

Aus der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie,
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Buch
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. P. M. Schlag

HABILITATIONSSCHRIFT

OPTIMIERUNG DER CHIRURGISCHEN THERAPIE DES MAGENKARZINOMS DURCH NEUE CHIRURGISCHE DIAGNOSEVERFAHREN UND PRÄDIKTIVE MOLEKULARE UND ZELLBIOLOGISCHE MARKER

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

CHIRURGIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dr. med. Stephan Gretschel

geboren am 10. April 1960 in Dresden

eingereicht im Mai 2008

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Professor H. D. Saeger, Dresden

2. Gutachter: Professor C. D. Heidecke, Greifswald

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

- 1.1 Metastasierungswege beim Magenkarzinom (hämatogen, lymphogen, peritoneal)
- 1.2 Minimal residuale Tumorerkrankung des Magenkarzinoms (Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Ascites)
- 1.3 Einführung neuer klinischer und histologischer Methoden für eine Optimierung des Staging beim Magenkarzinom (Staginglaparoskopie, Sentinel-Lymphknotenbiopsie, Knochenmarkpunktion)
- 1.4 Aktuelle Entwicklungen für eine molekularbiologische Subklassifizierung des Magenkarzinoms

2. FRAGESTELLUNG

3. PUBLIKATIONEN ZUR ERÖRTERUNG DER FRAGESTELLUNG

- 3.1 Surgical strategies for gastric cancer with synchronous peritoneal carcinomatosis
Gretschel S., Siegel R., Estevez-Schwarz L., Hünerbein M., Schneider U., Schlag P.M.
Br J Surg 2006, 93(12): 1530-1535
- 3.2 Lymphatic Mapping und Sentinel-Lymphknotendiagnostik beim Magenkarzinom
Gretschel S., Bembenek A., Ulmer C., Hünerbein M., Markwardt J., Schneider U., Schlag P.M.
Chirurg 2003, 74(2): 132-138

- 3.3 Prediction of gastric cancer lymph node status by sentinel lymph node biopsy and the Maruyama Computer Model
Gretschel S., Bembenek A., Ulmer C., Hümerbein M., Markwardt J., Schneider U., Schlag P.M.
Eur J Surg Oncol 2005, 31(4): 393-400
- 3.4 Efficacy of different technical procedures for sentinel lymph node biopsy in gastric cancer staging
Gretschel S., Bembenek A., Hümerbein M., Dresel S., Schneider W., Schlag P.M.
Ann Surg Oncol 2007, Jul;14(7): 2028-35
- 3.5 Prognostic value of cytokeratine positive bone marrow cells of gastric cancer patients
Gretschel S., Schick Ch., Schneider U., Estevez-Schwarz L., Bembenek A., Schlag P.M.
Ann Surg Oncol 2007, 14(2): 373-380
- 3.6 Clinical relevance of sialyltransferases ST6GAL-I and ST3GAL-III in gastric cancer
Gretschel S., Haensch W., Schlag P.M., Kemmner W.
Oncology 2003, 65(2): 139-145
- 3.7 Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma
Jüttner S., Wissmann C., Johns T., Vieth M., Hertel J., Gretschel S., Schlag P.M., Kemmner W., Höcker M.
J Clin Oncol 2006, 10;24(2): 228-40
- 3.8 Markers of tumour angiogenesis and tumor cells in bone marrow in gastric cancer patients
Gretschel S., Astrosini Ch., Vieth M., Jöns Th., Tomov T., Höcker M., Schlag P.M., Kemmner W.
Eur J Surg Oncol 2007, Nov. 17 , doi: 10.1016/ejso.2007.09.010

4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

- 4.1 Die Optimierung der Diagnostik und Präzisierung der Indikation für eine multimodale Therapie durch die Staginglaparoskopie beim Magenkarzinom
- 4.2 Optimierung des Lymphknotenstagings beim Magenkarzinom durch die Sentinel-Lymphknoten Biopsie
- 4.3 Die Prognostische Relevanz isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Magenkarzinom
- 4.4 Die prädiktive prognostische Wertigkeit von Sialyltransferasen sowie VEGF-Faktoren und deren Rezeptoren beim Magenkarzinom.

5. WERTUNG UND AUSBLICK

6. LITERATUR

7. DANKSAGUNG

8. ERKLÄRUNG

nach §4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

1. EINLEITUNG

1.1 METASTASIERUNGSWEGE BEIM MAGENKARZINOM

Wie bei den meisten soliden Tumoren ist die Todesursache beim Magenkarzinom überwiegend eine Folge der Fernmetastasierung mit dem hieraus resultierenden Funktionsausfall lebenswichtiger Organe. Lymph- und Blutgefäße sowie Nervenscheiden sind die wichtigsten Invasionsrouten der Metastasierung. Beim fortgeschrittenen Magenkarzinom kommt es in über 80 % der Fälle zu einer Lymphgefäß-, in bis zu 70 % zu einer Venen- und in bis zu 50 % zu einer Perineuralscheiden-Invasion¹⁻³. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind bereits über 50 % der Magenkarzinome metastasiert und können somit bisher praktisch keiner kurativen Therapie mehr zugeführt werden.

Bei der *hämatogenen Metastasierung* durchbrechen Tumorzellen die epitheliale Membran des Gewebes, durchdringen die Endothelschicht von Venolen und invadieren in den Blutkreislauf. Obwohl der größte Teil dieser Zellen durch das Immunsystem und die in der Zirkulation herrschenden Scherkräfte eliminiert wird, gelingt es einem kleineren Teil der Tumorzellen zu extravadiere und v.a. in Leber, Knochen, Nebennieren und Hirn einzuwandern. Wiederum nur ein Bruchteil dieser invadierten Zellen ist in der Lage, erneut Anschluss an das Blut- und Lymphgefäßsystem zu erhalten und somit die notwendigen Voraussetzungen zur Bildung von Mikrometastasen und schließlich Makrometastasen zu erlangen (Abb. 1)^{4,5}. Derzeit wird vermutet, dass es sich bei diesen ausgewählten Zellen um Stammzellen des Tumors handelt⁶⁻⁸. Da die Tumore bestimmte Metastasierungsorte bevorzugen, geht man von einer Gewebe- und somit Organspezifität der Metastasierung aus. Die Fähigkeit, in bestimmte Organe zu metastasieren, basiert auf der Expression von organspezifischen Genen, welche die Tumorstammzellen bilden können^{9,10}. Bereits 1965 beschrieb Laurén zwei Tumorentitäten, welche unterschiedliche Häufigkeiten einer hämatogenen Metastasierung aufweisen¹¹⁻¹³. Karzinome vom intestinalen Typ metastasieren häufiger in die Leber als Karzinome vom diffusen Typ (Tabelle 1).

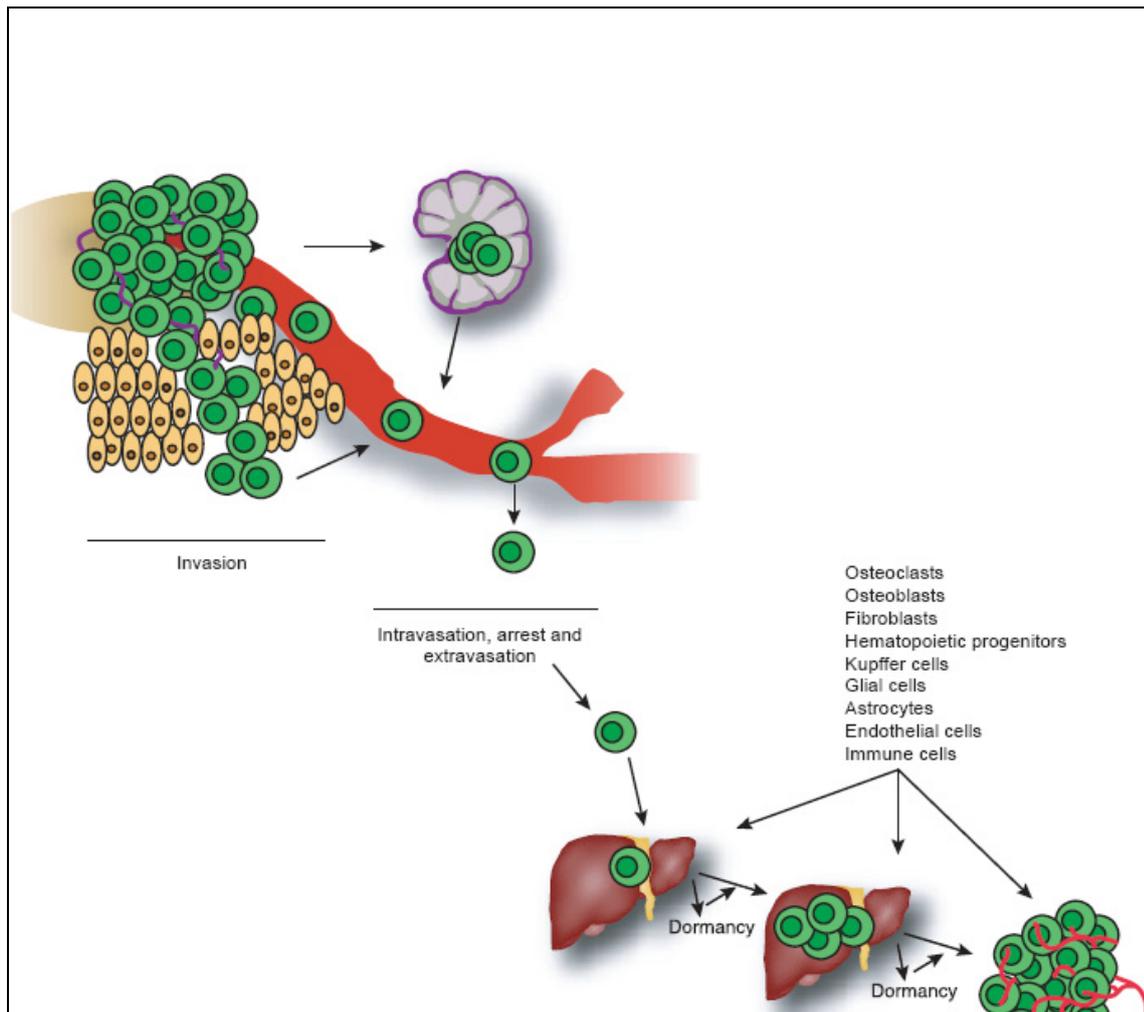


Abb. 1

Schematische Darstellung des hämatogenen Metastasierungsprozesses.

P. S. Steeg, Nature Medicine 2006: „Tumor metastasis: mechanistic insight and clinical challenges“.

Bei der **lymphogenen Metastasierung** verbreiten sich die Tumorzellen vom Primärtumor über Lymphbahnen zu den Lymphknoten (Abb. 2). Im Magen beginnen diese Lymphbahnen in der Submukosa und bilden ein weit verzweigtes Lymphgefäßnetz. Von diesem wird die Lymphe gesammelt und über efferente Lymphbahnen aktiv und passiv weitertransportiert¹⁴ (Abb. 3). Die Lymphbahnen orientieren sich dabei an den versorgenden Arterien und Venen. Die perigastrischen Lymphknoten und die Lymphknoten am Truncus coeliacus bzw. am Pankreasoberrand sind wichtige Sammelstationen¹⁵⁻¹⁸ (Abb. 4).

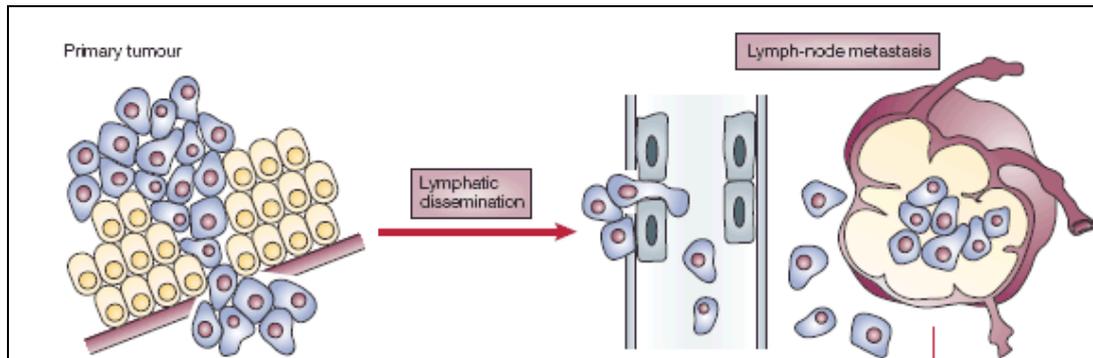


Abb. 2

Schematische Darstellung der lymphonodalen Metastasierung.

