UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Operative Medizin
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

Phänotypische Charakterisierung von frühdisseminierten Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes (Oesophagus, Magen, Pankreas, Colorektum) und der Lunge (NSCLC)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Ilona Wolff

aus Kiew

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Izbicki

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Rösch

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 4
1.1. Einführung 4
1.1.1. Eigenschaften der Tumorzellen und ihre Metastasierung 6
1.1.2. Neues Modell der Metastasierungskaskade 11
1.1.3. Lymphogene Metastasierung 16
1.1.4. Lymphkapillaren / Lymphknoten 17
1.1.5. Serieller oder paralleler Transport im Lymphsystem 18
1.1.6. Lymphwege 19
1.2. Die Minimale Residuale Tumorerkrankung (MRD) 20
1.2.1. Immunhisto- und immunzytochemische Nachweismethoden 22
1.3. Inzidenz und prognostische Relevanz von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten 23

2. Material und Methoden 26
2.1. Studienplanung und Patienten 26
2.2. Charakterisierung der Patienten 28
2.3. Materialgewinnung 31
2.4. Aufarbeitung des Gewebes 34
2.4.1. Disaggregation 35
2.5. Färbungen – Die APAAP-Komplex-Methode 38
2.5.1. APAAP – Immunhistochemie: Kryoschnitte 40
2.5.2. Immunzytochemie: Spins (Einzelzelldetektion) 45
2.6. Der Primärantikörper Ber-EP4 46
2.7. Auswertung 48
2.8. Beispiele für Färbeergebnisse 49
2.9. Statistische Auswertung 51

3. Ergebnisse 52
3.1. Inzidenz von Mikrometastasen in Lymphknoten 52
3.2. Ber-EP4 positive Lymphknoten: Schnitt vs. Spin 56
3.3. Mikrometastasen in den pN0- und pN1-Gruppen 58
3.4. Tumore 61
3.4.1. Oesophagus-Karzinom 61
3.4.2. Magen-Karzinom 64
3.4.3. Kolon-Karzinom 67
3.4.4. Pankreas-Karzinom 70
3.4.5. Bronchial-Karzinom 73

4. Diskussion 77

5. Zusammenfassung 93

6. Literaturverzeichnis 95

7. Danksagung 109

8. Lebenslauf 110

9. Eidesstattliche Erklärung 111

1. Einleitung

1.1. Einführung

Maligne epitheliale Tumoren stellen die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen und krebsbezogenen Todesfälle in den westlichen Industrieländern und so auch in der Bundesrepublik Deutschland dar.
Da die frühzeitige lymphogene Aussaat ein wesentlicher prognostischer Faktor ist, kommt der Beurteilung der regionären Lymphknoten eine erhebliche Bedeutung zu [11, 34, 57, 77].

Trotz verbesserter operativer Techniken, Fortschritten in der Frühdiagnostik und Anwendung multimodaler Therapiestrategien, konnte die Prognose von Patienten mit einigen operablen Karzinomerkrankungen in den letzten Jahrzehnten nur unwesentlich verbessert werden. Ein erheblicher Prozentsatz der Patienten mit Karzinomen, die in kurativer Absicht therapiert wurden, erleidet ein lokoregionales oder systemisches Rezidiv.
So liegen beispielsweise beim Ösophaguskarzinom die postoperativen 5-Jahresüberlebensraten nahezu unverändert zwischen 20% und 36% [67, 108, 118, 94, 38]. Trotz der aggressiven chirurgischen Therapie bei Patienten mit lokal begrenzten Tumoren und den Fortschritten in der postoperativen Behandlung in den letzten 20 Jahren wird die Gesamtprognose von Krebspatienten, welche einer kurativ intendierten chirurgischen Therapie zugeführt werden konnten, meist durch eine zum Operationszeitpunkt bereits stattgehabte systemische Tumorzellaussaat bestimmt, welche jedoch mit derzeitigen prä- und postoperativen Stagingmodalitäten nicht verifiziert werden kann. Diese *okkulte* Tumorzellaussaat kann aber mit neuen sensitiven immunzyto- oder immunhistochemischen bzw. molekularbiologischen Techniken aufgespürt werden. Als Indikatororgane zur Detektion dieser okkult disseminierten Tumorzellen haben sich hierbei insbesondere die Lymphknoten und das Knochenmark bewährt. Darüber hinaus konnte die klinische Relevanz einer okkulten Tumorzelldissemination in Lymphknoten und Knochenmark in einer Vielzahl von Studien belegt

werden, wobei Patienten mit okkult disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten oder Knochenmark signifikant früher und häufiger Tumorrezidive entwickelten bzw. signifikant früher und häufiger tumorbedingt verstarben als Patienten ohne diese Zellen [113, 103, 70, 55, 112, 43, 50, 13, 68, 69, 89, 99, 120, 44, 53, 63, 64, 65, 10, 45, 5].

Trotz dieser Ergebnisse wird aber weiterhin sehr kontrovers über die biologische Relevanz dieser immunzyto- und immunhistochemisch bzw. molekularbiologisch detektierten „Tumorzellen“ diskutiert, da diesen Zellen häufig tumortypische zytomorphologische Charakteristika fehlen [40, 39, 41]. Weiterführende Analysen an diesen Zellen sind zwar prinzipiell möglich, gestalten sich jedoch aufgrund der extrem niedrigen Zellfrequenz äußerst schwierig. So werden im Knochenmark etwa eine Zelle pro 10^5-10^6 normaler mononukleärer Knochenmarkszellen bzw. in pathohistologisch „unauffälligen“ Lymphknoten etwa eine Zelle pro 10^4-10^5 normaler Lymphknotenzellen gefunden [97]. Bei der weiterführenden Analyse dieser Einzelzellen kommen verschiedene Techniken zum Einsatz. Hierzu gehören beispielsweise immunzytochemische Doppelfärbetechniken [83], die *in vitro*-Expansion [84, 101], die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [76] und seit neuestem auch die komparative genomische Hybridisierung auf Einzelzellniveau (Einzelzell-CGH; SCOMP) [60]. Insgesamt konnten durch diese Analysen erste Hinweise erbracht werden, dass es sich bei einem Großteil dieser immunzyto-/immunhistochemisch detektierbaren Einzelzellen wahrscheinlich tatsächlich um Tumorzellen handelt [101, 46, 105]. Da maligne Tumore während ihrer Progression in einem komplexen, mehrstufigen Prozess die Fähigkeit zur Metastasierung erwerben, und Tumormetastasen während ihrer Proliferation in den Sekundärorganen wiederum immer neue Zellvarianten auszubilden scheinen, scheinen diese okkult disseminierten Tumorzellen als Frühformen der zur Dissemination (und Metastasierung) befähigten Krebszelle besonders geeignete Ziele darzustellen, um die molekularen Grundlagen von Metastasierungsvorgängen weiter aufzuklären.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch eine immunzyto-/immunhistochemische Detektierung von Mikrometastasen in den

Lymphknoten, die auf zwei unterschiedliche Weisen (Gefrierschnitte und Einzelzell-Spins) aufgearbeitet wurden, eine Aussage zu treffen, ob man durch eine feinere Lymphknotenbearbeitung (Einzelzell-Spin) Mikrometastasen besser nachweisen kann. Dabei haben wir die Sensitivität eines neuen Detektionsverfahrens an disaggregierten Lymphknoten untersucht.

Mit Hilfe der Alkalischen-Phosphatase-Anti-Alkalischen-Phosphatase-(APAAP)-Methode [19] wurden die Malignomzellen auf die Expression jener Antigene untersucht, deren Nachweis in Lymphknoten auf den epithelialen Ursprung der betreffenden Zellen hinweist, denn epitheliale Zellen kommen in gesunden Lymphknoten nicht vor. Sie sind somit karzinomatös. Damit können diese positiv gefärbten Zellen als (Mikro-)Metastasen des Primärtumors identifiziert werden. Untersucht wurden Oberflächenantigene der epithelialen Zellen, die mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 reagieren und durch die APAAP-Färbung sichtbar gemacht werden können.

1.1.1. Eigenschaften der Tumorzellen und ihre Metastasierung

In der Tumorpathologie umschreibt Metastasierung (griech. *metastasis* Wegzug, Wanderung) ein komplexes Geschehen, das zu sekundären, das heißt, vom Primärtumor ausgehenden, oder tertiären, das heißt, von sekundären Absiedlungen ausgehenden, Absiedlungen von Tumorzellen in benachbarte oder entfernte Organe führt. Die Lymph- und Blutbahnen (lymphogen, hämatogen, s. Abb. 1) sind die häufigsten Wege der Metastasierung. Seltener tritt die direkte Tumorausbreitung (per continuitatem) auf Nachbarorgane oder die intrakanalikuläre Verschleppung von Tumorzellen, z.B. im Bronchialsystem auf.

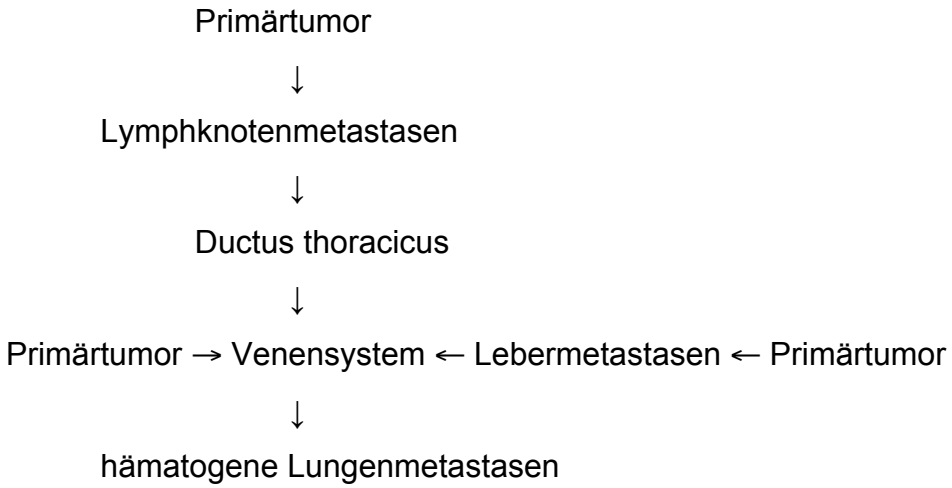


Abb. 1: Möglichkeit der Entwicklung von hämatogenen Lungenmetastasen aus einem extrapulmonalen Primärtumor [6].

Schon seit langer Zeit hat man versucht festzustellen, [18, 24, 35, 47, 54] was maligne Tumoren befähigt, sich im Organismus mehr oder weniger unbeschränkt auszubreiten.
Einige der für den Metastasierungsprozess relevanten Eigenschaften von Tumorzellen sind:

1. *Autonome Zellproliferation* [111]:
   Proliferationsdruck
2. *Unregulierte Gewebsinvasion* [8, 78, 92]:
   Amöboide Beweglichkeit, verminderte Kontaktinhibition, Freisetzung oder Aktivierung lytischer Enzyme (Proteasen, Collagenasen etc.)
3. *Oberflächen- (Membran-) Besonderheiten* [84, 92, 119]:
   Verminderte Zellkohäsion, thromboplastische Aktivität, Rezeptoren-Alteration, Tumorantigene etc.
4. *Produktion des Angiogenese-Faktors* [56]:
   Induktion einer Kapillarproliferation im Wirtsorganismus
5. *Ausschaltung von Abwehrmechanismen* [24]:
   Neutralisation zytotoxischer Antikörper, zytotoxischer Lymphozyten etc.

Da die meisten Krebsarten Metastasen erzeugen, erkennt man die Malignität eines Tumors an seiner Metastasierungsfähigkeit. Dieser Vorgang ist hoch selektiv, denn von den Millionen Zellen, die von einem Tumor abwandern und in die Blutbahn gelangen, führen nur einige wenige zu einer Metastase, die manchmal erst nach Jahren entdeckt wird.
Das Zusammenspiel der an der Metastasierung beteiligten Faktoren wird von Genen kontrolliert, die ähnlich wie bei der Tumorinvasion für Zelladhäsionsmoleküle (E-Cadherin) und/oder Inhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP) kodieren. Diese werden erst im späten Verlauf einer Tumorkrankheit (z.B. durch Mutation) deaktiviert. Veränderungen der Immunogenität scheinen bei der zunehmenden Transformation von Tumorzellen eine zentrale Bedeutung zu haben [8, 23, 29, 33].

Der Metastasierungsvorgang vollzieht sich in folgenden Schritten:

- *Kohäsionsverlust und Kohäsionsunabhängigkeit:* Die meisten malignen Tumorzellen besitzen durch die Sialinsäure eine erhöhte negative Oberflächenspannung. Damit entstehen abstoßende Kräfte zwischen den Zellen, so dass die Tumorzellen sich aus dem Zellverband lösen. Außerdem werden durch Mutation bestimmter Tumorsuppressorgene wie APC (Adenoatöse-Polyposis-Coli-Gen, Lokus:5q21) die Zellproliferation und die Zellkohäsion beeinflusst. Das APC-Gen-Produkt ist im Zytoplasma lokalisiert und inhibiert das Signaltransduktionsmolekül ß-Catenin, wodurch der T-Zell-Transkriptionsfaktor Tcf und damit die Zellproliferation gedrosselt wird. Außerdem bindet das APC-Gen-Produkt an die zytoplasmatische Seite des E-Cadherins, welches mit seinem extrazellulären Teil den Zellzusammenhalt garantiert. Manche Zelladhäsionsmoleküle werden so verändert, dass der Zellzusammenhalt verloren geht. Bestimmte Suszeptibilitätsgene wie das PTEN-Gen (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, Lokus: 10q23.3) interagieren inhibierend mit der FAK (focal adhesion kinase). Ein

Verlust solcher Gene hat zur Folge, dass die zelluläre Kohäsion sowie die Verankerung der Zelle in der Extrazellulärmatrix verloren gehen.

- *Verlust der Kontakthemmung:* Die Kontaktinhibition (Einstellen der Bewegungs- und Zellteilungsaktivität) wird durch Signalstrukturen auf der Zelloberfläche in Form von fukosylierten Oligosacchariden (Lewis-Blutgruppenantigene) und Zelladhäsionsmolekülen gewährleistet. Diese melden über die Kette „Transmembranprotein → membranständiges Verankerungsprotein (Catenin) → Zytoskelett“ das Stoppsignal an die „Proliferationszentrale“ weiter. Bei den malignen Tumorzellen ist diese Signalkette und somit eine sinnvolle Zellkommunikation gestört, so dass sie ihre gegenseitigen Grenzen nicht mehr respektieren und so lange weiter wachsen, bis sie sich gegenseitig erdrücken.

- *Invasion und Infiltration:* Tumorzellen bilden Motilitätsfaktoren und Chemokine (chemische Lockstoffe), mit denen sie sich gegenseitig beweglich machen. Gleichzeitig sezernieren sie unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie bFGF (fibroblast growth factor) und TGF-ß (tumor growth factor) Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche Kollagene sogar der Basalmembran sowie Laminin und Fibronektin abbauen können. Metalloproteinasen werden von Tumorzellen selbst aber auch von Tumorstroma und Tumorentzündungszellen produziert. Mit ihrer Hilfe lösen sich die Tumorzellen aus dem ursprünglichen Zellverband und aus der Verankerung in der Extrazellulärmatrix. Die Tumorzellen sind nun in der Lage, in umgebende Gewebe und Gefäße einzubrechen. Die Lymphkapillaren weisen im Gegensatz zu den Blutgefäßen keine Basalmembran auf. Das ist der Grund, weshalb lymphogene Metastasen meist vor den hämatogenen Metastasen auftreten.

- *Angiogenese:* Als schnell wachsende Gewebe sind Tumore auf eine konstante Versorgung mit Blut und Sauerstoff angewiesen. Bereits im relativ frühen Stadium entwickelt sich im Tumor ein Kapillarnetz, das aus

umgebenen präexistenten Gefäßen entspringt: Die kollagenhaltige Basalmembran der postkapillären Venulen wird mit Hilfe von Matrixmetalloproteinasen der Tumorzellen und der umgebenden Stromazellen abgebaut. Dadurch können die Endothelzellen unter dem Antrieb von Chemokinen zum Tumorgewebe auswandern. Die Tumorzellen und die umgebenden Stromazellen sezernieren angiogene Wachstumsfaktoren wie Angiogenin, FGF und VEGF (vascular endothelial growth factor) dergestalt, dass die Endothelzellen in diesem Bereich proliferieren, und/oder die Angiogeneseinhibitoren wie Angiostatin Thrombospondin ineffektiv werden.

- *Abwehr:* In der terminalen Strombahn bleiben die Tumorzellen stecken. Damit sie nicht gleich von Immunsystem angegriffen und vernichtet werden, schützen sie sich zum einen mit einer verminderten Expression von HLA-Selbsterkennungsmolekülen, zum anderen mit einer Fibrinummantelung. Daneben bilden Krebszellen auch zytotoxische Substanzen, die die körpereigenen Immunabwehrzellen ausschalten [97].

Die Entstehung von Metastasen stellt einen komplexen, mehrstufigen Prozess dar. Hierbei kommt es in einem ersten Schritt innerhalb des Primärtumors zur Entwicklung von Zellvarianten, welche sich aus dem Tumorzellverband lösen, durch das umgebende Gewebe migrieren und nach Invasion und Penetration von Lymph- und Blutgefässen in die Zirkulation gelangen [6, 97]. Nach Erreichen der Sekundärorgane erfolgt in den letzten drei Schritten der Metastasierungskaskade die Adhäsion an das Gefäßendothel, gefolgt von Extravasion und Proliferation, wobei die Proliferation in der neuen Gewebsumgebung stark von gewebespezifischen Faktoren abhängig ist [7]. Auf molekularer Ebene konnte eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, welchen im Rahmen der Metastasierungskaskade eine Rolle zu spielen scheinen. So führt zunächst eine Herunterregulierung (*Down-regulation*) von desmosomalen Adhäsionsmolekülen, wie *E-Cadherin* und *Plakoglobin*, zum Verlust der

wechselseitigen Adhäsion im Tumorzellverband [19]. Anschließend wird die Invasion der Tumorzellen durch das umgebende Stroma und die Basalmembran durch die Expression vom Motilitätsfaktoren, wie dem *Scatter factor/Hepatocyte growth factor* (*SF/HGF*) und den *Transforming growth factors* (*TGFs*), sowie durch Sekretion von Proteasen wie *Cathepsin D*, *Metallo-Matrixproteinasen* (*MMPs*) und *Plasminogenaktivatoren* begünstigt [24, 26, 32, 48, 74].

1.1.2. Neues Modell der Metastasierungs-Kaskade

Zahlreiche in-vitro-Studien und Analysen von Tiermodellen haben gezeigt, dass Zellen, die von Metastasen isoliert wurden, sich sowohl genetisch als auch phänotypisch sehr von Zellen unterscheiden, die von ihren Primärtumoren isoliert wurden. So scheinen Subpopulationen von Primärtumorzellen während der späteren Stadien der Tumorprogression Metastasierungs-Eigenschaften zu erhalten [28]. Dies widerspricht Berichten, dass primäre Mammakarzinome spezifische Gen-Expression haben, die Metastasen vorhersagen kann [115, 114] – Studien deuten darauf hin, dass es nicht kleine Subpopulationen des Primärtumors sind, die die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen, sondern die meisten Zellen im Tumor [4].
Keines dieser Modelle vergleicht jedoch Lymphknoten und Fernmetastasen oder beinhaltet verfügbare Daten über disseminierte Tumorzellen.
Außerdem wurden die meisten Gen-Expression-Studien über Brusttumoren durchgeführt. Verschiedenen Tumorarten können aber verschiedene Metastasierungsmodelle folgen.
Man versuchte daher, ein umfassenderes Modell der Metastasierungs-Kaskade zu konstruieren [82], das verschiedene Disseminierungswege erlaubt.
Wie oben diskutiert, erwirbt ein großer Prozentsatz der Zellen des Primärtumors die Fähigkeit zur Metastasierung, wenn die Disseminierung der Tumorzellen sehr früh bei der Tumorentstehung beginnt. Wenn die

Disseminierung bei späten Stadien der Tumorprogression eingeleitet wird, entwickelt sich nur ein kleiner Prozentsatz von Zellen zu metastatischen Subklonen.
Bei Patienten mit Brustkrebs scheint die Disseminierung sehr früh in der Tumorentwicklung zu starten. Sowohl die Daten zu Gen-Expressions-Profilen verbunden mit Metastasen [115, 114, 4, 121] als auch die genetischen Merkmale der einzelnen disseminierten Tumorzellen, die von Patienten mit nicht-metastasiertem Krebs isoliert wurden, [59, 105] unterstützen dieses.
Metastasierung könnte zwei Modellen folgen, die einander zwar ergänzen, aber eigene Wege gehen.

Im ersten Modell (Abb. 2) disseminieren Krebszellen aus dem Primärtumor in den frühen Phasen des Tumorwachstums in die Lymphknoten oder Blut. Die disseminierten Tumorzellen proliferieren und bilden solide Metastasen in Lymphknoten, während die Tumorzellen, die in entfernte Standorte durch das Blut streuen, sterben oder ruhen.
In späteren Stadien disseminieren Tumorzellen von den manifesten Lymphknoten-Metastasen in entfernte Orte, wo sie in der Lage sind solide Metastasen zu bilden. Es ist möglich, dass diese Fähigkeit bei der Selektion dieser Zellen im Lymphknotenmilieu gewonnen wurde. Die Metastasierung in andere Organe ist also von der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen abhängig.

Im zweiten Modell (Abb. 2) disseminieren Zellen häufig durch das Blut vom Primärtumor zu entfernten Stellen, wo sie sich zu manifesten Metastasen ohne vorherige Passage durch die Lymphknoten entwickeln.
Bei Patienten mit Brustkrebs scheint diese hämatogene Disseminierung ein sehr frühes Ereignis in der Tumorprogression zu sein, so dass die ins Knochenmark disseminierten Tumorzellen als "unreife" Tumorzellen angesehen werden könnten, da sie eine begrenzte Lebensdauer haben und normalerweise nicht proliferieren.

Dennoch prognostiziert die Präsenz dieser disseminierten Zellen genau die Entwicklung von Fernmetastasen. Einige der disseminierten Tumorzellen beginnen am entfernten Standort zu proliferieren und erwerben genetische Mutationen unabhängig von denen des Primärtumors [105].

Nach experimentellen Daten [14], ist der Anteil an Zellen, die aus dem Einzel-Zell-Stadium solide Metastasen entwickeln, wegen der begrenzten Kapazität zu Proliferation und der Anzahl der genetischen Veränderungen, die von diesen "unreifen" Krebszellen erforderlich ist, um manifeste Metastasen zu bilden, wahrscheinlich gering.
In beiden Modellen kann weitere hämatogene Disseminierung von Metastasen, die sich schließlich in den Lymphknoten und in entfernten Organen manifestieren, auftreten. Jahre nach der Entfernung des Primärtumors bei Patienten mit Krebs mit manifesten Fernmetastasen liefert die Anwesenheit von Zytokeratin-positiven Zellen im peripheren Blut Indizien, dass Tumorzellen aus Metastasen ausbrechen und zu sekundären Geweben disseminieren können. Diese Tumorzellen könnten aggressiver sein, in dem Sinne, dass sie bereits selektiert wurden, um die dynamische Passage durch das Blut zu überleben, neue Organe zu infiltrieren und dann zu beginnen zu proliferieren.

