

Prognostische Bedeutung immunzytologisch nachgewiesener freier intraperitonealer Tumorzellen beim Magenkarzinom

Pamela Antonia Bauer

Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)

Prognostische Bedeutung immunzytologisch nachgewiesener freier intraperitonealer Tumorzellen beim Magenkarzinom

Pamela Antonia Bauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. O. F. H. Nekarda

2. Univ.-Prof. Dr. H. Bartels

Die Dissertation wurde am 02.01.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2008 angenommen.

Für meine Schwester Michaela

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie, Ätiologie, Staging und Therapie des Magenkarzinoms	1
1.2. Prognosefaktoren beim Magenkarzinom	8
1.3. Definition, Pathogenese, klinische Bedeutung und Prognose der Peritonealkarzinose	13
1.4. Zytologische Diagnostik von Ergüssen und Lavagen zum Tumorstaging	17
1.4.1. Konventionelle zytologische Lavagediagnostik	18
1.4.2. Immunzytologische Diagnostik	19
1.5. Das epitheliale Antigen EPG 4 und der monoklonale Antikörper Ber-Ep4	21
1.6. Das karzinoembryonale Antigen CEA und sein Antikörper	23
1.7. Fragestellung	26
2. Patienten, Material und Methoden	27
2.1. Studienkollektiv	27
2.1.1. Studieneinschlusskriterien	27
2.1.2. Alter und Geschlecht der Patienten	27
2.1.3. Operationsverfahren	28
2.1.4. Tumorstadium	29
2.1.5. Datenerhebung	29
2.1.6. Nachbeobachtung	30
2.2. Material und Methoden	31
2.2.1. Probenasservation	31
2.2.2. Probenaufarbeitung	31
2.2.3. Färbung	32
3. Statistische Analyse	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Gesamtstudienkollektiv	36
4.1.1. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich	36
4.1.2. Verteilung des Nachweises intraperitonealer Tumorzellen zwischen den einzelnen Tumorstadien	38
4.2. R0-Kollektiv	45
4.2.1. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich im residualtumorfrei resezierten Kollektiv	45
4.2.2. Verteilung des Nachweises intraperitonealer Tumorzellen zwischen den einzelnen Tumorstadien im residualtumorfrei resezierten Kollektiv	47
4.3. Prognostische Bedeutung intraperitonealer freier Tumorzellen	53
4.3.1. Überlebensanalyse des Gesamtstudienkollektivs	53
4.3.2. Überlebensanalyse der Patienten mit R0-Resektion	56
4.3.3. Univariate und multivariate Überlebensanalyse (Cox-Regressionsmodell)	58
5. Diskussion	61
5.1. Methode	62
5.1.1. Nachweismethoden intraperitonealer freier Tumorzellen im Vergleich	62
5.1.2. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich	69

5.2. Inzidenz und prognostische Bedeutung freier intraperitonealer Tumorzellen	70
5.3. Therapeutische Relevanz	72
6. Zusammenfassung	75
7. Anhang	78
7.1. Laborprotokoll	78
7.2. Bildtafeln	83
7.3. Erfassungsbogen	86
7.3.1. Patientenerfassungsbogen	86
7.3.2. Lavageprotokoll	95
8. Literaturverzeichnis	99
9. Abbildungsverzeichnis	118
10. Tabellenverzeichnis	120
11. Danksagung	122

Verwendete Abkürzung:

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
CTAP	computertomographische Arterio-Portographie
Def.	Definition
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	und Mitarbeiter
FPTC	Free peritoneal tumor cells
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gramm
HCl	Salzsäure
H.p.	Helicobacter pylori
IMZ	Immunzytologie
Intraop.	Intraoperativ
IPCH	intraperitoneale Chemotherapie
KVZ	Konventionelle Zytologie
LUAE	Left upper abdominal evisceration
µl	Mikroliter
MAK	monoklonaler Antikörper
MALT	Mucosa associated lymphoie tissue
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mo	Monate
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
m.S.	mittlere Überlebenszeit
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NaJO ³	Natrium Jod Oxid
neg	negativ
n.s.	nicht signifikant
p	Signifikanzniveau
PC	Peritonealkarzinose
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pos	positiv

R	Resektion
R0	kein Residualtumor, d.h. mikroskopisch und makroskopisch bestätigter tumorfreier Sicherheitsabstand um das Tumorsektat in allen drei Ebenen
R1	histologischer Residualtumor
R2	makroskopischer Residualtumor
rpm	rounds per minute
RPMI-Medium	Zellkulturmedium
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
Sek.	Sekunden
SLN	Sentinel lymph node
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TNM	Primärtumor, regionale Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
TU	Technische Universität
U	Unit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie, Ätiologie, Staging und Therapie des Magenkarzinoms

In Deutschland stehen insgesamt ca. 18 500 Menschen pro Jahr der Diagnose „Magenkarzinom“ gegenüber. Trotz Halbierung der **Inzidenz** seit Anfang der 70er Jahre liegt es für beide Geschlechter an vierthäufigster Stelle für tumorbedingte Todesursachen. Bei Männern ist es die sechshäufigste und bei Frauen die fünfhäufigste maligne Neoplasie.

Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt bei 68 Jahren und der Frauen bei 74 Jahren.

Das Magenkarzinom zeigt eine geographische Inzidenzverteilung. Asiatische Länder wie Japan, China und Korea weisen eine hohe Inzidenz auf. Im Vergleich zu weißen Nordamerikanern, mit einer geringen Neuerkrankungsrate von 8/ 100.000, liegt sie in Japan mit 60/ 100.000 sieben mal höher (78, S.24). Die Nachfolgeneration von Japanern, die in die USA ausgewandert sind, zeigen kein erhöhtes Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken. Es wird vermutet, dass Ernährungsfaktoren diesem Häufigkeitsunterschied zugrunde liegen (36, S.364).

In Europa findet sich eine mittlere Häufigkeit (84, S.975). Im innereuropäischem Vergleich weisen Dänemark, Frankreich und Schweden die niedrigsten Erkrankungsraten auf. In Deutschland liegt sie für beide Geschlechter noch unter Portugal, Italien und Österreich. (78, S.24).

Weltweit ist das **Magenkarzinomrisiko** eher unter Bevölkerungsschichten mit niedrigem sozioökonomischem Status erhöht. Dies weist eine Korrelation mit der bakteriellen Durchseuchung durch *Helicobacter pylori* auf (84, S.975). Allerdings wirken nur einzelne Subspezies von H.p. als Kokanzeroagen. Prädisponierend für die Karzinomentstehung wird eine H.p.-Infektion in Verbindung mit einem Interleukin-1-Polymorphismus diskutiert. Begleitend kommt es bei erhöhten Interleukin-1-beta Konzentrationen, durch Hemmung der Magensäuresekretion zu einer H.p.-induzierten Infektionsausbreitung vom Antrum zum Korpus.

Patienten mit einer Gastritis im Antrumbereich weisen hohe Säureproduktionsraten auf, neigen zu duodenalen Ulkuserkrankungen und zeigen nur ein geringes Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken. Im Gegensatz dazu führt eine Gastritis im vor allem Säure sezernierenden Korpusbereich zu einer Hypochlorhydrie mit progressiver Magenatrophie und einem erhöhten Magenkarzinom Erkrankungsrisiko (18, S.399; 28, S.129,130).

Neben einer H.p.-induzierten Gastritis Typ B, die bei 90 % aller Patienten mit Magenfrühkarzinom nachzuweisen ist, gelten als weitere endogene Risikofaktoren die chronische atrophische Autoimmungastritis Typ A, die perniziöse Anämie, die Achlorhydrie, rezidivierende Ulcera ventriculi und der Zustand nach Magenteilresektion. Ein Morbus Ménétrier entartet in bis zu 10% und adenomatöse Magenpolypen in bis zu 20% der Fälle. Patienten mit der Blutgruppe A weisen eine häufigere Karzinomentstehung auf. Die im Tabakrauch enthaltene karzinogenen Nitrosamine entstehen auch bei dem bakteriellen Umbau von Nitraten zu Nitriten. Ascorbinsäure wirkt diesem Vorgang entgegen. Somit gelten geräucherte und stark gesalzene Speisen mit hohem Nitratgehalt als exogene Risikofaktoren (17, S.585,586; 36, S.364). Der Konsum von frischem Obst und Gemüse und der damit verbundene erhöhte Vitamin-C-Spiegel im Magensaft stellt dagegen einen protektiven Effekt dar (84, S.975).

Durch Eradikation einer H.p.-Infektion lässt sich der Ascorbinsäuregehalt im Magensaft steigern (28, S.129). Weiter wird dadurch der Pathomechanismus, der durch eine H.p.-induzierten Gastritis zu einer Hypochlorhydrie führt, unterbrochen. Die begünstigte Superinfektion anderer Bakterien und die damit angekurbelte hochgradig karzinogen N-Nitroso-Compounds Produktion entfällt (18, S.399). Allerdings entwickelt nur ein kleiner Anteil von infizierten Patienten tatsächlich ein Magenkarzinom. Ob daher bei weltweit hoher Durchseuchungsrate Screening Programme zur Detektion und Eradikation einer H.p.-Infektion die Prävention eines Magenkarzinoms fördert, steht weiter zur Diskussion.

Exogene Faktoren induzieren häufiger Magenkarzinome vom intestinalen Typ nach Laurén entsprechen und genetische Faktoren prädisponieren mehr zu einem diffusen Typ nach Laurén. Die sinkende Magenkarzinominzidenz ist v.a. durch die Abnahme

der exogenen Faktoren bedingt. Es wird eine kontinuierliche Zunahme des diffusen Typ im proximalen Magen beobachtet (82, S.244).

Zu Beginn der **Diagnostik** steht die **Video-Fiberendoskopie** mit Biopsie zur histologischen Sicherung (87, S.817,818). Über 90% der malignen Magentumoren entsprechen Adenokarzinomen. Die übrigen sind mesenchymaler Herkunft und werden als Sarkome bezeichnet oder entstammen dem mucosaassoziierten Lymphgewebe. Sog. MALT-Lymphome werden jedoch nicht zu den Magenkarzinomen, sondern zu den Non- Hodgkin- Lymphomen gerechnet und erfordern eine eigene Therapie (84, S.974). Die histopathologische Klassifikation nach Laurén in intestinaler und nicht-intestinaler Typ sowie der Grad der Differenzierung (Grading) werden mit den ersten Biopsien erfasst (89, S.324). Wichtig für unterschiedliche operative Strategien ist die mit Hilfe der Endoskopie ermittelte Lokalisation des Tumors. Dabei sollten die Tumoren des proximalen Magendrittels (AEG-Typ III nach Siewert, adenocarcinoma of the esophago-gastric junction) von den eigentlichen Kardiakarzinomen (AEG-Typ II) und von den Adenokarzinomen des distalen Ösophagus (Barrett-Karzinom, AEG-Typ I) differenziert werden (98, S.1457).

Mit der Diagnose des Magenkarzinoms steht die möglichst genaue prätherapeutische Evaluierung des Tumorstadiums. Die Prognose des Patienten kann nur, wie bei allen anderen gastrointestinalen Tumoren, durch eine R0-Resektion signifikant verbessert werden. Daher erfolgt das **Staging** zur individuellen Therapiefindung mit dem Ziel durch eine Resektion eine mikroskopische und makroskopische Tumorfreiheit zu erreichen (87, S.817).

Das TNM-System, definiert als die Tiefe der Tumordinfiltration in die Magenwand (T-Kategorie), den Lymphknotenstatus (N-Kategorie) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Kategorie,) wird nach den Regeln der UICC zur Klassifikation des Tumorstadiums (Tabelle 1.1) herangezogen (107, S.59).

Mit dem **endoluminalen Ultraschall** können erfahrene Untersucher das T-Stadium mit einer Genauigkeit von 80-85% richtig voraussagen. Allerdings ist die Unterscheidung eines ulzerierten T1a- von einem T1b-Stadium und zwischen der Infiltration der Subserosa (Stadium T2b) zur Serosa (Stadium T3) schwierig.

Die endosonographische Erfassung für magenwandnaher Lymphknoten liegt bei einer Genauigkeit von 65-87% (81, S.550). Da beim N-Stadium die Anzahl der befallenen Lymphknoten und nicht deren Nähe zum Tumor entscheidend ist, ist die tatsächliche Sensitivität eher noch geringer. Die Infiltration angrenzender Organe (Pankreas, Milz, Colon transversum, linker Leberlappen) sowie eine Peritonealkarzinose bei Vorliegen von Aszites kann nur mit einer Genauigkeit von 65% erfasst werden.

T-Primärtumor		Stadium			
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden				
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	0	Tis	N0	M0
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria	IA	T1	N0	M0
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa	IB	T1	N1	M0
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa	II	T2a/b	N0	M0
T2a	Tumor infiltriert Muscularis propria		T1	N2	M0
T2b	Tumor infiltriert Subserosa		T2a/b	N1	M0
T3	Tumor penetriert Serosa (viszerales Peritoneum), infiltriert aber nicht benachbarte Strukturen	IIIA	T3	N0	M0
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen		T2a/b	N2	M0
			T3	N1	M0
		IIIB	T4	N0	M0
		IV	T3	N2	M0
			T4	N1,N2,N3	M0
			T1,T2,T3	N3	M0
			Jedes T	Jedes N	M1
N-Regionäre Lymphknoten					
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden				
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen				
N1	Metastasen in 1-6 regionäre Lymphknoten				
N2	Metastasen in 7-15 regionäre Lymphknoten				
N3	Metastasen in mehr als 15 regionäre Lymphknoten				
M-Fernmetastasen					
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden				
M0	Keine Fernmetastasen				
M1	Fernmetastasen				

Tabelle 1.1: Stadiengruppierung nach UICC 2001(107, S.60,61)

Mit **abdomineller Sonographie, Computertomographie, CTAP**

(computertomographischer Arterio-Portographie) und **Kernspintomographie (MRT)** können Lebermetastasen > 1cm mit einer Genauigkeit von ungefähr 85% sichtbar gemacht werden. Weiter können Fernmetastasen und das genaue Ausmaß der Organ- und Gefäßinfiltration verifiziert werden.

Bei allen lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3,T4) ist eine **diagnostische Laparoskopie** indiziert. Hierbei können Lebermetastasen < 1cm durch laparoskopischen Ultraschall und eine Peritonealkarzinose durch Biopsie dokumentiert werden. Durch Spülung der Bauchhöhle kann eine Lavage gewonnen und auf Tumorzellen untersucht werden (siehe auch: 1.4, S.17) (84, S.978; 87, S.822; 89, S.325). Durch diagnostische Laparoskopie kann somit eine Verbesserung des Staging erreicht werden. Inwieweit Patienten, bei denen durch Laparoskopie ein M1 Stadium nachgewiesen wird, durch ein dadurch verändertes Therapieschema profitieren und Patienten mit laparoskopisch gesichertem M0 Stadium ein verlängertes Langzeitüberleben nach R0-Resektion aufweisen, muss noch in Studien geklärt werden (16, S.972; 48, S.310).

Weiter werden zur Fernmetastasensuche neben einer Computertomographie von Abdomen und Becken noch ein konventionelles **Röntgenbild** und fakultativ eine **Skelettszintigraphie** durchgeführt (89, S.326).

Mit abgeschlossenem Staging folgt die individuelle Therapieplanung:

Die **chirurgische Therapie** ermöglicht durch eine R0- Resektion eine kurative Behandlung. Dabei ist das Resektionsausmaß von der Tumorsituation abhängig: Bei einem Magenfrühkarzinom vom Mukosatyp (pT 1m) liegt die Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung unter 5%. Minimal invasiv kann es durch lokale Exzision behandelt werden. Jedoch ist die Abgrenzung zu einem Submukosakarzinom (im Stadium IB) wichtig, da hier eine Lymphknotenmetastasierung bis zu 22% erwartet und eine Lymphadenektomie notwendig wird. Patienten mit lokalisierten Magenkarzinomen: Stadium IB, II und eventuell IIIA profitieren von einer Gastrektomie mit erweiterten D2-Lymphadenektomie. Die Resektion erfolgt mit adäquaten Sicherheitsabständen, die nach Maßgabe der Laurén-Klassifikation und des Grading bestimmt werden. Die Tumorlokalisation entscheidet zwischen subtotaler Resektion beim distalen Karzinom, totale Gastrektomie bei Tumoren im mittleren Drittel und transhiatal erweiterte Gastrektomie bei proximalem Tumorsitz und bei einem Kardiakarzinom. In erfahrenen Zentren liegt die Operationsletalität unter 5%. Bei Infiltration adhärenter Organe wird der Eingriff im Sinne einer erweiterten En-bloc-Resektion, die sich bis zur „Left Upper Abdominal Evisceration“ (LUAE) mit Resektion von Magen, Colon

transversum, Linkspankreatektomie und Splenektomie erstrecken kann, modifiziert. Mit dem Anspruch einer R0-Resektion müssen für diesen Eingriff freie Tumorzellen im Abdomen prä- oder intraoperativ ausgeschlossen werden. Bei bis zu 60% Morbidität für diese Operation muss der Patient in einem guten Allgemeinzustand sein. Des weitern sollte die Indikation zur Pankreaslinksresektion und/oder zur Splenektomie nur bei direkter Tumorf infiltration der Organe oder bei Lymphknotenmetastasen im Milzhilus individuell gestellt werden (siehe auch: 1.2, S.8).

Bei einer erhöhten Morbidität und einer verminderten humoralen Immunität, sind derzeit einzig Kardiakarzinome und subkardialen Magenkarzinome (AEG Typ II und III) bei der Indikation zur Splenektomie anerkannt (84, S.978-985; 87, S.822-826; 88, S.316-322; 90, S.359-361).

Um die chirurgische Therapie des Magenkarzinoms weiter zu individualisieren, wird neuerdings die Anwendbarkeit der Sentinel-Lymphnode-Technik, ein anerkanntes Verfahren für die Behandlung des malignen Melanoms, in Studien geprüft. Sie beruht auf dem Prinzip der Darstellung und Entfernung des sog. Wächterlymphknotens („Sentinel Lymph Node“, SLN). Ist der SLN tumorfrei, soll das ihm nachfolgende Lymphknoten-Echelon ebenfalls frei von Lymphknotenmetastasen sein. Erste Befürchtungen, dass komplizierte Lymphabflussverhältnisse des Magens und die daraus folgende erhöhte Häufigkeit von Skip-Metastasen die Detektion eines Pförtnerlymphknotens erschweren würde, konnten nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: Es konnte sogar aufgezeigt werden, dass dem Wachstum des Primärtumors vergleichbar eine geordnete Tumorprogression stattfindet. Das Vorliegen einer Skip-Metastasierung wurde in 20% der Fälle vermutet. Jedoch konnten erste Studien nur in ca. 1% der Fälle dieses Vorkommen bestätigen (8, S.347; 37, S.339; 49, S.752; 50, S.608; 97, S.259).

Somit erklärt sich auch ein Computerprogramm, das von K. Maruyama (National Cancer Center, Tokio) entwickelt wurde. Es bietet die Möglichkeit, die Lymphknotenmetastasierung präoperativ in bezug auf Lokalisation und T-Stadium des Tumors abzuschätzen. Mit 94% können metastatisch befallene Lymphknoten relativ sicher nach den Grundlagen der Japanese Gastric Cancer Association Klassifikation vorhergesagt werden. Somit kann das Ausmaß der Lymphknoten-Dissektion recht gut geplant werden. Allerdings ist die Mikrometastasierung bei der Berechnung nicht berücksichtigt (65, S.602).

Die **neoadjuvante Chemotherapie** scheint bisher die Prognose nur bei Patienten mit primär nicht R0 resektablen Tumoren zu verbessern. Bei den Patienten, die im Staging irresektabel erscheinen, kann durch eine präoperative Chemotherapie eine klinisch relevante Tumorregression erreicht werden und daher eine R0-Resektion ermöglicht werden. Bei einer nachgewiesenen Peritonealkarzinose ist sie jedoch ohne Wirkung (91, S.1452). Allerdings können so frühzeitig Mikrometastasen eliminiert werden und auch die Effektivität einer Chemotherapie kann beurteilt werden. Die Vorteile einer präoperativen Verabreichung liegen in den noch intakten Blutversorgungs- bzw. Lymphabflusswege des Tumors. Außerdem ist der Patient noch in einem besseren Allgemeinzustand als postoperativ (2, S.312; 87, S.828; 88, S.322-323).

Bisher konnte durch **adjuvante Therapie** nach einer potentiellen kurativen Resektion noch keinen Hinweis für einen Überlebensvorteil oder einer Verlängerung des rezidivfreien Intervalls aufgezeigt werden. Jedoch profitiert evtl. eine Subgruppe von Patienten von einer Nachbestrahlung, die nicht adäquat lymphadenektomiert worden sind (88, S.322-323).

Fortgeschrittene Magenkarzinome (Stadium IIIB und IV) sind oft schon fernmetastasiert und die komplette Entfernung des Tumors kann chirurgisch nicht erreicht werden. Eine belastende Operation ist nur palliativ, da praktisch immer ein mikroskopischer (UICC R1) oder makroskopisch (UICC R2) Residualtumor in situ bleibt. Die schlechte Prognose kann weder chirurgisch noch durch additive Therapie verbessert werden. Eine Intervention dient nur zum Zweck der Therapie lokaler Komplikationen mit minimalem Risiko und dem Ziel der Erhaltung einer maximalen Lebensqualität (84, S.978,985; 87, S.825; 91, S.1448). Allerdings zeigte Wohrer et al. nach Untersuchung von 101 Veröffentlichungen zur palliativen Chemotherapie beim fortgeschrittenen Magenkarzinom, dass eine Chemotherapie der alleinigen supportiven Therapie überlegen ist. Weiter ist das ECF-Schema (Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil) aktuell eines der effektivsten Regimes. Auch neuere Kombinationen basierend auf Irinotecan oder Taxan zeigen vielversprechende Resultate. Bei älteren Patienten oder bei reduziertem Allgemeinzustand kann eine Leukovorin modulierte 5-FU mono-Therapie erwogen werden. Trotzdem ist die Prognose der Mehrzahl dieser Patienten sehr schlecht (108, S.1585; 57).

1.2. Prognosefaktoren beim Magenkarzinom

Das relative 5-Jahres-Überleben liegt in Deutschland bei Männern bei 27% und bei Frauen bei 28%. So führt eine Krebserkrankung des Magens bei Männern im Mittel zu einem Verlust der Lebenserwartung von 8 Jahren und bei Frauen von 9 Jahren (78, S.24).

In Japan werden aufgrund etablierten Früherkennungsprogrammen bis zu 50% der Patienten in einem frühen Stadium des Frühkarzinoms diagnostiziert (32, S.119; 111, S.613). Daher ist die 5-Jahres-Überleben mit ungefähr 70% um einiges höher als in westlichen Ländern, wo das Magenkarzinom in mehr als 50% der Fälle erst in lokal fortgeschrittenen oder gar metastasierten Tumorstadien diagnostiziert wird (84, S.974).

Dabei ist die Prognose der Patienten v.a. von einer erfolgreichen, kompletten chirurgischen Resektion des Tumors abhängig:

Kaum ein Patient überlebt 5 Jahre, wenn der Tumor nicht makroskopisch und histologisch residualtumorfrei (R0) reseziert werden konnte. Die Möglichkeit einer R0-Resektion ist Stadienabhängig und so sinkt die Prognose mit jedem weiteren Tumorstadium (36, S.367). Aber auch Patienten in frühen Stadien mit Abwesenheit von Metastasen, die aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes nicht operiert werden können, haben eine ähnlich schlechte Prognose, wie Patienten in fortgeschrittenen nicht resektablen Stadien.

Insofern sollten prognostische Faktoren separat für zwei Patientengruppen betrachtet werden (35, S.47):

1. Für Patienten mit nichtkurativer Resektion (R1, R2)
2. Für Patienten mit kurativer Resektion (R0)

Patienten ohne kurativer Resektion (R1, R2)

Patienten, bei denen keine R0-Resektion erreicht werden kann ist die Prognose sehr schlecht. Siewert et al. ermittelte in einem Review die mittlere Überlebenszeit nach explorativer Laparotomie oder Gastroenterostomie zwischen 3 und 5 Monaten und nach nichtkurativer Resektion zwischen 7 und 11 Monaten. Das Vorliegen einer Fernmetastasierung beeinflusst das Überleben in diesen Stadien nur geringfügig (96).

Jedoch konnte in multivariaten Studien (siehe auch Kapitel 3, S. 35), bei denen Patienten mit einer Chemotherapie behandelt wurden, gezeigt werden, dass eine Peritonealkarzinomatose die ungünstigste Form der Metastasierung ist (siehe auch: 1.3, S. 13).

Eine histologisch gesichertes Ansprechen auf Chemotherapie ist ein Indikator für längere Überlebenszeit. Hier kann das Ansprechen auf die präoperative Therapie hinweisend sein und gilt als möglicher unabhängiger Prognosefaktor (2, S.314). Ungünstige Faktoren sind Gewichtsverlust und schlechter Allgemeinzustand (35, S.49).

In der Studie von Wilke et al. zeigten Frauen im Vergleich zu Männern ein schlechteres Überleben. Auch die histomorphologische Unterscheidung nach Laurén geht mit unterschiedlicher Überlebensdauer einher. So haben Patienten mit einem Karzinom vom diffusen Typ eine schlechtere Prognose als Patienten mit intestinalem Typ nach Laurén (106, S.63).

Patienten mit kurativer Resektion (R0)

Die mediane Überlebenszeit nach kurativer Resektion liegt zwischen 35 und 75 Monaten (84, S.974). Der wichtigste prognostische Faktor ist die aktuelle Tumorausdehnung, beschrieben durch die pTNM-Klassifikation und die Stadien Einteilung der UICC: die Tumorinvasionstiefe pT, der nodale Status pN und die pM-Kategorie, Auftreten von Fernmetastasen (siehe auch: Tabelle 1.1, S.4).