K. Pantel and R. H. Brakenhoff, Nature Reviews Cancer 2004: „Dissecting the metastatic cascade“.

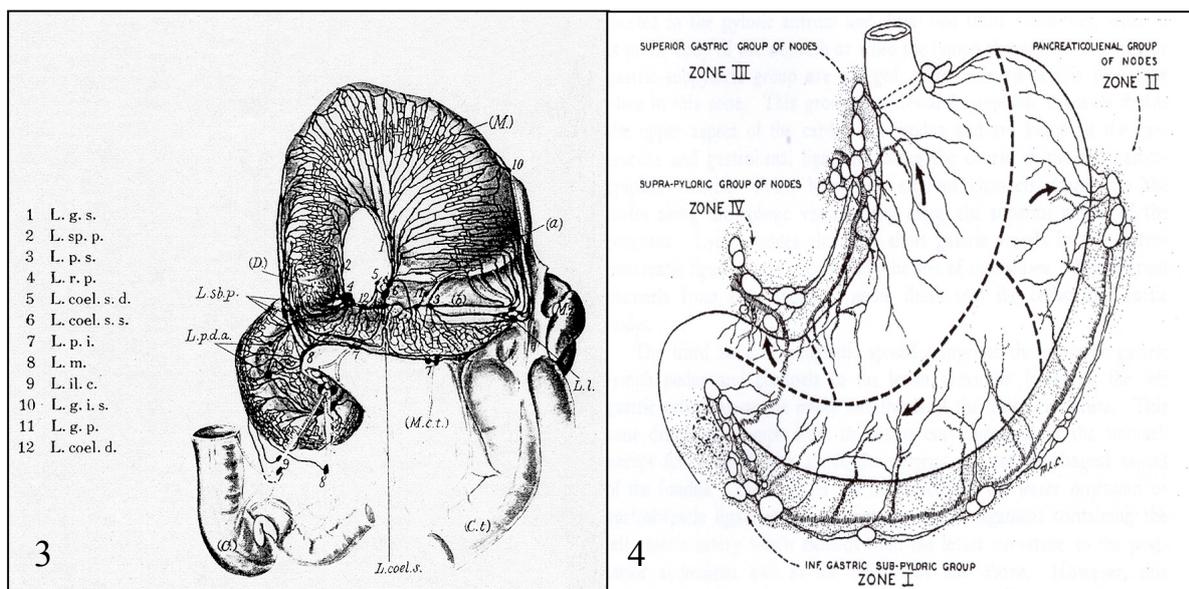


Abb. 3:

Darstellung des multidirektionalen lymphatischen Netzwerkes des Magens.

Dorsale Ansicht mit Verbindungen zum Duodenum und zum Pankreas. Y. Inoue et al., Acta Anatomica Nipponika 1936: „About the lymphatic system of the stomach and duodenum“.

Abb. 4:

Darstellung der vier verschiedenen zonalen lymphatischen Metastasierungsrichtungen mit den entsprechenden regionalen Lymphknotenmetastasen beim Magenkarzinom. F. A. Coller et al., Archives of Surgery 1941: „Regional lymphatic metastases of carcinoma of the stomach“.

Nach der Japanischen Klassifikation unterteilt man die Lymphknoten des Magens in 16 Stationen, welche wiederum drei verschiedenen Kompartimenten zugeordnet werden (D1: 1-6, D2: 7-12 und D3: 13-16; Abb. 5) ¹⁹. Ob es eine geordnete lymphonodale Metastasierung vom Primärtumor zu den perigastrischen (D1) und später zu den D2- und D3-Lymphknoten gibt, bleibt bisher unklar. Unbestritten ist jedoch, dass mit zunehmender Tiefeninfiltration eines Tumors auch die Häufigkeit der lymphogenen Metastasierung zunimmt. So zeigen über 70 % der Patienten mit einem T3-Tumor bereits Lymphknotenmetastasen. Der Lymphbahnbefall (L) und die Anzahl der befallenen Lymphknoten (pN) korreliert mit einer zunehmenden ungünstigen Prognose.

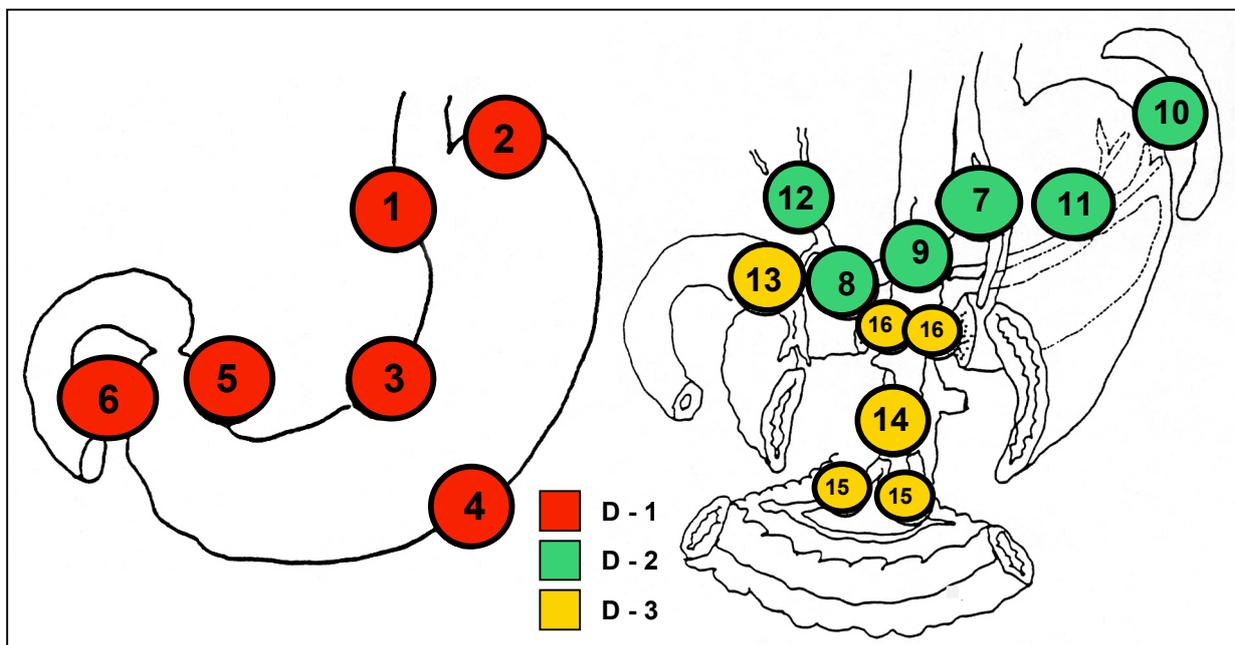


Abb. 5:

Darstellung der Lokalisation der 16 Lymphknotenstationen des Magens mit Zuordnung zu den drei verschiedenen Kompartimenten D1, D2 und D3 ¹⁹.

Eine **peritoneale Metastasierung** ist eine für das Magenkarzinom besondere und typische, von anderen Metastasierungswegen speziell zu unterscheidende Form. Ob die Tumorzell dissemination in das Peritoneum überwiegend hämatogen bzw. lymphogen oder durch einen zusätzlichen Mechanismus einer Serosapenetration des Tumors (intracavitäre Dissemination) erfolgt, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Unbestritten ist aber, dass Tumorzellen am Peritoneum spezielle biologische Veränderungen hervorrufen, welche zu

Alterationen der mesothelialen Oberfläche führen. Morphologisch kommt es speziell am Peritoneum zur Ausbildung von Stellen ohne Mesothelzellen (naked areas), welche als Implantationsstellen für Tumorzellen dienen. Kiyasu und Mitarbeiter konnten dieses Phänomen bereits 1981 durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachweisen (Abb. 6)^{20,21}.

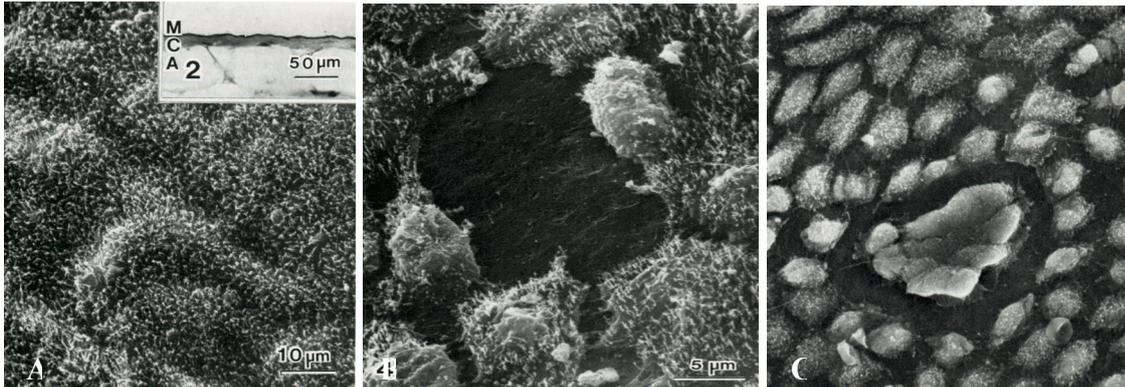


Abb. 6:

Veränderungen am Peritoneum von Magenkarzinompatienten, welche durch intraabdominale Karzinomzellen verursacht werden.

A: normales Peritoneum; die Oberfläche der eng miteinander verbundenen Mesothelzellen ist dicht mit Mikrovilli bedeckt, sodass die Mesothelzellen selbst kaum zu erkennen sind (x1250 Elektronenmikroskopie).

B: Peritoneum eines Magenkarzinompatienten mit Peritonealkarzinose. Die Mikrovilli sind in Zahl und Größe abnehmend, sodass die veränderten (hemisphärischen) Mesothelzellen erkennbar werden. Diese sind nur noch locker miteinander verbunden, teilweise liegt das submesotheliale Bindegewebe frei (naked area).

C: Tumorzelladhäsion auf einer „naked area“. Y. Kiyasu et al., Cancer Research (41), 1981: „Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer“.

Bereits zum Zeitpunkt der Primärdiagnose weisen ca. 20-30 % der Patienten einen peritonealen Befall auf, wobei mit fortschreitender Tumorerkrankung bei nahezu 80 % der Magenkarzinompatienten eine Peritonealkarzinose (PC) vorliegt. Der diffuse Typ nach Laurén tendiert stärker zur peritonealen Metastasierung als der intestinale Typ (Tab. 1). Da die PC-Herde initial klein sind, ist deren frühzeitige Diagnostik oftmals schwierig. Unklar ist auch, inwieweit der zytologische Nachweis isolierter Tumorzellen in der Abdominalhöhle mit einer PC tumorbiologisch und vor allem prognostisch gleichzusetzen ist²²⁻²⁴.

Tabelle 1

Literaturangaben zur Häufigkeit von Leber- und peritonealer Metastasierung im Autopsiegut in Abhängigkeit vom histologischen Phänotyp (Laurén-Klassifikation) des Magenkarzinoms.

Lebermetastasierung		Peritonealkarzinose		Autoren
Diffuser Typ	Intestinaler Typ	Diffuser Typ	Intestinaler Typ	
30 %	60 %	47 %	23 %	¹¹
27 %	70 %	80 %	33 %	¹²
20 %	78 %	81 %	38 %	¹³

1.2 MINIMAL RESIDUALE TUMORERKRANKUNG DES MAGENKARZINOMS

Mit dem Begriff „Minimal Residuale Tumorerkrankung“ (MRD) wird der Nachweis isolierter Tumorzellen (ITZ) in unterschiedlichen Lokalisationen wie dem Blut- und Lymphsystem, der Abdominalhöhle oder dem Knochenmark beschrieben. ITZ werden über spezifische Proteine wie z.B. Epitheliales-Membran-Antigen (EMA), Carcino-Embryonales-Antigen (CEA) und verschiedene Cytokeratine (CK) detektiert. Die Identifikation erfolgt mit immunhistochemischer Zellfärbung, RT-PCR oder einem Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Die Sensitivität und Spezifität des Nachweises ist stark methodenspezifisch. Der klonale Ursprung und der Proliferationszustand von ITZ variiert. ITZ sind heterogene Zellen was ihre Herkunft und ihren Aktivitätszustand betrifft. Obwohl ITZ teilweise im ruhenden Zustand sind (dormancy cells), können sie Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF-R) und andere Marker für proliferative Aktivität, wie z. B. Ki 67 und p120, exprimieren²⁵. Die prognostische Relevanz von ITZ wird derzeit insbesondere auch in Abhängigkeit der einzelnen Lokalisationen, in denen sie nachgewiesen werden, kontrovers beurteilt.

Einzelne Tumorzellen oder kleine Zellverbände, welche sich vom Primärtumor lösen und über Tumorgefäße abtransportiert werden, können als **ITZ im Blut** nachgewiesen werden. Bisher gibt es wenige hinreichend aussagekräftige Studien über die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen bei GI-Tumoren im Blut. Beim Magenkarzinom wurde lediglich in einer größeren prospektiven Studie mit 70 Patienten mittels einer CK20-spezifischen RT-PCR gezeigt, dass ITZ im Blut bei T1- und T2-Magenkarzinompatienten einen unabhängigen prognostischen Marker darstellen²⁶. Die bisherige kontroverse Datenlage bei GI-Tumoren – insbesondere hinsichtlich der prognostischen Bedeutung – beruht u. a. darauf, dass verschiedene Faktoren wie Zeitpunkt, Häufigkeit und Ort der Blutentnahme nicht genügend berücksichtigt und standardisiert wurden. Auch müssen Unterschiede in der prognostischen Aussagekraft bei Betrachtung unterschiedlicher klinischer Tumorstadien bzw. Tumordinfiltrationstiefe beachtet werden.

Im Vergleich zur Detektion von Tumorzellen im Blut ist der Nachweis von **ITZ im Knochenmark** auch über längere Zeiträume stabil möglich. Als mesenchymales Organ, das normalerweise keine epithelialen Zellen beherbergt, spricht der Nachweis von epithelialen Zellen bzw. epithelialen Markern für die Präsenz von ITZ. Der Nachweis von ITZ im Knochenmark gelingt bei Magenkarzinompatienten bereits im nicht-metastasierten Stadium, teilweise sogar bei mehr als der Hälfte aller Patienten²⁷⁻³³. Es besteht aber Heterogenität sowohl bei der Gewinnung als auch bei den Nachweismethoden und bei der Aufarbeitung

dieser Zellen. Diese methodischen Unterschiede limitieren nach wie vor die prognostische Einschätzung. Eine Definition von ITZ im Knochenmark allein aufgrund immunhistologischer oder molekularer Marker, ohne gleichzeitig die Morphologie der Zellen zu berücksichtigen, ist hochproblematisch^{34,35}. Zukünftige Studien sollten daher u. a. diesen Aspekt vermehrt mitberücksichtigen. Darüber hinaus ist für eine valide prognostische Aussage eine ausreichend lange Nachbeobachtung (Median mindestens 36 Monate) an einem größeren und klinisch sowie pathohistologisch gut klassifizierten Krankengut erforderlich.

