

*Immunzytologischer Nachweis von Mikrometastasenzellen
in der Peritonealhöhle und im Knochenmark bei Patienten
mit hepatobiliären Malignomen*

Dissertation

Christin Merkel

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik, Abteilung für Allgemeinchirurgie
des Universitätskrankenhauses Eppendorf

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. J. Izbicki

***Immunzytologischer Nachweis von Mikrometastasenzellen in
der Peritonealhöhle und im Knochenmark bei Patienten mit
hepatobiliären Malignomen***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Christin Merkel
aus Wittenburg (Meckl.)

Hamburg, 2000

meinem Vater gewidmet

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: *19. Sept. 2000*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: *Prof. Dr. H.-P. Leichtweiss*

Referent: *Prof. Dr. H.-W. Schreiber*

Koreferent: *Prof. Dr. J. Izbicki*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

A. Einleitung..... 1

1. Einführung in die Thematik	1
2. Übersicht über die betrachteten Malignome	1
3. Metastasierung und Mikrometastasierung von Malignomen.....	5
4. Immunzytologische Diagnostik - Tumormarker und Antikörper	6

B. Material und Methoden 8

1. Materialien	8
1.1. Chemikalien.....	8
1.2. Antikörper und Proteine	8
1.2.1. Übersicht über die Antikörper	8
1.2.2. Vorstellung der Antikörper	9
Alpha-Fetoprotein	9
Carcinoembryonales Antigen.....	10
Carbohydratantigen 19-9.....	11
CO 17-1A.....	11
Ra 96	12
C 54-0	12
Zytokeratin	12
1.3. Puffer und Lösungen für Zellkultur.....	13
1.4. Zelllinien	13
1.5. Weitere Materialien.....	13
1.6. Geräte.....	14
2. Patientenkollektiv	14
2.1. Malignom-Patienten.....	14
2.1.1. Zusammenfassung.....	14
2.1.2. HCC	14
2.1.3. Lebermetastasen	16
2.1.4. Klatskin-Tumoren	16
2.1.5. Gallenblasenkarzinome	16

2.2. Kontrollgruppe	17
3. Versuche zur Methode	17
3.1. Bestimmung der Antikörperkonzentrationen.....	17
3.2. Bestimmung der Zellverlustrate	17
3.2.1. Zellverluste durch die Dichtegradientenzentrifugation.....	17
3.2.2. Zellverluste nach der Zytozentrifugation.....	18
4. Gewinnung der Materialien vom Patienten.....	18
4.1. Gewinnung von Knochenmark	18
4.2. Gewinnung der Peritoneallavage	18
4.3. Präparierung von Tumorgewebe und Grenzgewebe.....	18
4.4. Aszites	19
5. Aufbereitung von Knochenmark, Peritoneallavage undAszites	19
5.1. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten.....	19
5.2. Anlegen von Zellkulturen.....	19
6. Immunchemische Färbung	20
6.1. Prinzip der indirekten Immunperoxidase-Färbung.....	20
6.2. Durchführung der Färbung	20
7. Auswertung der Färbung	21
C. Ergebnisse	22
<hr/>	
1. Zellwiederfindungsrate und Negativkontrollen	22
2. Malignome	22
2.1. Übersicht.....	22
2.2. Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Parametern.....	26
2.2.1. Korrelation zur Resektabilität.....	26
2.2.2. Korrelation zum Grading.....	26
2.2.3. Korrelation zum TNM-System	27
2.3. HCC	27
2.4. Lebermetastasen	30
2.5. Klatskin-Tumoren	33
2.6. Gallenblasenkarzinome	35
3. Kontrollgruppe.....	37
D. Diskussion.....	38
<hr/>	

E. Zusammenfassung	46
F. Literaturverzeichnis	47
G. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	54
Danksagung	55
Lebenslauf	56

Abkürzungsverzeichnis

A	Aszites
AFP	Alpha-Fetoprotein
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Da	Dalton
G	Grading
HAV	Hepatitis A-Virus
HBs-Ag	Surface-Antigen des HBV
HBs-Ak	Antikörper gegen das HBs-Ag
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
Ig	Immunglobulin
J 131	radioaktives ¹³¹ Jod
KM	Knochenmark
mAk	monoklonale Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
N	nichtneoplastisches Gewebe, das an den Tumor grenzt
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PL	Peritoneallavage
R	Resektabilität
Tm	Tumorgewebe

A. Einleitung

1. Einführung in die Thematik

Maligne Erkrankungen sind nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den hochindustrialisierten Ländern. Die überwiegende Mehrzahl aller bösartigen Neubildungen sind epithelialen Ursprungs, also Karzinome. Der Anteil gastrointestinaler Tumoren an den soliden Malignomen, insbesondere die Karzinome des Dickdarms, des Pankreas, des Magens und der Leber, beträgt über 30 % (Mendelsohn 1994).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das cholangiozelluläre Karzinom, das Gallenblasenkarzinom sowie Lebermetastasen gastrointestinaler Malignome. Den primären Tumoren ist eine unspezifische Symptomatik, eine späte Diagnose und daraus folgend eine schlechte Prognose gemeinsam. Die einzige kurative Therapie besteht in der vollständigen Resektion des Tumors; alle medikamentösen Therapieformen beeinflussen den Krankheitsverlauf nur temporär und haben kaum Einfluß auf die Langzeitüberlebensrate (Luporini *et al.* 1993). Leider treten auch nach einer vermeintlich kurativen Resektion dieser Tumoren häufig Lokalrezidive, Peritonealkarzinosen oder Fernmetastasen auf. Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, daß bereits zum Zeitpunkt der therapeutischen Intervention Mikrometastasen vorhanden sind, die zum Ausgangspunkt von Rezidiven und Fernmetastasen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit immunzytochemischen Methoden untersucht, ob bei hepatobiliären Malignomen bereits bei der Primäroperation eine Dissemination von Tumorzellen in die Peritonealhöhle oder das Knochenmark vorlag. Außerdem wurde geprüft, ob bei Patienten mit hepatisch metastasierten Tumoren des Magen-Darm-Traktes eine Tumorzellaussaat in die genannten Kompartimente nachweisbar war. Hierzu wurden Aufbereitungen aus dem Primärtumor bzw. der Lebermetastase, der Peritoneallavage, dem Aszites und dem Knochenmark mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen tumorassoziierte Antigene und Zytokeratin auf das Vorhandensein maligner Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Immunzytochemie wurden mit klinischen und pathologischen Daten verglichen.

Im Folgenden wird auf die untersuchten Malignome und die Pathophysiologie der Metastasierung näher eingegangen, und es werden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper vorgestellt.

2. Übersicht über die betrachteten Malignome

Primäre Lebertumoren umfassen hepatozelluläre Karzinome, cholangiozelluläre Karzinome, Hepatoblastome, Angiosarkome und Sarkome. Das HCC macht etwa 90 % der primären Lebermalignome aus, Cholangiokarzinome 5-10 % (Moore u. Pazdur 1993; Tomimatsuet *al.*

1993). Sekundäre Lebertumoren treten in Europa und den USA ungefähr zwanzig Mal so häufig wie primäre Lebertumoren auf. Die Leber stellt die Hauptlokalisation von Metastasen gastrointestinaler Tumoren dar (Isselbacher u. Dienstag 1994).

Das HCC ist ein von den Hepatozyten ausgehendes Neoplasma mit aggressiver Malignität. Es hat weltweit eine hohe Prävalenz mit großen geografischen Schwankungen in der Häufigkeit des Auftretens. Während es in Westeuropa und den USA relativ selten ist, gilt das HCC in Asien (China, Japan, Taiwan und Korea) sowie im subsaharischen Afrika als eine der häufigsten Todesursachen des Mannes. Der Anteil hepatozellulärer Karzinome an allen Malignomen in Autopsien beträgt in den USA und in Europa 1-2 %, in Asien und Afrika 20-30% (Isselbacher u. Dienstag 1994). Weltweit werden jährlich bis zu eine Million Neuerkrankungen registriert. In Westeuropa und den USA beträgt die Inzidenz des HCC vier Fälle je 100 000 Einwohner und Jahr (Vogel u. Judmaier 1989). Hierbei sind Männer bis zu fünfmal häufiger betroffen als Frauen (Tanaka *et al.* 1992; Schirmacher *et al.* 1993). In 80-90 % aller Autopsien bei HCC-Patienten findet sich eine Leberzirrhose als Ausdruck einer chronischen Lebererkrankung. Entsprechend den Hauptursachen für eine Leberzirrhose ist in Westeuropa und den USA die nutritiv-toxisch bedingte Zirrhose der häufigste Risikofaktor für das HCC, während bei Patienten in den HCC-Endemiegebieten in bis zu 80 % eine chronische Infektion mit dem Hepatitis B-Virus vorliegt (Simonetti *et al.* 1991; Nagasue *et al.* 1993; Tang *et al.* 1993).

Das klinisch manifeste HCC mit Hepatomegalie, Aszites und Ikterus ist charakterisiert durch eine rasche Progredienz bei gleichzeitig limitierten therapeutischen Möglichkeiten. Eine frühzeitige chirurgische Intervention in Form einer Tumorresektion, einer Leberteilresektion oder einer Lebertransplantation ist bisher die einzige Therapie, die eine Chance auf Heilung bietet. In wenigen Fällen ist der Tumor zum Diagnosezeitpunkt noch kurativ resektabel. Die Resektabilität des HCC liegt durchschnittlich bei nur 19 % (Ravoet *et al.* 1993). Die Ergebnisse bei der Resektion sind gekennzeichnet durch eine hohe Rezidivrate von 68 % und eine hohe perioperative Mortalität von 12 % durch Leberversagen. Es kann jedoch eine Einjahres-Überlebensrate von 72 % erreicht werden, ein Drittel der Patienten lebt länger als 3 Jahre und 8 % leben länger als 5 Jahre (Dusheiko 1990; Furuta *et al.* 1992).

Die Rolle der Lebertransplantation beim HCC wird derzeit kontrovers diskutiert. Eine Mikrometastasierung zum Operationszeitpunkt führt infolge der postoperativen Immunsuppression rasch zu einem Rezidiv (Jenkins *et al.* 1989). Die Zweijahresüberlebensrate nach einer Lebertransplantation beträgt für HCC-Patienten 25-39 %; das ist etwa ein Drittel der Überlebensrate nach Lebertransplantationen aufgrund benigner Grunderkrankungen (Dusheiko 1990).

Medikamentöse Therapieformen für das HCC sind die systemische und lokoregionäre Chemotherapie mit Mitomycin C und 5-Fluorouracil, die Tumorgefäßembolisation mit Polyvinylalkohol oder Gelfoam, die Chemoembolisation und die perkutane Alkohol-Injektion

in den Tumor. Alle diese Verfahren erzielen nur geringe Ansprechraten von kurzer Dauer und haben keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Langzeitprognose (Venooket *et al.* 1990; Luporini *et al.* 1993; Moore u. Pazdur 1993). Eine effektive Strahlentherapie hepatischer Tumoren scheitert an der geringen Strahlentoleranz des gesunden Lebergewebes von 25-30 Gray. Eine Bestrahlungsdosis innerhalb dieses Bereichs wirkte gegenüber primären hepatischen Tumoren nicht therapeutisch (Dusheiko 1990; Yamashita *et al.* 1991).

Insgesamt sind die therapeutischen Optionen für das HCC somit unbefriedigend. In der Regel ist eine rasche Progredienz zu verzeichnen, und der Tod tritt innerhalb weniger Monate ein. Die Prognose des HCC hat sich in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert und ist im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Malignomen ausgesprochen schlecht. Die weltweite Fünfjahresüberlebensrate aller Stadien beläuft sich auf 3 %. Die mittlere Überlebenszeit ohne Therapie beträgt 1 bis 6 Monate, unter konventioneller nichtchirurgischer Therapie liegt sie bei 6 Monaten bis zu 3 Jahren. Die mediane Überlebenszeit ist 3 Monate (Tabor 1989; Yamashita *et al.* 1991).

Das cholangiozelluläre Karzinom macht 5-10 % der primären Lebertumoren aus. Die Patienten sind meist im 6.-7. Lebensjahrzehnt. Ätiologisch stehen zystische Veränderungen der Gallengänge wie beispielsweise beim Caroli-Syndrom, Gallensteine und eine sklerosierende Cholangitis im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Gallengangskarzinoms. Auch ein chronischer Reflux von Pankreassekret kann für die maligne Transformation der Gangepithelien mitverantwortlich sein. In 95 % der Fälle liegt ein Adenokarzinom vor. Eine Sonderform ist der Klatskin-Tumor, ein Karzinom an der Bifurkation des Ductus hepaticus, das in 25 % der Fälle vorliegt.

Für diese Gallengangstumoren konnte bisher keine Verbesserung der Prognose durch eine chirurgische Therapie nachgewiesen werden. Die mediane Überlebenszeit nach Lebertransplantation betrug acht Monate, in Autopsien war nach 90 Tagen bei allen Patienten ein Tumorrezidiv nachzuweisen. Eine Leberteilektomie bringt gegenüber der Transplantation bessere Langzeitergebnisse, so daß das cholangiozelluläre Karzinom zur Zeit keine Indikation für eine Lebertransplantation darstellt (Terblanche 1994; Pichlmayr *et al.* 1995). Alle anderen Therapieformen wie Bestrahlung oder Chemotherapie haben bisher ebenfalls keine ermutigenden Ergebnisse gezeigt (Dusheiko 1990; Luporini *et al.* 1993; Moore u. Pazdur 1993).

Im Gegensatz zu den in Europa seltenen primären Lebertumoren ist die Leber ein bevorzugter Sitz der Metastasen von Primärtumoren anderer Organe. Die Inzidenz von Lebermetastasen ist ungefähr zwanzig Mal höher als die der primären Lebertumoren. Insbesondere Mammakarzinome, Bronchialkarzinome und gastrointestinale Tumoren metastasieren in die Leber. In Autopsien von Patienten, die an einem Malignom verstarben, finden sich in 30-50 % der Fälle Lebermetastasen (Isselbacher u. Dienstag 1994). Ungefähr die Hälfte der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom leiden im Krankheitsverlauf an hepatischen

Metastasen. Die Filiae können synchron mit dem Primärtumor nachweisbar sein oder erst während der postoperativen Nachsorge auftreten. Die Diagnostik erfolgt in der Regel durch bildgebende Verfahren wie Ultraschall oder Computertomografie. Leberfunktionstests sind für Lebermetastasen nicht spezifisch (Terblanche 1994). Der Tumormarker CEA im Serum weist eine stadienabhängige hohe Sensitivität zwischen 20 und 45 % für den Primärtumor auf (Haglund *et al.* 1992). Liegt der Marker präoperativ im „Tumorbereich“, zeigt ein erneuter Anstieg der Serumkonzentration in der Nachsorge hochsensitiv ein Rezidiv oder eine Filiarisierung an. Bei diesen Patienten können mittels Immunszintigrafie mit radioaktiv markierten monoklonalen CEA-Antikörpern 60 % der Lebermetastasen und 95 % der intraabdominellen Rezidive eines kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden. Das CEA ist auch ein wichtiger prognostischer Faktor. Bei Patienten mit normalen Serumkonzentrationen beträgt die Fünfjahres-Überlebensrate 30 %; liegt das CEA präoperativ im „Tumorbereich“ über 30 ng/ml, ist die Überlebenszeit nach 5 Jahren mit 18 % deutlich niedriger.

Die einzige kurative Therapie ist die vollständige Resektion aller Metastasen. Dies ist nur bei 5-10 % der Patienten möglich. Für diese Patienten ist die Prognose günstiger, die Fünfjahres-Überlebensrate liegt bei 25 %, nach 10 Jahren leben noch 12 % der Patienten. Alle nichtchirurgischen Therapien wie Chemotherapie, arterielle Embolisation und Kombinationen aus diesen Verfahren haben zwar Ansprechraten von bis zu 80 %, können aber die Überlebenszeit in der Regel nicht verlängern (Isselbacher u. Dienstag 1994).

Das Gallenblasenkarzinom ist ein seltenes Malignom und hat einen Anteil von weniger als 2 % an allen diagnostizierten Karzinomen pro Jahr. Es ist innerhalb des Gallensystems allerdings der häufigste Tumor. Wie das Gallengangskarzinom betrifft es meist Patienten jenseits des 60. Lebensjahres. Frauen erkranken daran häufiger als Männer. In den meisten Fällen liegt ein Adenokarzinom vor; undifferenzierte Karzinome sind selten. Abgesehen von den „stillen Tumoren“, ein Zufallsbefund bei einer Cholezystektomie, sind die symptomatischen Karzinome meist in einem fortgeschrittenen Stadium und haben eine sehr schlechte Prognose. Die präoperative Diagnose dieses Tumors ist häufig auch mit bildgebenden Verfahren oder laborchemisch nicht sicher möglich.

Wie bei allen Karzinomen des hepatobiliären Systems bietet nur eine vollständige Resektion von Gallenblase und befallenen Lymphbahnen eine Chance auf Heilung. Bei Zufallsbefunden eines Karzinoms in Cholezystektomiepräparaten beträgt die Fünfjahresüberlebensrate 15 % für kleine Malignome, wenn der Tumor vollständig erfaßt wurde. Eine extensive Resektion mit Erfassung der extrahepatischen Gallenwege und einer Pankreatoduodenektomie erbringt eine Fünfjahres-Überlebensrate von 38 %. Die systemische Chemotherapie hat auch beim Gallenblasenkarzinom eine ähnlich geringe Ansprechraten wie beim cholangiozellulären Karzinom. Die mediane Überlebenszeit ohne Therapie beträgt 6 Monate (Terblanche 1994).

3. Metastasierung und Mikrometastasierung von Malignomen

Die Entwicklung von Tochtergeschwülsten ist ein sicheres Zeichen der Malignität eines Tumors. Diese Absiedlungen können lymphogen, hämatogen und kanalikulär erfolgen. Der Vorgang der Metastasierung läuft in mehreren Phasen ab. Voraussetzung für eine Ausbildung von Metastasen ist u.a. die Aussendung proliferationskompetenter Zellen in den Blutstrom. Für diesen Vorgang sind Aggregationen mehrerer Tumorzellen gegenüber Einzelzellen bevorzugt, da durch den Verbund der Zellen die inneren Zellschichten gegen die Abwehrmechanismen des Körpers geschützt werden. Die Zellen müssen Stammzellcharakter haben, um eine Metastasierung induzieren zu können. Es werden Subpopulationen der Tumorzellen, sogenannte Metastasklone, selektiert, die in der Lage sind, die jeweils nächste Stufe der Metastasierung zu erreichen. Die metastatischen Zellen besitzen daher in der Regel eine aggressivere Proliferationskinetik und ein höheres Malignitätspotential als die Zellen des Primärtumors. Die Phasen der Metastasierung laufen als Kaskadenprozeß ab. Zunächst erfolgt die Invasionsphase, in der sich einzelne Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen und die Gefäßwände ähnlich der Diapedese der Leukozyten penetrieren. Während der Dissemination gelangt die intravaskuläre Tumorzellformation mit dem Blutstrom in das Zielorgan, bevorzugt in die Kapillarfilter Leber, Lunge und Knochenmark. Dann erfolgt die Phase der Implantation der Tumorzellen mit der Bildung von Metastasen. Von den eingeschwemmten Tumorzellen werden über 99 % vernichtet; nur rund 0,01-1 % der zirkulierenden Malignomzellen besitzen das Potential, solide Metastasen zu bilden (Seifert 1983; Liotta u. Stetler-Stevenson 1991; Häring u. Zilch 1992). Auf disseminierten Tumorzellen gastrointestinaler Tumoren konnte eine erniedrigte Expression von Antigenen des Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I festgestellt werden. Der MHC I ist unter anderem für die zytotoxische Lyse von Zellen mittels T-Zellen verantwortlich. Da die Tumorzellen die Antigene des MHC I nur noch in geringem Ausmaß exprimieren, werden sie seltener lysiert als andere Fremdzellen und haben daher einen Selektionsvorteil (Pantel *et al.* 1991). Die Streuung solcher Tumoreinzellen ist die Voraussetzung für die Bildung von Mikrometastasen.

Als Mikrometastasen werden metastatische Zellverbände bezeichnet, in denen keine eigene Angiogenese abläuft oder/und die einen Durchmesser von weniger als 0,3 cm haben. Sie bestehen aus bis zu 10^8 Tumorzellen (Burkhardt 1980). Die Zahl der Mikrometastasen ist insgesamt größer als die der Makrometastasen. Sie sind prinzipiell in der Lage, zu Makrometastasen auszuwachsen und damit die Prognose der Erkrankung entscheidend zu beeinflussen. Die Bedeutung der Mikrometastasen ist leicht am häufigen Auftreten von Metastasen bei vermeintlich kurativ operierten Patienten erkennen (Braun *et al.* 1995, Mori *et al.* 1996, Broll *et al.* 1996). Gastrointestinale Tumoren metastasieren oft lokal in

die Peritonealhöhle oder bilden Fernmetastasen in der Leber. Im Gegensatz zur häufigen Absiedlung von Metastasen in die Leber kommt es bei gastrointestinalen Tumoren selten zu Knochenmetastasen, obwohl auch das Knochenmark als ein Kapillarfilter für die Metastasierung prädestiniert ist.

Der Nachweis solcher disseminierter Tumorzellen ist mit der konventionellen präoperativen Diagnostik nicht möglich. Mit Hilfe immunzytochemischer Methoden, die im Vergleich mit histomorphologischen und fluoreszenzmikroskopischen Verfahren eine wesentlich höhere Sensitivität aufweisen (Molino *et al.* 1991), konnte eine Dissemination von Tumoreinzellen in das Knochenmark erstmals für das Mammakarzinom, später auch für Bronchial- und Prostatakarzinome sowie für das Neuroblastom nachgewiesen werden (Dearnaley *et al.* 1983; Redding *et al.* 1983; Diel *et al.* 1992). 1987 gelang der immunzytochemische Nachweis metastatischer Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Magen- und Kolonkarzinomen (Schlimoket *et al.* 1987), mittlerweile auch von Pankreaskarzinomen (Juhl *et al.* 1994a).