Studien an Tiermodellen haben gezeigt, dass der letzte Schritt besonders geschwindigkeitsbestimmend bei der Bildung von manifesten Metastasen zu sein scheint [71]. Dieses Auswahlverfahren kann auch erklären, warum die disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit manifesten Metastasen einander genetisch ähneln [59].
Viele Teile dieses Modells müssen noch bei Patienten mit Krebs bei gleichzeitiger genetischer Charakterisierung von Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten, Blut und Knochenmark bestätigt werden.
Dieser Entwurf könnte jedoch helfen, die aktuellen Kontroversen in der klinischen Onkologie zu klären. Zum Beispiel gibt es eine anhaltende Debatte

darüber, ob eine Dissektion der axillären Lymphknoten bei Patienten mit Brustkrebs die Chancen für das Überleben verbessert [61].

Das beschriebene Modell (Abb. 2) zeigt, dass die Lebenserwartung eines Patienten davon abhängen würde, ob die Tumorzell-Disseminierung dem ersten oder zweiten Modell folgt.
Wenn die Tumorzellen zuerst in regionäre Lymphknoten streuen (Abb. 2), würde die Entfernung der Lymphknoten, bevor die sekundäre Disseminierung in den Blutkreislauf eintritt, den Patienten heilen.
Im Gegensatz dazu, wenn die Tumorzellen die Lymphknoten umgehen und zunächst über die Blutbahn disseminieren (Abb. 2), würde die Entfernung der Lymphknoten keinen Einfluss auf das klinische Ergebnis haben.
Die Arbeit in experimentellen Modellen ist daher wichtig für die Validierung der beschreibenden Daten, die an Patienten mit Krebs gewonnen wurden.

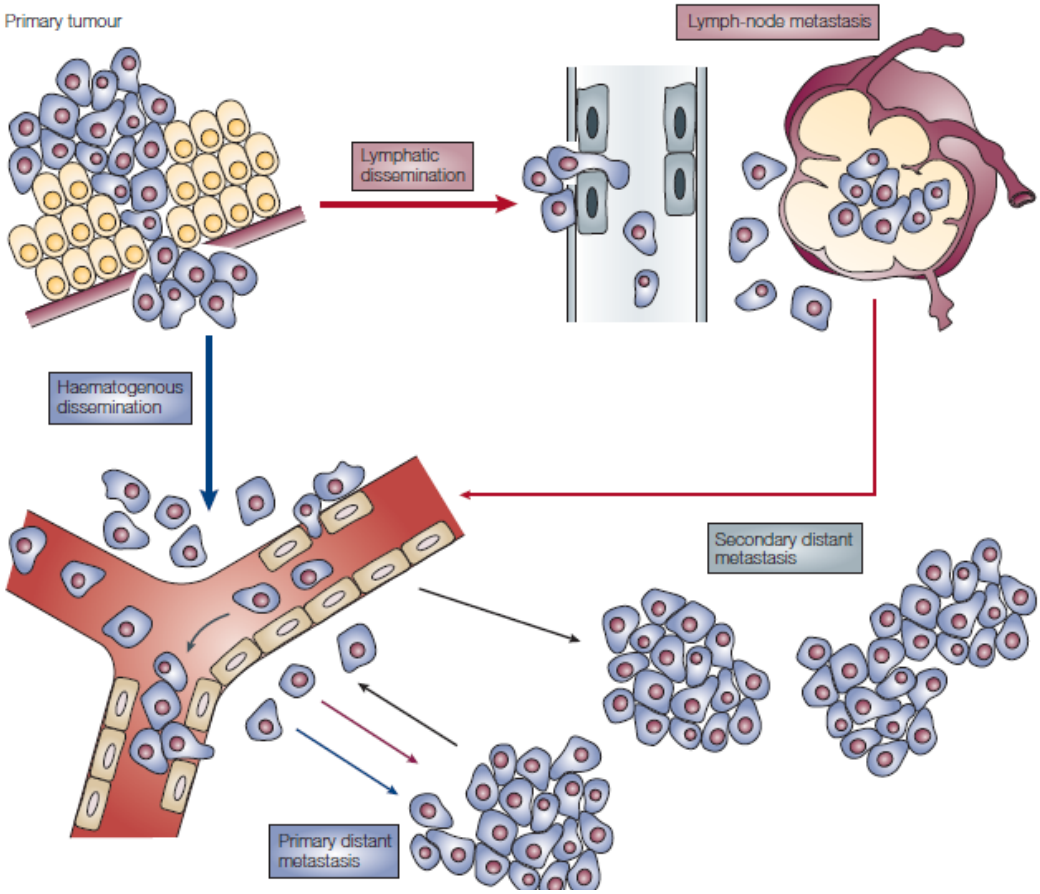


Abb.2: Modelle der Metastasierungskaskade. Tumorzellen können vom Primärtumor via Lymphwege (rote Pfeile) und über die Blutbahn (blaue Pfeile) disseminieren. Sekundäre hämatogene Disseminierung tritt auch von manifesten Metastasen aus in andere entfernte Orte (schwarze Pfeile) [82].

1.1.3. Lymphogene Metastasierung

- *Lymphangiosis carcinomatosa:* Die aus dem Randgebiet eines Tumors abgelösten Tumorzellen können in die Lymphgefäße einbrechen, weil diese keine Basalmembran aufweisen. Die Tumorzellen durchwandern die Gefäßwand wie Granulozyten und benötigen dazu etwa 24 Stunden. Sind die Strömungsbedienungen im betreffenden Lymphgefäß günstig, so vermehren sich die Krebszellen bereits in den Lymphgefäßen, verstopfen sie und wachsen an ihnen entlang. Wenn der Lymphabfluß behindert ist, beobachtet man auch eine Metastasierung gegen die Richtung des Lymphstromes, die sogenannte retrograde lymphogene Metastasierung.

- *Lymphonoduläre Metastasierung:* Meist aber werden die Tumorzellen vom Lymphstrom zum nächsten Lymphknoten verschleppt. Dort siedeln sie sich zunächst in dem subkapsulär gelegenen Randsinus ab. In dem Lymphknoten führt das Tumorwachstum zunächst zu einer Verdrängung und Infiltration des lymphatischen Gewebes. Später durchwuchert das Tumorgewebe den Lymphknoten, die Kapsel wird durchbrochen, das Tumorgewebe wächst extranodal weiter und dringt gelegentlich in die Blutgefäße und zwar meist in die Venolen ein.

- *Fernmetatasen:* Von den ersten Lymphknotenmetastasen aus werden die Tumorzellen über die efferenten Lymphbahnen auf dem Lymphweg weiter geschleppt, sodass schließlich mehrere hintereinander geschaltete Lymphknotenstationen befallen werden können. Es können aber auch Lymphknotenstationen übersprungen werden. Über die großen Lymphgefäße, vor allem den Ductus thoracicus gelangen die Krebszellen in entfernte Lymphknoten und schließlich in die Blutbahn.

Im Gegensatz zu den Sarkomen setzen Karzinome mit wenigen Ausnahmen in erster Linie lymphogene Metastasen [7, 26, 97].

Die lymphogene Metastasierung ist von besonderer klinischer Bedeutung, da selbst kleine Karzinome häufig Lymphknotenmetastasen aufweisen. Hieraus ergeben sich wichtige Konsequenzen für die Tumorbehandlung (Lymphadenektomie und Bestrahlung) [7].

1.1.4. Lymphkapillaren / Lymphknoten

Bei der lymphogenen Metastasierung stehen die toporegionalen Lymphknoten ganz im Vordergrund.

Die Lymphknotenkapillaren enthalten Öffnungen, durch die Partikel aus der extrazellulären Flüssigkeit in eine Lymphkapillare gelangen können und dann aktiv transportiert werden. Die Lymphkapillaren kontrahieren und erschlaffen alle zwei bis drei Minuten. Der Rückfluss wird durch Klappen verhindert. Je kleiner die Partikel sind, desto schneller gelangen sie zum nächsten Lymphknoten.

Die Partikel lagern sich zunächst im Lymphknoten ab. Je mehr Tumorzellen sich im Lymphknoten angesiedelt haben, desto geringer wird seine Aufnahmefähigkeit für weitere Partikel, seine Filterleistung sinkt. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Kategorien der Aufnahme:

1. Normale Aufnahme:	kein Tumorbefall Einzelne Tumorzellen im Lymphknoten
2. Verminderte Aufnahme:	zahlreiche Tumorzellen im Lymphknoten
3. Temporäre Anreicherung:	keine Aufnahme in das RHS mehr möglich, keine Fixierung
4. Keine Aufnahme:	Befall des Zugangs des Lymphknoten, Umgehung des Lymphknotens

Ist die zuführende Lymphbahn befallen, wird der betreffende Lymphknoten von den Partikeln umgangen. Die Partikel gelangen zu einem anderen Lymphknoten.
Wenn ein Partikel kleiner als 5 nm ist, kann er auch Blutkapillaren penetrieren und wird dann im Blut transportiert. Nach Applikation von derart kleinen Partikeln in peritumorales Gewebe gelangen diese nur begrenzt in Lymphgefäße. Größeren Partikeln ist der Weg in die Blutgefässe verschlossen [102].
Noch größeren Partikeln mit Durchmessern oberhalb von 500µm ist der Weg aus der extrazellulären Flüssigkeit auch in die Lymphkapillaren versperrt. Sie gelangen nicht in das Innere eines Lymphknotens [58, 80].

1.1.5. Serieller oder paralleler Transport im Lymphsystem

Partikel werden im Lymphsystem entweder seriell oder parallel transportiert. Serieller Transport beinhaltet, dass Partikel von einem bestimmten Ort nur einen bestimmten Lymphknoten in einer bestimmten Region in der 1. Stufe der Lymphknoten-Kaskade erreichen. Von diesem Knoten aus können später Partikel zum Lymphknoten der nächsten Stufe transportiert werden.

Ein paralleler Transport ist der gleichzeitige Zugang
- zu mehreren Lymphknoten einer Region in der ersten Stufe einer Kaskade,
- zu mehreren Lymphknoten einer Region in verschiedenen Stufen einer Kaskade,
- zu mehreren Lymphknoten in mehreren Regionen.

Im Parenchym werden Partikel nur in einen oder wenige Lymphknoten transportiert. Partikel werden oft in eine Lymphregion mitunter aber auch bis in vier verschiedene Lymphregionen transportiert. Die Anzahl der von einem

Ort aus erreichten Lymphknoten ist in verschiedenen Körperregionen unterschiedlich. So gibt es im Rektum mehr Möglichkeiten der Ausbreitung als bei der Mamma) [102].

1.1.6. Lymphwege

Das lymphatische System besteht aus endothelial begrenzten Lymphkapillaren, welche die gesamten Weichteile durchziehen und sich in größeren Lymphgefäßen vereinigen. Diese drainieren dann in die regionalen Lymphknoten, von wo aus letztendlich die zentralen Lymphgefäße erreicht werden.

Die Dichte des Lymphnetzes ist unterschiedlich: Sie ist an der Oberfläche wesentlich größer als subcutan [58]. Für Partikel in der extrazellulären Flüssigkeit an der Oberfläche sind die Wege zum Erreichen eines Lymphgefäßes kürzer als in der Tiefe. Sie können damit das Lymphgefäß schneller erreichen als den zugehörigen Lymphknoten [96].

1.2. Die Minimale Residuale Tumorerkrankung (MRD)

Trotz verbesserter Operationstechniken mit vermeintlich kompletter chirurgischer Tumorresektion (R0) und Anwendung multimodaler Therapiekonzepte erleidet ein hoher Prozentsatz von Patienten mit soliden malignen Tumoren nach wie vor frühzeitig ein Tumorrezidiv. Da das Auftreten lokoregionärer Rezidive durch radikale operative Strategien weitgehend verhindert werden kann, manifestieren sich Rezidivtumoren daher häufig als fernmetastatische Rezidive [47, 100]. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass es bei einem Teil dieser Patienten bereits zum Zeitpunkt der Primärtumoroperation zu einer okkulten Streuung von Tumorzellen gekommen ist, die mit derzeitigen bildgebenden Verfahren sowie routinemäßig durchgeführten histopathologischen Untersuchungen nicht erfasst werden kann. Durch den Einsatz sensitiver immunzyto- bzw. immunhistochemischer sowie molekularbiologischer Techniken ist es aber mittlerweile möglich, diese „okkulte Tumorzellstreuung“ in Indikatororganen, wie Knochenmark und Lymphknoten, zu detektieren. Dabei hat sich der Nachweis einer „okkulten Tumorzellstreuung“ in einer Vielzahl von Studien als klinisch relevanter und vom Tumorstadium unabhängiger Prognosefaktor erwiesen. Der Nachweis dieser „okkulten Tumorzelldissemination“ scheint somit Ausdruck eines latenten Stadiums der Krebserkrankung zu sein und wird daher auch als *Minimale Residuale Tumorerkrankung (MRD)* bezeichnet [60].

Trotz der sich abzeichnenden klinischen Relevanz dieser minimal residualen Tumorerkrankung bei Patienten mit Karzinomen der Lunge [87], des Pankreas [43], des Ösophagus [51, 44], der Mamma [49, 113, 73, 20], des Colons [36], des Magens [72], der Prostata [31, 25] und beim Melanom [16], ist wenig bekannt über die Biologie dieser okkult disseminierten Tumorzellen. Da sich weiterführende Analysen an diesen Zellen auf Grund ihrer extrem niedrigen Frequenz äußerst schwierig gestalten, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei diesen Zellen auch tatsächlich um Tumorzellen handelt und, ob diese Tumorzellen vital und proliferationsfähig

sind und somit als "Stammzellen" späterer Makrometastasen angesehen werden müssen, oder ob sie lediglich tote, abgeschilferte und lymphatisch drainierte bzw. hämatogen abgeschwemmte Zellen des Primärtumors darstellen. Unterstützt wird diese Skepsis dabei auch dadurch, dass diesen immunhisto- bzw. immunzytochemisch detektierten Zellen in Lymphknoten und Knochenmark häufig tumorzelltypische morphologische Charakteristika fehlen [47]. Des Weiteren wird eine Beurteilung der MRD durch die große Anzahl unterschiedlicher Nachweismethoden sowie fehlende Standards bei der Durchführung dieser Detektionsansätze erschwert.

Nach derzeitigem Wissensstand scheinen okkult disseminierte Tumorzellen überwiegend ruhende, d.h. in der G0-(G1-)Phase befindliche Zellen zu sein, die evtl. zu einem späteren Zeitpunkt durch exogene und/oder endogene Faktoren eine Wandlung zur proliferierenden Zelle erfahren [86, 104]. Diese Ruhephase kann dabei mehrere Jahre bis Jahrzehnte betragen (*tumor cell dormancy*), bevor es zum Auftreten klinisch manifester Metastasen kommt. Welche wachstumsvermittelnden bzw. wachstumshemmenden Faktoren dabei die Biologie dieser Zellen bestimmen, ist ebenso ungeklärt wie die Beobachtung, dass sich individuelle „Tumorzellen“ im Knochenmark auch bei Tumorentitäten nachweisen lassen, bei denen manifeste Knochenmetastasen nur äußerst selten anzutreffen sind. So finden sich beispielsweise bei etwa 30-40% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom im Knochenmark individuelle „Tumorzellen“ [70, 85, 103], eine manifeste ossäre Metastasierung macht hingegen nur etwa 5% aller hämatogenen Fernmetastasen dieses Tumortyps aus [106].

In jüngster Vergangenheit wurden wiederholt Versuche unternommen pathohisto- bzw. pathozytologische Kriterien für die okkult disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark zu definieren [40, 82]. Einigkeit besteht seither weitgehend darin, dass zwischen „(Mikro)metastasen (MM)“ und „isolierten Tumorzellen (ITC)“ unterschieden werden sollte. So ist beispielsweise nach einer Empfehlung der *UICC* [30] vom Vorliegen einer

Lymphknoten-„Mikrometastase“ auszugehen, wenn diese Anzeichen für Proliferation aufweist, d.h. mehrzellig ist, dabei einen maximalen Durchmesser von 2 mm nicht überschreitet und sich im Lymphknoten implantiert hat, d.h. außerhalb von Blutgefäßen bzw. extrasinusoidal lokalisiert ist. Fakultativ kommt als weiteres Unterscheidungsmerkmal eine desmoplastische Stromareaktion hinzu. Weisen immunhistochemisch detektierte „Tumorzellen“ in Lymphknoten diese Kriterien nicht auf, sollte von „isolierten Tumorzellen“ gesprochen werden.

1.2.1. Immunhisto- und immunzytochemische Nachweismethoden

Die während des letzten Jahrzehntes entwickelten sensitiven immunhisto- bzw. immunzytochemischen Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen basieren in erster Linie auf der Detektion mehr oder weniger Epithelzell-spezifischer Markerproteine in mesenchymalen Kompartimenten wie Lymphknoten oder Knochenmark. Hierbei kommen in erster Linie monoklonale Antikörper (mAk) gegen Cytokeratine (CK), welche integrale Bestandteile des epithelialen Zytoskeletts darstellen, zum Einsatz.

1.3. Inzidenz und prognostische Relevanz von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten

Beim MRD-Nachweis in Lymphknoten kommen in erster Linie immunhistochemische Ansätze zum Einsatz. Dabei werden intraoperativ entnommene Lymphknoten, welche in der konventionellen histopathologischen Untersuchung als „tumorfrei“ klassifiziert wurden, auf die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen untersucht [51]. Diese okkulten Tumorzellen können sich immunhistochemisch als isolierte Tumoreinzelzellen oder kleine Tumorzellcluster darstellen [87]. Die Frequenz dieser Zellen liegt bei etwa 1-10 Zellen vor dem Hintergrund von 10^5 normalen Lymphknotenzellen.

Mit diesem immunhistochemischen Ansatz wurden in den letzten Jahren zahlreiche Tumorentitäten untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich okkult disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten bei durchschnittlich etwa 1/4 bis 1/3 aller Patienten mit operablen soliden Tumoren nachweisen lassen.

Darüber hinaus konnten zahlreiche dieser Studien zeigen, dass die Detektion dieser Zellen in „tumorfreien“ Lymphknoten mit einer ungünstigen postoperativen Prognose assoziiert ist [36, 87, 72, 50, 43].

Neben immunhistochemischen Verfahren kommen bei der Detektion von okkult disseminierten Tumorzellen auch molekularbiologische Techniken, wie PCR oder RT-PCR, zum Einsatz, wobei eine klinische Bewertung dieser Ergebnisse aufgrund der häufig nur sehr geringen Anzahl untersuchter Patienten nach wie vor noch aussteht.

Tabelle 1: Frequenz und prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten beim Ösophaguskarzinom.

Studie	*Detektions-Technik*	*Detektions-Marker*	*Detektionsraten*		*Prog. Bedeutung*
			n pos. Pat (%)	*n pos. LK (%)*	
Doki et al.[290]	IHC	CK	18/41 (43,9)	20/2168 (0,9)	GÜ
Glickman et al.[287]	IHC	CK	20/78 (25,6)	40/574 (7)	n.s.
Hosch et al.[20]	IHC	EpCAM	89/126 (70,6)	k.A.	RFÜ*, GÜ*
Izbicki et al.[22]	IHC	EpCAM	42/68 (61,7)	67/399 (16,8)	RFÜ*, GÜ*
Komukai et al.[292]	IHC	CK	14/37 (37,8)	29/2774 (1)	RFÜ*, GÜ
Komukai et al.[291]	IHC	CK	47/104 (45,2)	106/7769 (1,4)	RFÜ*, GÜ*
Matsumoto et al.[293]	IHC	CK	33/59 (55,9)	66/2714 (2,4)	GU
Mueller et al.[281]	IHC	CK	5/30 (16,7)	39/937 (4,2)	n.s.
Nakamura et al.[286]	IHC	CK	14/53 (26,4)	18/2511 (0,7)	n.s.
Natsugoe et al.[282]	IHC	CK	31/69 (44,9)	46/1954 (2,4)	GÜ
Sato et al.[288]	IHC	CK	20/50 (40)	29/1840 (2)	n.s.
Tanabe et al.[289]	IHC	CK	12/46 (26,1)	60/3438 (1,7)	n.s.
Vazquez-Sequeiros et al.[285]	IHC	CK	14/124 (11)	k.A.	n.s.
Godfrey et al.[301]	RT-PCR	CEA	11/30 (36,7)	12/307 (3,1)	RFÜ*, GÜ
Kano et al.[264]	RT-PCR	SCC	k.A.	29/511 (5,7)	n.d.
Kassis et al.[303]	RT-PCR	CEA	k.A.	17/29 (58,6)	n.d.
Kijima et al.[304]	RT-PCR	CEA	18/21 (85,7)	79/373 (21)	n.d.
Luketich et al.[305]	RT-PCR	CEA	5/10 (50)	36/73 (49)	n.d.
Makino et al.[267]	RT-PCR	CK19	k.A.	2/6 (33,3)	n.d.
Mori et al.[306]	RT-PCR	CEA	k.A.	47/87 (54)	n.d.
Xi et al.[308]	RT-PCR	CK19, TACSTD1	5/34 (14,7)	k.A.	RFU

Detektionstechnik: IHC=Immunhistochemie; RT-PCR=Reverse Transkriptase-PCR.
Detektionsraten: n pos. Pat (%)=Anzahl immunhistochemisch „positiver" Patienten/Gesamtanzahl untersuchter Patienten (%); n pos. LK=Anzahl immunhistochemisch „positiver" Lymphknoten/Gesamtanzahl untersuchter Lymphknoten (%); k.A.=keine Angaben
Detektionsmarker: CK=Cytokeratine; EpCAM=Epithelial cell adhesion molecule; CEA=Carcinoembryonales Antigen; SCC=Squamous cell carcinoma Antigen.
Prog. Bedeutung: Prognostische Bedeutung immunhistochemisch „positive" Lymphknoten (RFÜ=signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben; GÜ= signifikant verkürztes Gesamtüberleben; n.d.=Analyse nicht durchgeführt; n.s.=Unterschiede nicht signifikant).
* Prognostische Relevanz durch multivariate Analyse bestätigt.

Tabelle 2: Frequenz und prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten bei anderen soliden Tumoren.