Die bisher vorliegenden Studien zu **ITZ in Lymphknoten** von Magenkarzinompatienten führten ebenfalls zu widersprüchlichen Ergebnissen. Auch wird die Aussagekraft der meisten Studien durch ihre geringe Patientenzahl limitiert³⁶⁻³⁹. Hinzu kommen unterschiedliche Techniken der Lymphknotenaufarbeitung, insbesondere bei der Anzahl der Schnittstufen und der Wahl der Antikörper, die zu einer sehr hohen Variabilität des Tumorzellnachweises führen und einen validen Vergleich der Studien derzeit nicht möglich machen. So wurden Arbeiten publiziert, in welchen nur eine einzige Schnittstufe pro Lymphknoten untersucht wurde^{40,41}. Die verwendeten Antikörper bzw. die damit visualisierten Zielmoleküle sind zahlreich und erstrecken sich von CK8, AE1/AE3 und CAM5.2 über MNF116 bis hin zu Ber-Ep4⁴²⁻⁴⁵.

Als prognostisch relevant ist unter den gastrointestinalen Tumoren am besten der Nachweis von **ITZ in der Peritonealhöhle** beim Magenkarzinom abgesichert⁴⁶⁻⁵⁴. Jedoch nicht alle Patienten mit nachgewiesenen ITZ im Abdomen entwickelten eine manifeste Peritonealkarzinose; hierfür scheinen unterschiedliche Marker-Konstellationen der ITZ mitverantwortlich zu sein^{55,56}. Unter anderem deswegen ist die Frage, inwieweit Patienten mit peritonealen ITZ generell von einer neoadjuvanten oder adjuvanten (insbesondere intraperitonealen) Therapie profitieren, noch offen und sollte zukünftig, im Rahmen größerer klinischer Studien mit eindeutigen und homogenen Kriterien für die Identifizierung der intraperitonealen ITZ, geklärt werden.

1.3 EINFÜHRUNG NEUER KLINISCHER UND HISTOLOGISCHER METHODEN FÜR EINE OPTIMIERUNG DES STAGINGS BEIM MAGENKARZINOM

Beim Magenkarzinom wird von der präoperativen Metastasendiagnostik eine möglichst genaue Beurteilung der Tumorausdehnung, speziell in der Abdominalhöhle, erwartet. Konventionelle Imagingverfahren haben insbesondere bei kleineren metastatischen Läsionen eine diagnostische Lücke. Die *chirurgische Staginglaparoskopie* erlaubt eine umfassende Beurteilung der Peritonealhöhle. Durch Vergrößerungsoptik und vor allem durch HDTV-Technik ermöglicht die diagnostische Laparoskopie eine genaue Visualisierung auch kleinster Herde sowie deren unmittelbare bioptische Sicherung. Die Inspektion wird durch verschiedene präparatorische Schritte, u.a. durch Darstellung des retrogastralen Raumes, noch zusätzlich optimiert. Auch der zytologische Nachweis freier Tumorzellen ist durch Lavage des Abdomens bei der Laparoskopie möglich. Zusätzlich kann durch eine laparoskopische Ultraschalluntersuchung (LAPUS) die Beurteilung der intraabdominalen Organe (Leber, Pankreas, Magen) und Strukturen (Lymphknoten, Gefäße) gezielt ergänzt werden. Publikationen zur Wertigkeit der diagnostischen Laparoskopie konnten beim Magenkarzinom einen Zugewinn an Informationen von 7 % bis 21 % zeigen⁵⁷⁻⁵⁹. Dies hat vor allem für eine stadiengerechte multimodale Therapieplanung Konsequenzen. Beispiele hierfür sind die präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie und die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) in Kombination mit zytoreduktiver Chirurgie. Erste Ergebnisse einer solchen chirurgisch multimodalen Therapie sind ermutigend⁶⁰⁻⁶⁸, zeigen jedoch, dass eine sorgfältige Patientenselektion notwendig ist, welche ggf. mittels Staginglaparoskopie optimiert werden kann.

Das Konzept der *Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB)* basiert auf der Annahme, dass es einen oder einige wenige Lymphknoten gibt, in welche vom Primärtumor freigesetzte Zellen als erstes drainieren. Wegen der Wächterfunktion werden diese Lymphknoten als Sentinel (=Wächter) bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit, Makro- oder Mikrometastasen bzw. isolierte Tumorzellen aufzufinden, ist somit im Sentinel-Lymphknoten (SLN) am größten. Diese Annahme setzt einen gerichteten, nicht zufällig verteilten Abstrom von Tumorzellen aus dem Tumorgewebe voraus. Die derzeit etabliertesten Techniken der SLNB sind die Farbstoffmethode und die Radiokolloidmethode. Bei der *Farbstoffmethode* erfolgt unmittelbar intraoperativ eine peritumorale Farbstoffinjektion, welche entweder endoluminal

gastroskopisch oder subserös bei der Laparotomie erfolgt. Die dabei angefärbten Lymphbahnen bzw. Lymphknoten sind entweder sofort visuell zu erkennen oder müssen durch Inzision des Peritoneums bzw. des subperitonealen Fettgewebes sichtbar gemacht werden. Bei der *Radiokolloidmethode* erfolgt die peritumorale Injektion des Radiokolloids in der Regel gastroskopisch am Vortag der OP. Intraoperativ wird dann wiederum der Radiokolloid-speichernde SLN mit einer Hand- γ -Sonde detektiert und entnommen. Die identifizierten SLN werden einer intensivierten histopathologischen Untersuchung zugeführt. Nachdem die Praktikabilität der Methode für die klinische Routine etabliert werden konnte⁶⁹⁻⁷¹, ist nun deren klinische Relevanz zu prüfen.

Ein weiteres Ziel in der Optimierung des Stagings beim Magenkarzinom liegt im Nachweis von Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen (ITZ). Lokalisatorisch ist dabei vor allem das Knochenmark interessant, in welchem normalerweise keine epithelialen Zellen anzutreffen sind. Ihr Nachweis ist prinzipiell durch Auswertung eines ***Knochenmarkspirates***, welches während der Magenkarzinomoperation zusätzlich entnommen wird, möglich. Sowohl durch immunhistochemische Untersuchungen^{27-29,72} als auch durch RT-PCR wurde in verschiedenen Publikationen der Nachweis von ITZ im Knochenmark von Magenkarzinompatienten erbracht⁷³⁻⁷⁵. Allerdings ist neben der Spezifität der angewendeten Methoden vor allem die prognostische Wertigkeit nachgewiesener ITZ in Abhängigkeit der verwendeten Techniken nach wie vor unklar.

1.4 AKTUELLE ENTWICKLUNG EINER MOLEKULARBIOLOGISCHEN SUBKLASSIFIZIERUNG DES MAGENKARZINOMS

Maligne Transformation und Metastasierung laufen im Rahmen eines Mehrstufenprozesses ab. Moleküle bestimmen die Einzelschritte wie Wachstum, Tumorzellablösung, Angiogenese, Gefäßinvasion, intravasale Ausbreitung, Endotheladhäsion, Extravasation und erneutes Wachstum. Für jeden einzelnen Schritt sind verschiedene Moleküle verantwortlich, welche in gegenseitiger Beeinflussung wirken (Abb. 7).

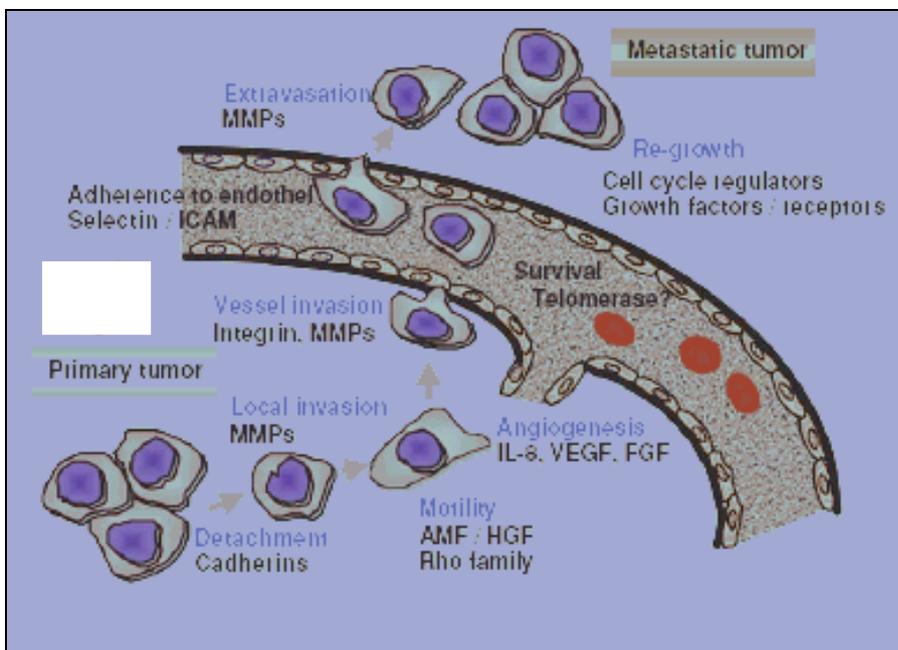


Abb. 7

Molekulare Mechanismen der Metastasierung beim Magenkarzinom. MMP, Matrix Metalloproteinasen; IL, Interleukine; VEGF, vascular endothelial growth factor; FGF, fibroblast growth factor; AMF, autocrine motility factor; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM, intercellular adhesion molecule. W. Yasui et al.: „Molecular-pathological prognosis factors of gastric cancer: a review“, *Gastric Cancer* (2005) 8: 86-94.

Die wichtigsten Gruppen von Molekülen sind Wachstumsfaktoren, Telomere, Zelladhäsionsmoleküle, matrixdegenerierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren (Tab. 2). Für die Tumorentstehung ist der Verlust des Gleichgewichts zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen maßgeblich. Onkogene können aktiviert, Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Telomere können reaktiviert werden, während Wachstumsfaktoren,

Zelladhäsionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren überexprimiert werden können und oft Alterationen zeigen.

Jeder Tumor weist ein spezielles Muster dieser Moleküle auf. Die Identifizierung solcher Moleküle ermöglicht eine molekulare Subklassifizierung von Tumoren, welche bei der Einschätzung des biologischen Verhaltens (malignes Potenzial, Wachstum, Metastasierung) eines Tumors helfen könnte. Ziel einer solchen Klassifizierung ist letztendlich eine individuelle, auf den Tumor abgestimmte und somit effektivere Therapie.

Tabelle 2

Moleküle bzw. Gene mit nachgewiesener Bedeutung für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung.

Kategorie	Kandidaten
Tumorsuppressorgene	p53, APC, DCC, CDH1, β -Catenin
Onkogene	<i>bcl-2</i> , <i>K-ras</i> , <i>c-met</i> , <i>K-sam</i> , <i>c-erbB2</i>
Wachstumsfaktoren	EGFR, EGF, TGF α , VEGF
Telomere	POT1
Zelladhäsionsmoleküle	E-cadherin, Dysadherin, CD44v6, Cd44v9
Matrixdegenerierende Enzyme	MMP-1, MMP-2, MT1-MMP, TIMP-1
Transkriptionsfaktoren	CDX1, CDX2, Ets1, NF- κ B, Sp-1

Das maligne Potenzial eines Tumors wird unter anderem durch die Tumorzelladhärenz bestimmt. Je geringer die Adhärenz der Zellen im Tumor ist, umso schneller kann die Freisetzung und damit die Dissemination dieser Zellen erfolgen. Die Tumorzelladhärenz wird unter anderem durch Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche beeinflusst. Die Bedeutung einer veränderten Glykosylierung der Tumorzellmembran für die Adhäsions- und Metastasierungseigenschaften ist jedoch bisher noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich besitzen alle Zellen ein für sie typisches Muster der Aktivität unterschiedlicher Glykosyltransferasen, das in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus genetisch reguliert wird. Von Interesse sind die Sialyltransferasen, eine Gruppe von Enzymen unterschiedlicher Spezifität, die den sauren Zucker Sialinsäure aus CMP-Sialinsäure auf verschiedene

Glykolipid- und Glykoproteinakzeptoren übertragen. Die spezifische Veränderung der Aktivität dieser Enzyme während der Transformation der Zellen führt über die selektive Hypersialylierung bestimmter Glykoproteine und Glykolipide der Zellmembran zur Entstehung von Tumorzellsubpopulationen mit unterschiedlichen Adhäsions- und Metastasierungseigenschaften⁷⁶⁻⁷⁹. Wie eine Reihe von immunhistochemischen Studien zeigt, korreliert auch im Fall des Magenkarzinoms die Sialylierung verschiedener Komponenten der Zellmembran mit der Metastasierung der Tumorzellen⁸⁰⁻⁸². Erste Untersuchungen der mRNA-Expression verschiedener Glykosyltransferasen beim Magenkarzinom deuten auf einen die Prognose bestimmenden Einfluss der Sialyltransferase ST6GAL-I hin^{83,84}.

