braun et al. 2000 b; Naume et al. 2001; Solomayer et al. 2001*) die diesen Zusammenhang bestätigten und jene Arbeitsgruppen (*Berger et al. 1988; Dearnaley et al. 1991; Schlimock et al. 1991; Harbeck et al. 1994; Janni et al. 2000; Landys et al. 1998; Menard et al. 1994; Molino et al.1997a; Braun et al.2001*) die keine Signifikanz für diesen Parameter feststellten.

Diel et al. (1996) und *Solomayer et al. (1997)* weisen auf die besondere Bedeutung eines Tumorzellnachweises im Knochenmark bei Patienten mit kleinen Primärtumoren hin, weil hiermit eine frühe hämatogene Zellaussaat und somit eine spätere Metastasierung erfasst und Risikopatienten erkannt werden könnten. Sie zeigen den guten prognostischen Wert dieser Zellen in diesem Patientenkollektiv bezüglich der Entwicklung von Fern- bzw. Knochenmetastasen. Auch eine aktuellere Studie von *Wiedswang et al. (2005)* weist auf einen unabhängigen Prognosewert eines Tumorzellnachweises im Knochenmark in frühen Stadien des Brustkrebses hin.

Der Großteil unserer Patienten 155/272 (57%) befand sich im T1/T1mic-Stadium, davon wiesen 28,4% der Patienten einen KM-Befall auf. Diese Gegebenheit erwies sich für das Subkollektiv in der statistischen Analyse als nicht signifikant. *Solomayer et al. (1998a)* erwähnen, dass nur einige zirkulierende Tumorzellen fähig sind Metastasen zu setzen und nur ein Indikator des metastatischen Potentials der Disseminierung sind. Das Auffinden derselben im Knochenmark repräsentiert nur eine Vorstufe in der Kaskade der Metastasierung und ist nicht gleichzusetzen mit Mikrometastasen (*Diel et al. 1992a, 1996; Solomayer et al. 1997*).

4.6. Einfluss des Tumorgradings auf den KM-Status

Für niedrig - bzw. undifferenzierte Tumoren ist allgemein bekannt, dass diese ein aggressives Wachstum aufweisen und deshalb für eine schlechtere Prognose sprechen. Etwa 60% aller Tumoren werden bekanntlich aber, aufgrund einer subjektiven Beurteilung, in ein mittleres Grading (G2) eingestuft (*Bässler 1998, Kreienberg et al. 2002*).

In unserem Gesamtkollektiv wurden 66,2% [180/272] aller Tumore als G2 eingestuft. Wenn man die G2-Gruppe nicht mit in die Kalkulation einbezieht ergibt sich folgendes Bild: bei G1-Tumoren stellte sich mit einer Frequenz von 25,0% und bei G3-Tumoren mit einer Frequenz von 36,8% ein Tumorzellbefall des Knochenmarks heraus. Das bedeutet, dass bei schlecht differenzierten G3-Tumoren scheinbar das Knochenmark signifikant häufiger positiv für disseminierte Zellen ist. Wie nicht anders zu erwarten, gibt es einige Arbeitsgruppen (*Diel, Cote 2000; Gerber et al. 2000; Solomayer et al. 2001*) die zum selben Ergebnis kamen und andere die keine Signifikanz aufzeigen konnten (*Harbeck et al. 1994; Molino et al. 1997a; Janni et al. 2000*). In einer aktuelleren Studie von *Becker et al. 2006* wurden bei 93 von 112 Patienten (83%) disseminierte Tumorzellen zu Beginn einer systemischem chemo-/endokrinen Therapie im Knochenmark gefunden. In der

Nachbeobachtungszeit der Fälle, nach einer Operation und Fertigstellung der adjuvanten Chemotherapie, fiel die Positivrate auf 24%. Ein positiver Knochenmarkstatus während der Nachbeobachtung korrelierte nur mit dem Grading ($p = 0,020$).

4.7. Einfluss des Lymphgefäßdurchbruches auf den KM-Status

Die vaskuläre bzw. lymphatische Invasion als tumorabhängiger Faktor wurde bisher nicht für die Beurteilung des Erkrankungsrisikos eingesetzt und fand daher keine Anwendung für die routinemäßige Entscheidung über eine systemische adjuvante Therapie.

Seit der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2005 werden die Gefäßinvasion und der HER-2/Neu-Status ebenfalls zu den gesicherten Prognosefaktoren gezählt. Invasionen in benachbarte Blut- und Lymphgefäße sind mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert und gehen deshalb in die Risikoklassifizierung nodal-negativer Patientinnen mit ein (*Goldhirsch et al. 2005*).

In unserem Gesamtkollektiv war für die Lymphangiosis carcinomatosa im positiven Fall mit 42,5% vs. 28,4% im negativen Fall eine Korrelation mit dem Knochenmarksbefund nicht zu übersehen. Dieser Sachverhalt deckt sich jedoch nicht mit dem Ergebnis der univariaten Analyse für das Subkollektiv ($p=0,663$). Vermutlich liegt dies daran, dass sich das Subkollektiv unter anderem aus der DCIS-Gruppe zusammensetzte bei der keine Fälle von Lymphgefäßbeteiligung vorlagen, jedoch in drei Fällen das Knochenmark positiv war. Zudem wies die neoadjuvant behandelte Gruppe die nicht zum Subkollektiv zählte zahlreiche Fälle einer vorliegenden Lymphangiosis carcinomatosa sowie häufig einen Tumorzellbefall im Knochenmark auf.