Tumorentität	*Detektions-Technik*	*Detektions-Marker*	*Detektions-Rate (%)*	*Prog. Bedeutung*	*Studie*
Mamma-Ca	IHC	CK	13/150 (9)	n.s.	Braun et al.[317]
	IHC	CK	148/736 (20)	RFÜ*, GÜ	Cote et al.[16]
	IHC	CK	31/484 (6)	RFÜ*, GÜ	Gerber et al.[18]
	IHC	CK, Muc-1	53/208 (25)	RFÜ*, GÜ	McGuckin et al.[30]
	IHC	CK, HMFG2	60/477 (13)	n.s.	Millis et al.[318]
	IHC	CK	50/218 (23)	n.s.	de Mascarel et al.[319]
Kolorektal-Ca	IHC	CK, CEA	12/46 (26)	n.s.	Cutait et al.[320]
	IHC	CK, TAG72	14/50 (28)	GÜ*	Greenson et al.[19]
	RT-PCR	CEA	14/26 (54)	RFÜ*, GÜ*	Liefers et al.[27]
Magen-Ca	IHC	CK	16/84(19)	n.d.	Cai et al.[321]
	IHC	CK	54/83 (65)	GÜ	Cai et al.[322]
	IHC	CK	28/88 (32)	n.s.	Choi et al.[323]
	IHC	CK	38/107 (36)	n.s.	Fukagawa et al.[324]
	IHC	CK, CEA	44/109 (40)	GÜ	Ishida et al.[325]
	IHC	CK	36/180 (20)	GÜ	Ishigami et al.[326]
	IHC	CK	22/51 (44)	n.s.	Kikuchi et al.[327]
	IHC	CK	75/153 (49)	GÜ*	Lee et al.[26]
	IHC	CK	8/34 (24)	GÜ	Maehara et al. [328]
	IHC	CK	30/300 (10)	n.s.	Morgagni et al.[329]
	IHC	CK	14/67 (21)	GÜ	Nakajo et al.[330]
	IHC	CK	20/64 (32)	GÜ*	Yasuda et al.[35]
Pankreas-Ca	IHC	EpCAM	28/48 (58)	RFÜ*, GÜ*	Bogoevski et al.[13]
	IHC	EpCAM	13/18 (72)	RFÜ*, GÜ*	Hosch et al.[21]
NSCLC	IHC	p53, CK	22/49 (45)	GÜ*	Gu et al.[309]
	IHC	EpCAM	29/93 (31)	RFÜ, GÜ	Izbicki et al.[23]
	IHC	EpCAM	27/125 (22)	RFÜ*, GÜ*	Kubuschok et al.[25]
	IHC	CK	32/115 (28)	GÜ*	Osaki et al.[31]
	IHC	EpCAM	11/72 (15)	RFÜ*	Passlick et al.[33]
Prostata-Ca	RT-PCR	PSA	25/57 (44)	n.d.	Edelstein et al.[314]
	IHC	CK	15/95 (16)	n.d.	Freeman JA et al.[331]

Detektionstechnik: IHC=Immunhistochemie RT-PCR=Reverse Transkriptase-PCR.
Detektionsmarker: CK=Cytokeratine; CEA=Carzinoembryonales Antigen; Muc-1=Mucin-1; Muc-2=Mucin-2; HMFG2=Humanes Milchfettglobulin 2; TAG72=Tumor-associated Glycoproteine; EpCAM=Epithelial cell adhesion molecule; PSA=Prostate specific Antigen.
Detektionsrate: Anzahl immunhistochemisch „positiver" Patienten/Gesamtanzahl untersuchter Patienten (%).
Prog. Bedeutung: Prognostische Bedeutung immunhistochemisch „positiver" Lymphknoten (RFÜ=signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben; GÜ=signifikant verkürztes Gesamtüberleben; n.d.=Analyse nicht durchgeführt; n.s.=Unterschiede nicht signifikant).
*Prognostische Relevanz durch multivariate Analyse bestätigt.

2. Material und Methoden

2.1. Studienplanung und Patienten

Die Durchführung dieser Studie war von der Ethik-Kommission in Hamburg genehmigt worden. Alle Patienten waren über die Teilnahme an dieser Studie aufgeklärt worden.
Von 393 Patienten, die sich zwischen September 1998 und August 2002 im Universitätsklinikum Eppendorf einer chirurgischen Therapie ihrer Bronchialkarzinome und ihrer Karzinome des Gastrointestinaltraktes unterzogen, wurden intraoperativ Lymphknoten aus dem Lymphabflußgebiet des jeweiligen Tumors entnommen.

Die Lymphknoten wurden in der Pathologischen Abteilung des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Prof. Dr. U. Helmchen aufgearbeitet und histologisch untersucht.

Postoperativ wurden die Patienten bezüglich des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades gemäß den Richtlinien der 6. Auflage der TNM-Klassifikation der „Union International Contre Cancer (UICC“) aus dem Jahr 2002 eingestuft.

In die Studie wurden Patienten aufgenommen, deren Lymphknoten intraoperativ unauffällig erschienen, um diese genauer zu untersuchen.

Alle Patienten, bei denen in den entnommenen, intraoperativ-makroskopisch unauffälligen Lymphknoten histopathologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen wurden, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es verblieben 131 Patienten mit 229 histopathologisch negativen Lymphknoten.
Ebenso wurden Lymphknoten und Gewebeproben aus der Studie ausgeschlossen, die bei der Aufarbeitung zu Spins oder beim Schneiden zu

Schnittpräparaten entweder zu wenig oder gar kein Lymphknotengewebe aufwiesen.

Es verblieben somit 106 Patienten mit 190 Lymphknoten, die das Kollektiv dieser Studie darstellten.
Im Rahmen der Tumorentfernung wurde eine Lymphadenektomie der mediastinalen oder abdominalen Lymphknoten durchgeführt. Pro Patient waren durchschnittlich drei intraoperativ unauffällige Lymphknoten entfernt worden.

In der 6. Auflage der pTNM-Klassifikation wird aufgrund der derzeit noch unklaren biologisch-prognostischen Bedeutung isolierter Tumorzellen zwischen „isolierten Tumorzellen“ und „Mikrometastasen“, unterschieden (UICC, 2002). Darin werden isolierte Tumorzellen als einzelne Zellen oder kleine Ansammlung von Zellen definiert. Sie dürfen laut dieser neuen Definition in ihrer Ausdehnung nicht größer als 0.2 mm sein. Nachgewiesen werden sie mittels immunhistochemischer oder molekularer Verfahren. Um eine metastatische Infiltration im Sinne einer Mikrometastase handelt es sich, laut dieser neuen Definition, erst ab einer Größe von 0.2 mm bis zu 2 mm. In einigen Gewebeproben waren allerdings Tumorzellverbände vorhanden, welche diesen Kriterien nicht entsprachen und entsprechend aussortiert werden mussten. Alle Patienten, bei denen keine vollständig tumorfreien Resektionsränder erzielt werden konnten, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

2.2. Charakterisierung der Patienten

Von 106 Patienten, die sich in diesem Zeitraum einer Operation ihres Tumors unterzogen und in die Studie aufgenommen wurden, waren 77 Männer und 29 Frauen im Alter zwischen 19 und 84 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 60,77 Jahren (Tabelle 3). An keinem dieser Patienten war eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie durchgeführt worden.

Die meisten untersuchten Tumore waren Pankreaskarzinome - 38 (35,8%). Die anderen Tumore waren an der Zahl jeweils ca. die Hälfte von der der Pankreaskarzinome: Lunge 19 (17,9%), Oesophagus 17 (16%), Magen 15 (14,1%) und Kolon 17 (16%). Von den 15 Magenkarzinomen waren 3 (2,8%) in der Cardia und von den 17 Kolonkarzinomen waren 8 (7,5%) im Rektum lokalisiert (Tabelle 4).
Die meisten Karzinomtypen waren Adenokarzinome – 82 (77,4%). 20 (18,9%) Patienten wiesen Plattenepithelkarzinome und 4 (3,8%) neuroendokrine Karzinome auf (Tabelle 5).
55 (51,9%) aller untersuchten Karzinome waren mäßig differenziert (G2), 32 (30,2%) waren schlecht differenziert (G3), nur acht Tumore (7,5%) wiesen eine gute Differenzierung (G1) auf. Bei 11 (10,4%) Karzinomen konnte kein Differenzierungsgrad angegeben werden.
Der größte Anteil der Patienten (43 bzw. 40,6%) hatte ein Tumor im Stadium pT3, gefolgt von 30 Patienten im Tumorstadium pT2 (28,3%). Einen vergleichsweise geringen Anteil machten Tumoren im Stadium pT1 (13,2%) und pT0 (10,4%) aus. Patienten im Tumorstadium pT4 hatten in unserer Studie den kleinsten Anteil von nur 7,5%.
Die Einteilungen der Tumorstadien nach den Richtlinien der TNM-Klassifikation von 2002 sind in der Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 3: Charakterisierung der Patienten (n= 106)

	Männlich	Weiblich
Patienten	77	29
%	72,6	27,4
Alter von 19 – 84 Jahren und Median von 61 Jahren		

Tabelle 4: Patientenverteilung nach Tumorart (n= 106)

	Patientenzahl	**%**
Oesophagus	17	16
Magen	15	14,1
(Cardia)	(3)	(2,8)
Kolon	17	16
(Rektum)	(8)	(7,5)
Pankreas	38	35,8
Lunge	19	17,9

Tabelle 5: Zelltyp der Karzinome (n= 106)

	Patientenzahl	**%**
Adenokarzinom	82	77,4
Plattenepithel	20	18,9
Neuroendokrin	4	3,8

Tabelle 6: Tumoreigenschaften (n=106)

Variable	Anzahl der Patienten	%
Primärtumor		
pT0	11	10,4
pT1	14	13,2
pT2	30	28,3
pT3	43	40,6
pT4	8	7,5
Lymphknotenbefall		
pN0	55	51,9
pN1	42	39,6
pN1a	4	3,8
pN1b	7	6,6
pN2	7	6,6
pN3	2	1,9
Fernmetastasierung		
M0	96	90,6
M1	10	9,4
Differenzierungsgrad		
G0	11	10,4
G1	8	7,5
G2	55	51,9
G3	32	30,2

2.3. Materialgewinnung

Im Rahmen der Tumorresektion wurden die regionären Lymphknoten der superioren, inferioren, anterioren und posterioren Stationen der jeweiligen Organe entfernt. Diese wurden geteilt und sowohl für die histopathologische als auch für die immunhistochemische Analyse asserviert.

Der Operateur entfernte die regionären Lymphknoten und ordnete sie den unterschiedlichen anatomischen Regionen zu. Die Gewebeproben wurden danach entsprechend ihrer Lokalisation bezeichnet.

Oesophagus: Nodi lymphatici paratracheales (Teil der tiefen vorderen Lymphknoten).
Nll. juxta-oesophageales (hintere Mediastinallymphknoten).

Magen: Nll. gastrici dextri + sinistri (nahe der A. gastrica dextra + sinistra, Einzugsgebiet: kleine Magenkurvatur).
Nll. splenici (nahe der A. splenica, Einzugsgebiet: Magenkuppel).
Nll. gastro-omentales dextri + sinistri (an der Wurzel des großen Netzes, Einzugsgebiet: große Magenkurvatur).
Nll. pylorici (cranial, distal und hinter dem Pylorus, Einzugsgebiet: Pylorusabschnitt). Truncus coeliacus.

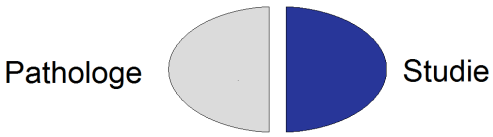
Kolon: Nll. mesocolici, Nll. mesenterici sup. Nll. coeliaci

Rektum: Nll. mesenterici inf. (Nll. rectales sup. und Nll. sigmoidei).
Nll. mesenterici sup., Nll. Coeliaci.

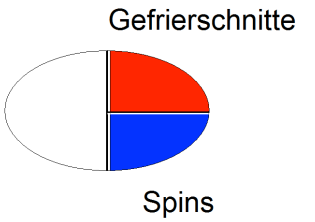
Pankreas:	Nll. pancreatici et sup. + inf. Nll. pansreaticoduodenales sup. + inf. Ferner Lymphknoten in der Umgebung der Bauchaorta und des Milzhilums.
Lunge:	Nll. pulmonales (am Lungenhilum). Nll. tracheobronchiales sup. + inf. (cranial und distal der Carina – Luftröhrengabelung – und der Hauptbronchen). Nll. paratracheales (entlang der Luftröhre).

Es wurden nur die Lymphknoten in die Studie aufgenommen, die intraoperativ vom Operateur makroskopisch als unauffällig beurteilt wurden.

Jeder dieser Lymphknoten wurde in zwei Hälften geteilt.

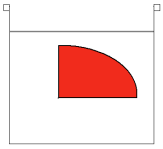


Die eine Hälfte wurde für die histopathologische Routineuntersuchung im Pathologischen Institut der Universität Hamburg in Paraffin eingebettet.
Die zweite Hälfte des entfernten Lymphknotens wurde zweigeteilt.



Davon wurde ein Teil in Tissue-Tek-Behälter (Miles Inc., Code-Nr. 4583) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Anschließend erfolgte die Asservation bei –80°C bis zur weiteren Aufarbeitung des Materials



Der andere Teil des jeweiligen Lymphknotens wurde sofort in ein Kulturmedium bei +4°C gebracht und noch am gleichen Tag weiterverarbeitet.

Im Rahmen der Lymphadenektomie wurden insgesamt 1179 Lymphknoten entnommen. Von diesen ergab die histopathologische Routineuntersuchung bei 190 Lymphknoten keinen Nachweis von Tumorzellabsiedlungen. Sie wurden in dieser Studie aufgearbeitet und immunhistochemisch auf die Anwesenheit einzelner Tumorzellen untersucht.

2.4. Aufarbeitung des Gewebes

190 Lymphknoten, die in der konventionellen histopathologischen Untersuchung als tumorfrei beurteilt worden waren, wurden mit immunhistochemischen und immunzytochemischen Methoden auf minimale residuale Tumorzellabsiedlungen, die sogenannten „okkulten“ Mikrometastasen, weiter untersucht.
Dazu wurden im Kryostaten von jedem Lymphknoten mindestens 8 etwa 5 und 7 µm dicke Schnitte in drei Ebenen angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgetragen. Zur endgültigen Färbung und Fixierung wurden die Schnittpräparate bei –20 °C aufbewahrt.
Die im Kulturmedium befindlichen Proben wurden zu Einzelzell-Suspensionen disaggregiert und auf Objektträger als Zytospins mit bis zu 500.000 Zellen sedimentiert.

Die weitere Bearbeitung erfolgte mit einer immunhistochemischen Färbung mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 (M0804, Dako, Dänemark), der speziell gegen die Oberflächenmerkmale epithelialer Zellen gerichtet ist. Da es Zellen dieser Klassifizierung in einem gesunden Lymphknoten nicht gibt, ist es mit dieser Färbung möglich, einzelne epitheliale Tumorzellen sichtbar zu machen und so in lymphatischem Gewebe nachzuweisen.
Insgesamt wurden auf diese Weise Schnitte und Spins von 190 Lymphknoten, welche bei der Routinehistologie als primär negativ bewertet wurden, aufgearbeitet und immunhistochemisch untersucht.

Die in den Schnitten und Zytospins der jeweiligen Lymphknoten gefundenen Tumorzellen wurden miteinander verglichen.

2.4.1. Disaggregation

Für die Herstellung von Zytospins wurde zuerst die Lymphknoten-Probe von Binde- und Fettgewebe gesäubert und mit einem Skalpell zerkleinert.

LK säubern und zerkleinern

Eine Medikon®-Kapsel wurde mit 1000 µl RPMI 1640 Medium + 10% FCS (PBS) (FCS = fetales Kalbserum) gefüllt und 30 Sekunden lang rotiert. Dann wurde die Medikon®-Kapsel mit Lymphknoten-Gewebe beschickt und 1000 µl RPMI 1640 Medium + 10% FCS (PBS) hinzu pipettiert. Anschließend wurde das Lymphknoten-Gewebe für jeweils 45 Sekunden disaggregiert, wodurch es sich verflüssigte.

Danach wurden jeweils 1000 µl Suspension zusammen mit Lymphknotenzellen abgezogen. Das Restvolumen wurde mit 1000 µl RPMI wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Lymphknoten-Gewebe verbraucht war.

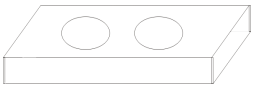
Danach wurde die Zellsuspension in 14 ml Falcon-Röhrchen bei 1500 rpm acht Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Bodensatz in 5 bis 8 ml PBS resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension bei 850 rpm 10 Minuten lang noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Bodensatz je nach Größe in entsprechendem PBS-Volumen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer nach der Formel

$$\text{Zellzahl} \times \text{Restvolumen} \times 10000$$

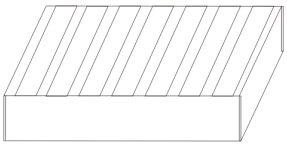
gezählt.

Für die Weiterverarbeitung der Einzezell-Suspension zu *Zytospins* wurden pro Objektträger 5 mal 10^5 Zellen in 1000 µl PBS aufgetragen und zentrifugiert.

Nach dem Abgießen der Flüssigkeit wurden die Objektträger 24 Stunden lang getrocknet.



Je nach vorhandener Zellzahl wurden bis zu acht Objektträger hergestellt. Der Rest der Einzelzell-Suspension wurde verworfen. Um die Präparate schadlos aufbewahren zu können, bevor sie immunzytochemisch gefärbt werden konnten, wurden diese fünf Minuten lang in Aceton fixiert und dann in eine speziellen Lagerlösung von –20 °C gegeben, wie sie weiter unten beschrieben wird.



Konservierung von cytologischen Präparaten [122]:

Lagerlösung:

Sucrose	85,6 g (Sigma S9378)
$MgCl_2$	0,66 g (Merck)
Glycerin	500 ml (Merck)
Dulbeccos PBS	500 ml (GIBCO)

Die Lagerlösung wird steril mit einer Porengröße vom 0,45 µm filtriert.

2.5. Immunhistochemische Färbemethoden

Um die einzelnen Tumorzellen im lymphatischen Gewebe darstellen zu können, wurde eine Färbemethode benötigt, die bezüglich Sensitivität und Spezifität besonders zuverlässig ist und außerdem durch eine gute Reproduzierbarkeit möglichst konstante Färbeergebnisse erbringt.
Für den einfachen Antigennachweis wurde eine indirekte immunenzymatische Färbemethode zur Darstellung der Antikörper-Reaktion mit dem Oberflächenantigen gewählt, da der Nachweis von einzelnen Tumorzellen aufgrund ihrer geringen Frequenz ein besonders sensitives Detektionssystem erfordert.

Die als APAAP bezeichnete Methode beruht auf einer Immun-Komplex-Bildung, die sich durch Bindung spezifischer Primärantikörper an die Oberflächenantigene der nachzuweisenden Zellen darstellt.
Die APAAP-Methode als Enzym-Immunkomplex-Färbemethode zählt zu den empfindlichsten immunhistochemischen Nachweismethoden. Hier wird die natürliche Affinität der Antikörper genutzt, Komplexe gegen ihre Antigene zu bilden. Somit kann man auf das chemische Verfahren der Konjugation verzichten, da die chemische Konjugation von Antikörpern häufig durch Denaturierung der Proteine mit Sensitivitäts- und Spezifitätsverlusten einhergeht.
Als Enzym-Anti-Enzym-Komplex dient hier als Tertiär-Antikörper der monoklonale Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex. Das ist der präformierte Komplex aus alkalischer Phosphatase und monoklonalen Anti-Alkalische-Phophatase-Antikörpern der Maus, mit der Bezeichnung „APAAP“ (DAKO A/S, Dänemark, Code-Nr. D 651), welcher über einen Brücken-Antikörper an den monoklonalen Primärantikörper bindet. Als Brücken-Antikörper wurde ein polyvalentes Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin-Antiserum (Z259, DAKO A/S, Dänemark) verwendet [19].

Die alkalische Phosphatase, also der erste Teil des APAAP-Komplexes, wird aus Kälberdarm gewonnen. Der Anti-Alkalische-Phophatase-Antikörper der Maus, das heißt also, der monoklonale Maus-Antikörper und somit der zweite Teil des APAAP-Komplexes, ist mit einem Bindungsarm gegen die alkalische Phophatase gerichtet. Mit dem anderen Arm, also der zweiten Bindungsstelle, ist er spezifisch gegen ein Epitop auf dem Kaninchenantikörper gerichtet. So entsteht eine Antikörperkette.

Aufgrund der mehrfachen Bindungsmöglichkeiten von Brücken- und Tertiärantikörpern liegt bei der APAAP-Methode eine erheblich höhere Enzymdichte vor, als bei den anderen immunhistochemischen Methoden, so dass hier ein besonders intensives Färbesignal entsteht.

Der verwendete Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) hat gegenüber dem ebenfalls etablierten Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP) einige Vorteile. Einerseits befinden sich in kryoasservierten Gefriergeweben wesentlich geringere Mengen der gewebseigenen, sogenannten endogenen Alkalischen Phosphatase, wogegen die Peroxidaseaktivität in Gefrierschnitten uneingeschränkt vorhanden ist, was zu einer unspezifischen Färbereaktion führen würde.
Die alkalische Phosphatase, die als Enzym für die Farbreaktion bei der APAAP-Methode verwendet wird, ist im Lymphknoten nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Das Enzym lässt sich leicht mit Levamisole (Sigma, L 9756, Deisenhofen) blockieren. So können unspezifische Anfärbungen durch endogene alkalische Phosphatasen vermieden werden.

Nach Blockade der gewebseigenen Enzyme in der anschließenden Farbreaktion reagiert nur noch die an den Sekundärantikörper gebundene Alkalische Phosphatase, was zu einer Verstärkung des Kontrastes und damit zu einem leichteren Detektieren der markierten Zellen innerhalb des Lymphknotens führt.

2.5.1. APAAP - Immunhistochemie: Kryoschnitte

Bei dieser Färbemethode werden zunächst die Kryostat-Schnitte für 30 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet, anschließend erfolgt das Anfixieren der Präparate durch Spülen in einem Acetonbad über fünf Minuten.
Nach der Rehydrierung des Gewebes in TRIS-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) (15504-020 Life Technologies, Karlsruhe) für ebenfalls fünf Minuten folgt der erste Inkubationsschritt.

Stammlösung:	36,69 g Tris auf 1500 ml aqua dest.
Gebrauchslösung:	1225 ml Stammlösung + 100 ml 2 M HCl + 42,4 g NaCl ad 5 l aqua dest. => pH = 7,4

Dabei finden alle Inkubationen bei Raumtemperatur in einer Feuchtenkammer statt.
Danach werden die Schnitte mit einer 1:10 Verdünnung aus TRIS und AB-Serum, dem antikörperfreien Humanserum von Spendern der Blutgruppe AB 21 (Biotest Diagnostics 805135, Dreieich, Deutschland), benetzt und 30 Minuten lang inkubiert.
Durch diesen Schritt wird vermieden, dass sich unspezifische Hintergrundfärbungen bilden, die durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Kollagen und anderen Bindegewebselementen entstehen könnten.
Danach werden die Objektträger vorsichtig abgeklopft, um sie anschließend mit der nächsten Lösung benetzen zu können. Es folgt die Inkubation der Präparate mit dem Primärantikörper Ber-EP4 (Maus-IgG1, Dako, Hamburg) für 45 Minuten in einer Verdünnung von 1:400, bzw. 0.625 µg/ml.
Zum Ausschluss unspezifischer Färbungen wurde zu jedem Präparat parallel eine Negativkontrolle, ebenfalls für 45 Minuten und in einer Verdünnung von 1:400, mitgeführt. Dabei wurde statt des Primärantikörpers, der Maus-Antikörper MOPC-21 (Sigma, Code M-9269) verwendet, welcher ein Non-Immunserum ist.

Dieses Immunserum weist keine spezifische Reaktion mit Antigenen auf. Es gehört zum Isotyp der IgG1 Kappa Subklasse an und wurde jeweils in der Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers verwendet.
Sämtliche Konzentrationen waren zuvor in einer Verdünnungsreihe zur Optimierung der Färbeergebnisse ermittelt worden.
Anschließend werden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in TRIS-Puffer gespült, um eine Verunreinigung der Gewebsoberfläche mit dem Primärantikörper zu vermeiden.
Der Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Brückenantikörper stammt vom Kaninchen (Z0259, Dako, Hamburg) und wird hier in einer Verdünnung von 1:50 verwendet, was einer Konzentration von 64 µg/ml entspricht. Dieser Antikörper verbindet den Primärantikörper mit dem Enzym-Immunkomplex, der ebenfalls von der Maus stammt. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Präparate mit TRIS-Puffer für je 5 Minuten folgt das Beschichten der Präparate mit APAAP-Komplex, der ebenfalls von der Maus stammt. Dieser ist mit einem zweiten Arm gegen Epitope des Kaninchens gerichtet und wird somit an den Brückenantikörper gebunden.
Nach einer Inkubationsdauer von wiederum 30 Minuten mit einer Verdünnung von 1:100 (0,9 µg/ml) und dem erneuten dreifachen Spülen für je 5 Minuten in TRIS-Puffer folgt die Färbereaktion.