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit hepatobiliären Tumoren oder mit Lebermetastasen gastrointestinaler Malignome immunzytochemisch auf eine Tumorzell dissemination in die Bauchhöhle und das Knochenmark untersucht.

4. Immunzytologische Diagnostik - Tumormarker und Antikörper

Das Prinzip der Immunzytochemie beruht auf dem Nachweis spezifischer Oberflächenantigene, durch welche sich Tumorzellen von gesunden Zellen unterscheiden. Einige der sogenannten tumorassoziierten Antigene oder Tumormarker sind bereits gut charakterisiert. Diese Moleküle spielen bei der Zelldifferenzierung und Zellproliferation eine wichtige Rolle. Einige werden während der Fetalzeit in großem Ausmaß exprimiert, dann mittels Regulationsmechanismen inaktiviert; sie sind später auf gesunden Zellen kaum noch nachweisbar. Bei der Entstehung eines Malignoms werden sie erneut gebildet, indem genetische Informationen der Embryonal- und Fetalzeit reaktiviert werden. Ein Beispiel für diese Vorgänge sind die Tumormarker AFP und CEA. Andere Tumormarker unterscheiden sich nur durch einen Kohlenhydratrest von einem normalerweise sezernierten Analogon, das auch im Serum von Gesunden nachweisbar ist, beispielsweise das Carbohydratantigen Ca 19-9 (Vogel u. Judmaier 1989; Fagerberg *et al.* 1993).

Die Entwicklung der Hybridoma-Technik durch Koehler und Milstein 1975 ermöglichte es erstmals, monoklonale Antikörper (mAk) gegen diese Tumorantigene in praktisch unbegrenzter Menge herzustellen (Koehler u. Milstein 1975). Es konnte mittlerweile eine Vielzahl von Antikörpern mit Tumorbindungseigenschaften kloniert werden. Damit eröffnete sich für die Tumorbehandlung die grundsätzliche Möglichkeit, Malignomzellen mit einer gewissen Selektivität zu erkennen und zu eliminieren.

Primäre Lebertumoren sind biologisch heterogen und sezernieren eine Reihe verschiedener Tumormarker, vor allem Glykoproteine. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen TAA wurden eingesetzt, um mit immunzytochemischen Methoden mikrometastatische Einzelzellen in der Peritonealhöhle, im Aszites und im Knochenmark von Patienten mit hepatobiliären Tumoren nachzuweisen.

Unter Verwendung der tumorassoziierten Antikörper AFP, CEA, Ca 19-9, 17-1A, Ra 96, C 54-0 und KL-1 wurde bei Patienten mit hepatobiliären Tumoren oder Lebermetastasen gastrointestinaler Malignome untersucht, ob eine Tumorzell dissemination zum Operationszeitpunkt vorlag. Mittels immunzytochemischer Färbemethoden wurden Peritoneallavagen, Knochenmark- und Aszitesproben auf das Vorhandensein von Tumoreinzelzellen getestet. Im Kapitel „Material und Methoden“ werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Antigene und die zugehörigen monoklonalen Antikörper im Einzelnen charakterisiert.

Der frühzeitige Nachweis einer Generalisierung der Tumorerkrankung könnte dazu beitragen, bei Tumorpatienten die Indikation für adjuvante Therapieverfahren besser stellen zu können. Auch die Wahl der Primärtherapie könnte beeinflusst werden, indem Hilfestellung bei der Indikationsstellung zur Lebertransplantation bei Patienten mit Cholangiokarzinomen geboten wird. Die durch die Transplantation notwendig werdende Immunsuppression birgt für die Tumorpatienten ein erhöhtes Risiko für ein beschleunigtes Wachstum von verbliebenen Mikrometastasen. Yokoyama et al. belegten eine signifikant kürzere Tumorverdopplungszeit für Lebertransplantierte im Vergleich mit einer Patientengruppe, die nur mit einer Leberteilresektion therapiert worden war. Die tumorfreie Periode und die Überlebenszeit waren bei den Resektionspatienten deutlich länger als bei den transplantierten Patienten (Yokoyama et al. 1991; Terblanche, 1994).

Insbesondere für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Malignome ist ein weiterer Parameter für die Therapieentscheidung wichtig, da bei diesen Tumoren die Prognose trotz verbesserter Diagnostik und neuer adjuvanter Therapien immer noch überwiegend infaust ist.

B. Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Chemikalien

Bovine Serum Albumin (BSA)	Miles Lab.; Pentex
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma, Deisenhofen
Ficoll Paque	Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala
Eukitt	Kindler, Freiburg
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt

1.2. Antikörper und Proteine

1.2.1. Übersicht über die Antikörper

Detektionsantikörper	Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit-antiMouse IgG, IgM (H+L), Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat-anti-Rabbit IgG F (ab') ₂ , Fragment specific, Dianova, Hamburg
KL-1	Mouse-antiHuman IgG kappa, Dianova, Hamburg Immunogen ist das Keratin epidermaler Keratinozyten, der mAk wurde durch Immunisierung von Mäusen mit der Myelom-Zelllinie NS 1 erzeugt (Moll 1986).
C1-P83	Mouse-antiHuman IgG _{1 kappa'} , PD Dr. H. Kalthoff, Forschungsgruppe Molekulare Onkologie, Chirurgische Universitätsklinik Kiel Der monoklonale Antikörper C1 P83 (IgG _{1 kappa'}) erkennt das GOLD 3 Epitop des CEA (Hammarstrom <i>et al.</i> 1989). Immunogen ist die Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan 1.
Ca 19-9	Mouse-antiHuman IgG _{1 kappa'} , Dianova, Hamburg Gegen das Tumorantigen Ca 19-9 wurde erstmals von Magnani <i>et al.</i> 1983 ein mAk 116 NS 199 erzeugt. Immunogen ist die humane Kolonkarzinom-Zelllinie SW 1116 (Magnani <i>et al.</i> 1983).
C 54-0	Mouse-antiHuman IgG _{2b kappa'} , PDDr. H. Kalthoff, Forschungs-gruppe Molekulare Onkologie, Chirurgische Universitätsklinik Kiel Immunogen ist die Pankreaskarzinom-Zelllinie Colo-357 (Schmiegel <i>et al.</i> 1985). Um falsch positive Ergebnisse infolge einer Kreuzreaktion mit Lymphozytenpopulationen des Knochenmarks zu vermeiden, wurde eine Reaktion in Knochenmarkaufbereitungen nicht in die Auswertung einbezogen.

Ra 96	<p>Mouse-antiHuman IgG_{1 kappa}, PD Dr. H. Kalthoff, Forschungsgruppe Molekulare Onkologie, Chirurgische Universitätsklinik Kiel</p> <p>Zur Herstellung des Antikörpers wurde als Immunogen ein duktales Pankreaskarzinom verwendet.</p>
17-1-A	<p>Mouse-antiHuman IgG_{2a kappa}, Dianova, Hamburg</p> <p>Der Antikörper 17-1A ist ein unkonjugierter chimärer Ak, der durch Immunisierung von Mäusen gegen die Rektumkarzinom-Zelllinie SW 1083 gewonnen wurde (Herlyn <i>et al.</i> 1979).</p>
AFP	<p>Rabbit-antiHuman Alpha1 Fetoprotein, Dianova, Hamburg</p> <p>Der monoklonale Antikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen gegen das humane Alpha-Fetoprotein erzeugt.</p>

1.2.2. Vorstellung der Antikörper

Alpha-Fetoprotein

Das Alpha-Fetoprotein (AFP) wurde 1963 durch Abelev entdeckt. Es ist ein onkofetales Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 72 kDa. AFP ist das Hauptprotein in der fetalen Zirkulation während des frühen fetalen Lebens und wird in der Leber, im Gastrointestinaltrakt und im Dottersack gebildet. Es ist intrazellulär im rauhen endoplasmatischen Retikulum, im perinukleären Raum, im Golgi-Apparat und in membrangebundenen Ribosomen lokalisiert (Kinoyama *et al.* 1986). Genetisch und strukturell ist es eng mit Albumin verwandt. Im Verlauf der Fetalzeit nimmt die Albuminsynthese stark zu, während der AFP-Spiegel innerhalb des ersten Lebensjahres auf die niedrigen Werte des Erwachsenen (< 20 ng/ml) abfällt (Chanet *al.* 1986; Vogel u. Judmaier 1989). In 50-90 % der symptomatischen HCC-Fälle ist ein erhöhtes Serum-AFP nachweisbar. Die molekulare Basis für diese AFP-Erhöhung ist noch nicht geklärt; möglich ist eine Steigerung der Gentranskription oder eine veränderte Stabilität der AFP-mRNA, da vermehrte mRNA-Transkriptionen in HCC-Zelllinien und Tumorgewebe nachgewiesen wurden. Zwischen AFP-produzierenden und nichtproduzierenden Zellen sind keine ultrastrukturellen Unterschiede gefunden worden (Kinoyama *et al.* 1986; Otsuru *et al.* 1988). Das Serum-AFP korreliert exponentiell mit der Tumorgröße; nach vollständiger Entfernung des Tumors sinkt die Serumkonzentration des AFP innerhalb von 3 bis 5 Tagen auf Normwerte ab. Tritt dies nicht ein oder kommt es zu einem erneuten Anstieg der Werte, ist von einem Residualtumor bzw. einem Tumorrezidiv auszugehen. Der AFP-Anstieg im Serum kann dem Nachweis eines HCC durch bildgebende Verfahren um 1 bis 6 Monate vorausgehen (Hirai u. Taketa 1992; Bioscintia Bericht 1993).

AFP ist kein HCC-spezifischer Tumormarker. Erhöhungen des AFP-Serumspiegels finden sich auch bei Keimzelltumoren (Hoden, Ovar, extragonadal) und bei sonstigen nichthepatischen

Neoplasien im fortgeschrittenen Stadium. Transitorische Anstiege der Serumkonzentrationen treten bei benignen Lebererkrankungen auf. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Gen-Reaktivierung infolge der Zellregeneration (Bioscintia Bericht 1993).

Die Sensitivität der AFP-Bestimmung beträgt stadienabhängig 30-80 % (Bioscintia Bericht 1993). Obwohl die Spezifität mit bis zu 95 % angegeben wird, besteht das Problem einer relativ großen Überlappungszone der Serumwerte zwischen benignen und malignen Erkrankungen. Für diese Differentialdiagnose kann eine Bestimmung von AFP-Isoformen vorgenommen werden (Vogel u. Judmaier 1989; Dusheiko 1990; Wu 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion von AFP-exprimierenden Zellen ein gleichnamiger monoklonaler Antikörper verwendet, der durch Immunisierung von Kaninchen gegen das humane Alpha-Fetoprotein erzeugt wurde.

Carcinoembryonales Antigen

Die Erstbeschreibung des carcinoembryonalen Antigens (CEA) von Gold und Freedman im Jahr 1965 charakterisierte das Protein als Komponente sowohl von fetalem Kolongewebe als auch von Kolonkarzinomen. Im gesunden Dickdarmgewebe des Erwachsenen ist es nicht nachweisbar. Das CEA ist ein Glycoprotein, dessen Kohlenhydratanteil bei 50-60 % liegt. Das Molekulargewicht beträgt 180 kDa (Gold u. Freedman 1965). Es sind mehrere Isoformen beschrieben worden, die sich vom 180 kDa CEA durch unterschiedliche Glycosylierung unterscheiden (Muraro 1985).

Der Normwert der Serumkonzentration beträgt 5 ng/ml; ein geringer Anstieg ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen nichtmalignen Erkrankungen, beispielsweise akuten und chronischen Lebererkrankungen, zu beobachten. Auch bei Patienten mit einem Nikotinabusus werden erhöhte Serumwerte gemessen. Der „Tumorbereich“ wird allgemein bei Werten über 20 ng/ml angegeben. Ein deutlicher Anstieg der Serumkonzentrationen ist bei Malignomen des Magen-Darm-Traktes und bei Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren zu beobachten. Die Sensitivität für Kolonkarzinome beträgt stadienabhängig bis zu 20 % für das Stadium Dukes A und bis zu 80 % für das Dukes D-Stadium (Klapdor 1991). In bis zu 79 % der HCC sind ebenfalls erhöhte CEA-Serumwerte gefunden worden, allerdings lagen sie nur selten im „Tumorbereich“. Für dieses Malignom liegt die Bedeutung der CEA-Bestimmung darin, daß bei AFP-negativen HCC in bis zu 65 % deutliche CEA-Erhöhungen im Serum zu finden sind. Das CEA ist für gastrointestinale Malignome ein Tumormarker mit guter Sensitivität, aber nur geringer Spezifität (Vogel u. Judmaier 1989; Dusheiko 1990).

In der vorliegenden Arbeit ist der monoklonale Antikörper C1 P83 (IgG₁ kappa) verwendet worden, der das GOLD 3 Epitop des CEA erkennt (Hammarstrom *et al.* 1989). Das Antigen für

C1 P83 wird von exokrinen Pankreastumoren exprimiert, nicht jedoch bei benignen Pankreaserkrankungen. C1P83 besitzt eine hohe Spezifität für gastrointestinale Karzinome und ihre Metastasen (Schmiegel *et al.* 1985).

Carbohydratantigen 19-9

Das Carbohydratantigen 19-9 (Ca 19-9) wird auf Zelloberflächen fetaler Epithelzellen als Glykoprotein und Glykolipid exprimiert. Das Antigen ist physiologisch in hohen Konzentrationen in Speichel, Milch (Brockhaus *et al.* 1985) und Pankreassekret (Kalthoff *et al.* 1986) nachweisbar. Im Serum von Karzinompatienten ist das Protein Ca19-9 verbunden mit einer kohlenhydratreichen Muzinfraktion mit hohem Molekulargewicht (Haglund *et al.* 1992). Die Antigen-Determinante von Ca 19-9 ist ein Kohlenhydrat (Sialyl-Lacto-N-Fucopentaose II), welches eine enge Strukturverwandtschaft mit den Antigenen des Lewis-Blutgruppensystems aufweist.

Die Sensitivität der Bestimmung von Ca 19-9 im Serum liegt bei 55-80 % für Gallenblasenkarzinome und bei 87 % für cholangiozelluläre Karzinome. In 90 % der Fälle findet sich eine Erhöhung der Serumwerte vor positiven Befunden der bildgebenden Verfahren. Allerdings sind die Serumwerte in 38 % der benignen Gallenerkrankungen ebenfalls erhöht (Haglund *et al.* 1992; Bioscintia 1993). Eine sehr gute Sensitivität zeigt der Marker auch für das Pankreaskarzinom (77 %). Beim kolorektalen Karzinom ist sie genauso hoch wie die des CEA bei einer gleichzeitig hohen Spezifität; alle Patienten mit benignen Kolonerkrankungen hatten normale Serumwerte. Für das HCC liegt die Sensitivität bei 9 %; in 15 % der Fälle finden sich erhöhte Serumkonzentrationen bei benignen Lebererkrankungen (Haglund *et al.* 1992).

Gegen das Tumorantigen Ca 19-9 wurde erstmals von Magnani *et al.* 1983 ein mAk 116 NS 199 erzeugt. Dieser Antikörper reagiert mit fetalem Darmgewebe und ist in 60-80 % aller gastrointestinalen Tumoren positiv (Magnani *et al.* 1983).

CO 17-1A

Das Tumorantigen CO17-1A ist ein nicht sezerniertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa, für das mehrere Epitope beschrieben sind (Fagerberget *et al.* 1993). Da das Antigen nicht zirkuliert, sind keine Serumbestimmungen möglich.

Der Antikörper 17-1A wurde durch Immunisierung von Mäusen gegen die Rektumkarzinom-Zelllinie SW 1083 gewonnen (Herlyn *et al.* 1979). Dieser Antikörper wird bisher am häufigsten in experimentellen Therapien für gastrointestinale Tumoren eingesetzt (Woo *et al.* 1989; Amendola *et al.* 1990; Masucci *et al.* 1990; Meredith *et al.* 1991).

Ra 96

Ra 96 ist ein muzinähnliches tumorassoziertes Antigen, das sezerniert und wahrscheinlich interstitiell abgelagert wird. Das Ra 96-Antigen hat ein Molekulargewicht von $1,5 \times 10^6$ kD und liegt in glykosylierter Form vor. Das Epitop des Antigens liegt wahrscheinlich im Proteinkern des Muzins. Es ist durch Glykosidasen nicht beeinflussbar, aber empfindlich gegenüber Proteinasen.

Der gleichnamige Antikörper Ra 96 zeigte in der immunhistochemischen Austestung eine Sensitivität von 99 % für duktales Pankreaskarzinome; eine hohe Sensitivität lag außerdem für Magenkarzinome (70 %) und Kolonkarzinome (55 %) vor. Im Tierversuch konnte nach Injektion des radioaktiv markierten Antikörpers eine starke Anreicherung desselben in Pankreas- und Kolonkarzinomgeweben nachgewiesen werden (Kalthoff *et al.* 1987).

C 54-0

Das C 54-0-Antigen wird auf der Basalmembran der glatten Muskulatur, in fetalen Geweben, in adultem Pankreasgewebe und auf den Zellmembranen verschiedener epithelialer Tumoren exprimiert und nicht sezerniert. Beim Vorliegen gastrointestinaler Malignome erfolgt wahrscheinlich lediglich eine verstärkte Expression des Antigens verglichen mit der in gesundem Gewebe. Das Molekulargewicht des Antigens beträgt 122 kDa.

Der gleichnamige monoklonale Antikörper C 54-0 reagiert mit verschiedensten Tumoren, insbesondere mit Pankreas- und hepatobiliären Malignomen. In abgeschwächter Intensität erfolgt auch eine Bindung an chronisch entzündetes sowie gesundes Pankreasgewebe. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist auf die Zellmembranen beschränkt. Sowohl acinäre und endokrine Zellen als auch Fibroblasten werden nicht angefärbt (Schmiegele *et al.* 1985). Es besteht eine Kreuzreaktivität gegen eine Subpopulation lymphatischer Zellen im Knochenmark (Juhl *et al.* 1994b).

Zytokeratin

Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten, die als Polypeptide Bestandteil des Zytoskeletts der Zellen sind. Es sind 5 verschiedene Intermediärfilamente bekannt, die jeweils typisch für bestimmte Zellarten sind: Zytokeratin für epitheliale Zellen, Vimentin für mesenchymale Zellen, Desmin für Muskelzellen, Gliafilamente für Gliazellen und Neurofilamente für Neurone. Mit Hilfe von Antikörpern gegen die einzelnen Intermediärfilamente wird eine Zuordnung der Zellen zum jeweiligen embryonalen Muttergewebe möglich. Tumorzellen exprimieren ebenfalls denselben Intermediärfilament-Typ wie das gesunde Organgewebe, aus dem sie entstammen (Osborn u. Weber 1983). Auf diese Weise

kann mit dem Nachweis von epithelialen Zellen im Knochenmark, das normalerweise nur mesenchymale Zellen enthält, eine Metastasierung von epithelialen Tumoren belegt werden (Schlimok *et al.* 1987).

Der Antikörper KL-1 (IgG_{1 kappa}) reagiert mit dem Zytokeratin epithelialer Zellen. KL-1 ist streng epithelspezifisch und markiert Plattenepithelien von Epidermis und Mucosa (Moll 1986). Damit ist KL-1 zum Nachweis der Metastasierung eines gastrointestinalen Adenokarzinoms in das Knochenmark gut geeignet (Juhl *et al.* 1994b). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reaktion von KL-1 mit Peritoneallavagen, Aszites und Tumorpräparaten nicht als Detektion maligner Einzelzellen gewertet, da in diesen Materialien physiologischerweise epitheliale Zellen vorhanden sind.

1.3. Puffer und Lösungen für Zellkultur

Dulbecco's PBS	GIBCO, Wiesbaden
RPMI - 1640 Medium	GIBCO, Wiesbaden
Glutamin	GIBCO, Wiesbaden
Natrium-Pyruvat	GIBCO, Wiesbaden
Penicillin, 100 U/ml	GIBCO, Wiesbaden
Streptomycin, 100 µg/ml	GIBCO, Wiesbaden
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Wiesbaden

1.4. Zelllinien

Die Zelllinien wurden von PD Dr. H. Kalthoff, Forschungsgruppe Molekulare Onkologie, Chirurgische Universitätsklinik Kiel, zur Verfügung gestellt.

COLO 357	Pankreaskarzinom
HepG 2	Hepatozelluläres Karzinom

1.5. Weitere Materialien

Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden-Biebrecht
Maskenobjektträger	Wilke, Hamburg
Filter	0,22 µm, Millipore, Molsheim
Silikonstift (PAP PEN)	Behr, Hamburg
Kartell-Kästen	Wilke, Hamburg
Jamshidi-Kanülen	Pharmaseal, Unterschleißheim

1.6. Geräte

Mikroskop	Olympus, Hamburg
Zytozentrifuge	Shandon & Elliott, Runcorn
Microtom	Cambridge Instruments, Bielefeld
Sterilwerkbank	Heraeus, Hannover

2. Patientenkollektiv

Alle Patienten der vorliegenden Arbeit waren zur Diagnostik und Therapie in der Chirurgischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg stationär aufgenommen. Sie wurden über die Methode und Zielsetzung der Studie aufgeklärt. Von allen Patienten lag eine Einwilligung zur Entnahme von Knochenmark und zur Durchführung einer Peritoneallavage im Rahmen einer geplanten explorativen Laparotomie vor.

2.1. Malignom-Patienten

2.1.1. Zusammenfassung

Die Gruppe der untersuchten Patienten mit malignen Erkrankungen umfaßte 39 Patienten (21 Männer, 18 Frauen) mit Tumoren der Leber und Gallenblase; davon waren 11 hepatozelluläre Karzinome, 19 Lebermetastasen bei gastrointestinalen Karzinomen und einem Hypernephrom sowie 9 Tumoren der Gallenblase oder Gallenwege (5 respektive 4 Patienten). Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 58,9 Jahre (20-77).

