

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, von welchen tumorbiologischen Faktoren eine Tumorzell dissemination in das Knochenmark von Magenkarzinompatienten abhängt und ob ein Nachweis von CK-positiven Zellen im Knochenmark eine unabhängige prognostische Relevanz hat. Dazu soll die Bedeutung CK-positiver Zellen im Knochenmark als unabhängiger langzeit-prognostischer Faktor bei Magenkarzinom-Patienten im Hinblick auf Überleben, Metastasierung und Rezidivbildung untersucht werden.

Es handelt sich um eine prospektive Untersuchung an der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie, Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch, Robert-Rössle-Klinik über einen Zeitraum von 5 Jahren (1994-1999) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der Knochenmarks-Befunde werden anhand der Überlebensraten, Metastasierung und Rezidivbildung diskutiert und in Vergleich zu den Ergebnissen der Literatur gesetzt.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientengut

Grundlage der Auswertung waren die in der der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert-Rössle-Klinik, Universitätsmedizin Charité, Campus Berlin Buch prospektiv erhobenen Knochenmarksbefunde und eine PC-Datenbank, welche parallel von allen Patienten angelegt wurde, die wegen eines Magenkarzinoms an der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert-Rössle-Klinik, Universitätsmedizin Charité, Campus Berlin Buch behandelt wurden.

3.1.1 Patientenkollektiv

Wir erfaßten in der Studie 209 Patienten mit Magenkarzinom, welche im Zeitraum von 03/1994 bis 03/1999 therapiert wurden.

Bei all diesen Patienten wurde nach Einholen einer schriftlichen

Einverständniserklärung und unmittelbar vor dem eigentlichen Haupteingriff unter Intubationsnarkose von beiden Beckenkämmen eine Knochenmarkspunktion durchgeführt.

Für die Gesamtauswertung wurden zunächst alle knochenmarkspunktierten Patienten eingeschlossen (n=209) unabhängig von TNM-Status oder von der operativen Intention - kurativ bzw. palliativ.

Überlebens-, Rezidiv- und Metastasierungsanalyse wurden ausschließlich bei Patienten durchgeführt, welche R0-reseziert wurden und initial frei von Fernmetastasen waren bzw. keine Zweittumoren hatten (n=109)

Das präoperative Staging erfolgte unter Verwendung von Endoskopie, endoskopischer Sonographie, abdominaler Sonographie, abdominaler Computertomographie und Thorax-Röntgen.

3.1.2 Erfasste Daten

- **Angaben zur Person:** Name und Vorname (verschlüsselt als ID-Nummer entsprechend den Vorschriften zum Datenschutz), Geburtsdatum, Geschlecht des Patienten,
- **Anamnestische Daten:** Familienanamnese bezüglich des Magenkarzinoms; Begleiterkrankungen und deren Klassifizierung nach pulmonal, kardial, renal, Diabetes, Hypertonie, Anämie, andere; Zweit-Karzinom (inkl. Diagnose und Datum der Erstmanifestation)
- **Tumor:** Lokalisation des Tumors (oberes Drittel / mittleres Drittel / unteres Drittel / Kardia / Totalkarzinom / Restmagen / Multifokal), histopathologische Wachstumsform nach Lauren, Angaben zum Vorkommen von Siegelringzellen, Grad der Differenzierung (Grading), Infiltrationstiefe (pT), Zahl und Lokalisation der resezierten und befallenen Lymphknoten (pN), Angaben über Fernmetastasen, Angaben über histopathologische Befunde bei Peritoneal-Lavage, Angaben über histopathologische Befunde bei Knochenmarksaspiraten, Angaben über einen Gefäßeinbruch des Tumors in

Blut- bzw. Lymphsystem (V bzw. L), Angaben über Residualtumor (R0 / R1 / R2 / Rx) nach Resektion