Des weitern werden neben gesicherten auch potentiell unabhängige Prognosefaktoren diskutiert. Es wird zwischen Tumorbezogenen, Patientenbezogenen und auch Therapiebezogenen Faktoren unterschieden. Die wichtigsten Faktoren werden in Tabelle 1.2 zusammengefasst (35, S.49).

Eine Peritonealkarzinose nimmt nach dem Resektionsstatus eine übergeordnete Rolle ein. Sie tritt meist innerhalb der ersten 2 Jahre nach Resektion auf und entspricht der Gruppe der „frühen“ Rezidivkranken (41, S.26). Das Überleben der Patienten wird in einem höheren Maße von einer peritonealen Streuung als von einer Fernmetastasierung beeinflusst (siehe auch: 1.3, S. 13). Das durchschnittliche Überleben nach peritonealem Wiederauftreten der Tumorerkrankung liegt bei weniger als 7 Monaten und bei Auftreten einer Fernmetastasierung unter 10 Monaten (115, S.237).

In multivariaten Studien konnten die Tumormarker Carcinoembryonalem Antigen (CEA) (63, S.859; 70, S.2703) und CA19-9 (75, S.596; 52, S.177) als unabhängige prognostische Faktoren evaluiert werden. Patienten mit einem hohen präoperativen Tumormarker-Serumspiegel haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit niedrigeren Werten. Asao et al. konnte in Studien zeigen, dass auch der CEA-Gehalt der Peritonealspüllösung mit einer schlechteren Prognose einhergeht (4, S.44; 5, S.79).

Neue biologische und molekulare Faktoren stehen im Zusammenhang mit Eigenschaften maligner Zellen. Als Grundlage gilt die genetische Alterationen durch Onkogene, die z.B. den Thyrosinkinaserzeptor (wie C-erbB2) kodieren. Gene für Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren (wie epidermal growth factors (EGF)), Gene, die die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen (wie die ras Familie), Tumorsuppressorgene (p53) sowie Gene die vor Apoptose schützen (bcl-2) wurden im Zusammenhang mit Magenkarzinomzellen beschrieben.

Weiter werden bei Zellen mit reduzierten Adhäsionsmolekülen wie CD 44 und E-Cadherin häufiger eine Metastasierung beobachtet.

Die Invasion und Metastasierung ist abhängig von der proteolytischen Zerstörung umliegender Matrix. Untersuchungen bestätigen, dass Tumoren eine Überexpression an Proteolytischen Systemen aufweisen. Die Aggressivität des Tumors steigt z.B. bei erhöhtem uPA (urokinase-type plasminogen activator) – Spiegel. Sein spezifischer Membranbinderezeptor uPA-R und der Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)-1 sind weitere Faktoren dieses Proteolytischen Systems (3, S.1658).

Kategorie	Gesicherte Faktoren	Potentielle Faktoren
Tumorbezogen	<input type="checkbox"/> TNM, R • Anzahl befallener Lymphknoten	<ul style="list-style-type: none"> • FPTC in der Abdominallavage • CK-18 positive Zellen im KM • Tumorzellinvolvement- pN0
Biologische & molekulare	<input type="checkbox"/> CEA, CA 19-9	<ul style="list-style-type: none"> • Ploidie • Proliferation (Ki-67), S-Phase • EGF-R, C-erbB2 • P53, ras, bcl-2, myc, E-Cadherin • UPA, PAI-1, uPA-R • Cathepsine • CD 44 (v5,6)
Patientenbezogen		<ul style="list-style-type: none"> • Alter
Therapiebezogen	<input type="checkbox"/> Erfahrung der Klinik <input type="checkbox"/> Erfahrung des Chirurgen <input type="checkbox"/> Resektionsstatus (R0 vs. R1/R2) <input type="checkbox"/> Lymphknotenquotient	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphadenektomie(D2 vs. D1) • (Neo-) adjuvante CTX • Komplikationen

Tabelle 1.2: Prognosefaktoren beim Magenkarzinom

Ein Wiederauftreten der Tumorerkrankung erfolgt am häufigsten, in ca. 33- 50% der Fälle aufgrund einer peritonealen Metastasierung (60, S.1720; 115, S.236), gefolgt von einer Fernmetastasierung in ca. 26% der Fälle und das Auftreten eines lokoregionalen Rezidives in 19% der Fälle. Auch eine Kombination dieser drei Möglichkeiten kann zum Wiederauftreten führen. Hier steht die Peritonealkarzinose mit dem gleichzeitigen Auftreten eines lokoregionalen Rezidives an häufigster Stelle. Die hämatogene Ausbreitung erfolgt zunächst in Leber, anschließend in Lunge und Knochen (115, S.236).

Die Häufigkeit einer peritonealer Metastasierung korreliert mit der Tiefe der Wandinfiltration vor allem der Infiltrationstiefe der Serosa. Die wichtigsten Prognosefaktoren für das Überleben nach einer kurativen Resektion ist die Infiltration der Serosa, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen mit einer peritonealer Dissemination, während eine Lebermetastasierung weniger relevant ist (10, S.439).

Als Erklärung für ein unerkanntes frühes Wiederauftreten der Tumorerkrankung werden eingeschränkte Nachweismöglichkeiten einer beginnenden Tumorzell dissemination beim Zeitpunkt der Diagnose vermutet. Daher ist es wichtig Nachweismethoden weiter zu verfeinern und neue Möglichkeiten zur Früherkennung zu etablieren (115, S.241).

Die UICC hat 1993 ein Programm zur Evaluation von Prognosefaktoren initiiert. Es sollen Prognosefaktoren sowohl für die klinische Behandlung maligner Tumoren als auch Faktoren für Studien evaluiert werden. Von Seiten der Statistischen Anforderungen ist die einfach univariate Analyse nicht mehr ausreichend. Es wird zur Evaluierung eine multivariate Analyse gefordert (z.B. eine Cox-Regressionsanalyse, eine logistische Regressionsanalyse oder eine CART-Analyse) (107, S.22).

Modellrechnungen mit Prognosefaktoren ermöglichen eine individuelle Abschätzung des Risikos eines Wiederauftretens der Erkrankung und können daher zur Empfehlung einer weiteren Therapie herangezogen werden. Ein wichtiger Aspekt stellt die Einteilung der Patienten in Risikosubgruppen dar.

Die Patienten können nach Abschätzung ihres Rezidivrisikos in Subgruppen eingeteilt werden. Diese Risikogruppen können als Grundlage für die Entwicklung suffizienter adjuvanter Therapieregimes dienen.

Durch Verbesserung des Überlebens solcher Risikogruppen kann die Prognose einer Magenkarzinomerkrankung insgesamt verbessert werden.

1.3. Definition, Pathogenese, klinische Bedeutung und Prognose der Peritonealkarzinose

Beim Zeitpunkt der Diagnose haben bereits 10-20% der Magenkarzinompatienten eine metastatische peritoneale Streuung (25, S.219-220).

Eine Peritonealkarzinose (PC) liegt vor, wenn der Mesotheldeckzellverband von Tumorzellen durchbrochen ist. Besteht kein Durchbruch der Mesothelschicht, so handelt es sich um eine mesenteriale Karzinose.

Die lokale Durchwanderung der Organwand, wie z.B. beim Ovarialkarzinom im Stadium pT1c entspricht nach den Richtlinien der UICC einer Peritonealkarzinose. Dies gilt ebenso für das Stadium pT4 beim Kolonkarzinom sowie für das Stadium pT3 bei einem Magenkarzinom. Andererseits kann eine Peritonealkarzinose auch als eine lokalisierte Metastasierung im Peritoneum (pM1 (Per)) auftreten (107, S.76, 80, 224). Im Gegensatz zu der geringen Rate der primär peritonealen Tumoren: Mesotheliom und Pseudomyxom, ist eine metastatische PC häufig (83, S.361).

Die **Pathogenese** einer Peritonealkarzinose scheint multifaktoriell. So ist die Ausbreitung freier Tumorzellen abhängig von einer Serosainvasion des Primärtumors, von der lymphatischen wie auch der venösen Dissemination maligner Zellen. Weiter bedarf die Implantation der freien Tumorzellen die Präsenz von Adhäsionsmolekülen.

Es ist bekannt, dass vitale Tumorzellen, die die Serosa durchbrochen haben in die Bauchhöhle abschlüpfen. Dort reimplantieren sie sich und bilden Tumorzellnester auf dem Peritoneum. Die Ausbildung von Tumoraszites ist mit den beginnenden Mesothelaufbrüchen verbunden (39, S.2131).

Hagiwara et al. zeigte in einem Tierversuch an Mäusen, dass die peritonealen Metastasierung vorwiegend im Bereich der Milky Spots des Omentum vorkommen (29, S.687). Die Mesothelschicht besitzt in diesem Bereich keine Basalmembran und zwischen den Mesothelzellen befinden sich Lücken (Stomata). Die sonst durchgängige Mesothelschicht des Peritoneums wird hier durch zahlreiche Makrophagen unterbrochen. Darunter liegen Lymph- und Blutgefäße. Anders als im übrigen Omentum sind die Kapillaren hier fenestriert. Diese strukturellen Besonderheiten ermöglichen Zellen dieser Milky Spots barrierenlos zwischen dem Intestinalraum und der Peritonealhöhle zu migrieren.

Neben Makrophagen finden sich auch Lymphozyten und wenige Mastzellen. Als Orte der immunologischen Kompetenz des Peritoneums sind Milky Spots daher mit regionalen Lymphknoten zu vergleichen. Die meist mehrreihig übereinander sitzenden oberflächlichen Makrophagen filtern zirkulierende Antigene und Fremdkörper aus der Peritonealhöhle und leiten die Informationen zu den zentraler liegenden Lymphozyten weiter.

Ebenso wurde in Tierversuchen gezeigt, dass intraperitoneal verabreichte Tumorzellen innerhalb weniger Stunden in Milky Spots nachgewiesen werden und Tumorknoten bilden können. Dabei kommt es durch die entfaltende Immunabwehr der Makrophagen zu einer Öffnung der Oberfläche der Milky Spots. Dies ermöglicht den Durchtritt von Tumorzellen.

Es wird vermutet, dass Polypeptide Wachstumsfaktoren der Makrophagen zu einer Verstärkung des Tumorwachstums führen und die Sekretion von angiogenetischen Faktoren des Omentum eine vermehrte Neovaskularisation des Tumors induzieren (94, S.90-97).

So kann eine Omentektomie bei frühen Stadien der Peritonealkarzinose zu einer Verlängerung des Überlebens führen (29, S.687).

Werden in einem Tierversuch Tumorzellen bei maximal reseziertem Omentum intraperitoneal verabreicht kommt es zu einem weitaus geringerem Auftreten der Tumorerkrankung (94, S.96).

Die Lymphe der Milky Spots drainiert wahrscheinlich in die Cysterna chyli und dann weiter in den Ductus thoracicus (94, S.93). Dies ermöglicht das Fortschreiten der Erkrankung. Gleichzeitig wird vermutet, dass auch retrograd es so zu einer peritonealen Metastasierung führen kann.

Diese Theorie würde erklären, weshalb eine Peritonealkarzinose auch bei Magenkarzinomen auftritt, die die Serosa noch nicht durchbrochen haben, die gerade die Muskularis propria infiltrieren.

Tanaka et al. vermutet, dass es aufgrund einer Obstruktion der Lymphgefäße oder Lymphknoten zu einem Austritt von Tumorzellen in den paralympatischen Raum kommt. Gleichzeitig kann durch gestaute Lymphgefäße vor der Obstruktion ein Reflux ausgelöst werden. Auf beide Wege können Tumorzellen entlang des paralympatischen Gewebes oder rückwärts innerhalb eines gestauten Lymphgefäßes Richtung Interstitium, Omentum und Milky Spots wandern und so zu einer Peritonealkarzinose führen (103, S.166, 170).

Mehrere Studien zeigen, dass undifferenzierte Tumoren häufiger zu einer Peritonealkarzinose führen, als differenzierte. Die Vermutung liegt darin, dass diese stärker mutierten Zellen einen größeren Adhäsionsverlust aufweisen und es daher früher zu einer Ausbreitung freier Tumorzellen in die Bauchhöhle kommt. Dies kann auch durch den häufigeren Nachweis freier intraperitonealer Tumorzellen bei undifferenzierten Tumoren bestätigt werden (10, S.439).

Eine PC kann sich **klinisch** durch Auftreten von Aszites oder gastrointestinaler Obstruktion manifestieren. Der Nachweis von Aszites kann mittels Ultraschall und CT erfolgen. Jedoch können Läsionen einer PC kleiner 2cm (in maximaler Ausmessung) durch Ultraschall und Läsionen kleiner 5mm durch CT-Aufnahmen nur sehr schwierig erkannt werden. Die Sensitivität der CT-Bildgebung zur Diagnostik einer PC liegt bei 70% für Läsionen in größter Ausbreitung von 2cm und bei nur 28% bei Läsionen von kleiner 5mm in größter Ausbreitung (83, S.362).

Die **Prognose** einer Peritonealkarzinose ist sehr schlecht. Das mittlere Überleben liegt bei Magenkarzinompatienten bei 3,1 Monaten. In der EVOCAPE 1 Studie konnte gezeigt werden, dass das Überleben von der Stadieneinteilung beschrieben nach Gilly (siehe Tabelle 1.3 auf Seite 16) abhängig ist und die Prognose sich durch die Anwesenheit von Aszites oder einer kombinierten Lebermetastasierung verschlechtert (83, S.362-363). Palliative systemische Chemotherapie zeigen zwar ermutigende Tumorresponstraten jedoch keine Verlängerung des Überleben. Aufgrund neuer multimodaler Therapiekonzepte zeigt sich seit den 80iger Jahren ein erneutes Interesse an peritonealen malignen Oberflächenerkrankungen. So wurden inzwischen einige neue Therapieversuche wie Peritonektomie, Intraperitoneale Verabreichung von Antitumormedikamenten wie OK432, Intraperitoneale Immuntherapie, Intraperitoneale Chemotherapie (IPCH) und frühe postoperative intraperitoneale Chemotherapie durchgeführt (25, S.219).

Tabelle 1.3

PC Stadieneinteilung nach Gilly et al. (23, S.124)

Stadium 0	kein makroskopischer Nachweis
Stadium I	maligne Implantate < 5mm in größter Ausbreitung, lokal in einem Teil des Abdomens
Stadium II	maligne Implantate < 5mm in größter Ausbreitung, diffus im ganzen Abdomen
Stadium III	maligne Implantate > 5mm und < 2cm in größter Ausbreitung
Stadium IV	maligne Implantate > 2cm in größter Ausbreitung

In Japan erfolgt die Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose beim Magenkarzinom nach der Klassifikation der Japanese Research Society for Gastric Cancer (11, S.131):

P0: keine Aussaat von Metastasen auf die Serosa

P1: Aussaat von Metastasen nur im angrenzendem tumornahen Peritoneum

P2: einzelne bis mehrere verstreute Metastasen ins entfernte Peritoneum

P3: zahlreiche Metastasen ins entfernte Peritoneum

1.4. Zytologische Diagnostik von Ergüssen und Lavagen zum Tumorstaging

Die Technik der Entnahme einer intraperitonealen Spülflüssigkeit wurde 1956 von Keetle und Elkin eingeführt (93, S.131).

Seit einigen Jahren sind zytologische Untersuchungen nun Standard bei der Stadieneinteilung verschiedener Tumoren. Maligne Pleuraergüsse werden bei einem Bronchial- bzw. Lungenkarzinom als T4-Tumor klassifiziert (107, S.76,80).

Auch beim Ovarialkarzinom sind freie Tumorzellen schon seit 1975 fester Bestandteil bei der Stadieneinteilung nach FIGO (93, S.131). Stadium I wird durch die Diagnose intraperitonealer Tumorzellen in Stadium Ic erweitert (119, S.105).

Bei den gastrointestinalen Tumoren werden bereits an vielen großen Zentren zytologische Untersuchungen der Peritoneallavage am Anfang der Operation durchgeführt (85, S.92). Eine diagnostische Laparoskopie kann durch eine Peritoneallavage ergänzt werden und ist beim lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen in Zentren als Standard anerkannt (84, S.977; 87, S.818; 89, S.325).

Schließlich fanden diese Daten Eingang in das Supplement der TNM-Klassifikation im Jahre 1992. Eine positive Zytologie in der Peritonealhöhle ist als M1 und R1 zu klassifizieren, allerdings mit dem Hinweis, dass es sich um zytologische, intraoperative Befunde handelt (85, S.90). Hiervon abzugrenzen sind Mikrometastasen (kleiner 2mm) im Lymphknoten, die bisher nur bei einem Mammakarzinom in die reguläre TNM-Klassifikation als pN1a eingeht. Bei allen weiteren Tumoren muss auch hier zusätzlich angegeben werden, dass eine Mikrometastase vorliegt (33, S.2771).

Allerdings gibt es eine große Variationsbreite der Nachweisverfahren, v.a. was die Methodik betrifft. Unterschiede bestehen außerdem bzgl. des Entnahmeorts und des Zeitpunktes und bei der Interpretation der erhobenen Befunde. Die Definition der Tumorzelle und die Wertung zweifelhafter Befunde spielt hier eine entscheidende Rolle (85, S.90). So scheint der Weg zur Standardisierung noch weit.

1.4.1. Konventionelle zytologische Lavagediagnostik

Die zytologische Untersuchung der Spülflüssigkeit bzw. eines Aszites oder Ergusses wird routinemäßig an Ausstrichpräparaten nach einer Zentrifugation, die nach May-Grünwald-Giemsa, Papanicolaou, Giemsa, PAS oder H.E. gefärbt werden, nach den üblichen diagnostischen Kriterien vorgenommen (41, S.26; 69, S.225).

Leider hat die Konventionelle Zytologiediagnostik auf freie intraperitoneale Tumorzellen einige Probleme. Erstens kommt es bei dieser Methode zu einer sehr hohen Rate an falsch-negativen Resultaten. Eine große Zahl der Patienten, die mittels konventioneller Färbung keine Tumorzellen nachgewiesen bekommen, haben ein Rezidiv und entwickeln eine Peritonealkarzinose (71, S.687). Die klinische Sensitivität dieser Methode ist daher recht gering und wird in der Literatur zwischen 21 und 46% angegeben (112, S.521-522).

Aber auch Patienten mit makroskopisch sichtbarer peritonealer Dissemination haben nicht immer positive Resultate (40, S.4966).

Selbst die in Studien evaluierte Häufigkeit positiver zytologischer Befunde bei Verwendung konventioneller Methoden schwankt beträchtlich. Sie liegt beim Magenkarzinom zwischen 0 und 43% (85, S.90).

Die Beurteilung der Malignität von peritonealem Erguss stellt eine große Herausforderung in der zytologischen Diagnostik dar. Die korrekte Diagnose hat einen wichtigen Einfluss auf das weitere diagnostische und therapeutische Handeln. Das größte Problem der einfachen Zytologie ist die diagnostische Schwierigkeit Tumorzellen von gutartigen Mesothelzellen und anderen benignen Zellen zu unterscheiden (64, S.467; 105, S.26; 119, S.105).

Peritoneale Spülflüssigkeit enthält drei verschiedene Zelltypen: 1. Tumorzellen, 2. mesotheliale und inflammatorische Zellen und 3. fibrotische Zellen. Die Unterscheidung dieser drei Zellarten ist schwierig (40, S.4967).

Besondere Schwierigkeiten treten bei der morphologischen Differenzierung zwischen reaktiven und malignen Zellpopulationen auf. Dies gilt v.a. wenn sich nur wenig maligne Zellen neben vielen reaktiven Mesothel- und Entzündungszellen befinden

(13, S.85) oder wenn zytologisch blande neben Mesothel- und inflammatorischen Zellen liegen (40, S.4967).

Bei der Identifizierung einer Tumorzelle müssen verschiedene Standardkriterien für Malignität wie Kernvergrößerung, Kernunregelmäßigkeiten und prominente Nukleolen erfüllt sein (64, S.468). Zusätzlich sollte jedoch auch eine ähnliche Morphologie der malignen Zellen mit den Tumorzellen des Primärtumors vorhanden sein (119, S.106).

Um eine Zelle der Ergussflüssigkeit zytologisch als freie Tumorzelle einstufen zu können, muss sie nach den Kernzeichen eindeutig als maligne erkennbar sein (105, S.26). Dieses übliche Vorgehen der Beurteilung von Zellen kann sehr schwierig sein, vor allem wenn zellarmes Material vorliegt. In solchen Fällen kann nach histologischer Färbung das Elektronenmikroskop herangezogen werden. Eine weitere Möglichkeit wurde vor einigen Jahren hierfür entdeckt: die Immunzytologie (6, S.1212-1213).

1.4.2. Immunzytologische Diagnostik

Immunzytochemische Analysen von Zentrifugationspräparaten sind mittlerweile eine weit verbreitete Methode eine größere Genauigkeit bei der Diagnostik von Zellen zu erreichen (13, S.85; 43, S.594). Diese recht einfache Methode wurde bisher vor allem bei Aszites und Pleuraergüssen zur Ergänzung der konventionellen zytologischen Diagnostik herangezogen (67, S.30). Hier steht die Unterscheidung von benignen und malignen Ergüssen im Vordergrund.

Durch Immunreaktion zwischen einem Farbmakierten Antikörper und dessen spezifischen Zell-Antigen werden Zellen, die dieses Antigen exprimieren, sichtbar. Selbst einzelne Zellen können unter Millionen von nicht markierten Zellen erkannt und anhand klassischer Kernkriterien untersucht werden.

Für eine klare und einfache Beurteilbarkeit ist die Benutzung hoch sensitiver und spezifischer Antikörper von großer Bedeutung (6, S.1213).

So sollten die verwendeten Antigene nicht an benignen Zellen exprimiert werden. Entzündliche Zellen verschiedener Prozesse z.B. bei Tuberkulose, Abdomentrauma, Leberzirrhose und Herzinsuffizienz sollten Idealerweise keine Immunreaktion mit

dem verwendeten Antikörper eingehen, so dass keine falsch-positiven Ergebnisse entstehen. Auf der Gegenseite sollte durch eine hohe Sensitivität der verwendeten Antikörpern die falsch-negativen Resultate minimiert werden.

Antikörper zur spezifischen Unterscheidung von Zellen nach deren Histiogenese sind bei malignen Ergüssen von hoher Relevanz. So kann eine spezifische Differenzierung bei der Primärtumorsuche den Weg weisen (62, S.137).

Mehrere verschiedene Antikörper wurden bereits herangezogen, um die malignen Zellen in peritonealen Lavageflüssigkeiten zu entschlüsseln. Häufig verwendete Antikörper waren z.B. Zytokeratin, CEA, Ber-Ep4, HEA-125, B72.3, AUA1, MCA-b-12 und EMA (40, S.4965; 42, S.95; 59, S.213; 62, S.137; 67, S.30; 79, S.267; 100, S.297). Zytokeratine, MCA-b-12 und EMA (epithelial membrane antigen) sowie viele weitere Antikörper scheiterten in Untersuchungen, wegen ihrer positiven Anfärbung von Mesothelzellen. B72.3 zeigt nur eine unregelmäßige Reaktion mit bestimmten Karzinomtypen, so dass es häufig zu falsch-negativen Ergebnissen bei Verwendung dieses Antikörpers kommen kann.

Obwohl HEA-125 bzw. Ber-Ep4 in den meisten Studien keine Antigenpräsentation mit Mesothelzellen beschrieben wird, konnte in einzelnen Fällen unklare Färbungen beobachtet werden, bei denen keine sichere morphologische Unterscheidung zwischen mesothelialen und epithelialen Ursprungs erfolgen konnte. CEA zeigte keinerlei Anfärbung von Mesothelzellen (42, S.96; 67, S.33; 100, S.300-301).

In der Studie von Robinson et al. zeigte AUA1 die gleichen Ergebnisse wie Ber-Ep4 nur zeigte AUA1 eine geringere Färbeintensität. Im Vergleich von CEA zu Ber-Ep4 konnte ein Karzinomzellnachweis von 71% mit CEA im Vergleich zu 89% mit dem MAK Ber-Ep4 festgestellt werden (79, S.267).

So scheint der MAK Ber-Ep4, trotz seiner beschriebenen seltenen unspezifischen Reaktionen, vielen anderen Antikörpern überlegen.

1.5. Das epitheliale Antigen EPG 4 und der monoklonale Antikörper Ber-Ep4

Der monoklonale Antikörper Ber-Ep4 wurde erstmals 1990 von Latza et al. beschrieben. Er bindet an den Proteinteil zweier nicht kovalent gebundenen Glykopolypeptidketten (34 kd und 39 kd).

Dieses epitheliale Glykoprotein 34 (Egp 34: Mp 34 000) kommt auf sämtlichen epithelialen Zellen und deren malignen Varianten, nicht aber auf reaktiven oder malignen mesothelialen Zellen vor. Auch auf der Oberfläche mesodermaler und neuronaler Zellen konnte dieses Zellmembranprotein nicht nachgewiesen werden (59, S.213).

Der MAK Ber-Ep4 erkennt das gleiche Oberflächenantigen wie der von Perez und Walker beschriebene MAK KS $\frac{1}{4}$ und ist homolog zum tumorassoziierten Antigen GA 733. Diese Proteine zeigen identische Sequenzen wie das Nidogen, ein extrazelluläres Matrixadhäsionsprotein. EGP zeigt außerdem Ähnlichkeiten mit weiteren Adhäsionsproteinen, weshalb Simon et al. vermutet, dass dieses Zelloberflächenmolekül EGP bei der Zell-Zell- oder Zell-Matrix- Interaktion beteiligt ist (99, S.2755).

Mit dem identischen oder zumindest angrenzenden Epitop reagiert der von Momburg et al. relativ zeitgleich gefundene MAK HEA-125. Ergebnisse bei der Untersuchung beider Antikörper sind identisch.

So konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Ber-Ep4 bzw. HEA-125 bei der Unterscheidung epithelialer von normalen, reaktiven und neoplastischen mesothelialer Zellen von großem Wert ist.

Ber-EP4 erkennt Proteine, die sich biochemisch von epithelassozierten Antigenen wie Keratin, Epithelmembranantigen, Leu-M1 und CEA unterscheiden.

Latza et al. fanden heraus, dass alle normalen epithelialen Zellen mit Ausnahme von Hepatozyten, Parietalzellen und apikale Squamosaepithelzellen Ber-Ep4 exprimieren. Gleichzeitig konnte keine Ber-Ep4-Exprimierung von mesothelialen Zellen auch nicht beim malignen Mesotheliom nachgewiesen werden (59, S.218).

Die Arbeitsgruppen von Sheibani et al. sowie De Angelis et al. konnten ebenfalls keinen Ber-Ep4 Nachweis an Mesothelzellen bestätigen und demonstrieren Ber-Ep4 als einen zuverlässigen Marker bei der Unterscheidung von Adenokarzinomen und Mesotheliomen (14, S.779; 92, S.111).

Im Gegensatz zu diesen früheren Studien konnte Diaz-Arias et al. jedoch eine positive Ber-Ep4 Färbung bei 2% seiner untersuchten benignen Ergussflüssigkeiten feststellen. Dies könnte an dem hohen Anteil reaktiver Ergussflüssigkeiten innerhalb seiner Studie liegen. Aber auch die verwendete Technik unterscheidet sich von der von Latza et al. verwendeten APAAP-Methode. So arbeitete Diaz-Arias et al. mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Technik, die sensitiver als viele andere Techniken ist. Somit konnte Diaz-Arias zeigen, dass die immunhistochemische Färbung mit Ber-Ep4 nicht absolut spezifisch bei der Diagnose Adenokarzinom in Ergussflüssigkeiten ist. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten einer gynäkologischer Zweiterkrankung wurde in Betracht gezogen, weil alle Patienten mit falsch-positiver Ber-Ep4-Färbung weiblich waren und gynäkologische Zusatzerkrankungen wie Leiomyome oder Endometriose hatten (15, S.516-517,520).

Auch nach Befunden von Mezger et al. wurden bei reaktiv proliferierenden ("aktiven") Mesothelzellen Reaktionen beobachtet. Diese Diskrepanz in den Angaben der Literatur wurde mit der großen Seltenheit auftretenden positiv reagierender reaktiver Mesothelzellen erklärt. So fanden sich in der Untersuchung von Mezger et al. bei 4 von 55 benignen Fällen wenige egp34 positive Mesothelien. Ebenso wurde in zwei Fällen auch bei Mesotheliomen eine egp34-Expression nachgewiesen. So scheint es, dass Ber-Ep4 nicht streng spezifisch für epitheliale Zellen ist (67, S.33).

Bailey et al. konnte auf der Gegenseite wieder eine Spezifität von 100% zeigen. Er betont die erhebliche Vereinfachung durch Immunzytologie bei der Beurteilung zytologischer Proben. Immunfärbungen mit Ber-Ep4 zeigen eine membranöse Färbung. Keine mesothelialen Zellen zeigen diese Membrananfärbung. Die Abgrenzung zu unspezifischen schwachen Hintergrundfärbung sollte erfolgen und als negativ gewertet werden (6, S.1212-1213).

Zusammenfassend kann für den Antikörper Ber-Ep4 eine diagnostische Sensitivität zum Nachweis epithelialer Tumoren zwischen 67% und 100% angegeben werden. Seine Spezifität bewegt sich zwischen 96% und 100% (14, S.111; 15, S.516; 59, S.218; 92, S.783).

Wird bei der Untersuchung nicht nur eine positive Farbreaktion gewertet, sondern wird auf Membranfärbung geachtet und erfolgt eine zusätzliche Zellbeurteilung anhand der typischen Kernkriterien für maligne Zellen kann Ber-Ep4 als Gold-Standard-Antikörper zum Nachweis von epithelialen Tumoren in der Immunzytologie eingesetzt werden. Vor allem bei der Differenzierung zwischen Adenokarzinomzellen und Mesotheliomen ist dieser Antikörper weiterhin führend.

1.6. Das karzinoembryonale Antigen CEA und sein Antikörper

Das erstmals 1965 von Gold und Freedman beschriebene karzinoembryonale Antigen CEA ist ein hoch glycosyliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 180 kD (26, S.455-459; 27, S.471,474-479). Es gehört zu einer großen Familie von serologisch kreuzreagierenden und kreuzhybridisierenden Molekülen aus der Immunoglobulinen-Superfamilie und kann heute Mithilfe monoklonaler Antikörper sicher von mehreren kreuzreagierenden Antigenen unterschieden und spezifisch gemessen werden. Immunhistologisch ist es regelmäßig im fetalen Gastrointestinaltrakt sowie vorwiegend in entodermalen Tumoren nachzuweisen und ist ein bekannter Tumormarker bei mehreren Karzinomen.

Sehr geringe Konzentrationen finden sich auch in normalem Darmgewebe. Als Zelloberflächenglykoprotein wird CEA von den meisten normalen Epithelien exprimiert (40, S.4967; 58, S.43-45).

Bei benignen Tumoren des Pankreas, Colon und Rektum konnten Gold und Freedman keine messbaren Tumor spezifischen Antigene nachweisen. Sie vermuten, dass Tumorzellen erst ab einem bestimmten Organisationsverlust (Orientierung) und einem gewissen Grad der Entdifferenzierung diese Antigene produzieren. Weiter beobachteten sie, dass Karzinome des unteren Gastrointestinaltrakts (Colon und Rektum) höhere Antigenkonzentrationen aufweisen als Karzinome des oberen Abschnittes (Ösophagus und Magen). Die gleichen Antikörper finden sich zwischen dem 2. und 6. Gestationsmonat in fetalem Darmgewebe, Pankreas und in fetaler Leber. So kam es zu der Bezeichnung als „Carcinoembryonale Antikörper“ (27, S.471,474-479).

CEA-Spiegel im Serum weisen je nach Test meist eine obere Referenzgrenze um 3-5 ng/ml auf. Leicht höhere Spiegel finden sich z.B. bei starken Rauchern, so schließt sich an die angegebene Referenzgrenze eine Grauzone (zwischen 5 und 10 ng/ml) an. Auch benigne Grunderkrankungen wie Leberzirrhose, Extrahepatische Gallengangsobstruktion, Cholangitis oder dialysepflichtige Niereinsuffizienz gehen häufig mit einem erhöhten CEA-Nachweis einher (68, S.160). Werte über 15-20 ng/ml gelten als malignitätsverdächtig (58, S.44).

Das Kolon-/ Rektumkarzinom ist nach wie vor noch der wichtigste Zieltumor der CEA-Bestimmung. Hier wird mit der höchsten Kategorie I vom AJCC den Einschluss des präoperativen Serum-CEA-Wertes in das TNM-Staging gefordert. Ansonsten kommen CEA-Spiegelerhöhungen noch bei anderen Karzinomen vor.

Die häufigsten sind Magen- (45%), Bronchial- (71%) und metastasierendes Mammakarzinom (54%). Beim Magenkarzinom ist der präoperative CEA-Wert ein unabhängiger Prädiktor für das Überleben. Er korreliert mit Tumorgröße und -stadium, Invasionstiefe sowie Lymphknoten-, peritonealer und Lebermetastasierung (58, S.44-45).

Nicht nur Serumspiegel, sondern auch CEA Bestimmungen der peritonealen Spülflüssigkeit wurden untersucht. In Hinblick auf die Entdeckung einer mikroskopischen Dissemination wurden zwei Studien von Asao et al. veröffentlicht. Er untersuchte CEA-Spiegel in peritonealen Spülflüssigkeiten bei Magenkarzinompatienten. Er schloss, dass CEA-Spiegel in Peritonealspülflüssigkeit ein sensitiver Detektor unsichtbarer peritonealer Dissemination und ein neuer Prognosefaktor für die postoperative Prognose beim Magenkarzinom ist (4, S.44; 5, S.79).

Nishiyama et al. berichtete das peritoneales CEA sehr gut mit dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls, der Metastasierung und der Tiefe der Tumorwandinfiltration korreliert (74, S.135).

Neuerdings gibt es einige Studien die disseminierte Tumorzellen in der Bauchhöhle durch RT-PCR von CEA mRNA bei Magenkrebspatienten untersuchen. Imada et al. untersuchten die Antigenexpression von CEA in Tumorgewebe und ermittelte eine Positivrate von 94,3% (40, S.4966).

Nakanishi et al. konnten zeigen, dass CEA als Ziel Antigen für die RT-PCR Technik sehr spezifisch und hoch sensitiv ist (72, S.411).

Als Tumorantigen ist CEA bei der Zellinteraktion beteiligt. Bei Untersuchungen bezüglich seiner biologischen Eigenschaften und Funktion wurde vorwiegend eine Rolle als intrazelluläres Adhäsionsmolekül beschrieben (68, S.160). Die Überproduktion an CEA korreliert mit dem Ausmaß der Tumorerkrankung.

Es wird vermutet, dass diese Adhäsionsmoleküle eine Ausbreitung der Tumorerkrankung begünstigen. Auf der einen Seite wird der Einfluss auf die Gewebearchitektur und auf der anderen der Einfluss auf die Invasion von Tumorzellen mit folglich Metastasenbildung beschrieben. Aufgrund einer CEA Überproduktion kommt es zu einer Unterbrechung der normalen interzellulären Adhäsionskräften. Dies führt zu einer vermehrten Zellbewegung und einem Verlust der geordneten Gewebearchitektur. Die normal auftretenden stärkeren Adhäsionskräften nach lateral und zur Basalmembran werden aufgehoben. Zellaggregate lösen sich leichter vom Primärtumor als einzelne Tumorzellen. Diese Zellverbände haben darüber hinaus eine bessere Überlebenschance bei der Zirkulation im Körper oder bei der Einnistung in ein anderes Organ. Diese Vermutung kann dadurch unterstützt werden, dass Kolonkarzinompatientin mit Lebermetastasen einen höheren Nachweis an CEA mRNA und CEA Protein aufweisen und auch höhere CEA-Serumspiegel aufweisen (7, S.332).

1.7. Fragestellung

Die prognostische Bedeutung freier Tumorzellen für das Überleben nach residuumtumorfreier Resektion beim Magenkarzinom konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Dabei waren die Immunzytologischen Nachweisverfahren für freie intraperitoneale Tumorzellen mit dem Antikörper Ber-Ep4 dreimal sensitiver als die konventionelle Zytologie (73, S.611).

Wir haben eine prospektive Studie an Magenkarzinompatienten durchgeführt mit der Fragestellung, ob der immunzytologische Nachweis von CEA in den freien intraperitonealen Tumorzellen im Vergleich zu dem Nachweis mit Hilfe des Antiköpers Ber-Ep4 einen zusätzlichen prognostischen Unterschied bzw. Gewinn zeigt.

Spezielle Ziele dieser Untersuchung waren:

1. In welcher Häufigkeit konnten Tumorzellen in der Peritoneallavage immunzytologisch mit einem Antikörper gegen CEA nachgewiesen werden und können die bekannten Ergebnisse mit dem Antikörper Ber-Ep4 an dem größeren Kollektiv bestätigt werden?
2. Welcher Unterschied zeigt der Nachweis von Ber-Ep4 positiven Tumorzellen im Vergleich von CEA positiven Tumorzellen zum Überleben im Gesamtkollektiv bzw. im R0-reserzierten Kollektiv und Subgruppen?
3. Besteht im Vergleich zu etablierten Prognosefaktoren eine eigenständige unabhängige prognostische Bedeutung der immunhistochemisch mit CEA nachgewiesenen intraperitonealen Tumorzellen?
4. Kann mit Hilfe des immunzytologischen Nachweises freier Tumorzellen eine Risikostratifizierung (Prognosemodell) definiert werden?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Studienkollektiv

Zwischen Oktober 1987 und Dezember 2001 wurde in der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München bei 723 Patienten, die wegen eine histologisch gesicherten Magenkarzinoms behandelt wurden, eine Zytologie in Form einer intraoperativen bzw. einer laparoskopischen Peritoneallavage oder einer Aszitesasservation entnommen.

2.1.1. Studieneinschlusskriterien

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, damit die Patienten in unsere Studie aufgenommen werden konnten:

- histologisch gesichertes Magenkarzinom
- intraoperative Peritoneallavage durchgeführt und auswertbar
- keine neoadjuvante/ präoperative Chemotherapie durchgeführt
- postoperative Überlebenszeit mehr als 3 Monate
- keine Zweittumoren

Aufgrund eines Gefrierschrankdefektes war die Peritoneallavage von 231 eingefrorenen Proben aus dem Zeitraum Mai 1998 bis Dezember 1999 nicht auswertbar. 148 Patienten erhielten präoperativ Chemotherapie. 17 Patienten verstarben innerhalb den ersten 12 Wochen nach der Operation, und bei 14 Patienten wurden Zweittumore diagnostiziert.

Damit reduzierte sich das Studienkollektiv auf 313 Patienten. Bei 230 Patienten wurde eine R0-Resektion durchgeführt, bei 33 Patienten eine R1-Resektion und bei 50 eine R2-Resektion.

2.1.2. Alter und Geschlecht der Patienten

Das Studienkollektiv umfasste 119 weibliche Patienten (38%) und 194 männliche Patienten (62%). Das Durchschnittsalter der Frauen lag bei 68 +/- 5 Jahren (von 26 bis 87 Jahre), das der Männer lag bei 64 +/- 3 Jahren (von 34 bis 93 Jahre).

2.1.3. Operationsverfahren

Operation	Patienten	
	n =	
Subtotale Resektion	69	22 %
Gastrektomie	113	36 %
Erweiterte Gastrektomie	119	38 %
Transmediastinale Ösophagektomie	2	< 1 %
Restgastrektomie	10	3 %

Tabelle 2.1: Angewandte Operationsverfahren

Das Resektionsausmaß und wurde gemäß dem standardisierten Operationsprotokoll der Deutschen Magenkarzinomstudienengruppe durchgeführt (80, S.2090).

Tumorresektion und Lymphadenektomie wurden bestimmt von Tumorlokalisierung, Tumorstadium und histologischen Typ (Laurén-Klassifikation). Die Lymphknoten wurden vollständig im Sinne einer „en-bloc“-Lymphadenektomie in Anlehnung an die Empfehlung der japanischen Magenkarzinomstudie (Japanese Research Society for Gastric Cancer, JRSGC) reseziert (80, S.2090).

2.1.4. Tumorstadium

Stadium	Kategorie	Patienten	
		n	
I A	pT1 pN0 pM0	67	21,4 %
I B	{ pT1 pN1 pM0 pT2 pN0 pM0	5	1,6 %
		45	14,4 %
		50	16,0 %
II	{ pT1 pN2 pM0 pT2 pN1 pM0 pT3 pN0 pM0	3	1,0 %
		24	7,7 %
		13	4,2 %
		40	12,8 %
III A	{ pT2 pN2 pM0 pT3 pN1 pM0 pT4 pN0 pM0	26	8,3 %
		20	6,4 %
		2	0,6 %
		48	15,3 %
III B	pT3 pN2 pM0	19	6,0 %
IV	{ pT4 pN1-3 pM0 pT1-3 pN3 pM0 pTx pNx pM1	11	3,5 %
		11	3,5 %
		67	21,4 %
		89	28,4 %

Tabelle 2.2: Stadienverteilung (UICC, 2001) bei 313 Magenkarzinompatienten

2.1.5. Datenerhebung

Erfasst wurde das klinische Staging, die intraoperative Befundung, die histopathologische Aufarbeitung und der postoperative Verlauf:

Alle Daten wurden in Dokumentationsbogen, aufgeführt im Anhang (S.78), prospektiv zusammengetragen.

2.1.6. Nachbeobachtung

Im ersten postoperativen Jahr wurde eine dreimonatliche und später in sechsmonatigen Abständen eine Tumornachsorge durchgeführt. Hierfür wurde ein Fragebogen (siehe Anhang auf S.78) den zuständigen Ärzten übersandt und durch Telefoninterviews ergänzt.

Folgende Untersuchungen wurden nach festgelegtem Schema durchgeführt:

1. Anamnese und klinische Untersuchung
 2. Routinelabor, Tumormarkerbestimmung (CEA, CA19-9, CA12-5, TPA, CA 72-4)
 3. Oberbauchsonographie, Endoskopie, Endosonographie, Computertomographie Abdomen, Skelettszintigraphie
 4. Untersuchung zur Sicherung eines Rezidivs:
 - Punktion (Histologie, Zytologie)
 - (Relaparotomie)

Der Zeitpunkt eines Rezidivs wurde durch klinische, laborchemische (Tumormarkern) und radiomorphologische Parameter festgelegt. Eine alleinige Erhöhung von Tumormarkern reichte nicht für die Wertung als Rezidiv.

Alle Patienten wurden, soweit sie nicht vorher verstarben, mindestens 24 Monate nachbeobachtet.

192 Patienten (83%) von 230 R0-Resezierten Patienten blieben im beobachteten Zeitraum rezidivfrei.

Von den 313 Patienten des Studienkollektivs verstarben insgesamt 159 Patienten. Von diesen Patienten verstarben 31 aufgrund einer anderer Todesursache. Deren Überlebenszeit wurde als zensierter Datensatz berücksichtigt.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Probenasservation

Direkt nach der Laparotomie wurde bei vorhandenem Aszites 6 Proben à 50 ml asserviert. Hatte der Patient kein Aszites wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Hierfür wurde der suprakolische Raum mit 500 ml und der infrakolische Raum mit 200 ml Ringerlösung gespült. Davon wurden 6 Proben à 50 ml asserviert. Die Proben wurden mit 100 mg EDTA / 100 ml Probe versetzt. Zur Aufarbeitung und Untersuchung wurde die Hälfte der Proben dem Zytologischen Institut der TU München (Prof. Schenck) und die andere Hälfte dem onkologischen Labor der Chirurgischen Klinik zugeführt.

2.2.2. Probenaufarbeitung

2.2.2.1. Cytospinpräparation zur Immunzytologie

Im onkologischen Labor der Chirurgischen Klinik der TU München wurde die Probenflüssigkeit bei 1500 rpm 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet mit 10 ml Hämolysepuffer 10 Minuten inkubiert. Danach wurden sie gepoolt und zweimal mit RPMI- Lösung, durch Auffüllen auf 50 ml mit RPMI-Lösung, anschließend Abzentrifugieren und den Überstand abkippen, gewaschen. Mit isotoner Kochsalzlösung wurde das Zentrifugat suspensiert, bis es milchglasfarben war.

Pro Objektträger wurden 100 µl Suspension in der Zytozentrifuge 3 Minuten mit 1500 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Objektträger 1 Minute mit 1500 rpm bei Raumtemperatur trocken zentrifugiert.

Es wurden jeweils 6 Zytozentrifugenpräparate angefertigt und über Nacht getrocknet. Zur Asservation wurden sie danach bei minus 80°C eingefroren. Jeweils 4 Präparate wurden immunhistochemisch gefärbt, ein Präparat wurde als May-Grünwald-Giemsa modifizierte Schnellzytologie-Färbung der Immunhistochemie zur Seite gestellt. Das sechste Präparat wurde zur Reserve bei minus 80°C weiter asserviert.

2.2.3. Färbung

2.2.3.1. Konventionelle Färbung der Zytozentrifugenpräparate (Chirurgisches Labor)

Die Färbung ist eine nach May-Grünwald-Giemsa modifizierte Färbung. Sie wird als Schnellzytologie-Färbung (Dauer ca. 5 Min.) im Handel von der Firma Dade Behring Marburg GmbH (Diff-Quick, Bestell-Nr.: 1330833/ 34/ 35) angeboten.

Die Färbung wurde zur Überprüfung der Zellerhaltung, sowie der Begleitinfiltrate und zur Beurteilung der Kernkriterien der Immunzytologie an die Seite gestellt.

2.2.3.2. Immunzytologie

Mit immunhistochemischen Färbeverfahren wie in dieser Arbeit verwendeten APAAP-Methode können Gewebsantigene angefärbt werden, die von monoklonalen Antikörpern erkannt und durch ein angekoppeltes, chromogenumsetzendes Enzym sichtbar gemacht werden.

Dieses Enzym, im Falle von APAAP Alkalische Phosphatase wird nicht wie bei ähnlichen Methoden an den Fc-Teil eines Antikörpers gebunden, sondern wird durch Antikörper komplexiert, die seine antigene Struktur erkennen. Durch diese Bindung wird jedoch die Arbeit des aktiven Zentrums nicht behindert.

Die Immunkomplexe bestehen aus einem Antikörper, der zwei Enzymmoleküle bindet. So werden mehrere Enzymmoleküle an ein Gewebsantigen gekoppelt. Eventuell vorhandene endogene Alkalische Phosphatase lässt sich durch Zugabe von Levamisol blocken.

Der immunzytologischen Färbeprozess im Sinne einer APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) dauert ca. fünf Stunden.

Nach dem Auftauen müssen die Cytospinpräparate 10 Minuten in Azeton fixiert werden. Danach folgen eine Reihe von Inkubationsschritten mit verschiedenen Antikörpern:

Das Gewebsantigen wird primär durch einen monoklonalen Antikörper erkannt, der in einer anderen Tierspezies gegen das gewünschte Antigen hergestellt wird. In dieser Arbeit wurde Ber-Ep4 und CEA mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten verwendet. Im nächsten Schritt wird dann ein sog. Brückenantikörper für weitere 30 Minuten auf die Cytospinpräparate aufgebracht. Er ist in einer dritten Spezies hergestellt und gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und soll den primären Antikörper mit dem APAAP-Komplex verbinden. Der Antikörper des APAAP-Komplexes muss also in der selben Spezies hergestellt sein wie die primären Antikörper, gegen die die Brückenantikörper gerichtet sind. Außerdem muss der Brückenantikörper im Überschuss vorhanden sein, damit möglichst oft nur eine seiner zwei Bindungsstellen am primären AK bindet und die andere für den APAAP-Komplex frei bleibt. Der APAAP-Komplex wird 30 Minuten lang inkubiert. Durch Wiederholung der Inkubation mit dem Brücken-AK und APAAP-Komplex ist es möglich, die Intensität der Farbreaktion zu verbessern. Es kommt zu einer Signalverstärkung und gleichzeitig können so unspezifische Bindungen reduziert werden.

Für weitere 30 Minuten wird mit Hilfe von Neufuchsin-haltiger Entwicklungslösung das Chromogen zugesetzt. Dieses wird vom Enzym Alkalische Phosphatase in einen Farbstoff umgewandelt. Die Gewebsantigene werden letztlich durch das rote Reaktionsprodukt sichtbar gemacht.

Zur Beurteilung der kernmorphologischen Kriterien erfolgt eine Blau-Gegenfärbung für 5 Minuten.

Die detaillierten Schritte unserer Färbung sind im Anhang (siehe 7.1 auf S.78) nachzuvollziehen.

Bei jeder Färbung wurde für die Positivkontrolle ein Magenkarzinomresektatschnitt mitverarbeitet. Für die Negativkontrolle wurde bei jedem Patienten ein zytologisches Zentrifugationspräparat im ersten Schritt mit PBS anstelle des Primärantikörpers behandelt.

Die **Auswertung** erfolgte unabhängig von der konventionellen Färbung in vier Kategorien:

- Negativ
- Positiv/ keine Tumorzellen: positive Anfärbung ohne Hinweis auf Tumorzellmorphologie
- vereinzelt positive Zellen mit zytologischen Kernkriterien für Malignität ($\leq 5/40 \times$ Gesichtsfeld)
- zahlreich positive Zellen mit zytologischen Kernkriterien für Malignität ($> 5/40 \times$ Gesichtsfeld)

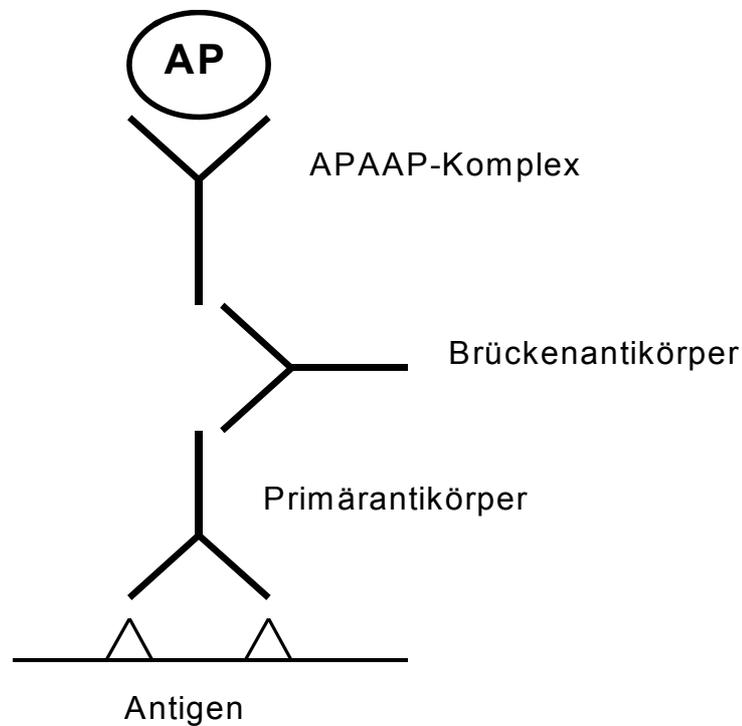


Abbildung 2.1: Alkalische-Phosphatase (AP)-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex-Methode

3. Statistische Analyse

Das Statistikprogramm NCSS 5.X SERIES von Dr. Jerry L. Hintze, 329 North 1000 East, Kaysville, Utah 8437, (801) 546-0445 lieferte uns die vergleichende statistische Auswertung.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde die statistische Signifikanz von Häufigkeitsverteilungen berechnet.