Insgesamt wurden Aufbereitungen von 29 Peritoneallavagen, 28 Knochenmarkaspirationen, 18 Tumorschnitten und 7 Aszitesproben ausgetestet.

2.1.2. HCC

Von 11 Patienten mit einem HCC (9 Männer und 2 Frauen) konnte Untersuchungsmaterial gewonnen werden; einem Patienten wurde bei Wiedervorstellung ein zweites Mal Aszites abpunktiert. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 49 Jahre (20 - 63). Insgesamt wurden je 4 Aufbereitungen von Knochenmark, Peritoneallavage und Tumorgewebe und einmal ein an den Tumor angrenzendes Gewebe sowie 7 Ascitesproben ausgetestet. Bei 7 Patienten lagen Angaben zur Tumordifferenzierung vor; 3 Tumoren waren hoch (Grading I), 2 Tumoren mittelgradig (G II) und ein Tumor niedrig (G III) differenziert. Nach der TNM-Klassifikation wurden 2 Tumoren dem Stadium II, 3 HCC dem Stadium III, 2 Tumoren dem Stadium IVa und 2 Tumoren dem Stadium IVb zugeordnet. Bei 5 der 11 Patienten wurde zum Untersuchungszeitpunkt eine chirurgische Therapie des HCC vorgenommen. In 4 Fällen konnte der Tumor vollständig im Gesunden entfernt werden (R_0 -Resektion), bei einem

Patienten waren histologisch Malignomzellen an den Resektionsrändern nachweisbar (R₁-Resektion).

Von insgesamt 11 Histologien wurde in zwei Fällen die fibrolamelläre Variante des HCC diagnostiziert. Diese Tumoren waren groß (>10cm), das Bilirubin betrug <1mg/dl, es lagen keine Leberzirrhose und kein Aszites vor. Die Anamnese dieser Patienten war leer bezüglich Alkoholabusus und Hepatitiden.

Die Serumwerte von mindestens einem der Tumormarker AFP, CEA und Ca 19-9 lagen bei 9 Patienten vor. Eine Erhöhung des AFP war in 7 von 9 Fällen nachweisbar. Bei 5 von 7 Patienten war das Ca 19-9 im Serum erhöht, in zwei dieser Fälle bei einem AFP-Wert im Normbereich. Der Marker CEA war bei einem von 7 Patienten erhöht.

Von 9 der 11 Patienten war eine Hepatitis-Serologie bekannt; 4 Patienten waren HBV-positiv, in 2 Fällen lag eine chronisch aggressive HCV-Infektion vor und bei einem Patienten war eine frühere HAV-Infektion nachzuweisen. In 7 von 11 Fällen wurde eine Leberzirrhose diagnostiziert. Bei 3 Patienten war ein Alkoholabusus bekannt, zwei dieser Patienten hatten zusätzlich eine HBV-Infektion durchgemacht. In 2 Fällen handelte es sich um eine alkoholunabhängige HBV-Zirrhose. Beide Patienten mit positiver HCV-Serologie hatten eine Zirrhose mit ausgeprägtem Aszites bei leerer Alkoholanamnese.

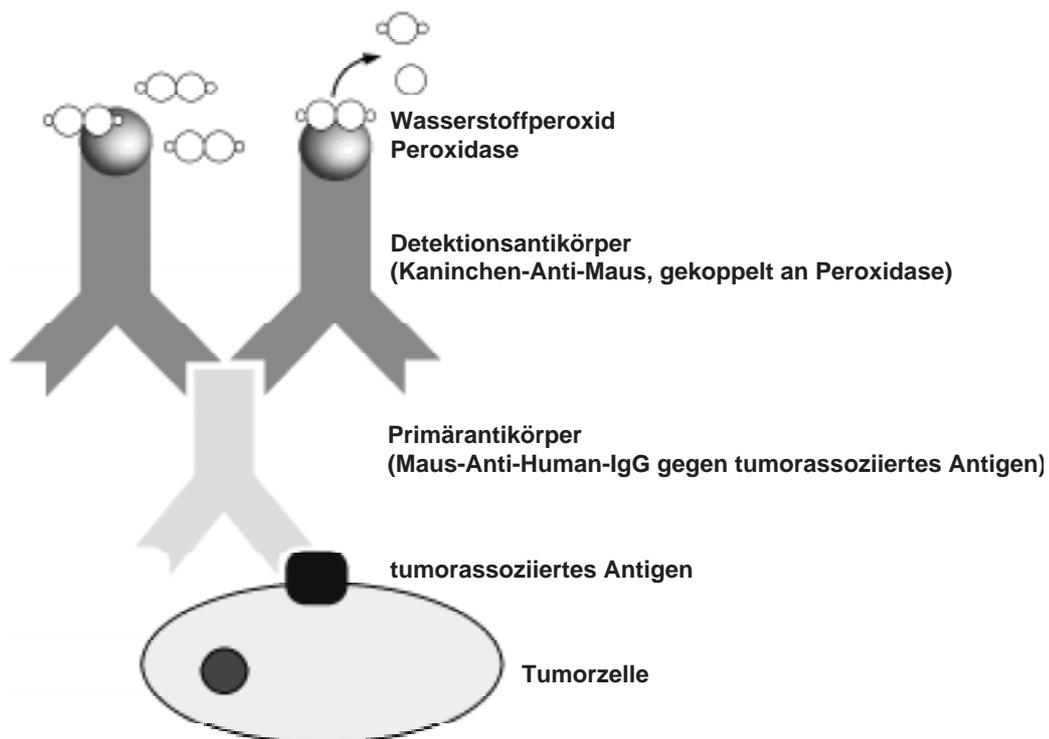


Abb. 1: Prinzip der verwendeten Färbemethode. Antikörper gegen ein spezifisches tumorassoziertes Antigen aus der Maus werden auf die Aufbereitung gegeben, anschließend peroxidasegekoppelte Antikörper gegen Maus-Immunglobulin aus Kaninchen. Dies ermöglicht die Spaltung von Wasserstoffperoxid, was wiederum bei DAB (3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) einen Farbumschlag nach braun bewirkt.

2.1.3. Lebermetastasen

Insgesamt wurden Materialien von 19 Patienten (8 Männer und 11 Frauen) untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 61,7 Jahre (48 - 77). Es wurden je 16 Knochenmark- und Lavage-Aufbereitungen, 10 Tumorgewebe und einmal ein an den Tumor angrenzendes Gewebe ausgetestet.

Bei 15 Patienten mit Lebermetastasen bei Kolonkarzinom wurde eine R_0 -Resektion der Metastase(n) durchgeführt, je einmal eine R_1 - bzw. eine R_2 -Resektion. Alle Metastasen waren mittelgradig differenziert (G II); bei 5 Patienten waren die Filiae bereits bei der Erstdiagnose des Kolontumors diagnostiziert worden. In einem Fall war der Primärtumor ein Hypernephrom, die Lebermetastase war hoch differenziert (G I). Ein weiterer Patient litt an einem metastasierenden Magen-Karzinom; die Metastasen waren mittelgradig differenziert und konnten nicht vollständig entfernt werden (R_2 -Resektion).

2.1.4. Klatskin-Tumoren

Insgesamt wurden 5 Patienten untersucht (3 Männer und 2 Frauen). Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 62 Jahre (57 - 66). Bei allen Patienten wurden eine Peritoneallavage und eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. In 2 Fällen konnte zusätzlich Tumorgewebe ausgetestet werden. Von 4 Patienten lag eine Einteilung nach dem TNM-Schema vor. Die Tumoren wurden als $T_2 N_0 M_0$, $T_2 N_1 M_1$, $T_3 N_1 M_1$ und $T_4 N_2 M_1$ klassifiziert. Histologisch wurden alle Klatskin-Tumoren als mittelgradig differenziert (G II) eingestuft.

Bei allen Patienten wurde eine chirurgische Therapie durchgeführt. In 2 Fällen konnte der Tumor vollständig entfernt werden (R_0 -Resektion), je einmal verblieben mikroskopisch bzw. makroskopisch Tumorreste (R_1 - und R_2 -Resektion). Von einem Patienten liegen keine Angaben über die Resezierbarkeit des Tumors vor. Von 4 Patienten lagen Serumwerte der Tumormarker AFP, CEA und Ca 19-9 vor. Die Konzentrationen von AFP und CEA lagen im Normbereich, während Ca 19-9 in allen Fällen erhöht war.

2.1.5. Gallenblasenkarzinome

Insgesamt wurden 4 Patienten (1 Mann und 3 Frauen) untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 68 Jahre (54 - 77). Es wurden 3 Knochenmarkaufbereitungen, 4 Peritoneallavagen und 2 Tumorgewebe ausgetestet.

In jedem Fall lag bereits zum Zeitpunkt der Operation eine Metastasierung vor. Die Einteilung nach der TNM-Klassifikation ergab $T_2 N_0 M_1$, $T_3 N_1 M_1$, $T_4 N_1 M_1$ und $T_4 N_2 M_1$. Die Tumoren waren mittelgradig bis niedrig differenziert (G II-III). Bei allen Patienten wurden R_2 -

Resektionen durchgeführt. Der Tumormarker Ca 19-9 war im Serum aller Patienten erhöht, während CEA und AFP im Normbereich lagen.

2.2. Kontrollgruppe

Insgesamt wurden 19 Patienten (10 Männer und 9 Frauen) untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 49,7 Jahre (26 - 65).

Eine Knochenmarkaspiration (8 Patienten) und/oder Peritoneallavage (11 Patienten) wurde bei insgesamt 12 Patienten durchgeführt, die aufgrund benigner Krankheitsbilder einer Laparotomie unterzogen wurden. Die Diagnosen umfaßten Achalasie, Ulcus duodeni, Leberzysten, arterio-mesenteriales Kompressionssyndrom, Stuhlinkontinenz, Hypersplenismus, chronische Pankreatitis, Sigma-Divertikulitis sowie einen inflammatorischen Lebertumor und einen zystischen Peritonealtumor. Pathohistologisch war in allen Fällen ein aktuelles malignes Geschehen ausgeschlossen worden. Von 7 Patienten konnte Aszites untersucht werden; die Grunderkrankung war in 6 Fällen eine äthyltoxische Leberzirrhose und bei einem Patienten eine primäre biliäre Zirrhose.

3. Versuche zur Methode

3.1. Bestimmung der Antikörperkonzentrationen

Die verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in mehreren Konzentrationsstufen von 1:10 bis 1:1000 mit 1%iger BSA verdünnt. Die besten Farbreaktionen wurden bei einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml (c=1:100) erzielt.

3.2. Bestimmung der Zellverluste

3.2.1. Zellverluste durch die Dichtegradientenzentrifugation

Die Pankreaskarzinom-Zelllinie Colo 357 wurde in RPMI-Medium suspendiert und eine Verdünnungsreihe mit Zellzahlen von $0,5 \times 10^6$, 10^5 , $0,5 \times 10^5$ und 10^4 Zellen/ml mittels Neubauer-Zählkammer erstellt. Anschließend wurden je 3 ml der Zellsuspensionen auf je 7 ml Ficoll-Paque® pipettiert und dieses Gemisch bei 1500 U/min für 30 min zentrifugiert. Die erste Phase des Trenngemisches wurde abpipettiert und 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet erneut in Medium suspendiert.

Um für die immunzytologische Färbung eine konstante Zellzahl pro Objektträger zu gewährleisten, wurde mit der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ml in den Aufbereitungen vom Knochenmark und von der Peritoneallavage bestimmt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Tryptanblau in beide Kammern gefüllt. Nach der Auszählung aller vier Felder konnte die Zellzahl in der Aufbereitung mit folgender Formel berechnet werden: ausgezählte Zellen : $4 \times 2 \times 10^4 =$ Zellzahl/ml. Für das Knochenmark ergab sich ein Volumen

von 50-150 µl Zellsuspension pro Objektträger, für die Peritoneallavage wurden 150-500 µl pro Objektträger benötigt.

3.2.2. Zellverluste nach der Zytozentrifugation

Von der Pankreaskarzinom-Zelllinie Colo 357 wurden nach der Dichtezentrifugation mit Ficoll-Paque® (wie unter 3.2.1. beschrieben) die Zellen in RPMI-Medium suspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit 10^6 , 10^5 , 10^4 und $0,5 \times 10^4$ Zellen je Milliliter erstellt. Dann wurden die Zellsuspensionen in der Zytozentrifuge 5 min mit 1000 U/min zentrifugiert und danach die verbliebene Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4. Gewinnung der Materialien vom Patienten

4.1. Gewinnung von Knochenmark

Der narkotisierte Patient wurde zu Operationsbeginn mit einer Jamshid®-Kanüle in der rechten Spina iliaca anterior punktiert. Es wurden 6-8 ml Aspirat abgezogen, die Gerinnung wurde mittels Citrat-Zusatz geblockt und das Aspirat anschließend 1:4 mit PBS verdünnt.

Zur Abtrennung der Erythrozyten von den mononukleären Zellen wurde dann eine Zentrifugation über einen Dichtegradienten durchgeführt. Hierzu wurden in 10 ml-Röhrchen auf 7 ml Ficoll-Paque® Lösung 3 ml des Aspiratgemisches pipettiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation mit 1500 U/min wurde die erste Phase mittels Pasteurpipette abgesaugt und in ein steriles Röhrchen pipettiert. Dies Gemisch wurde mit 1000 U/min 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 15 ml Medium vorsichtig durchmischt; die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgte in der Zellkultur und mittels Zytozentrifugation auf Glasobjektträger.

4.2. Gewinnung der Peritoneallavage

Unmittelbar nach dem Eröffnen der Bauchhöhle des Patienten wurde eine Spülung des Bauchraumes mit 1 Liter physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Die Lavageflüssigkeit wurde in einen sterilen Behälter abgesaugt. Um die in der Lösung enthaltenen Zellen zu sedimentieren, wurde die Lavageflüssigkeit 10 Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde wie unter 3.1. beschrieben eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque® Lösung durchgeführt. Die weitere Aufbereitung der Zellen erfolgte ebenfalls in Zellkultur und durch Zytozentrifugation auf Glasobjektträger.

4.3. Präparierung von Tumorgewebe und Grenzgewebe

Aus dem intraoperativ entnommenen Tumorpräparat wurde nach Begutachtung durch einen Pathologen ein ca. 1 cm³ großes Gewebstück sofort in flüssigem Stickstoff bei -195,8 °C schockgefroren. Mit einem Microtom wurden von dem tiefgefrorenen Tumorgewebe 6 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgetragen. Diese wurden dann 10 Minuten in Aceton fixiert und vakuumverschweißt bei -20 °C gelagert. Von jedem Tumorpräparat wurden auf diese Weise je 25 Gefrierschnitte angefertigt.

Von 2 Patienten konnte Grenzgewebe ausgetestet werden. Dieses Gewebe umgab den Tumor und war makroskopisch und pathohistologisch als nicht infiltriertes, gesundes Lebergewebe klassifiziert worden. Es wurde auf die gleiche Weise wie das Tumorgewebe aufgearbeitet.

4.4. Aszites

Unter sterilen Bedingungen wurde den Patienten im Rahmen diagnostischer und/oder therapeutischer Maßnahmen Aszites abpunktiert. Pro Patient wurde ca. 1 Liter Aszites in einem sterilen Behältnis aufgefangen und wie unter 3.2. beschrieben weiter verarbeitet.

5. Aufbereitung von Knochenmark, Peritoneallavage und Aszites

5.1. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe einer Zytozentrifuge auf Glasobjektträger aufgebracht. Pro Objektträger betrug die Zellzahl etwa 2×10^5 Zellen. Mit der Zytozentrifuge wurde 5 Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert. Die Objektträger wurden luftgetrocknet, 5 Minuten in Aceton fixiert und in vakuumverschweißten Kartell®-Kästen bei -20°C bis zur Durchführung der Immunfärbung gelagert.

5.2. Anlegen von Zellkulturen

Von einem Teil der Zellsuspensionen aus den Knochenmark-, Peritoneallavage- und Aszitesproben wurden Zellkulturen angelegt. Diese Arbeiten wurden an der sterilen Werkbank unter laminarem Flow durchgeführt. Jeweils 1,5 ml der Zelllösung wurde mit 2,0 ml Medium in eine Zellkulturflasche pipettiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 37°C. Dem Medium RPMI-1640 wurden 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt; dieses Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach ca. 3 Wochen waren die Zellen in der Regel konfluiert, so daß sie in eine größere Zellkulturflasche ausgesät werden konnten. Hierzu wurde der Zellrasen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin,

0,02 % EDTA) in PBS vom Boden der Zellkulturflasche gelöst; die Trypsin-Lösung wurde durch mehrmaliges Waschen der Suspension mit Medium aus der Zelllösung entfernt und diese erneut in eine Zellkulturflasche pipettiert. Wenn auf diese Weise eine ausreichende Zelldichte erreicht war, wurden die Zellen für zwei Tage auf Maskenobjektträger kultiviert, dreimal mit PBS gewaschen, luftgetrocknet und 5 Minuten in Aceton fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit der indirekten Immunperoxidase-Technik gefärbt.

6. Immunchemische Färbung

6.1. Prinzip der indirekten Immunperoxidase-Färbung

Es wurde die von Gerdes, Chess und Hajdu entwickelte Methode (Gerdes 1985; Chess u. Hajdu 1986) in modifizierter Form angewendet.

Zunächst wurde der Primärantikörper aufgebracht, der gegen das tumorassoziierte Antigen auf der Zelloberfläche der Malignomzelle gerichtet ist - in der vorliegenden Arbeit ein monoklonaler Maus-antiHuman-IgG-Antikörper (bzw. für AFP ein monoklonaler Kaninchen-antiHuman-IgG-Antikörper). Als Detektionsantikörper wurde anschließend ein Kaninchen-antiMaus-Antikörper (bzw. ein Ziege-antiKaninchen-Antikörper) aufgetragen, die das Enzym Peroxidase tragen. Wurden diese Antikörper gebunden, was ein Vorhandensein des tumorassoziierten Antigens voraussetzt, erfolgte bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Spaltung des Substrates durch das Enzym. Dies wurde durch eine Braunfärbung des 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) in der entsprechenden Zelle belegt. Die Farbreaktion konnte durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun besser sichtbar gemacht werden (Abb. 1).

6.2. Durchführung der Färbung

Als Negativkontrolle für die monoklonalen Antikörper wurde bei jeder Färbung je ein Präparat mit BSA anstelle des Primärantikörpers versetzt; als Positivkontrollen wurden bei jeder Färbung die Tumorzelllinien COLO 357 und HepG 2 mitgeführt.

Zunächst erfolgte eine Fixierung der Zellen mit Aceton. Die Kryostatpräparate wurden 10 Minuten, die Zytospinpräparate und Maskenobjektträger 5 Minuten fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mittels 0.3 % Wasserstoffperoxid in Methanol 20 Minuten geblockt. Die Präparate auf den Objektträgern wurden dann mit einem Silikonstift umzeichnet, um das korrekte Auftragen der Substanzen zu erleichtern.

Die Primärantikörper (Kaninchen-antiHuman-Ig für AFP, Maus-antiHuman-Ig für alle anderen Tumormarker) wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml angewendet; es wurden je 100 µl auf die Zytospinobjektträger und Kryostatschnitte sowie 50 µl auf die Maskenobjektträger pipettiert. Dies wirkte in der feuchten Kammer 16 Stunden bei 4°C (Objektträger) bzw. 2 Stunden bei Raumtemperatur (Kryostatschnitte) ein. Anschließend wurden die nicht

gebundenen Antikörper mit einer PBS-Pufferlösung ausgewaschen. Der Puffer wurde mit 400g NaCl, 10g KCl, 73,5g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10g KH_2PO_4 auf 5 Liter destilliertes Wasser hergestellt und auf einen pH von 7,5 eingestellt. Die Präparate wurden vorsichtig mit dieser Lösung abgespritzt und jeweils in drei Behälter mit PBS-Puffer eingetaucht. Der Detektionsantikörper (Ziege-antiKaninchen-Ig für AFP, Kaninchen-antiMaus-Ig für alle anderen Tumormarker) wurde mit 10%igem defibrinisierten ABO-Serum verdünnt und in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Es wurden wieder 100 μl pro Objektträger und Kryostatschnitt sowie 50 μl pro Maskenobjektträger aufgetragen, und der Antikörper wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der nicht gebundene Anteil wie oben beschrieben mit PBS-Puffer ausgewaschen. Dann wurde das Substrat hergestellt. Dazu wurde DAB in 50 mM Tris auf einen pH von 7,4 eingestellt und durch einen 0,22 μm Filter filtriert. Von dieser DAB-Lösung wurden 3 ml mit 5 μl 30%igem H_2O_2 vermischt und 100 μl pro Objektträger aufgetragen. Das Substrat inkubierte 10-20 Minuten bei Raumtemperatur, bis eine deutliche Braunfärbung der Positivkontrollen eintrat. Anschließend wurden nicht gebundene Anteile wie oben beschrieben mit PBS-Puffer ausgewaschen. Zur Gegenfärbung wurde Mayer's Hämalaunlösung verwendet. Die Lösung wurde frisch filtriert und 1:3 mit Leitungswasser verdünnt. Die Objektträger wurden 1 Minute gefärbt, dann zweimal 10 Minuten in Leitungswasser nachgebläut und 10 Sekunden in Aqua dest getaucht. Nach der Lufttrocknung wurden die Präparate mit Eukitt eingedeckelt und dann mikroskopisch beurteilt.

7. Auswertung der Färbung

Von jedem Patienten wurden alle vorhandenen Materialien mit allen verwendeten monoklonalen Antikörpern ausgetestet. Pro Antikörper und Material wurde ein Objektträger gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Jeder Objektträger wurde von zwei Untersuchern unabhängig voneinander beurteilt, wobei der Primärtumor und das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Auswertung nicht bekannt waren.

Ein Präparat wurde dann als „positiv“ bewertet - d.h. mikrometastatische Einzelzellen waren nachweisbar -, wenn mindestens ein monoklonaler Antikörper mit wenigstens einer Zelle auf dem Objektträger eine Farbreaktion zeigte. Die Intensität der Farbreaktion wurde in starke, mittelstarke und schwache Färbung eingeteilt.