4.8. Einfluss des Hormonezeptorstatus auf den KM-Status

In der Literatur wird auf den klinisch relevanten Stellenwert des Östrogen- und/oder Progesteronrezeptors bezüglich der Gesamtüberlebenszeit hingewiesen (*Fisher et al. 1988; Foekens et al. 1989; Mc Guire 1990; Rutsch 1995; Clark 1996*).

Der Östrogenrezeptorstatus hat einen prädiktiven Wert, damit kann der Nutzen einer adjuvanten Therapie bewertet werden. Östrogenrezeptornegative Tumore sprechen im Gegensatz zu rezeptorpositiven kaum auf eine endokrine Therapie an. Durch den Progesteronrezeptor kann zudem die Aussagekraft des Östrogenrezeptors hinsichtlich einer erfolgreichen endokrinen Therapie besser eingeschätzt werden.

Unsere Ergebnisse für den Östrogenrezeptor[ER] -Status zeigen, dass ein negativer ER -Status scheinbar für ein erhöhtes Risiko eines Tumorzellbefalls spricht, da hier 42% der negativen Fälle tumorzellpositiv und 72% der positiven Fälle frei von Karzinomzellen waren. Für den Progesteronrezeptor [PR] -Status ließ sich aus den Häufigkeitsverteilungen kein Zusammenhang mit dem KM-Status herauslesen. *Mansi et al. (1987, 1999)* sowie *Gerber et al. (2001)* wiesen gleichfalls bei negativem Hormonrezeptorstatus signifikant häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nach. *Naume et al. (2001)* zeigten diesen Zusammenhang zu nodalnegativen Patienten, während der Hormonrezeptorstatus keinen Einfluss auf den Knochenmarkbefund hatte. Zahlreiche weitere Arbeitsgruppen kamen jedoch zu anderen Ergebnissen (*Berger et al. 1988; Dearnaley et al. 1991; Harbeck et al. 1994; Diel et al. 1996; Molino et al. 1997a, 1999; Diel, Cote 2000; Solomayer et al. 2001*).

4.9. Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 auf den KM-Status

Das p53-Gen ist ein Wachstumsinhibitor welches für ein nukleäres Protein kodiert das praktisch in geringen Mengen in allen Zellen gefunden wird. Mutationen im Bereich des Tumorsuppressorgens p53 führen zu einem inaktiven Suppressorprotein das sich immunhistochemisch nachweisen lässt. Das mutierte p53 ist im Gegensatz zum Wildtyp-p53-Gen dann nicht mehr in der Lage eine Reparatur geschädigter Erbsubstanz zu bewirken, die Folge ist eine maligne Transformation (*Bernstein et al. 1999*).

Nach *Allred et al. 1994* korreliert ein positiver p53-Status mit einer hohen S-Phasen - Fraktion, großen Primärtumoren und einem negativem Hormonrezeptorstatus.

An unserem heterogenen Gesamtkollektiv [Tab.7] konnte aus den Häufigkeitsverteilungen als auch in der univariaten Analyse im Subkollektiv ($p=0,205$) kein Indiz für einen Zusammenhang des p53-Gens mit einem KM-Befall erbracht werden.

Zum gleichen Ergebnis kommen auch *Gerber et al.(2001)* sowie *Naume et al.(2001)* die auch keine Signifikanz für diese beiden Variablen erkannten. *Fehm et al. 2004* zeigten in ihrer Studie an 202 KM-positiven Patienten einen multivariat signifikanten Einfluß von p53 für eine Knochenmarkbeteiligung.

4.10. Einfluss der bcl-2-Expression auf den KM-Status

Das bcl-2 ist ein Protein, welches sich auf der Mitochondrienmembran befindet und zu den Protoonkogenen zählt. Als Apoptoseinhibitor wirkt es protektiv gegen exogene Zellschäden (*Reed 1994*).

Das Genprodukt von bcl-2 ist in ca. 70 % der Mammakarzinome positiv und korreliert mit Hormonrezeptorpositivität, einer niedrigen Proliferationsrate und dem Fehlen von p53. Die Expression von bcl-2 läßt sich charakteristischerweise bei langsam proliferierenden, gut differenzierten, rezeptorpositiven Mammakarzinomen nachweisen (*Henderson, Patek 1998*).

Für die bcl-2-Expression ließ sich weder aus den Häufigkeitsverteilungen für das Gesamtkollektiv noch in der univariaten Analyse für das Subkollektiv ($p= 0,070$) eine Korrelation mit dem KM-Status feststellen.

4.11. Einfluss der Her2/Neu-Expression auf den KM-Status

Das Her2/Neu-Molekül ist ein Protein das in die Zellmembran eingefügt ist und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor ähnelt. In ca. 30-40% der Mammakarzinome ist eine Überexpression [2-40 fach] dieses Proteins, verbunden mit besonders aggressivem Wachstum und verkürztem Gesamtüberleben feststellbar (*Bernstein et al. 1999*).

Einige Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der Überexpression des Her2/Neu-Proteins und frühen Stadien der Brustkrebsentstehung für verschiedene histologische Arten des Primärtumors und vermuten daher eher eine Rolle dieses Proteins am Initiierungs- als am Progressionsprozeß der Tumorgenese (*Slamon et al. 1989; Allred et al. 1992*).

Unser Gesamtkollektiv enthielt 90 Patienten (33,1%) mit einer Her2/Neu-Überexpression, davon waren 51 Patienten (56,7%) tumorzellpositiv im Knochenmark. Dieser klare Zusammenhang für die beiden Parameter erwies sich zudem in der univariaten Analyse am Subkollektiv als statistisch signifikant ($p=0,009$). Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch die Arbeitsgruppen um *Naume et al. (2001)*, *Fehm et al. (2004)* und *Becker et al. (2006)*, wohingegen *Gerber et al. (2001)* gegensätzliches feststellten.

V. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt bei vielen Erkrankten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine systemische Erkrankung dar, deshalb bleiben selbst nodalnegative Patienten von einem späteren Fernrezidiv nicht verschont.

Diese Patienten im T1N0M0-Stadium haben eigentlich eine sehr gute Überlebensprognose und bedürfen nicht in jedem Fall einer adjuvanten Therapie, jedoch eine kleine Subgruppe dieses Kollektives entwickelt ein Rezidiv.

Eine frühzeitige hämatogene, evtl. lymphogene Tumorzell dissemination scheint dabei eine herausragende Rolle einzunehmen. Diese "Fremdzellen" können im Knochenmark als geeignetem Kompartiment durch Immunzytologie und FISH analysiert werden.

Gegenstand dieser Arbeit war zu überprüfen ob histopathologische und biologische Prognosefaktoren eine Auskunft über den Istzustand des Knochenmarks bezüglich eines Tumorzellbefalles geben können und ob bzw. inwieweit klassische adjuvante Behandlungsmaßnahmen Einfluß auf die Anzahl zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark haben. Die Untersuchung des KM-Status als möglicher neuer prognostischer und prädiktiver Faktor soll dazu beitragen, zusätzliche Informationen über das jeweilige Patientenrisiko zu erhalten um insbesondere bei nodalnegativen Brustkrebserkrankten effektivere individuelle Therapieentscheidungen zu treffen.

In unserer Untersuchung wurden retrospektiv die Daten von 310 Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren und sich zur primären operativen Therapie, bzw. zur Nachsorge nach einer auswärts durchgeführten Operation vorgestellt hatten, analysiert. Zur Detektion zytokeratinpositiver Zellen wurde ein monoklonaler Panzytokeratin-Antikörper der spezifisch für CK 8,18,19 ist verwendet. Als Nachweisystem diente die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase = APAAP).

272 Patienten gingen in die Beurteilung ein. Zur besseren Beurteilung der Falldaten wurde das Gesamtkollektiv in vier folgende Untergruppen aufgeteilt:

1. stationäre Gruppe (adjuvant) n=186,
2. stationäre Gruppe (neoadjuvant) n=46,
3. ambulante Gruppe n=16,
4. DCIS – Gruppe n=24.

Ein definiertes Subkollektiv dieser Patienten bestehend aus der adjuvant behandelten Gruppe und der Gruppe mit In situ-Tumoren (DCIS-Gruppe) wurde näher untersucht. 31,25% der Patienten (85/272) im heterogenen Gesamtkollektiv wiesen bei Diagnosestellung Tumorzellen im Knochenmark auf, davon entfallen 70,6 % (60/83) auf das Subkollektiv (n=210). Dieser hohe Befall deutet darauf hin, dass übliche adjuvante Behandlungsmaßnahmen nicht in der Lage sind zytokeratinpositive Zellen wirkungsvoll aus dem Knochenmark zu entfernen. Zudem zeigte sich in drei Fällen in der DCIS-Gruppe ein positiver KM-Status, welcher vermutlich auf einen Falschbefund zurückzuführen ist.

Ein positiver KM-Status ließ sich im Gesamtkollektiv anhand der Häufigkeitsverteilungen in Abhängigkeit des *Lymphknotenstatus*, des *Tumorstadiums*, des histologischen *Gradings*, der *Lymphangiosis carcinomatosa* des *Östrogenrezeptorstatus* und des *Her2/Neu-Status* beobachten. Dieser Sachverhalt zeigte sich in der statistischen Analyse jedoch nicht als signifikant.

In der univariaten Analyse für das Subkollektiv wird eine Abhängigkeit der Prognosefaktoren [**T-Stadium, Nodalstatus, Alter, Steroidhormonrezeptorstatus, Her2/Neu-Status, bcl2-Status, Lymphangiosis carcinomatosa, p53-Status, max. Tumorgröße, Menopausen-Status**] nur für den *Her2/Neu-Status* bestätigt, eine Korellation des *T-Stadiums* konnte nur für den Lymphknotenstatus ($p=0,000$), nicht jedoch für den KM-Status erbracht werden ($p=0,133$). Bei größeren Tumoren (pT3/4) fand sich aber ein tendentiell höheres Risiko für einen positiven KM-Status.

Die Gegenwart von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten zeigte sich hierbei als ein unabhängiger prognostischer Faktor. Gemischte duktal-lobulär invasive Tumore (50%), duktale (33.8%) und medulläre Tumore (40%) führten häufiger zu einem KM-Befall als andere

histologische Typen. Außerdem zeigte sich bei ausreichender Anzahl entfernter Lymphknoten (≥ 10) eine erhöhte Nachweisfrequenz zytokeratinpositiver KM-Zellen bei nodalpositiven (40%) gegenüber nodalnegativen (25%) Patientinnen. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass bei negativem Östrogenrezeptorstatus eine Vielzahl des Gesamtkollektives (42%) panzytokeratinpositiv ist.

Epitheliale Zellen im Knochenmark scheinen ein Indikator einer hämatogenen Streuung zu sein und könnten Ziele für zusätzliche adjuvante Therapien werden. Bei der Analyse der Tumorhistologie überrascht es daher nicht, dass zahlreiche Arbeitsgruppen, zu denen auch die unsere zählt, einen Zusammenhang von isolierten Tumorzellen im Knochenmark mit tumorabhängigen Faktoren und zum Teil negativem Hormonrezeptorstatus gefunden haben, also ungünstigen Eigenschaften des Primärtumors. Eine weitere Charakterisierung des Primärtumors und insbesondere der isolierten Tumorzellen könnte klären, welche tumorbiologischen Faktoren eine hämatogene Dissemination begünstigen und welche Eigenschaften hierbei weitergegeben, verloren oder neu erworben werden.