Die Überlebenszeiten der einzelnen Patientengruppen wurden deskriptiv verglichen.

Hierfür wurde zur graphischen Darstellung der postoperativen

Überlebenswahrscheinlichkeit die Methode nach Kaplan-Meier (47, S.457)

herangezogen. Die einzelnen Gruppen eines Merkmals (z.B. Geschlecht, pM,

Lymphangiosis carcinomatosa, Residualtumorstatus) wurden mit dem Log-Rang-Test bezüglich ihrer Unterschiede der Überlebenswahrscheinlichkeit überprüft.

Zur Bestimmung der Prognosefaktoren diente die Cox-Regressions-Analyse als univariate und multivariate Überlebensanalyse. Nach Einteilung in Minimum und Maximum nach dem 95%-Konfidenzintervall konnte das Relative Risiko der einzelnen prognostischen Variablen berechnet werden.

Für alle Tests galt die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$.

4. Ergebnisse

4.1. Gesamtstudienkollektiv

4.1.1. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich

CEA	Ber-Ep4			
	negativ n= 130 (41,5%)	positiv/ keine Tumorzellen n= 78 (24,9%)	vereinzelt positive Tumorzellen* n= 72 (23,0%)	zahlreich positive Tumorzellen** n= 33 (10,5%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
negativ n= 221 (70,6%)	130 (41,5%)	71 (22,7%)	20 (6,4%)	0
positiv/ keine Tumorzellen n= 12 (3,8%)	0	7 (2,2%)	4 (1,3%)	1 (0,3%)
vereinzelt positive Tumorzellen* n= 67 (21,4%)	0	0	47 (15,0%)	20 (6,4%)
zahlreich positive Tumorzellen** n= 13 (4,2%)	0	0	1 (0,3%)	12 (3,8%)

Chi-Quadrat-Test: p>0,0001
 * <5 Zellen/ 40x Gesichtsfeld
 ** >5 Zellen/ 40x Gesichtsfeld

Tabelle 4.1: Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus Immunzytologie mit CEA (Gesamtkollektiv n=313)

Die Gruppe der positiven Anfärbung ohne Hinweis auf Tumorzellmorphologie wurde als negative Färbung gewertet. Bei dieser Positivfärbung handelt es sich um eine Membranfärbung von Mesothelzellen oder um positives phagozytiertes Material in Makrophagen. Dieses Phänomen wurde in 24,9% der Ber-Ep4 Färbungen und in 3,8% der CEA Färbungen beobachtet.

Für die weitere Auswertung wurde die Gruppe an Patienten mit wenigen Tumorzellen mit der Gruppe der zahlreichen Tumorzellen zusammengefasst.

CEA	Ber-Ep4	
	negativ n= 208 (66,5%)	positiv n= 105 (33,5%)
negativ n= 233 (74,4%)	208 (66,5%)	25 (8,0%)
positiv n= 80 (25,6%)	0	80 (25,5%)

Chi- Quadrat-Test: p> 0,0001

Tabelle 4.2: Zusammenfassende Beurteilung des Vergleichs der Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus der Immunzytologie mit CEA (Gesamtkollektiv n=313)

Eine positive Färbung mit dem Antikörper Ber-Ep4 bei zusätzlich vorhandenen histomorphologischen Kernkriterien für Malignität zeigte unser Studienkollektiv in 33,5%. Mit dem Antikörper CEA war unser Ergebnis bei gleicher Beurteilung 25,6%. Alle CEA positiven Präparate zeigten auch eine positive Ber-Ep4 Färbung. Bei 233 Patienten mit einem CEA negativem Ergebnis zeigte sich dennoch bei 25 eine positive Färbung mit dem Antikörper Ber-Ep4 (10,7%).

4.1.2. Verteilung des Nachweises intraperitonealer Tumorzellen zwischen den einzelnen Tumorstadien

4.1.2.1. Verteilung und Residualtumor

Variable	Patienten	Ber-Ep4 negativ	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ	CEA positiv	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
R-Gruppe					
R 0	230 (73,5)	183 (79,6)	20 (8,7)	27 (11,7)	
R 1	33 (10,5)	16 (48,5)	3 (9,1)	14 (42,4)	
R 2	50 (16,0)	9 (18,0)	2 (4,0)	39 (78,0)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tabelle 4.3: Nachweis intraabdominaler freier Tumorzellen und R-Status des Gesamtstudienkollektivs (n= 313)

Das Gesamtstudienkollektiv setzt sich zusammen, aus 230 Patienten mit residualtumorfrei reseziertem Magenkarzinom, 33 Patienten mit mikroskopischem und 50 Patienten mit makroskopischen Tumorrest.

11,7% der R0 resezierten Patienten zeigten eine positive Ep4- und CEA-Färbung. Bei vorhandenem mikroskopischen Residualtumor waren es 42,4% und beim makroskopischen 78% der Fälle. Diese Ergebnisse entsprechen einer alleinigen CEA-Färbung.

Wenn die Ber-Ep4 Färbung alleine betrachtet wird, sind bei 20,4% der R0 resezierten, bei 51,5% der R1 resezierten und bei 82,0% der R2 resezierten Patienten positive Färbungen aufgetreten.

Die Werte unterschieden sich signifikant.

4.1.2.2. Verteilung und TNM-Stadium

Variable	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
Primärtumor					
pT 1	76 (24,3)	70 (92,1)	1 (1,3)	5 (6,6)	
pT 2	107 (34,2)	89 (83,2)	11 (10,3)	7 (6,5)	
pT 3	99 (31,6)	39 (39,4)	10 (10,1)	50 (50,5)	
pT 4	31 (9,9)	10 (32,3)	3 (9,7)	18 (58,1)	
Regionäre Lymphknoten					
pN 0	129 (41,2)	116 (89,9)	5 (3,9)	8 (6,2)	
pN 1	63 (20,1)	41 (65,1)	7 (11,1)	15 (23,8)	
pN 2	94 (30,0)	42 (44,7)	12 (12,8)	40 (42,6)	
pN 3	27 (8,6)	9 (33,3)	1 (3,7)	17 (63,0)	
Fernmetastasen					
pM 0	246 (78,6)	190 (77,2)	22 (8,9)	34 (13,8)	
pM 1	67 (21,4)	18 (26,9)	3 (4,5)	46 (68,7)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.4: Nachweis intraabdominaler ‚freier‘ Tumorzellen und TNM Einteilung bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs

Bei dem Vergleich unserer Färbungen mit der TNM Einteilung konnte gezeigt werden, dass schon in einer pT1-Situation in 7,9 % der Fälle freie Tumorzellen auftreten. 6,6% der pT1-Patienten hatten einen Tumorzellnachweis mit dem Antikörper CEA. Die Betrachtung der Ber-Ep4 Färbung zeigt einen Nachweis in 7,9% der pT1 Patienten im Vergleich zu 16,8% der pT2 Patienten. Bei einem Befall der Serosa wurden in 50,5% der Fälle mittels CEA Immunzytologie freie Tumorzellen entdeckt. Die Ber-Ep4 Immunzytologie erhöht die Detektionsrate um 10,1% Punkten. Auch in einer pN0 Situation konnte mittels der CEA Färbung in 6,2 % der Fälle freie Tumorzellen nachgewiesen werden.

Mit zunehmendem lymphogenen Metastasierung ist eine zunehmende Zahl von freien Tumorzellen verzeichnet worden. Alle Werte unterschieden sich signifikant. Ebenso zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Vorhandensein von Fernmetastasen.

4.1.2.3. Verteilung und UICC-Stadium

Stadium	Kategorie	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
				CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
I A	pT1 pN0 pM0	67 (21,4)	63 (94,0)	1 (1,6)	3 (4,5)	
I B	pT1 pN1 pM0	5 (1,6)	3 (60,0)	0	2 (40,0)	
	pT2 pN0 pM0	45 (14,4)	41 (91,1)	3 (6,7)	1 (2,2)	
		50 (16,0)	44 (88,0)	3 (6,0)	3 (6,0)	
II	pT1 pN2 pM0	3 (1,0)	3 (100)	0	0	
	pT2 pN1 pM0	24 (7,7)	21 (87,5)	3 (12,5)	0	
	pT3 pN0 pM0	13 (4,2)	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)	
		40 (12,8)	34 (85,0)	4 (10,0)	2 (5,0)	
III A	pT2 pN2 pM0	26 (8,3)	18 (69,2)	5 (19,2)	3 (11,5)	
	pT3 pN1 pM0	20 (6,4)	11 (55,0)	3 (15,0)	6 (30,0)	
	pT4 pN0 pM0	2 (0,6)	1 (50,0)	0	1 (50,0)	n.s.
		48 (15,3)	30 (62,5)	8 (16,7)	10 (20,8)	
III B	pT3 pN2 pM0	19 (6,0)	7 (36,8)	3 (15,8)	9 (47,4)	
IV	pT4 pN1-3 pM0	11 (3,5)	6 (54,5)	3 (27,3)	2 (18,2)	n.s.
	pT1-3 pN3 pM0	11 (3,5)	6 (54,5)	0	5 (45,5)	
	pTx pNx pM1	67 (21,4)	18 (26,9)	3 (4,5)	46 (68,7)	
		89 (28,4)	30 (33,7)	6 (6,7)	53 (59,6)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Zumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.5: Verteilung Färbeergebnisse zur UICC-Stadieneinteilung des Gesamtstudienkollektivs
n= 313

Die Anzahl der freien Tumorzellen steigen mit zunehmendem Stadium an. Jedoch zeigt sich bei Betrachtung der CEA Färbung kein wesentlicher Unterschied zwischen Stadium I und Stadium II. Bei der Ber-Ep4 Färbung kommt es bei zunehmendem Stadium zu einer steigenden Anzahl freier Tumorzellen. So liegt der Nachweis FPTC mittels Ber-Ep4 in Stadium IA bei 6,1%, in Stadium IB bei 12% und in Stadium II bei 15% der Fälle.

Vergleicht man bei gleicher Tumordinfiltration die Zunahme der lymphogenen Metastasierung mit den immunzytologisch positiven Ergebnissen, korreliert sie mit der Anzahl freier Tumorzellen. Bei einem Serosabefall ohne lymphogene Metastasierung wurden in 15,4%, mit pN1-Befall in 30% und mit pN2-Befall in 47,4% der Fälle freie Tumorzellen nachgewiesen.

4.1.2.4. Verteilung und histomorphologische Kriterien

Histologie	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
WHO-Klassifikation					
tubulär	133 (42,5)	103 (77,4)	11 (8,3)	19 (14,3)	
papillär	17 (5,4)	11 (64,7)	3 (17,6)	3 (17,6)	
muzinös	18 (5,8)	12 (66,7)	1 (5,6)	5 (27,8)	
Siegelringzell- CA	136 (43,5)	75 (55,1)	10 (7,4)	51 (37,5)	
undifferenziert	8 (2,6)	6 (75,0)	0	2 (25,0)	
unklassifiziert	1 (0,3)	1 (100)	0	0	
Laurén					
Intestinaler Typ	152 (48,6)	114 (75,0)	14 (9,2)	24 (15,8)	
Mischtyp	35 (11,2)	23 (65,7)	3 (8,6)	9 (25,7)	
difuser Typ	117 (27,4)	64 (54,7)	8 (6,8)	45 (38,5)	
nicht klassifizierbar	9 (2,9)	7 (77,8)	0	2 (22,2)	
Grading					
gut differenziert	2 (0,6)	2 (100,0)	0	0	
mäßig differenziert	64 (20,4)	50 (78,1)	7 (10,9)	7 (10,9)	
schlecht differenziert	236 (75,4)	150 (63,6)	18 (7,6)	68 (28,8)	
undifferenziert	11 (3,5)	6 (54,5)	0	5 (45,5)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test
n.s.= nicht signifikant (p<0.05)
Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.6: Nachweis intraabdomineller freier umorzellen und histomorphologische Kriterien bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs

Variable	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
pM 1					
pM 1 ohne Peritonealkarzinose	24 (7,7)	12 (50,0)	3 (12,5)	9 (37,5)	
pM 1 mit Peritonealkarzinose	43 (13,7)	6 (14,0)	0	37 (86,0)	
Peritonealkarzinose (intraop.-makroskop.)					
negativ	272 (86,9)	203 (74,6)	24 (8,8)	45 (16,5)	
lokaler Magenwandbefall	8 (2,6)	3 (37,5)	1 (12,5)	4 (50,0)	
peritoneale Implantate	26 (8,3)	2 (7,7)	0	24 (92,3)	
Tumoraszites	7 (2,2)	0	0	7 (100)	
Lymphangiosis carcinomatosa					
nicht vorhanden	199 (63,7)	154 (77,4)	14 (7,0)	31 (15,6)	
vorhanden	114 (36,4)	54 (47,4)	11 (9,6)	49 (43,0)	
Angioinvasion					
nicht vorhanden	281 (89,8)	196 (69,8)	19 (6,8)	66 (23,5)	
vorhanden	32 (10,2)	12 (37,5)	6 (18,8)	14 (43,8)	
konventionelle Zytologie					
negativ	251 (80,2)	205 (81,7)	14 (5,6)	32 (12,7)	
verdächtig	30 (9,6)	3 (10,0)	8 (26,7)	19 (63,3)	
positiv	32 (10,2)	0	3 (9,4)	29 (90,6)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test
n.s.= nicht signifikant (p<0.05)
Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.7: Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und weitere histomorphologische Kriterien bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs

Sowohl die WHO-Klassifikation als auch die Laurén-Klassifikation und das Grading korrelierte signifikant mit dem Vorkommen freier Tumorzellen (siehe Tabelle 4.6). Ist bei der Fernmetastasierung (siehe Tabelle 4.7) eine Peritonealkarzinose vorhanden, zeigen 86% dieser Patienten freie Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung. In dieser Situation gab es keine Konstellation von gleichzeitigem Vorliegen einer Ber-Ep4 positiver und CEA negativer Färbung. Alle sieben Tumoraszitespunktionen zeigten positive immunzytologische Ergebnisse. Bei intraoperativ makroskopisch nicht vorhandener Peritonealkarzinose wurden bei 16,5% der Patienten in der Peritoneallavage freie Tumorzellen mit Hilfe der CEA Färbung entdeckt. Mittels Ber-Ep4 Färbung war ein Nachweis von 25,3% der Fälle möglich.

Eine signifikante Korrelation findet sich auch zwischen der intraoperativen, makroskopisch beurteilten Ausbreitung einer Peritonealkarzinose mit dem Vorhandensein freier intraperitonealer Tumorzellen.

Lymphangiosis carcinomatosa und Angioinvasion korrelierte mit dem immunzytologischen Nachweis freier Tumorzellen.

Im Vergleich zur konventionellen zytologischen Färbung zeigten 18,3% der negativ beurteilten konventionellen Zytologien Tumorzellen in der Immunhistochemie. 69,6% dieser Patienten wiesen bei beiden Antikörperfärbungen Tumorzellen nach. Allerdings zeigten 9,4% der Patienten mit konventionell erfassten FPTC keine Bestätigungsfärbung mit CEA auf. Jedoch zeigten alle eine immunzytologische Reaktion mit Ber-Ep4.

4.2. R0-Kollektiv

4.2.1. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich im residualtumorfrei resezierten Kollektiv

CEA	Ber-Ep4			
	negativ n= 113 (49,1%)	positiv/ keine Tumorzellen n= 70 (30,4%)	vereinzelt positive Tumorzellen* n= 37 (16,1%)	zahlreich positive Tumorzellen** n= 10 (4,3%)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
negativ n= 193 (83,9%)	113 (49,1)	65 (28,3)	15 (6,5)	0
positiv/ keine Tumorzellen n= 10 (4,3%)	0	5 (2,2)	4 (1,7)	1 (0,4)
vereinzelt positive Tumorzellen* n= 24 (10,4%)	0	0	18 (7,8)	6 (2,6)
zahlreich positive Tumorzellen** n= 3 (1,3%)	0	0	0	3 (1,3)

Chi-Quadrat-Test: p>0,0001
 * <5 Zellen/ 40x Gesichtsfeld
 ** >5 Zellen/ 40x Gesichtsfeld

Tabelle 4.8: Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus Immunzytologie mit CEA bei 230 R0-resezierten Patienten

230 Patienten des Gesamtkollektivs wurden residualtumorfrei reseziert. Bei 113 dieser Patienten war ein Tumorzellnachweis auszuschließen. 70 Patienten zeigten eine positive immunzytologische Färbung ohne positiven Kernkriterien für Malignität. Die Ergebnisse wurden wieder zu jeweils zwei Gruppen zusammengefasst (siehe Tabelle 4.9):

CEA	Ber-Ep4	
	negativ n= 183 (79,6%)	positiv n= 47 (20,4%)
	n (%)	n (%)
negativ n= 203 (88,3%)	183 (79,6)	20 (8,7)
positiv n= 27 (11,7%)	0	27 (11,7)
Chi- Quadrat-Test: p> 0,0001		

Tabelle 4.9: Zusammenfassende Beurteilung des Vergleichs der Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus der Immunzytologie mit CEA bei 230 R0-reserzierten Patienten

Im Vergleich zu dem Gesamtkollektiv ist die Detektionsrate deutlich niedriger. Mit Ber-Ep4 werden in 20,4% der Fälle freie Tumorzellen in der Spülzytologie gefunden. Mit dem carcinoembryonalen Antigen liegt die Rate nur bei 11,7%.

4.2.2. Verteilung des Nachweises intraperitonealer Tumorzellen zwischen den einzelnen Tumorstadien im residualtumorfrei resezierten Kollektiv

4.2.2.1. Verteilung und TNM-Stadium (R0-Kollektiv)

Variable	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
Primärtumor					n.s.
pT 1	75 (32,6)	69 (92,0)	1 (1,3)	5 (6,7)	
pT 2	101 (43,9)	84 (83,2)	11 (10,9)	6 (5,9)	
pT 3	48 (20,9)	27 (56,3)	7 (14,6)	14 (29,2)	
pT 4	6 (2,6)	3 (50,0)	1 (16,7)	2 (33,3)	
Regionäre Lymphknoten					
pN 0	124 (53,9)	113 (91,1)	5 (4,0)	6 (4,8)	
pN 1	53 (23,0)	37 (69,8)	7 (13,2)	9 (17,0)	
pN 2	42 (18,3)	27 (64,3)	8 (19,0)	7 (16,7)	
pN 3	11 (4,8)	6 (54,5)	0	5 (45,5)	
Fernmetastasen					
pM 0	220 (95,7)	178 (80,9)	19 (8,6)	23 (10,5)	
pM 1	10 (4,3)	5 (50,0)	1 (10,0)	4 (40,0)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.10: Nachweis intraabdominaler ‚freier‘ Tumorzellen und TNM Einteilung bei 230 Patienten des R0-Kollektivs

Bei 12,6% der Patienten deren Tumor noch nicht in die Serosa eingebrochen ist wurden freie Tumorzellen mit beiden Antikörpern nachgewiesen.

Die Beurteilung der CEA-Färbung zeigt bei geringer Tumorstadiuminfiltration, pT1 im Vergleich zu pT2 keinen wesentlichen Unterschied. Ebenso bei Zunahme der lymphogenen Metastasierung von pN2 zu pN3 kann kein Zuwachs von freien Tumorzellen gezeigt werden. Anders, wenn die Ber-Ep4 Färbung berücksichtigt wird. 8% der Patienten mit pT1-Tumor, 16,8% der Patienten mit pT2-Tumor, 43,8% der

Patienten mit pT3-Tumr und 50% der Patienten mit pT4-Tumor weisen eine positive Immunzytologie auf.

Dementsprechend zeigt sich auch ein Zuwachs bei dem Fortschreiten einer lymphogenen Metastasierung. Bei 8,8% der Nodal-negativen Patienten, 30,2% der pN1-, 35,7% der pN2- und 45,5% der pN3-Patienten finden sich FPTC bei immunhistochemischen Färbung mit Ber-Ep4.

4.2.2.2. Verteilung und UICC-Stadium (R0-Kollektiv)

Stadium	Kategorie	Patienten n (%)	Ber-Ep4negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
				CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
I A	pT1 pN0 pM0	67 (29,1)	63 (94,0)	1 (1,5)	3 (4,5)	
I B	pT1 pN1 pM0	5 (2,2)	3 (60,0)	0	2 (40,0)	
	pT2 pN0 pM0	45 (19,6)	41 (91,1)	3 (6,7)	1 (2,2)	
		50 (21,7)	44 (88,0)	3 (6,0)	3 (6,0)	
II	pT1 pN2 pM0	3 (1,3)	3 (100)	0	0	
	pT2 pN1 pM0	23 (10,0)	20 (87,0)	3 (13,0)	0	
	pT3 pN0 pM0	11 (4,8)	8 (72,7)	1 (9,1)	2 (18,2)	
		37 (16,1)	31 (83,8)	4 (10,8)	2 (5,4)	
III A	pT2 pN2 pM0	24 (10,4)	17 (70,8)	5 (20,8)	2 (8,3)	
	pT3 pN1 pM0	19 (8,3)	11 (57,9)	3 (15,8)	5 (26,3)	
	pT4 pN0 pM0	/	/	/	/	
		43 (18,7)	28 (65,1)	8 (18,6)	7 (16,3)	
III B	pT3 pN2 pM0	8 (3,5)	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	n.s.
IV	pT4 pN1-3 pM0	4 (1,7)	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	n.s.
	pT1-3 pN3 pM0	11 (4,8)	6 (54,5)	0	5 (45,4)	
	pTx pNx pM1	10 (4,3)	5 (50,0)	1 (10,0)	4 (40,0)	
		25 (10,9)	13 (52,0)	2 (8,0)	10 (40,0)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.11: Verteilung intraabdomineller Tumorzellen und UICC-Stadium beim R0-Kollektiv n=230

Bei Betrachtung der CEA-Färbung fällt auf, dass bei den frühen Stadien I und II die Häufigkeit freier Tumorzellen stadienunabhängig zwischen 4,5% und 6% liegt. Ab Stadium III kommt es zu einem steten Anstieg von 16,3% im Stadium IIIA, über 25% im Stadium IIIB, zu 40% im Stadium IV. Jedoch zeigte Stadium IIIB wegen der kleinen Fallzahl keine Signifikanz.

Bei der immunzytologischen Färbung mit Ber-Ep4 zeigt sich im Vergleich eine stadienabhängige Zunahme des Auftretens freier Tumorzellen schon in frühen Stadien. Stadium IA zeigt eine Häufigkeit von 6%, Stadium IB 12%, Stadium II 16,2% und Stadium IIIB 50%.

Mit 48% in Stadium IV kam es zu keinem weiteren Zuwachs. Diese Gruppe setzt sich zusammen aus pT4 pN+, pN3 und pM1-Patienten. Aufgrund einer geringen Anzahl von sechs Patienten mit pT4-Tumor (siehe auch Tabelle 4.10 auf S.47) konnte keine Signifikanz erreicht werden.

4.2.2.3. Verteilung und histomorphologische Kriterien (R0-Kollektiv)

Histologie	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
WHO-Klassifikation					
Tubulär	113 (49,1)	93 (82,3)	11 (9,7)	9 (8,0)	
Papillär	15 (6,5)	11 (73,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	
Muzinös	12 (5,2)	10 (83,3)	0	2 (16,7)	
Siegelringzell- CA	85 (37,0)	64 (75,3)	7 (8,2)	14 (16,5)	
Undifferenziert	4 (1,7)	4 (100)	0	0	
Unklassifiziert	1 (0,4)	1 (100)	0	0	
Laurén					
intestinaler Typ	126 (54,8)	103 (81,7)	12 (9,5)	11 (8,7)	
Mischtyp	28 (12,2)	21 (75,0)	3 (10,7)	4 (14,3)	
difuser Typ	71 (30,9)	54 (76,1)	5 (7,0)	12 (16,9)	
nicht klassifizierbar	5 (2,2)	5 (100)	0	0	
Grading					
gut differenziert	2 (0,9)	2 (100)	0	0	
mäßig differenziert	57 (24,8)	48 (84,2)	6 (10,5)	3 (5,3)	
schlecht differenziert	166 (72,2)	129 (77,7)	14 (8,4)	23 (13,9)	
Undifferenziert	5 (2,2)	4 (80,0)	0	1 (20,0)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.12: Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und histomorphologische Kriterien bei 230 Patienten des R0-Kollektiv

Bei dem Gesamtkollektiv konnte schon gezeigt werden, dass die histomorphologische WHO-Klassifikation, die Laurén-Klassifikation, sowie das Grading mit dem Auftreten freier Tumorzellen korrelierte. Auch in residuumtumorfrei reserzierten Situation waren alle Ergebnisse signifikant.

Variable	Patienten n (%)	Ber-Ep4 negativ n (%)	Ber-Ep4 positiv		P- Value
			CEA negativ n (%)	CEA positiv n (%)	
pM 1					
pM 1 ohne Peritonealkarzinose	6 (2,6)	3 (50,0)	1 (10,0)	2 (40,0)	n.s.
pM 1 mit Peritonealkarzinose	4 (1,7)	2 (50,0)	0	2 (50,0)	
Peritonealkarzinose (intraop.-makroskop.)					
negativ	229 (99,6)	182 (79,5)	20 (8,7)	27 (11,8)	
lokaler Magenwandbefall	1 (0,4)	1 (100)	0	0	
Lymphangiosis carcinomatosa					
nicht vorhanden	171 (74,3)	143 (83,6)	12 (7,0)	16 (9,3)	
vorhanden	59 (25,7)	40 (67,8)	8 (13,6)	11 (18,6)	
Angioinvasion					
nicht vorhanden	215 (93,5)	133 (61,9)	17 (7,9)	25 (11,6)	
vorhanden	15 (6,5)	10 (66,7)	3 (20,0)	2 (13,3)	
Konventionelle Zytologie					
negativ	207 (90,0)	181 (87,4)	12 (6,0)	14 (6,7)	
verdächtig	15 (6,5)	2 (13,3)	5 (33,3)	8 (53,3)	
positiv	8 (3,5)	0	3 (37,5)	5 (62,5)	

Statistische Analyse: Chi-Quadrat Test

n.s.= nicht signifikant (p<0.05)

Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.13: Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und histomorphologische Kriterien bei 230 Patienten des R0- Kollektivs

Intraoperativ konnte nur bei einem Patienten ein lokaler Magenwandbefall einer Peritonealkarzinose makroskopisch diagnostiziert werden. Hier zeigte sich weder mit der CEA noch der Ber-Ep4 immunzytologischen Färbung ein Tumorzellnachweis. Interessant ist jedoch, dass wir bei 11,8% der Patienten ohne makroskopischen Nachweis einer Peritonealkarzinose mittels CEA Färbung freie Tumorzellen gefunden haben. Mittels Ber-Ep4 Färbung waren es 20,5% dieser Patienten.