C. Ergebnisse

Von 39 Patienten mit malignen Tumoren der Leber und Gallenblase sowie 19 Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen als Kontrollgruppen wurden insgesamt 40 Peritoneallavagen, 36 Knochenmarkproben, 18 Tumorpräparate und 13 Asziteszytologien untersucht. In der Auswertung von Peritoneallavagen, Tumorpräparaten und Aszites wurde der mAk KL-1 nicht berücksichtigt, da in diesen Materialien mit dem Vorhandensein nichtmaligner epithelialer Zellen zu rechnen ist. Von dem Antikörper C 54-0 wurde vereinzelt eine Kreuzreaktivität mit einer Leukozyten-Subpopulation des Knochenmarkes beschrieben (Schmiegel *et al.* 1985), daher wurde dieser für Knochenmarkproben ebenfalls nicht gewertet.

1. Zellwiederfindungsrate und Negativkontrollen

Die Vorversuche zur Methodik erbrachten für die monoklonalen Antikörper eine optimale Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$, bei der eine kräftige Färbung der Tumorzelllinien erfolgte, ohne daß eine störende Hintergrundfärbung auftrat. Die Negativkontrollen, bei denen als Antigen Bovines Serumalbumin aufgetragen wurde, wurden bei diesen Antikörperkonzentrationen nicht unspezifisch gefärbt. Die Zellverluste nach der Dichtezentrifugation mit Ficoll-Paque® und der Zytozentrifugation lagen in vier Verdünnungsstufen ($0,5 \times 10^6$, 1×10^5 , $0,5 \times 10^5$ und 1×10^4 Zellen/ml) bei durchschnittlich 15 %.

2. Malignome

2.1. Übersicht

Es wurden Aufbereitungen von 29 Peritoneallavagen, 28 Knochenmarkaspirationen, 18 Tumorschnitten und 6 Aszitesproben von 11 Patienten mit HCC, 19 Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren, 5 Patienten mit Klatskintumoren und 4 Patienten mit Gallenblasenkarzinomen ausgetestet (Abb. 2).

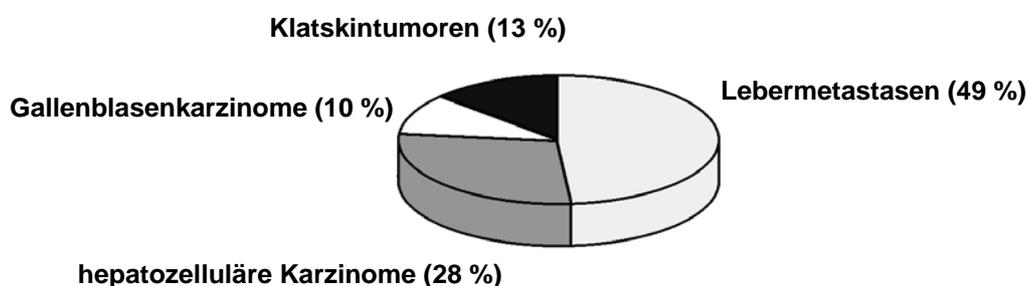


Abb. 2: Anteil der verschiedenen Malignome an den Aufbereitungen. Von 39 untersuchten Malignomen waren 19 Lebermetastasen, 11 hepatozelluläre Karzinome, 4 Gallenblasenkarzinome und 5 Klatskintumoren.

Bei 59 % der Patienten (23/39) konnte in mindestens einer Aufbereitung mikrometastatische Einzelzellen nachgewiesen werden.

In der Gesamtauswertung aller Tumormarker reagierten die Aufbereitungen von 52 % der Peritoneallavagen (15/29), 46 % der Knochenmarkaspirationen (13/28), 33 % der Aszitesproben (2/6) und 94 % der Tumorgewebe (17/18) mit mindestens einem Antikörper positiv. Bei 24 Patienten konnte sowohl Peritoneallavage als auch Knochenmark untersucht werden. In 17 dieser Fälle

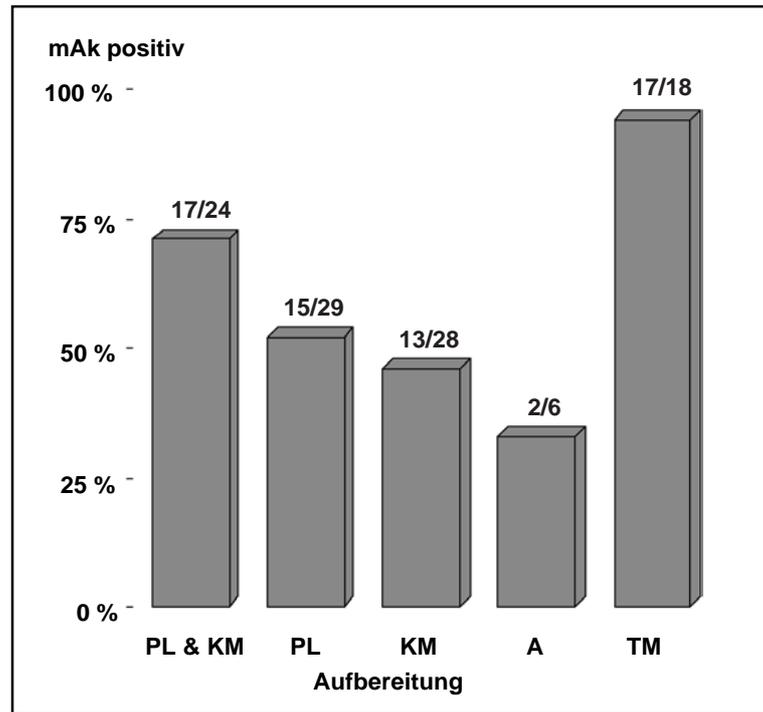


Abb. 3: Übersicht über die Detektionsrate von Tumoreinzelzellen in den Aufbereitungen. PL: Peritoneallavage, KM: Knochenmark, PL&KM: Patienten, von denen beide Kompartimente ausgetestet werden konnten, A: Aszites, TM: Tumor. Nicht gewertet wurde KL-1 in PL und TM sowie C 54-0 im KM. Die Zahlen über den Balken geben die absoluten Zahlen der Proben wieder.

(71 %) war mindestens eine der beiden Aufbereitungen positiv (Abb. 3). Die Detektionsrate von Mikrometastasenzellen zeigte Unterschiede für die einzelnen Tumorarten. So konnten bei 45 % der HCC-Patienten (5/11), bei 58 % der Patienten mit Lebermetastasen (11/19), bei 80 % der Klatskintumor-Patienten (4/5) und bei 75 % der Gallenblasenkarzinom-Patienten (3/4) mikrometastatische Einzelzellen detektiert werden (Abb. 4).

Betrachtet man die Sensitivität der Antikörper in den einzelnen Materialien, ergibt sich die folgende Verteilung: Im Knochenmark war KL-1 am häufigsten positiv (36 % der Proben, 10/28 Fälle). Ca 19-9 reagierte in 29 % (8/28) und AFP in 7 % (2/28). Die Antikörper Ra 96, 17-1A und C1 P83 färbten keine der Knochenmarkaufbereitungen. Die Peritoneallavage wurde weitaus am häufigsten von Ca 19-9 gefärbt (31 % der Proben, 9/29). C 54-0 färbte 14 % der Aufbereitungen (4/29) und C1 P83 10 % (3/29). Selten positiv waren die Antikörper AFP (7 %, 2/29) und 17-1A (3 %, 1/29). Erwartungsgemäß färbte der mAk KL-1 einzelne Zellen in allen Peritonellavagen (Abb. 5 und 6).

Von allen Lavage- und Knochenmarkaufbereitungen sowie vom Aszites wurden Zellkulturen angelegt. Eine Anzüchtung vitaler Zellen gelang in 27 % der Fälle (18 von 66 Zellkulturen). Unter lichtmikroskopischer Kontrolle ließ sich bis auf die unten beschriebene Ausnahme in

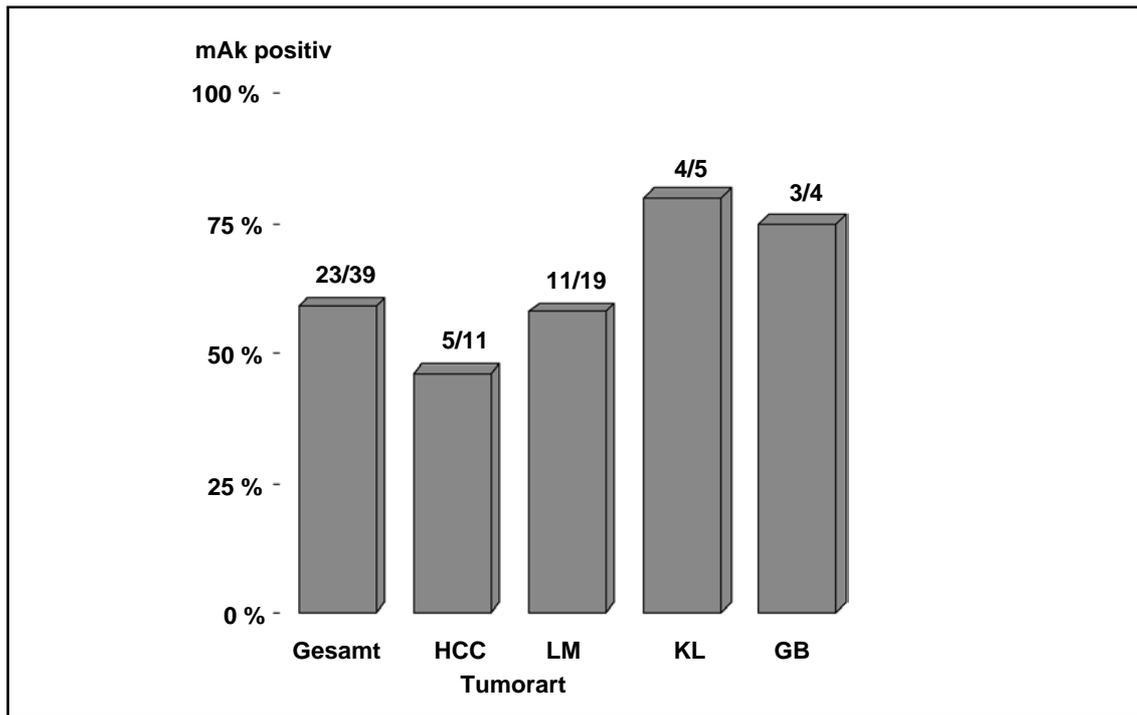


Abb. 4: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Aufbereitungen; aufgeschlüsselt nach Tumorarten. Gesamt: Alle Tumoren, HCC: hepatozelluläres Karzinom, LM: Lebermetastasen, KL: Klatskintumoren, GB: Gallenblasentumoren. Die Zahlen über den Balken geben die absoluten Zahlen der Proben wieder.

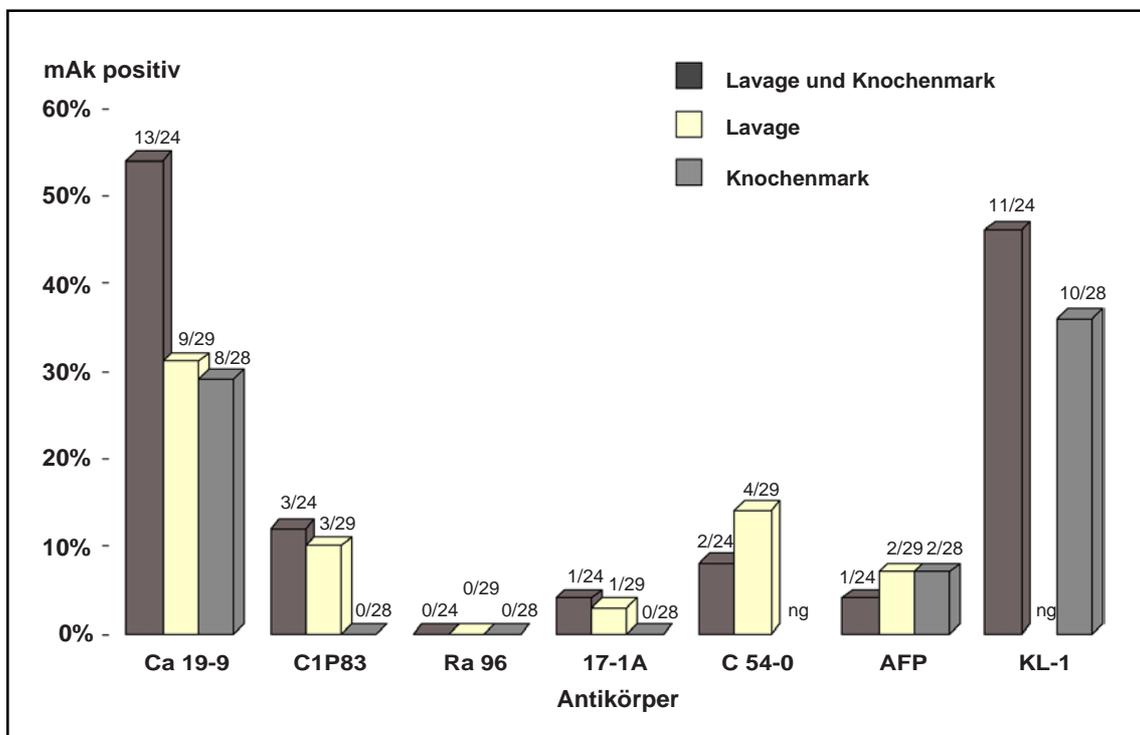


Abb. 5: Detektionsrate von Tumoreinzellen durch die verwendeten Antikörper; aufgeschlüsselt nach Aufbereitungen. Ng: nicht gewertet - KL-1 in der Peritoneallavage, C 54-0 im Knochenmark. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

allen Fällen ein ausgeprägtes Fibroblastenwachstum feststellen. In diesen Zellkulturen waren die verwendeten Antikörper negativ. Bei einem metastasierten Klatskin-Tumor gelang aus beiden Aufbereitungen die Anzüchtung einer permanenten Tumorzelllinie. Die Reaktion der Antikörper in diesen Kulturen entsprach der in den vom Patienten gewonnenen Materialien (Ca 19-9 in der Lavage und Lavage-Kultur, KL-1 im Knochenmark und in der Knochenmarkkultur).

Insgesamt wurden 18 Tumorpräparate aufgear-

beitet. Prinzipiell waren alle verwendeten Tumormarker in der Lage, mit den untersuchten Tumoren zu reagieren. Ca 19-9 war am häufigsten positiv (83 %, 15/18), C1 P83 in 67 % (12/18). Die Antikörper Ra 96 und C 54-0 färbten jeweils 39 % der Präparate (7/18), die Marker AFP und 17-1A je 22 % (4/18). Erwartungsgemäß färbte KL-1 alle Tumorpräparate an.

Eine Übereinstimmung des Antikörperprofils im Tumorgewebe mit dem im zugehörigen Knochenmark und/oder in der Peritoneallavage war bei 53 % der Patienten zu verzeichnen (9/17). In jedem dieser Fälle waren die Tumormarker Ca 19-9, C1 P83, C 54-0 oder Kombinationen aus ihnen positiv.

In zwei Fällen wurde zusätzlich Gewebe aufgearbeitet, das an den Tumor grenzte und histopathologisch als nicht infiltrierte Leberparenchym bewertet worden war. In einem Fall (Patient 59 mit Lebermetastase bei kolorektalem Karzinom) war das Präparat auch für die verwendeten Tumormarker negativ. Das Grenzgewebe des zweiten Falles (Patient 58 mit HCC) war in der immunologischen Anfärbung positiv für Ca 19-9. Das entsprach der Reaktion des zugehörigen Tumorgewebes, das mit Ca 19-9 und Ra 96 anfärbbar war.

Von sechs Patienten mit hepatozellulärem Karzinom konnte Aszites gewonnen und aufgearbeitet werden. Alle Präparate waren erwartungsgemäß positiv für KL-1. In 2 Fällen (33 %) färbte AFP Einzelzellen an. Die übrigen Antikörper zeigten keine Reaktion.

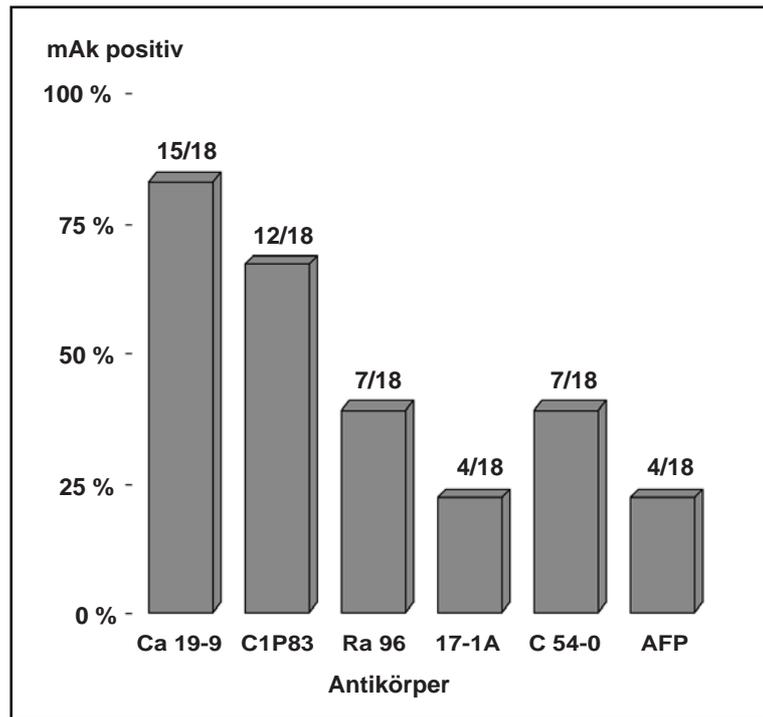


Abb. 6: Übersicht über die Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Aufbereitungen; aufgeschlüsselt nach den verwendeten Antikörpern. Die Zahlen über den Balken geben die absoluten Zahlen der Proben wieder.

2.2. Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Parametern

2.2.1. Korrelation zur Resektabilität

Der Nachweis von Mikrometastasen-Zellen gelang bei 70 % Patienten (16/23), die mit kurativer Zielsetzung operiert wurden. Bei 5 der 8 Patienten (63 %), deren Tumor makroskopisch nicht vollständig entfernt werden konnte, war eine Tumorzell dissemination nachweisbar.

2.2.2. Korrelation zum Grading

In der Gruppe der gut differenzierten Malignome (G I) wurde bei 60 % der Patienten (3/5) in der der mittelgradig differenzierten (G II) bei 76 % der Patienten (19/25) eine Tumorzell dissemination nachgewiesen. Bei den als niedrig differenziert eingestuften Tumoren (G III) waren in einem der drei Fälle Mikrometastasen-Zellen zu detektieren (Abb. 7).

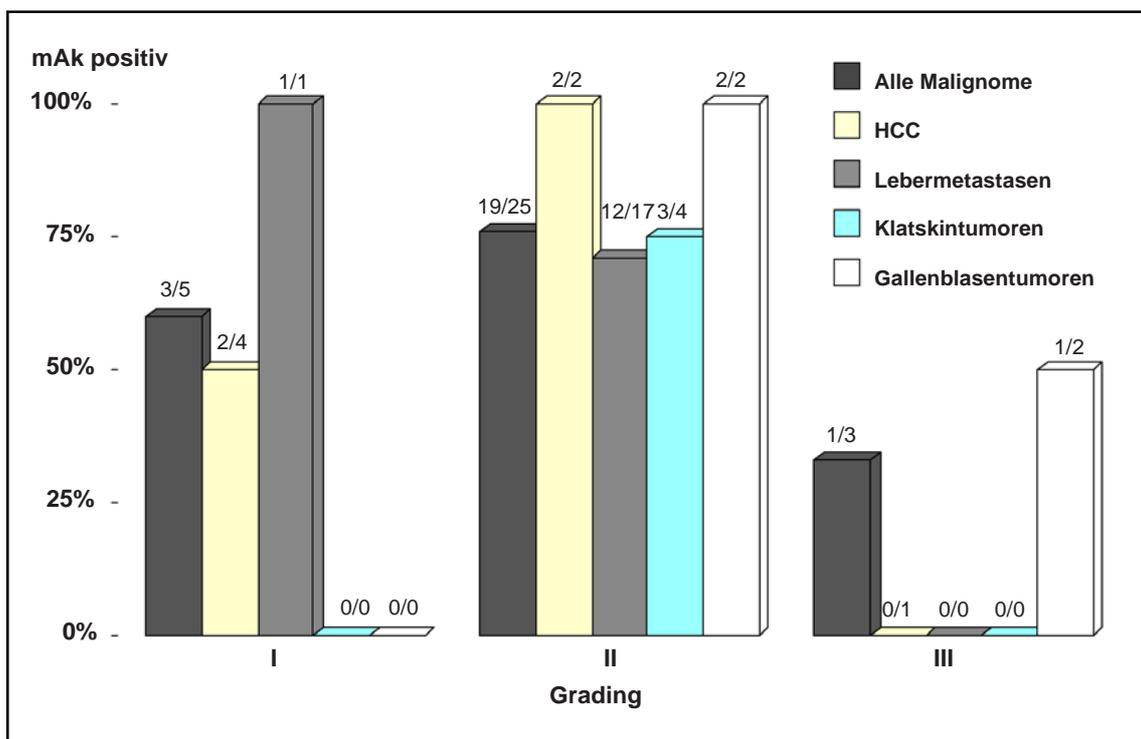


Abb. 7: Detektionsrate von Tumoreinzelzellen in Abhängigkeit vom Grading. I: gut differenziert, II: mittelgradig differenziert, III: niedrig differenziert. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

2.2.3. Korrelation zum TNM-System

Von 17 der 20 primären Lebermalignomen und Gallenblasenkarzinomen lag eine Einteilung nach dem TNM-Schema vor. Im Stadium II ($T_2N_0M_0$) befanden sich zwei HCC und ein Klatskintumor; bei allen drei Tumoren konnten in den Aufbereitungen (3 Aszitesproben, 2 Knochenmarkaufbereitungen und 1 Peritoneallavage) keine Tumoreinzelnzellen detektiert werden.