VI. Literaturverzeichnis

Agrup M, Stal O, Olsen K, Wingren S. (2000) :

C-erbB-2 overexpression and survival in early onset breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 63(1):23-9.

Alexander P. (1985) :

Do cancers arise from a single transformed cell or is monoclonality of tumours a late event in carcinogenesis?
Br J Cancer 51(4): 453-457.

Bässler R, Bocker W, Hermanek P, Pickartz H, Prechtel K, Schauer A, Schnurch HG, Stegner HE. (1992) : Current status of grading in breast cancer
Pathologe. 13(3): 130-4.

Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. (2006) :
Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy.
Breast Cancer Res Treat. 97(1):91-6.

Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. (2005) :
Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients.
Anticancer Res. 25(3B):2171-5.

Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easten D, Coombes RC, Neville AM. (1988):
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

Bernstein JL, Lopez-Carrillo L, Wang L. (1999) :

The epidemiology of Her-2/neu and P53 in breast cancer.
Salud Publica Mex. 41 Suppl 2: S114-23. Review.

Bloom HJG, Richardson WW. (1957) :

Histologic grading and prognosis in breast cancer.
Br J Cancer 11: 359-377

Blot WJ, Fraumeni JF, Stone BJ. (1977) :

Geographic patterns of the breast cancer in the United States.
J. Natl. Cancer Inst. 59: 1407

Body JJ. (2001) :

Bisphosphonates in the treatment of metastatic breast cancer.
J Mammary Gland Bioi Neoplasia. 6(4): 477-85. Review.

Body JJ, Bartl R, Burckhardt P, Delmas PD, Diel IJ, Fleisch H, Kanis JA, Kyle RA, Mundy GR, Paterson AH, Rubens RD. (1998) :

Current use of bisphosphonates in oncology. International Bone and Cancer Study Group.
J Clin Oncol. 16(12):3890-9. Review.

Borgen E, Naume B, Nesland JM et al. (1999) :

Standardisation of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood: *I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells.*
Cytotherapy. 1: 377-388.

Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI. (1989) :

Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations.
Br J Cancer. 59 (6):943-7

Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F. (2001) :

Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of nodenegative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy.
J Clin Oncol. 19: 1468-1475.

Braun S, Kantenich CRM, Janni W, Hepp F, de Waal J, Wiligeroth F, Sommer HL (2000 a) :

Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients.
J Clin Oncol. 18: 80-86.

Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmüller G, Pantel K (1998) :

Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.
J Natl Cancer Inst 90(14): 1099-1101. Review.

Braun S, Pantel K., Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller R, Schlimok G. (2000 b):

Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer.
N Engl J Med 342: 525-533.

Braun S, Vogl FD, Janni W, Marth C, Schllmok G, Pantel K. (2003 a) :

Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy.

Breast. 2003 Dec;12(6):397-404. Review.

Braun S, Vogl F, Schlimok G, Diel I, Janni W, Gerber B, Gebauer G, Coombes RC, Pierga J-Y, Naume B, Pantel K (2003 b):

Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases:

10 year survival 4199 breast cancer patients.

Breast Cancer Res Treat 67 (7): Abstract SABCS

Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kranz L. (1994) :

Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors.

Blood 83: 636-640.

Buchali A, Budach V. (2000) :

Die Bedeutung der Strahlentherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms

Geburts Frauenheil 60 (12): 594-603.

Ceci G, Franciosi V, Nizzoli R, De Lisi V, Lottici R, Boni C, Di Blasio B, Passalacqua R, Guazzi A., Cocconi G. (1998) :

The value of bone marrow biopsy in breast cancer at time of diagnosis.

Cancer 61: 96-98.

Ciatto S, Cecchini S, Grazzini G, Iossa A, Bartoli D, Rasponi A. (1990) :

Tumor size and prognosis of breast cancer with negative axillary nodes.

Neoplasma. 37 (2): 179-84.

Clark GM. (1996) : Prognostic and predictive factors.

In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S.:

Disease of the breast.

Lippincott-Raven, Philadelphia: 462.

Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B, Speizer FE. (1995) :

The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women.

N Engl J Med. 15: 332 (24):1589-93.

Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. (1987) :

The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy.

J Clin Oncol. 5 (9): 1378-86.

Cote RJ, Rosen PP, Lesser M, Old LJ, Osborne MP. (1991) :

Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.

J Clin Oncol. 9: 1749-1756.

Courtemanche OJ, Worth AJ, Coupland RW, Mc Farlane JK. (1991) :

Detection of micrometastases from primary breast cancer.

Can J Surg 34: 15--19.

Cowen D, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Resbeut M, Largillier R, Bardou VJ, Viens P, Maraninchi O. (1998) : Local recurrences after conservative

treatment of breast cancer: risk factors and influence on survival.

Cancer Radiother. 2 (5): 460-8.

Dahiya R, Deng G. (1998) : Molecular prognostic markers in breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 52 (1-3): 185-200. Review.

Dalberg K, Eriksson E, Kanter L, Sandelin K, Liedberg A, Auer G, Thorstensson S, Fredriksson I, Johansson U, Rutqvist LE. (1999) :
Biomarkers for local recurrence after breast-conservation-"a nested case-control study.
Breast Cancer Res Treat. 57 (3): 245-59.

Datta YH, AdamsPT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. (1994):
Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction.
J Clin Oncol 12: 475-482.

Davies GC, Millis RR, Hayward JL. (1980) :
Assessment of axillary lymph node status.
Ann Surg 192: 148-151.

Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP. (1991) :
Micrometastases in breast cancer: Long-term follow-up of the first patient cohort.
Eur J Cancer 27: 236-239.

Diel IJ. (2001) :
Bisphosphonates in the prevention of bone metastases: current evidence.
Semin Oncol. 28 (4 Suppl 11): 75-80. Review.

Diel IJ, Cote RJ. (2000) :
Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer.
Cancer Treat Rev 26: 53-65.

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. (1996) :

Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison With Nodal Status.
J Natl Cancer Inst 88 (22): 1652-1664.

Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. (1992) :

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.

Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G (1998):

Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment.
N Engl J Med 339: 357-363.

Egan KM, Stampfer MJ, Hunter D, Hankinson S, Rosner BA, Holmes M, Willett WC, Colditz GA. (2002) : Active and passive smoking in breast cancer:

prospective results from the Nurses' Health Study.
Epidemiology. 13(2):138-45.

Elledge RM, Allred DC. (1998) :

Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 52(1-3):79-98. Review.

Elston CW, Ellis IO. (1991) :

Pathological prognostic factors in breast cancer . *I. The value of histological grade in breast cancer* : Experience from a large study with long-term follow-up.
Histopathology, 19,403-10.

Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, Kramer B, Gruber I, Sotlar K, Kurek R, Wallwiener D, Solomayer E. (2004) :

Influence of tumor biological factors on tumor cell dissemination in primary breast cancer.

Anticancer Res. 24(6):4211-6.

Fehr MK, Köchli OR, Helfenstein U, Schär G, Bussmann Ch, Fink D, Haller U. (1995) : Multivariate Analyse klinisch-pathologischer Prädiktoren der axillären Lymphknotenmetastasierung beim invasiven Mammakarzinom.

Geburtsh Frauenheilk 55:182-188

Feigelson HS, Jonas CR, Robertson AS, Mc Cullough ML, Thun MJ, Calle EE. (2003) : Alcohol, folate, methionine, and risk of incident breast cancer in the

American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 12 (2): 161-4.

Fields KK, Effenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC (1996) : Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation.

J Clin Oncol 14: 1868-1876.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R (1988) :

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: 1 076-1 087.

Fisher ER, Redmond C, Fisher B. (1980) :

Histologic grading of breast cancer.

Pathol Annu. 15 (1): 239-51.

Fisher B, Wolmar, Wolmark N, Bauer M, Redmond C, Gebhardt M (1981) :

Accuracy of clinical nodal staging and of limited axillary nodal staging and of limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast.

Surg Gynecol Obst. 152: 765-772.

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF.(2000) :

Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases-a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases.

Breast Cancer Res Treat. 61(1):1-12.

Foekens J A, Portengen H, Van Putten WLJ, Peters HA, Krijnen HL, Alexieva Figusch J, Klijn JG (1989) :

Prognostic value of estrogen and progesterone receptors measured by immunoassays in human breast cancer cytosols.

Cancer Res. 49: 5823-5828.

Fox 5B., Leek RD, Bliss J, Mansil JL, Gusterson B, Gatter KC, Harris AL.

(1997) : Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients.

J Natl Cancer Inst. 89: 1044-1049.

Frisch B, Bartl R, Mahl G, Burkhardt R. (1984) :

Scope and value of bone marrow biopsies in metastatic cancer.

Invasion Metastasis. 4 (1): 12-30.

Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ (2000) :

Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro.

J Bone Miner Res 15 (11): 2211-21.

Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss M, Untch M, Bohnert H, Schildberg FW, Jauch KW (1996):

Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer.

Int J Cancer 65: 755-761

Galasko CS (1986) :

Skeletal metastases.

Clin Orthop. 210: 18-30

Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. (2001) :

Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up.

J Clin Oncol. 19(16): 3669-74.

Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. (2001) :

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(4):960-71.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. (1984) :

Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.

J Immunol. 133(4): 1710-5.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. (2005) :

Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.

Ann Oncol. 16(10): 1569-83.

Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. (1986) :

Growth factors and cancer.

Cancer Res 46 (3): 1015-1029.

Gregory RK, Powles T J, Salter J, Chang JC, Ashley S, Dowsett M. (2000) :

Prognostic relevance of cerbB2 expression following neoadjuvant chemotherapy in patients in a randomised trial of neoadjuvant versus adjuvant chemoendocrine therapy.

Breast Cancer Res Treat. 59 (2): 171-5.

Grischke E.-M., Wallwiener D. (2000) :

Das Mammakarzinom an der Schwelle zum neuen Jahrtausend.

Der Gynäkologe 33 (10): 757-763.

Harbeck N., Untch M., Pache L, Eiermann W. (1994) :

Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a 3-year median follow-up.

Br J Cancer 69: 566-571

Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB, Solano SM, Wynder EL. (1996) :

Hormone replacement therapy and breast cancer risk.

JAMA. 275 (15): 1158; author reply 1159-60.

Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R et al. (2001) :

Gene-expression profiles in hereditary breast cancer.
N Engl J Med. 344: 539-548

Henderson IC, Patek AJ. (1998) :

The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 52 (1-3): 261-88.

Hosch SB, Knoefel WT, Metz S et al. (1997):

Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: Frequency and prognostic significance.
Pancreas 15: 154-159.

Hossfeld DK, Fiedler W, Gehling U, Mende T. (2001) :

Neoangiogenese und Tumorwachstum: Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze.
Dt Ärztebl. 98: A 1392-1394 [Heft 21]

Janjan N. (2001) :

Bone metastases: approaches to management.
Semin Oncol. 28(4 Suppl 11): 28-34. Review.

Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kantenich C, Rjosk D, Schindlbeck C, Dimpfl T, Sommer H, Braun S. (2000) :

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

Janni W, Pantel K, Rack B, Schindlbeck Ch, Sommer H, Gerber B, Friese K (2004) :

Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen: Methodik, Biologie und klinische Relevanz.
Dtsch Ärztebl. 101:A 3496-3502 [Heft 51-52]

Johnston MJ, Lipsett JA, Donovan AJ (1970) :

Osseous metastasis in mammary cancer. Response to therapy.
Arch Surg. 101(5): 578-81

Johnston RN, Smith DH (1968) :

Symptoms and survival in lung cancer.
Lancet. 2(7568): 558-91.

Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P (1999) :

Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy.
J Natl Cancer Inst (Bethesda) 91: 80-85

Kirk SJ, Cooper GG, Hoper M, Watt PC, Roy AD, Odling-Smee W (1990) :

The prognostic significance of marrow micrometastases in women with early breast cancer.
Eur J Surg Oncol. 16: 481-485

Klein-Bauernschmidt P, von Knebel-Doeberitz M, Ehrbar M (1996) :

Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitization of human tumour cells.
Eur J Cancer 32 A : 1174.

Koslowski L, Bushe KA, Junginger Th, Schwemmle K (Hrsg.) :

Lehrbuch der Chirurgie.

Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York, 3. Auflage 1988

Kreienberg R, Volm T, Mabus V, Alt D (Hrsg.) :

Management des Mammakarzinoms.

Springer-Verlag, Berlin, 2. Auflage 2002

Krempien B. (1995) :

Pathogenesis of bone metastasis and tumor osteopathies.

Radiologe 35(1): 1-7.

Kroman N, Jensen MB, Wohlfart J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M

(2000) : Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study.

BMJ 320: 474-478

Kropp S, Chang-Claude J. (2002) :

Active and passive smoking and risk of breast cancer by age 50 years among German women.

Am J Epidemiol. 156(7): 616-26.

Landys K, Persson S, Kocaric J, Hultborn R, Holmberg E (1998) :

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

Lehr JE, Pienta KJ (1970) :

Preferential Adhesion of Prostate Cancer Cells to a Human Bone Marrow Endothelial Cell Line.

J Natl Cancer Inst.90: 118-23

Lipton A, Costa L, Ali S, Demers L. (2001) :

Use of markers of bone turnover for monitoring bone metastases and the response to therapy.

Semin Oncol. 28(4 Suppl 11):54-9. Review.

Mansi JL, Berger U, Easten D, Mc Donnel T, Redding WH, Gazet JC, Mc Kinna A, Powels TJ (1987) :

Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as a nearly predictor of bone metastases.

BMJ 295: 1093-1096.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC (1999) :

Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study.

Lancet 354: 197-202.

Mathieu MC, Friedman S, Bosq J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, Contesso G (1990) :

Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer.

Breast Cancer Res Treat 15: 21-26.

Me Guire WL, Tandon A.K, Allred DC, Chammes GC, Clark GM. (1990) :

How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients.

J Natl Cancer Inst 82: 1006-1015

Menard S, Squicciarini P, Luini A, Sacchini V, Rovini D, Tagliabue E, Veronesi P, Salvadori B, Veronesi U., Colnaghi MI. (1994) :

Immunodetection of bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients and its correlation with primary tumour prognostic features.

Br J Cancer 69: 1126-1129.

Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. (2002) :

Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women.

Ann Epidemiol. 12 (1): 21-6.

Molino A., Pelosi G., Micciolo R., Turazza M., Nortilli R., Pavanel F., Cetto GL. (1997 a) : Bone marrow micrometastases in breast cancer patients.

Breast Cancer Res Treat. 58: 123-130.

Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L., Bonetti A, Nortilli R, Fattovich G, Alaimo C, Piubello Q, Pavanel F, Micciolo R, Cetto GL. (1997 b) :

Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: Correlations with clinical and pathological features and prognosis.

Breast Cancer Res Treat. 42: 23-30.

Monninkhof EM, van der Schouw YT, Peeters PH. (1999) :

Early age at menopause and breast cancer: are leaner women more protected? A prospective analysis of the Dutch DOM cohort.

Breast Cancer Res Treat. 55(3):285-91.

Monson J (1996):

Adjuvant therapy for colorectal cancer.

Inpharma (Suppl) 1996; 4: 3 (Abstract).

Morris KT, Pommier RF, Morris A, Schmidt WA, Beagle G, Alexander PW, Toth-Fejel SE, Schmidt J, Vetto JT. (2001) :

Usefulness of the Triple Test Score for Palpable Breast Masses.

Arch Surg. 136: 1008-1013.

Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesn R, Qvist H, Sauer T, Kumar T, Nesland JM. (2001) : 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.

Nekolla EA, Griebel J, Brix G. (2005) :

Einführung eines Mammographiescreeningprogramms in Deutschland:

Erwägungen zu Nutzen und Risiko.

Radiologe 45: 245-254

Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF. (1991) :

Bone metastases: pathophysiology and management policy.

J Clin Oncol. 9 (3): 509-24. Review.

Osborne CK (1998). : Steroid hormone receptors in breast cancer management.

Breast Cancer Res Treat. 51(3): 227-38. Review.

Osborne MP, Rosen PP. (1994) :

Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer.

Oncology 8: 25-31. Review

O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M, Shanahan F (1997) :

Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease?

Gut 40: 512-515.

Page DL, Jensen RA, Simpson JF. (1998) :

Routinely available indicators of prognosis in breast cancer.

Breast Cancer Res Treat. 51(3): 195-208.

Pantel K, Aignherr C, Kollermann J, Caprano J, Riethmüller G, Kollermann MW(1995) :

Immunocytochemical Detection of Isolated Tumour Cells in Bone Marrow of Patients with Untreated Stage C Prostatic Cancer.