Neben der Tumorzelladhärenz ist für die Entstehung und Progression solider Malignome und deren Metastasen die Neuausbildung von Blut- und Lymphgefäßen essenziell^{85,86}. Dieser als Neoangiogenese bezeichnete Vorgang unterliegt der Kontrolle von stimulierenden (pro-angiogenen) und inhibierenden (anti-angiogenen) Faktoren, wobei es im Verlauf der malignen Transformation zu einem Überwiegen des Einflusses pro-angiogener Faktoren kommt. Unter den bislang charakterisierten pro-angiogenen Faktoren nimmt das VEGF-System eine besondere Stellung ein^{85,87}. Dieses System umfasst mindestens fünf Liganden (VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), deren zelluläre Effekte durch Aktivierung von mindestens drei Tyrosinkinaserzeptoren (VEGFR-1, -2, -3), die eine unterschiedliche Gewebeverteilung aufweisen, vermittelt werden. Innerhalb des komplexen VEGF-Systems scheinen für die *lymphogene* Metastasierung solider Tumoren die Liganden VEGF-C und VEGF-D sowie deren Rezeptor VEGFR-3, der nahezu exklusiv von Endothelzellen des Lymphsystems exprimiert wird, von besonderer Bedeutung zu sein⁸⁷⁻⁸⁹. Im Gegensatz hierzu scheint die VEGF-A-abhängige Aktivierung der VEGF-Rezeptoren vom Typ 1 und Typ 2 neben ihrer zentralen Rolle für die Progression von Primärtumoren auch eine wichtige Rolle bei der *hämatogenen* Metastasierung zu spielen^{87,89}. Aktuelle klinische Studien weisen darauf hin, dass eine Aktivierung des VEGF-Systems gerade für die Entwicklung und Metastasierung von Adenokarzinomen des Magens bedeutsam sein könnten⁹⁰⁻⁹³.

2. FRAGESTELLUNG

In der Einleitung wurden die verschiedenen Möglichkeiten der Metastasierung und die Rolle der Minimal Residualen Tumorerkrankung für das Magenkarzinom dargestellt. Neue klinische, histologische und molekularbiologische Methoden wurden entwickelt und stehen für die Anwendung bereit. In wie weit diese einerseits zum besseren Verständnis der Tumorzellausbreitung und andererseits zur Optimierung der Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms beitragen, soll durch die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Kann durch die (chirurgische) Staginglaparoskopie eine Optimierung der Diagnostik und damit die Indikation für eine multimodale Therapie präzisiert werden?
2. Inwieweit wird durch die Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) das Lymphknotenstaging beim Magenkarzinom optimiert?
3. Unter welchen Voraussetzungen ist der Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark von prognostischer Relevanz?
4. Eignet sich die Expressionsanalyse von VEGF, seinen Rezeptoren sowie von Sialyltransferasen im Tumorgewebe zur Generierung einer zusätzlichen prädiktiv-prognostischen Aussage?

3. PUBLIKATIONEN ZUR ERÖRTERUNG DER FRAGESTELLUNG

3.1 SURGICAL STRATEGIES FOR GASTRIC CANCER WITH SYNCHRONOUS PERITONEAL CARCINOMATOSIS

GRETSCHEL S., SIEGEL R., ESTEVEZ-SCHWARZ L.,

HÜNERBEIN M., SCHNEIDER U., SCHLAG P.M.

***BR J SURG* 2006, 93(12): 1530-1535**

PMID: 17051604

HINTERGRUND: Das Magenkarzinom breitet sich häufig in der Perinealhöhle aus. Ob eine Laparoskopie für die Planung der Therapie nützlich ist, bleibt umstritten. Ziel diese Studie ist die Untersuchung des Nutzens der Laparoskopie und die Entwicklung eines therapeutischen Algorithmus.

PATIENTEN UND METHODE: Sechshundertsechzig konsekutive Patienten mit einem Magenkarzinom wurden in diese prospektive Beobachtungsstudie eingeschlossen. Die Sensitivität des abdominellen Ultraschalls, der Computertomographie (CT) und der Laparoskopie wurden bezüglich der Detektion einer Peritonealkarzinose verglichen. Die Läsionen wurden einer Biopsie unterzogen und nach den Empfehlungen der Japanischen Research Society for Gastric Cancer als P1, P2 oder P3 klassifiziert. Die Prognose wurde entsprechend dem Stadium der Peritonealen Karzinose und dem angewandten therapeutischen Verfahren bestimmt.

ERGEBNISSE: Bei Einhundertzehn (16.7%) von sechshundertsechzig Patienten lag eine synchrone Peritonealkarzinose vor. Die Sensitivität für die Detektion einer Peritonealkarzinose betrug 85% für die Laparoskopie, verglichen mit 19% für den Ultraschall und 28% für die CT. Patienten mit einer P3-Peritonealkarzinomatose entstanden, verglichen mit einer ausschließlichen Chemotherapie, kein Nutzen eines zusätzlichen chirurgischen Eingriffs. Die Überlebensrate jener mit einer P1-Karzinomatose verbesserte sich nach einer vollständiger Resektion, gefolgt von Chemotherapie.

ZUSAMMENFASSUNG: Die Laparoskopie verbessert die Detektion und Klassifizierung der Peritonealkarzinomatose und ermöglicht für Patienten mit Magenkarzinom eine individuellere und effektivere Therapie.

3.2 LYMPHATIC MAPPING UND SENTINEL-

LYMPHKNOTENDIAGNOSTIK BEIM MAGENKARZINOM

GRETSCHEL S., BEMBENEK A., ULMER C., HÜNERBEIN M.,

MARKWARDT J., SCHNEIDER U., SCHLAG P.M.

***CHIRURG* 2003, 74(2): 132 - 138**

PMID: 12599031

HINTERGRUND: Das „Lymphatic mapping“ und das Sentinel-Lymphknotenkonzept sind beim malignen Melanom und beim Magenkarzinom bereits etabliert. Die Anwendung bei anderen soliden Tumoren ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen und wird kontrovers beurteilt. Als Erfolg versprechender Ansatz bietet sich das selektive Lymphknotenstaging bei Patienten mit einem Magenkarzinom an. Die vorliegende Pilotstudie untersucht die Durchführbarkeit mittels Radiokolloidtechnik und die Genauigkeit bei der Bestimmung des Lymphknotenstatus.

PATIENTEN UND METHODE: Bei 15 Patienten mit einem Magenkarzinom (uT1-3) erfolgte 17(+/-3) h präoperativ eine submuköse endoskopische Unterspritzung mit 0,4 ml 60 MBq ^{m99}Tc-Nanocis[®] um den Tumor. Unmittelbar nach der Laparotomie wurde die Aktivität der 16 Lymphknotenstationen (JGCA) mit einer Hand-Gammasonde gemessen. Alle Patienten wurden einer Gastrektomie mit D2-Lymphadenektomie unterzogen. Nach der Resektion wurde der Operationssitus nach verbliebener Aktivität abgescannt. Alle Nuklid speichernden Lymphknoten mit einer 10fachen Aktivität gegenüber dem Grundrauschen wurden als Sentinel Lymphknoten (SLN) definiert und am Operationspräparat entfernt. Die SLN's wurden gesondert in Serienschnitten und mittels Immunhistochemie aufgearbeitet.

ERGEBNISSE: Bei 14 von 15 Patienten konnte ein SLN detektiert werden (93%). Die mediane Zahl der SLN's betrug 3 (1-5). Von 14 untersuchten Patienten waren 9 nodal positiv. In 8 von diesen 9 Fällen konnte mit dem SLN der positive Lymphknotenstatus vorausgesagt werden, wobei in 5 Fällen die Lymphknotenstation mit dem befallenen SLN die einzige befallene Station war. Damit lag die Sensitivität der Methode bei 89%. In einem Fall zeigte die immunhistochemische Untersuchung des SLN bei einem initial nodal negativen Patienten isolierte Tumorzellen im Randsinus („Upstaging“).

ZUSAMMENFASSUNG: Das „Lymphatic mapping“ und die Sentinel-Lymphknotendiagnostik sind beim Magenkarzinom durchführbar. Die ersten Ergebnisse deuten auf eine korrekte Bestimmung des Lymphknotenstatus mit dieser Methode hin. Durch die gezielte histologische Aufarbeitung der SLN's ist zusätzlich ein Upstaging möglich. Weitere zahlenmäßig größere Untersuchungen müssen sich anschließen, um den klinischen Wert der Methode weiter zu klären.

3.3 PREDICTION OF GASTRIC CANCER LYMPH NODE STATUS BY SENTINEL LYMPH NODE BIOPSY AND THE MARUYAMA COMPUTER MODEL

**GRETSCHEL S., BEMBENEK A., ULMER C., HÜNERBEIN M.,
MARKWARDT J., SCHNEIDER U., SCHLAG P.M.**

***EUR J SURG ONCOL* 2005, 31(4) 393-400**

PMID: 15837046

HINTERGRUND: Der Umfang der Lymphknotendisektion beim Magenkarzinom bleibt umstritten. Das Maruyama Computer-Modell und die Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) werden hinsichtlich ihres Nutzens zur Vorhersage des Lymphknotenstatus, die zu einer stadienadaptierte Chirurgie führt, verglichen.

PATIENTEN UND METHODE: Vierunddreißig Patienten mit einem Magenkarzinom im Stadium I-IV wurden beide Methoden unterzogen. Für die SLNB erhielten 15 Patienten eine endoskopische, peri-tumorale Injektion von ^{99m}Tc -Kolloid, bzw. wurden 19 Patentblau V[®] injiziert. Alle radioaktiven oder blauen Sentinel Lymphknoten (SLN's) wurden separat exzidiert und histopathologisch untersucht. Falls der SLN nach der Routinefärbung durch H&E negativ war, wurde er weiter aufgearbeitet und immunhistochemisch untersucht.

ERGEBNISSE: Bei 33 von 34 Patienten wurde mindestens ein SLN detektiert. Die Sensitivität zur Erkennung eines positiven Nodalstatus war 22/23 und die Spezifität und der positive prädiktive Wert betrug 10/10 und 22/22. Bei 5/15 initial als nodal negativ klassifizierten Patienten wurden zusätzliche Mikrometastasen oder isolierte Tumorzellen im Sinne eines „Upstaging“ detektiert. Unter Verwendung des Maruyama-Computer-Modells wurde eine Sensitivität von 22/23 und eine Spezifität von 2/10 sowie ein positiver prädiktiver Wert von 22/30 erzielt.

ZUSAMMENFASSUNG: Der klinische Wert des Maruyama Computer-Modells ist auf Grund einer niedrigen Spezifität und eines niedrigen positiven prädiktiven Wertes limitiert, weshalb diese Methode für eine individualisierte Chirurgie weniger geeignet ist.

3.4 EFFICACY OF DIFFERENT TECHNICAL PROCEDURES FOR SENTINEL LYMPH NODE BIOPSY IN GASTRIC CANCER STAGING

**GRETSCHEL S., BEMBENEK A., HÜNERBEIN M., DRESEL S.,
SCHNEIDER W., SCHLAG P.M.**

***ANN SURG ONCOL* 2007 JUL;14(7):2028-35**

PMID: 17453300

HINTERGRUND: Die klinische Bedeutung der Sentinel Lymphknotenbiopsie (SLNB) bei Magenkarzinomen ist umstritten. Wir führten eine prospektive Studie zum Vergleich der verschiedenen Methoden: der Radio-Kolloidmethode (RM), der Farbstoff-Methode (DM) und der simultanen Anwendung beider Methoden, der Dualmethode (DUM), durch. Zielgrößen waren die Zuverlässigkeit und die therapeutischen Konsequenzen.

PATIENTEN UND METHODE: Die RM und die DM wurden bei 35 Patienten mit Magenkarzinom angewandt. Nach endoskopischer peritumorale Injektion von ^{99m}Tc-Kolloid und Patentblau V[®] wurde die Position aller blauen oder radioaktiven SLN erfasst und die SLN mit H&E, Serienschnitten und Immunhistochemie untersucht.

ERGEBNISSE: RM, DM und DUM identifizierten die SLN bei 34 (97%) von 35 Patienten. Die Sensitivität bezüglich der Identifikation eines positiven Lymphknotenstatus für die RM betrug 22 (92%) von 24, 16 (66%) von 24 für die DM und für die DUM 22 (92%) von 24. Bei 7 von 17 (RM), 5 von 15 (DM) und 7 von 17 (DUM) durch H&E-Färbung als N0 klassifizierten Patienten wurden nach fokussierter Untersuchungen Mikrometastasen oder isolierte Tumorzellen in den SLN (Upstaging) entdeckt. Wäre nur eine limitierte Dissektion des Lymphknotenbassins durchgeführt worden, wären residuelle Lymphknoten-Metastasen bei 9 von 24 (RM), 7 von 34 (DM) und 5 von 24 (DUM) der Patienten mit positiven Lymphknoten verblieben.

ZUSAMMENFASSUNG: Die Verwendung der RM stellte sich am geeignetsten heraus. Die DUM konnte die Sensitivität nicht weiter erhöhen. Eine limitierte Lymphknotendissektion, d. h. Lymphbassin-Resektion, ist bei lymphonodal positiven Patienten mit einem hohen Risiko von verbleibenden Lymphknotenmetastasen verbunden. Patienten mit negativen SLN könnten, bei Erfüllung bestimmter Kriterien, ggf. für ein limitiertes chirurgisches Vorgehen selektiert werden.