Das Stadium III ($T_3N_0M_0$) erfüllten drei HCC. Bei zwei der drei Patienten konnte in den Aufbereitungen eine Tumorzellaussaat nachgewiesen werden (1 Aszitesprobe, 1 Knochenmarkprobe und 1 Peritoneallavage). Insgesamt 11 Patienten hatten eine Malignomerkrankung im Stadium IV. Davon waren je 4 ein HCC bzw. ein Gallenblasenkarzinom und 3 Klatskintumoren. In 7 dieser 11 Fälle war in mindestens einer Aufbereitung eine Tumorzelldisseminierung festzustellen (Abb. 8).

2.3. HCC

Von 11 Patienten mit HCC konnte Untersuchungsmaterial gewonnen werden. Insgesamt wurden je 4 Aufbereitungen von Knochenmark, Peritoneallavage und Tumorgewebe, einmal an den Tumor angrenzendes Gewebe und 7 Aszitesproben untersucht. Bei 45 % der Patienten (5/11) wurden Tumoreinzelnzellen in mindestens einer Materialprobe gefunden. Die Knochen-

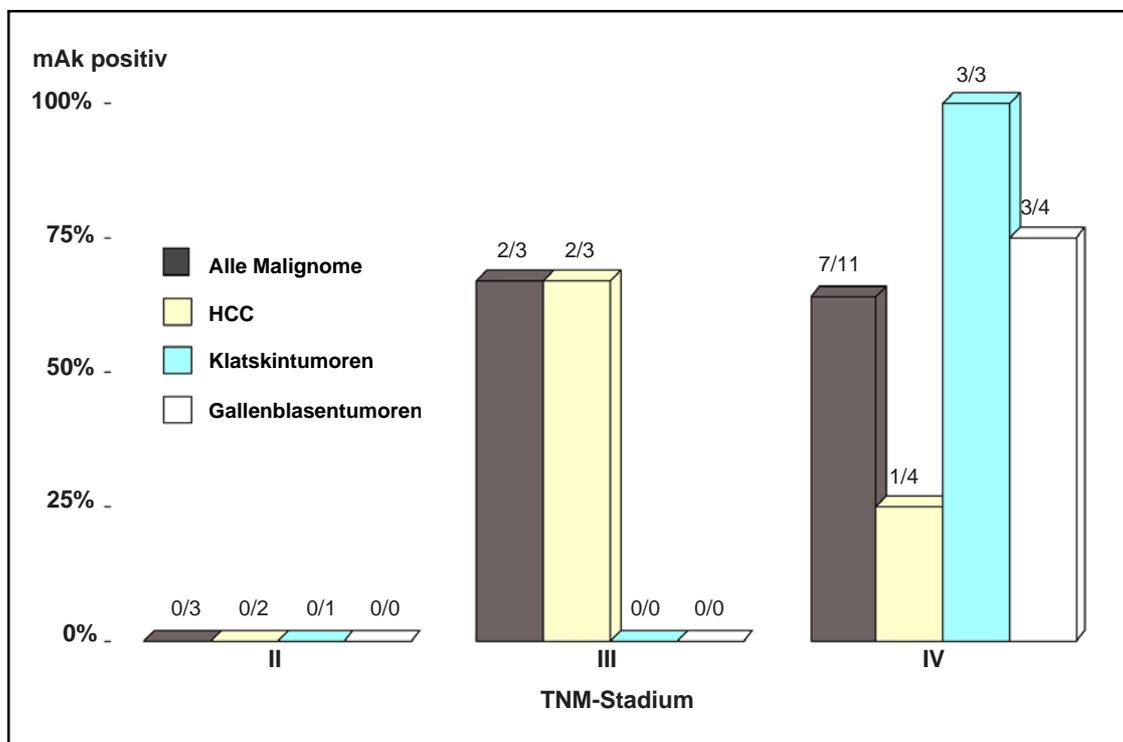


Abb. 8: Detektionsrate von Tumoreinzelnzellen in Abhängigkeit vom TNM-Stadium. Lebermetastasen wurden nicht berücksichtigt. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

mark- und Lavage-Präparate dieser Patienten waren zu je 50 % positiv für einen oder mehrere Antikörper.

Von 4 untersuchten Tumorgeweben waren 3 positiv. In einem Fall wurde zusätzlich Tumorrangewebe ausgetestet, das mikroskopisch als nicht infiltriert beurteilt worden war. In der Immunzytochemie war es wie das zugehörige Tumorgewebe mit Ca 19-9 anfärbbar.

Bei 6 Patienten konnten mindestens zwei Aufbereitungen (Peritoneallavage, Knochenmark, Tumorgewebe, Aszites) untersucht werden. Bei zwei dieser Patienten fanden sich in allen untersuchten Materialien Tumoreinzellen (Pat. Nr. 5 und 33).

Die Aszites-Aufbereitungen waren in 29 % der Fälle (2/7) positiv.

Die Proben der HCC-Patienten waren nur für die Tumormarker Ca 19-9, KL-1, Ra 96 und AFP positiv. Ca 19-9 färbte alle Materialarten mit Ausnahme der Aszitesaufbereitungen mit guter Intensität. Ra 96 färbte einen Tumor. Der Antikörper AFP reagierte als einziger der verwendeten Antikörper mit Tumorzellen im Aszites. Die AFP-Färbungen der Lavage und des Tumorgewebes waren wesentlich schwächer ausgeprägt als die der übrigen Antikörper in diesen Materialien.

In den einzelnen Aufbereitungen reagierten folgende Antikörper: Die Knochenmarkaufbereitungen waren positiv für die mAk KL-1 (2/4 Proben) und Ca 19-9 (1/4 Proben). Die Lavage wurde in 2 von 4 Proben durch mAk angefärbt. Je einmal reagierten Ca 19-9 und AFP,

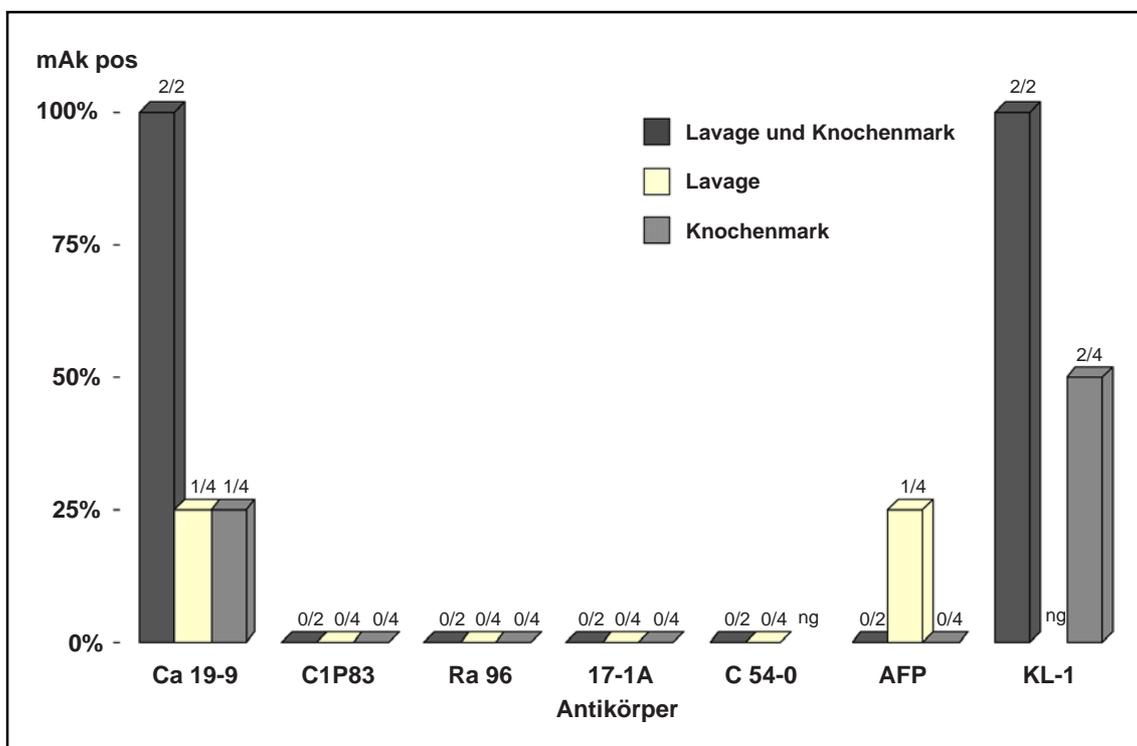


Abb. 9: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom; aufgeschlüsselt nach Antikörpern. Ng: nicht gewertet - KL-1 in der Peritoneallavage, C 54-0 im Knochenmark. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

alle anderen Antikörper waren negativ (Abb. 9). In allen Aszitespunktaten war erwartungsgemäß der Zytokeratinmarker KL-1 positiv. Die Aszitesproben wurden in 29 % der Fälle (2/7) durch AFP angefärbt; alle anderen Antikörper reagierten nicht (Abb. 10). Von den 4 untersuchten Tumorgeweben wurden 2 durch Ca 19-9 angefärbt, davon einmal in Kombination mit Ra 96 (Abb. 11). In einem anderen Fall war nur AFP positiv. Ein Tumorgewebe war negativ für alle verwendeten Marker.

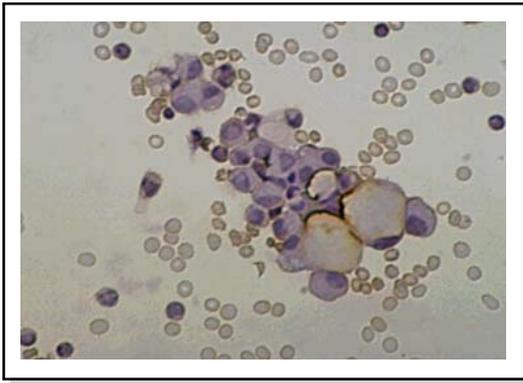


Abb. 10: Aszites-Präparat eines HCC-Patienten. Die Tumorzellen sind mit AFP angefärbt.

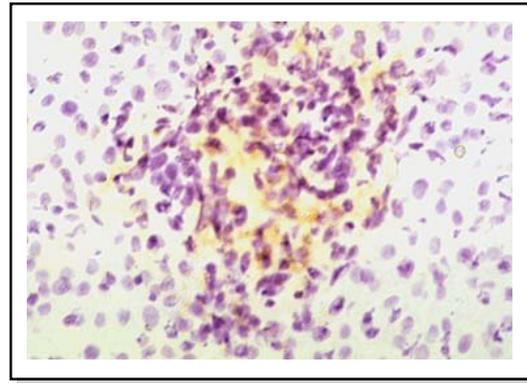


Abb. 11: Tumorpräparat eines HCC-Patienten. Die Tumorzellen sind mit Ca 19-9 angefärbt.

Patient	TNM, G	Res.	Begleitdgn.	Marker i.S.	Mat.	mAk positiv	
1	42 m	T3N0M0, GI		äthyltox. Zirrhose	AFP, CEA	A	AFP, KL-1
3	61 m					A	AFP, KL-1
5	53 m	T1N0M0, GII	R0	Hep. B, Zirrhose	AFP, Ca 19-9	PLP TM	AFP, KL-1 Ca 19-9
7	41 w	T3N0M0, GI	R0	Hep. B		KMP PLP	Ca 19-9, C 54-0, KL-1 KL-1
13	62 m	T4N0M0		Hep. B äthyltox. Zirrhose		A	KL-1
18	53 m			Hep. C, Zirrhose		A	KL-1
21	51 m	T2N0M0, GI		Hep. C, Zirrhose		KMP A A	- KL-1 KL-1
33	39 m	T4N0M0, GII	R0	fibrolamellär	AFP	KMP PLP TM	KL-1 Ca 19-9, KL-1 AFP, KL-1
43	20 w	T3N1M1	R0	fibrolamellär		KMP TM	- KL-1
49	50 m	T3N0M0, GI	R0	Hep. B äthyltox. Zirrhose		A	KL-1
58	63 m	T4N0M1, GIII	R1	Hep. A		PLP TM N	KL-1 Ra 96, Ca 19-9, KL-1 Ca 19-9, KL-1

Tab. 1: Patienten mit hepatozellulärem Karzinom. Dargestellt wurden die Patientennummer, Alter, Geschlecht (m/w), das TNM-Stadium und Grading zum Zeitpunkt der Operation, die Resektabilität (R), eventuelle Zusatzdiagnosen, die Tumormarker im Serum sowie die positiv reagierenden Antikörper (mAk positiv) in den einzelnen untersuchten Aufbereitungen (Mat.).

Die Antikörperprofile der einzelnen Patienten waren wie folgt: In 29 % der Fälle (2/7) lag eine komplette Übereinstimmung der Marker in allen Aufbereitungen vor. Bei diesen Patienten waren sowohl das Knochenmark als auch Aszites-, Lavage- und Tumorgewebe nicht mit den verwendeten Markern anfärbbar (Pat. Nr. 21 und 43). Von dem Pat. Nr. 21 stand nach 10 Wochen eine weitere Aszitesprobe zur Verfügung, die ebenfalls negativ war. Dieses Ergebnis stand mit der klinischen und histopathologischen Einschätzung eines noch nicht generalisierten Tumorleidens ($T_2 N_0 M_0, G I$) im Einklang. Bei 2 anderen Patienten konnte in allen verfügbaren Aufbereitungen Tumoreinzellen detektiert werden, jedoch mit unterschiedlichen Tumormarkern (Pat. Nr. 5 und 33). In zwei weiteren Fällen war eine Aufbereitung (jeweils die Lavage) negativ, während Knochenmark bzw. Tumorgewebe mit den Markern reagierte (Pat. Nr. 7 und 58).

Von 4 Patienten mit abgelaufener Hepatitis B waren in zwei Fällen die Materialien mit Tumormarkern anfärbbar. Die Aufbereitungen der beiden HCV-positiven Fälle waren für alle verwendeten Tumormarker negativ.

2.4. Lebermetastasen

Es konnten Materialien von 19 Patienten mit Lebermetastasen untersucht werden. Hierbei wurden je 16 Knochenmark- und Lavage-Aufbereitungen, 10 Tumorgewebe und einmal ein an den Tumor grenzendes Gewebe ausgetestet.

In 58 % der Fälle (11/19 Patienten) reagierte mindestens eine der Aufbereitungen mit den verwendeten Antikörpern. Die Knochenmark-Aufbereitungen waren zu 44 % (7/16), die Peritoneallavagen in 37 % (6/16) positiv für einen oder mehrere Antikörper (Abb. 12). Die untersuchten Tumorgewebe waren in jedem Fall positiv für einen oder mehrere Antikörper.

Die Antikörper färbten die einzelnen Materialarten in folgender Häufigkeit: Im Knochenmark reagierte am häufigsten der Zytokeratinmarker KL-1; 31 % (5/16) der Präparate waren hiermit anfärbbar. Von den Tumormarkern reagierte nur Ca 19-9; dieser war in 31 % (3/16) der Proben nachweisbar. Die Lavagen wurden zu 21 % durch Ca 19-9 angefärbt (3/14), in 14 % der Fälle reagierte C1 P83 (2/14) und einmal C 54-0. Jede Probe war jeweils nur für einen Marker positiv. Die untersuchten Tumorgewebe waren in jedem Fall positiv für einen oder mehrere Antikörper. In 80 % der Fälle (8/10) wurden sie sowohl von Ca 19-9 als auch von C1 P83 angefärbt, in 40 % der Fälle (4/10) zusätzlich von C 54-0. Ra 96 färbte 30 % der Gewebe, AFP und 17-1A reagierten jeweils in 20 % der Fälle. Ein histologisch als Normalgewebe klassifiziertes Leberresektat, das an eine Lebermetastase angrenzte, war auch in der immunzytochemischen Färbung negativ. Ca 19-9 färbte alle Materialien am häufigsten. C1 P83 reagierte in Tumorgeweben ebenso häufig wie Ca 19-9, jedoch stärker in der Farbintensität.

Von 7 Patienten standen Lavage, Knochenmark und Tumorgewebe zur Verfügung. In 71 % der Fälle (5/7) war außer dem Tumor eine weitere Aufbereitung positiv. Bei diesen Patienten

war in 60 % (3/5) der Fälle die Aufbereitung mit dem gleichen Antikörper wie das Tumorgewebe anfärbbar (Pat. Nr. 28, 29, 44). Der Primärtumor war in zwei Fällen ein Sigmakarzinom, einmal ein Zökumkarzinom. Im Serum von zwei Patienten war Ca 19-9 bzw. CEA erhöht; mit diesen Antikörpern waren auch die Materialien immunzytochemisch anfärbbar.

In einem Fall (Pat. Nr. 25) reagierten alle Materialien mit dem Marker Ca 19-9, der auch im Serum des Patienten erhöht war. Der Primärtumor dieser Lebermetastase war ein mittelgradig differenziertes Kolonkarzinom im Stadium $T_4 N_2 M_0$, das makroskopisch und mikroskopisch ohne verbleibendes Tumorgewebe reseziert worden war (R_0 -Resektion). Die Lebermetastasen traten 6 Monate nach der vermeintlich kurativen Operation auf.

In einem weiteren Fall waren Lavage und Knochenmark nicht mit den Markern anfärbbar (Pat Nr. 40).

Bei 7 weiteren Patienten konnten Lavage und Knochenmark untersucht werden. In 43 % der Fälle (3/7) war eine Aufbereitung anfärbbar. In 2 dieser Fälle war das Knochenmark negativ bei positiver Lavage (Pat. Nr. 6 und 34) und in einem Fall war die Lavage negativ bei positivem Knochenmark. (Pat. Nr. 23). Bei 4 Patienten reagierten beide Aufbereitungen nicht mit den verwendeten Markern (Pat. Nr. 22, 24, 50 und 56). Die Patienten ohne detektierbare Tumoreinzellen im Knochenmark bei positiver Lavage (Pat. Nr. 6, 28, 34 und 44) befanden sich im Tumorstadium $T_3 N_0 M_0$, die Primärtumoren waren mittelgradig differenziert (G II). Es

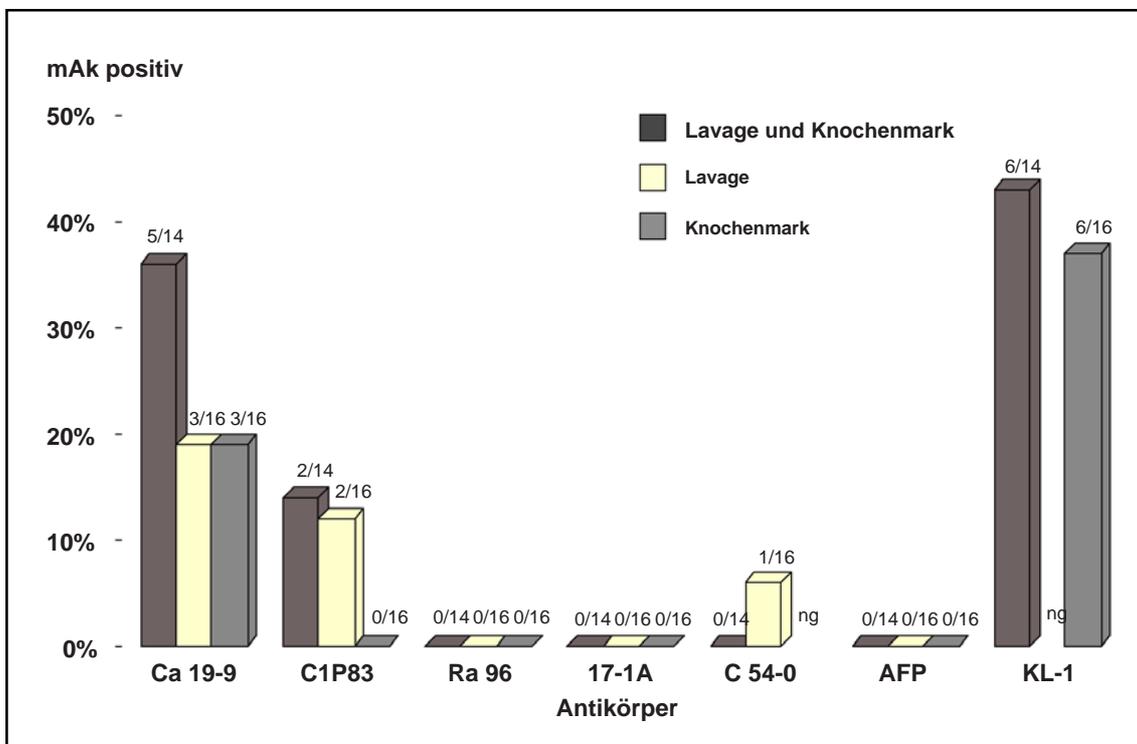


Abb. 12: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren; aufgeschlüsselt nach Antikörpern. Ng: nicht gewertet - KL-1 in der Peritoneallavage, C 54-0 im Knochenmark. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

lag für drei Patienten eine Tumormarkenserologie vor, in der Ca 19-9 und CEA erhöht waren. Die Patienten mit Tumoreinzelzellen im Knochenmark bei negativer Lavage (Pat. Nr. 23, 29, 32 und 59) hatten zum Operationszeitpunkt ein Tumorstadium T₃ oder T₄, in zwei Fällen lag eine Metastasierung in die Lymphknoten bzw. Fernmetastasen vor. Die Tumoren waren mittelgradig differenziert. Im Serum war bei zwei Patienten der Tumormarker CEA erhöht.