Das Substrat der Färbung ist hierbei Naphtholbisphosphat-Ester. Dabei erfolgt durch die Alkalische Phosphatase eine Aufspaltung des Substrats in Phenolkomponenten und Phosphat. Bei dem anschließenden Farbumschlag reagieren die Phenole mit Neufuchsin, einem Dinatriumsalz (sogenanntes Chromogen), zu einem unlöslichen Azofarbstoff. Das Chromogen Neufuchsin erzeugt ein intensiv rotes Reaktionsprodukt.

Für eine Küvette mit 150 ml Färbelösung müssen vier verschiedene Lösungen angesetzt werden und zwar:

Lösung 1: *Tris-NaCl-Puffer*

0,21 g Tris
1,70 g NaCl
ad 200 ml aqua dest.
Mit 1 M HCl auf pH = 8,24 einstellen
+ 0,08 g Levamisole (Sigma L 9756)

anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit Hilfe von HCl 22 und NaOH auf 8,24 eingestellt. Diese Lösung dient der anfangs bereits erwähnten Blockade der gewebseigenen Alkalischen Phosphatase.

Lösung 2: *Naphtol-AS-Bi-Phosphat-Lösung*

0,033 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat (Sigma N 2250)
1 ml Dimethylformamid (Sigma D 4254)

Lösung 3: *4%iges Natriumnitrit*

0,4 g Natriumnitrit (Sigma S 2252)
10 ml aqua dest.

Lösung 4: *Neufuchsin-Stammlösung*

5 g Neufuchsin (Sigma N 0638)
100 ml 2 M HCl

Die Lösung 4 wird in die Lösung 3 gegeben. Diese beiden Substanzen müssen eine Minute miteinander reagieren. Dabei entsteht die Lösung 5.
Nun werden die Lösungen 5 und 2 in die Lösung 1 gegeben.
Die entstandene Färbelösung wird durch ein Papierfilter geschickt. (Abb. 3).

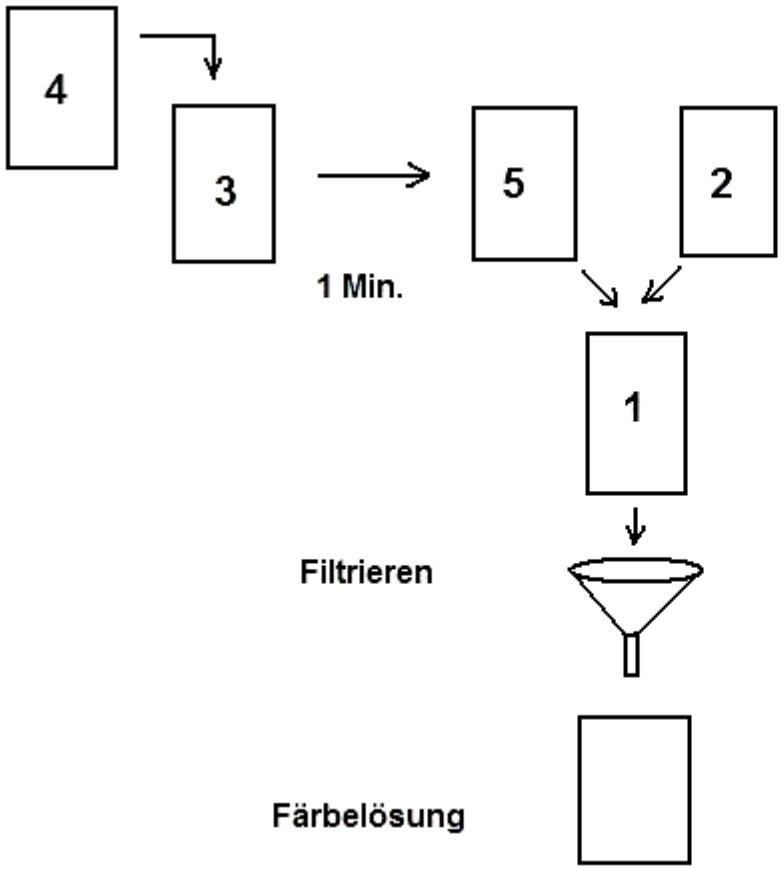


Abb. 3: APAAP-Lösung

In diese Färbelösung (APAAP-Substrat) werden die Schnittpräparate gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die gesamte Färbereaktion muss zwingend im Dunkeln durchgeführt werden, weil die Färbelösung lichtempfindlich ist.

Nach zweifacher anschließender Spülung der Objektträger mit Aqua dest. (pH 7) wird die Kernfärbung drei Minuten lang mit Hämatoxylin Gill (1.09249.0500 Merck, Darmstadt) durchgeführt und ein weiteres Mal kurz in Aqua dest. gespült. Die Intensität der Färbung wird dann noch durch Waschen der Schnitte in alkalischem Leitungswasser für 5-10 Minuten optimiert. Abschließend werden die Präparate zwei Mal in Aqua dest. Gespült und zum Eindeckeln kurz an der Luft getrocknet.

Zum Eindeckeln der Präparate erfolgt zunächst ein Beschichten mit Crystal Mount Abdeckmedium (MØ 3, Biømeda); nach dem Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur erhalten die Objekte ein Deckgläschen, das mit Permount (SP 15.500, Fisher Scientific) befestigt wird.

Kontrollfärbungen

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbildung wurden jetzt Folgeschnitte jedes Lymphknotens an Stelle des spezifischen Primärantikörpers mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper (Non-Immunserum) in gleicher Konzentration inkubiert wie der Primärantikörper. Es enthält bis auf die spezifischen Primärantikörper alle anderen Komponenten des Serums. Als Isotyp-Kontrolle für die IgG 1-Subklasse diente der Maus-Antikörper MOPC-21 (Sigma Immuno Chemicals, M-9269), der gegen kein spezifisches Epitop gerichtet ist.

Zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse dienten Positivkontrollen, die bei jeder Färbung mitliefen. Als Epitheliales-Antigen-Positivkontrolle dienten Schnittpräparate der gesunden Kolonmucosa, die vorab angefertigt und bei - 20 °C gelagert wurden.

2.5.2. Immunzytochemie: Spins (Einzelzelldetektion)

Die Zytospins wurden immunenzymatisch nach der oben beschriebenen APAAP-Komplex-Methode gefärbt. Es wurden je zwei Spins von je 10 Mio. Zellen mit monoklonalem Antikörper Ber-EP4 gefärbt.

Kontrollfärbungen

Als Negativkontrolle wurde je ein Spin mitgefärbt, der mit MOPC-21 inkubiert wurde. Zur Positivkontrolle wurde ein mehrfach mit Sicherheit Ber-EP4-positiver Spin aus der HT29-Reihe der colorectalen Adeno-Carcinom-Zelllinie verwendet. Die Spins der HT29-Zelllinie wurden regelmäßig angefertigt und bei –20°C gelagert.

2.6. Der Primärantikörper Ber-EP4

Zur Darstellung der Zellen epithelialen Ursprungs in Lymphknoten wurde der monoklonale Maus-Antikörper Ber-EP4 (Isotyp IgG1 kappa, DAKO A/S Code-Nr. M 0804, Dänemark) verwendet.

Er wird durch die Reinigung von Kulturüberständen der Zelllinie MVF-7 gewonnen und eignet sich sowohl für die Färbung von in Paraffin gebetteten Geweben als auch für Kryokonservierte Gewebeschnitte.
Eingesetzt wurde er in einer Verdünnung von 1:400 (0,625µg/ml) in trisgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (TBS, pH = 7,4). Diese Verdünnung war zuvor in Verdünnungsreihen von 1:50 bis 1:1000 an humaner, nicht pathologisch veränderter Kolonmukosa als die optimalste ermittelt worden. Die gesunde Kolonmukosa wurde gleichzeitig als Positivkontrolle verwendet.

Ber-EP4 reagiert zuverlässig mit sämtlichen epithelialen Normalgeweben. Inert sind allerdings Hepatozyten, Parietalzellen, epidermale Keratinozyten und apikale Zellschichten von Plattenepithelien [62, 74].
Auch die meisten Karzinome können mittels Ber-EP4 immunhistochemisch gefärbt werden [62, 74, 87, 88]. Dieser Antikörper wurde zum ersten Male eingesetzt, um maligne Mesotheliome von Adenokarzinomen zu unterscheiden [32, 62].
Mit Ausnahme des Adenokarzinoms der Mamma, des hepatozellulären Karzinoms (HCC) und des Nierenzellkarzinoms zeigten alle bisher untersuchten Karzinome auch in weitgehend entdifferenziertem Stadium eine positive Reaktion mit Ber-EP4 [62, 107]. Der Antikörper reagiert ebenfalls nicht mit Nerven-, Glia-, Muskelzellen und Zellen des mesenchymalen Gewebes und des lymphatischen Gewebes.
Ber-EP4 ist gegen zwei Glycoproteine mit dem Molekulargewicht 34 und 39 kDa gerichtet, die auf der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert werden. Deren Funktion ist jedoch noch nicht geklärt. Das ubiquitäre Vorkommen auf epithelialen Geweben und die Expression selbst auf weitgehend

entdifferenzierten Karzinomen macht es zum sicheren epithelialen Marker. Viele der bisher getesteten Karzinome zeigten eine positive Reaktion mit Ber-EP4 [62].

In einer früheren Studie wurden Lymphknoten einer Kontrollgruppe von 30 Patienten mit mesenchymalen Neoplasien, benignen Tumoren oder entzündlichen Veränderungen mit Ber-EP4 und der APAAP-Methode untersucht. Hierbei konnte bei keinem Patienten eine Anfärbung nachgewiesen werden [84]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Passlick et al., die bei 24 Kontrollpatienten mit nicht malignen Erkrankungen ebenfalls keine positive Anfärbung in Lymphknoten nachweisen konnten [87]. Die hohe Spezifität von Ber-EP4 für epitheliale Zellen macht also diesen Antikörper sehr geeignet, um Lymphknoten auf isolierte Tumorzellen epithelialen Ursprungs zu untersuchen.

Dass lymphogen metastasierte Karzinomzellen eine positive Reaktion mit dem Antikörper Ber-EP4 zeigen, ergab sich bei der Färbung von Schnittpräparaten der Lymphknoten, bei denen histopathologisch Lymphknotenmetastasen der epithelialen Karzinome nachgewiesen wurden. Alle Schnitte dieser Lymphknotenmetastasen, die mittels der oben beschriebenen APAAP-Färbemethode mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 inkubiert wurden, zeigten eine starke Farbreaktion.

Mit Hilfe von Kontrolluntersuchungen, die am Pathologischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf durchgeführt wurden, zeigte sich, dass bei Vorhandensein Ber-EP4-positiver Zellen in Lymphknoten in den angrenzenden Schnitten mittels konventioneller Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine Metastasierung zu identifizieren war.

2.7. Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Schnittpräparate (Mikroskop Olympus BH-2, Olympus, Hamburg, Vergrößerungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:1000) und auch der Spins wurde von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Patientendaten vorgenommen. Präparate, bei denen beide Beobachter zu abweichenden Ergebnissen gelangt waren, wurden noch einmal gemeinsam beurteilt und ein Konsens hergestellt.

Als Mikrometastasen wurden einzelne Zellen oder kleine Gruppen von nicht mehr als fünf Zellen (Cluster) definiert, die sich in einem histopathologisch als tumorfrei befundenen Lymphknoten mit dem Antikörper Ber-EP4 nach der APAAP-Methode anfärben ließen (Abbildung 4-6). Zusätzlich durften die Schnittpräparate und auch die Zytospins, die mit dem Kontrollantikörper MOPC21 (Negativkontrolle) gefärbt worden waren, keine Neufuchsinanfärbung aufweisen. Dabei mussten die Schnittpräparate der gesunden Kolonmukosa und auch die Spins der HT29-Zellinien, also die Positivkontrolle, durch eine homogene Anfärbung eine positive Reaktion mit dem Antikörper Ber-EP4 zeigen.

Als weiteres Kriterium zur Beurteilung dieser Zellen wurde ihre Lokalisation im Lymphknoten herangezogen. Einzelne lymphogen gestreute Tumorzellen besiedeln hierbei bevorzugt den Randsinus oder die von Lymphkapillaren gebildeten Intermediärsinus [2], sowie die veränderte Morphologie und die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns waren weitere Kriterien, nach denen die Beurteilung der Ber-EP4-positiven Zellen erfolgte. Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Auswertung aller Schnittpräparate wurden mit denen der Zytospins der jeweiligen Lymphknoten verglichen.

2.8. Beispiele für Färbeergebnisse

Abbildung 4: Ber-EP4-positive Zelle im Intermediärsinus [43]

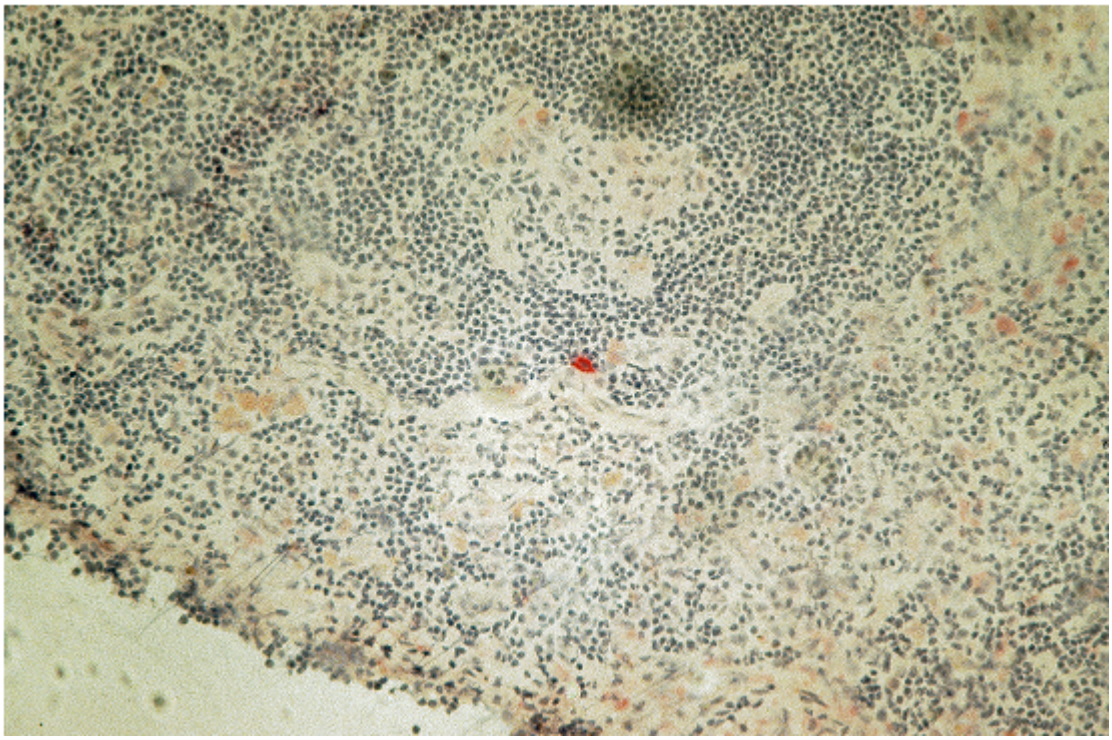


Abbildung 5: Disseminierte Tumorzelle im Zellverband [43]

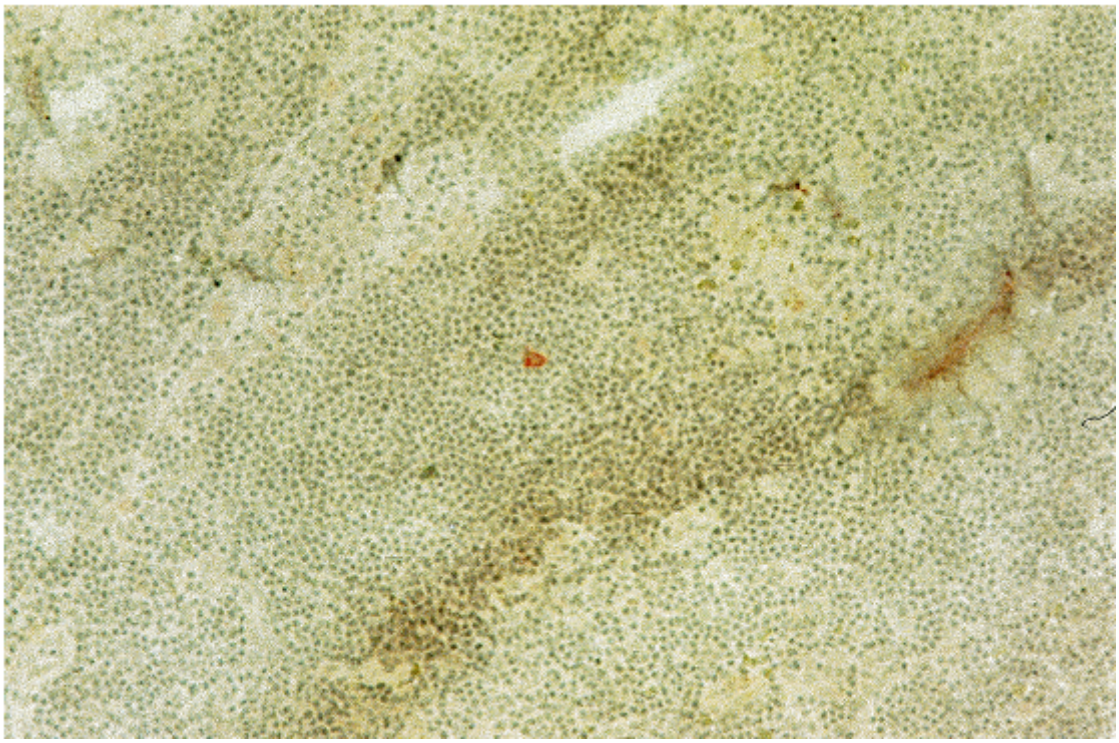
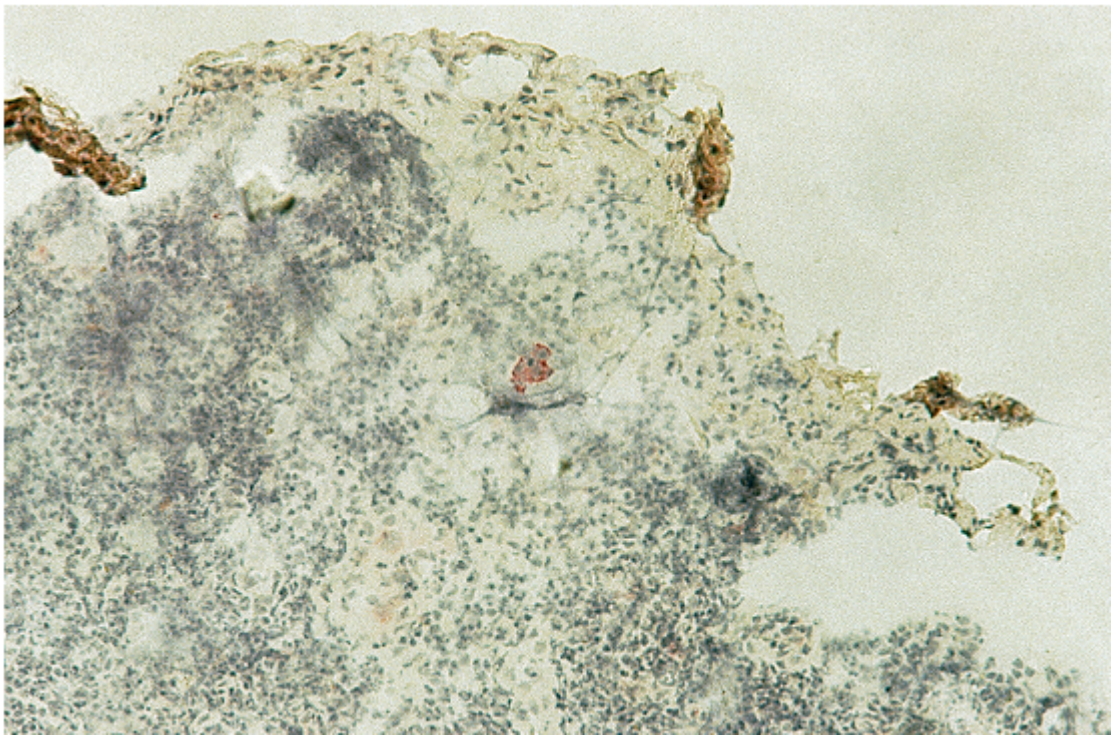


Abbildung 6: Zellcluster im Randsinus [43]



2.9. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die nicht parametrischen Variablen mit 4-Felder Tafeln und dem Cohens Kappa-Koeffizienten (k) ausgewertet und auf die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse hin überprüft.

Die meistverwendete statistische Methode zur Auswertung der Übereinstimmung zwischen unterschiedlichen Bewertern oder zwischen wiederholten Beurteilungen eines Bewerters bezüglich eines kategoriellen Merkmals ist Cohens Kappa-Koeffizient. Cohens Kappa misst den zufallskorrigierten Anteil übereinstimmender Bewertungen [17, 37].

Tabelle 7: Richtwerte zur Interpretation von k [3]

Wert von k	Stärke der Übereinstimmung
< 0,20	schwach
0,21 – 0,40	leicht
0,41 – 0,60	mittelmäßig
0,61 – 0,80	gut
0,81 – 1,00	sehr gut

3. Ergebnisse

Im Rahmen der Lymphadenektomie wurden 1179 Lymphknoten von insgesamt 393 Patienten mit Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und des Pankreas, welche keine adjuvante Therapie erhalten hatten, entnommen. 786 Lymphknoten davon erschienen intraoperativ unauffällig. Proben von diesen Lymphknoten wurden für unsere Studie asserviert. Nach Kriterien, die unter 2.1. beschrieben wurden, wurden 190 Lymphknoten von 106 Patienten in die Studie aufgenommen. In der konventionellen histopathologischen Untersuchung wurden bei diesen 190 Lymphknoten keine Tumorzellen nachgewiesen. Diese histopathologisch negativen Lymphknoten wurden mit dem monoklonalen Maus-Antikörper BerEP-4 weiter immunhistochemisch untersucht, welcher sich in Voruntersuchungen bereits als spezifischer Marker erwiesen hatte [87].

3.1. Inzidenz von Mikrometastasen in Lymphknoten

Die immunhistochemische und die immunzytochemische Untersuchung der Lymphknoten auf isolierte Tumorzellen (Mikrometastasen) ergab bei 61 von 106 untersuchten Patienten (57,5 %) damit also bei 81 von 190 Lymphknoten (42,6 %) den Nachweis von Ber-EP4-positiven Zellen. Diese Mikrometastasen aus den Schnittpräparaten siedelten bevorzugt in den Randsinus der Lymphknoten oder im Bereich der Lymphkapillaren der Intermediärsinus, die den Lymphknoten durchziehen.

Tabelle 8:

	histopathologisch negative Lymphknoten	**Lymphknoten mit Mikrometastasen (in %)**
Patienten (n)	106	61 (57,5%)
Lymphknoten (n)	190	81 (42,6%)

Das Auftreten von Mikrometastasen in Lymphknoten korrelierte nicht mit dem histopathologischen Tumorgrading, wie Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad oder Tumorstadium.

82 Patienten des Gesamtkollektivs hatten ein Adenokarzinom, 20 Patienten hatten ein Plattenepithelkarzinom und vier ein neuroendokrines Karzinom. Von 145 histopathologisch negativen Lymphknoten der Patienten mit einem Adenokarzinom wurden bei 58 Lymphknoten (40 %) isolierte Tumorzellabsiedlungen nachgewiesen. Von 38 histopathologisch negativen Lymphknoten der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom wurden bei 20 Lymphknoten (52,6 %) Ber-EP4 positive Zellen gefunden. Bei Patienten mit einem neuronedokrinen Karzinom wurden bei drei von 7 Lymphknoten (42,9 %) Mikrometastasen gefunden.