3.5 PROGNOSTIC VALUE OF CYTOKERATINE POSITIVE BONE MARROW CELLS OF GASTRIC CANCER PATIENTS

GRETSCHEL S., SCHICK CH., SCHNEIDER U., ESTEVEZ-SCHWARZ L., BEMBENEK A., SCHLAG P.M.

***ANN SURG ONCOL* 2007, 14(2):373-380**

PMID: 17080240 [

HINTERGRUND: Epitheliale Zellen im Knochenmark von Magenkarzinompatienten deuten auf Tumorzell dissemination hin, wobei deren prognostischen Implikationen umstritten sind. Wir bewerteten prospektiv die prognostische Korrelation zwischen dem Knochenmarkstatus, der Rezidivrate und dem krankheitsfreiem Überleben in einer Langzeitstudie.

PATIENTEN UND METHODE: Bei 209 Patienten wurde vor der Operation bilateral vom Beckenkamm Knochenmark aspiriert und mit monoklonalem (CK)-18 Antikörper gefärbt. Die Patienten wurden median 56 Monate nachbeobachtet.

ERGEBNISSE: Insgesamt wiesen 39 (19%) von 209 Patienten und 15 (14%) von 109 R0-resezierten Patienten CK-positive Zellen auf. CK-positive Patienten hatten mehr lokale, regionale und systemische Rezidive als CK-negative Patienten ($p < .05$). Wir fanden ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben ($p < .05$) bei den Patienten mit >2 CK-positive Zellen je 2×10^6 Knochenmarkszellen (durchschnittlich 35 Monate), als bei Patienten mit ≤ 2 CK-positive Zellen je 2×10^6 Knochenmarkszellen (durchschnittlich 70 Monate) bzw. bei Patienten ohne CK-positive Zellen (durchschnittlich 86 Monate). Die multivariate Analyse bestätigte, dass >2 CK-positive Zellen je 2×10^6 Knochenmarkszellen ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Tumor bezogene Versterben ist ($p < .05$).

ZUSAMMENFASSUNG: Nicht allein das Vorhandensein von CK-positiven epithelialen Zellen im Knochenmark korreliert mit der Prognose, sondern auch die Anzahl der Zellen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Klassifizierung CK-positiver Knochenmarkszellen bei diesen Patienten zukünftige Studien erleichtern.

3.6 CLINICAL RELEVANCE OF SIALYLTRANSFERASES ST6GAL-I AND ST3GAL-III IN GASTRIC CANCER

GRETSCHEL S., HAENSCH W., SCHLAG P.M., KEMMNER W.

***ONCOLOGY* 2003, 65(2): 139-145**

PMID: 12931020

HINTERGRUND: Abnormale Glykosylierung von Membrankomponenten durch eine Veränderung der Glykosyltransferaseaktivität ist eine übliche Eigenschaft von Karzinomzellen und wird gewöhnlich mit Invasion und Metastasen assoziiert.

PATIENTEN UND METHODE: In einer prospektiven Studie wurde bei 55 Patienten mittels radiometrischer Untersuchung die Enzymaktivität der Sialyltransferasen ST6GAL-I und ST3GAL-III im Magenkarzinomgewebe und normaler Mukosa untersucht. Die zelluläre Lokalisation der Expression von Sialyltransferase ST6GAL-I mRNA wurde durch In-situ-Hybridisation untersucht.

ERGEBNISSE: ST6GAL-I mRNA Expression fand sich hauptsächlich in epithelialen Zellen. ST6GAL-I Enzymaktivität war im Tumorgewebe erhöht. Signifikante Korrelationen wurden zwischen dem Auftreten von Siegelringzellen und einer erhöhten ST6GAL-I Aktivität im Tumorgewebe ($p = 0.047$) oder in der Mukosa ($p = 0.024$), sowie zwischen Siegelringzellen und ST3GAL-III Aktivität in der Mukosa ($p=0.001$) festgestellt. Die multivariate Coxanalyse zeigte, dass nur Lymphknotenmetastasen ($P = 0.044$) einen signifikanten Einfluss auf das tumorbezogene Überleben hatten.

ZUSAMMENFASSUNG: ST3GAL-III und ST6GAL-I Aktivität zeigte keine unabhängige prognostische Relevanz in der multivariaten Analyse, jedoch eine enge Beziehung zwischen einem hohen Niveau an ST3GAL-III und ST6GAL-I im Tumorgewebe und einem erneuten sekundären lokalen Auftreten des Tumors ($p = 0.005$; $p = 0.012$). Bemerkenswerterweise war die nicht involvierte Mukosa von Tumorpatienten auf molekularer Ebene alteriert und zeigte in einigen Fällen einen erhöhten Sialyltransferaselevel, was auf eine sehr frühe Alteration der Glykosylierung bei der Tumorigenese hindeutet.

3.7 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-D AND ITS RECEPTOR VEGFR-3: TWO NOVEL INDEPENDENT PROGNOSTIC MARKERS IN GASTRIC ADENOCARCINOMA

JÜTTNER S., WISSMANN C., JOHNS T., VIETH M., HERTEL J., GRETSCHEL S., SCHLAG P. M., KEMMNER W., HÖCKER M.

***J CLIN ONCOL.* 2006, 10;24(2): 228-40**

PMID: 16344322

HINTERGRUND: Der vasculäre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)-D und dessen homolog VEGF-C beeinflussen durch die Aktivierung des VEGF-Rezeptors-3 (VEGFR-3) die Lymphangiogenese und sind in die lymphonodale Metastasierung einbezogen. Die lymphonodale Dissemination bestimmt maßgeblich den klinischen Verlauf und die therapeutischen Optionen der betroffenen Patienten. Daher analysierten wir beim Adenokarzinom des Magens die Expression und die prognostische Bedeutung von VEGF-D gemeinsam mit VEGF-C und VEGFR-3.

PATIENTEN UND METHODE: VEGF-D, VEGF-C und VEGFR-3 wurden bei 91 R0-resezierten primären Adenokarzinomen des Magens, bei nicht karzinomatöser Magenmukosa und bei Lymphknotenmetastasen unter Anwendung von Immunhistochemie und/oder In-situ-Hybridisierung analysiert. Blut- und Lymphgefäßdichte wurde nach Färbung mit CD31 und LYVE-1-spezifischen Antikörper bewertet.

ERGEBNISSE: VEGF-D und VEGF-C wurden bei 67.0% bzw. 50.5% der Magenkarzinome entdeckt. Gesunde Magenmukosa war negativ für VEGF-C und zu 12.5% positiv für VEGF-D. Das Vorhandensein von VEGF-D ($p = 0.005$) oder VEGF-C ($p = 0.006$) korrelierte mit lymphatischen Metastasen und verringerte das Überleben (VEGF-D, $p < .05$; VEGF-C, $p < .05$). VEGFR-3 korrelierte mit einem reduzierten tumorspezifischen Überleben ($p < .05$). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse bestätigte VEGF-D und VEGFR-3, jedoch nicht VEGF-C, als unabhängigen Prognoseparameter. Bei lymphonodal positiven Magenkarzinomen, war das Vorhandensein von VEGF-D und VEGFR-3 mit einem schlechteren Überleben verbunden, wohingegen die Abwesenheit von VEGF-D und VEGFR-3 eine Untergruppe von Patienten mit deutlich besserer Prognose definierte.

ZUSAMMENFASSUNG: VEGF-D und VEGFR-3 sind neue unabhängige prognostische Markermoleküle, welche die Identifikation von Patienten mit einer schlechten Prognose nach kurativer Resektion eines Magenkarzinoms ermöglichen. Die kombinierte Analyse des VEGF-D/VEGF-C/VEGFR-3-Systems kann bei der Identifikation von Patienten mit ungünstigen klinischen Verlauf behilflich sein und

kann dadurch vielleicht helfen, die therapeutische Entscheidung beim Magenkarzinom zu verbessern.

3.8 MARKERS OF TUMOUR ANGIOGENESIS AND TUMOR CELLS IN BONE MARROW IN GASTRIC CANCER PATIENTS

GRETSCHEL S., ASTROSINI CH., VIETH M., JÖNS TH., TOMOV T., HÖCKER M., SCHLAG P. M., KEMMNER W.

EUR J SURG ONCOL 2007, NOV. 17 (IN PRESS)

PMID: 18023552

HINTERGRUND: Die vaskulären endothelialen Faktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D werden als potentiell angiogen und lymphangiogen erachtet. Die „Minimale residuale Erkrankung“ ist für Tumorprogress und Rezidiv verantwortlich. In dieser Studie untersuchten wir die Beziehung zwischen der Expression von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D im Magenkarzinomgewebe und dem Vorkommen von Tumorzellen im Knochenmark

PATIENTEN UND METHODE: Insgesamt wurden 50 resezierte primäre Adenokarzinome des Magens, 44 nicht kanzeröse Magen-Mukosaprobe und 36 Lymphknotenmetastasen mittels Immunhistochemie auf die Expression von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D untersucht. Die verwendeten Proben wurden aus einer früheren Studienkohorte entnommen in welcher das Vorhandensein von ITC immunhistochemisch mit Zytokeratin-AK (CK-18) untersucht wurde.

ERGEBNISSE: Die Expression von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D war im Tumorgewebe am höchsten ($p < 0.001$) und das Niveau in Lymphknotenmetastasen war signifikant höher als in der normalen Mukosa ($p < 0.01$). Die Expression von VEGF-A korrelierte signifikant mit einer venösen Tumorinfiltration ($p < 0.05$) und dem Vorhandensein von Tumorzellen im Knochenmark ($p < 0.05$). Tumoren mit hoher Expression von VEGF-D, zeigten eine signifikant höhere Tumorinfiltration ($p < 0.05$) und vermehrt Lymphknotenmetastasen ($p < 0.01$).

ZUSAMMENFASSUNG: VEGF-A ist ein signifikanter Marker für die Präsenz von Tumorzellen im Knochenmark von Magenkarzinom-Patienten. Unsere Ergebnisse bestätigen VEGF-D als einen Prädiktor für die lymphatische Tumorzell dissemination. Daher könnte die Route der Metastasierung durch das Profil der VEGF-Familie, welche im Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten exprimiert wird, ermittelt werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 DIE OPTIMIERUNG DER DIAGNOSTIK UND PRÄZISIERUNG DER INDIKATION FÜR EINE MULTIMODALE THERAPIE DURCH DIE STAGINGLAPAROSKOPIE BEIM MAGENKARZINOM

In den letzten 15 Jahren mehrten sich die Hinweise darauf, dass beim Magenkarzinom mit peritonealer Metastasierung eine Primärtumorresektion unter Mitnahme des befallenen Peritoneums (zytoreduktive Chirurgie) einen Gewinn an Lebenszeit und Lebensqualität bringen kann⁹⁴⁻⁹⁹. Parallel dazu konnte durch zunehmend wirksamere zytostatische Behandlungsprotokolle¹⁰⁰⁻¹⁰³, aber auch durch neue Behandlungskonzepte wie z. B. die intraperitoneale hypertherme Chemotherapie (HIPEC), die Überlebenszeit von Patienten mit peritoneal metastasiertem Magenkarzinom verbessert werden^{60,63,65,104}. Zur notwendigen Selektion geeigneter Patienten ist eine optimierte Diagnostik wichtig. Nachdem in verschiedenen Publikationen bei Magenkarzinompatienten über einen Informationsgewinn durch die Staginglaparoskopie (SL) gegenüber herkömmlicher bildgebender Diagnostik berichtet wurde^{59,105}, war es angebracht, die Bedeutung dieser Methode speziell bei der Diagnostik der Peritonealkarzinose (PC) und den sich daraus ergebenden Konsequenzen zu untersuchen. Im Abschnitt 2.1 evaluierten wir in einer prospektiven Beobachtungsstudie 660 Magenkarzinompatienten, von denen 110 eine histologisch gesicherte PC aufwiesen. War ein Nachweis der PC mittels Computertomographie (CT) oder abdominellem Ultraschall lediglich in 28 % bzw. 19 % möglich, erlaubte die SL in 85 % eine korrekte Diagnose. Im Rahmen der notwendigen Laparotomie konnten wir als Ursachen der 15 % falsch-negativen Befunde der SL, Adhäsionen nach Voroperationen, geringe Ausprägung und ungünstige Lokalisationen der PC (Bursa omentalis), ermitteln. Insgesamt war nicht nur eine bessere Detektion, sondern auch eine genaue Einschätzung des Ausmaßes einer PC (P1, P2, P3) mit der SL möglich. Dies hat unmittelbare therapeutische Konsequenzen, da sich gezeigt hat, dass nur Patienten mit einer geringen oder mäßig ausgeprägten PC (P1 und P2) von einer zytoreduktiven Chirurgie und HIPEC profitieren^{60,63,65,104}. Die SL könnte damit einerseits die Diagnostik optimieren, andererseits aber auch die Indikationsstellung für eine multimodale Therapie präzisieren.