Patient	Grad.	Res.	Primärtumor	Marker i.S.	Mat.	mAk positiv
6	53 m	GII	R0	Rektumkarzinom Hep. C		KMP - PLP Ca 19-9, KL-1
22	66 w	GII	R0	Rektumkarzinom	CEA	KMP - PLP KL-1
23	68 w	GII	R0	Kolonkarzinom	CEA	KMP Ca 19-9 PLP KL-1
24	60 m	GII	R2	Rektumkarzinom	CEA	KMP - PLP KL-1
25	50 m	GII	R0	Kolonkarzinom	Ca 19-9	KMP Ca 19-9, KL-1 PLP Ca 19-9, KL-1 TM C1P83, Ca 19-9, C54-0, KL-1
28	72 w	GII	R0	Zöekumkarzinom	Ca 19-9, CEA	KMP - PLP Ca 19-9, KL-1 TM alle
29	73 m	GII	R0	Sigmakarzinom		KMP C54-0, KL-1 PLP KL-1 TM C1P83, Ca 19-9, C54-0, KL-1, AFP
31	65 w	GII	R0	Sigmakarzinom	CEA	TM C1P83, Ca 19-9, KL-1
32	49 w	GI	R0	Hypernephrom		KMP C54-0, KL-1 PLP KL-1 TM Ca 19-9, KL-1
34	77 w	GII	R0	Sigmakarzinom	Ca 19-9	KMP - PLP C1P83, KL-1
39	48 w	GII	R0	Sigmakarzinom	Ca 19-9	KMP KL-1
40	52 m	GII	R0	Kolonkarzinom		KMP C 54-0 PLP KL-1 TM C1P83, Ca 19-9, KL-1
42	71 w	GII	R0	Kolonkarzinom		KMP KL-1 TM Ra 96, C1P83, Ca 19-9, KL-1
44	60 m	GII	R0	Sigmakarzinom	CEA	KMP - PLP C1P83, KL-1 TM Ra 96, C1P83, Ca 19-9, KL-1
47	59 w	GII	R1			PLP KL-1 TM C1P83, Ca 19-9, C54-0, 17-1A, KL-1
50	59 m	GII	R2	Magenkarzinom		KMP - PLP KL-1
52	56 m	GII		unbekannt		PLP C54-0, KL-1
56	63 w	GII	R0	Sigmakarzinom		KMP - PLP KL-1
59	63 w	GII	R0	Sigmakarzinom	CEA	KMP Ca 19-9, KL-1 PLP KL-1 TM C1P83, KL-1 N KL-1

Tab. 2: Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Karzinome. Dargestellt wurden die Patientennummer, Alter, Geschlecht (m/w), Grading und Resektabilität (R) zum Zeitpunkt der Primäroperation, der Primärtumor, die Tumormarker im Serum sowie die positiv reagierenden Antikörper (mAk positiv) in den einzelnen untersuchten Aufbereitungen (Mat.).

2.5. Klatskin-Tumoren

Insgesamt wurden 5 Patienten mit einem Klatskin-Tumor untersucht; bei allen wurde eine Peritoneallavage und eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. In 2 Fällen konnte auch Tumorgewebe ausgetestet werden. In 60 % der Fälle (3/5 Patienten) waren alle Aufbereitungen mit einem oder mehreren Tumormarkern anfärbbar. Bei 80 % der Patienten (4/5) reagierte mindestens eine Aufbereitung mit mindestens einem Tumormarker.

Die einzelnen Aufbereitungen waren durch folgende Marker anfärbbar: Die positiven Knochenmarkproben (80 %, 4/5 Proben) reagierten sämtlich mit Ca-19-9; 60% der Aufbereitungen (3/5) waren zusätzlich KL-1 positiv und in 40 % reagierte außerdem der Marker AFP. Die positiven Lavagen (60 %, 3/5 Patienten) waren sämtlich mit Ca 19-9 anfärbbar. In einem Fall reagierten außerdem AFP, 17-1A und C 54-0 (Abb. 16). Die beiden untersuchten Tumorgewebe waren durch Ca 19-9 und Ra 96 anfärbbar, C1 P83 färbte zusätzlich einen der Tumoren an. Insgesamt war Ca 19-9 bei 60 % der Patienten (3/5) positiv in sämtlichen Aufbereitungen.

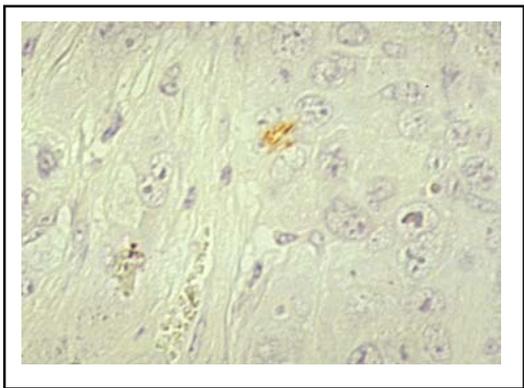


Abb. 13: Kulturzellen der Peritonallavage eines Patienten mit Klatskin-Tumor. Die Tumorzellen sind mit Ca 19-9 anfärbbar.

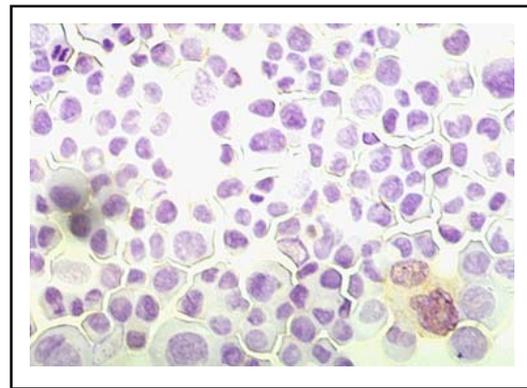


Abb. 14: Knochenmark-Präparat desselben Patienten mit Klatskin-Tumor. Die Tumorzellen sind mit KL-1 anfärbbar.

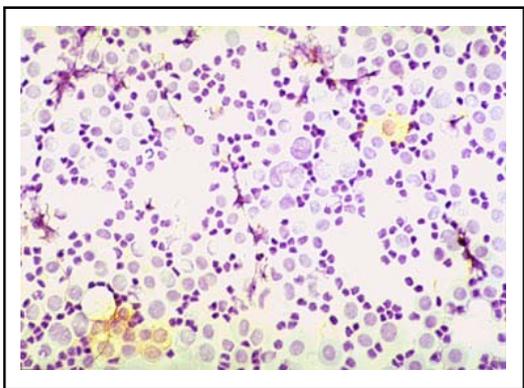


Abb. 15A: Peritoneallavage-Präparat desselben Patienten mit Klatskin-Tumor. Die Tumorzellen sind mit Ca 19-9 anfärbbar.

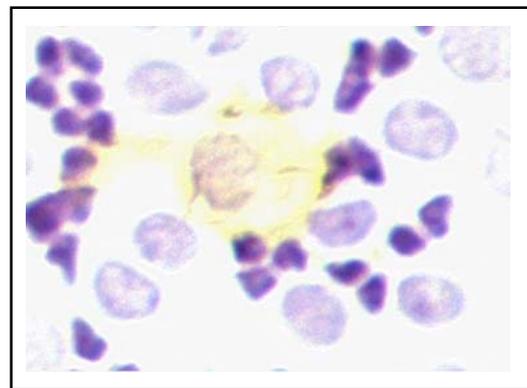


Abb. 15B: Präparat 15A in Vergrößerung. Zu sehen ist eine mit Ca 19-9 gefärbte Tumorzelle in der Peritoneallavage.

Bei 60 % der Patienten (3/5) färbte derselbe Marker jeweils alle verfügbaren Materialien. In zwei Fällen waren Lavage, Knochenmark und Tumor mit Ca 19-9 anfärbbar (Pat. Nr. 11 und 19), in einem Fall waren Knochenmark und Lavage positiv für AFP (Pat. Nr. 15). Für den

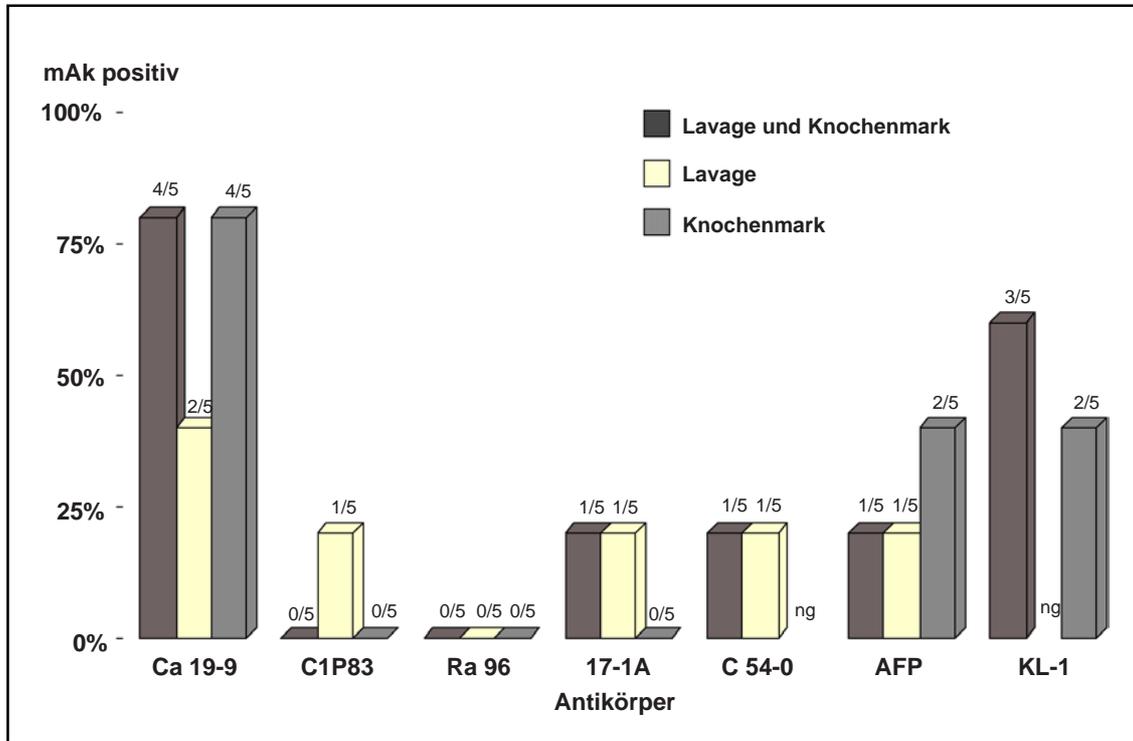


Abb. 16: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Klatskintumoren; aufgeschlüsselt nach Antikörpern. Ng: nicht gewertet - KL-1 in der Peritoneallavage, C 54-0 im Knochenmark. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

Patient	TNM, G	Res.	Begleitdgn.	Marker i.S.	Mat.	mAk positiv
11	62 w T4N2M1, GII	R2	äthyltox. Zirrhose	Ca 19-9	KMP KMK PLP PLK TM	Ca 19-9, KL-1 KL-1, AFP Ca 19-9, KL-1 KL-1, Ca 19-9 Ra 96, Ca 19-9, KL-1
15	66 w				KMP PLP	Ca 19-9, C 54-0, KL-1, AFP C 54-0, 17-1A, KL-1, AFP
19	62 m T3N1M1, GII	R0	äthyltox. Zirrhose		KMP PLP TM	Ca 19-9, C 54-0, AFP Ca 19-9, KL-1 Ra 96, C1P83, Ca 19-9, KL-1
41	62 m T2N0M0, GII	R1		Ca 19-9	KMP PLP	- KL-1
57	56 m T2N1M1, GII	R0	Hep. A	Ca 19-9	KMP PLP	Ca 19-9 KL-1

Tab. 3: Patienten mit Klatskin-Tumoren. Dargestellt wurden die Patientenummer, Alter, Geschlecht (m/w), das TNM-Stadium und Grading zum Zeitpunkt der Operation, die Resektabilität (R), eventuelle Zusatzdiagnosen, die Tumormarker im Serum sowie die positiv reagierenden Antikörper (mAk positiv) in den einzelnen untersuchten Aufbereitungen (Mat.).

letztgenannten Patienten lagen keine klinischen Angaben vor. Die Patienten mit Ca19-9-positiven Aufbereitungen (Pat. Nr. 11 und 19) befanden sich in fortgeschrittenen Tumorstadien (T_3 bzw. T_4) mit Lymphknoten- und Fernmetastasen. Beide Tumoren waren mittelgradig differenziert, in einem Fall war der Marker Ca 19-9 im Serum stark erhöht. Aus der Lavage und dem Knochenmark von Pat. Nr. 11 gelang jeweils die Anzüchtung einer Zellkultur. Die Kulturzellen der Peritoneallavage ließen sich wie die originale Aufbereitung mit Ca 19-9 anfärben. Die Kulturzellen des Knochenmarks waren wie die Aufbereitung der Knochenmarkzellen des Patienten positiv für KL-1 (Pat. Nr. 11, Abb. 13 - 15B).

2.6. Gallenblasenkarzinome

Insgesamt wurden 4 Patienten untersucht. Es wurden 3 Knochenmarkaufbereitungen, 4 Peritoneallavagen und 2 Tumorgewebe ausgetestet. Bei 75 % der Patienten (3/4) war mindestens eine Aufbereitung mit mindestens einem Tumormarker anfärbbar. Im Knochenmark war in 2 von 3 Fällen eine Anfärbung mit C 54-0 möglich; es reagierte kein weiterer Tumormarker. Die Lavagen waren zu 75 % positiv (3/4). Jedesmal war eine Anfärbung mit Ca 19-9 möglich, in 2 Fällen zusätzlich mit C 54-0, in einem weiteren Fall war außerdem C1 P83 positiv (Abb. 17). Die beiden Tumorgewebe waren mit C1 P83, Ca 19-9, C 54-0 und 17-1A anfärbbar; je einmal waren außerdem Ra 96 und AFP positiv.

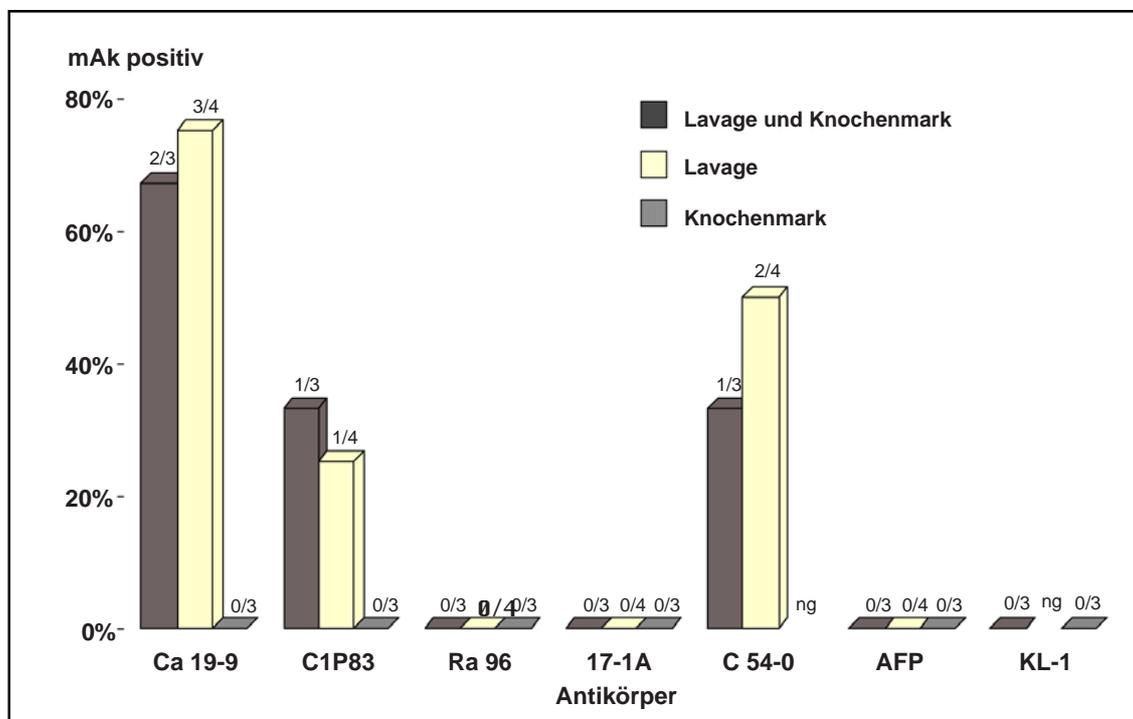


Abb. 17: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Gallenblasentumoren; aufgeschlüsselt nach Antikörpern. Ng: nicht gewertet - KL-1 in der Peritoneallavage, C 54-0 im Knochenmark. Die Zahlen über den Balken geben die absolute Zahl der Proben wieder.

Der Antikörper C 54-0 färbte alle Materialien gleichmäßig gut, aber mit schwacher Farbtintensivität. Tumorfärbungen gelangen mit allen verwendeten Antikörpern, besonders intensiv mit Ca 19-9 und C1 P83.

Eine Übereinstimmung des Antikörperprofils war bei allen drei Patienten zu verzeichnen, von denen mehrere Aufbereitungen ausgetestet werden konnten. Bei beiden Patienten mit C 54-0-positivem Knochenmark (Pat. Nr. 20 und 37) war auch die Peritoneallavage positiv für mehrere Tumormarker, darunter einmal C 54-0. Bei denselben beiden Patienten fand sich das Tumorgewebe mit C 54-0 anfärbbar. Das Tumorleiden war bei diesen Patienten fortgeschritten, nach der TNM-Klassifikation in den Stadien $T_4 N_2 M_1$ (Pat. Nr. 20) und $T_2 N_0 M_1$ (Pat. Nr. 37). Die Tumoren waren mittelgradig bis gering differenziert (G II und G III) und konnten nur palliativ operiert werden. In beiden Fällen waren die Serumwerte für Ca 19-9 erhöht.

In einem weiteren Fall waren Knochenmark und Lavage negativ. Bei diesem Patienten (Pat. Nr. 45) mit dem Tumorstadium $T_3 N_1 M_1$ lag eine makroskopisch sichtbare Metastasierung vor, der Tumor war niedrig differenziert (G III).

Patient	TNM, G	Res.	Marker i.S.	Mat.	mAk positiv
10 77 m	T4N1M1, GII	R2		PLP	Ca 19-9, C54 -0, KL-1
20 69 w	T4N2M1, GIII	R2	Ca 19-9	KMP	C 54-0
				PLP	C1P83, Ca 19-9, C54 -0, KL-1
				TM	C1P83, Ca 19-9, C54 -0, 17-1A, KL-1, AFP
37 72 w	T2N0M1, GII		Ca 19-9	KMP	C 54-0
				PLP	Ca 19-9, KL-1
				TM	Ra 96, C1P83, Ca 19-9, C54 -0, 17-1A, KL-1
45 54 w	T3N1M1, GII	R2		KMP	-
				PLP	KL-1

Tab. 4: Patienten mit Gallenblasenkarzinomen. Dargestellt wurden die Patientennummer, Alter, Geschlecht (m/w), das TNM-Stadium und Grading zum Zeitpunkt der Operation, die Resektabilität (R), eventuelle Zusatzdiagnosen, die Tumormarker im Serum sowie die positiv reagierenden Antikörper (mAk positiv) in den einzelnen untersuchten Aufbereitungen (Mat.).

3. Kontrollgruppe

Insgesamt 19 Patienten, die nicht an einer malignen Erkrankung litten, dienten als Kontrollgruppe. Von 7 Patienten konnte Aszites untersucht werden; die Grunderkrankung war in 6 Fällen eine äthyltoxische Leberzirrhose und bei einem Patienten eine primäre biliäre Zirrhose. Eine Knochenmarkaspiration (8 Proben) und/oder Peritoneallavage (11 Proben) wurde bei insgesamt 12 Patienten durchgeführt, die sich aufgrund nicht maligner Krankheitsbilder einer Laparotomie unterzogen. Die Austestung mit Tumormarkern ergab in den Aszitesproben und in den Peritoneallavagen Positivität für KL-1. Alle anderen Antikörper waren negativ. Die Knochenmarkaufbereitungen wurden durch keinen Tumormarker angefärbt, der Antikörper KL-1 war ebenfalls negativ.

Patient	Diagnose	Material
2	53 m Leberzirrhose	A
4	52 w äthyltox. Leberzirrhose	A
12	45 m äthyltox. Leberzirrhose	A
14	51 w Leberzirrhose bei PBC	A
17	65 m äthyltox. Leberzirrhose	A
26	58 m Leberzirrhose bei Hep. C	A
46	48 m äthyltox. Leberzirrhose	A
8	44 w Achalasie	PLP
9	46 m Ulkus duodeni	PLP
16	51 m Leberzyste	PLP
27	26 m Morbus Hodgkin	PLP
30	65 w Sigmastenose	KMP,PLP
35	25 w Angina abdominalis	KMP,PLP
36	49 w Stuhlinkontinenz	KMP,PLP
38	66 w Leberabzeß	KMP
48	47 m chronische Pankreatitis	KMP,PLP
51	50 m Ulkus duodeni	KMP,PLP
53	54 w Hypersplenismus	KMP,PLP
55	40 w Sigmastenose	KMP,PLP

Tab. 5: Kontrollgruppe. Dargestellt wurden die Patientennummer, Alter, Geschlecht (m/w), die Erkrankung und die untersuchten Aufbereitungen.

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei Patienten mit primären und sekundären Lebertumoren sowie Gallenblasenkarzinomen mittels immunzytochemischer Techniken der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, in der Peritonealhöhle und im Aszites möglich ist.

Bei verschiedenen Malignomen des Gastrointestinaltraktes ist bereits ein solcher Nachweis geführt worden, so für das Magen-, Kolon- und Pankreaskarzinom, wobei jeweils eine Korrelation mit dem TNM-System, der Tumordifferenzierung und der Rezidivwahrscheinlichkeit bestand (Lindemann *et al.* 1992; Braun *et al.* 1995; Broll *et al.* 1996; Schott *et al.* 1998).

Bisher liegen keine Untersuchungen für Tumoren der Leber sowie der Gallenblase und Gallenwege vor. Die hohe Rezidivrate der Tumoren nach vermeintlich kurativer Resektion läßt vermuten, daß bei diesen Malignomen bereits zum Zeitpunkt der Operation eine Mikrometastasierung vorlag, die mit der konventionellen präoperativen Diagnostik nicht erfaßt wird.