Die konventionelle Zytologie ergab einen Tumorzellnachweis in nur 3,5% der Fälle. 15 Patienten zeigten verdächtige Zellen bei der konventionellen Färbetechnik. Davon waren 2 Patienten (13,3%) nach unserer immunzytologischen Technik als negativ für den Tumorzellnachweis gewertet worden. 6,7% der Patienten, die negative Ergebnisse bei der konventionellen Routinezytologie hatten, wurde mit CEA Tumorzellen nachgewiesen. Ber-Ep4 schlug bei 12,7% dieser Patienten an.

4.3. Prognostische Bedeutung intraperitonealer freier Tumorzellen

4.3.1. Überlebensanalyse des Gesamtstudienkollektivs

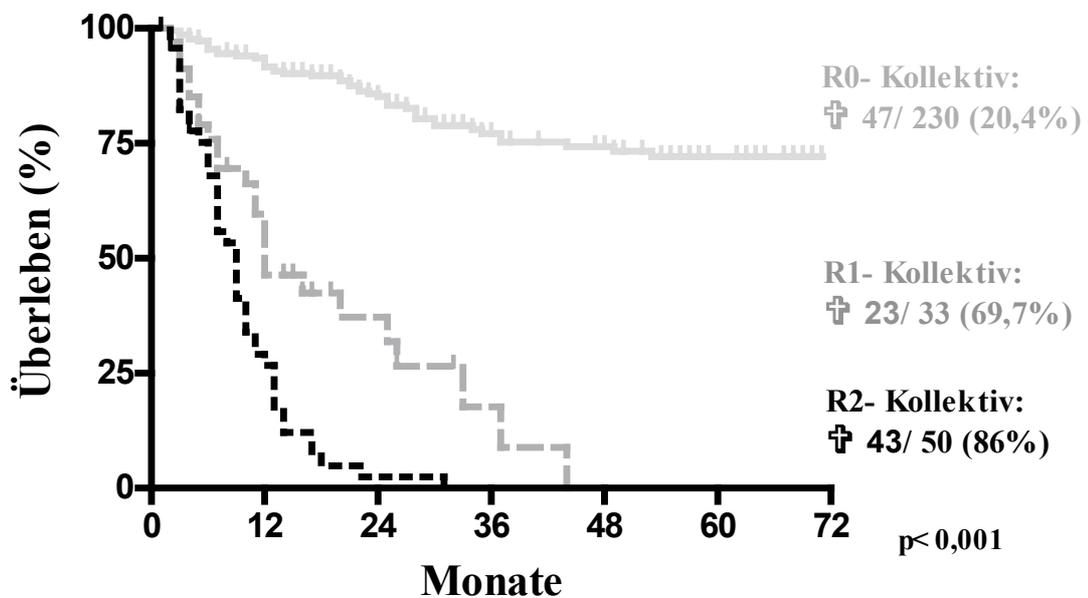


Abbildung 4.1: Gesamtüberleben und Residualtumor

Innerhalb unserer Nachbeobachtungszeit verstarben 113 Patienten unseres Gesamtkollektivs. 47 (20,4%) in der Gruppe der R0 resezierten Patienten. Bei 69,7% im R1-Kollektiv waren es 23 Patienten und 43 Patienten (86%) im R2-Kollektiv. Die mediane Überlebenszeit der Patienten die nicht residualtumorfrei reseziert werden konnten lag bei unter einem Jahr.

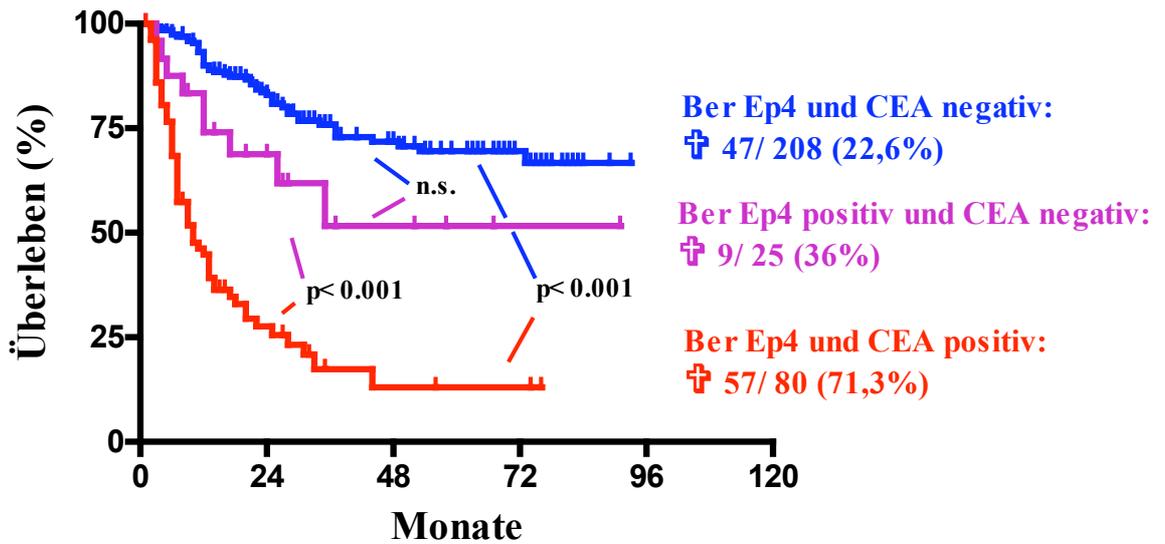


Abbildung 4.2: Gesamtüberleben und freie Tumorzellen in den einzelnen diagnostischen Patientenkollektiven, n= 313

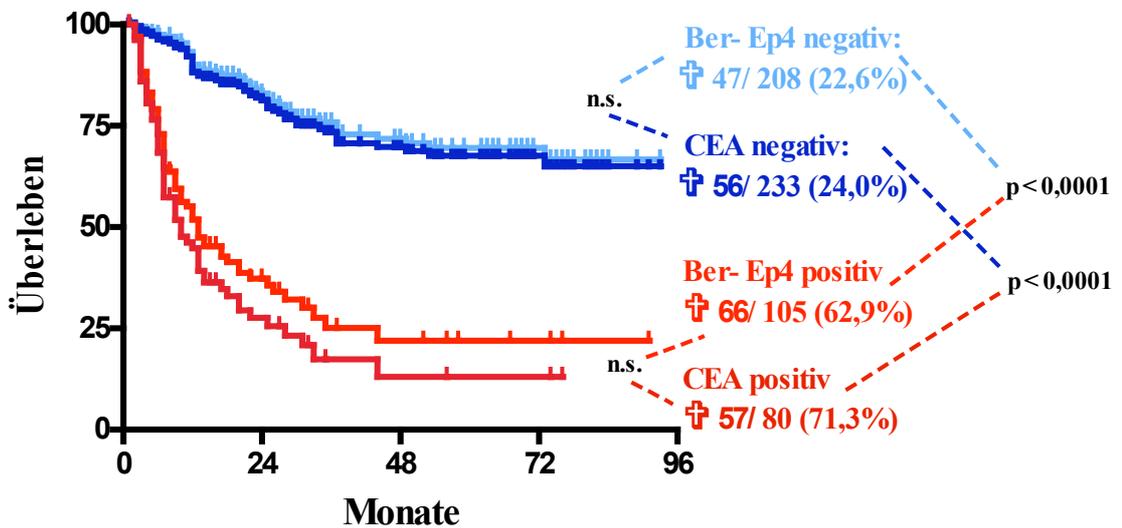


Abbildung 4.3: Gesamtüberleben und freie Tumorzellen in den einzelnen diagnostischen Patientenkollektiven Ber-Ep4 im Vergleich mit CEA, n= 313

Von 208 Patienten ohne immunhistochemischen Nachweis freien Tumorzellen der Bauchhöhle starben 47 innerhalb der Nachbeobachtungszeit (22,6%). Die mediane Überlebenszeit dieser Gruppe betrug mehr als 4 Jahre.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe mit CEA negativer aber Ber-Ep4 positiver Färbung, obwohl 36% dieser Patienten verstarben (siehe Abbildung 4.2 auf S.54). Werden beide Gruppen zusammen als Gruppe der CEA negativer Patienten gewertet (siehe Abbildung 4.3 auf S.54), ergibt sich eine Sterblichkeit von 24% dieser Patienten.

Sind Tumorzellen immunzytologisch mit CEA nachgewiesen, zeigt sich ein signifikanter Überlebenszeitunterschied. Von 80 Patienten sind bei einer medianen Überlebenszeit von weniger als 12 Monaten 57 Patienten verstorben (71,3%).

4.3.2. Überlebensanalyse der Patienten mit R0-Resektion

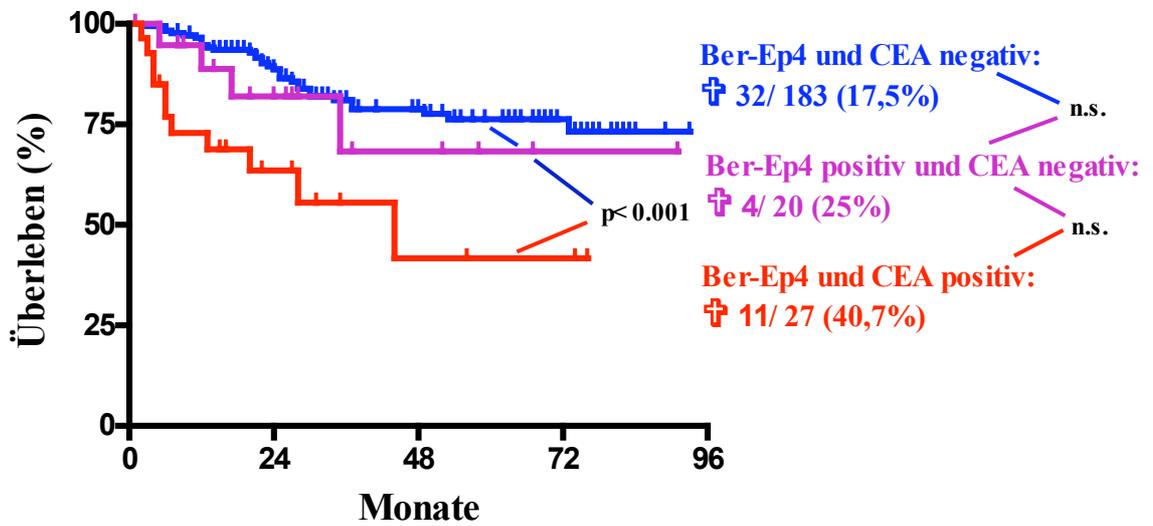


Abbildung 4.4: Überleben und freie Tumorzellen bei 230 R0-reserzierten Patienten

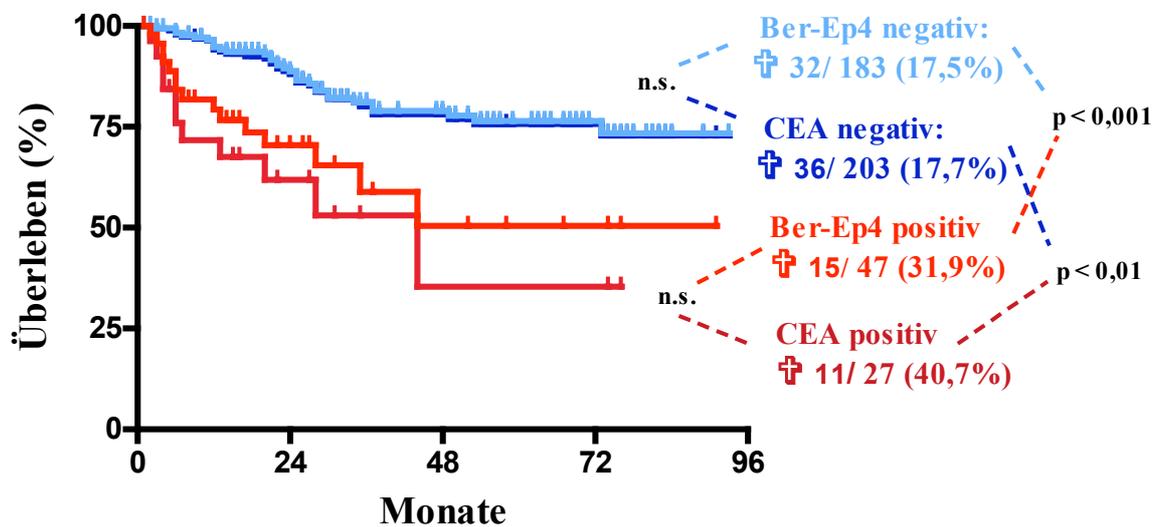


Abbildung 4.5: Überleben des R0- Kollektivs und Ber-Ep4- und CEA-Ergebnisse, n= 230

Von 230 Patienten, die residualtumorfrei reseziert werden konnten, verstarben insgesamt 47 Patienten.

32 Patienten verstarben aus der Gruppen von 183 Patienten bei denen die Peritoneallavage frei von Tumorzellen war.

Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit negativer Ber-Ep4 Färbung im Vergleich zu negativer CEA Färbung. Ebenso zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Positivfärbungen. Jedoch unterscheidet sich die Prognose durch negative und positive Immunzytologie signifikant ($p < 0.001$ für Ber-Ep4- und $p < 0.01$ für CEA-Färbung).

Einen Tumorzellnachweis mit Ber-Ep4-Färbung zeigten 47 Patienten, wovon 15 Patienten während unserer Nachbeobachtungszeit verstarben.

Von 27 Patienten mit CEA immunzytologisch nachgewiesenen Tumorzellen verstarben 11 Patienten innerhalb unserer Nachbeobachtungszeit. Die mediane Überlebenszeit lag unter 4 Jahren.

4.3.3. Univariate und multivariate Überlebensanalyse (Cox- Regressionsmodell)

Variable	Kategorie	Univariate	Multivariate Analyse		
		p- Value*	p- Value*	Relatives Risiko	Konvidenzintervall
Peritonealkarzinose (intraop.-makroskopisch)	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.0001	n.s.		
Resektionsgruppe	R0/ R1, R2	<0.0001	<0.0001	11.47	7.60 - 17,32
Primärtumor (pT)**	T1, T2/ T3, T4	<0.0001	n.s.		
Lymphknotenstatus (pN)**	N0/ N1, N2	<0.0001	<0.0001	6.62	3.47 - 12.64
Fernmetastasen (pM)**	M0/ M1	<0.0001	n.s.		
WHO- Klassifikation	differenziert/ undifferenziert	n.s.	n.s.		
Lymphangiosis carcinomatosa	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.0001	<0.0001	2.25	1.52 - 3.33
Konventionelle Zytologie	negativ/ verdächtig/ positiv	<0.0001	n.s.		
Immunzytologie mit Ber-Ep4	negativ/ positiv	<0.0001	n.s.		
Immunzytologie mit CEA	negativ/ positiv	<0.0001	0.0043	1.97	1.23 - 3.16
kombinierte Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA	beide negativ/ nur Ber-Ep4 positiv/ beide positiv	<0.0001	n.s.		

* n.s.= nicht signifikant (p<0.05)
** Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.14: Cox-Regressionsmodell beim Gesamtkollektiv

In der univariate Cox-Regressions-Analyse des Gesamtkollektivs konnte gezeigt werden, dass die Faktoren Resektionsstatus ($p < 0.0001$), Primärtumor ($p < 0.0001$), Lymphknotenstatus ($p < 0.0001$), Fernmetastasen ($p < 0.0001$), Lymphangiosis carcinomatosa ($p < 0.0001$), Peritonealkarzinomatose ($p < 0.0001$), konventionelle Zytologie ($p < 0.0001$), Immunzytologie mit CEA ($p < 0.0001$) und kombinierte Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA ($p < 0.0001$) statistisch signifikant mit der Überlebenszeit von Magenkarzinompatienten korreliert waren.

Nicht signifikant war die Differenzierung nach WHO- Klassifikation.

In der multivariaten Cox-Regressions-Analyse waren unabhängige Prognosefaktoren Resektionsgruppe (Relatives Risiko = 11.47), Lymphknotenstatus (Relatives Risiko = 6.62), Lymphangiosis carcinomatosa (Relatives Risiko = 2.25) und Immunzytologie mit CEA (Relatives Risiko = 1.97) zum Überleben von Magenkarzinompatienten korreliert (siehe auch Tabelle 4.14).

Variable	Kategorie	Univariate	Multivariate Analyse		
		p- Value*	p- Value*	Relatives Risiko	Konvidenzintervall
Peritonealkarzinose (intraop.-makroskopisch)	vorhanden/ nicht vorhanden	n.s.	n.s.		
Primärtumor (pT)**	T1, T2/ T3, T4	<0.0001	n.s.		
Lymphknotenstatus (pN)**	N0/ N1, N2	<0.0001	<0.0001	7.69	3.72 - 15.88
Fernmetastasen (pM)**	M0/ M1	<0.0001	n.s.		
WHO- Klassifikation	differenziert/ undifferenziert	n.s.	n.s.		
Lymphangiosis carcinomatosa	vorhanden/ nicht vorhanden	<0.0001	0.0033	2.44	1.35 - 4.38
Konventionelle Zytologie	negativ/ verdächtig/ positiv	n.s.	n.s.		
Immunzytologie mit Ber-Ep4	negativ/ positiv	0.0006	n.s.		
Immunzytologie mit CEA	negativ/ positiv	<0.0001	0.0010	3.32	1.61 - 6.86
kombinierte Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA	beide negativ/ nur Ber-Ep4 positiv/ beide positiv	<0.0001	n.s.		

* n.s.= nicht signifikant (p<0.05)
 ** Tumorstadium nach UICC, 2001

Tabelle 4.15: Cox-Regressionsmodell beim R0-Kollektiv

In der univariaten Cox-Regressions-Analyse des Subkollektivs mit residuumtumorfrei resezierten Magenkarzinompatienten konnte eine statistische Signifikanz der Korrelation von Überlebenszeit und folgenden Faktoren gesichert werden:

Primärtumor ($p < 0.0001$), Lymphknotenstatus ($p < 0.0001$), Fernmetastasen ($p < 0.0001$), Lymphangiosis carcinomatosa ($p < 0.0001$), Immunzytologie mit Ber-Ep4 ($p = 0.006$), Immunzytologie mit CEA ($p < 0.0001$) und kombinierte Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA ($p < 0.0001$).

Keine Signifikanz der Korrelation zeigte die Peritonealkarzinose, die WHO-Klassifikation in bezug auf die Tumordifferenzierung, und die konventionelle Zytologie.

Die multivariate Cox-Regressions-Analyse bestätigte als unabhängige Prognosefaktoren zum Überleben von R0-reserzierten Magenkarzinompatienten den Lymphknotenstatus mit einem Relativen Risiko von 7.69, die Lymphangiosis carcinomatosa mit dem Relativen Risiko von 2.44 und die CEA-Immunzytologie mit einem Relativen Risiko von 3.32 (siehe auch Tabelle 4.15). Eine alleinige Färbung mit Ber-Ep4 konnte nicht als unabhängig prognostischer Faktor in der multivariaten Analyse ermittelt werden. Auch eine Kombination beider Antikörper zum Nachweis freier intraperitonealer Tumorzellen kann nicht als unabhängiger Prognosefaktor gewertet werden.

5. Diskussion

Ziel unserer Untersuchung war es zu klären, welche prognostische Bedeutung freie Tumorzellen in der Bauchhöhle haben, inwieweit das Auftreten freier Tumorzellen stadienabhängig ist und ob sich konventionelle Zytologie und Immunzytologie bzgl. Sensibilität und Spezifität beim Nachweis von Tumorzellen in der Peritoneallavage unterscheiden. Weiter sollte der Einfluß des CEA-Immunzytologischen Nachweises von Tumorzellen auf den bisher beschriebenen Ber-Ep4-Immunzytologischen Tumorzellnachweis überprüft werden und ob durch den CEA-Einsatz Risikosubgruppen gebildet werden können. Schließlich sollte überprüft werden, inwieweit im Vergleich zu etablierten Prognosefaktoren eine eigenständige unabhängige prognostische Bedeutung der immunhistochemisch mit Ber-Ep4 oder CEA nachgewiesenen intraperitonealer Tumorzellen besteht.

Anhand von 313 Patienten, darunter 230 residuumtumorfrei resezierte Magenkarzinompatienten haben wir die prognostische Bedeutung freier Tumorzellen in der Abdominalhöhle beim Magenkarzinom prospektiv untersucht. Alle Patienten hatten vor der Magenresektion eine diagnostischen Lavage, die einerseits konventionell-zytologisch, andererseits immunzytologisch mit zwei verschiedenen Antikörpern Ber-Ep4 und CEA auf freie Tumorzellen hin untersucht wurde.

5.1. Methode

5.1.1. Nachweismethoden intraperitonealer freier Tumorzellen im Vergleich

Es liegen zahlreiche Studien zur Untersuchung freier Tumorzellen in der Peritoneallavage vor. In dieser Arbeit werden 35 Veröffentlichungen mit unseren Ergebnissen verglichen (siehe Tabelle 5.1 auf S.66). Seit 1989 wurde die prognostische Bedeutung freier Tumorzellen untersucht und auch nachgewiesen.

Allerdings führte die Mehrzahl dieser Studiengruppen ihre Untersuchung mittels konventioneller Zytologie durch. Die Ergebnisse dieser Methode schwankt erheblich, so reicht die Nachweisrate je nach Studie ungeachtet des Residualtumorstatus von 4% bis 50%. Jonas et al. konnte jedoch für sein Ergebnis von 50% keine prognostische Relevanz nachweisen. Vielleicht liegt dies an seinem kleinen Studienkollektiv von 18 Patienten (44, S.101-106). Etwas darunter liegt die Inzidenz von Tumorzellen mit 42% in der Studie präsentiert von Vogel und Kollegen (104, S.515).

Ein Grund für diese Diskrepanz ist sicherlich die unterschiedliche Zusammensetzung der Kollektive. Werden jedoch für einen genaueren Vergleich die Daten in Abhängigkeit des Resektionsstatus der Patienten verglichen, reicht die Inzidenz freier Tumorzellen bei Residualtumorfreiheit auch von 3% bis 25%. Der Grund hierfür ist sicherlich, die schwierige Unterscheidung der Tumorzellen von reaktiven Mesothelzellen oder Makrophagen. Somit sind die Ergebnisse stark vom Untersucher abhängig.

Die größte Fehlerquelle dieser konventionellen zytologischen Diagnostik ist daher das Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen. Nakajima und Mitarbeiter berichten, dass 32% ihrer Patienten mit makroskopischer Peritonealkarzinose keinen Tumorzellnachweis bei der Lavagediagnostik hatten. Kann es sein, dass die Tumorzellen so in das Peritoneum verwachsen sind, dass sie sich nicht ablösen, wie es die o.g. Kollegen vermuten?

Vielmehr lässt vermuten, dass Tumorzellen einfach nicht als solche erkannt werden, in der Unsicherheit reaktive, jedoch benigne Zellen falsch positiv zu werten.

Die Sensitivität dieser Methode scheint daher keine überzeugende Verlässlichkeit zu bieten. Viele Patienten mit negativem Tumorzellnachweis entwickeln dennoch eine Peritonealkarzinose (69, S.228; 73, S.617).

Auf der Suche nach einer sensitiveren Methode wurden weitere Verfahren überprüft. Asao et al. befasste sich mit dem reinen Nachweis des CEA Gehaltes der peritonealen Lavageflüssigkeit und zeigte seine Ergebnisse in zwei Veröffentlichungen. In seiner ersten Studie konnte er bei 41% seiner Patienten mit Magenkarzinom einen erhöhten CEA Gehalt nachweisen. Werte über 100 ng/g wurden als auffällig gewertet. Das Überleben der Patienten mit erhöhtem CEA Gehalt war signifikant schlechter als das der Patienten ohne erhöhte CEA Werte. Ebenso korrelierte das Auftreten eines peritonealen Rezidivs mit dem Nachweis eines erhöhten peritonealem CEA Spiegels (5, S.79-81).

Asao et al. unterscheidete in seiner ersten Veröffentlichung nicht zwischen R0 und R+ Resektion. Jedoch in seiner Folgestudie 1991: So wurden bei 22% der R0 Patienten und 74% der R+ Patienten erhöhte CEA Level gefunden (4, S.44-46). Im Vergleich mit zwei weiteren Studien, bei denen Ergebnisse von 13% und 18% bei R0 Patienten und 70% bei R+ Patienten vorliegen, scheint diese Methodik im Vergleich zur konventionellen Zytologieuntersuchung einen sehr hohen Anteil an Risikopatienten zu liefern. Inwieweit hier eine zu geringe Spezifität dieser Methode besteht, oder inwiefern erhöhte Serum CEA-Spiegel Einfluss auf den CEA Gehalt der Peritonealspülflüssigkeit nehmen, wurde bisher nicht geklärt (1, S.356-361; 4, S.44-47; 5, S.79-81; 74, S.133-137).