4.2 OPTIMIERUNG DES LYMPHKNOTENSTAGINGS BEIM MAGENKARZINOM DURCH DIE SENTINEL-LYMPHKNOTENBIOPSIE

Im Rahmen der wachsenden Bedeutung der Sentinel-Lymphknotenbiopsie (SLNB) beim Mammakarzinom und beim Melanom wurde die SLNB beim Magenkarzinom erstmals 1999 von einer italienischen Arbeitsgruppe mit Farbstoff (Patentblau) durchgeführt¹⁰⁶. Untersuchungen mit der Radiokolloidmethode erfolgten ab dem gleichen Jahr unter Verwendung eines ca. 500 nm großen Radiokolloid-Tracers (^{m99}Tc-Sn-Kolloid) zunächst ausschließlich im asiatischen Raum¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Mit beiden Methoden konnte die prinzipielle Durchführbarkeit beim Magenkarzinom gezeigt werden. Die Sensitivität bezüglich der Vorhersagegenauigkeit einer lymphatischen Metastasierung schwankte zwischen 71 % und 100 %^{110,111}. Ob sich ähnlich gute Ergebnisse der Radiokolloidmethode auch im europäischen Raum mit einem hier üblichen kleineren Tracer von 100 nm Teilchengröße (^{m99}Tc-Nanocis[®]) erreichen lassen würden, war unklar. Im Abschnitt 2.2 werden unsere durchgeführten Untersuchungen zur Validität der Radiokolloidmethode beschrieben. Neben einer Detektionsrate von 93 % und einer Sensitivität hinsichtlich des Nodalstatus von 89 % zeigte sich, dass die Methode insbesondere bei pT1- und pT2-Tumoren mit ausreichender Genauigkeit anwendbar ist. Diese Studie stellt den Einstieg unserer Arbeitsgruppe in die Problematik der SLNB beim Magenkarzinom dar und bildet den Anfang einer Reihe weiterer Arbeiten auf diesem Gebiet.

1992 wurde ein von K. Maruyama in Japan entwickeltes Computermodell zur Vorhersage des Lymphknotenstatus vorgestellt^{112,113}. Es basiert auf histopathologischen Daten von Magenkarzinompatienten. Mithilfe eines computergestützten Rechnerprogramms wird dabei die prozentuale Wahrscheinlichkeit des Befalls der 16 Lymphknotenstationen kalkuliert. Die Frage nach der klinischen Wertigkeit dieses Programms im Vergleich zur SLNB war unbeantwortet. Ein direkter Vergleich beider Methoden sollte diesbezüglich Klärung bringen und wurde im Abschnitt 2.3 beschrieben. Wir konnten zeigen, dass beide Verfahren eine hohe Sensitivität bei der Vorhersage eines positiven Nodalstatus aufweisen, das Maruyama-Programm jedoch durch eine niedrigere Spezifität und damit auch eine höhere Rate falsch-positiv eingestufte Lymphknotenstationen gekennzeichnet ist. Bei der SLNB gibt es hingegen keine falsch-positiven Werte, da die Möglichkeit einer selektiven Lymphknotenentnahme mit konsekutiver histopathologischer Aufarbeitung besteht. Damit kann der SLNB eine größere klinische Relevanz eingeräumt werden, was zu einer weiteren

Legitimation der Methode beim Magenkarzinom beiträgt.

Nachdem die prinzipielle Durchführbarkeit der Radionuklid- und Farbstoffmethode beim Magenkarzinom mehrfach gezeigt worden war, stand zunehmend die Optimierung der zuverlässigen Vorhersage des Lymphknotenstatus im Vordergrund. Dies insbesondere vor dem Hintergrund, dass die hohen Sensitivitäten, welche bei ersten Arbeiten mit Mono-Tracer (Farbstoff oder Radiokolloid) erreicht wurden^{70,106,109}, später teilweise nicht mehr reproduziert werden konnten^{110,114,115}. Eine Lösung des Problems deutet sich möglicherweise durch die gleichzeitige Anwendung beider Methoden (Dualmethode) an^{110,116,117}. Im Abschnitt 2.4 beschreiben wir den ersten diesbezüglichen Vergleich mit simultaner Anwendung beider SLN-Methoden in Europa. Im Ergebnis konnten die Nachteile sowohl der Farbstoffmethode (kurzes Zeitfenster, BMI-Abhängigkeit) als auch der Radionuklidmethode (Überstrahlungsphänomen bei engen Lagebeziehungen der SLN und des Tumors) demonstriert werden, welche durch gleichzeitiges Anwenden beider Methoden komplementär ausgeglichen werden können. Dies scheint insbesondere bei der zunehmend auch laparoskopisch durchgeführten SLNB von Bedeutung zu sein, da durch die vorgegebenen Einschränkungen in Bewegung und Sicht die Anwendung von Mono-Tracermethoden noch problematischer ist¹¹⁷.

Durch intensivierete histopathologische Aufarbeitung der gewonnenen SLN wurde, im Vergleich zu anderen diesbezüglich publizierten Arbeiten, ein relativ hoher Anteil an Mikrometastasen und ITZ diagnostiziert und so eine „Upstaging-Rate“ von 39 % erreicht. Inwiefern dies prognostische oder therapeutische Relevanz hat, ist bisher nicht abschließend geklärt und ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Im Rahmen weiterer Studien zur SLNB wurden 2003 von der Arbeitsgruppe um Miwa (Kanazawa-Universität, Japan) erstmalig fünf lymphatische Hauptabflussrichtungen mit den dazugehörigen Lymphknotenbassins am Magen beschrieben¹¹⁸. Wurde ein SLN im Lymphknotenbassin detektiert, erfolgte die Entfernung des jeweiligen Bassins. Ziel ist neben einer weiteren Erhöhung der Sensitivität insbesondere auch die Verbesserung der Praktikabilität durch Verkürzung des Zeitaufwandes und Verringerung des Komplikationsrisikos. Im Abschnitt 2.4 wurden alle Daten hinsichtlich einer bassinorientierten Lymphadenektomie ausgewertet. Wir konnten zeigen, dass schon bei Befall eines einzigen SLN im Bassin auch außerhalb des Bassins weitere Lymphknotenmetastasen vorhanden sein können. Damit sollte bei diesen Patienten eine D2-Lymphadenektomie ausgeführt werden. Ob sich bei negativen SLN im Bassin eine Lymphadenektomie nur auf das entnommene Bassin beschränken kann, wird derzeit in Studien geklärt.

4.3 DIE PROGNOSTISCHE RELEVANZ ISOLIERTER TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK VON PATIENTEN MIT MAGENKARZINOM

Nachdem beim Mammakarzinom die Prognostische Bedeutung von isolierten Tumorzellen (ITZ) im Knochenmark zweifelsfrei gezeigt werden konnte^{119,120}, wurde dieses Phänomen in den letzten 15 Jahren auch beim Magenkarzinom intensiv untersucht. Hier zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Als Gründe dafür sind insbesondere Unterschiede bei der Gewinnung und Aufarbeitung von ITZ, eine unzureichende Berücksichtigung der Morphologie dieser Zellen, aber insbesondere auch zu kleine Patientenzahlen und zu kurze Nachbeobachtungszeiten zu nennen. Diese Limitationen versuchten wir in unseren Untersuchungen soweit wie möglich zu eliminieren oder zu reduzieren. (Abschnitt 2.5). Wir konnten in 19 % der Patienten ITZ im Knochenmark detektieren. Viele Arbeiten mit höheren Detektionsraten konnten keine prognostische Relevanz multivariat nachweisen^{31,33,121}. Dies könnte die These von Braun et al. unterstützen, dass nicht alle angefärbten Zellen ITZ sind bzw. nicht alle ITZ die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen. Bezogen auf alle von uns untersuchten Patienten zeigte sich eine signifikante Prognoseverschlechterung für Patienten mit ITZ im Knochenmark. R0-resezierte Patienten wiesen ab einer Zahl von mehr als zwei CK-positiven Zellen pro 2×10^6 normalen KM-Zellen ein signifikant schlechteres Überleben auf. Damit ist ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit, dass nicht allein die Präsenz, sondern insbesondere die Anzahl von ITZ eine prognostische Bedeutung hat. In unseren Untersuchungen traten bei R0-resezierten Patienten mit positivem Knochenmark häufiger und früher systemische Metastasen auf. Der Ort der Metastasierung war jedoch variabel. Dies unterstützt die Ergebnisse anderer Arbeiten, dass die ITZ bezüglich des phenotypischen Profils und damit der Art der exprimierten tumorspezifischen Proteine heterogen sein können¹²². Basierend auf unserem derzeitigen Kenntnisstand kann die Präsenz von Tumorzellen im Knochenmark von Magenkarzinompatienten zunächst als Surrogatmarker für die Tumoraggressivität gelten. Zukünftig wird eine genauere molekulare und genetische Klassifizierung dieser Zellen notwendig werden, um ggf. nicht nur die Wahrscheinlichkeit, sondern auch die Lokalisation einer möglichen Metastasierung zu erkennen.

4.4 DIE PRÄDIKTIVE PROGNOTISCHE WERTIGKEIT VON SIALYLTRANSFERASEN SOWIE VEGF-FAKTOREN UND DEREN REZEPTOREN BEIM MAGENKARZINOM

Für verschiedene Tumorentitäten, vor allem aber für das Kolonkarzinom, konnte bei Analyse von Zuckerstrukturen der Tumorzellmembran gezeigt werden, dass eine veränderte Glykosylierung durch Fukosyl-, Galactosyl- oder Sialyltransferasen mit Rezidivbildung und Metastasierung assoziiert ist ¹²³⁻¹²⁶. Untersuchungen von Magenkarzinomgewebe ergaben gleichfalls teilweise eine erhöhte Expression von sialylierten Antigenen auf der Tumorzellmembran ^{127,128}. Dies konnte, wie auch eigene Untersuchungen zeigten, mit den vermehrt nachgewiesenen Sialyltransferasen ST6GAL-I und ST3GAL-III in Zusammenhang gebracht werden ⁸³. Auch konnte die Bedeutung von CDw75, ein durch ST6GAL-I sialyliertes Kohlehydrat, als histopathologischer Marker für lokale und metastatische Aggressivität des Magenkarzinoms gezeigt werden ^{129,130}. Eine Untersuchung von ST6GAL-I und ST3GAL-III mit In-situ-Hybridisierung und Radioimmunoassay sollte hier weitere Klärung bringen. Wir konnten, anders als in den bisherigen Arbeiten, die Sialyltransferasen ST6GAL-I und ST3GAL-III nicht nur im Tumor, sondern bereits auch in der Mukosa des Karzinom befallenen Magens nachweisen (Abschnitt 2.6). Dies könnte für eine relativ frühe, in jedem Falle aber flächenhafte Alteration der Glykosylierung der Magenmukosa beim Magenkarzinom sprechen. Wir fanden weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten lokaler Rezidive kurativ operierter Magenkarzinompatienten und einer hohen Enzymaktivität von ST3GAL-III und ST6GAL-I im Tumorgewebe. Veränderte Glykosylierung durch ST6GAL-I und ST3GAL-III impliziert beim Magenkarzinom offenbar besonders lokales Tumorwachstum. Dies konnte in aktuellen Publikationen anderer Arbeitsgruppen zwischenzeitlich auch experimentell bestätigt werden, welche für ST6GAL-I-exprimierende Magenkarzinomzellen eine höhere Migration, Adhäsion und Infiltration der extrazellulären Matrix (ECM) sehen ^{131,132}.

Die Bedeutung des VEGF-Systems, insbesondere der Liganden VEGF-C und VEGF-D und deren Rezeptor VEGFR-3, für die lymphonodale Metastasierung wurde beim Endometrium-, Kolorektal-, Mamma- und Ovarialkarzinom bereits beschrieben ¹³³⁻¹³⁷. Beim Magenkarzinom ist der Zusammenhang zwischen VEGF-C, der lymphonodalen Metastasierung und einer schlechteren Prognose bekannt ¹³⁸⁻¹⁴². Weitgehend unklar in diesem Kontext ist bisher die Rolle von VEGF-D und VEGFR-3 gewesen. Wir untersuchten deshalb neben der Expression dieser Faktoren deren Korrelation zu unterschiedlichen histologischen

Subtypen des Magenkarzinoms und deren Beziehung zur Prognose. Dabei konnten wir VEGF-D und VEGFR-3 als unabhängige prognostische Biomarker beim Magenkarzinom identifizieren, wobei VEGF-D signifikant mit der lymphatischen Invasion und der lymphonodalen Metastasierung korrelierte (Abschnitt 2.7). Aktuelle Publikationen zeigen eine Interaktion von VEGFR-3 sowohl für VEGF-C als auch für VEGF-D und bestätigen ihre prognostische Relevanz¹⁴³⁻¹⁴⁵. Diese und unsere Ergebnisse demonstrieren die prinzipielle Bedeutung der Faktoren des VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 Systems für die lymphonodale Metastasierung^{146,147}. Weiterführende Studien sollen jetzt das Zusammenwirken der Liganden VEGF-C und VEGF-D mit dem Rezeptor VEGFR-3 detaillierter klären, zumal sich andeutet, dass die Lymphangiogenese im Tumorrinneren im Vergleich zur Oberfläche und Umgebung des Tumors nicht zwangsläufig dem selben Mechanismus zugrunde liegt^{148,149}.

Da offenbar spezielle Faktoren des VEGF-Systems im Zusammenwirken mit ihren Rezeptoren für bestimmte Metastasierungsmechanismen verantwortlich sind¹⁵⁰, sollte weiterführend geklärt werden, welche der VEGF-Faktoren bei der Dissemination von Isolierten Tumorzellen (ITZ) in das Knochenmark eine Bedeutung haben. Die dazu verfügbaren Publikationen wiesen konträre Ergebnisse auf und untersuchten ausschließlich VEGF-A^{31,151}. Im Abschnitt 2.8 legten wir unsere Ergebnisse bezüglich der ITZ im Knochenmark und der Expression von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D im Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten vor. Wir konnten eine Korrelation zwischen VEGF-A mit der Invasion von Tumorzellen in venöse Blutleiter (V) und der Präsenz von ITZ im Knochenmark finden. Dagegen bestand kein korrelativer Zusammenhang zwischen VEGF-A und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, wohingegen ein solcher zwischen VEGF-D und einer lymphonodalen Metastasierung gezeigt werden konnte. Nachfolgende Publikationen über die Rolle von VEGF-Faktoren im Rahmen der Tumorzell-dissemination in das Knochenmark sind bisher nicht existent. Zur weiterführenden Abklärung der gezeigten Zusammenhänge wäre eine genauere Analyse des Expressionsmusters der ITZ, insbesondere hinsichtlich der Angiogenesefaktoren, denkbar.