Für den Nachweis von Tumoreinzellen besitzt die Immunzytochemie im Vergleich mit anderen Verfahren, z.B. der histomorphologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung, eine weitaus höhere Sensitivität. In Knochenmarkaufbereitungen mit einer definierten Anzahl von Tumorzellen war immunzytochemisch in einer Verdünnung von 0,00025 % Tumorzellen pro Lösung ein Zellenachweis möglich, während die histomorphologische Untersuchung bis zu einer Verdünnung von 0,05 % und der fluoreszenzaktivierte Zell-Sorter nur bis zur Verdünnung von 1 % Tumorzellen nachweisen konnte (Molino *et al.* 1991).

In dieser Arbeit wurde eine immunzytochemische Methode angewendet, die die von Gerdes, Chess und Hajdu 1985 entwickelte Technik modifiziert. Mit diesem Verfahren war es in der vorliegenden Arbeit möglich, eine Tumorzelle unter $2,5 \times 10^6$ gesunden Zellen zu detektieren. Der Zellverlust infolge der Aufarbeitung der Materialien lag in der vorliegenden Arbeit bei durchschnittlich 15 %.

Zur Anfärbung der Präparate wurde die indirekte Immunperoxidase-Methode gewählt. Um eine störende Hintergrundfärbung zu vermeiden, muß vorher eine Blockung der endogenen Peroxidase erfolgen. In dieser Arbeit wurde mit 0,3 %igem H_2O_2 eine ausreichende Blockung erreicht, so daß in den Zytospinpräparaten und Kryostatschnitten keine Hintergrundfärbung auftrat. Die Tumorantigene waren in Verdünnungsreihen stabil gegen das Blockungsreagenz Methanol/Wasserstoffperoxid, eine Anfärbung war auch mit hochverdünnten monoklonalen Antikörpern möglich (Stritzel 1994).

Durch die Verwendung von sechs mAk (Ca 19-9, C1 P83, 17-1A, C 54-0, Ra 96, AFP) gegen tumorassoziierte Antigene und dem Zytokeratin-Antikörper KL-1 im Knochenmark wurde der

Antigenheterogenität der Tumoren Rechnung getragen. Da die meisten Antikörper jeweils nur für bestimmte Tumorsubpopulationen spezifisch sind, sollte mit diesem Spektrum von mehreren Antikörpern die Sensitivität der Untersuchung erhöht werden. Dies wird durch die Ergebnisse von Studien an Zellkulturen sowie an Magen-, Kolon- und Pankreaskarzinomen bestätigt (Watanabe *et al.* 1990; Werner *et al.* 1992; Juhl *et al.* 1994a).

Bei der Verwendung von verschiedenen mAk zur Detektion von Tumorzellen in unterschiedlichen Kompartimenten muß die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktion der Antikörper, insbesondere ihre Bindung an mesotheliale Zellen, in Betracht gezogen werden (Lüttges *et al.* 1988). Der Zytokeratinmarker KL-1 bindet mit großer Spezifität an epitheliale Zellen und wurde bei der Austestung der Peritoneallavagen und Aszitesaufbereitungen nicht verwendet, weil die Peritonealhöhle Mesothelzellen enthält, die epithelialen Ursprungs sind. In anderen Studien wurde eine Kreuzreaktivität des Tumormarkers C 54-0 mit einer Subpopulation lymphatischer Zellen des Knochenmarks gezeigt (Schmiegelet *et al.* 1985; Juhl *et al.* 1994a). Deshalb wurde dieser Antikörper in der vorliegenden Arbeit nicht in die Auswertung der Knochenmarkpräparate einbezogen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Da sämtliche Negativkontrollen aller Aufbereitungen (Peritoneallavage, Knochenmark, Aszites) durch die mAk nicht angefärbt wurden, während die als Positivkontrollen bei jeder Färbung mitgeführten Tumorzelllinien COLO 357 und HepG 2 gute Anfärbbarkeit zeigten, wurden die in dieser Studie anfärbbaren Zellen als Tumorzellen interpretiert.

Es wurden 39 Patienten mit Malignomen der Leber und Gallenblase sowie 19 Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen untersucht. Insgesamt konnten bei 59 % der Patienten mit Malignomen in mindestens einer Aufbereitung Tumoreinzelzellen nachgewiesen werden. Damit ist die Detektionsrate für mikrometastatische Einzelzellen bei diesen Tumoren ungefähr ebenso hoch wie bei gastrointestinalen Malignomen, bei denen in bis zu 77 % zum Zeitpunkt der Primäroperation eine Tumorzellaussaat in die Peritonealhöhle und/oder in das Knochenmark nachweisbar war (Broll *et al.* 1996).

Bei 80 % der mit kurativer Zielsetzung operierten Patienten (R_0 -Resektion) waren Tumoreinzelzellen in der Peritonealhöhle und/oder im Knochenmark nachweisbar. Damit ist die Detektionsrate von mikrometastatischen Einzelzellen bei hepatobiliären Karzinomen in der vorliegenden Arbeit höher als die in der Literatur für radikal operierte Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen beschriebenen, bei denen in bis zu 48 % der Fälle Tumorzellen in der Peritonealhöhle und in bis zu 34 % im Knochenmark detektierbar waren. In diesen Studien konnte zudem gezeigt werden, daß das Vorhandensein dieser Zellen bei Patienten ohne klinische Zeichen einer Metastasierung ein Indikator für eine folgende Metastasierung ist (Schlimok *et al.* 1991; Lindemann *et al.* 1992; Braun *et al.* 1995; Schott *et al.* 1998). Dies zeigt, daß mit der Immunzytochemie bereits dann eine Generalisierung der Tumorerkrankung

nachweisbar ist, wenn nach klinischen Gesichtspunkten noch von einer kurativen chirurgischen Therapie ausgegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei 63 % der Patienten mit nicht mehr vollständig resektablen Tumoren (R_1 - und R_2 -Resektion) Tumoreinzellen in der Lavage und/oder im Knochenmark nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der klinischen Beobachtung, daß bei Patienten, deren Tumorerkrankung so weit fortgeschritten ist, daß eine vollständige Entfernung nicht mehr möglich ist, die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung größer ist als bei radikal resezierbaren Malignomen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies eventuell aufgrund der geringen Patientenzahl nicht bestätigt werden. In größeren Studien über die Mikrometastasierung von Magen-, Kolon- und Pankreaskarzinomen wurde der Zusammenhang zwischen einer höheren Detektionsrate an Mikrometastasen und einer nicht mehr kurativ möglichen Resektion belegt (Lindemann 1992; Juhl *et al.* 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Korrelation der Detektionsrate von Tumoreinzellen mit der Einteilung der Tumoren nach dem TNM-System festgestellt werden. So wurde in der Gruppe der Malignome im Stadium IV in 64 % der Fälle eine Tumorzellaussaat in mindestens einer Aufbereitung nachgewiesen und in 66 % der Patienten mit Tumoren im Stadium III. Bei den weniger fortgeschrittenen Erkrankungen im TNM-Stadium II war keine Aufbereitung mit den monoklonalen Antikörpern anfärbbar. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, die bei anderen Malignomen ebenfalls eine steigende Rate der Tumorzell-detektion mit zunehmender Ausbreitung der Erkrankung, standardisiert im TNM-System, fanden (Schlimok *et al.* 1991; Lindemann *et al.* 1992; Juhl *et al.* 1995; Broll *et al.* 1996).

In der Gruppe der gut differenzierten Malignome konnte in 60 % der Fälle eine Generalisierung der Tumorerkrankung nachgewiesen werden, bei den mittelgradig differenzierten Tumoren in 76 %. In der Gruppe der niedrig differenzierten Malignome waren bei einem von drei Patienten Tumoreinzellen detektierbar. Möglicherweise erfolgt mit zunehmender Entdifferenzierung die Expression tumorassoziierter Antigene nicht mehr in gleichem Maße wie bei gut differenzierten Malignomzellen. In einer Studie über die immunzytochemische Färbung hepatozellulärer Karzinome belegten auch Brumm *et al.* eine geringere Anfärbbarkeit entdifferenzierter Tumoren mit AFP gegenüber gut differenzierten HCC (Brumm *et al.* 1989).

In der vorliegenden Arbeit war insgesamt eine annähernd gleiche Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Lavagen und in den Knochenmarkproben zu beobachten. Sie betrug in den Peritoneallavagen 48 % und in den Knochenmarkaufbereitungen 46 %. Auch für das Pankreaskarzinom ist eine gleiche Inzidenz von Tumorzellen in diesen beiden Kompartimenten beschrieben worden (Juhl *et al.* 1994b). Bei Magen- und kolorektalen Karzinomen ist dagegen eine häufigere Tumorzellaussaat in die Peritonealhöhle als in das Knochenmark beobachtet worden (Juhl *et al.* 1995). Die Ergebnisse dieser und der vorliegenden Arbeit unterstützen

damit die klinischen Befunde bei diesen Patienten. So ist das relativ häufige Vorhandensein von metastatischen Einzelzellen hepatobiliärer Tumoren im Knochenmark Ausdruck der frühen hämatogenen Metastasierung dieser Malignome - auch wenn makroskopische Knochenmetastasen bei diesen Tumoren selten auftreten - und ein Grund für die schlechte Prognose. Der häufigere Nachweis von Tumoreinzelzellen im Peritoneum bei gastrointestinalen Tumoren entspricht dem klinischen Befund einer bevorzugten Metastasierung dieser Malignome in die Bauchhöhle (Häring u. Zilch 1992).

In der vorliegenden Arbeit war eine annähernd gleiche Detektionsrate von Tumoreinzelzellen in den Lavagen und in den Knochenmarkproben bei den Patienten mit HCC und Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren zu beobachten. Eine peritoneale Aussaat findet bei diesen Tumoren später statt als bei Gallenblasen- und Klatskintumoren, was die relativ niedrige Anzahl positiver Lavagen (43 %) bei HCC und Lebermetastasen im Vergleich zu denen bei Gallenblasen- und Klatskintumoren erklärt. Hier waren in 78 % der Fälle in den Lavagen Tumorzellen nachweisbar; in 50 % der Fälle konnte auch eine Dissemination in das Knochenmark festgestellt werden. Dies ist eine Bestätigung der klinischen Beobachtung, daß in der Mehrzahl der Fälle bei diesen Tumoren bereits zum Zeitpunkt der Primäroperation eine Generalisierung der Erkrankung vorliegt, die auch bei radikal operierten Patienten verantwortlich für rasche Rezidive und die infauste Prognose ist (Dirsch *et al.* 1991; Terblanche 1994).

Immunzytologische und laborchemische Untersuchungen des Aszites von HCC-Patienten sind in der Literatur selten beschrieben. Zytologische Aszitesuntersuchungen haben diesen Tumor oft nur als Randgruppe mit geringen Fallzahlen berücksichtigt. Dies widerspiegelt zum einen ein allgemeines Problem in der Diagnostik zellarmer Flüssigkeiten. Es werden relativ große Flüssigkeitsmengen benötigt, um eine ausreichende Anzahl von Zellen zu erfassen. Zudem liegt eine Schwierigkeit in der Aszites-Beurteilung bei Malignomen des Gastrointestinaltraktes und insbesondere beim HCC darin, daß auch Entzündungen oder eine Leberzirrhose eine starke mesotheliale Reaktion mit malignitätsverdächtigen Zellen hervorrufen können (Lüttges *et al.* 1988; Klar u. Lenz 1991; Dirsch *et al.* 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde von 6 Patienten mit einem HCC eine immunzytologische Austestung des Aszites vorgenommen. Die Ergebnisse der Aszitesaustestung entsprachen bei der Hälfte der Patienten der klinischen Einschätzung der Erkrankung (eine negative Probe und zwei mit dem Antikörper AFP anfärbbare Proben). Mit 50 % liegt die immunzytologische Detektionsrate von Tumoreinzelzellen für diese kleine Patientengruppe sehr hoch, zumal keine zytologischen Vorbefunde vorlagen. In der Literatur werden für immunzytologische Austestungen mit monoklonalen Antikörpern nur teilweise eindeutige differentialdiagnostische Ergebnisse beschrieben. Bei zytologisch als positiv befundenen Ergußflüssigkeiten von 35 Tumorpatienten fanden Lüttges *et al.* in 100 % eine Reaktion des monoklonalen Epithelantikörpers HEA 125 und in 80 % eine Anfärbbarkeit mit KL-1. Die Angaben für positive Reaktionen des Antikörpers

CEA variieren zwischen 5 % für den polyklonalen und 60 % für den monoklonalen monospezifischen Antikörper (Lüttges *et al.* 1988). Für die zytologische und laborchemische Aszitesdiagnostik liegen ähnliche Angaben vor. So fanden Colli *et al.* malignitätsverdächtige zytologische Befunde in 12 % der Proben. Die laborchemische Untersuchung erwies sich als sensitiver; in 30 % fand sich ein erhöhter Fibronectin-Spiegel und bei allen Patienten mit einem erhöhten Serum-AFP war dieses auch im Aszites in höheren Konzentrationen zu finden (Colli *et al.* 1993). Die Rate positiver Asziteszytologien bei bekanntem Malignom wird in Abhängigkeit vom Primärtumor mit 36 - 96 % angegeben (Sears u. Hajdu 1987). Die Ergebnisse in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit belegen, daß die differentialdiagnostische Beurteilung von Aszites durch den Einsatz monoklonaler Antikörper erleichtert werden kann.

Um die Vitalität der nachgewiesenen Tumorzellen zu überprüfen, wurde von allen Lavagen, Knochenmarkproben und Aszitespunktaten Zellkulturen angelegt. Es gelang in 34 % der Fälle (25/74 Proben), vitale Zellen anzuzüchten. Aus den Knochenmarkpräparaten ließen sich deutlich häufiger Zellen anzüchten (53 % der Fälle, 15/28) als aus den Lavagen (17 %, 5/29). Die Zellkulturen wurden lichtmikroskopisch und immunzytologisch untersucht. Bis auf eine Ausnahme, in der die Anzüchtung einer Tumorzelllinie aus der Lavage eines metastasierten Klatskintumors gelang, war in allen Kulturen ein ausgeprägtes Wachstum von Fibroblasten zu beobachten. Auch andere Untersucher bestätigen das überwiegend fibroblastische Wachstum von Epithelzelllinien unter Kulturbedingungen mit einer entsprechenden immunzytologischen Reaktion mit dem Zytoskelett-Marker Vimentin (Franket *al.* 1979; Ramaekers *et al.* 1983; Osborn u. Weber 1983; Stritzel 1994), zusätzlich zur Expression des ursprünglichen Markers Zytokeratin (KL-1) für das Zytoskelett epithelialer Zellen. Die Ursache für diese temporäre Koexpression von zwei Zytoskelett-Markern in Zellkulturen ist bisher ungeklärt; es wird vermutet, daß es sich lediglich um eine physiologische Adaptation an das Wachstum *in vitro* handelt (evtl. durch den Ausfall hormoneller Wachstumskontrollen oder durch den Wegfall bestimmter Zellschichten induziert) und nicht durch gesteigerte Mitose oder durch neoplastische Transformation bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit reagierte der Zytokeratin-Marker KL-1 mit allen Kulturen aus Peritoneallavagen und Aszites; dies war eine erwartete Markierung des Zytoskeletts der von epithelialen Zellen stammenden Kulturzellen. In den Knochenmarkkulturen war keine Anfärbung mit dem Zytokeratinmarker KL-1 möglich, obwohl dieser Marker in den Zytopinpräparaten der Knochenmarkproben der sensitivste Antikörper für epitheliale Tumoreinzellen war. Auch mit den übrigen verwendeten Tumormarkern war in keiner Kultur eine Anfärbung von Zellen möglich. Dies könnte auf eine Antigendrift und/oder Antigenshift zurückzuführen sein, die unter Zellkulturbedingungen stattfinden können. Deshalb sollte eine Auswertung der Ergebnisse von Zellkulturen unter dem Vorbehalt betrachtet werden, daß *in vitro*-Beobachtungen nur begrenzte Rückschlüsse

auf die Wachstumskinetik und das Malignitätspotential der Zellen *in vivo* zulassen (Osborn und Weber 1983).

Werden die Ergebnisse dieser Arbeit nach den verwendeten monoklonalen Antikörpern aufgeschlüsselt, färbte der Zytokeratinmarker KL-1 in den Knochenmarkaufbereitungen am häufigsten Einzelzellen an. Für die Knochenmarkaufbereitungen von Patienten mit einem HCC oder mit Lebermetastasen erwies er sich als sensitivster Marker, bei den Klatskin-Tumoren war er nach Ca 19-9 am häufigsten positiv. Ein Grund für die häufige Positivität von KL-1 ist die größere Reaktionsbreite, die dieser Antikörper als ein Zytoskelett-Marker im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit verwendeten Tumormarkern aufweist. Daß es sich bei den mit KL-1 angefärbten Knochenmarkzellen um mikrometastatische Zellen handelt, wird dadurch unterstrichen, daß in jedem dieser Fälle in der gleichen Knochenmarkprobe zusätzlich einer der verwendeten Tumormarker reagierte und/oder in einer weiteren Aufbereitung dieses Patienten Tumoreinzelzellen nachweisbar waren. Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse wird durch Studien an anderen Malignomen unterstrichen. So konnte Schlimok in 20 % der Knochenmarkproben von Patienten mit kolorektalen, Magen- und Mammakarzinomen mit monoklonalen Zytokeratinantikörpern anfärben und belegte einen Zusammenhang zwischen positiven Knochenmarkproben und klinischem Stadium der Erkrankung sowie der Rezidivhäufigkeit (Schlimok *et al.* 1987; Schlimok *et al.* 1991). Auch beim Pankreaskarzinom wurde für diesen Marker eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Tumoreinzelzellen im Knochenmark festgestellt (Juhl *et al.* 1994b).

Obgleich in der vorliegenden Arbeit keine Anfärbung der Knochenmarkproben der Kontrollgruppe mit dem Antikörper C 54-0 auftrat, wurde dieser Tumormarker nicht in die Auswertung der Knochenmarkproben einbezogen, da in der Literatur Kreuzreaktionen des Antikörpers mit lymphopoetischen Zellen des Knochenmarks beschrieben wurden (Juhl *et al.* 1994b).

Die Peritoneallavagen wurden weitaus am häufigsten von Ca 19-9, C 54-0 und C1P83 gefärbt. Dies wurde in anderen Arbeiten ebenfalls festgestellt und bestätigt die Rolle von Ca 19-9 und CEA als wichtigste Tumormarker für gastrointestinale Malignome (Kawahara *et al.* 1986).

Eine Übereinstimmung des Antikörpermusters in den Aufbereitungen der Lavagen und/oder des Knochenmarks mit dem des zugehörigen Tumorgewebes war in 86 % (12/14) der Fälle gegeben, in denen mindestens eine der Aufbereitungen positiv war. Dadurch wird unterstrichen, daß es sich bei den angefärbten Einzelzellen in den Lavagen und Knochenmarkproben um Absiedlungen des Primärtumors handelt.

Die biologische Signifikanz von Mikrometastasenzellen ist immer noch nicht geklärt. So werden zwar bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen in einem hohen Prozentsatz Tumor-

einzelzellen im Knochenmark gefunden, deren Nachweis ein unabhängiger Vorhersagewert für eine makrometastatische Fernmetastasierung ist; trotzdem sind Knochenmetastasen bei diesen Karzinomen eher selten (Lindemann *et al.* 1992). Eine Begründung sind möglicherweise ungünstigere Wachstumsbedingungen für diese Tumoreinzelzellen im Knochenmark, so daß das Auswachsen zu Makrometastasen eher in anderen Kompartimenten erfolgt. Der Nachweis von Tumoreinzelzellen im Knochenmark ist dann nur als Ausdruck der hämatogenen Metastasierung des Primärtumors aufzufassen. Eine weitere Erklärung ist, daß sich die Mikrometastasen in einem Ruhestadium befinden und das Potential zur Bildung klinisch detektierbarer Makrometastasen während der Lebenszeit des Patienten nicht erreichen. Eine Bestätigung dieser sogenannten dormancy-Hypothese wurde durch Pantel *et al.* gegeben. Sie haben nachgewiesen, daß Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit gastrointestinalen Malignomen sich in der G₀-Phase befinden und mit Proliferationsmarkern meist nicht anfärbbar sind. Auf diesen Tumorzellen war zugleich aber der Nachweis einer Expression des erb B₂-Onkogens möglich, das mit einem aggressiven Tumorwachstum assoziiert ist. Dies belegt das maligne Potential der Tumoreinzelzellen, auch wenn sie im Ruhestadium verharren. Klinisches Korrelat dieser These könnte das Auftreten von Metastasen auch Jahre nach einer kurativen Operation des Tumorleidens sein, wie es beispielsweise bei Mammakarzinomen zu beobachten ist (Pantel *et al.* 1993).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bereits zum Zeitpunkt der Primäroperation von Tumoren der Leber und Gallenblase Tumoreinzelzellen in der Peritonealhöhle und im Knochenmark feststellbar sind. Für die Überprüfung der prognostischen Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit werden Nachuntersuchungen der Patienten erfolgen.

Eine Bestätigung der immunzytochemischen Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten wurde durch die Etablierung neuer Verfahren gebracht. Die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es ebenfalls, eine frühe Tumordissemination spezifisch und sehr sensitiv zu erkennen. So gelang es, bei Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen durch den Nachweis von CEA-mRNA unter 10⁷ Zellen eine Tumorzelle zu detektieren (Gerhard *et al.* 1994). Bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen wiesen Carr *et al.* mittels PCR Albumin-mRNA im peripheren Blut nach. Da die Albumin-mRNA leberspezifisch ist und normalerweise keine Hepatozyten im peripheren Blut zu finden sind, wurde daraus geschlossen, daß es sich bei den detektierten Zellen um metastatische Zellen der Lebermalignome handelte. Sie waren bei 94 % der getesteten Patienten mit einem HCC zu finden, während im Kontrollkollektiv keine Albumin-mRNA im peripheren Blut nachweisbar war. Nach einer Lebertransplantation sanken bei allen HCC-Patienten bis auf zwei Ausnahmen die Albumin-mRNA-Spiegel; beide Patienten mit weiterhin erhöhten Spiegeln entwickelten innerhalb kurzer Zeit ein Tumorrezidiv im Transplantat (Carr u. Kar 1991). Mori *et al.* konnten CEA-

mRNA im peripheren Blut von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen mittels Reverse Transkriptase - PCR (RT-PCR) detektieren und fanden eine Korrelation der Positivität mit dem Tumorstadium (Mori et al. 1996). Eine Weiterführung dieser Methode ist die Immunobead-PCR-Technik. Hier binden magnetische monoklonale Antikörper an die tumorassoziierten Antigene. Die so markierten Tumorzellen werden anschließend durch die PCR nachgewiesen (Hardingham *et al.* 1993).