Eine weitere Methode, die zum Einsatz kam, um intraperitoneale Tumorzellen mit einer höheren Sensitivität zu detektieren, ist die Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Mithilfe dieses Verfahrens, bei dem CEA als Zielgen verwendet wurde, ging die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse zurück. Zwischen 26% und 31% der R0 reserzierten Magenkarzinompatienten hatten einen positiven CEA mRNA Nachweis (71, S.687; 53, S.429; 112, S.521). Das Problem dieses Systems jedoch ist, dass die Genamplifikation und Analyse einige Zeit benötigt, so dass keine Ergebnisse noch während der Operation vorliegen können. Außerdem wurden mit dieser Methode auch einige falsch positiv gewertet, was wahrscheinlich auf die CEA-Expression von Nicht-Tumorzellen zurückzuführen ist. Eine Zytokin

induzierte CEA mRNA Expression kann diesem Phänomen zugrunde liegen (55, S.500,505; 76, S.436,440-441).

Seit einigen Jahren kann aufgrund von Innovationen in der PCR Technologie, mittels einer neuen Generation von Thermischen Cyclern (Light Cycler; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) eine quantitative Erfassung von mRNA erfolgen (55, S.500,505).

Ein Problem der real-time RT-PCR ist die unspezifische Amplifikation, vermutlich verursacht durch endogene CEA mRNA von nichtkanzerogenen Zellen der Bauchspülflüssigkeit. So konnte auch bei benignen Erkrankungen ein absoluter p-CEA mRNA Spiegel ermittelt werden (76, S.440-441). Um dieses Phänomen zu korrigieren, empfiehlt Kodera et al. (55, S.505) die Etablierung eines „cut-off levels“. Für die Berechnung dieses „cut-off“-Wertes werden die p-CEA mRNA Spiegel Peritonealspülungen benignen Erkrankungen als Referenz herangezogen. Kodera et al. konnte durch Festlegen, dass kein T1 Tumoren als positiv gewertet wird, einen „cut-off“-Wert bestimmen und dadurch eine Sensitivität von 80% und Spezifität von 94% seiner Methode erreichen (55, S.505).

Die Inzidenz von p-CEA mRNA mit dieser Nachweismethode liegen zwischen 17% und 28% (72, S.414; 55, S.503; 56, S.73; 76, S.439).

Als Erweiterung zu einer konventionellen zytologischen Untersuchung war auch die Immunzytologie Bestandteil einiger Veröffentlichungen und auch diese Arbeit basiert auf dieser Antikörperreaktion. Die Ergebnisse dieses Verfahrens unterliegen ebenso erheblichen Schwankungen wie die konventionelle Zytologie. Dies liegt wohl hauptsächlich daran, dass verschiedene Arbeitsgruppen verschiedene Antikörper zum Nachweis von Tumorzellen verwendet haben. Drei Studien wurden mit jeweils fünf verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Bei 27% bis 55% der R0-reserzierten Patienten wurden mittels spezifischer Antikörper Tumorzellen detektiert. Verwendet wurden verschiedene Monoklonale Antikörper, die mit tumorassoziierten Antigenen reagieren (anti-CEA, anti-CA-19-9, anti-17-I-A, anti-C54-0, anti-Ra96, anti-CC, anti-p53, anti-AUA 1 und anti-B27) (31, S.521; 46, S.331; 86, S.373).

Der Vorteil der immunzytologischen Untersuchung ist eine hochspezifische und hochsensible Differenzierungsmöglichkeit zwischen reaktiven Mesothelzellen und Karzinomzellen. Jedoch sollte auch hier die Malignitätsbeurteilung wie bei der konventionellen zytologischen Untersuchung über Kernkriterien erfolgen.

Schott et al. gibt hierüber keine Angabe in seiner Veröffentlichung. Vielmehr wurde jede Probe als positiv gewertet, sobald auch nur eine Zelle positiv mit einem der fünf Antikörper reagiert hatte. Sicherlich kann so seine sehr hohe Detektionsrate von 55% erklärt werden (86, S.373).

Zwei Studiengruppen arbeiteten nur mit dem Antikörper gegen das epitheliale Glykoprotein 34 und verwendeten den Ber-Ep 4 bzw. HEA 125 Antikörper (73, S.611; 104, S.515). Hier konnten nur bei 20-30% dieser Patienten Tumorzellen detektiert werden.

Das epitheliale Antigen Egp 34 wird als Oberflächenantigen auf epithelialen Zellen nicht aber mesodermaler oder neuraler Zellen exprimiert. Auch bei deren Entartung wird das Ber-Ep4 bei intestinalen Karzinomzellen weiterhin nachgewiesen.

Dementsprechend tritt dieses Antigen auch bei Mesotheliomen und Mesothelzellen oder mesotheliale Hyperplasien nicht auf und ist daher ideal zur Abgrenzung von aktivierten Mesothelzellen gegenüber freien epithelialen Tumorzellen der Bauchhöhle (59, S.213).

Dies ist wohl der Grund weshalb dieses Antigen in einzelnen Studien allein untersucht wurde. Nekarda et al. konnte hierdurch zeigen, dass die Immunzytologie (Ber-Ep 4) im Vergleich zur konventionellen Zytologie um den Faktor 3 sensitiver ist (73, S.617).

Das carcinoembryonale Antigen CEA ist dahingehend nur in verhornendem Epithel, jedoch nicht in normalen Zellen des schleimbildenden Epithels nachzuweisen. Angaben zu der Häufigkeit des Vorkommens von CEA bei malignen Magentumoren liegen bei 45% (58, S.45).

Dennoch ist das carcinoembryonale Antigen CEA bei dem direkten Nachweis in peritonealer Spülflüssigkeit oder über neuere CEA mRNA Isolierungen weiter in ständiger Diskussion in Bezug auf die Eruierung neuer Prognosefaktoren beim Magenkarzinom (1, S.356; 4, S.44; 55, S.499). Darum war mitunter Ziel unserer Studie der Vergleich der beiden Antikörper Ber-Ep4 und CEA bei dem immunzytologischen Nachweis freier Tumorzellen.

Bei Betrachtung des R0 Kollektivs konnte die Inzidenz von freien Tumorzellen nachgewiesen durch Ber-Ep4 von 20% in direkten Übereinstimmung mit der zuvor erfolgten Studie von Nekarda et al. bestätigt werden (73, S.614).

Der Nachweis freier Tumorzellen mittels CEA ist wie erwartet seltener erfolgt und liegt bei einer Inzidenz von knapp 12%. Dies ist kein großer Unterschied zu der konventionellen zytologischen Untersuchung, bei der in unserer Studie 10% der intraperitonealen Lavagen als verdächtig bzw. positiv für den Nachweis freier Tumorzellen eingestuft wurde. Jedoch konnte nur bei 3% der Lavagen sicher Tumorzellen nachgewiesen werden.

Von 207 Lavagen, die in der konventionellen Zytologie als tumorzellfrei gewertet worden waren, wurden mittels CEA Immunzytologie 14 (6,8%) und mittels Ber-Ep4 Immunzytologie 26 (12,6%) mit als positiv eingestuft (R0 Kollektiv).

In dem Patientenkollektiv mit Residualtumor waren von 44 konventionell unauffällige Abdominalspülungen 16 (36,4%) mit CEA- und 20 (45,5%) mit Ber-Ep4-immunzytologischer Untersuchung als positiv gewertet. Freie Tumorzellen in der Abdominalhöhle können durch Verwendung von immunzytologischen Färbetechniken sicherer diagnostiziert werden.

Tabelle 5.1: Vergleich veröffentlichter Studien mit unseren Ergebnissen nach Publikationsjahren aufgelistet

Autor	Jahr	Patienten n	Inzidenz von Tumorzellen konventionelle Zytologie			Inzidenz von Tumorzellen immunologisch				Inzidenz von Tumorzellen andere Methoden				Relevanz			
			insgesamt	R0	R+	insgesamt	R0	R+	Methode	insgesamt	R0	R+	prognos- tisch	therapeu- tisch			
Asao	(5)	1989	44	14% (6/44)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Jaehne	(41)	1989	66	18% (12/66)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Iitsuka	(38)	1990	387	25% (96/387)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Asao	(4)	1991	120	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Juhl	(46)	1994	44	---	---	---	5 AK	43% (19/44)	40% (13/33)	55% (6/11)	---	---	---	---	---	Ja	---
Juhl	(45)	1995															
Ikeguchi	(39)	1994	362	33% (119/362)	18% (43/234)	59% (76/128)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Nishiyama	(74)	1995	155	8% (13/155)	3% (3/118)	27% (10/37)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Bonenkamp	(9)	1996	535	7% (38/535)	4% (20/457)	23% (18/78)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Wu	(109)	1997	134	19% (26/134)	19% (26/134)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Nakanishi	(71)	1997	48	21% (10/48)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Nekarda	(73)	1998	118	9% (10/118)	9% (10/118)	---	Ber-Ep4	20% (23/118)	20% (23/118)	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Schott	(86)	1998	62	---	---	---	5 AK	53% (33/62)	55% (31/56)	33% (2/6)	---	---	---	---	---	Ja	---
Kodera	(53)	1998	148	18% (26/148)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Hayes	(31)	1999	85	19% (16/85)	---	---	5 AK	27% (23/85)	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Funami	(21)	1999	85	24% (20/85)	24% (20/85)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	Ja

Autor	Jahr	Patienten n	Inzidenz von Tumorzellen konventionelle Zytologie			Inzidenz von Tumorzellen immunologisch				Inzidenz von Tumorzellen andere Methoden				Relevanz		
			insgesamt	R0	R+	insgesamt	R0	R+	Methode	insgesamt	R0	R+	prognos- tisch	therapeu- tisch		
Suzuki	(101) (102)	1999	347	8%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Vogel	(104)	1999	111	42%	25%	78%	HEA-125	49%	30%	82%	---	---	---	---	Ja	---
Kodera	(54)	1999	91	11%	11%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Imada	(40)	1999	51	31%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	---
Nakanishi	(72)	2000	109	13%	---	---	---	---	---	real-time CEA RT-PCR	28%	---	---	---	Ja	---
Yonemura	(113)	2001	152	18%	---	---	---	---	---	MMP-7 RT-PCR	18%	---	---	---	Nein	---
Yonemura	(112)	2001	230	20%	20%	---	---	---	---	CEA RT-PCR	26%	26%	---	---	Ja	---
Abe	(1)	2001	56	6%	6%	---	---	---	---	CEA-Spiegel	18%	18%	---	---	Ja	---
Kodera	(55)	2002	189	19%	---	---	---	---	---	real-time CEA RT-PCR	24%	---	---	---	Ja	---
Kodera	(56)	2002	90	4%	---	---	---	---	---	real-time CEA RT-PCR	17%	---	---	---	Ja	---
Fujimoto	(20)	2002	236	33%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ja	Ja
Oyama	(76)	2004	195	4%	---	---	---	---	---	real-time CEA RT-PCR	28%	18%	78%	---	Ja	---
Jonas	(44)	2004	26	50%	---	---	2 AK	56%	---	---	---	---	---	---	Nein	---
eigene Ergebnisse		2005	313	10%	4%	29%	Ber-Ep4	34%	20%	70%	---	---	---	---	Ja	---
							CEA	26%	12%	64%	---	---	---	---	Ja	---

5.1.2. Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA im Vergleich

Im Gesamtkollektiv von 313 Patienten wurde bei 80 mittels CEA Färbung freie intraperitonealer Tumorzellen nachgewiesen. Dies entspricht einer Inzidenz von 25,6%. Die Ber-Ep4 Färbung konnte bei 105 Patienten Tumorzellen identifizieren, entsprechend einer Inzidenz von 33,5%. Im R0-Kollektiv ist die Häufigkeit des Auftretens freier Tumorzellen entsprechend weniger. Die Nachweisrate liegt hier mit Ber-Ep4 bei 20,4% und mit CEA bei 11,7%.

Keine positive CEA-Färbung war negativ bei der Ber-Ep4 immunzytologischen Untersuchung. Umgekehrt zeigten 25 Patienten der Gesamtkollektivs und 20 R0-reserzierte Patienten eine positive Ber-Ep4 Färbung jedoch ohne Nachweis von CEA-Antigen.

Bei genauerer Betrachtung dieser 25 Patienten konnte festgestellt werden, dass bei 17 dieser Abdominallavagen in der Ber-Ep4 Färbung nur eine Einzeltumorzelle oder eine Tumorleiste diagnostiziert wurde. So lässt sich vermuten, dass vielleicht durch intraoperative Manipulation wenig Tumormaterial in diese Spülflüssigkeit gelangt ist ohne, dass tatsächlich freie Tumorzellen der Bauchhöhle vorliegen. Vier Abdominallavagen waren zwar positiv in der CEA Färbung, jedoch zeigten diese Zellen keine positiven Kernkriterien und wurden daher als negativ gewertet (siehe Tabelle 4.1 auf S.36).

Bei der Überlebensanalyse zeigt sich zwischen der Gruppe an CEA negativen und Ber-Ep4 positiven Lavagen keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe mit insgesamt negativer Immunzytologie jedoch zu der Gruppe mit insgesamt positiver Immunzytologie (siehe Abbildung 4.2 auf S.54). Dieses Ergebnis verfestigt die Überlegung, dass sich in dieser Gruppe ein Großteil von Patienten befindet, bei denen nur einzelne Tumorzellen in die Probenflüssigkeit gelangt sind, jedoch keine intraperitonealen freien Tumorzellen vorliegen.

Es lässt sich somit keine signifikante Verschlechterung der Prognose durch Vorliegen einer positiven Ber-Ep4 immunzytologischen Untersuchung bei negativer CEA Immunzytologie Kontrolle nachweisen.

In der univariaten Analyse ist die Immunzytologie mit Ber-Ep4 ein signifikanter Prognosefaktor. Auch die Kombination der Antikörper Ber-Ep4 und CEA zeigt die univariate Analyse einen signifikanten Unterschied.

Von Seiten der statistischen Anforderungen ist die einfach univariate Analyse jedoch nicht mehr ausreichend (107, S.22). Zur Evaluierung wird eine multivariate Analyse gefordert. Die in unserer Arbeit benutzte Cox-Regressionsanalyse kann bei Betrachtung beider Kollektive (Gesamt- und R0-Kollektiv) nur die Immunzytologie mit CEA als ein signifikanter Prognosefaktor bestätigen (siehe in Tabelle 4.14 und Tabelle 4.15 auf den Seiten 58 und 59).

Dennoch ist die Sensitivität der immunzytologischen CEA Tumorzellbestimmung um einiges schlechter als die in der Literatur beschriebene Sensitivität mittels quantitativer CEA mRNA Bestimmung (55, S.499). Eine Untersuchung im direkten Vergleich dieser zwei Methoden wurde bisher noch nicht durchgeführt.

5.2. Inzidenz und prognostische Bedeutung freier intraperitonealer Tumorzellen

Wir konnten bei 6 von 117 Patienten mit UICC Stadium IA und IB freie Tumorzellen nachweisen. Auch Juhl et al. fand bei 4 von 17 Patienten im IA oder IB Stadium immunzytologisch positive Zellen, obwohl hier der Tumor die Serosa histologisch nicht durchbrochen hat. Er vermutet, dass, da keine direkte Abgabemöglichkeit in die Peritonealhöhle bestand, diese Zellen über Lymphbahnen in die Bauchhöhle gelangen (106, S.334). Daher lässt sich vermuten, dass es sich hier bereits um eine generalisierte Erkrankung handelt, die dementsprechend eine dieser Situation zugeschnittene weitere adjuvante Therapie erfordert.

Dementsprechend wurde in unserer Untersuchung eine Korrelation zwischen zunehmendem Befall der regionären Lymphknoten und dem häufigeren Auftreten freier intraperitonealer Tumorzellen bestätigt.

Boku et al. beschreibt als erste Ursache einer peritonealen Dissemination die Tumordinfiltration der Serosa (10, S.436).

In der pT3-Kategorie ist dies der Fall, der Tumor penetriert histologisch die Serosa. Jedoch hat hier nur jeder zweite einen positiven Nachweis freier intraperitonealer

Tumorzellen. Selbst wenn der Tumor schon in Nachbarstrukturen infiltrierend wächst (pT4-Kategorie), werden nicht wie erwartet bei 100% der Patienten freie Tumorzellen gefunden, sondern nur bei 58% dieser Patienten (siehe Tabelle 4.4 auf S.39). In der Überlebensanalyse konnte gezeigt werden, dass die Patienten ohne Tumorzellnachweis einen signifikanten Überlebensvorteil zu den Patienten hatten, bei denen Tumorzellen nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 4.5 auf S.56).

Es ist bekannt, dass Tumorzellen von schlecht differenzierten Karzinomen sich leichter vom Primärtumor lösen als Zellen von gut differenzierten Karzinomen (69, S.227). In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass auch die Inzidenz freier intraperitonealer Tumorzellen mit dem Grad der Entdifferenzierung korreliert. Der diffuse Typ und auch der Mischtyp nach Laurén weisen häufiger freie Tumorzellen auf, als der intestinale Typ. Die Einteilung der Karzinome durch die WHO-Klassifikation lässt jedoch keine Risikoabschätzung über das Vorhandensein freier Tumorzellen zu (siehe Tabelle 4.6 auf S.42 und Tabelle 4.12 auf S.50).

Von den 230 Patienten mit kurativer Resektion hatten 27 eine positive Färbung. Eine peritoneale Metastasierung trat bei 5 dieser Patienten auf. Von 83 Patienten mit keiner residualtumorfreen Resektion hatten 53 freie intraperitoneale Tumorzellen. 37 Patienten entwickelten ein peritoneales Rezidiv. Immunhistochemische CEA-Färbung war eine sensitive Methode diese Rezidiventwicklung vorauszusagen. Dennoch entwickelten nicht alle Patienten mit Nachweis freier Tumorzellen in der Bauchhöhle ein peritoneales Rezidiv. Dieser Widerspruch ist aufgetreten, weil wahrscheinlich die Nachbeobachtungszeit zu kurz für eine Rezidiventwicklung war. Oder aber es reflektiert die Tatsache, dass freie Tumorzellen in der Bauchhöhle nicht immer eine peritoneale Streuung verursachen. Wahrscheinlich spielen Adhäsionsmoleküle (66, S.21; 116, S.81) und Angiogenese induzierende Faktoren (117, S.298) bei der Implantation noch eine zusätzlich wichtige Rolle. Vielleicht sind diese Zellen auch losgelöste Zellen im Stadium der beginnenden Apoptose.

Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass mittels Immunzytologie freie Tumorzellen in einer höheren Frequenz als der konventionellen Zytologie nachgewiesen werden konnte. Patienten, bei denen diese Tumorzellen

nachgewiesen wurden, zeigten ein deutlich schlechteres Überleben als Patienten ohne FPTCs.

Außerdem konnten mittels multivariater Analyse CEA immunzytologisch nachgewiesene Tumorzellen als ein signifikanter unabhängiger Prognosefaktor und Risikofaktor für peritoneale Streuung und Überleben identifiziert werden. Dies konnte für das Gesamtkollektiv sowie für das R0-reserzierte Kollektiv gezeigt werden.

5.3. Therapeutische Relevanz

Im Ausblick der zukünftigen klinischen Bedeutung dieser Resultate, kann diese Methode als eine Möglichkeit zur Identifizierung eines Subkollektives herangezogen werden. Kandidaten mit Nachweis freier intraperitonealer Tumorzellen können einer adjuvanten Therapie zugeführt werden, um dadurch ihre schlechte Prognose zu verbessern.

Adjuvante intraperitoneale Chemotherapie hat bisher noch keinen Benefit bei Patienten mit makroskopisch erkennbarer peritonealen Metastasen gezeigt (91, S.1452).

Dennoch gibt es zahlreiche Studien, die gerade für diese Vorstufen der peritonealen Implantation ein gutes Ansprechen auf adjuvante Therapie vermuten lassen: So konnte Yonemura et al. in einer Studie zeigen, dass durch intraoperativer Chemotherapie bei Magenkarzinompatienten mit Serosainfiltration ohne makroskopischen Nachweis einer peritonealen Dissemination einen signifikanten Überlebensvorteil erreicht werden konnte (114, S.450-455).

Bei diesen high-risk Patienten konnte durch Applikation einer intraoperativen adjuvanten Therapie eine peritoneale Metastasierung vorgebeugt werden.

Glehen et al. vermutet aufgrund seiner Ergebnisse, dass eine intraperitoneale Chemohyperthermie nur bei R0-und R1-Situation mit einer kurativen Intention einen Vorteil liefert. Allergings konnte er auch bei bei malignem Aszites eine Regression von 70% verbunden mit einer verbesserten Lebensqualität, feststellen (24, S.805). Experimentell wurde ein zytotoxischer Effekt von Hyperthermie erwiesen. Die Hyperthermie soll die Aktivität von Antitumormedikamenten verstärken. In einer weiteren Studie wurde die intraperitoneale Chemotherapie kombiniert mit einer

hyperthermischen Verabreichung überprüft. Die randomisierte Studie wurde bei 141 Magenkarzinompatienten mit makroskopischer Serosainfiltration durchgeführt. 70 Patienten wurden nur operiert. 71 Patienten erhielten zusätzlich eine hyperthermische intraperitoneale Chemotherapie (Mitomycin C). 16 Patienten, die nur operiert wurden, entwickelten eine Peritonealkarzinose, wohingegen nur ein Patient, der zusätzlich behandelten Patientengruppe, ein peritoneales Rezidiv bekam. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied bei der hepatischen Metastasierung festgestellt werden (19, S.532-533).

Auch Hamazoe et al. stellte fest, dass die Verabreichung intraperitonealer Thermochemotherapie bei Magenkarzinompatienten mit Serosainfiltration eine Prävention zur peritonealen Rezidiventwicklung darstellt (30, S.2048).

Yu et al. führte eine randomisierte Studie zur adjuvanten intraperitonealen Chemotherapie bei rezervierbarem Magenkarzinom durch. Hier zeigte sich kein signifikanter 5-Jahres-Überlebensvorteil bei Patienten mit einem Stadium I, II oder IV. Jedoch zeigten Patienten mit einem Stadium III eine signifikant höhere Überlebensrate, wenn sie eine intraperitoneale Chemotherapie erhalten haben. Knapp 50% (49,1%) der Patienten mit Chemotherapie lebten noch nach 5 Jahren, wohingegen 18,4% der Patienten mit alleiniger operativen Therapie überlebten (118, S.347).

Interessant ist, dass nur Patienten mit einer Serosainfiltration von einer adjuvanten intraperitonealen Therapie profitieren. Die Serosainfiltration ist mit dem Auftreten freier intraperitonealer Tumorzellen assoziiert. Ist es schon zu einer peritonealen Einnistung der Tumorerkrankung gekommen, hat die Chemotherapie keinen signifikanten Nutzen mehr. Die Vermutung lautet also, dass intraperitoneale Chemotherapie nur einen Nutzen bei Vorhandensein von intraperitonealen Tumorzellen hat, ohne dass eine makroskopische peritoneale Streuung bereits besteht.

Der Immunmodulator OK-432 ist bei der antikanzerogenen Therapie in Japan weit gebräuchlich. Die Kombination mit einer Chemotherapie hat bei Patienten mit Lungenkrebs, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Blasenkarzinom und Peritonealkarzinomatose eine Verbesserung erzielt. In Japan ist die Kombination

einer Immunchemotherapie mit intraperitonealer Verabreichung von Mitomycin C (MMC) und OK-432 zur Kontrolle und Prävention einer Peritonealkarzinose seit 1986 etabliert. Die Patienten mit FPTCs sollten laut Empfehlung von Fujimoto et al. als high-risk Patienten für peritoneale Metastasierung in Stadium IV der Japanischen Klassifikation des Magenkarzinoms eingeteilt werden. Er empfiehlt eine intraoperative Schnelldiagnostik. Werden während der Operation Tumorzellen in der Spülflüssigkeit des Abdomens gefunden, sollte eine intraoperative Chemotherapie an die Operation angeschlossen werden. Die Pharmakokinetischen Vorteile dieser schnellen Therapie wurden mehrfach beschrieben. So werden intraperitoneal verstreute Tumorzellen bei einem postoperativ geschwächten Immunsystem am Wachstum gehindert und eine peritoneale Implantation erschwert. Außerdem kommt es zu einer zusätzlichen Therapie eventuell vorhandener Lebermikrometastasen, weil intraperitoneale Antitumormedikamente über die Portvene in den Kreislauf aufgenommen werden. Fujimoto et al. behandelte alle Patienten mit Tumorzellnachweis mit MMC und OK-432 intraperitoneal und konnte einen signifikanten Überlebensvorteil dieser Risikogruppe erreichen (20, S.201-202,206-207).

6. Zusammenfassung

Unter den Krebserkrankungen ist das Magenkarzinom immer noch eines der führenden Todesursachen. Dabei spielt die Peritonealkarzinose als häufigste Ausbreitungsform eine übergeordnete Rolle. Freie Tumorzellen in der Bauchhöhle zeigen den Weg der Metastasierung an und sind ein anerkannter Prognosefaktor. Der immunhistochemische Nachweis von Tumorzellen mit dem Antikörper Ber-EP4 hat gegenüber der konventionellen Untersuchung mit der Papanicolaou Färbung eine 3-fach höhere Sensitivität.

In dieser prospektiven Studie wurde bei 313 Patienten mit einem Magenkarzinom intraoperativ eine Lavage der Bauchhöhle durchgeführt und konventionell als auch immunzytologisch auf freie Tumorzellen untersucht. Es wurden zwei Antikörper für die immunzytologische Färbung verwendet, Ber-Ep4 und ein Antikörper gegen CEA. Hierbei wurde untersucht, ob die Ergebnisse des Tumorzellnachweises mit dem Antikörper Ber-Ep4 durch den tumorabhängigen Antikörper gegen CEA bestätigt werden können und ob eine Risikostratifizierung vorgenommen werden kann.