5. WERTUNG UND AUSBLICK

Neben einer Optimierung der Diagnostik durch die chirurgische Staginglaparoskopie konnten wir gleichzeitig die Sinnhaftigkeit einer chirurgischen Resektion bei Patienten mit einer gering bis mäßig ausgeprägten Peritonealkarzinose (P1, P2) zeigen. Eine weitere Prognoseverbesserung war in dieser Patientengruppe durch eine additive Chemotherapie zu erreichen. Hierauf basierend ist es berechtigt, anzunehmen, dass diese Patienten von einem multimodalen chirurgischen Vorgehen wie z. B. einer HIPEC oder einer präoperativen Chemotherapie profitieren könnten. Die geeignete Patientenselektion zur Indikationsstellung für eine derartig intensive Therapie ist allerdings entscheidend. In welchem Ausmaß durch eine solche multimodale chirurgische Therapie eine Prognoseverbesserung bei vertretbarer Morbidität resultiert, soll in einer von uns konzipierten prospektiven, multizentrischen, randomisierten Phase-III-Studie zur zytoreduktiven Chirurgie mit HIPEC nach neoadjuvanter EOX-Chemotherapie bei Magenkarzinompatienten mit primärer peritonealer Metastasierung weiter nachgegangen werden ^{104,152-154}.

In unseren Arbeiten konnten wir die Verlässlichkeit der SLNB-Radionuklidmethode hinsichtlich der Vorhersagegenauigkeit zum Lymphknotenstatus aufzeigen. Im Vergleich mit dem Maruyama-Computermodell zur Prädiktion tumorbefallener Lymphknotengruppen ^{112,113} liegen die Vorteile der SLNB insbesondere bei der möglichen Entnahme der SLN und deren genauen histopathologischen Aufarbeitung. Beim SLNB-Methodenvergleich zeigte die Radionuklidmethode in 29 % der Fälle ein Überstrahlungsphänomen und die Farbstoffmethode wies bei hohem BMI Sensitivitätsverluste auf. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Methoden konnten insbesondere die Schwächen der Farbstoffmethode komplementär ausgeglichen werden. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde von uns eine prospektive, multizentrische Studie zur Sentinel-Lymphknoten-Biopsie beim Magenkarzinom initiiert, welche die beiden SLNB-Verfahren prospektiv standardisiert miteinander vergleicht. Neueste Studien aus Japan deuten darauf hin, dass die Dissektion des lymphatischen (LN)-Bassins, welches durch den SLN markiert wird ¹¹⁸, zu weiteren Verbesserungen der Ergebnisse führt. Ob durch die SLNB insbesondere bei Frühkarzinomen die Lymphadenektomie auf die Technik der LN-Bassin-Dissektion limitiert werden kann und darf, müssen die Ergebnisse laufender Studien zeigen. Sollte dies tatsächlich möglich sein,

hätte dies erheblichen Einfluss auf die Weiterentwicklung der minimal-invasiven Chirurgie (MIC) beim Magenkarzinom.

Unsere Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von ITZ im Knochenmark von Magenkarzinompatienten belegen, dass nicht nur die Präsenz, sondern vor allem die Anzahl der ITZ von prognostischer Relevanz sind. Bei R0-resezierten Patienten war ein signifikant schlechteres Überleben bei mehr als zwei CK-positiven Zellen pro 2×10^6 KM-Zellen zu verzeichnen. Prinzipiell zeigten Patienten mit ITZ im Knochenmark mehr und früher Rezidive und Metastasen. Knochenmetastasen waren dabei aber nicht dominant, sondern eher selten. Damit können ITZ im Knochenmark von Magenkarzinompatienten v. a. als ungünstiger prognostischer Surrogatmarker angesehen werden. Zukünftig gilt es diese Zellen einer genauen molekularen Charakterisierung zu unterziehen, um eine mögliche Stammzellzugehörigkeit und ihre Funktionalität (Plastizität, Dormancy, Seneszens) weiter abzuklären.

Als erste Ansätze, um Unterschiede im molekularen Repertoire von Magenkarzinomen näher zu analysieren, sind die durchgeführten Untersuchungen zur Expression von Sialyltransferasen und VEGF-Rezeptor-Subtypen anzusehen. Soweit sich in weiteren größeren Studien unsere Ergebnisse bestätigen, könnten Molekül- oder Gensignaturen Aufschlüsse über genotypische Metastasierungsmechanismen geben und möglicherweise auch eine prädiktiv-prognostische Aussage zulassen. Dies wiederum könnte zu einer weiteren Individualisierung chirurgisch multimodaler Therapie führen.

6. LITERATUR

1. Inada K, Shimokawa K, Ikeda T et al. The clinical significance of venous invasion in cancer of the stomach. *Jpn J Surg* 1990; 20:545-552.
2. David L, Nesland JM, Holm R et al. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 1994; 73:518-527.
3. Tanaka A, Watanabe T, Okuno K et al. Perineural invasion as a predictor of recurrence of gastric cancer. *Cancer* 1994; 73:550-555.
4. Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2002; 12:89-96.
5. Yilmaz M, Christofori G, Lehenbre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 2007; 13:535-541.
6. Barker N, van Es JH, Kuipers J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449:1003-1007.
7. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449:557-563.
8. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19:150-158.
9. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441:444-450.
10. Kang Y. New tricks against an old foe: molecular dissection of metastasis tissue tropism in breast cancer. *Breast Dis* 2006; 26:129-138.
11. Duarte I, Llanos O. Patterns of metastases in intestinal and diffuse types of carcinoma of the stomach. *Hum Pathol* 1981; 12:237-242.
12. Esaki Y, Hirayama R, Hirokawa K. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histologic type and age. *Cancer* 1990; 65:2086-2090.
13. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 1992; 33:606-612.
14. Inoue Y. About the lymphatic system of the stomach, duodenum, pancreas and diaphragm (Jap.). *Acta Anat Nipponica* 1936; 9:35-117..
15. Jamieson JK, Edin CM, Dobson JF et al. The lymphatic system of the stomach. *Lancet* 1907; 169:1061-1062.
16. Moynihan GA. The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexure and rectum. *Gynecol Obstet* 1908; 6:463-466.
17. Rouviér H: Anatomie des lymphatiques de l'homme. Paris: Masson; 1932. VIII, 489 S.
18. Coller FA, Kay EB, McIntyre R. Regional lymphatic metastases of carcinoma of the stomach. *Arch Surg* 1941;114(1):748-761.
19. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma. 2nd english edition. *Gastric Cancer* 1998; 1:10-24.

20. Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 1981; 41:1236-1239.
21. Mochizuki Y, Nakanishi H, Kodera Y et al. TNF-alpha promotes progression of peritoneal metastasis as demonstrated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21:39-47.
22. Gunderson LL, Sosin H. Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a re-operation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8:1-11.
23. Ajani JA, Mansfield PF, Lynch PM et al. Enhanced staging and all chemotherapy preoperatively in patients with potentially resectable gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2403-2411.
24. Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 2000; 88:358-363.
25. Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1162-1168.
26. Illert B, Fein M, Otto C et al. Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:843-849.
27. Schlimok G, Funke I, Pantel K et al. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 1991; 27:1461-1465.
28. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:1810-1817.
29. Funke I, Fries S, Rolle M et al. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* 1996; 65:755-761.
30. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU et al. Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor-associated proteases in gastric cancer. *Ann Surg* 1997; 226:736-744.
31. Kakeji Y., Maehara Y, Shibahara K. et al. Clinical significance of micrometastasis in bone marrow of patients with gastric cancer and its relation to angiogenesis. *Gastric Cancer* 1999; 2:46-51.
32. de Manzoni G, Pelosi G, Pavanel F et al. The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2002; 86:1047-1051.
33. Matsunami K, Nakamura T, Oguma H et al. Detection of bone marrow micrometastasis in gastric cancer patients by immunomagnetic separation. *Ann Surg Oncol* 2003; 10:171-175.
34. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3:165-173.
35. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:448-456.
36. Doekhie FS, Mesker WE, van Krieken JH et al. Clinical relevance of occult tumor cells in lymph nodes from gastric cancer patients. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1135-1144.
37. Heeren PA, Kelder W, Blondeel I et al. Prognostic value of nodal micrometastases in patients with cancer of the gastro-oesophageal junction. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31:270-276.
38. Horstmann O, Fuzesi L, Markus PM et al. Significance of isolated tumor cells in lymph nodes among gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:733-740.

39. Lee HS, Kim MA, Yang HK et al. Prognostic implication of isolated tumor cells and micrometastases in regional lymph nodes of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11:5920-5925.
40. Choi HJ, Kim YK, Kim YH et al. Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002; 9:13-19.
41. Fukagawa T, Sasako M, Mann GB et al. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 92:753-760.
42. Cai J, Keguchi M, Maeta M, Kaibara N, Sakatani T. Clinicopathological value of immunohistochemical detection of occult involvement in pT3N0 gastric cancer. *Gastric Cancer* March 1999; 2: 95-100.
43. Morgagni P, Saragoni L, Scarpi E et al. Lymph node micrometastases in early gastric cancer and their impact on prognosis. *World J Surg* 2003; 27:558-561.
44. Mueller JD, Stein HJ, Oyang T et al. Frequency and clinical impact of lymph node micrometastasis and tumor cell microinvolvement in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Cancer* 2000; 89:1874-1882.
45. Saragoni L, Gaudio M, Morgagni P et al. Identification of occult micrometastases in patients with early gastric cancer using anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *Oncol Rep* 2000; 7:535-539.
46. Bando E, Yonemura Y, Endou Y et al. Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis. *Oncol Rep* 1998; 5:1483-1488.
47. Bentrem D, Wilton A, Mazumdar M et al. The value of peritoneal cytology as a preoperative predictor in patients with gastric carcinoma undergoing a curative resection. *Ann Surg Oncol* 2005; 12:347-353.
48. de Manzoni G, Verlato G, Di Leo A et al. Peritoneal cytology does not increase the prognostic information provided by TNM in gastric cancer. *World J Surg* 2006; 30:579-584.
49. Ito S, Nakanishi H, Kodera Y et al. Prospective validation of quantitative CEA mRNA detection in peritoneal washes in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* 2005; 93:986-992.
50. Kodera Y, Nakanishi H, Ito S et al. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a sensitive predictor of outcome for patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* 2002; 235:499-506.
51. Nekarda H, Gess C, Stark M et al. Immunocytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79:611-619.
52. Oyama K, Terashima M, Takagane A et al. Prognostic significance of peritoneal minimal residual disease in gastric cancer detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Surg* 2004; 91:435-443.
53. Ribeiro U, Jr., Safatle-Ribeiro AV, Zilberstein B et al. Does the intraoperative peritoneal lavage cytology add prognostic information in patients with potentially curative gastric resection? *J Gastrointest Surg* 2006; 10:170-176.
54. Suzuki T, Ochiai T, Hayashi H et al. Peritoneal lavage cytology findings as prognostic factor for gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 1999; 17:103-107.
55. Katsuragi K, Yashiro M, Sawada T et al. Prognostic impact of PCR-based identification of isolated tumour cells in the peritoneal lavage fluid of gastric cancer patients who underwent a curative R0 resection. *Br J Cancer* 2007; 97:550-556.
56. Milsmann C, Fuzesi L, Heinmoller E et al. Morphological and immunohistochemical characterization of isolated tumor cells by p53 status in gastrointestinal tumors. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393(1):49-58.

57. Anderson DN, Campbell S, Park KG. Accuracy of laparoscopic ultrasonography in the staging of upper gastrointestinal malignancy. *Br J Surg* 1996; 83:1424-1428.
58. Feussner H, Omote K, Fink U et al. Pretherapeutic laparoscopic staging in advanced gastric carcinoma. *Endoscopy* 1999; 31:342-347.
59. Hünerbein M, Rau B, Hohenberger P et al. The role of staging laparoscopy for multimodal therapy of gastrointestinal cancer. *Surg Endosc* 1998; 12:921-925.
60. Glehen O, Schreiber V, Cotte E et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis arising from gastric cancer. *Arch Surg* 2004; 139:20-26.
61. Hall JJ, Loggie BW, Shen P et al. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2004; 8:454-463.
62. Hirose K, Katayama K, Iida A et al. Efficacy of continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prophylaxis and treatment of peritoneal metastasis of advanced gastric cancer: evaluation by multivariate regression analysis. *Oncology* 1999; 57:106-114.
63. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res* 1996; 82:359-374.
64. Shen P, Levine EA, Hall J et al. Factors predicting survival after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis. *Arch Surg* 2003; 138:26-33.
65. Yonemura Y, Fujimura T, Nishimura G et al. Effects of intraoperative chemohyperthermia in patients with gastric cancer with peritoneal dissemination. *Surgery* 1996; 119:437-444.
66. Yonemura Y, Bandou E, Kinoshita K et al. Effective therapy for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12:635-648.
67. Yonemura Y, Kawamura T, Bando E et al. [Treatment results of peritoneal dissemination from gastric cancer by neoadjuvant intraperitoneal-systemic chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31:1723-1726.
68. Yonemura Y, Bandou E, Sawa T et al. Neoadjuvant treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:661-665.
69. Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001; 129:335-340.
70. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al. The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. *Surg Clin North Am* 2000; 80:1799-1809.
71. Ichikura T, Morita D, Uchida T et al. Sentinel node concept in gastric carcinoma. *World J Surg* 2002; 26:318-322.
72. O'Sullivan GC, Sheehan D, Clarke A et al. Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology* 1999; 116:543-548.
73. Soeth E, Vogel I, Roder C et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57:3106-3110.
74. Oki E, Maehara Y, Tokunaga E et al. Detection of disseminated cancer cells in bone marrow of gastric cancer using real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer Lett* 2002; 188:191-198.