Überprüfungen dieser wenig invasiven Methoden des Tumorzellnachweises stehen für große Patientenkollektive noch aus. Die bisherigen Ergebnisse bestätigen jedoch die Resultate der immunzytochemischen Untersuchungen auch der vorliegenden Arbeit, daß gastrointestinale Karzinome ebenso wie Mamma-Karzinome als systemische Erkrankung betrachtet werden müssen (Mori et al. 1996). Dies könnte für die Erstellung von Therapiekonzepten für maligne Tumoren große Bedeutung erlangen. So könnten beispielsweise bei einem Patienten mit nachgewiesener Mikrometastasierung die Heilungsaussichten durch eine frühzeitige adjuvante Therapie verbessert werden oder die Indikationsstellung zu einer Lebertransplantation mit nachfolgender Immunsuppression bei vorliegender Tumorzell dissemination überprüft werden. Somit wäre eine stadiengerechte individuelle Therapie der Erkrankung möglich (Burkhardt 1980).

Es bleibt zu hoffen, daß mit den vorgestellten Methoden eine frühere Diagnostik und stadiengerechte Therapie von Malignomerkrankungen möglich wird und die Prognose dieser Patienten verbessert werden kann.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung einer immunzytochemischen Methode untersucht, ob bei Patienten mit hepatobiliären Tumoren oder Lebermetastasen gastrointestinaler Malignome bereits zum Operationszeitpunkt eine Tumorzell dissemination in die Bauchhöhle oder das Knochenmark vorlag. Um der Antigenheterogenität der Tumoren Rechnung zu tragen, wurden sieben monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene und Zytokeratin (Ra 96, C1P83, Ca19-9, C 54-0, 17-1A, KL-1, AFP) verwendet. Mit diesen Markern wurden Peritoneallavagen, Knochenmark- und Aszitesproben auf das Vorhandensein von Tumoreinzellen getestet sowie Tumorgewebe gefärbt.

Metastatische Einzelzellen stellen ein besonderes Problem in der Tumordiagnostik dar. Sie sind mit der konventionellen präoperativen Diagnostik nicht feststellbar, zeichnen aber für Lokalrezidive und Fernmetastasen trotz vermeintlich kurativer Operation verantwortlich. Für einige Tumoren (Mammakarzinom, Pankreaskarzinom und kolorektales Karzinom) konnte eine Korrelation der Einzelzell dissemination mit dem Stadium und der Prognose der Erkrankung gezeigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten primären Malignome (hepatozelluläre Karzinome, Klatskintumoren und Gallenblasenkarzinome) sind durch eine sehr schlechte Prognose gekennzeichnet. Dies beruht auf einem späten Diagnosezeitpunkt, zu dem eine vollständige operative Entfernung des Tumors meist nicht mehr möglich ist und auf der zeitlich begrenzten Wirksamkeit adjuvanter Therapieverfahren. Die sehr frühe Generalisierung der Erkrankung als Ursache dieser schlechten Prognose ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Es wurden bei 59 % der untersuchten Patienten Tumoreinzellen in mindestens einer Aufbereitung gefunden, wobei ein Zusammenhang der Detektionsrate mit dem TNM-Stadium bestand. Die monoklonalen Antikörper gegen Ca 19-9 und CEA färbten am häufigsten Tumoreinzellen in den Peritoneallavagen an, was die Bedeutung dieser tumorassoziierten Antigene als wichtigste Tumormarker gastrointestinaler Tumoren unterstreicht. Im Knochenmark war der Zytokeratinmarker KI-1 am sensitivsten. Diese Ergebnisse der immunzytochemischen Austestung der Peritoneallavage und des Knochenmarkes von Patienten mit hepatobiliären Karzinomen entsprechen den Befunden bei anderen gastrointestinalen Tumoren. Sollten Nachsorgeuntersuchungen bestätigen, daß dem Nachweis disseminierter Einzelzellen prognostische Relevanz zukommt, könnte mit Hilfe der Immunzytochemie die individuelle Therapieplanung für die Patienten mit hepatobiliären Tumoren verbessert werden, indem beispielsweise frühzeitig die Indikation für adjuvante Therapieverfahren gestellt wird oder einer Leberteileresektion der Vorzug gegenüber einer Lebertransplantation gegeben wird.

F. Literaturverzeichnis

- Amendola BE, Brady LW, Woo D, Markoe AM, Miyamoto C, Rackover M, Bulova S, Steplewski Z, Koprowski H (1990) Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic carcinoma to the liver: report of a pilot study including leukopheresis. *Am J Clin Oncol* 13:144-147
- Bioscintia Bericht (1993) Tumormarker und ihre klinische Bedeutung für Diagnostik und Therapie. *Bioscintia Bericht* 54:10-20
- Braun S, Pantel K (1995) Immunodiagnosis and immunotherapy of isolated tumor cells disseminated to bone marrow of patients with colorectal cancer. *Tumori* 81(3 Suppl):78-83
- Brumm C, Schulze C, Charels K, Morohoshi T, Kloppel G (1989) The significance of alpha-fetoprotein and other tumour markers in differential immunocytochemistry of primary liver tumours. *Histopathology* 14/5:503-513
- Brockhaus M, Wysocka M, Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1985) Normal salivary mucin contains the gastrointestinal cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the serum mucin of patients. *Vox Sang* 48:34-38
- Broll R, Lembcke K, Stock C, Zingler M, Duchrow M, Schimmelpenning H, Strik M, Muller G, Kujath P, Bruch HP (1996) Tumor cell dissemination in bone marrow and peritoneal cavity. An immunocytochemical study of patients with stomach or colorectal cancer. *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 381/1:51-58
- Burkhardt R (1980) The clinical study of micrometastatic cancer by bone biopsy. *Bull Cancer* 67/3:291-305
- Carr BI, Kar S (1991) An assay for hepatoma micrometastasis: albumine gene expression in peripheral blood from patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatology* 14:108A
- Chan D, Kelsten M, Rock R, Bruzek D (1986) Evaluation of a monoclonal immunoenzymometric assay for Alpha-Fetoprotein. *Clin Chem* 32/7:1318-1322
- Chess Q, Hajdu S (1986) The Role of Immunoperoxidase Staining in Diagnostik Cytology. *Acta Cytol* 30/1:1-7
- Colli A, Cocciolo M, Riva C, Marcassoli L, Pirola M, Di Gregorio P, Buccino G (1993) Ascitic fluid analysis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 72:677-682
- Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Lumley H, Imrie S, Jones M, Coombes RC, Neville AM (1983) Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. *J R Soc Med* 76:359-364
- 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

- Dirsch OR, Landolt U, Pedio G (1991) Möglichkeiten der Zytodiagnostik im Aszites. *Leber Magen Darm* 21:113-115
- Dusheiko GM (1990) Hepatocellular carcinoma associated with chronic viral hepatitis. Aetiology, diagnosis and treatment. *Br Med Bull* 46:492-511
- Fagerberg J, Frodin JE, Wigzell H, Mellstedt H (1993) Induction of an immune network cascade in cancer patients treated with monoclonal antibodies (ab1). I. May induction of ab1-reactive T cells and anti-anti-idiotypic antibodies (ab3) lead to tumor regression after mAb therapy? *Cancer Immunol Immunother* 37:264-270
- Franke WW, Schmid E, Winter S, Osborn M, Weber K (1979) Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* 123:25-46
- Furuta T, Sonoda T, Matsumata T, Kanematsu T, Sugimachi K (1992) Hepatic resection for a hepatocellular carcinoma larger than 10 cm. *J Surg Oncol* 51:114-117
- Gerdes J (1985) An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery. *Int J Cancer* 35:169-171
- Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M (1994) Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12:725-729
- Gold P, Freedman S (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122/1:467-481
- Haglund C, Roberts PJ, Jalanko H, Kuusela P (1992) Tumour markers CA 19-9 and CA 50 in digestive tract malignancies. *Scand J Gastroenterol* 27:169-174
- Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larsson A, Ghosh R, Borner O, Buchegger F, Mach JP, Burtin P, al. e (1989) Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 49:4852-4858
- Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, Butler RN, Mi JX, R.E. S, Dobrovic A (1993) Immunobead-PCR: A technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 53:3455-3458
- Häring R, Zilch H (1992) *Lehrbuch der Chirurgie*, 3. Aufl. de Gruyter, Berlin
- Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H (1979) Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1438-1452
- Hirai H, Taketa K (1992) Lectin affinity electrophoresis of alpha-fetoprotein. Increased specificity and sensitivity as a marker of hepatocellular carcinoma. *J Chromatogr* 604:91-94

- Isselbacher KJ, Dienstag JL (1994) Neoplasms of the Liver. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (ed) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1495-1498.
- Jenkins RL, Pinson CW, Stone MD (1989) Experience with transplantation in the treatment of liver cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 23:104-109
- Juhl H, Kalthoff H, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B (1995) Immunzytologischer Nachweis mikrometastatischer Zellen bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren. *Zentralbl Chir* 120:116-122
- Juhl H, Kalthoff K, Krüger U, Schott A, Schreiber W, Henne-Bruns D, Kremer B (1994a) Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in der Bauchhöhle und im Knochenmark von Pankreascarcinompatienten. *Chirurg* 65:1111-1115
- Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, Henne-Bruns D, Kremer B, Schmiegel W, Neumaier M, Wagener C, Schreiber HW, Kalthoff H (1994b) Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 57:330-335
- Kalthoff H, Holl K, Schmiegel W, Klöppel G, Arndt R, Matzku S (1987) A new mucin reacting monoclonal antibody for serum diagnosis and radioimmunoscintigraphy of pancreatic cancer. *J Tumormarkers Oncol* 2:75
- Kalthoff H, Kreiker C, Schmiegel WH, Greten H, Thiele HG (1986) Characterization of Ca 19-9 bearing mucins as physiological exocrine pancreatic secretion products. *Cancer Res* 46:3600-3607
- Kawahara M, Terasaki PI, Chia D, Johnson C, Hermes M, Tokita K (1986) Use of four monoclonal antibodies to detect tumor markers. *Cancer* 58:2008-2012
- Kinoyama S, Yamada G, Nagashima H (1986) Ultrastructural observation of alpha-fetoprotein producing cells in human hepatocellular carcinoma using immunoperoxidase methods—comparison with fetal liver. *J Gastroenterol (Tokio)* 21:152-161
- Klapdor R (1991) Tumor Associated Antigens, Oncogenes, Receptors, Cytokines in Tumor Diagnosis and Therapy at the Beginning of the Nineties. 6th Symposium on Tumor Markers, Hamburg 1991
- Klar D, Lenz A (1991) Zyto-Diagnostik von Liquor mittels hochwertiger Objektträgerpräparate. *BioTec Life Science* 2:34-38
- Koehler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmueller G (1992) Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340:685-689

- Liotta L, Stetler-Stevenson W (1991) Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51:5054-5059
- Luporini G, Labianca R, Pancera G (1993) Medical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol Suppl* 3:115-118
- Lüttges J, Neumann K, Pflüger K-H, Schmitz-Moormann P (1988) Differentialzytologie von Ergußflüssigkeiten unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern. *Pathologie* 9:137-142
- Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1983) Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res* 43:5489-5492
- Masucci G, Ragnhammar P, Wersall P, Mellstedt H (1990) Granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor augments the interleukin-2-induced cytotoxic activity of human lymphocytes in the absence and presence of mouse or chimeric monoclonal antibodies (mAb 17-1A). *Cancer Immunol Immunother* 31:231-235
- Mendelsohn J (1994) Principles of Neoplasia. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (ed) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol. 2. 13th edn. McGraw-Hill, New York, pp 1814-1827.
- Meredith RF, LoBuglio AF, Plott WE, Orr RA, Brezovich IA, Russell CD, Harvey EB, Yester MV, Wagner AJ, Spencer SA, et (1991) Pharmacokinetics, immune response, and biodistribution of iodine-131-labeled chimeric mouse/human IgG1,k 17-1A monoclonal antibody. *J Nucl Med* 32:1162-1168
- Molino A, Colombatti M, Bonetti F, Zardini M, Pasini F, Perini A, Pelosi G, Tridente G, Veneri D, Cetto GL (1991) A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer* 67:1033-1036
- Moll R (1986) Epitheliale Tumormarker. *Verh Dtsch ges Path* 70:28-50
- Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T (1996) Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 68/6:739-743
- Moore D, Jr., Pazdur R (1993) Systemic therapies for unresectable primary hepatic tumors. *J Surg Oncol Suppl* 3:112-114
- Muraro R (1985) Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinomas versus normal adult tissues. *Cancer Res* 45:5769-5780
- Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Taniura H, Yamanoi A, Uchida M, Kimoto T, Takemoto Y, Nakamura T, Yukaya H (1993) Liver resection for hepatocellular carcinoma. Results of 229 consecutive patients during 11 years. *Ann Surg* 217:375-384

- Osborn M, Weber K (1983) Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48:372-394
- Otsuru A, Nagataki S, Koji T, Tamaoki T (1988) Analysis of Alpha-Fetoprotein gene expression in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis by in situ hybridization. *Cancer* 62:1105-1112
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmueller G (1993) Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85:1419-1424
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmueller G (1991) Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51:4712-4715
- Pichlmayr R, Weimann A, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, Klempnauer J, Bornscheuer A, Chavan A, Schmoll E, Lang H, Tusch G et al. (1995) Role of liver transplantation in the treatment of unresectable liver cancer. *World J Surg* 19/6:807-813
- Ramaekers FC, Haag D, Kant A, Moesker O, Jap PHK, Vooijis GI (1983) Co-expression of keratin and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(9):2618-2622
- Ravoet C, Bleiberg H, Gerard B (1993) Non-surgical treatment of hepatocarcinoma. *J Surg Oncol Suppl* 3:104-111
- Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, al. e (1983) Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 2:1271-1274
- Schirmacher P, Rogler CE, Dienes HP (1993) Current pathogenetic and molecular concepts in viral liver carcinogenesis. *Virchows Arch B Cell Pathology* 63:71-89
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Goettlinger G, Schmidt G, Haeuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, al. e (1987) Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8672-8676
- Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmueller G (1991) Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27:1461-1465
- Schmiegel WH, Kalthoff H, Arndt R, Giesecking J, Greten H, Kloeppe G, Kreiker C, Ladak A, Lampe V, Ulrich S (1985) Monoclonal antibody-defined human pancreatic cancer-associated antigens. *Cancer Res* 45:1402-1407

- Schott A, Vogel I, Krueger U, Kalthoff H, Schreiber HW, Schmiegel W, Henne-Bruns D, Kremer B, Juhl, H (1998) Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker. *Ann Surg* 227/3:372-379
- Sears D, Hajdu S (1987) The Cytologic Diagnosis of Malignant Neoplasms in Pleural and Peritoneal Effusions. *Acta Cytol* 31/2:85-95
- Seifert G (1983) Zur Pathomorphologie der hämatogenen Metastasierung. *Pathologe* 4:194-203
- Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L (1991) Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 36:962-972
- Stritzel M (1994) Nachweis von Mikrometastasen in der Peritonealhöhle und im Knochenmark durch monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene und Zytokeratine beim Magen- und Kolorektaladenokarzinom. Dissertation Humanmedizin, Fachbereich Medizin, Universität Hamburg
- Tabor E (1989) Hepatocellular carcinoma: possible etiologies in patients without serologic evidence of hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 27:1-6
- Tanaka K, Hirohata T, Takeshita S, Hirohata I, Koga S, Sugimachi K, Kanematsu T, Ohryohji F, Ishibashi H (1992) Hepatitis B virus, cigarette smoking and alcohol consumption in the development of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Fukuoka, Japan. *Int J Cancer* 51:509-514
- Tang ZY, Yu YQ, Zhou XD, Yang BH, Ma ZC, Lin ZY (1993) Subclinical hepatocellular carcinoma: an analysis of 391 patients. *J Surg Oncol Suppl* 3:55-58
- Terblanche J (1994) Hepatobiliary Malignancy, Edward Arnold Inc, London, p 672.
- Tomimatsu M, Ishiguro N, Taniai M, Okuda H, Saito A, Obata H, Yamamoto M, Takasaki K, Nakano M (1993) Hepatitis C virus antibody in patients with primary liver cancer (hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and combined hepatocellular-cholangiocarcinoma) in Japan. *Cancer* 72:683-688
- Venook AP, Stagg RJ, Lewis BJ, Chase JL, Ring EJ, Maroney TP, Hohn DC (1990) Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 8:1108-1114
- Vogel W, Judmaier G (1989) Tumor markers in internal medicine hepatology. *Wien Klin Wochenschr* 101:484-489
- Watanabe Y, Endo K, Saga T, Koizumi M, Sakahara H, Nakai T, Hosono M, Yao ZS, Kuroki M, Matsuoka Y, et (1990) Influence of cocktails of labeled monoclonal antibodies on the localization of antibodies in human tumor xenografts. *Jpn J Cancer Res* 81:266-271
- Werner M, Kaloutsi V, Walter K, Buhr T, Bernhards J, Georgii A (1992) Immunohistochemical examination of routinely processed bone marrow biopsies. *Pathology, Research and Practice* 188/6:707-713

- Woo DV, Li D, Mattis JA, Steplewski Z (1989) Selective chromosomal damage and cytotoxicity of ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody 17-1a in human cancer cells. *Cancer Res* 49:2952-2958
- Wu JT (1990b) Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: A review. *Ann Clin Lab Sci* 20:98-105
- Yamashita Y, Takahashi M, Koga Y, Saito R, Nanakawa S, Hatanaka Y, Sato N, Nakashima K, Urata J, Yoshizumi K, et (1991) Prognostic factors in the treatment of hepatocellular carcinoma with transcatheter arterial embolization and arterial infusion. *Cancer* 67:385-391
- Yokoyama I, Carr B, Saitsu H, Iwatsuki S, Starzl TE (1991) Accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Cancer* 68:2095-2100

G. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Prinzip der verwendeten Färbemethode
- Abb. 2: Anteil der verschiedenen Malignome an den Aufbereitungen
- Abb. 3: Übersicht über die Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Aufbereitungen
- Abb. 4: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Aufbereitungen; aufgeschlüsselt nach Tumorarten
- Abb. 5: Detektionsrate von Tumoreinzellen durch die verwendeten AK; aufgeschlüsselt nach Aufbereitungen
- Abb. 6: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den Aufbereitungen; aufgeschlüsselt nach den verwendeten AK
- Abb. 7: Detektionsrate von Tumoreinzellen in Abhängigkeit vom Grading
- Abb. 8: Detektionsrate von Tumoreinzellen in Abhängigkeit vom TNM-Stadium
- Abb. 9: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom
- Abb. 10: Aszites-Präparat eines HCC-Patienten
- Abb. 11: Tumorpräparat eines HCC-Patienten
- Abb. 12: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren
- Abb. 13: Kulturzellen der Peritoneallavage eines Patienten mit Klatskintumor
- Abb. 14: Knochenmarkpräparat desselben Patienten mit Klatskintumor
- Abb. 15A: PL-Präparat desselben Patienten mit Klatskintumor
- Abb. 15B: Präparat 15A in Vergrößerung
- Abb. 16: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Klatskin-Tumor
- Abb. 17: Detektionsrate von Tumoreinzellen in den einzelnen Aufbereitungen bei Patienten mit Gallenblasenkarzinom
-
- Tab. 1: Patienten mit hepatozellulärem Karzinom
- Tab. 2: Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren
- Tab. 3: Patienten mit Klatskin-Tumoren
- Tab. 4: Patienten mit Gallenblasenkarzinomen
- Tab. 5: Kontrollgruppe

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. H. W. Schreiber für die Vergabe des Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Für die Möglichkeit, an seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können, danke ich Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Ch. Broelsch, ehemaliger Direktor der Chirurgischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg.

Herrn PD Dr. H. Juhl, der für Fragen und Probleme jederzeit zur Verfügung stand, möchte ich für seine Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche herzlich danken.

Herrn Dr. M. Stritzel und Herrn Andreas Wroblewski danke ich für die nette Zusammenarbeit im Labor.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Martin.

LEBENS LAUF

- Personaldaten:** Christin Merkel, geb. Schwechten
Geburtsdatum, -ort: 10.04.1967 in Wittenburg, Mecklenburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Dr. Martin Merkel
ein Sohn und eine Tochter
- Herkunft:** Wilko Schwechten, Pastor
Liselotte Schwechten, Religionslehrerin
eine jüngere Schwester
- Schulbildung:** 1974 - 1983: Grundschule
1983-1985 Goethe - Schule Ludwigslust
Juli 1985: Abitur, Note 1,1
- Pflegepraktikum:** 9/1985 - 8/1986: Krankenhaus Neu Kalliß
- Studium:** 9/1986 - 8/1989: Humanmedizin an der Universität Rostock
August 1989: Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
über die ungarische Botschaft in Budapest
9/1989 - 8/1994: Humanmedizin an der Universität Hamburg
Praktisches Jahr: Innere Medizin: Indiana University, Indianapolis
Chirurgie: University of Texas, Houston; Allgemeines
Krankenhaus Wandsbek, Hamburg
Gynäkologie: Allg. Krankenhaus Barmbek, Hamburg
Juni 1994 Ärztliche Prüfung, Gesamtnote sehr gut (1,8)
- AiP:** 10/1994 - 3/1996: Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedi-
zin, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
- Facharztausbildung:** seit April 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
- Erziehungsurlaub:** 1/1997 - 9/1999