In dem Studienkollektiv hatten 67 Patienten das Stadium IA, 50 Patienten das Stadium IB, 40 Patienten das Stadium II, 48 Patienten das Stadium IIIA, 19 Patienten das Stadium IIIB und 89 Patienten das Stadium IV. Ausschlusskriterien waren eine neoadjuvante Chemotherapie und das Vorhandensein von Zweitumoren. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 29 Monaten (6-150 Monate).

Mit Hilfe der APAAP-Methode wurde anhand von Zytozentrifugenpräparaten die Immunzytologie durchgeführt.

Die konventionelle Befundung von Papanicolaou Ausstrichpräparaten ergab einen sicheren Tumorzellnachweis von 10%. Bei residuumorfreier Resektion konnte nur in 3% einen sichere zytologische Diagnose von Tumorzellen gestellt werden.

Unter Berücksichtigung der zytologischen Zellkernkriterien zeigte die Immunzytologie mit Ber-Ep4 bei insgesamt 34% der Patienten des Gesamtkollektivs einen Tumorzellnachweis. Im R0-Kollektiv zeigten 20% der Patienten einen Tumorzellnachweis mit dem Antikörper Ber-Ep4. Somit konnten die Ergebnisse von Nekarda et al. bestätigt werden (73, S.611).

Lag eine negative Ber-EP4 Färbung vor, so zeigte sich bei der CEA Färbung auch keine positive Tumorzelle.

Bei jeweils 8% der Patienten des Gesamtkollektivs und des R0-Kollektivs konnte eine positive Ber-Ep4 Färbung nicht durch einen CEA Nachweis bestätigt werden. Insgesamt wurde mit dem Antikörper gegen CEA bei 26% der Patienten des Gesamtkollektivs und bei 12 % der Patienten des R0-Kollektivs Tumorzellen nachgewiesen.

Prognostisch zeigten diese Patienten mit einer Ber-Ep4 positiver und CEA negativer Färbung keinen signifikanten Unterschied im Überleben zu den Patienten ohne immunzytologischen Tumorzellnachweis.

Im Vergleich zu Ber-Ep4 hatte die Patientengruppe mit positiver CEA-Immunzytologie ein signifikant schlechteres Überleben.

In der univariaten Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs fand sich eine signifikante prognostische Unterteilung in den Kriterien für das Vorhandensein einer Peritonealkarzinose, die R-Kategorie (R0 vs R1/2), die pT-Kategorie (T1/2 vs T3/4), die pN-Kategorie (N0 vs N1/2), die pM-Kategorie (M0 vs M1), die Lymphangiosis carcinomatosa, die konventionelle Zytologie, die Immunzytologie mit Ber-Ep4 und CEA sowie die Kombination beider Antikörper. In der multivariaten Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs waren der Lymphknotenstatus (RR 6,62), die Lymphangiosis carcinomatosa (RR 2,25) und die Immunzytologie mit CEA (RR 1,97) unabhängige Prognosefaktoren.

In der univariaten Überlebensanalyse des R0-Kollektivs waren die pT-Kategorie (T1/2 vs T3/4), die pN-Kategorie (N0 vs N1/2), die pM-Kategorie (M0 vs M1), die Lymphangiosis carcinomatosa, die Immunzytologie mit Ber-Ep4 oder CEA sowie die Kombination beider Antikörper unabhängige Prognosefaktoren. Unabhängige Prognosefaktoren in der multivariaten Analyse des R0-Kollektivs waren der Lymphknotenstatus (RR 7,69), die Lymphangiosis carcinomatosa (RR 2,44) und die Immunzytologie mit CEA (RR 3,32).

Zusammenfassend war der Tumorzellnachweis von disseminierten Tumorzellen beim Magenkarzinom mit den Antikörpern gegen CEA seltener, aber tumorbiologisch signifikant sensitiver als mit dem Antikörper Ber-Ep4. In 8% können Zellen mit dem Ber-Ep4-Antigen nachgewiesen werden, die keine prognostische Relevanz haben und prognostisch falsch positiv gelten müssen.

Ausblick:

Die Konventionelle Zytologie reicht wegen der geringen Sensitivität zur therapeutischen Definition eines Subrisikokollektivs nicht aus. Die Immunzytologie ist 3-fach sensitiver.

Die Immunzytologie mit dem Antikörper gegen CEA ist ein unabhängiger Prognosefaktor und prognostisch sensitiver als der Antikörper Ber-Ep4.

Inwieweit dieses definierbare Risikokollektiv mit einem CEA-immunzytologisch positiven Tumorzellnachweis (12% der Patienten des R0-Kollektivs, 26% der Patienten des Gesamtkollektivs) von adjuvanten Therapien, z.B. intraperitoneale Chemotherapie mit Hyperthermie profitiert, muss in Studien überprüft werden.

7. Anhang

7.1. Laborprotokoll

Erythrozyten-Lyse-Puffer:

- Ammoniumchlorid (Merck: 1145) 8.29 g/l
- Kaliumhydrogencarbonat (Merck: 4854) 1.0 g/l
- EDTA (Boehringer: 808270) 0.0371 g/l

mit sterilem aqua dest. auf 1 l auffüllen und im Kühlschrank lagern!

Cytospinpräparation:

1. Zentrifugation: 20 min bei 1500 U/min
2. Zugabe von Hämolysepuffer (Ammoniumchlorid)
3. Zweimaliges Waschen mit RPMI-Medium (Zellkulturmedium)
4. Cytospin-Zentrifugation
5. 20 000 Zellen / Objektträger

SPAP-Färbung: (modifizierte Färbung nach Pappenheim / May-Grünwald-Giemsa)

Tupfs oder Zytozentrifugenpräparate über Nacht trocknen lassen!

- Fixierung in grüner Lösung (Dade Behring: Diff-Quik 13 08 33) ca. 5 sec
- Färbelösung I, rot (Baxter: Diff-Quik 13 08 34) ca. 5 sec
- Färbelösung II, dunkelblau (Baxter: Diff-Quik 13 08 35) ca. 5 sec
- in aqua dest. spülen
- mindestens 30 min lufttrocknen lassen
- Eindecken mit Eukitt

APAAP-Färbung

Gefrierschnitte:

Nach dem Schneiden mit dem Kryostat Schnitte 24 Stunden lufttrocknen lassen!

Können die Schnitte nicht am nächsten Tag gefärbt werden, lässt man sie ebenfalls 24 Stunden lufttrocknen, fixiert sie 10 min in Aceton und friert sie zunächst bei -80 °C ein. Später können sie bei -20°C gelagert werden.

Zytozentrifugenpräparate:

Siehe Gefrierschnitte!

Die Zytos werden unfixiert eingefroren!

Fixierung:

Gefrierschnitte:

- 30 min Aceton (Merck 14)
- 30 min Chloroform (Merck 2445)

Zytos:

- 10 min Aceton

Primärer Antikörper:

- Schnitte bzw. Zytos mit Fettstift (DAKO-Pen: S 2002) umranden
- Antikörper (AK) mit RPMI+Zusätze in die entsprechende Konzentration verdünnen
- 200 µl AK-Verdünnung auf Schnitte auftragen (bei Zytos: 100 µl)
- 30 min bei Raumtemperatur (RT) in Feuchtekammer inkubieren

Waschen:

- 3 x mit Spülpuffer waschen (PBS-Objektträger **getrennt** von AK-Objektträgern waschen)

Fixierung:

- 1 min in 4 % Formalin (phosphatgepuffert) fixieren
- mit Spülpuffer waschen

Brückenantikörper:

- Brückenantikörper (rabbit-anti-mouse, DAKO Z259) mit RPMI+Zus. + Humanserum (im Verhältnis 8:1) verdünnen; **Konzentration: 1:20 (bei Zytos: 1:10)**
- 200 µl (bzw. Zytos 100 µl) auftragen
- 30 min bei RT in Feuchtekammer inkubieren

Waschen:

- 3 x mit Spülpuffer waschen

APAAP-Komplex:

- APAAP-Komplex (von Dianova: M800) mit RPMI+Zus. verdünnen;
Konzentration: 1:160
- 200 µl (bzw. Zytos 100 µl) auftragen
- 30 min bei RT in Feuchtekammer inkubieren

Waschen:

- 3 x mit Spülpuffer waschen

Wiederholung:

- Brückenantikörper 10 min bei RT in Feuchtekammer inkubieren
- 3 x mit Spülpuffer waschen
- APAAP-Komplex 10 min bei RT in Feuchtekammer inkubieren
- 3 x mit Spülpuffer waschen

Entwicklung:

- entsprechende Menge (ca. 50 ml) Entwicklungspuffer in Küvette geben
- 30 min bei RT auf Schüttler inkubieren

Waschen:

- 3 x mit Spülpuffer waschen

Gegenfärbung:

- Hämalaun: 5 min
- mit Leitungswasser, abschließend mit Spülpuffer bläuen

Präparate mit Kaiser's-Glyceringelatine (Merck 9242) eindecken!

Lösungen für APAAP-Färbung

RPMI + Zusätze:

- RPMI (Flow: 12-602-54) 50 ml
- Aqua dest. 450 ml
- Kälberserum (inaktiviert; Flow: 29-101-54) 50 ml
- Na-Azid (Merck: 6688) 0.5 g

pH 7.4 - 7.6

portioniert bei -20°C einfrieren! (aufgetaut im Kühlschrank 3 Tage haltbar)

Humanserum und Kälberserum 30 min bei 56°C inaktivieren!

Spülpuffer:

- Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan; Merck 8382) 0.9 g/l
- Trizma-Hydrochlorid (Sigma: T-3253) 6.84 g/l
- NaCl (Merck 6404) 8.76 g/l

in 1 l Aqua dest. lösen!

Hämalaun:

- Hämatoxylin (Merck 4302) 1.0 g/l
- Natriumjodat (Merck 6525) 0.2 g/l
- Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat; Merck 1047) 50 g/l

in 1 l Aqua dest. lösen, über Nacht rühren lassen!

- + Choralhydrat (Merck 2425) 50 g/l
- + Zitronensäure (Merck 244) 1.0 g/l

eine Woche im Dunkeln reifen lassen!

Entwicklungspuffer:

EWP:

- Tris-Base 4.9 g/l
- Trizma-Hydrochlorid 1.5 g/l in 1 l Aqua dest. lösen!
- NaCl 8.7 g/l

Propandiol:

- 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck 801464) 21 g
- in 1 l Aqua dest. lösen (dunkel lagern)!

Neufuchsin:

- Neufuchsin (Chroma: 1B 467; S.Nr. 782) 5 g
- in 100 ml 2 N HCL lösen (kühl und dunkel lagern)!

Entwicklungspuffer (Ansatz für 5 Küvetten)

- EWP 175 ml
- Propandiol 62.5 ml

mischen und pH auf 9.75 einstellen (mit 2 N HCL)!

- + Levamisol (Sigma: L-9756) 100 mg
 - + Na-Nitrit (Merck 6549) 50 mg
- in 1250 µl Aqua dest. vorlösen
- + Neufuchsin 500 µl
- 1 min reagieren lassen und zugeben!
- Naphtol-As-Bi-Phosphat (Sigma: N-2250) 125 mg
- in 1500 µl Dimethylformamid (Merck: 3034) vorlösen und zugeben!

pH 8.8 einstellen!

Entwicklungspuffer kurz vor Gebrauch herstellen und filtrieren!

7.2. Bildtafeln

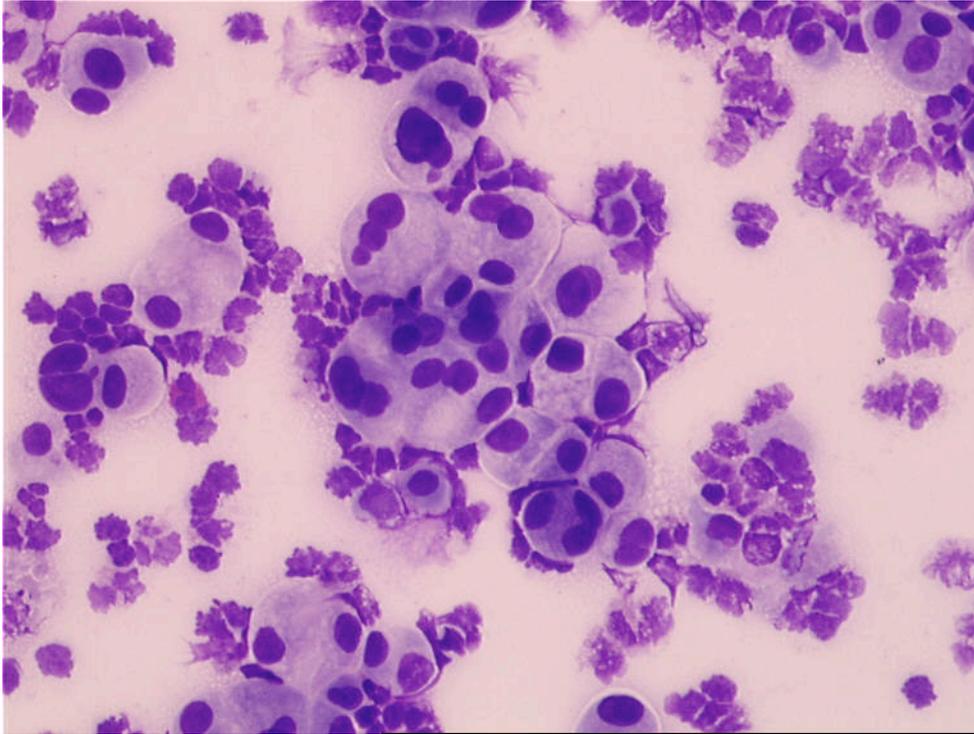


Abbildung 7.1: Lavage SPAP-Färbung, 20-fache Vergrößerung

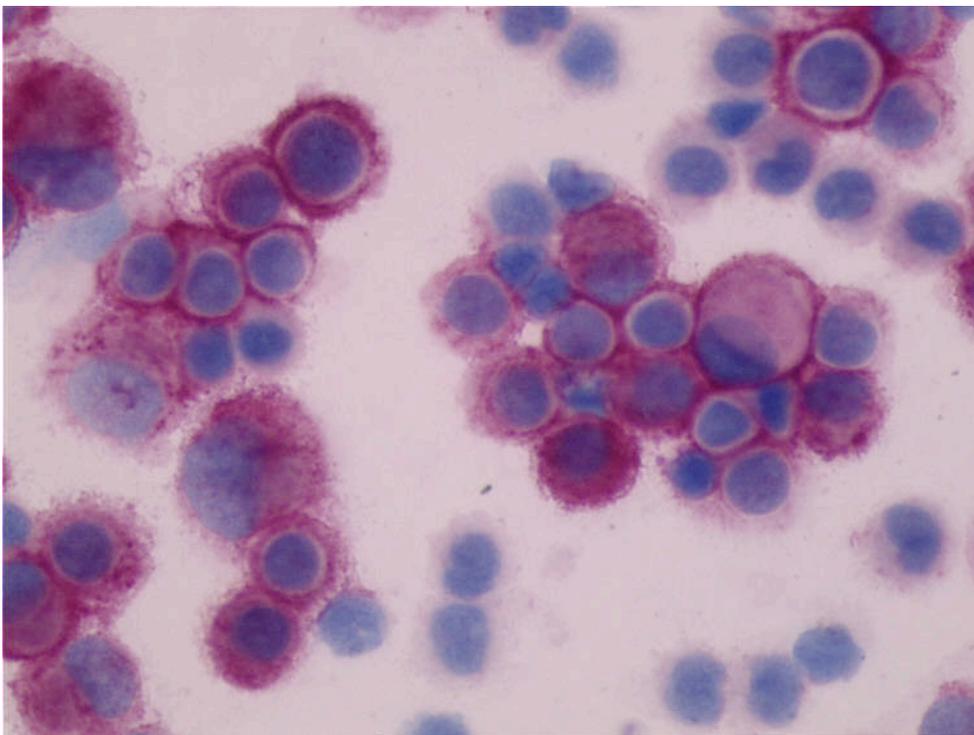


Abbildung 7.2: Lavage mit Ber-Ep4 Färbung, 40-fache Vergrößerung

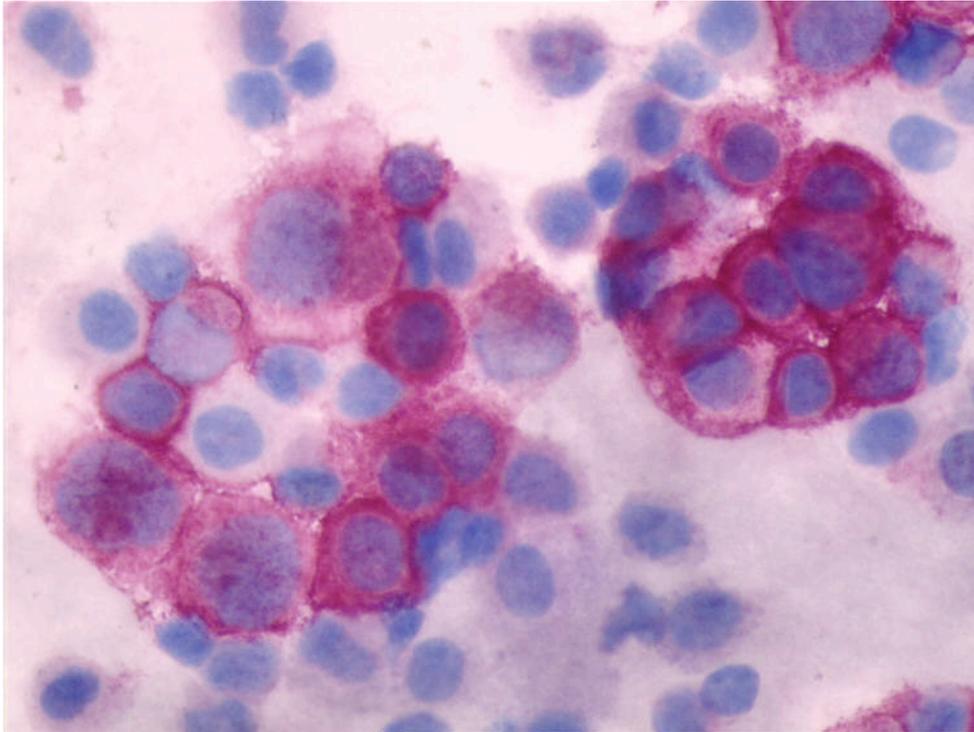


Abbildung 7.3: Lavage mit positiver Ber-Ep4-Färbung unter 40-facher Vergrößerung

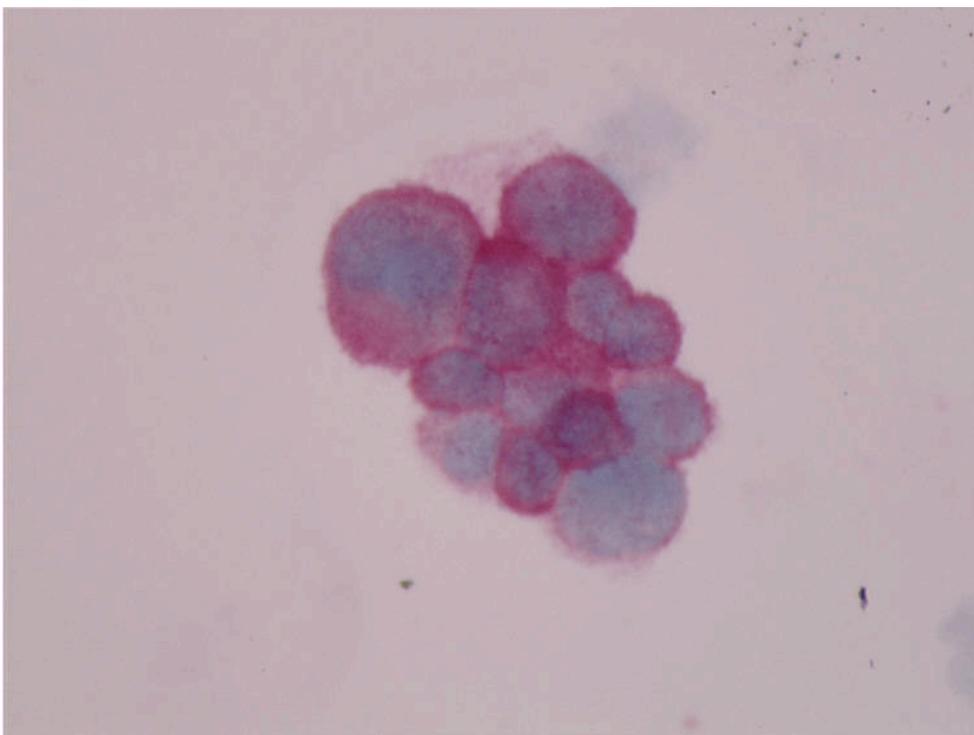


Abbildung 7.4: Lavage mit positiver CEA-Färbung unter 40-facher Vergrößerung

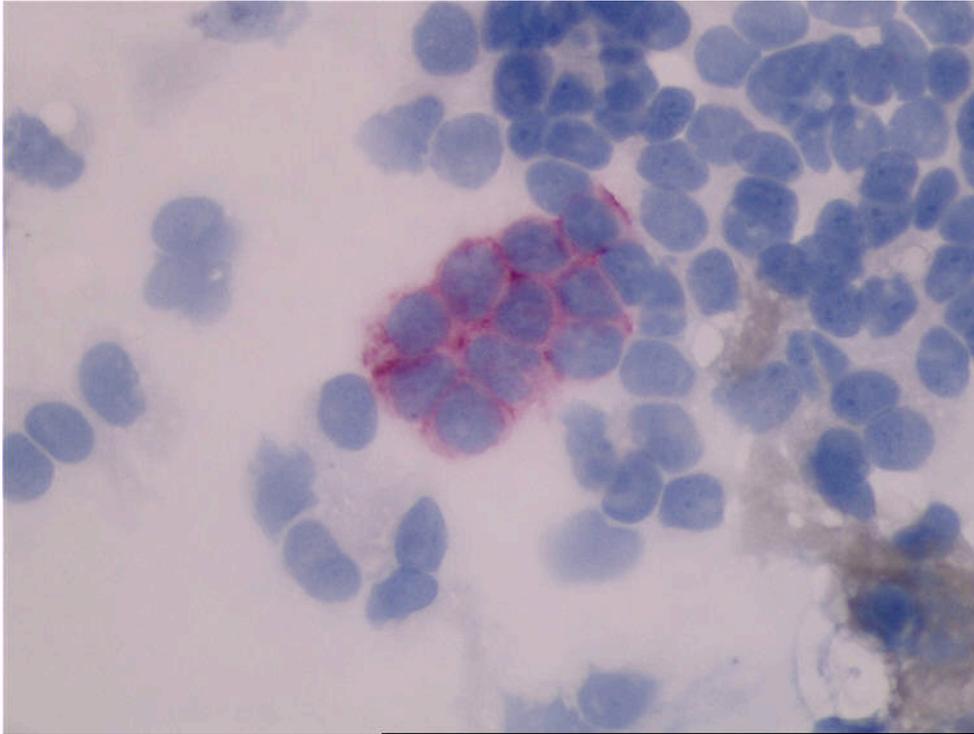


Abbildung 7.5: positive Ber-Ep4-Färbung einer Lavage, aber keine Tumorzellkriterien bei 40-facher Vergrößerung

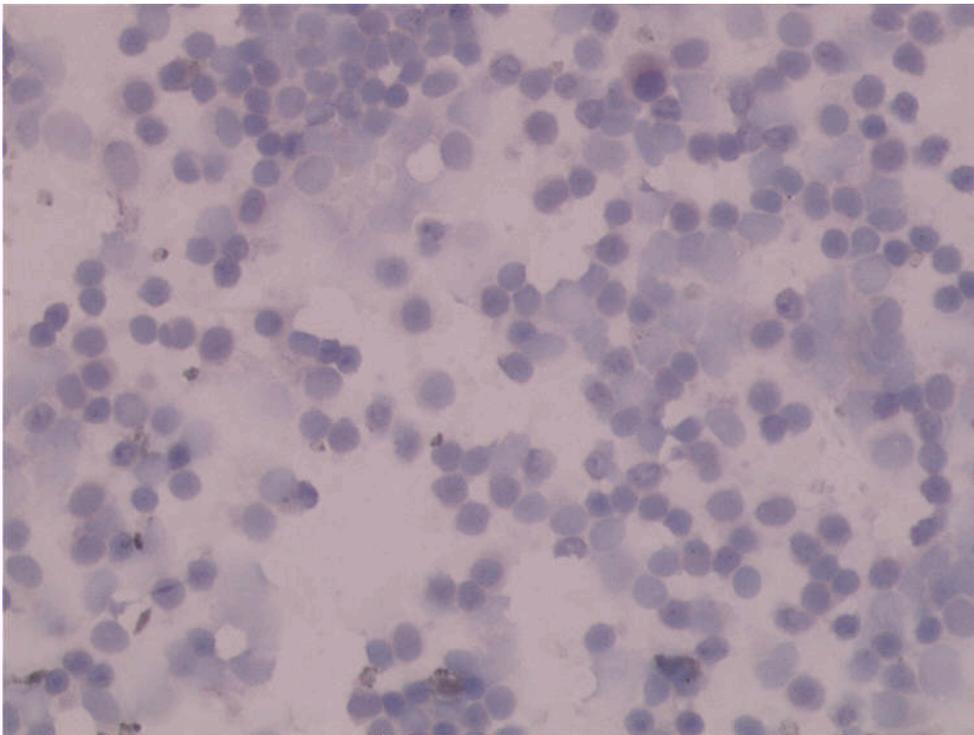


Abbildung 7.6: PBS-Negativ-Kontrolle einer Lavage bei 20-facher Vergrößerung

7.3. Erfassungsbogen

7.3.1. Patientenerfassungsbogen

Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ. Prof. Dr. J. R. Siewert)

ERFASSUNGSBOGEN

Peritoneallavage beim Magenkarzinom

ERFASSUNGSBOGEN	E I N G A N G S M A T E R I A L	PERSONALBOGEN BLATT 1
-----------------	--	--------------------------

<u>Patientenstammdaten</u>	0	<u>Arztbrief (Zuverlegung)</u>	0	<u>Abschlußbericht</u> _____	0
<u>Routinelabor prä OP</u>	0	<u>Tumormarker</u>	0		
<u>Pathologie</u>	0	<u>OP-Bericht</u>	0		
<u>Nachsorge</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12			<u>Gestorben</u>/...../.....	
<u>User</u> (Doktorand) K (Krois) T (Techen) W (Wenninger) D (Dieling) L (Ludwig) B (Bochtler)					

OP-DATUM	TT MM JJ	
FÄRBENUMMER	JAHRGANG	STATION/.....
STUDIENNUMMER		

NAME	
GEBURTSDATUM	TT MM JJ
ADRESSE	
TELEFON/.....	
HAUSARZT	
TELEFON/.....	