45 von 106 Patienten (51% - die Hälfte des Patientenkollektivs) hatten laut histopathologischer Untersuchung keine Lymphknotenmetastasen. Es waren 95 negative Lymphknoten, die als pN0 eingestuft wurden. Es wurden allerdings bei 34 dieser Patienten (63%) mit 49 Lymphknoten (51,6%) isolierte Tumorzellen nachgewiesen.

43 Patienten hatten einen Primärtumor im pT3-Stadium. 80 histopathologisch negative Lymphknoten dieser Patienten wurden weiter untersucht. Bei 24 dieser Patienten (55,8 %) und deren 33 Lymphknoten (41,2 %) wurden Ber-EP4 positive Zellen nachgewiesen.
14 Patienten mit 24 histopathologisch negativen Lymphknoten hatten einen sehr kleinen Primärtumor im pT1-Stadium. Bei 8 dieser Patienten (57,1 %) und deren 10 Lymphknoten (41,7 %) wurden Mikrometastasen gefunden.

Besonders auffällig sind 11 Patienten und ihre 21 histopathologisch negativen Lymphknoten in der Studie, bei denen mit diesem Verfahren kein Tumor nachgewiesen wurde. Sie wurden deshalb histopathologisch als pT0, pN0, pG0 eingestuft. Bei dem immunhisto-/immunzytochemischen Screening

wurden allerdings bei sechs dieser Patienten (54,5 %) und deren acht Lymphknoten (38,1 %) Ber-EP4 positive Zellen gefunden.

Acht Patienten (7,5 %) aus dem Gesamtkollektiv hatten einen gut differenzierten Primärtumor (G1). Fünfundfünfzig Patienten (51,9 %) wiesen dagegen einen mäßig differenzierten und zweiunddreißig Patienten (30,2 %) einen schlecht differenzierten Primärtumor auf. In der größten Gruppe (n=55) mit einem mäßig differenziertem Primärtumor im Stadium G2 gab es bei 34 Patienten (68,1 %) Mikrometastasen. Von insgesamt 97 histopathologisch negativen Lymphknoten in dieser Gruppe gab es bei 49 Lymphknoten (50,5 %) Mikrometastasen.
96 Patienten der Studie hatten nur Lymphknotenmetastasen. Fernmetastasen konnten nicht nachgewiesen werden. Bei 76 ihrer 171 histopathologisch negativen Lymphknoten (44,4 %) wurden isolierte Tumorzellabsiedlungen gefunden.
Zehn Patienten mit nachgewiesenen Fernmetastasen hatten 19 histopathologisch negative Lymphknoten in die Studie eingebracht. Bei fünf dieser Lymphknoten (26,3 %) fanden sich Mikrometastasen (MM).
Die Aufteilung der Lymphknoten mit Mikrometastasen nach Karzinom-Typ siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Inzidenz Ber-EP4 positiver Zellen

		Patienten	Lymphknoten histopathologisch	
		mit MM	negativ	mit MM
Gesamtzahl	106	61 (57,5 %)	190	81 (42,6 %)
Männer	77	46 (59,7 %)	138	63 (45,6 %)
Frauen	29	15 (51,7 %)	52	18 (34,6 %)
pT0	11	6 (54,5 %)	21	8 (38,1 %)
pT1	14	8 (57,1 %)	24	10 (41,7 %)
pT2	30	21 (70 %)	50	28 (56 %)
pT3	43	24 (55,8 %)	80	33 (41,2 %)
pT4	8	2 (25 %)	15	2 (13,3 %)
pN0	54	34 (63 %)	95	49 (51,6 %)
pN1	43	21 (48,8 %)	80	26 (32,5 %)
pN2	7	5 (71,4 %)	9	5 (55,5 %)
pN3	2	1 (50 %)	6	1 (16,7 %)
G 0	11	6 (54,5 %)	21	8 (38,1 %)
G I	8	4 (50 %)	12	4 (33,3 %)
G II	55	34 (61,8 %)	97	49 (50,5 %)
G III	32	17 (53,1 %)	60	20 (33,3 %)
pM0	96	57 (59,4 %)	171	76 (44,4 %)
pM1	10	4 (40 %)	19	5 (26,3 %)
Karzinome				
Adeno	82	42 (51,2 %)	145	58 (40 %)
Plattenepithel	20	16 (80 %)	38	20 (52,6 %)
Neuroendokrin	4	3 (75 %)	7	3 (42,9 %)
Oesophagus	17	12 (70,6 %)	31	13 (41,9 %)
Magen	15	11 (73,3 %)	31	14 (45,2 %)
Kolon	17	9 (52,9 %)	29	13 (44,8 %)
Pankreas	38	16 (42,1 %)	62	23 (37,1 %)
Bronchial	19	13 (68,4 %)	37	18 (48,6 %

3.2. Ber-EP4 positive Lymphknoten: Schnitt vs. Spin

Betrachtet man die 81 Ber-EP4-positiven Lymphknoten, so ist interessant, die immunhistochemische Analyse mit den Schnitten der immunzytochemischen Analyse mit den Spins gegenüberzustellen. Bei 42 Lymphknoten (52 %) wurden Ber-EP4-positive Zellen sowohl in den Schnitten als auch in den Spins nachgewiesen. Bei 13 Lymphknoten (16 %) wurden Ber-EP4-positive Zellen lediglich in den Schnitten aber nicht in den Spins gefunden. Umgekehrt wurden bei 26 Lymphknoten (32 %) Mikrometastasen nur in den Spins nicht aber in den Schnitten gefunden.

Tabelle 10: Schnitt vs. Spin nach Karzinomen

Karzinom	LK	Schnitt pos Spin pos	Schnitt pos Spin neg	Schnitt neg Spin pos
Gesamt	81	42 (52 %)	13 (16 %)	26 (32 %)
Oesophagus	13	9 (69,2 %)	1 (7,7 %)	3 (23,1 %)
Magen	14	6 (42,9 %)	3 (21,4 %)	5 (35,7 %)
Kolon	13	8 (61,5 %)	1 (7,7 %)	4 (30,8 %)
Pankreas	23	8 (34,8 %)	3 (13 %)	12 (52,2 %)
Lunge	18	11 (61,1 %)	5 (27,8 %)	2 (11,1 %)

Um beide Untersuchungsmethoden (Schnitte und Spins) zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe von Cohens Kappa-Tests auf Übereinstimmung analysiert (Tabellen 11a und 11b).
Dabei ist der Kappa-Wert 0,534. Dies entspricht einer nur mittelmäßigen Übereinstimmung beider Untersuchungsmethoden (s. Tabelle 7).
Betrachtet man hingegen die Anzahl der positiven Schnitte (bei negativen Spins) mit der Anzahl der positiven Spins (bei negativen Schnitten), so stehen sie im Verhältnis 1:2 zu einander. Das heißt, in unserer Studie wurden doppelt so viele Mikrometastasen in den Spins als in den Schnittpräparaten gefunden.

Tabelle 11a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=190)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	109	26	135
Schnitt positiv	13	42	55
Gesamt	122	68	190

Tabelle 11b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=190)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,534**	0,065	0,000
	Anzahl der gültigen Fälle	190		

3.3. Mikrometastasen in den pN0- und pN1-Gruppen

Unter den 54 Patienten (51 %) mit histopathologisch tumorfreien Lymphknoten (pN0) wurden beim immunhisto-/immunzytochemischen Screening 34 Patienten (63 %) mit Ber-EP4-positiven Zellen gefunden. Entsprechend wurden unter den 95 histopathologisch negativen Lymphknoten (also 50% der Lymphknoten dieser Studie) bei 49 Lymphknoten Mikrometastasen (51,6 %) gefunden.

Elf (20,4 %) bzw. zwölf (22,2 %) Patienten in dieser Gruppe hatten entweder keinen nachweisbaren oder einen kleinen Primärtumor im Stadium T0 bzw. T1. Von den je 21 (22,1 %) histopathologisch negativen Lymphknoten wiesen acht (38,1 %) bzw. neun (42,9 %) bei unserer Untersuchung Mikrometastasen auf.
Dreißig Patienten (55,6 %) dieser Gruppe, also die Mehrzahl, hatten einen mittelgradig differenzierten Primärtumor des Typs G2. Unter den 55 (58 %) histopathologisch negativen Lymphknoten dieses Stadiums wurden bei 33 (60 %) Lymphknoten Mikrometastasen gefunden.

Die meisten Patienten des pN0-Stadiums hatten ein Adenokarzinom als Primärtumor (41 – 75,9 %). Von den 75 histopathologisch negativen Lymphknoten (79 %) waren 37 (49,3 %) immunhisto-/immunzytochemisch positiv.
Bemerkenswerterweise wurde bei zwei Patienten (3,7 %) histopathologisch kein Magen-Karzinom sondern ein Ulkus festgestellt. Bei der immunhisto-/immunzytochemischen Analyse ihrer drei histopathologisch negativen Lymphknoten (3,2 %) wurden bei zweien (66,7 %) Ber-EP4-positive Zellen entdeckt, weshalb diese beiden Patienten beim Zusammenfassen der Ergebnisse zu der Patientengruppe mit Adeno-Magenkarzinom hinzugerechnet wurden.

Tabelle 12: Stadium pN0

	LK negativ	LK positiv
Gesamt	95	49 (51,6%)
pT0	21	8 (38,1 %)
pT1	21	9 (42,9 %)
pT2	24	14 (58,3 %)
pT3	29	18 (62,1 %)
pT4	0	0
G0	21	8 (38,1 %)
G1	11	4 (36,4 %)
G2	55	33 (60 %)
G3	8	4 (50 %)
Adeno	75	37 (49,3 %)
Ulcus	3	2 (66,7 %)
Plattep	11	7 (63,6 %)
NE	6	3 (50 %)

Betrachtet man die Gruppe des pN1-Stadiums mit ihren 43 Patienten (40,6 %), so fand man bei 21 Patienten (48,8 %) Mikrometastasen durch das immunhisto-/immunzytochemische Screening. Unter den 80 histopathologisch negativen Lymphknoten (42,1 %) wurden 26 Lymphknoten (32,5 %) mit Mikrometastasen gefunden. 26 Patienten (60,5 %) hatten einen fortgeschrittenen Primärtumor des Typs pT3, womit dieses Tumorstadium am häufigsten in dieser Gruppe vertreten war. Bei deren 46 histopathologisch negativen Lymphknoten (57,5 %) waren 13 (28,3 %) von Mikrometastasen befallen. Die Tumordifferenzierung verteilt sich in dieser Gruppe ziemlich gleichmäßig unter den mittelgradig differenzierten mit 22 Fällen (51,2 %) und wenig differenzierten Tumor mit 20 Patienten (46,5 %). Von den 39 (48,7 %) bzw. 40 (40 %) histopathologisch negativen Lymphknoten wurden bei jeweils 13 von ihnen (33,3 % bzw. 32,5 %) Ber-EP4-positive Zellen nachgewiesen.
Die meisten Patienten, nämlich 33, litten an einem Adenokarzinom als Primärtumor (76,7 %). Von 56 untersuchten histopathologisch negativen Lymphknoten (70 %) waren 16 (28,6 %) Ber-EP4-positiv.

Tabelle 13: Stadium pN1

	LK negativ	**LK positiv**
Gesamt	80	26 (32,5 %)
pT0	0	0
pT1	3	1 (33,3 %)
pT2	19	11 (57,9 %)
pT3	46	13 (28,3 %)
pT4	12	1 (8,3 %)
G0	0	0
G1	1	0
G2	39	13 (33,3 %)
G3	40	13 (32,5 %)
Adeno	56	16 (28,6 %)
Plattenepithel	23	10 (43,6 %)
Neuroendokrin	1	3 (50 %)

3.4. Tumore

3.4.1. Oesophagus-Karzinom

In die Studie wurden 17 Patienten mit einem Oesophagus-Karzinom aufgenommen. 14 davon waren Männer. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Operation und damit auch während der Lymphknotenentnahme in einem Alter zwischen 51 und 78 Jahren. Das mittlere Alter betrug 65,3 Jahre. 12 von 17 Patienten (70,6 %) hatten Mikrometastasen in den untersuchten Lymphknoten.
31 Lymphknoten dieser 17 Patienten waren histopathologisch tumorfrei, bei 13 (41,9 %) von ihnen wurden jedoch isolierte Ber-EP4-positive Zellen nachgewiesen. Sechs Patienten dieser Gruppe befanden sich im pN0-Stadium. Fünf von ihnen (83,3 %) wiesen Mikrometastasen in ihren Lymphknoten auf. Von diesen befanden sich drei Patienten im pT2-Stadium und je ein Patient im Stadium pT1 und pT3.
In neun der 13 positiven Lymphknoten wurden Mikrometastasen sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den Spins nachgewiesen. In einem Lymphknoten wurden Mikrometastasen nur im Schnittpräparat und in drei weiteren Lymphknoten nur in den Spins gefunden.

LK ges. 31 = 16,3 % von 190 Lymphknoten.
LK pos 13 = 16% von 81 positiven Lymphknoten.

Tabelle 14 zeigt eine detaillierte Aufteilung der untersuchten Lymphknoten des Oesophagus-Karzinoms.

Tabelle 14: Oesophagus-Karzinom

	LK	**LK pos**	**Sch/Spin**	**Schnitt**	**Spin**
	(% von LK ges. n=31)		**(% von LK pos n=13)**		
Gesamt	31	13 (41,9%)	9 (69,2%)	1 (7,7%)	3 (23,1%)
Männer	26 (83,9%)	11 (42,3%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)
Frauen	5 (16,1%)	2 (40%)	0	0	2 (100%)
Pl.epithel	24 (77,4%)	12 (50%)	9 (75%)	0	3 (25%)
Adeno-Ca	7 (22,6%)	1 (14,3%)	0	1 (100%)	0
pN0	7 (22,6%)	5 (71,4%)	2 (40%)	0	3 (60%)
pN1	22 (71%)	7 (31,8%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0
pN2	0	0	0	0	0
pN3	2 (6,4%)	1 (50%)	1 (100%)	0	0
pT0	0	0	0	0	0
pT1	2 (6,4%)	1 (50%)	0	0	1 (100%)
pT2	9 (29%)	4 (44,4%)	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
pT3	18 (58,1%)	7 (38,9%)	6 (85,7%)	0	1 (14,3%)
pT4	2 (6,4%)	1 (50%)	1 (100%)	0	0
G 0	0	0	0	0	0
G I	0	0	0	0	0
G II	18 (58,1%)	8 (44,4%)	4 (50%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)
G III	13 (41,9%)	5 (38,5%)	5 (100%)	0	0
M0	27 (87,1%)	11 (40,7%)	7 (63,6%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)
M1	4 (12,9%)	2 (50%)	2 (100%)	0	0

Die statistische Auswertung der Daten für das Oesophagus-Karzinom mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten zeigt mit dem Kappa-Wert von 0,719 eine gute Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse.

Tabelle 14a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=31)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	18	3	21
Schnitt positiv	1	9	10
Gesamt	19	12	31

Tabelle 14b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=31)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,719**	0,129	0,000
	Anzahl der gültigen Fälle	31		

3.4.2. Magen-Karzinom

Es gab 15 Patienten mit Magen-Karzinom, 14 davon (93,3 %) waren Männer. Die Patienten waren zur Zeit der Operation im Alter von 19 bis 84 Jahren. Das mittlere Alter betrug 54,3 Jahre.
Bei 11 dieser Patienten (73,3 %) fanden sich Lymphknoten-Mikrometastasen. Es wurden dazu 31 histopathologisch negative Lymphknoten untersucht. Bei 14 dieser Lymphknoten (45,2 %) wurden Mikrometastasen gefunden.

Fünf Patienten befanden sich im pN0-Stadium, wobei vier von ihnen (80 %) nach dem Screening Lymphknoten-Mikrometastasen aufwiesen. Zwei Patienten hatten keinen nachweisbaren Primärtumor, weshalb sie der pT0-Kategorie angehörten. Zwei weitere Patienten hatten nur einen sehr kleinen Primärtumor. Je ein Patient hatte Stadium pT1 und pT2.

31 Lymphknoten dieser 15 Patienten waren histopathologisch tumorfrei, in 14 (45,2 %) von ihnen wurden jedoch isolierte Ber-EP4-positive Zellen nachgewiesen. Fünf Patienten dieser Gruppe befanden sich im pN0-Stadium. Vier von ihnen (80 %) wiesen Mikrometastasen in ihren Lymphknoten auf.

In sechs der 14 positiven Lymphknoten wurden Mikrometastasen sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den Spins nachgewiesen. In drei Lymphknoten wurden Mikrometastasen nur im Schnittpräparat und in fünf weiteren Lymphknoten nur in den Spins gefunden.

LK ges. 31 = 16,3 % von 190 Lymphknoten.
LK pos 14 = 17,3% von 81 positiven Lymphknoten.

Tabelle 15 zeigt eine detaillierte Aufteilung der untersuchten Lymphknoten des Magen-Karzinoms.

Tabelle 15: Magen-Karzinom

	LK	**LK pos**	**Sch/Spin**	**Schnitt**	**Spin**
	(% von LK ges. n=31)		**(% von LK pos n=14)**		
Gesamt	31	14 (45,2%)	6 (42,9%)	3 (21,4%)	5 (35,7%)
Männer	29 (93,5%)	12 (41,1%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)
Frauen	2 (6,9%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	0
pN0	10 (32,3%)	6 (60%)	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)
pN1	15 (48,4%)	7 (467%)	4 (57,1%)	0	3 (42,9%)
pN2	2 (6,9%)	1 (50%)	0	0	1 (100%)
pN3	4 (13,8%)	0	0	0	0
pT0	3 (10,3%)	2 (66,7%)	0	1 (50%)	1 (50%)
pT1	5 (17,2%)	2 (40%)	1 (50%)	1 (50%)	0
pT2	15 (48,4%)	8 (53,3%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	4 (50%)
pT3	7 (24,1%)	2 (28,6%)	2 (100%)	0	0
pT4	1 (3,4%)	0	0	0	0
G 0	3(10,3%)	2 (66,7%)	0	1 (50%)	1 (50%)
G I	0	0	0	0	0
G II	10 (32,3%)	5 (50%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)
G III	18 (62,1%)	7 (38,9%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)	3 (42,9%)
M0	21 (67,7%)	12 (57,1%)	4 (33,3%)	3 (25%)	5 (41,7%)
M1	10 (32,3%)	2 (20%)	2 (100%)	0	0

Die statistische Auswertung der Daten für das Magen-Karzinom mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten zeigt mit dem Kappa-Wert von 0,412 eine mittelmäßige Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden.

Tabelle 15a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=31)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	17	5	22
Schnitt positiv	3	6	9
Gesamt	20	11	31

Tabelle 15b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=31)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,412**	0,172	0,020
	Anzahl der gültigen Fälle	31		

3.4.3. Kolon-Karzinom

Es wurden 17 Patienten mit Kolon-Karzinom in die Studie aufgenommen. 14 von ihnen waren Männer (82,3 %). Bei neun der Patienten (52,9 %) wurden isolierte Tumorzellabsiedlungen in den Lymphknoten nachgewiesen. Von den 29 histopathologisch negativen Lymphknoten, die weiter untersucht wurden, wiesen 13 Lymphknoten Ber-EP4-positive Zellen auf.

Bei 12 Patienten waren die Lymphknoten histopathologisch metastasenfrei (pN0-Stadium). Bei sieben von ihnen (58,3 %) wurden aber durch die immunhisto-/immunzytochemische Nachweismethode isolierte Tumorzellen in den Lymphknoten nachgewiesen. Von diesen hatte ein Patient einen sehr kleinen Primärtumor pT1, zwei Patienten gehörten der Kategorie pT2 und vier Patienten der Kategorie pT3 an.

29 Lymphknoten der 17 Patienten waren histopathologisch tumorfrei, in 13 (44,8 %) von ihnen wurden jedoch isolierte Ber-EP4-positive Zellen nachgewiesen.
In acht der 13 positiven Lymphknoten wurden Mikrometastasen sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den Spins nachgewiesen. In einem Lymphknoten wurden Mikrometastasen nur im Schnittpräparat und in vier weiteren Lymphknoten nur in den Spins gefunden.

LK ges. 29 = 15,3 % von 190 LK's gesamt
LK pos 13 = 16 % von 81 LK's pos

Tabelle 16 zeigt eine detaillierte Aufteilung der untersuchten Lymphknoten des Kolon-Karzinoms.

Tabelle 16: Kolon-Karzinom

	LK	**LK pos**	**Sch/Spin**	**Schnitt**	**Spin**
	(% von LK ges. n=29)		**(% von LK pos n=13)**		
Gesamt	29	13 (44,8%)	8 (61,5%)	1 (7,7%)	4 (30,8%)
Männer	24 (82,8%)	11 (45,8%)	6 (54,5%)	1 (9,1%)	4 (36,4%)
Frauen	5 (16,1%)	2 (40%)	2 (100%)	0	0
pN0	20 (69%)	11 (55%)	7 (63,6%)	0	4 (36,4%)
pN1	7 (24,1%)	2 (28,6%)	1 (50%)	1 (50%)	0
pN2	2 (6,9%)	0	0	0	0
pN3	0	0	0	0	0
pT0	4 (13,8%)	0	0	0	0
pT1	1 (3,5%)	1 (100%)	0	0	1 (100%)
pT2	4 (13,8%)	2 (50%)	2 (100%)	0	0
pT3	16 (55,2%)	9 (56,2%)	5 (55,6%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)
pT4	4 (13,8%)	1 (25%)	1 (100%)	0	0
G 0	4 (13,8%)	0	0	0	0
G I	1 (3,5%)	1 (100%)	0	0	1 (100%)
G II	18(62,1%)	11 (61,1%)	7 (63,6%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)
G III	6 (20,7%)	1 (16,7%)	1 (100%)	0	0
M0	29 (100%)	13 (100%)	8 (61,5%)	1 (7,7%)	4 (30,8%)
M1	0	0	0	0	0

Die statistische Auswertung der Daten für das Kolon-Karzinom mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten zeigt mit dem Kappa-Wert von 0,631 eine mittelmäßige Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden.

Tabelle 16a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=29)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	16	4	20
Schnitt positiv	1	8	9
Gesamt	17	12	29

Tabelle 16b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=29)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,631**	0,146	0,000
	Anzahl der gültigen Fälle	29		

3.4.4. Pankreas-Karzinom

Die 38 Patienten mit einem Pankreaskarzinom bildeten die größte Gruppe der Studie (35,8 %). 22 Patienten waren Männer (57,9 %), 16 Patienten waren Frauen (41 %).
Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Operation in einem Alter zwischen 36 und 76 Jahre (das mittlere Alter betrug 61,7 Jahre). Bei 16 dieser Patienten (42,1 %) wurden Mikrometastasen in den Lymphknoten gefunden. Die Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom lieferte mit 62 (32,6 %) auch die höchste Zahl der negativen Lymphknoten der Studie. Mit der immunhisto-/immunzytochemischen Untersuchung wurden bei 23 dieser Lymphknoten (37,1 %) Mikrometastasen nachgewiesen.

19 Patienten dieser Gruppe befanden sich im pN0-Stadium. Bei 11 dieser Patienten (57,9 %) wurden jedoch Mikrometastasen in den Lymphknoten gefunden. Bemerkenswerterweise hatten drei dieser Patienten keinen histopathologisch nachweisbaren Primärtumor, weshalb sie in das Tumorstadium pT0 eingeordnet wurden.
Zwei Patienten dieser Gruppe hatten einen sehr kleinen Primärtumor im Stadium pT1, sechs Patienten hatten einen Primärtumor im Stadium pT3.