- **Klinikaufenthalt und Therapieverlauf:** Aufnahme- und Entlassungsdatum, Datum der Operation, postoperative Verweildauer auf der Intensivstation, Wertung der Therapie als kurativen oder palliativen Eingriff, Art des angewandten Operationsverfahrens (Zwei-Höhlen-Eingriff / Kardiaresektion / Zwei-Drittel-Resektion, Vier-Fünftel-Resektion / Gastrektomie / Gastroenterostomie / Andere), Angaben über das Ausmaß der Lymphknoten-Dissektion (D1, D2, Dx), Angaben über zusätzlich resezierte Organe, Angaben über Anlage eines Jejunumersatzmagens, Operationsdauer, Risiko-Score nach ASA sowie Body Mass Index (BMI) zum Operationstermin, Blutverlust während der Operation, Angaben über chirurgische und nicht-chirurgische Komplikationen, Datum eventueller Relaparotomien; Art der tumorbezogenen prä- und postoperativen Zusatztherapien (Sekundär-Operationen; Neoadjuvante / Adjuvante / Palliative / intraperitoneale Chemotherapie; Radiotherapie).
- **Nachsorge:** Datum des letzten Kontakts zum Patienten; Angaben zum Tumorprogreß (Tumorfreiheit / Diagnose von Metastasen inkl. Datum und Lokalisation / Diagnose eines Lokalrezidivs inkl. Datum und Lokalisation); ggf. Todesdatum; ggf. tumorabhängige Todesursache

3.1.3 Klinische Langzeitbeobachtung

Um den biologischen und klinischen Einfluß von CK-positiven Zellen zu beurteilen, wurden bei Patienten mit histopathologisch gesicherter R0-Resektion Folgeuntersuchungen durchgeführt. Diese fanden postoperativ innerhalb der ersten 2 Jahre quartalsweise, für 3 weitere Jahre halbjährlich und anschließend jährlich statt.

Diese Nachkontrollen beinhalteten die körperliche Untersuchung, Laboranalysen inklusive Tumormarkern (CEA, CA19-9, CA72-4), Abdomen-Sonographie und Thorax-Röntgen. Bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv wurden

weitere Bildgebungsverfahren und endoskopische Verfahren hinzugezogen wie die Magnetresonanztomographie (MRT), Spiralcomputertomographie (Spiral-CT) oder Ösophago-Gastro-Duodenoskopie inklusive endoskopischer Sonographie (EUS) und Biopsie. Bei Nachweis eines Tumorrezidivs erfolgte die Klassifizierung als locoregionär vs. Fernmetastasierung.

Der postoperative Beobachtungszeitraum für alle Patienten lag im Median bei 56 Monaten, kein Patient war aus der Nachsorge ausgeschieden.

3.2 Statistische Auswertung

Die computergestützte statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von SPSS-Software (Statistical Package for Social Sciences, Version 12.0). Zur Darstellung der Korrelation zwischen Knochenmarksbefund und klinikopathologischen Merkmalen wurde der Chi Quadrat mit Pearson Test verwendet. Überlebenskurven mit tumorbezogenem Überleben, rezidivfreier Zeit hinsichtlich Lokalrezidiv und Fernmetastasen wurden anhand der Kaplan-Meier Methode (univariater Test)²⁹² ermittelt.

Es wurden alle etablierte potentielle Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Invasionstiefe (pT), Lymphknotenmetastasierung (pN), Grading (G), Lymphgefäßinvasion (L), Gefäßinvasion (V) in Korrelation zu den Ergebnissen des immunohistochemischen Knochenmarksstatus nach multivariater Cox's Regression mit der Schrittweise Vorwärts Methode und dem Konfidenzintervall von 95% untersucht²⁹³. Das Signifikanzniveau war $p < 0.05$.

3.3 Histopathologische Untersuchung des Knochenmarks

Der komplette Untersuchungsablauf wird schematisch in folgender Abbildung dargestellt.