Eur J Cancer 31A (10): 1627-32.

Pantel K, Diekmanns A, Zippelius A et al, (1995) :

Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines.

J Natl Cancer Inst 87: 1162-1168.

Pantel K, Felber. E, Schlimok G (1994):

Detection and characterization of residual disease in breast cancer.

J Hematother 3 (4): 315-322.

Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Häussinger K, Thetter O, Riethmüller G. (1996) :

Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases.

Lancet 347: 649-653.

Paterson AH. (2001) :

Adjuvant bisphosphonate therapy: the future.

Semin Oncol. 28(4 Suppl 11): 81-5.

Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. (1998) :

HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy.
Breast Cancer Res Treat. 52(1-3): 65-77. Review.

Perez EA. (2001) :

Metastatic bone disease in breast cancer: the patient's perspective.
Semin Oncol. 28(4 Suppl 11): 60-3. Review.

Pesch B, Hackeloh U, Ranft U, Richter M, Pott F (1994) :

ICD 174. In: Atlas zur Krebssterblichkeit in Nordrhein-Westfalen.
Düsseldorf: Ministry of Work, Health and Social Affairs

Peto R, Dalesio O. (2003) :

Breast and prostate cancer: 10-year survival gains in the hormonal adjuvant
treatment trials.

Proc 12th European Conference on Clinical Oncology,
Copenhagen, Denmark, 2003, 101.

Petrek JA. (1994): Breastcancer.

Clin Obst Gynecol. 37: 954-966.

Porro G, Menard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvadori S, Squicciarini P,

Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI (1988): Monoclonal antibody detection of
carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients.
Cancer 61: 2407-2411.

Pratap R, Shousha S (1998) :

Breast carcinoma in women under the age of 50: Relationship between p53
immunostaining, tumour grade, and axillary lymph node status.
Breast Cancer Res Treat. 49(1): 35-9.

Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, et al. (1993) :

Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease.

Cancer Res. 53(20): 4960-70.

Pschyrembel :

Klinisches Wörterbuch.

258. Auflage 1998.

Rakowsky E, Klein B, Kahan E, Derazne E, Lurie H.(1992) :

Prognostic factors in node-positive operable breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy.

Breast Cancer Res Treat. 21(2): 121-31

Ramm B, Hofmann G, Hahn N, Hopfenmüller W. (Hrsg) :

Biomathematik.

Enke Verlag, Stuttgart, 3.Auflage 1987

Recht A, Houlihan MJ. (1995) :

Axillary lymph nodes and breast cancer.

Cancer 76: 1491-1512.

Reed JC. (1994) :

Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.

J Cell Biol. 124 (1-2): 1-6. Review.

Remmele W, Stegner HE. (1987) :

Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue
Pathologie. 8 (3): 138-40.

Rosenquist CJ, Lindfors KK (1994) : Screening mammography in women aged 40-49 years: analysis of cost-effectiveness.

Radiology. 191(3): 647-50.

Ruhland F, Heinrich J, Budner M, Jeschke A. (2000) :

Diagnostische Wertigkeit von Mammographie und Mammasonographie bei klinisch okkulten Mammaläsionen.

Geburtsh.u. Frauenheilk. 60 (2000). 104 -110

Russo J, Russo IH. (1995) :

The etiopathogenesis of breast cancer prevention.

Cancer Lett. 90 (1): 81-9. Review.

Rutsch MT. (1995) :

Prognosefaktoren beim operablen Mammakarzinom: Histologisches Grading versus Hormonrezeptorstatus.

Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich.

Sachs L (Hrsg) : Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo; 8.Auflage 1997

Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI (1990) : Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients.

Eur J Cancer 26: 865-867

Schirmacher V. [Hrsg] : Krebs - Tumoren, Zellen, Gene.
Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1990

Schleicher UM and Ammon J (1998):

Mode of breast cancer detection: a study from german Maas-Rhine-Eurego.
Eur J Cancer Prev 7 (suppl. 1): 41-46

Schlimok,G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, Riethmüller G. (1987) :
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

Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J,Riethmüller G. (1991) :
Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: Methodological aspects of detection and prognostic significance.
Eur J Cancer 27: 1461-1465.

Schmidt-Matthiesen, H,Bastert, G. [Hrsg.] :

Gynäkologische Onkologie.
Schattauer, Stuttgart, 7. neu bearb.und erw. Auflage 2002

Schmidt WA, Wachtel MS, Jones MK, Thurmond AS, DuBois PM, Pommier RF et al. (1994) :

The triple test: a cost effective diagnostic tool.
Lab Med. 25:715-9.

Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg) : Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Bd. 2: Spezielle Chirurgie
Thieme Verlag, Stuttgart Bd 2, 3. Aufl. 2002

Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW (2000) :

Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines.

Br J Cancer 82(8): 1459-68.

Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Wu K, Colditz GA, Willett WC. (2002) :

Intake of dairy products, calcium, vitamin d and risk of breast cancer.

J Natl Cancer Inst. 94(17): 1301-11.

**Shpall EJ, Gee AP, Hogan C., Cagnoni P, Gehling U, Hami L, Frankl W,
Bearman Sol, Ross M, Jones RB. (1996) :**

Bone marrow micrometastases.

Hematol Oncol Clin North Am 10: 321-343 (Review)

Singletary SE, Larry L, Tucker SL, Spitzer G (1991) :

Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of
breast carcinoma patients.

J Surg Oncol 47: 32-36.

Slade MJ, Smith BM, Sinnott HO, Cross NC, Coombes RC (1999) :

Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in
patients with breast cancer.

J Clin Oncol 17: 870-879.