75. Fujita Y, Terashima M, Hoshino Y et al. Detection of cancer cells disseminated in bone marrow using real-time quantitative RT-PCR of CEA, CK19, and CK20 mRNA in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9:308-314.
76. Wang X, Vertino A, Eddy RL et al. Chromosome mapping and organization of the human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Differential and cell-type specific usage of upstream exon sequences in B-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem* 1993; 268:4355-4361.
77. Paulson JC, Weinstein J, Schauer A. Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* 1989; 264:10931-10934.
78. Kemmner W, Kruck D, Schlag P. Different sialyltransferase activities in human colorectal carcinoma cells from surgical specimens detected by specific glycoprotein and glycolipid acceptors. *Clin Exp Metastasis* 1994; 12:245-254.
79. Aasheim HC, as-Eng DA, Deggerdal A et al. Cell-specific expression of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase transcripts differing in the 5' untranslated region. *Eur J Biochem* 1993; 213(1):467-475.
80. Dohi T, Hashiguchi M, Yamamoto S et al. Fucosyltransferase-producing sialyl Le(a) and sialyl Le(x) carbohydrate antigen in benign and malignant gastrointestinal mucosa. *Cancer* 1994; 73:1552-1561.
81. Ikeda Y, Mori M, Kamakura T et al. Immunohistochemical expression of sialyl Tn and sialyl Lewis(a) antigens in stromal tissue correlates with peritoneal dissemination in stage IV human gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21:168-175.
82. Kakeji Y, Maehara Y, Morita M et al. Correlation between sialyl Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 71:191-195.
83. Petretti T, Schulze B, Schlag PM et al. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428:209-218.
84. Petretti T, Kemmner W, Schulze B et al. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut* 2000; 46:359-366.
85. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364.
86. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 1996; 2:167-168.
87. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22.
88. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999; 5:1359-1364.
89. Plate K. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med* 2001; 7:151-152.
90. Kamiya K, Konno H, Tanaka T et al. Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:794-800.
91. Maeda K, Kang SM, Onoda N et al. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86:566-571.
92. Saito H, Tsujitani S, Kondo A et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery* 1999; 125:195-201.
93. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1679-1684.

94. Bonenkamp JJ, Sasako M, Hermans J et al. Tumor load and surgical palliation in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48:1219-1221.
95. Habu H, Saito N, Sato Y et al. Results of surgery in patients with gastric cancer extending to the adjacent organs. *Hepatogastroenterology* 1990; 37:417-420.
96. Hartgrink HH, Putter H, Klein KE et al. Value of palliative resection in gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89:1438-1443.
97. Kikuchi S, Arai Y, Morise M et al. Gastric cancer with metastases to the distant peritoneum: a 20-year surgical experience. *Hepatogastroenterology* 1998; 45:1183-1188.
98. Kodama I, Takamiya H, Mizutani K et al. Gastrectomy with combined resection of other organs for carcinoma of the stomach with invasion to adjacent organs: clinical efficacy in a retrospective study. *J Am Coll Surg* 1997; 184:16-22.
99. Ouchi K, Sugawara T, Ono H et al. Therapeutic significance of palliative operations for gastric cancer for survival and quality of life. *J Surg Oncol* 1998; 69:41-44.
100. Cunningham D, Rao S, Starling N. Randomized multicenter Phase III study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric (OG) cancer: The REAL 2 trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. J Clin. Oncol.* 24, 2006.
101. Lordick F, Lorenzen S, Stollfuss J et al. Phase II study of weekly oxaliplatin plus infusional fluorouracil and folinic acid (FUFOX regimen) as first-line treatment in metastatic gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:190-194.
102. Park SR, Chun JH, Yu MS et al. Phase II study of docetaxel and irinotecan combination chemotherapy in metastatic gastric carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94:1402-1406.
103. Thuss-Patience PC, Kretschmar A, Repp M et al. Docetaxel and continuous-infusion fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil for advanced gastric adenocarcinoma: a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23:494-501.
104. Yonemura Y, de A, X, Fujimura T et al. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomized controlled study. *Hepatogastroenterology* 2001; 48:1776-1782.
105. Hünnerbein M, Rau B, Schlag PM. Laparoscopy and laparoscopic ultrasound for staging of upper gastrointestinal tumours. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21:50-55.
106. Palaia R, Cremona F, Delrio P et al. Sentinel node biopsy in gastric cancer. *J Chemother* 1999; 11:230-231.
107. Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T et al. Can sentinel node biopsy indicate rational extent of lymphadenectomy in gastric cancer surgery? Fundamental and new information on lymph-node dissection. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384:149-157.
108. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al. [The validity of the sentinel node concept in gastrointestinal cancers]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2000; 101:315-319.
109. Yasuda S, Shimada H, Ogoshi K et al. Preliminary study for sentinel lymph node identification with Tc-99m tin colloid in patients with esophageal or gastric cancer. *Tokai J Exp Clin Med* 2001; 26:15-18.
110. Hayashi H, Ochiai T, Mori M et al. Sentinel lymph node mapping for gastric cancer using a dual procedure with dye- and gamma probe-guided techniques. *J Am Coll Surg* 2003; 196:68-74.
111. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M et al. Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89:604-608.

112. Bollschweiler E, Boettcher K, Hoelscher AH et al. Preoperative assessment of lymph node metastases in patients with gastric cancer: evaluation of the Maruyama computer program. *Br J Surg* 1992; 79:156-160.
113. Guadagni S, de-Manzoni G, Catarci M et al. Evaluation of the Maruyama computer program accuracy for preoperative estimation of lymph node metastases from gastric cancer. *World J Surg* 2000; 24:1550-1558.
114. Karube T, Ochiai T, Shimada H et al. Detection of sentinel lymph nodes in gastric cancers based on immunohistochemical analysis of micrometastases. *J Surg Oncol* 2004; 87:32-38.
115. Ryu KW, Lee JH, Kim HS et al. Prediction of lymph nodes metastasis by sentinel node biopsy in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:895-899.
116. Aikou T, Higashi H, Natsugoe S et al. Can sentinel node navigation surgery reduce the extent of lymph node dissection in gastric cancer? *Ann Surg Oncol* 2001; 8:90-93.
117. Tonouchi H, Mohri Y, Tanaka K et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy during laparoscopic gastrectomy for early cancer. *Dig Surg* 2003; 20:421-427.
118. Miwa K, Kinami S, Taniguchi K et al. Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. *Br J Surg* 2003; 90:178-182.
119. Braun S, Pantel K, Muller P et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:525-533.
120. Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:793-802.
121. de Manzoni G, Pelosi G, Pavanel F et al. The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2002; 86:1047-1051.
122. Pantel K, Muller V, Auer M et al. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6326-6334.
123. Dall'Olio F, Malagolini N, di-Stefano G et al. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer* 1989; 44:434-439.
124. Gessner P, Riedl S, Quentmaier A et al. Enhanced activity of CMP-neuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett* 1993; 75:143-149.
125. Seelentag WK, Li WP, Schmitz SF et al. Prognostic value of beta1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58:5559-5564.
126. Vierbuchen MJ, Fruechtnicht W, Brackrock S et al. Quantitative lectin-histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of alpha(2,3)- and alpha(2,6)-linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features. *Cancer* 1995; 76:727-735.
127. Miles DW, Linehan J, Smith P et al. Expression of sialyl-Tn in gastric cancer: correlation with known prognostic factors. *Br J Cancer* 1995; 71:1074-1076.
128. Nakamori S, Furukawa H, Hiratsuka M et al. Expression of carbohydrate antigen sialyl Le(a): a new functional prognostic factor in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15:816-825.
129. David L, Nesland JM, Funderud S et al. CDw75 antigen expression in human gastric carcinoma and adjacent mucosa. *Cancer* 1993; 72:1522-1527.
130. Elpek GO, Gelen T, Karpuzoglu G et al. Clinicopathologic evaluation of CDw75 antigen expression in patients with gastric carcinoma. *Journal of Pathology* 2001; 193:169-174.

131. Pinho S, Marcos NT, Ferreira B et al. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 2007; 249:157-170.
132. Shen L, Li HX, Luo HS et al. CDw75 is a significant histopathological marker for gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1682-1685.
133. Arinaga M, Noguchi T, Takeno S et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 97:457-464.
134. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:1361-1369.
135. White JD, Hewett PW, Kosuge D et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:1669-1675.
136. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D et al. Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88:237-244.
137. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003; 9:716-721.
138. Takahashi A, Kono K, Itakura J et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002; 62:121-127.
139. Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78:132-137.
140. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H et al. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1823-1829.
141. Yonemura Y, Fushida S, Bando E et al. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37:918-923.
142. Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer* 2002; 38:1413-1419.
143. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11:38-43.
144. Sung JY, Lee S, Kim YW et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a favorable prognostic factor in advanced gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 19:939-944.
145. Han FH, Zhan WH, He YL et al. The expression of VEGF-C, VEGFR-3 and its predictive value on lymph node metastasis and prognosis of gastric cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2006; 44:1058-1061.
146. Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. *World J Surg* 2005; 29:1600-1607.
147. Liu L, Li Z, Feng G et al. Expression of connective tissue growth factor is in agreement with the expression of VEGF, VEGF-C, -D and associated with shorter survival in gastric cancer. *Pathol Int* 2007; 57:712-718.
148. Jain RK, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:417-421.
149. Padera TP, Kadambi A, di TE et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296:1883-1886.

150. Ding S, Li C, Lin S et al. Distinct roles of VEGF-A and VEGF-C in tumour metastasis of gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 17:369-375.
151. Maehara Y, Hasuda S, Abe T et al. Tumor angiogenesis and micrometastasis in bone marrow of patients with early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2129-2134.
152. Scaringi S, Kianmanesh R, Sabate JM et al. Advanced gastric cancer with or without peritoneal carcinomatosis treated with hyperthermic intra-peritoneal-chemotherapy: A single western center experience. *Eur J Surg Oncol* 2008 (Epub ahead of print).
153. van Leeuwen BL, Graf W, Pahlman L et al. Swedish experience with peritonectomy and HIPEC. HIPEC in peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:745-753.
154. Facchiano E, Scaringi S, Kianmanesh R et al. Laparoscopic hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for the treatment of malignant ascites secondary to unresectable peritoneal carcinomatosis from advanced gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34:154-158.

DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank

Herrn Prof. Dr. Dr. P. M. Schlag, der durch seine langjährige Unterstützung, sein kontinuierliches Interesse sowie durch fachliche Diskussionen und konstruktive Kritik wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beitrug.

An dieser Stelle möchte ich auch allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert Rössle Klinik, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Buch, meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Sie unterstützten mich auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat und haben damit einen nicht unbedeutenden Anteil an der Fertigstellung dieser Habilitationsarbeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. A. Bembenek, mit dem ich zahlreiche gemeinsame Projekte erfolgreich abschließen konnte.

Sehr herzlich möchte ich mich bei den Kollegen des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin bedanken, ohne deren Unterstützung und gute Zusammenarbeit diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn PD Dr. W. Kemmner, Frau PD Dr. U. Stein, Herrn PD Dr. W. Walter, Frau Dr. U. Zibold, Herrn Dr. D. Besser und Herrn Dr. J. Fritzmann.

Bei den Kollegen der Charité Camps Mitte Herrn PD Dr. Th. Jöns und des Campus Virchow Klinikum Herrn Dr. S. Jüttner und Herrn Dr. C. Wissmann, möchte ich mich für deren gute Zusammenarbeit sehr bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kooperationspartnern außerhalb der Charité, die als Kollegen mit Anregungen und Diskussionen meine wissenschaftliche Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Höcker und PD Dr. M. Vieth für deren fachliche Anregungen, kritische Gespräche sowie die gute Kooperation danken.

Den Mitarbeitern der Studienzentrale, der Tumorbank und der EDV der Klinik für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert Rössle Klinik, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Buch, besonders Herrn M. Niederstrasser, Herrn S. Sander, Herrn J. Fischer, Frau D. Garus, Frau A. Weissenberg, Frau I. Wendler und Frau K. Nowak, gilt mein Dank.

Frau H. Lange und Frau C. Grosse vom Chefsekretariat danke ich sehr für ihre langjährige Unterstützung und ihre hilfreichen Hinweise.

Meinen Eltern danke ich herzlich dafür, dass sie mir den Weg für meine schulische und universitäre Laufbahn geebnet und so die Voraussetzung für meine berufliche und wissenschaftliche Entwicklung geschaffen haben.

Zuletzt und ganz besonders herzlich möchte ich meiner Frau Dr. Katrin Gretschel und meinen beiden Söhnen Julius und Lennart für deren nicht ermüdendes Verständnis und die Unterstützung in jeder Hinsicht und auf jeder Ebene des privaten, beruflichen sowie wissenschaftlichen Alltags meinen ganz besonderen Dank ausdrücken.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.



Berlin den 01.05.2008

Dr. med. Stephan Gretschel