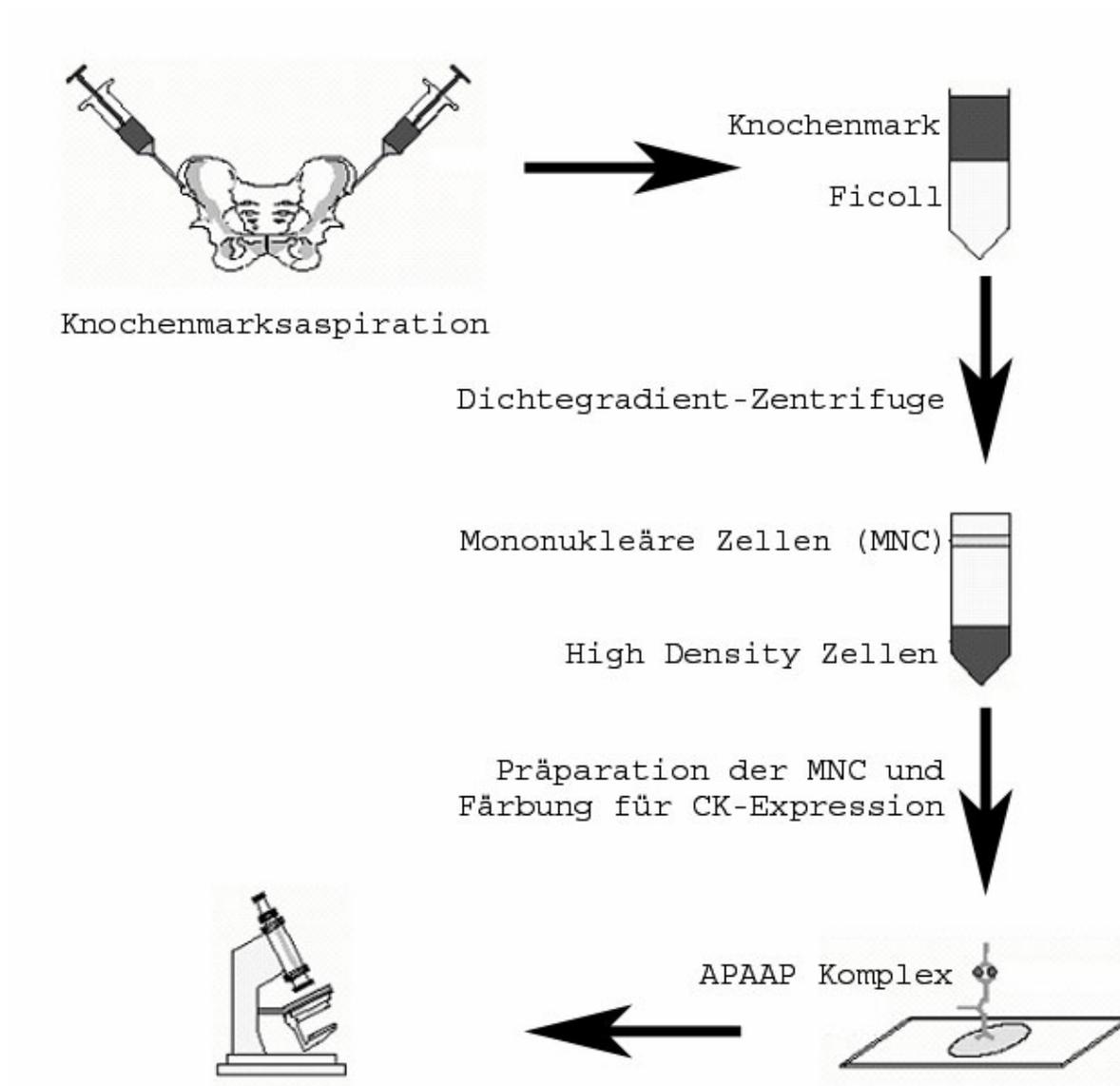


Abbildung 12: Standard Methode zur Anreicherung, immunzytochemischer Färbung und Screening nach disseminierten Tumorzellen in Knochenmarksaspiraten (CK: Zytokeratin, MNC: mononukleäre Zellen, CK 18- (Mab CK 2) Antikörper²⁹⁴).