62 Lymphknoten der 38 Patienten waren histopathologisch tumorfrei, in 23 (37,1 %) von ihnen wurden jedoch isolierte Ber-EP4-positive Zellen nachgewiesen.
In acht der 23 positiven Lymphknoten wurden Mikrometastasen sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den Spins nachgewiesen. In drei Lymphknoten wurden Mikrometastasen nur im Schnittpräparat und in 12 weiteren Lymphknoten nur in den Spins gefunden.

LK ges. 62 = 32,6 % von 190 LK's gesamt
LK pos 23 = 28,4 % von 81 LK's pos

Tabelle 17 zeigt eine detaillierte Aufteilung der untersuchten Lymphknoten des Pankreas-Karzinoms.

Tabelle 17: Pankreas-Karzinom

	LK	**LK pos**	**Sch/Spin**	**Schnitt**	**Spin**
	(% von LK ges. n=62)		**(% von LK pos n=23)**		
Gesamt	62	23 (37,1%)	8 (34,8%)	3 (13%)	12 (52,2%)
Männer	36 (58,1%)	17 (47,2%)	7 (41,2%)	2 (11,8%)	8 (47%)
Frauen	26 (40,6%)	6 (23,1%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	4 (66,7%)
Neuroendo	7 (10,9%)	3 (42,9%)	0	0	3 (100%)
Adeno-Ca	55 (88,7%)	20 (36,4%)	8 (40%)	3 (15%)	9 (45%)
pN0	35 (56,4%)	18 (51,4%)	6 (33,3%)	2 (11,1%)	10 (55,6%)
pN1	27 (43,5%)	5 (18,5%)	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)
pN2	0	0	0	0	0
pN3	0	0	0	0	0
pT0	10 (15,6%)	4 (40%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)
pT1	6 (9,4%)	3 (50%)	0	0	3 (100%)
pT2	5 (8,1%)	3 (60%)	0	1 (33,3%)	2 (66,7%)
pT3	36 (56,2%)	13 (36,1%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)	5 (38,5%)
pT4	5 (7,8%)	0	0	0	0
G 0	10 (15,6%)	4 (40%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)
G I	4 (6,2 %)	1 (25%)	0	0	1 (100%)
G II	37 (59,7%)	15 (40,5%)	6 (40%)	1 (6,7%)	8 (53,3%)
G III	11 (17,2%)	3 (27,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)
M0	60 (96,8%)	23 (38,3%)	8 (34,8%)	3 (13%)	12 (52,2%)
M1	2 (3,2%)	0	0	0	0

Bei drei Lymphknoten, die einem Pankreas-Karzinoms entnommen wurden und bei denen histopathologisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen wurden, ergab unser Screening folgendes: Bei einem der Lymphknoten wurden nur im Schnittpräparat immunhistochemisch Ber-EP4- positive Lymphknotenzellen gefunden aber keine im Spin. Bei den beiden anderen wurden weder im Schnittpräparat noch im Spin positive Zellen nachgewiesen.

Die statistische Auswertung der Daten für das Pankreas-Karzinom mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten zeigt mit dem Kappa-Wert von 0,372 eine leichte Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden.
Da die Anzahl der untersuchten Lymphknoten hier deutlich höher liegt, ist der Schnitt-Spin-Vergleich auch aussagekräftiger. Hier liegt das Verhältnis bei 1:4 zu Gunsten der Spin-Untersuchung.

Tabelle 17a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=62)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	39	12	51
Schnitt positiv	3	8	11
Gesamt	42	20	62

Tabelle 17b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=62)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,372**	0,125	0,002
	Anzahl der gültigen Fälle	62		

3.4.5. Bronchial-Karzinom

Es gab insgesamt 19 Patienten mit Bronchialkarzinom. 13 Patienten waren Männer (68,4 %), sechs Patienten waren Frauen (31,6 %). Die Patienten mit einem Bronchialkarzinom waren zum Zeitpunkt der Operation im Alter von 34 bis 82 Jahren. Ihr mittleres Alter betrug 60,6 Jahre.
Bei 13 Patienten (68,4 %) dieser Gruppe wurden Lymphknoten-Mikrometastasen gefunden.
12 Patienten mit Bronchialkarzinom waren ins pN0-Stadium eingestuft worden. Bei sieben von ihnen wurden Mikrometastasen gefunden. Alle sieben Patienten hatten einen kleinen Primärtumor, drei davon befanden sich im pT1-Stadium und vier im pT2-Stadium.

Von den 37 histopathologisch negativen Lymphknoten aus dieser Gruppe wurden bei 18 Lymphknoten (48,6 %) Mikrometastasen gefunden.
In elf der 18 positiven Lymphknoten wurden Mikrometastasen sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den Spins nachgewiesen. In fünf Lymphknoten wurden Mikrometastasen nur im Schnittpräparat und in zwei weiteren Lymphknoten nur in den Spins gefunden.

LK ges. 37 = 19,5 % von 190 LK's gesamt
LK pos 18 = 22,2 % von 81 LK's pos

Tabelle 18 zeigt eine detaillierte Aufteilung der untersuchten Lymphknoten des Bronchial-Karzinoms.

Tabelle 18: Bronchial-Karzinom

	LK	**LK pos**	**Sch/Spin**	**Schnitt**	**Spin**
	(% von LK ges. n=37)		**(% von LK pos n=18)**		
Gesamt	37	18 (48,6%)	11 (61,1%)	5 (27,8%)	2 (11,1%)
Männer	23 (62,2%)	12 (52,2%)	6 (50%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)
Frauen	14 (37,8%)	6 (42,9%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0
Pl.epithel	14 (37,8%)	8 (57,1%)	5 (62,5%)	2 (25%)	1 (12,5%)
Adeno-Ca	23 (62,2%)	10 (43,5%)	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)
pN0	23 (62,2%)	9 (39,1%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0
pN1	9 (24,3%)	5 (55,6%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)
pN2	5 (13,5%)	4 (80%)	3 (75%)	0	1 (25%)
pN3	0	0	0	0	0
pT0	4 (10,8%)	2 (50%)	2 (100%)	0	0
pT1	10 (27%)	3 (30%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0
pT2	17 (45,9%)	11 (64,7%)	6 (54,5%)	4 (36,4%)	1 (9,1%)
pT3	3 (8,1%)	2 866,7%)	1 (50%)	0	1 (50%)
pT4	3 (8,1%)	0	0	0	0
G 0	4 (10,8%)	2 (50%)	2 (100%)	0	0
G I	7 (18,9%)	2 (28,6%)	2 (100%)	0	0
G II	14 (37,8%)	10 (71,4%)	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)
G III	12 (32,4%)	4 (33,3%)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
M0	34 (91,9%)	17 (50%)	10 (58,8%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)
M1	3 (8,1%)	1 (33,3%)	1 (100%)	0	0

Die statistische Auswertung der Daten für das Bronchial-Karzinom mit dem Cohens Kappa-Koeffizienten zeigt mit dem Kappa-Wert von 0,606 eine mittelmäßige Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden.

Tabelle 18a: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=37)

	Spin negativ	Spin positiv	Gesamt
Schnitt negativ	19	2	21
Schnitt positiv	5	11	16
Gesamt	24	13	37

Tabelle 18b: Schnitt vs. Spin nach Cohens-Kappa-Test (LK n=37)

Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotischer Standardfehler[a]	Näherungsweise Signifikanz
Maß der Übereinstimmung	Kappa	**0,606**	0,132	0,000
	Anzahl der gültigen Fälle	37		

Diagramm 1:

Verteilung der immunhisto-/immunzytochemisch negativen und positiven Lymphknoten.

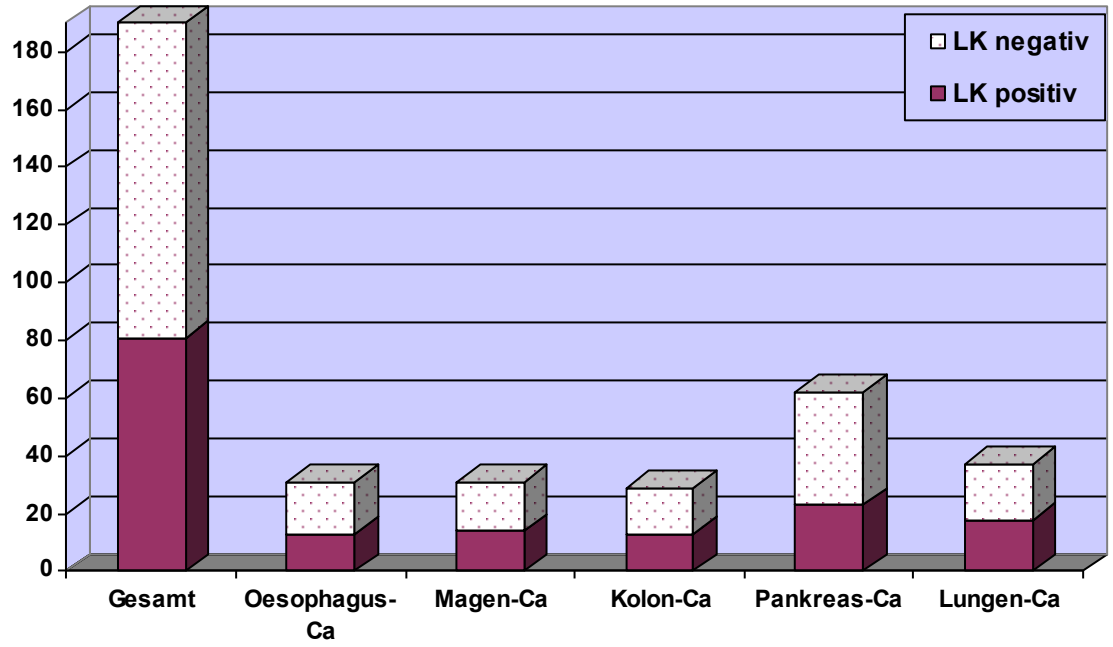
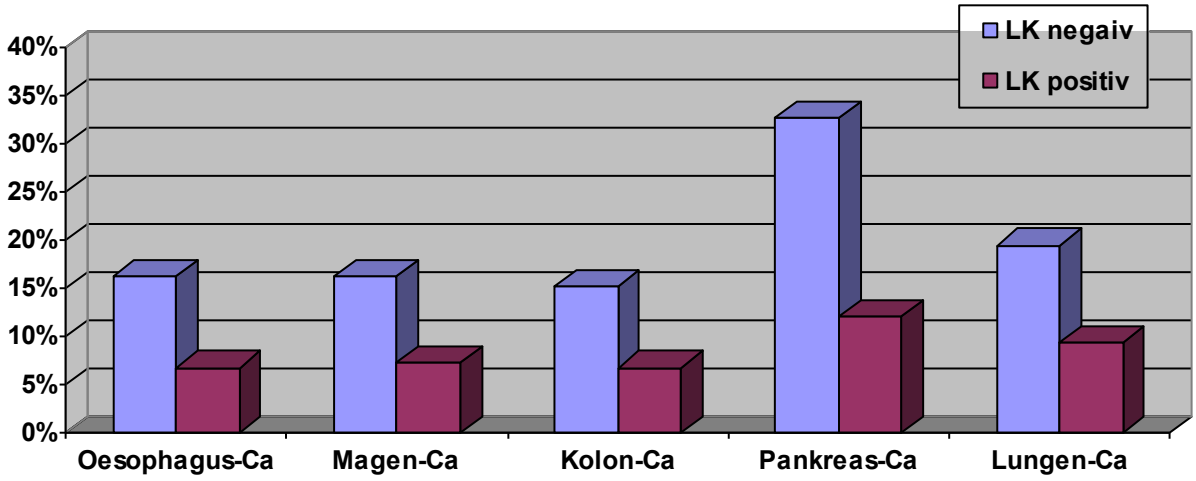


Diagramm 2:

Verteilung der immunhisto-/immunzytochemisch negativen und positiven Lymphknoten in Prozent.



4. Diskussion der Ergebnisse

Epitheliale Tumoren sind vorherrschend beim vorliegen von Krebs in Europa und den Vereinigten Staaten, und Metastasen stellen dabei die Haupttodesursache der Krebspatienten dar [91].

Primärtumorgröße und die Tumorausbreitung haben einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose von operierten Karzinomen.
Doch auch im Fall einer frühen Diagnose vieler Karzinome erleiden sehr viele Patienten nach radikaler Tumorresektion mit ausgedehnter Lymphadenektomie ein Tumorrezidiv, was die Notwendigkeit eines sorgfältigen, lebenslangen Follow-Ups unterstreicht [109]. Rezidive lassen sich generell therapeutisch nur schlecht beherrschen und stellen somit für alle Patienten mit malignen Erkrankungen die Haupttodesursache dar [110].
Vor allem Patienten mit nachgewiesenem Tumorbefall der Lymphknoten weisen, aufgrund einer frühen lymphogenen Metastasierung, eine schlechte postoperative Prognose bezüglich eines Rezidivs auf. Die histopathologische Einstufung der regionalen Lymphknoten hat daher neben der R0-Resektion einen entscheidenden prognostischen Stellungswert.
Selbst bei Patienten mit histopathologisch negativ befundetem Lymphknotenstatus beobachtet man nicht selten ein postoperatives Tumorrezidiv, welches sich oft in Form von Fernmetastasen äußert.
Unsere Studie basiert auf dem Grundgedanken, dass bereits einzelne, histopathologisch nicht nachzuweisende Tumorzellen, so genannte Mikrometastasen, in den Lymphknoten der Patienten zu entsprechenden Rezidiven führen könnten.

Die Immundiagnostik maligner Neoplasien nimmt in der chirurgisch-onkologischen Forschung einen immer breiteren Raum ein. Gestützt auf die Erkenntnis, dass das Immunsystem zu Erkennung und selektiver Eliminierung von Tumorzellen befähigt ist, wurden u.a. mit Hilfe monoklonaler Antikörper zahlreiche Antigenstrukturen auf Malignomen markiert und hinsichtlich ihres

Einflusses auf den klinischen Verlauf untersucht. Durch die Einführung von monoklonalen Antikörpern, welche gegen Tumorantigene oder Epitope epithelialer Proteine gerichtet sind, ist die Detektion einzelner epithelialer Tumorzellen in mesenchymalen Körperkompartimenten möglich geworden.

Diese minimalen Tumorzellabsiedlungen, die von hochgradiger Bedeutung für die Prognose der Patienten sein könnten, sind jedoch zu klein, um sie mit Sicherheit bei der konventionellen histopathologischen Untersuchung nachzuweisen.

Deshalb wurde mit Hilfe eines hochsensitiven immunhisto- und immunzytochemischen Assays versucht, mit dem monoklonalen antiepithelialen Antikörper Ber-EP4, isolierte disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten der Patienten mit Lungenkarzinom und Karzinomen des Magen-Darm-Traktes nachzuweisen.

Das Ziel unserer Untersuchung war, Patienten zu detektieren, bei denen bereits zum Zeitpunkt der Operation eine minimale Tumorzellaussaat in den regionalen Lymphknoten als möglicher Ausgangspunkt einer beginnenden Metastasierung vorlag.

Durch die Einführung monoklonaler Antikörper ist ein Anfärben einzelner epithelialer Zellen in mesenchymalem Lymphknotengewebe mittels immunhistochemischer Assays möglich geworden [12, 49, 62, 93].

Immunhistochemische Verfahren zählen, aufgrund der hohen und spezifischen Affinität von Antikörpern gegenüber ihrem Antigen, zu den sensitivsten und spezifischsten Nachweismethoden überhaupt. Unterschieden werden hierbei direkte und indirekte Immunfluoreszenz, sowie direkte und indirekte immunenzymatische Methoden.
Bei den direkten Methoden werden zum Antigennachweis Marker-Antikörper eingesetzt, welche direkt mit einem Fluorochromfarbstoff oder einem Enzym

konjugiert sind. Bei den indirekten Methoden wird die Antikörper-Rektion über einen konjugierten, gegen einen Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper nachgewiesen. Indirekte Methoden bieten grundsätzlich den Vorteil erhöhter Sensitivität. Bei den immunenzymatischen Methoden kann die Sensitivität durch den Einsatz von sogenannten „Brücken-Antikörpern“ noch weiter gesteigert werden. Hierbei verbindet ein brückenbildender Sekundär-Antikörper, z.B. das Kaninchen-Anti-Maus-Ig, den gegen den nachzuweisenden Antigen gerichteten Primär-Antikörper, z.B. Maus-Anti-Mensch, mit einem Tertiär-Antikörper, z.B. Maus-Ig. Um einzelne Tumorzellen unter 10^4 bis 10^6 normalen Lymphknoten- oder Knochenmarkszellen sicher detektieren zu können, ist ein hochsensitiver Reaktionsansatz notwendig. Des Weiteren ermöglicht der Einsatz von Brücken-Antikörpern eine hohe Verdünnung des eingesetzten Primär-Antikörpers, wodurch wiederum
eine hohe Spezifität erreicht wird, da unspezifische Reaktionen durch niedrige Primär-Antikörper-Konzentrationen reduziert werden.

Bei den Tertiär-Antikörpern, die bei den heilklimatischen Methoden eingesetzt werden, handelt es sich um präformierte Komplexe aus Enzymen und monoklonalen Anti-Enzym-Antikörpern. Zu den bewährtesten Enzym-Anti-Enzym-Komplexen zählen der Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Komplex und der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase(APAAP)-Komplex [19].

Bei der Immunfluoreszenz lässt sich die Antikörperreaktion unmittelbar nach Inkubation des fluorchromfarbstoffkonjugierten Antikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilen. Im Gegensatz dazu muss bei enzymatischen Methoden die Antikörperreaktion erst durch den Zusatz von Substraten angeregt werden. Die Substrate enthalten Chromogene, die mit den Enzymen der Enzym-Anti-Enzym-Komplexe reagieren. Bei der APAAP-Methode, mit der gearbeitet wurde, wird ein Naphtolphosphat-Ester, der im Substrat enthalten ist, durch die alkalische Phosphatase zu

Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren mit dem Diazoniumsalz „Neufuchsin“ als Chromogen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe, die als intensiv rote Reaktionsprodukte erscheinen und die Zellen sichtbar machen.

Die endogenen Enzyme wie alkalische Phosphatasen stellen ein Problem bei immunenzymatischen Methoden dar. Sie müssen daher inaktiviert werden, um eine spezifische Anfärbung der Präparate sicherzustellen. Bei den endogenen alkalischen Phosphatasen kann dies durch Zusatz von Levamisole erreicht werden. Endogene alkalische Phosphatasen kommen in Lymphknoten in sehr geringen Mengen vor, was ein weiterer Grund für die Wahl der APAAP-Methode war, weil diese den Färbeprozess nicht stört.

Der zur Detektion einer minimalen Tumorzellstreuung in Lymphknoten verwendete monoklonale Antikörper Ber-EP4 reagiert mit Ausnahme von epidermalen Keratinozyten und den apikalen Zellschichten von Plattenepithelien zuverlässig mit allen epithelialen Normalgeweben und den meisten Karzinomen [62, 74]. Erstmalig wurde dieser Antikörper eingesetzt, um maligne Mesotheliome von Adenkarzinomen zu unterscheiden [32, 107]. Ber-EP4 ist gegen zwei Glykopeptide mit Molekulargewichten von 34 kD und 49 kD gerichtet, die auf der Oberfläche und im Zytoplasma von epithelialen Zellen exprimiert werden. Die Funktion dieser Moleküle ist bis jetzt noch ungeklärt. Da sich jedoch eine Expression dieser Glykopeptide mittels Ber-EP4-Antikörper selbst auf stark entdifferenzierten Karzinomen nachweisen lässt, können diese beiden Glykopeptide als sichere epitheliale Histogenesemarker eingestuft werden. Mit Ausnahme des hepathozellulären Karzinoms (HCC), des Adenokarzinoms der Niere und des Adenokarzinoms der Mamma zeigen alle anderen bisher untersuchten Karzinome eine positive Reaktion mit dem Ber-EP4-Antikörper [62, 107]. Auch die im Rahmen unserer Studie untersuchten primären Ösophagus-, Magen-, Pankreas-, Kolon- und Bronchialkarzinome waren homogen Ber-EP4-positiv.

Bei Kontrollpatienten mit entzündlichen Erkrankungen oder benignen, sowie mesenchymalen Tumoren, konnte die Spezifität dieser Nachweismethode durch das Fehlen angefärbter Zellen demonstriert werden [87].

In unserer Studie analysierten wir 190 histopathologisch negative Lymphknoten von 106 Patienten sowohl als Gefrierschnitte als auch als Zytospins. Dabei konnten wir bei 61 Patienten (57,5 %) mit ihren 81 Lymphknoten (42,6 %) isolierte Ber-EP4-positive Zellen nachweisen. Bei der Gefrierschnitttechnik wurden die Lymphknoten in nur drei verschiedenen Ebenen untersucht. Diese Methode ist riskant, denn ihre Treffsicherheit ist ungenügend. Dagegen wurde der andere Teil der jeweiligen Lymphknoten als Ganzes zu Zytospins verarbeitet und beide Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Dabei stellte man fest, dass bei 12 schnitt-positiven Lymphknoten (14,8 %) keine Ber-EP4-positiven Zellen in den Zytospins nachzuweisen waren. Im Gegensatz dazu wiesen 25 der schnitt-negativen Lymphknoten (30,9 %) Mikrometastasen in den Zytospins auf.
Betrachtet man die Lymphknoten der Patienten unserer Studie, die als pN0-Stadium eingestuft wurden, so ergibt sich die in der Tabelle 21 dargestellte Verteilung.

Tabelle 21: Schnitt vs. Spin nach Karzinomen Stadium pN0

Karzinom	LK pos.	Schnitt pos Spin pos	Schnitt pos Spin neg	Schnitt neg Spin pos
Gesamt	49	24 (49 %)	7 (14 %)	18 (37 %)
Oesophagus	5	2 (40 %)	0	3 (60 %)
Magen	6	2 (33 %)	3 (50 %)	1 (17 %)
Kolon	11	7 (64 %)	0	4 (36 %)
Pankreas	18	6 (33 %)	2 (11 %)	10 (56 %)
Lunge	9	7 (78 %)	2 (22 %)	0

Wenn man die beiden Untersuchungsmethoden – Schnittpräparate vs. Spins – einzeln mit einander vergleicht, so sieht man, dass bei Ösophagus-, Kolon- und Pankreas-Karzinomen in den Spins deutlich mehr Mikrometastasen nachgewiesen werden konnten als in den Schnittpräparaten. Insgesamt

wurden bei 37% der positiven Lymphknoten Mikrometastasen in den Spins und lediglich in 14% in den Schnittpräparaten nachgewiesen. Das entspricht einem Verhältnis von ca. 1:3 zu Gunsten der Spin-Untersuchungsmethode.

Unter den 54 Patienten (51 %) mit histopathologisch tumorfreien Lymphknoten (pN0) wurden beim immunhisto-/immunzytochemischen Screening 34 Patienten (63 %) mit Ber-EP4-positiven Zellen gefunden. Entsprechend wurden unter den 95 histopathologisch negativen Lymphknoten (also 50% der Lymphknoten dieser Studie) bei 49 Lymphknoten Mikrometastasen (51,6 %) gefunden.

Wenn man die Ergebnisse anderer Forschergruppen [2, 21, 36, 72, 116] zugrunde legt, indem man die Patienten mit Mikrometastasen in den Lymphknoten aufgrund der prognostischen Bedeutung als nodal positiv bewertet, dann käme man durch den Nachweis von Lymphknoten-Mikrometastasen bei 63 % unserer untersuchten Patienten zu einer Änderung des postoperativen Tumorstagings.

Auch an Lymphknoten-Gewebeschnitten der gastrointestinalen Tumore wurde immunhistologisch bereits von Anderen der Nachweis von Tumorzellen untersucht [22, 87, 110].

Bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten wurde die Suche nach vereinzelter Tumorzellaussaat in den Lymphknoten durch immunhistochemische Methoden unterstützt. So fand Trojani [113] bei Patientinnen mit Mammakarzinom in 14 % der Fälle einen Befall der Lymphknoten durch Mikrometastasen. Bei einer Untersuchung der International Breast Cancer Study Group [49] an Patientinnen mit dem Lymphknotenstatus pN0 bei Mammakarzinom fand sich ein Anteil von 9% mit Einzelzelldissemination in den Lymphknoten.
Bei weiteren Tumorentitäten konnte ein Befall von Lymphknoten durch Mikrometastasen mit unterschiedlichen Nachweismethoden detektiert

werden. So zeigte sich bei Patienten mit Magenkarzinomen welche einen negativen Lymphknotenbefund aufwiesen ein positiver Nachweis einer minimalen Tumorzelldissemination in 23,5% der Fälle [72]. In einer retrospektiven Studie von Greenson [36] zeigte sich bei Patienten mit Colonkarzinom im Lymphknotenstadium pN0 in 28% der Fälle eine minimale Tumorzellstreuung in den perikolischen Lymphknoten, und beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde ein minimaler Tumorzellbefall in Lymphknoten bei 15,2% der Patienten beschrieben [87]. Bogoevski et al. Untersuchte, unter Anwendung des gleichen Antikörpers wie in unserer Studie (Ber-EP4), Lymphknoten von Patienten mit ductalem Adenokarzinom des Pankreas, welche zuvor in der Routinehistologie als pN0 eingestuft wurden. Bei 58% der Patienten mit als tumorfrei befundeten Lymphknoten konnte eine minimale Tumorzelldissemination nachgewiesen werden [9]. Yekebas et al. hatte im Rahmen seiner Untersuchung, ebenfalls des ductalen Pankreas-Adenokarzinoms, die Lymphknoten eines noch größeren Patientenkollektivs analysiert und konnte bei 57% der Patienten, mit einem histopathologisch als pN0 eingestuften Lymphknotenstatus, einen Befall der Lymphknoten mit Mikrometastasen nachweisen [123].

Bei Patienten mit Ösophaguskarzinom sind konventionell histopathologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen der wichtigste prognostische Faktor [30, 54, 66, 117]. Die Nachsorgeuntersuchungen im Rahmen dieser Studie mit Patienten mit Ösophaguskarzinom zeigen zum ersten Male, dass mit immunhistochemischen Methoden detektierte isolierte Tumorzellen in den Lymphknoten ein weiterer unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit Ösophaguskarzinom sind. Sowohl die Zeit des rezidivfreien Überlebens als auch die Gesamtüberlebenszeit waren im Falle eines Mikrometastasennachweises signifikant verkürzt. Das Fehlen von Ber-EP4-positiven Zellen dagegen kann als Indikator für eine bessere Prognose angesehen werden. Alle Patienten, die sowohl histochemisch als auch histopathologisch nodal tumorfrei waren, überlebten im bisherigen Beobachtungszeitraum von 21 Monaten ohne Anzeichen eines

Tumorrezidivs. Patienten hingegen, die nur histopathologisch nodal tumorfrei waren (pN0) jedoch Ber-EP4-positive Zellen in den Lymphknoten aufwiesen, hatten eine ähnlich reduzierte Prognose sowohl beim Tumorrezidiv als auch beim Gesamtüberleben wie Patienten im Stadium pN1 [95]. Diese Beobachtung lässt sich zum Beispiel durch eine hohe residuale Tumorlast erklären. Die disseminierten Tumorzellen könnten dabei eine potentielle Quelle für metastatische Rezidive sein. Bei Patienten, bei denen bereits histopathologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen bestehen, ist die Existenz weiterer okkulter Tumorzellabsiedlungen nahe liegend.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Mikrometastasierung des Papillenkarzinoms [15] zeigen, dass eine immunhistochemisch detektierbare isolierte Tumorzellaussaat in den regionalen Lymphknoten einen, von anderen Faktoren des Tumorstagings, wie Tumorgröße, Differenzierung und Lymphknotenstatus abhängigen prognostischen Faktor beim Papillenkarzinom darstellt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Multivariaten Cox Regressionsanalyse für Patienten mit Papillenkarzinom [15]

Risikofaktor	Relatives Risiko	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
Geschlecht (m vs. w)	0,500	0,202-1,235	0,133
pM	3,951	0,407-38,372	0,236
Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3/4)	1,779	0,670-4,719	0,247
Tumorstadium (T1/2 vs. T3/4)	1,389	0,750-2,570	0,296
Echte pN0 (pN0+MM0) vs. pN1 (pN1 oder MM1)	1,401	0,726-2,704	0,315

Die mediane Gesamtüberlebensdauer aller Patienten ohne Nachweis Ber-EP4-positiver Zellen Betrug Bemerkenswerterweise 144 Monate und lag somit rund fünf Mal höher als die mediane Überlebenszeit derjenigen mit lymphogener Einzelzelldissemination (28 Monate). Die Überlebenszeit war somit, ohne Berücksichtigung der histopathologischen Einstufung (pN0/pN1), bei Patienten ohne Ber-EP4-positive Zellen signifikant verlängert (p=0,026) (Tabelle 23).

Tabelle 23: Prognostischer Wert der Lymphknotenmikrometastasen aller Patienten (pN0 & pN1) des Papillenkarzinoms [15]

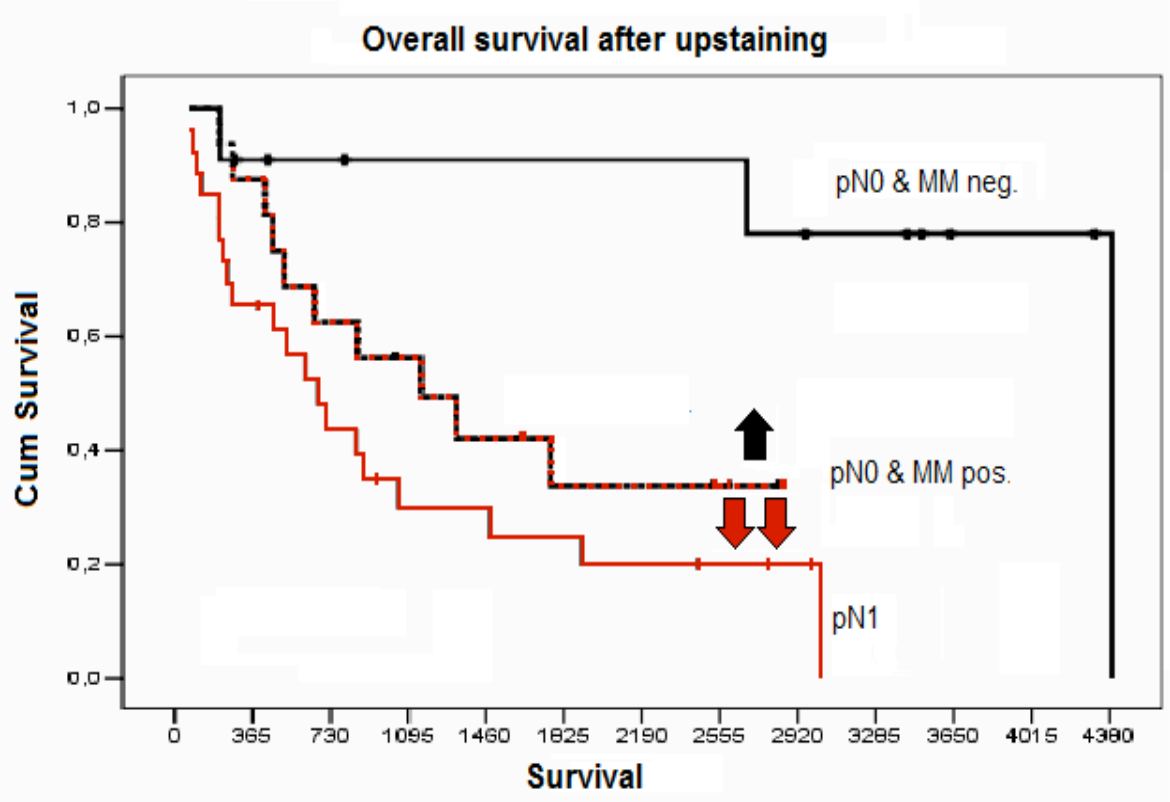
VARIABLE	Keine Lymphknoten-Mikrometastasen	Lymphknoten-Mikrometastasen	P Wert
Gesamtüberleben			
Anz. d. Ereignisse / Anz. d. Pat. (Tod)	**7/17 (41.2 %)**	**26/36 (72.2 %)**	**0.030**
5-Jahres Überlebensrate (%)	**66.5 %**	**29.6%**	
10-Jahres Überlebensrate (%)	**58.2 %**	**0%**	
Durchschnittliche Überlebenszeit (M.)	**96**	**43**	
Mediane Überlebenszeit (M.)	**144**	**28**	**0.026**

Bei Patienten, die an Papillentumoren [15] litten, konnte in einem Median Beobachtungszeitraum von 24,7 Monaten (Durchschnitt 42 Monaten, 1-144 Monate) festgestellt werden, dass der Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten signifikant mit einer Reduktion des rezidivfreien Überlebenszeitraumes korrelierte.

Patienten mit einem histopathologisch negativen Lymphknotenstatus (pN0), welche immunhistochemisch einen Tumorzellbefall der Lymphknoten aufwiesen, zeigten dabei einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie Patienten welche einen histopathologisch gesicherten Tumorbefall in den Lymphknoten (pN1) aufwiesen. Solche Patienten mit histopathologisch negativ, aber immunhistochemisch positiv aufgefallenen Lymphknoten (pN0 & MM pos.)

sind in Bezug auf die Prognose betrachtet eher den Patienten mit histopathologisch positiven Lymphknoten (pN1) zuzuordnen, als den tatsächlich tumorfreien Lymphknoten (pN0 & MM neg.). Abbildung 7 stellt dies anschaulich dar.

Abbildung 7: Gesamtüberleben nach Re-Staging für pN



Aufgrund dieser Studienergebnisse erscheint es sinnvoll, allgemein diejenigen Patienten mit immunhistochemisch nachgewiesenen Ber-EP4-positiven Zellen in den regionalen Lymphknoten, wegen der prognostischen Bedeutung, im Sinne eines Re-Stagings als nodal positiv (pN1) einzustufen; oder aber diese Patienten zumindest als eigenständige Subgruppe mit höherem Risiko gegenüber Patienten mit Ber-EP4-negativen Zellen in den Lymphknoten, aber besserer Prognose als Patienten mit histopathologisch positiv aufgefallenen Lymphknoten (pN1) abzugrenzen. Die Forderung nach einem Re-Staging wird unter Betrachtung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [2, 9,15, 21, 36, 43, 44, 72, 116] unterstützt.
Entsprechend würde der Nachweis von Ber-EP4 positiven Zellen zu einer Änderung des postoperativen Tumorstagings im Sinne einer Höherstufung führen.

Das Wachstum von disseminierten Tumorzellen zu klinisch manifesten Metastasen wird entsprechend der „Seed and Soil Hypothese“ von Paget wird durch das die disseminierte Tumorzelle umgebende Milieu bestimmt. Die Metastasierungsrate sowie das Rezidivmuster können durch die Anwesenheit und die Art der Wachstumsfaktoren in der unmittelbaren Umgebung der disseminierten Tumorzellen gefördert werden; damit steigt entscheidend die Fähigkeit der Tumorzellen, auf diese Stimuli anzusprechen [81]. Lokales Wachstum des Primärtumors und die Fähigkeit des Tumors zu metastasieren, sind Prozesse, die unabhängig voneinander ablaufen können [28]. Die Existenz von Ber-EP4-positiven Zellen könnte darauf hindeuten, dass selbst bei einem relativ kleinen Primärtumor ein zur Metastasierung befähigter Subklon vorliegt, der zum Zeitpunkt der Untersuchung schon zu einer Tumorzelldissemination geführt hat. Bei den Ber-EP4 detektierten Zellen könnte es sich um Zellen handeln, die speziell für die Metastasierung Selektionskriterien besitzen [79, 90, 91].

In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass nach den Studien anderer Autoren eine lymphovaskuläre Tumorinfiltration nicht mit dem Nachweis von Ber-EP4-positiven Zellen in Lymphknoten korrelierte [47, 95]. Offensichtlich können sich also nicht alle Tumorzellen zum lymphatischen System in den drainierenden Lymphknoten dergestalt Zugang verschaffen, dass auch lokoregionäre Abwehrmechanismen diskutiert werden müssten. Diese Beobachtung könnte ein Indiz dafür sein, dass zum einen die Anzahl der Tumorzellen, zum anderen aber auch ihre Eigenschaften, mit denen das Immunsystem konfrontiert wird, eine wichtige Rolle für den weiteren Krankheitsverlauf spielen [75].

So ließen sich immunhistochemisch nachweisbare Tumorzellen nicht nur in fortgeschrittenen Tumorstadien sondern auch bei Frühkarzinomen nachweisen. Dagegen breiten sich andere Tumorzellen offenbar ohne Einschränkung im betroffenen Organismus aus. Diese besitzen scheinbar einen Selektionsvorteil im Sinne einer veränderten Immunogenität. Entsprechend wird Veränderungen der Immunogenität im Rahmen der Transformation der Zellen ein entscheidender Einfluss zugeschrieben [8, 23, 29, 33, 44]. In allen Tumorstadien zeigte sich des Weiteren gleichermaßen ein negativer prognostischer Einfluss dieser Tumorzellen. Da mit dem Vorliegen von Ber-EP4-Oberflächenantigen jedoch eine signifikante Verschlechterung der Prognose der Patienten korreliert, könnte diese Beschaffenheit zu den beschriebenen Selektionsvorteilen von Tumoren gehören.

Entsprechend kann man Ber-EP4-positive Zellen als frühe Indikatoren für das systemische Fortschreiten einer Tumorerkrankung werten, welche bereits zu einem Zeitpunkt vorhanden sind, an dem herkömmliche Färbemethoden noch keine Metastasierung im ursprünglichen Sinne nachweisen können [43].
Somit ist vorstellbar, dass der Nachweis von Tumorzellen mit dem Vorliegen von Ber-EP4-Antigen auf der Zelloberfläche in den regionalen Lymphknoten bei histopathologisch negativem Befund in Zukunft ein Auswahlkriterium für

die Anwendung einer adjuvanten Tumortherapie darstellen könnte, da die alleinige chirurgische Therapie von Tumorpatienten bei nachgewiesener Aussaat Ber-EP4-positiver Zellen als nicht kurativ beurteilt werden kann [50].

Das Disseminationsverhalten der Ber-EP4-positiven Zellen folgte keinem Ausbreitungsmuster. Die Verteilung in die verschiedenen Lymphknotenstationen des Oesophagus, des Magens, des Kolons, des Pankreas und der Lungen war unregelmäßig. In der Studie zum Oesophaguskarzinom [47, 95] ließ sich nur bei 50 % der gefundenen Ber-EP4-positiven Zellen eine direkte Tumorzelldissemination in die angrenzenden regionären Lymphknotenstationen feststellen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Fekete [27] in einer Nachuntersuchung von histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen gefunden. In dieser Studie [27] zeigte sich ebenfalls häufig ein Tumorbefall in entfernteren Lymphknotenstationen, während die regionären Lymphknotenstationen noch tumorfrei waren. Auch beim Bronchialkarzinom konnte bezüglich der Mikrodissemination von Tumorzellen in Lymphknoten ein ähnliches Ausbreitungsmuster gefunden werden [52].

Arbeiten, in denen in primär unauffällige Lymphknoten nach Mikrometastasen gesucht wurden, erschienen bisher verhältnismäßig selten in der Fachliteratur. Die disseminierten Zellen könnten eine potentielle Quelle für metastatische Rezidive darstellen.
Diese von anderen Arbeiten abweichenden Ergebnisse könnten durch eine differente Färbemethode oder durch Einsatz anderer Primärantikörper aber auch durch die Zusammensetzung des Patientenkollektivs oder durch Unterschiede in der Bewertung der mikroskopischen Präparate begründet sein.

Voraussetzung für diese Untersuchung ist, dass Epithelzellen in gesunden Lymphknoten natürlicherweise nicht vorkommen und deshalb in jedem Fall als maligne anzusehen sind. In dieser Studie wurden nur jene 190

Lymphknoten untersucht, die vom Pathologen negativ bewertet worden waren. Die Lymphknoten wurden geteilt, wobei eine Hälfte jedes Lymphknotens dem Pathologen zur Verfügung gestellt wurde und die andere dieser Untersuchung vorbehalten war. Die in dieser Untersuchung behandelte Hälfte wurde halbiert und einerseits nach der klassischen Schnittmethode untersucht, andererseits zu einer Einzelzell-Suspension verarbeitet. Bei der Einzelzell-Suspension wurde je nach Zellzahl nur eine begrenzte Anzahl der Spins hergestellt, und zwar nicht mehr als acht Objektträger. Der Rest der Einzelzell-Suspension wurde verworfen. Es hing deshalb vom Zufall ab, in welchen der drei Teile sich epitheliale Zellen befanden. Denn schon A. Rehders hat in seiner Dissertation aus dem Jahre 1999 gezeigt, dass die Krebszellen inhomogen im Lymphknoten verteilt sind. Deshalb hätten sich maligne Zellen genau in jenen Lymphknotenteilen befinden können, die hier untersucht worden sind, während der Pathologe von Krebszellen freie Hälften bekam.

Diese Inhomogenität der Verteilung von kranken Zellen im Lymphknoten verhindert, die hier untersuchten 190 Fälle, die sowohl der Pathologe als auch diese Untersuchung negativ bewertet haben, als endgültig krebsfrei einzustufen. Makrometastasen wurden allerdings aus dieser Studie ausgeschlossen und fehlen in den 190 Fällen mit Sicherheit.

Folgendes kann zu falsch-negativen Befunden führen:

1. Maligne Zellen befinden sich nicht im untersuchten Lymphknotenteil
2. Maligne Zellen werden nicht angefärbt.
3. Die Zellmembran wurde während der Untersuchung verändert und nimmt keinen Farbstoff mehr an und ist nicht mehr färbbar.
4. Die Krebszelle wurde während der Untersuchung zerstört.

Diese Unsicherheiten beruhen auf dem Zufall durch die Probenentnahme. Damit kann man die hier untersuchten 109 Fälle nicht vollständig zweifelsfrei als negativ einstufen.

Genau die gleichen Überlegungen gelten auch für die Schnitt- bzw. Spin-Befunde. Da sich die einzelnen Mikrometastasen nicht gleichmäßig im gesamten Lymphknoten verteilen, gilt Folgendes:
In je mehr einzelne Teile für die unterschiedlichen Untersuchungen ein Lymphknoten aufgeteilt wird, desto höher ist die Gefahr eines Fehlbefundes.

Durch die hohe Inzidenz und prognostische Relevanz einer okkulten minimalen Tumorzellaussaat in Lymphknoten von Karzinom-Patienten wird die Forderung nach einem verfeinerten Tumorstaging resezierter Lymphknoten unterstützt, welches eine immunhistochemische Untersuchung beinhalten sollte. Dadurch könnten Subkollektive von Risikopatienten identifiziert werden, welche nicht durch einen chirurgischen Eingriff kurativ therapiert werden können, sondern gegebenenfalls von einer zusätzlichen adjuvanten Therapie profitieren könnten.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Anwendung einer immunhistochemischen Methode mit dem monoklonalen anti-Epithelzell-Antikörper Ber-EP4 bezüglich des Tumorzellnachweises in Lymphknoten durch Schreddern offensichtlich eine weitaus höhere Sensitivität gegenüber der konventionellen histopathologischen Untersuchung mit den Schnittpräparaten vorliegt.

Um alle möglichen Mikrometastasen durch die Färbung erfassen zu können, müsste man darüber hinaus den gesamten Lymphknoten detailliert untersuchen. Dies wäre ein unerträglicher Aufwand, denn im ungünstigsten Falle wären bis zu 100 Objektträger nötig. Außerdem würde es zu viel Zeit in Anspruch nehmen, um die gefärbten Spins nach Mikrometastasen durchzusehen und diese auszuwerten.

Für die Zukunft gilt es, Verfahren zum Reduzieren des Untersuchungsaufwandes zu entwickeln.
Patienten mit sowohl histopathologisch als auch immunhistochemisch tumorfreien Lymphknoten können möglicherweise durch eine alleinige radikale Tumorresektion ohne mikroskopischen Tumorrest (R0) kurativ behandelt werden.

5. Zusammenfassung

Die Prognose für Patienten mit Karzinomen der Lungen und des Magen-Darm-Traktes ist trotz verbesserter operativer und adjuvanter/neoadjuvanter Therapieverfahren nach wie vor unbefriedigend. Bei etwa 20% aller Patienten mit kolorektalen Karzinomen und über 50% der Patienten mit Ösophaguskarzinom, bei denen eine Tumorentfernung mit systematischer Lymphadenektomie in kurativer Intention durchgeführt wurde, kommt es frühzeitig zu Tumorrezidiven. Diese treten in erster Linie als Tumorabsiedlungen in Lymphknoten oder als Lungen- bzw. Lebermetastasen auf.

Es muss daher davon ausgegangen werden, dass sich bei vielen Patienten bereits zum Zeitpunkt der Operation eine lokale oder systemische Tumorzell-Disseminierung ereignet hat, die mit konventionellen Staging-Methoden nicht hinreichend erfasst wird. Voraussetzungen für eine Disseminierung sind komplexe Veränderungen der normalen Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen, die durch Zelloberflächenmoleküle vermittelt werden.

Diese Tumorzell-Disseminierung kann mit sensitiven immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden.

Um die minimale Tumorzelldisseminierung in regionäre Lymphknoten zu detektieren, wurden in der vorliegenden Studie 190 Lymphknoten untersucht, die in der konventionellen pathohistologischen Untersuchung als tumorfrei eingestuft wurden. Die Lymphknoten stammten von 106 Patienten mit Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Pankreas- und Bronchialkarzinom, welche keine adjuvante Therapie erhalten hatten. Während der Operation wurden systematisch Lymphknoten entnommen und gesammelt.
Diese 190 histopathologisch tumorfreie Lymphknoten wurden jeweils zu Gefrierschnittpräparaten und Einzelzell-Spins – einer feiner Untersuchungsmethode – verarbeitet und anschließend immunhisto-

/immunzytochemisch mit einer hochsensitiven APAAP-Methode und dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 auf das Vorhandensein von Mikrometastasen untersucht. Die beiden Untersuchungsmethoden – Gefrierschnittpräparate und Zytospins – wurden miteinander verglichen.

Die immunhistochemische Untersuchung nach Tumorzellen in den 190 Lymphknoten ergab bei 81 (42,6%) von ihnen bzw. bei 61 (57,5%) der 106 untersuchten Patienten den Nachweis von isolierten Ber-EP4 positiven Zellen.
Bei 42 der 81 Lymphknoten (52%) wurden sowohl in den Schnittpräparaten als auch in den dazugehörigen Zytospins Ber-EP4-positive Tumorzellen gefunden. Bei 13 Lymphknoten (16%) gab es keine Ber-EP4-positiven Zellen in den Zytospins, sondern nur in den Schnittpräparaten. Dafür gab es bei 26 Lymphknoten (32 %) keine Ber-EP4-positiven Zellen in den Schnittpräparaten wohl aber in den Zytospins. Das heißt, in unserer Studie wurden doppelt so viele Mikrometastasen in den Spins als in den Schnittpräparaten gefunden.