**Solomayer EF, Diel IJ, Krempien B, Meyberg GC, Gollan C, Krainick U,
Wallwiener O, Bastert G. (1998 a) :**

Results of iliac crest biopsies taken from 1465 patients with primary breast cancer.

J Cancer Res Clin Oncol. 124 (1): 44-8.

Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G. (2000) :

Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis.

Breast Cancer Res Treat. 59 (3): 271-8.

Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan Ch, Bode S, Wallwiener D, Bastert G. (1998 b) :

Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patient with breast cancer.

Breast Cancer Res Treat. 49: 145-154.

Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, Bastert G.

(2001) : Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients.

Clin Cancer Res. 7 (12): 4102-8.

Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, Gollan C, Kramer MD, Krainick U, Bastert G. (1997) :

Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micro - metastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer.

Br J Cancer. 76 (6): 812-8.

Tavani A, Pregnolato A, La Vecchia C, Favero A, Franceschi S. (1998) :

Coffee consumption and the risk of breast cancer.

Eur J Cancer Prev. 7(1): 77-82.

Tripathy D. (2001) :

Bisphosphonates in oncology: breast cancer and beyond.

Semin Oncol. 28 (4 Suppl11): 86-91. Review.

Tsuda H, Sakamaki C, Tsugane S, Fukutomi T, Hirohashi S. (1998) :

A prospective study of the significance of gene and chromosome alterations as prognostic indicators of breast cancer patients with lymph node metastases.

Breast Cancer Res Treat. 48 (1): 21-32.

Untch M, Kahlert S, Funke I, Boettcher B, Konecny G, Nestle-Kraemling C, Bauernfeind I (1999) :

Detection,of cytokeratin (CK) 18 positive cells in the bone marrow (BM) of breast cancer patients - no prediction of bad outcome.

Proc ASCe 18: 693a.

Untch M, Konecny G, Sitek H, Keßler M, Reiser M, Hepp H (Hrsg.):

Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms-State of the Art.

W. Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, New York 2000

Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Unari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci I, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P (1998):

Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT -PCR for cytokeratin-19 mRNA.

Br J Haematol 103: 61Q-617.

Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. (1997) :

Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes.

Lancet. 349: 1864-7.

Volpi A, De Paola F, Nanni O, Granato AM, Bajorko P, Becciolini A, Scarpi E, Riccobon A, Balzi M, Amadori D. (2000) :

Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study.

Breast Cancer Res Treat. 63 (3): 181-92.

Weckermann D, Müller P, Wawroschek F, Harzmann R, Riethmüller G, Schlimok G. (2001) : Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value.

J Urol. 166 (2): 699-703

Westhof G, Olbrecht M, Espeloer M, Schonemann S, Wolff M, Hatzmann W. (1997) :

Überprüfung der p53-Funktion in primären Mammakarzinomen durch quantitative Messung des p21 (WAF1)-Proteins im Tumorgewebe

Gebfra. 57: 342.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Naume B (2003 a) :

The presence of isolated tumor cells in the bone marrow three years after diagnosis in disease free breast cancer patients predicts an unfavorable outcome.

Breast Cancer Res Treat 67.

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. (2003 b) :

Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer .

J Clin Oncol, 21(16): 3469-7.

Wittekind Ch, Meyer H-J, Bootz F (Hrsg.) :

TNM Klassifikation maligner Tumoren

TNM-Atlas, UICC 5. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1997)

Wittekind Ch. Meyer H-J, Bootz F (Hrsg.) :

TNM Klassifikation maligner Tumoren

TNM-Atlas, UICC 6. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (2002)

Yamashita K, Ueda T, Komatsubara Y, Koyama H, Inaji H, Yonenobu K, Ono K. (1991) :

Breast cancer with bone-only metastases. Visceral metastases-free rate in relation to anatomic distribution of bone metastases.

Cancer. 68 (3): 634-7.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Wallwiener danke ich für die Überlassung des Themas.

Meinem Betreuer OA Dr. S. Becker danke ich für die Unterstützung sowie Förderung meiner gesamten Arbeit.

Außerdem gilt ganz besonderer Dank OÄ PD Frau Dr. T. Fehm für die Hilfe beim Erstellen der Statistik.

Bedanken möchte ich mich ferner bei meinem Freund und Kollegen Dr. Matthias Goth für seine detaillierten Ratschläge und moralischen Beistand.

Schließlich möchte ich meiner Frau danken, die sich in ungezählten Stunden um unseren kleinen Sohn und unsere kranke Tochter, denen die Arbeit gewidmet sein soll, kümmerte, und mir so genügend Zeit verschaffte, diese Arbeit erfolgreich zu Ende zu führen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Ihsan Nurali
Geburtsdatum	10.02.1974
Geburtsort:	Freudenstadt
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule in Baiersbronn
1985 - 1990	Wihelm Münster Schule in Baiersbronn
1990 - 1992	Berufsfachschule Metall in Freudenstadt
1992 - 1995	Technisches Gymnasium in Freudenstadt - Abitur abgelegt am 23. Juni 1995
1995 - 1996	Freiwilliges Soziales Jahr an der DRK- Klinik in Baden-Baden

Hochschulausbildung

WS 1996/97-WS 97/98	Studium der Zahnheilkunde an der Eberhardt-Karls-Universität zu Tübingen - Vorphysikum abgelegt am 10.10.1997
1998-2000	Erziehungsurlaub und Wartesemester
WS 2001/02 - SS 2003	Studium der Zahnheilkunde an der Eberhardt- Karls-Universität zu Tübingen - Physikum abgelegt am 28.02.2001
WS 2003/04 - SS 2006	Fortführung des Studiums der Zahnheilkunde an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel - Staatsexamen abgelegt am 05. Juli 2006