3.3.1 Gewinnung der Gewebeproben

Die Knochenmarksaspiration erfolgte unter Intubationsnarkose von den Beckenkämmen beidseits, wobei zur Vermeidung einer Kontamination mit Hautepithel eine kleine Hautinzision vorgenommen wurde. Nach Einführen einer 15G Aspirationskanüle (100 mm, Pflugbeil GmbH; Germany) wurden von jeder Seite je 10 ml Knochenmark in eine Spritze mit 5000 IU Heparin-Lösung aspiriert.

Von den 209 Patienten wurden 165 einer operativen Resektion unterzogen (109 Gastrektomien, 29 proximale Resektionen, 20 subtotale Resektionen, 7 Magenstumpfresektionen). Sämtliche Resektate dieser Patienten wurden untersucht und nach der geltenden pathologischen Klassifikation (pTNM) der International Union Against Cancer (UICC) von 1997^{171,295,296} klassifiziert.

3.3.2 Aufarbeitung und Histologische Auswertung der Knochenmarksbefunde

Die mononukleären Zellen wurden mittels Ficoll/Hypaque Dichtegradient-Zentrifugierung getrennt. Anschließend wurden Zytospins mittels eines Zentrifugensystems (Hettich-Universal 16/16R; Germany) aufbereitet. Pro Patient wurden mindestens $3,5 \times 10^6$ Zellen analysiert. Die immunozytochemische Suche nach epithelialen Tumorzellen basierte auf der Verwendung von monoklonalen Anti-Zytokeratin-18 Antikörpern (Mab CK2, Boehringer Mannheim, Germany) sowie der Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase Technik (APAAP) für 2×10^6 Zellen, wie sie im Detail bereits beschrieben wurde^{180,297-300}. Die folgende Abbildung illustriert die APAAP-Methode:

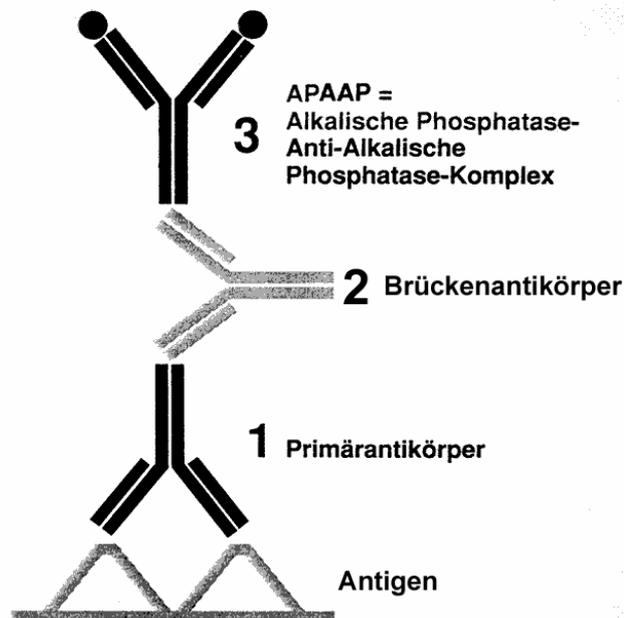


Abbildung 13: APAAP-Methode

Zur positiven Kontrolle auf epitheliale Marker wurden die Colon-Karzinom-Zelllinien SW480 herangezogen. Eine Hämalaun-Gegenfärbung wurde routinemäßig durchgeführt und alle CK-positiven Zellen wurden von einem erfahrenen Pathologen kritisch nach morphologischen Malignitätskriterien untersucht.

Um falsch-positive Knochenmarksbefunde auszuschließen wurden zusätzlich bei allen Patienten zwei Zytospins mit 1×10^6 Zellen mittels May-Grünwald-Giemsa-Gegenfärbung (MGG) untersucht.

Nur bei pathomorphologisch zweifelsfreiem Nachweis von Tumorzellen wurde das Knochenmark eines Patienten als positiv gewertet (Abbildungen 14a und 14b).