Anderen Studien zu Folge hat das Auftreten von Mikrometastasen einen signifikanten Einfluss auf ein verkürztes rezidivfreies Intervall. In einer multivarianten Analyse erwies sich der Nachweis isolierter Ber-EP4-positiver Zellen als unabhängiger Prediktor für eine signifikant schlechtere Prognose.

Somit scheint es sich bei diesen Zellen um einen geeigneten Parameter zu handeln, Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Tumorrezidiv bereits direkt postoperativ zu identifizieren und weiteren adjuvanten Therapieformen zuzuführen.

Durch die hohe Inzidenz und prognostische Relevanz einer okkulten minimalen Tumorzellaussaat in Lymphknoten wird die Forderung nach einem verfeinerten Tumorstaging resezierter Lymphknoten unterstützt, welches eine immunhistochemische bzw. immunzytochemische Untersuchung beinhalten sollte.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrams RA, Grochow LB, Chakravarthy A, Sohn TA, Zahurak ML, Haulk TL, Ord S, Hruban RH, Lillemoe KD, Pitt HA, Cameron JL, Yeo CJ.
Intensified adjuvant therapy for pancreatic and periampullary adenocarcinoma: survival results and observations regarding patterns of failure, radiotherapy dose and CA19-9 levels.
Int J Radiat Oncol Biol Phys. (1999) Jul 15;44(5):1039-46.

2. Allinson RT, Baron S, Peckitt N.
Lymph node micrometastasis: an investigation, including three-dimensional reconstruction.
Br. J. Biomed. Sci. (1994) 51:109-113.

3. Altman DG. Practical Statistics for Medical Research.Chapman & Hall/CRC, Boca Raton (1991)

4. Bernards, R. & Weinberg, R. A. A progression puzzle.
Proposes that the potential for metastasis is determined early in tumorigenesis, which explains why most cells in a primary tumour express the molecular signature that is associated with metastatic tumours.
Nature 418, 823–824 (2002).

5. Bischoff J, Rosenberg R, Dahm M, Janni W, Gutschow K.
Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer.
Recent Results Cancer Res. (2003) 162:135-40.

6. Blümcke S.
Pathologie. Walter de Gruyter (1995) 205-210.

7. Böcker W, Denk H, Heitz PhU.
Pathologie (2001) 187-192, 203-204.

8. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG.
Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms.
Ann.N.Y.Acad.Sci. (1993) 690: 42-49.

9. Bogoevski D, Yekebas EF, Schurr P, Kaifi JT, Kutup A, Erbersdobler A, Pantel K, Izbicki JR.
Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma: prognostic significance of nodal microinvolvement.
Ann Surg. (2004 Dec) 240(6):993-1000; discussion 1000-1.

10. Bonavina L, Soligo D, Quirici N, Bossolasco P, Cesana B, Lembertenghi Deliliers G, Peracchia A.
Bone marrow-disseminated tumor cells in patients with carcinoma of the esophagus or cardia.
Surgery. (2001 Jan) 129(1):15-22

11. Bottger T, Zech J, Weber W, Sorger K, Junginger T.
Prognostically relevant factors in cancer of Vater's ampulla
Langenbecks Arch Chir. (1989) 374(6):358-62.

12. Byrne J, Waldron R, McAvinchey D, Dervan P.
The use of monoclonal antibodies for the histopathological detection of mammary axillary micrometastases.
J. Surg. Oncol. (1987) 13: 409-411.

13. Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW.
Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review.
J Surg Oncol. (1998 Mar) 67(3):194-202. Review.

14. Chambers A, Groom AC, MacDonald IC.
Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.
Nature Rev. Cancer 2, 563–572 (2002).

15. Chayeb H.
Der Einfluss von minimaler Lymphknotenmetastasierung beim frühen Papillenkarzinom für die Rezidivrate und das Gesamtüberleben.
Diss (2006) 52-53.

16. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL.
Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistological study.
Am J Surg Pathol. (1988 Aug) 12(8):612-8.

17. Cohen J.
A coefficient of agreement for nominal scales.
Educational and Psychological Measurement (1960) 20: 37-46.

18. Cole WH. Spread by Implantation. In Cole WH, McDonald GO, Roberts SS, Southwick HW.
Dissemination of Cancer.
Appleton-Century-Crofts, New York (1961).

19. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY.
Immunenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of Alkine Phosphatase and monoclonal Anti-alkaline Phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. (1984) 32:219-229.

20. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Gusterson B, Neville AM.
Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group.
Lancet. (1999 Sep 11) 354(9182):896-900.

21. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP.
Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.
J. Clin. Oncol. (1991) 9: 1749-1756.

22. Cutait R, Alves VA, Lopes LC, Cuait DE, Borges JL, Singer J, Da Silva JH, Goffi FS. Restaging of colorectal cancer based on the identification of lymph node micrometastases through immunoperoxidase staining of CEA and cyoceratins.
Dis Colon Rectum (1991) 34:917-920.

23. Darrow TL, Slingluff CL, Seigler H.
The role of HLA class I anigens in recognation of melanoma cells by tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes.
J. immunol. (1989) 142:3329-3335.

24. Day SB, Myers WPL, Stanley P, Garattini S, Lewis MG. Cancer Invasion and Metastasis: Biologic Mechanisms and Therapy.
Raven Press, New York (1977).

25. Edelstein RA, Zietman AL, de las Morenas A, Krane RJ, Babayan RK, Dallow KC, Traish A, Moreland RB.
Implications of prostate micrometastases in pelvic lymph nodes: an archival tissue study.
Urology. (1996 Mar) 47(3):370-5.

26. Erbar P.
Onkologie. Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren. (2002) 26.

27. Fekete F, Gayet B, Molas GJM, DeLarue NC, Wilkins Jr. EW, Wong J. Mosby, St. Louis.
Prophylacic operative techniques: thoracic esophageal squamous cell cancer surgery, with special reference to lymph node removal.
In: Esophageal cancer: International Trends in General Thoracic Surgery (1988) 133-133.

28. Fidler IJ, Kripke M.
Metastasis resuts from preexisting variant cells within a malignant tumor.
Science (1977) 197:893-895.

29. Fleming KA, McMichael A, Morton JA, Woods J, McDee JO'D.
Distribution of HLA class I antigens in normal human tissue and in mammary cancer. J. Clin. Pathol. (1981) 34:779-784.

30. Forastiere A, Orringer M, Perez-Tomayo C, Urba SG.
Preoperative chemoradiation followed by transhiatal esophagektomy for carcinoma of the esophagus.
Final report. J. Clin. Oncol. (1993) 11:1118-1123.

31. Freeman JA, Esrig D, Grossfeld GD, Stein JP, Chen SC, Young LL, Taylor CR, Skinner DG, Lieskovsky G, Cote RJ.
Incidence of occult lymph node metastases in pathological stage C (pT3N0) prostate cancer.
J Urol. (1995 Aug) 154(2 Pt 1):474-8.

33. Gaffey MJ, Mills SE, Swanson PE, Zarbo RJ, Shah AR, Wick MR.
Immunreaktivity for Ber-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors and malignant mesotheliomas.
Am. J. Surg. Path. (1992) 16:593-599.

33. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pèrez-Villar JJ, Lòpez-Botet M, Duggan-Keen and Stern PL.
Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.
Immunol.Today (1997) 18: 89-95.

34. Gebhardt C, Kohler J, Jurowich C.
Carcinoma of the pancreas head, papilla Vateri, and cystadenocarcinoma - different biologic entities and different results.
Zentralbl. Chir. (2003) May;128(5):396-400.

35. Gilbert HA, Kagan AR. Metastases: Incidencs, detection, and evaluation without histologic confirmation. In Weiss L: Fundamental Aspects of Metastasis.
North-Holland Publ. Co, Amsterdam-Oxford (1976).

36. Greenson JK, Isenhart CE, Rice R, Mojzisik C, Houchens D, Martin EW Jr.
Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival.
Cancer. (1994 Feb 1) 73(3):563-9.

37. Grouven U et al.
Der Kappa-Koeffizient.
Dtsch Med Wochenschr (2007) 132: e65-e68.

38. Headrick JR, Nichols FC 3rd, Miller DL, Allen MS, Trastek VF, Deschamps C, Schleck CD, Thompson AM, Pairolero PC.
High-grade esophageal dysplasia: long-term survival and quality of life after esophagectomy.
Ann Thorac Surg. 2002 Jun;73(6):1697-702; discussion 1702-3.

39. Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind Ch.
Classification of isolated tumor cells and micrometastasis.
Cancer (1999) 86:2668-2673.

40. Hermanek P.
Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems.
Anticancer Res. (1999 Jul-Aug) 19(4A):2771-4. Review

41. Hermanek P.
What's new in TNM?
Pathol Res Pract. (1994 Jan) 190(1):97-102

42. Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K.
Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer.
Cancer Res. (2000 Dec 15) 60(24):6836-40.

43. Hosch SB, Knoefel WT, Metz S, Stoecklein N, Niendorf A, Broelsch CE, Izbicki JR.
Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: Frequency and prognostic significance.
Pancreas (1997) 15: 154-159.

44. Hosch SB, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K.
Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer.
Cancer Res. (2000) 60: 6836-6840.

45. Hosch SB, Steffani KD, Scheunemann P, Izbicki JR.
Micrometastases from HBP malignancies and metastatic cancer.
J Hepatobiliary Pancreat Surg. (2002) 9(5):583-91. Review.

46. Hosch SB, Stoecklein NH, Izbicki JR.
Molecular markers and staging of early esophageal cancer.
Langenbecks Arch Surg. (2003 Apr) 388(2):77-82. Epub 2003 Feb 20. Review.

47. Hosch S.
Untersuchungen zur immunhistochemischen und immunzytochemischen Evaluation einer minimalen residualen Tumorerkrankung bei Patienten mit vollständig reseziertem Ösophaguskarzinom. Inzidenz und prognostische Bedeutung.
Hab. (1999) 88:1-15, 96:19-20.

48. Hughes KS, Simon R, Songhorabodi S, et al.
Resektion of the liver for colorectal carcinoma metastases: A multi-institutional study of patterns of recurrence.
Surgery. (1986) 100:278-284.

49. International Breast Cancer Study Group.
Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers.
Lancet (1990) 335: 1565-1568. 9-12.

50. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K.
Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer.
N Engl J Med. (1997 Oct 23) 337(17):1188-94.

51. Izbicki JR, Hosch SB.
Minimal dissemination of solid epithelial tumours: impact on staging and therapeutic strategy.
Br J Surg. (1997 Jul) 84(7):897-8.

52. Izbicki JR, Passlick B, Hosch SB, Kubuschok B, Schneider C, Busch C, Knoefel WT, Thetter O, Pantel K.
Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small-cell lung cancer: significance of nodal micrometastsis.
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. (1996) 112:623-630.

53. Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kentenich C, Rjosk D, Schindlbeck C, Dimpfl T, Sommer H, Braun S.
Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma.
Cancer. (2000 May 15) 88(10):2252-9.

54. Jauch KW, Bacha EA, Deneke H, Anthuber M, Schildberg FW.
Esophagel carcinoma: Prognostic features and comparison between blunt transhiatal dissektion and transthoracic resection.
Eur. J. Surg. Oncol. (1992) 18:553-562.

55. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G, Schildberg FW.
Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer.
J Clin Oncol. (1996 Jun) 14(6):1810-7.

56. Johnson R: Notes on the vascular physiology of primary tumors and micrometastases. In Weiss, L.: Fundamental Aspects of Metastasis. North-Holland Publ. Co, Amsterdam-Oxford (1976).

57. Kayahara M, Nagakawa T, Ohta T, Kitagawa H, Miyazaki I.
Surgical strategy for carcinoma of the papilla of Vater on the basis of lymphatic spread and mode of recurrence. Surgery (1997 Jun) 121 (6): 611-617.

58. Keshtgar MRS, Ell PJ. Sentinel lymph node detection and imaging. Eur J Nucl Med 26 (1999) 57-76.

59. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G.
Genetic heterogenity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.
Lancet. (2002 Aug 31) 360(9334):683-9.

60. Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmüller G.
Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells.
Nat Biotechnol. (2002 Apr) 20(4):387-92.

61. Krag DN, Single RM
Breast cancer survival according to numbers of nodes removed.
Ann. Surg. Oncol. 10, 1152–1159 (2003).

62. Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody wich distinguishes epithelia from mesothelia. J Clin Pathol (1990) 43:213-219.

63. Leinung S, Würl P, Schönfelder A, Weiss CL, Röder I, Schönfelder M.
Detection of cytokeratin-positive cells in bone marrow in breast cancer and colorectal carcinoma in comparison with other factors of prognosis.
J Hematother Stem Cell Res. (2000 Dec) 9(6):905-11.

64. Leinung S, Würl P, Schönfelder A, Weiss CL, Röder I, Schönfelder M.
Rating of isolated disseminated tumor cells in bone marrow in comparison with other factors of prognosis in breast carcinoma.
Int J Surg Investig. (2000) 2(3):193-202.

65. Leinung S, Würl P, Weiss CL, Röder I, Schönfelder M.
Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma.
Langenbecks Arch Surg. (2000 Aug) 385(5):337-43

66. Lerut T, de Leyn P, Coosemans W, van Raemdonck D, Cuypers P, van Cleynenbreughel B. Advanced esophageal carcinoma.
World J. Surg. (1994) 18:379-387.

67. Lerut T, De Leyn P, Coosemans W, Van Raemdonck D, Scheys I, LeSaffre E.
Surgical strategies in esophageal carcinoma with emphasis on radical lymphadenectomy.
Ann Surg. (1992 Nov) 216(5):583-90.

68. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA.
Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer.
N Engl J Med. (1998 Jul 23) 339(4):223-8.

69. Lindblom A.
Improved tumor staging in colorectal cancer.
N Engl J Med. (1998 Jul 23) 339(4):264-5. No abstract available.

70. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G.
Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients.
Lancet. (1992 Sep 19) 340(8821):685-9.

71. Luzzi, K. J. et al.
Nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.
Am. J. Pathol. 153, 865–873 (1998).

72. Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, ichiyoshi Y, Kohnoe S, Sugimachi K. Surgery (1996) 119:397-402.

73. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG.
Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance.
Br J Cancer. (1996 Jan) 73(1):88-95.

74. Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunhistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. Cancer Res. (1987) 47:2883-2891.

75. Mühlhöfer A, Kronawitter U, Zoller WG. Prognostic value of immunhistochemically identifiable tumor celles in lymph nodes of patients with R0 resected esophageal carinoma. Z. Gastroenterol. (1998) 36:479-481.

76. Müller P, Weckermann D, Riethmüller G, Schlimok G.
Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization.
Cancer Genet Cytogenet. (1996 May) 88(1):8-16

77. Nakao A, Harada A, Nonami T, Kishimoto W, Takeda S, Ito K, Takagi H. Prognosis of cancer ofm the duodenal papilla of Vater in relation to clinicopathological tumor extension. Hepato-Gastroenterol. (1994) 41: 73-78

78. Nicolson, GL. Cancer Metastasis. Scient. Am. (1979) 240, 66.

79. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science (1976) 194:23-28.

80. Olmos RAV, Hoefnagel CA, Nieweg OE et al.
Lymphoscintigraphy in oncology: A rediscovered challenge. Eur J Nucl Med 26 (suppl.) (1999) 2-10.

81. Paget S. The Distribution of secondary growth in cancer of the breast. Lancet (1989) i:571-573.

82. Pantel K., Brakenhoff R. H.
Dissekting the metastatic cascade.
Reviews. 453-455 (2004)

83. Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O, Riethmüller G.
Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer.
Cancer Res. (1993 Mar) 1;53(5):1027-31.

84. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Passlick B, Izbicki JR, Johnson JP, Riethmüller G. Early metastasis of human solid tumors: Expression of cell adhesion molecules. Cell adhesion and human disease. Wiley Chichester (Ciba Foundation Symposium. (1995) 189:157-173.

85. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G.
Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.
J Hematother. (1994) Fall;3(3):165-73.

86. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G.
Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.
J Natl Cancer Inst. 1993 Sep 1;85(17):1419-24

87. Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, Nathrath W.
Immunhistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patient with non-small-cell lung cancer.
J. Clin. Oncol. (1994) 12:1827-1832.

88. Passlick B, Izbicki JR.
Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: impact on staging and prognosis.
Ann Thorac Surg. 1996 Jan;61(1):177-82; discussion 183

89. Passlick B, Kubuschok B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K.
Isolated tumor cells in bone marrow predicts reduced survival in lymph node-negative non-small-cell lung cancer.
Pneumologie. (2000 Aug) 54(8):355-60.

90. Pimm MV, Baldwin RW.
Antigenic differences between primary methylcholanthrene-induced rat sarcomas and post-surgical reccurences.
Int. J. Cancer (1977) 20:37-43.

91. Poste G, Fidler IJ.
The pathogenesis of cancer matstasis.
Nature (1980) 283:139-146.

92. Poste G. The cell surface and meastasis. In Day SB, Myers WPL, Stanley P, Garattini S, Lewis MG.
Cancer Invasion and Metastasis: Biologic Mechanisms and Therapy.
Raven Press, New York (1977).

93. Raymond WA, Leong AS. Immunoperoxidase staining in the detection of lymph node metastases in stage I breast cancer.
Pathology 21: 11-15. (1989)

94. Reed CE, Mishra G, Sahai AV, Hoffman BJ, Hawes RH.
Esophageal cancer staging: improved accuracy by endoscopic ultrasound of celiac lymph nodes.
Ann Thorac Surg. (1999 Feb) 67(2):319-21; discussion 322.

95. Rehders A. Inzidenz und prognostische Bedeutung residualer minimaler Tumorzellabsiedlungen in den resezierten Lymphknoten bei Patienten mit Ösophaguskarzinom sowie Phänotypisierung der gefundenen Zellen hinsichtlich der immunregulatorischen Oberflächenmoleküle HLA-I und ICAM-I.
Diss (1999) 64:25-27, 65:13-32, 66:32-33, 67:1-6.

96. Rettenbacher L, Kässmann H, Galvan G et al.
Lymphoscintigraphy in breast cancer patients – comparison of peritumoral and intradermal injection.
Nuklearmedizin (2000) 39:152-155.

97. Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E.
Allgemeine und spezielle Pathologie (2004) 366-369.

98. Riethmüller G, Schlimok G, Pantel K, Angstwurm M, Izbicki J, Karg O, Stade BG, Johnson JP.
Metastasis formation in human solid tumors: phenotypic characteristics of early metastatic cells.
Behring Inst Mitt. (1992 Apr) (91):204-9. Review.

99. Roder JD, Thorban S, Pantel K, Siewert JR.
Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer.
World J Surg. (1999 Sep) 23(9):888-91.

100. Sano T, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K.
Recurrence of early gastric cancer. Follow-up of 1475 patients and review of the Japanese literature.
Cancer. (1993 Dec) 1;72(11):3174-8. Review.

101. Scheunemann P, Izbicki JR, Pantel K.
Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes.
N Engl J Med. (1999 May) 27;340(21):1687.

102. Schlag PM et al.: Sentinel Lymphknoten Biopsie.
Spezielle Chirurgie (2001) 19-21.

103. Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmüller G.
Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance.
J Clin Oncol. (1990 May) 8(5):831-7.

104. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, et al.
Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies.
Proc Natl Acad Sci U S A. (1987 Dec) 84(23):8672-6.

105. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA.
From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7737-42. Epub 2003 Jun 13.

106. Schubert GE, Bethke BA (eds.). Lehrbuch der Pathologie.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1981), 213-8.

107. Sheibani K, Shin SS, Weiss LM.
Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma.
Am. J. Surg. Pathol. (1991) 15:779-784.

108. Siewert JR, Bartels H, Bollschweiler E, Dittler HJ, Fink U, Hölscher AH, Roder JD.
Squamous cell cancer of the esophagus. Treatment concept at the surgical clinic of the Munich Technical University.
Chirurg. (1992 Sep) 63(9):693-700.

109. Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Sernagiotto C, Pedrazzoli S.
Radical resection for ampullary carcinoma: long-term results.
Br J Surg. (1994 May) 81(5):668-71.

110. Stosiek P, Kasper M, Karsten U, Goertchen R.
Detection of cancer metastases in regional lymph nodes: Comparative histological and immunhistological investigation with broad-range anticytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3.
Neoplasma (1991) 38:43-47.

111. Sugarbaker EV, Ketcham AS.
Mechanisms and Prevention of Canceer dissemination: an overview.
Seminars of Oncology (1977) 4, 19.

112. Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Pantel K, Siewert JR.
Disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with esophageal cancer: detection and prognostic significance.
World J Surg. (1996 Jun) 20(5):567-72; discussion 572-3.

113. Trojani M, de Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G.
Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance.
Br.J.Cancer (1987) 55: 303-306.

114. Van de Vijver, M. J. et al.
A gene expression signature as a predictor for survival in breast cancer.
N. Engl. J. Med. 347, 1999–2009 (2002).

115. Van t' Veer, L. J. et al.
Gene-expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.
Nature 415, 530–536 (2002).

116. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P.
Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer.
Cancer (1993) 71:3926-3931.

117. Vogel SB, Mendenhall WM, Sombek MD, Marsch R, Woodward ER.
Downstaging of esophageal cancer after preoperative radiation and chemotherapy.
Ann. Surg. (1995) 221:695-695.

118. Watanabe H.
Squamous cell cancer of the esophagus. Treatment concept at the National Cancer Center in Tokyo.
Chirurg. (1992 Sep) 63(9):689-92.

119. Weiss L.
A Pathobiologic Overview of Metastasis.
Seminars of Oncology (1977) 4, 5.

120. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M.
Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow.
Clin Cancer Res. (1999 Jul) 5(7):1830-6

121. Wölfle, U. et al.
Molecular signature associated with micrometastasis in human breast cancer.
Cancer Res. 63, 5679–5684 (2003).

122. Xn et al. Arch Pathol. Lab Med (1993) 117, 1174ff.

123. Yekebas EF, Bogoevski D, Bubenheim M, Link BC, Kaifi JT, Wachowiak R, Mann O, Kutup A, Cataldegirmen G, Wolfram L, Erbersdobler A, Klein C, Pantel K, Izbicki JR.
Strong prognostic value of nodal and bone marrow micro-involvement in patients with pancreatic ductal carcinoma receiving no adjuvant chemotherapy.
World J Gastroenterol. (2006 Oct 28) 12(40):6515-21.

7. Danksagung

Ohne die Unterstützung einiger Personen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:
Herrn Dr. P. Scheunemann für die freundliche und kompetente Einarbeitung in das Thema dieser Doktorarbeit, Frau Karsta Lipke für die engagierte Beratung und Unterstützung.

Herrn OA Dr. Dean Bogoevski gilt mein besonderer Dank für die freundliche Betreuung, die letztendlich das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Tätigkeit im Rahmen dieser Dissertation.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Tante und meinem Mann für die ständige Unterstützung, Motivation und den privaten Rückhalt und zuletzt auch meiner guten Freundin, die mir den letzten Impuls zum Beenden dieser Arbeit gab.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ilona Wolff, geb. Lattke
geboren	8. April 1977 in Kiew
Familienstand	verheiratet, 1 Sohn
Anschrift	Geidelberg 56
	22143 Hamburg

Schulbildung

9/1984 – 5/1991	Mittelschule Nr. 207, Kiew
9/1991 – 4/1994	Gymnasium Nr. 299, Kiew
4/1994 – 7/1998	Gesamtschule Kirchdorf, Hamburg

Hochschulausbildung

10/1998 – 1/2005	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Praktisches Jahr

10/2004 – 02/2005	Innere Medizin (Med I), Asklepios Klinik Wandsbek
02/2005 – 06/2005	Chirurgisch-Traumatologische Klinik, AK St. Georg
06/2005 – 09/2005	Hals-Nasen-Ohrenheikunde, AK St. Georg

Arbeit

Seit 10/2006	Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin, AK Wandsbek

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:…….