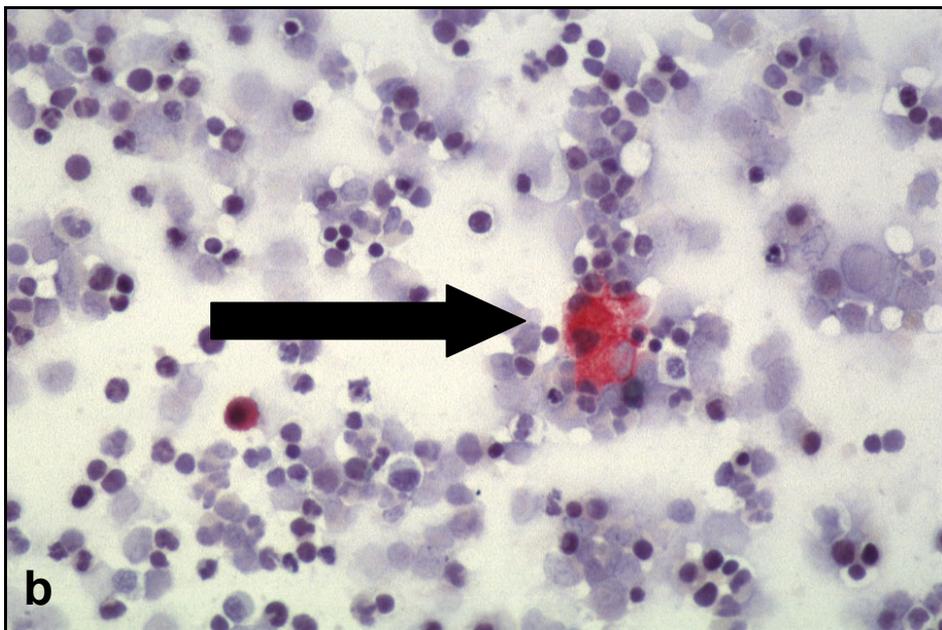
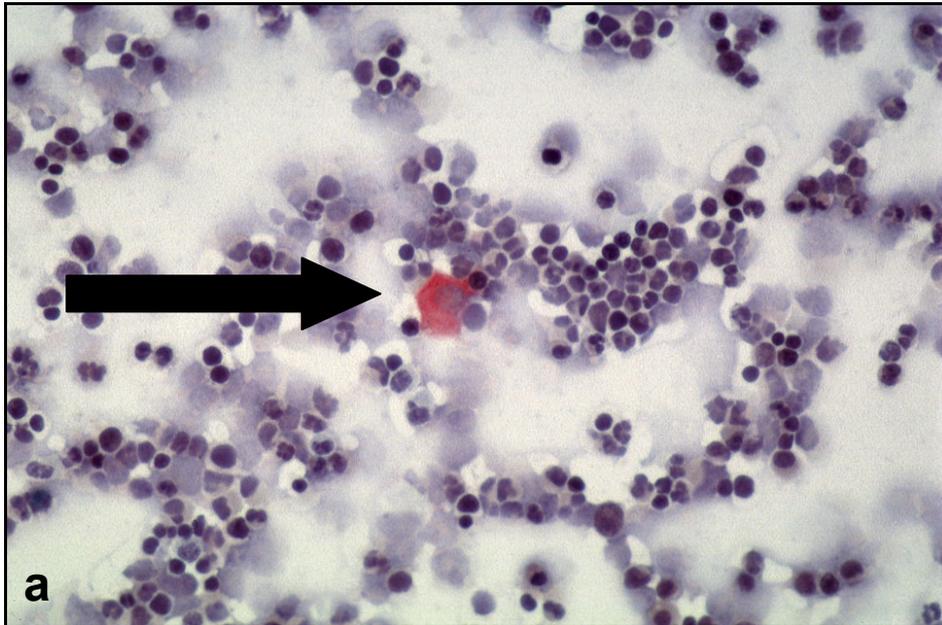


Abbildung 14: Einzelne CK-positive Zelle (a) und kleiner Zell-Cluster (b) im Knochenmark von Magenkarzinompatienten nach immunohisto-chemischer Färbung mit Mab CK2 (anti CK 18); X 500.