EINGANGSDIAGNOSE

(DIAG_SORT)

MAGENCA	3	
CARDIA II, NUR OP	3.11	
CARDIA II, MIT VORBEHANDL.	3.12	
CARDIA III (=SUBCARDIAL)	3.2	
CORPUS	3.3	
ANTRUM	3.4	
GESAMTER MAGEN	3.5	
B II-MAGEN	3.6	
REZIGIF	3.7

KLINISCHES STADIUM p T p N p M G R

MATERIAL (GEWEBE)

0 KEIN GEWEBE 1 RESEKTAT 2 BIOPSIE 3 EXZIDAT 4 ZYTOLOGIE

.....- ANZAHL DER BLÖCKE

SERUM

0 NEIN 1 JA

LAVAGE

1 INTRA OP 2 LAPARASKOPIE 3 ASCITES / IP-PORT

NEBENDIAGNOSEN 1. 2.

3. 4.

GESCHLECHT1./..2.....

1 MÄNNLICH 2 WEIBLICH

ENDOSOONO**T** NV 1 2 3 4**N** NV 0 1 2**FERNMETASTASEN (CT, OBS, SZINTIGRAPHIE)**

.....

0 KEINE 1 LEB 2 LUNG 3 NN 4 GI-TRAKT 5 NIERE 6 SKELETT 7 HAUT 8 GEHIRN 9 PC 10 LK 11 OVAR

BIOPSIE-MAGEN

E-NR

.....-.....

0 NEIN 1 NEGATIV 2 POSITIV -1 GI -2 GII -3 GIII -4 GIV

LAPAROSKOPIEBEFUND

.....-.....

0 UNAUFFÄLLIG 1 V.A. PC 2 PC-HISTO 3 PC-HISTO + ASCITES 4 ASCITES 5 V.A.LEBERFILIAE 6 LEBERFILIAE-HISTO
(-1 MAGEN-VW -2 LIG. HEPATODUODENALE -3 ZWERCHFELL -4 PARIETO-OB -5 PARIETO-UB -6 MESENTERIUM)**BIOPSIE-PERITONEUM**

.....

BIOPSIE-LEBER

.....

0 KEINE 1 NEGATIV 2 POSITIV

0 KEINE 1 NEGATIV 2 POSITIV

VOR OPERATION

0 KEINE 4 DIAG. LAPAROTOMIE 7 LAPAROSKOPIE

OPERATION

.....

0 SUBTOTALE RESEKTION 1 GASTREKTOMIE 2 ERWEITERTE GASTREKTOMIE (2.1 TRANSHIATAL 2.2 PANCREAS-LINKS / SPLEN / NN)
3 TRANSMEDIASTINALE ÖSOPHAGEKTOMIE + FUNDEKTOMIE +/- SPLEN 4 DIAG LAPAROTOMIE (MIT / OHNE GE) 5 RESTGASTREKTOMIE (N BII)
6 ÖSOPHAGEKTOMIE UND GASTREKTOMIE 7 LAPAROSKOPIE**OPERATEUR**

.....

SIEW HÖL1(M) WEIS LAN ADO HÖL2(A) SCHA LEHR FEU BÖTT RODER

PERITONEALCARCINOSE (intraoperativ)

.....

0 NEG 1 LOK MAGENWANDBEFALL 2 PERITONEALE IMPLANTATE 3 TUMORASCITES

RESIDUALTUMOR (Klinik)

.....

0 NEG 2 POS 2.1 KOMP I+II-REST 2.2 KOMP III-REST 2.3 FERNMETA 2.4 NICHT RESEZIERBAR 2.5 PC 2.6 CHEMO PRÄ OP 2.7 PLEURACA

THERAPIE (prä OP)

.....

0 KEINE 1 CHEMO (ALLEIN) 3 PALLIATIVE (INTRAPERITONEALE) CHEMO

(KLARTEXT)

THERAPIEERFOLG

.....

0 PROGRESSION(>25% +) 1 NO CHANGE (BIS 25% + O. BIS 50% -) 2 PART REMIS(>50% -)
3 KOMP REMIS (KEIN TM IN 2X STAGING) 4 NED (KEIN TM IN HISTO)**THERAPIEPLANUNG (post OP)**

.....

0 KEINE 1 CHEMO

(KLARTEXT).....

KRANKENHAUSZEIT (post OP in WO)

.....

KOMPLIKATIONEN (post OP)

.....

0 KEINE 1 ANAST. INSUFF 2 ABSZESS (ABD) 3 SEROM 4 WUNDHEILUNGSSTÖRUNG 5 FOLGEOP 6 SONSTIGES

TUMORMARKER**CEA prä-op** (<5) µg/l**CA19-9 prä-op** (<37) U/l**β-HCG prä-op** (<2) U/l**CA12-5 prä-op** (<65) U/ml**TPA prä-op** (<95) U/l**CA15-3 prä-op** (<35) U/l**Alfa-Feto prä-op** (<15) µg/l**CA 72-4 prä-op** (<3,8) U/ml**S E R U M****Alkalische Phosphatase** (<160)

MAKROSKOPIE**LOKALISATION (Anatomisch)**

1 CARDIA II 2 CARDIA III 3 FUNDUS 4 CORPUS 5 ANTRUM 6 ANASTOMOSE (BII) 7 ANASTOMOSEN-REZIDIV (ÖSOPHAGO-JEJUNOSTOMIE) 8 TOTAL
-1 VW -2 HW -3 KK -4 GK -5 ZIRKULÄR

LOKALISATION (UICC 1987)

1 OBERES DRITTEL (1.1 AEG II 1.2 AEG III 1.3 FUNDUS) 2 MITTLERES DRITTEL 3 UNTERES DRITTEL 4 GANZER MAGEN 5 B II 6 LOCOREGIONÄRES
REZIDIV

LOKALISATION (LYMPH-PHYSIO)

1 CARDIA 2 KLEINE KURVATUR 3 GROßE KURVATUR 4 VORDRWAND 5 HINTERWAND 6 GANZER MAGEN 7 BII 8 LOCOREG. REZIDIV

DURCHMESSER (cm)**FLÄCHE (cm²)****VOLUMEN (cm³)****BORRMANN**

0 FRÜHCA 1 EXOPHYTISCH 2 ULCERÖS-GLATT 3 ULCERÖS-UNREGELMÄßIG 4 DIFFUS INFILTRIEREND

HISTOLOGIE**WHO-KLASSIFIKATION**

1 ADENOCA-TUB 2 ADENO-PAP 3 ADENO-MUZ 4 ADENO-SRZ 5 ADENOSQUAMÖSES CA 6 PLATTENEPITHEL CA 7 UNDIFF (MEDULLÄRES) CA
8 UNKLASS CA 9 ADENOID-CYST
10 MUCOEPIDERMOID CA

LAUREN-KLASSIFIKATION

0 N KLASSIFIZIERBAR 1 INTESTINALER TYP 2 MISCHTYP 4 DIFFUSER TYP

MING-KLASSIFIKATION (INFILTRATING-TYP)

1 EXPANSIV 2 INFILTRATIV (2.1 DISSOZ-GERING 2.2 DISSOZ-MÄßIG 2.3 DISSOZ-STARK)

STAGINGp^T X 1 2 3 4p^N X 0 1 2p^M X 0 1**T SUB**

1 MUCOSA 2 SUBMUCOSA 3 NUR MUSCULARIS 4 MUSCULARIS ÜBERSCHRITTEN BZW. SUBSROSA 5 WEIT IM FETTGEBWE 6 SEROSA
7 ANDERES ORGAN

STADIUM

1 (T₁N₀M₀) 1.5 (T₁N₁M₀, T₂N₀M₀) 2 (T₁N₂M₀, T₂N₁M₀, T₃N₀M₀) 3 (T₂N₂M₀, T₃N₁M₀, T₄N₀M₀)
3.5 (T₃N₂M₀, T₄N₁M₀) 4 (T₄N₂M₀, T_XN_XM₁)

GRADING

0 NICHT DIFFERENTIERT 1 GUT DIFF 2 MÄßIG DIFF 3 SCHLECHT DIFF 4 UNDIFF

RESIDUALTUMOR (Patho)

0 NEG 1 POS

1.1 PROX RR 1.2 DIST RR 1.3 FETT-RR 1.4 PERITUMORAL

LYMPHKNOTEN

KOMP I (ANZAHL)

KOMP I (POSITIV)

KOMP II (ANZAHL)

KOMP II (POSITIV)

KOMP III (ANZAHL)

KOMP III (POSITIV)

KOMP GESAMT (ANZAHL)

KOMP GESAMT (POSITIV).....

KOMPARTMENT BEFALLEN

0 KEIN 1 KOMPARTMENT I 2 KOMPARTMENT I+II 3 KOMPARTMENT I+II+III

KOMPARTMENT VALIDITÄT

0 POS I+II+III 1 POS I NEG II+III 1.1 POS I NEG II NON III 2 POS I+II NEG III 2.1 POS I+II NON III 3 NEG I+II+III 3.1 NEG I+II NON III

INVASIVITÄT**GEFÄßINVASION**

0 NEGATIV 1 POSITIV

PERINEURALLCARCINOSE

0 NEGATIV 1 POSITIV

LYMPHANGIOSIS CARCINOMATOSA

0 KEINE 1 PRIMÄRTUMORBEREICH 2 RR 3 FETT(AUCH RR-FETT) 4 ENDOLUMINAL 5 FREIE FETTMETA

ASOZIERTE GEWEBSREAKTION**LYMPHOZYTENINFILTRAT**

.....

1 WENIG 2 MÄßIG 3 VIEL 4 AUFFALLEND VIEL

DESMOPLASIE

.....

0 NORMAL 1 VERMEHRT 2 DEUTLICH VERMEHRT 3 AUFFALLEND VIEL

GASTRITIS (CORPUSSCHLEIMHAUT)

.....

0 KEINE 1 LEICHT 2 MITTLERE 3 STARKE 4 DYSPLASIE (4.1 GRAD I 4.2 GRAD II 4.3 GRAD III)

GASTRITIS (ANTRUMSCHLEIMHAUT)

.....

0 KEINE 1 LEICHT 2 MITTLERE 3 STARKE 4 DYSPLASIE (4.1 GRAD I 4.2 GRAD II 4.3 GRAD III)

OP-DATUM

TT MM JJ

NACHSORGE

1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9

DATUM MM / JJ

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

NACH X MONATEN

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

CEA (< 5 µg/l)

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

CA 19-9 (< 37 U/l)

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

CA 12-5 (< 65 U/l)

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

TPA (< 95 U/l)

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

CA 72-4 (< 3,8 U/ml)

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

REZIDIV

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

0 NEGATIV 1 VERDACHT 2 JA 3 PROGREDIENZ

LOKALREZIDIV

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

0 NEGATIV 1 TUMORBETT 2 KOMPARTMENT II 3 KOMPARTMENT III 4 ENDOLUMINAL/MURAL 5 LK

FERNMETASTASEN

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

0 NEGATIV 1 LEB 2 LUNG 3 GI-TRAKT 4 AUG 5 NIERE 6 SKELETT 7 HAUT 8 CERE 9 SONSTIGES

PERITONEALCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

0 NEGATIV 1 VERDACHT (1.1 SUBILEUS 1.2 ASCITES) 2 JA (ZYTOLOGISCH/HISTOLOGISCH GESICHERT)

PLEURACARCINOSE

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....

0 NEGATIV 1 VERD WEGEN PLEURAERGUSS 2 JA (ZYTOLOGISCH/HISTOLOGISCH GESICHERT)

NACHSORGE

1 STATIONÄR 2 TUMORAMBULANZ 3 HAUSARZT 4 WECHSELND

AKTE BEFINDET SICH

STATUS

0 GESTORBEN 1 LEBEN

TODESURSACHE

0 NEGATIV 1 TOD DURCH TUMOR 2 TOD DURCH OP 3 TOD DURCH ANDERE ERKRANKUNGEN

GESTORBEN (DATUM)

TT MM JJ

ÜBERLEBENSZEIT (MO POST-OP)**REZIDIV (Monate)**(KLARTEXT)
.....**REZIDIVLOKALISATION**

0 KEIN 1 LK 2 FERNMETA 3 ENDOLUM 4 PC 5 TU-MARKER 6 EXTRALUM/LOCOREGIONÄR (TUMORBETT) 7 PLEURACA 9 UNKLARE PROGRESSION

REZIDIVFREIE ZEIT (MO)**PROGRESSIONSZEIT (REZIDIV IN MO)****ZUSATZTHERAPIE**.....**REZ THERAPIE**

0 KEINE 1 CHEMO 2 RADIATIO 3 KOMB. CHEMO/RADIATIO 4 RELAPAROTOMIE

-1 KURATIV (RO) -2 PALLIATIV (R2) 5 IMMUNTHERAPIE 6 SONSTIGES 7 INTRAPERITONEALE CHEMO

ZUSATZDIAGNOSEN

1.

2.

3.

NÄCHSTER NACHSORGETERMIN

MM JJ

7.3.2.Lavageprotokoll

LAVAGE-LABORBEFUNDPROTOKOLL

F-NR:

KLINISCHE DIAGNOSE:

STATION:

OP-DATUM:...../...../.....

NAME:

GEB.DATUM:/...../.....

LAVAGE

1 intra OP 2 Laparoskopie 3 Ascitespunktion / i.p.-Port 4 Pleurapunktat

.....

LAVAGEBEARBEITUNG

Material-OB: ca.ml klar / blutig +++ ++ + / Fibrin

Zytologisches Institut: ca.ml

Schnellzyto: + --

Pelletmenge: +++ ++ +

Zytozentrifugenpräparate:

APAAP-Färbung am:/...../.....

Restzytos:

BEFUNDUNG:

Bef. konvent. Zytologie (Zytologisches Institut)

0 negativ 1 verdächtig 2 positiv 4 wiederholungsbedürftig 5 diagn. n. verwertbar

.....

Befund SPAP (eigene Befundung)

0 negativ 1 verdächtig 2 positiv 5 diagn. n. verwertbar

.....

Befund Immunzytologie (Zytologisches Institut)

0 negativ 1 verdächtig 2 positiv 5 diagn. n. verwertbar

.....

Befund Immunzytologie (eigene Befundung)

0 negativ 1 unspez. pos 2 pos (low risk)
3 pos (high risk) 4 Peritonitis 5 diagn. n. verwertbar

.....

Fotofall:

.....

Befundprotokoll (SPAP-Zytologie):

Zellmenge:	diagn. n .ausr.	+++	++	+	
Leftzen:		+++	++	+	0
Einzelzellen:		+++	++	+	0
Morula:		+++	++	+	0
Tumorzellen:	Nein V.a. Ja (groß	mittel	klein	SRZ)
Kernatypien:	atyp. Mitosen	+++	++	+	0
Hyperchromasie:		+++	++	+	0
Mesothelaktivierung:	ca. %				
Begleitinfiltat:	ges. ca. %				
Lymphozyten:	anteilmäßig %				
Makrophagen:	anteilmäßig %				
Leukozyten:	anteilmäßig %				
sonstige:	anteilmäßig %				

Bemerkungen:

.....

.....

Befund-SPAP (eigene Befundung):

0 negativ 1 verdächtig 2 positiv 5 diagn. n. verwertbar

Befundprotokoll (Immunzytologie)

Ber-Ep4 / HEA 125

		POSITIV		NEGATIV	
Tumorzellen/ 40x	+++	++	+	0
Mesothel/ 40x	+++	++	+	0

CEA

Tumorzellen/ 40x	+++	++	+	0
Mesothel/ 40x	+++	++	+	0

BerMac 3 (Makrophagen)

ca. % Infiltratzellmenge

CA 19-9

Tumorzellen/ 40x	+++	++	+	0
Mesothel/ 40x	+++	++	+	0

CA 72-4

Tumorzellen/ 40x	+++	++	+	0
Mesothel/ 40x	+++	++	+	0

Bemerkungen:

.....

.....

Befund-Immunzytologie (eigene Befundung):

0 negativ 1 unspez. pos. 2 pos. (low risk) 3 pos. (high risk) 4 Peritonitis 5 diagn. n. verwertbar

8. Literaturverzeichnis

1. **Abe, N., Watanabe, T., Toda, H., Machida, H., Suzuki, K., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Atomi, Y., Nakaya, Y.**
Prognostic significance of carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washes in patients with gastric cancer
Am J Surg 181 (2001), 356-361
2. **Ajani, J.A.**
Ist neoadjuvante Therapie für lokal fortgeschrittene Magenkarzinome Standard?
Chirurg 73 (2000) 312-315
3. **Allgayer, H., Heiss, M.M., Schildberg, F.W.**
Prognostic factors in gastric cancer
Br J Surg 84 (1997) 1651-1664
4. **Asao, T., Fukuda, T., Yazawa, S., Nagamachi, Y.**
Carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washings can predict peritoneal recurrence after curative resection of gastric cancer
Cancer 68 (1991) 44-47
5. **Asao, T., Fukuda, T., Yazawa, S., Nagamachi, Y.**
CEA levels in peritoneal washings from gastric cancer patients as a prognostic guide
Cancer Lett 47 (1989) 79-81
6. **Bailey, M.E., Brown, R.W., Mody, D.R., Cagle, P., Ramzy, I.**
Ber-EP4 for differentiating adenocarcinoma from reactive and neoplastic mesothelial cells in serous effusions
Comparsion with carcinoembryonic antigen, B72.3 and Leu-M1
Acta Cytol 40 (1996) 1212-1216

- 7. Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P.**
Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule
Cell 57 (1989) 327-334
- 8. Bittorf, B.R., Günther, F., Merkel, S., Horbach, T., Hohenberger, W., Günther, K.**
Resektionsausmaß in der Chirurgie des Magenkarzinoms
Chirurg 73 (2002) 336-347
- 9. Bonenkamp, J.J., Songun, I., Hermans, J., van de Velde, C.J.H. and the kooperative investigators of the Dutch Gastric Cancer Trial**
Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric cancer
Br J Surg 83 (1996) 672-674
- 10. Boku, T., Nakane, Y., Minoura, T., Takada, H., Yamamura, M., Hioki, K., Yamamoto, M.**
Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer
Br J Surg 77 (1990) 436-439
- 11. Cancer JRSfG**
The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology
I. Clinical classification
Jpn J Surg 11 (1981) 127-139
- 12. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K., Stein, H., Mason, D.**
Immunoenzymatic labeling of monoklonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoklonal anti-alkaline phosphatase (APAAP Complexes)
Histochem Cytochem 32 (1984) 219-229

- 13. Davidson, B., Dong, H.P., Berner, A., Christensen, J., Nielsen, S., Johansen, P., Bryne, M., Asschenfeldt, P., Risberg, B.**
Detection of malignant epithel cells in effusions using flow cytometric immunophenotyping
An analysis of 92 cases
Am J Clin Pathol 118 (2002) 85-92
- 14. De Angelis, M., Buley, I.D., Heryet, A., Gray, W.**
Immuncytochemical staining of serous effusions with the monoclonal antibody Ber-EP4
Cytopathology 3 (1992) 111-117
- 15. Diaz-Arias, A.A., Loy, T.S., Bickel, J.T., Chapman, R.K.**
Utility of BER-EP4 in the diagnosis of adneocarcinoma in effusions: an immunocytochemical study of 232 cases
Diagn Cytopathol 9 (1993) 516-521
- 16. D'Ugo, D.M., Pende, V., Persiani, R., Rausei, S., Picciocchi, A.**
Laparoscopic staging of gastric cancer: An overview
J Am Coll Surg 196 (2003) 965-974
- 17. Dweger, A., Berger, D.P., Engelhardt, R.**
Magenkarzinom
In: „Das Rote Buch Hämatologie und Internistische Onkologie“, Berger, D.P., Engelhardt, R., Mertelsmann, R., Henß, H., Behringer, D. (Hrsg.), ecomed-Verl.- Ges., Landsberg/ Lech, 2002, 2. Auflage, 585-592
- 18. El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W-H., McColl, K.E.L., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C-C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni Jr, J.F., Rabkin, C.S.**
Interleukin- 1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer
Nature 404 (2000) 398-402

- 19. Fujimoto, S., Takahashi, M., Mutou, T., Kaboyashi, K., Toyasawa, T.**
Successful intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion for the prevention of postoperative peritoneal recurrence in patients with advanced gastric carcinoma
Cancer 85 (1999) 529-534
- 20. Fujimoto, T., Zhang, B., Minami, S., Wang, X., Takahashi, Y., Mai, M.**
Evaluation of intraoperative intraperitoneal cytology for advanced gastric carcinoma
Oncology 62 (2002) 201-208
- 21. Funami, Y., Tokumoto, N., Miyauchi, H., Ochiai, T., Kuga, K.**
Prognostic value of peritoneal lavage cytology and chemotherapy during surgery for advanced gastric cancer
Int Surg 84 (1999) 220-224
- 22. Gaffey, M.J., Mills, S.E., Swanson, P.E., Zarbo, R.J., Shar, A.R., Wick, M.R.**
Immuno reactivity for Ber-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors and malignant mesotheliomas
Am J Surg Pathol 16 (1992) 593-599
- 23. Gilly, F.N., Carry, P.Y., Sayag, A.C., Brachet, A., Panteix, G., Salle, B., Biennu, J., Burgard, G., Guibert, B., Banssillon, V., Brailon, G.**
Regional chemotherapy (with Mitomycin C) and intra-operative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis
Hepato-Gastroenterol 41 (1994) 124-129
- 24. Glehen, O., Mithieux, F., Osinsky, D., Beaujard, A.C., Freyer, G., Guertsch, Ph., Francois, Y., Peyrat, P., Panteix, G., Vignal, J., Gilly, F.N.**
Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: A phase II study
J Clin Oncol 21 (2003) 799-806

- 25. Glehen, O., Mohamed, F., Gilly, F.N.**
Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia
Lancet Oncol 5 (2004) 219-228
- 26. Gold, P., Freedman, S.O.**
Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques
J Exp Med 121 (1964) 439-462
- 27. Gold, P., Freedman, S.O.**
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system
J Exp Med 122 (1965) 467-481
- 28. Goldstone, A.R., Quirke, P., Dixon, M.F.**
Helicobacter pylori infection and gastric cancer
J Pathol 179 (1996) 129-137
- 29. Hagiwara, A., Takahashi, T., Sawai, K., Taniguchi, H., Shimotsuma, M., Okano, S., Sakakura, C., Tsujimoto, H., Osaki, K., Sasaki, S.**
Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice
Cancer Res 53 (1993) 687-692
- 30. Hamazoe, R., Maeta, M., Kaibara, N.**
Intraperitoneal thermochemotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer
Cancer 73 (1994) 2048-2052
- 31. Hayes, N., Wayman J., Wadehra, V., Scott, D.J., Rames, S.A., Griffin, S.M.**
Peritoneal cytology in the surgical evaluation of gastric carcinoma
Br J Cancer 79 (1999) 520-524

- 32. Heiss, M.M., Becker, K., Böttcher, K., Dittler, H.J., Fink, U., Janetschek, P., Roder, J.D., Sander, R., Siewert, J.R., Weber, B.**
Magenkarzinome
In: "Manual, Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge", Heiss, M.M. (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag München Bern Wien New York, 2001, 6.Auflage, 117-138
- 33. Hermanek, P.**
Disseminated tumor cells versus micrometastasis: Definitions and problems
Anticancer Res 19 (1999) 2771-2774
- 34. Hermanek, P.**
Tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: histopathology, staging and prognosis
Anticancer Res 19 (1999) 2393-2396
- 35. Hermanek, P., Maruyama, K., Sobin, L.H.**
Stomach carcinoma
In: "Prognostic factors in cancer", Hermanek, P., Gospodarowicz, M.K., Henson, D.E., Hutter, R.V.P., Sobin, L.H. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1995, 47-63
- 36. Herold, G., und Mitarbeiter**
Magenkarzinom
In: „Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung“
Gerd Herold Köln, 2005, 364-367
- 37. Hiratsuka, M., Miyashiro, I., Ishikawa, O., Furukawa, H., Motomura, K., Ohigashi, H., Kameyama, M., Sasaki, Y., Kabuto, T., Ishiguro, S., Imaoka, S., Koyama, H.**
Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery
Surgery 129 (2001) 335-340

- 38. Iitsuka, Y., Shiota, S., Matsui, T., Murata, Y., Kimura, A., Koga, S.**
Relationship between the cytologic characteristics of intraperitoneal free cancer cells and the prognosis in patients with gastric cancer
Acta Cytol 34 (1990) 437-442
- 39. Ikeguchi, M., Oka, A., Tsujitani, S., Maeta, M., Kaibara, N.**
Relationship between area of serosal invasion and intraperitoneal free cancer cells in patients with gastric cancer
Anticancer Res 14 (1994) 2131-2134
- 40. Imada, T., Rino, Y., Cyo, H., Oshima, T., Hatori, S., Wakebe, S., Kabara, K., Shiozawa, M., Takahashi, M., Takanashi, Y.**
The detection of microscopically disseminated cancer cells in the abdominal cavity by intraoperative lavage cytology combined with an immunocytochemical method in Gastric cancer
Anticancer Res 19 (1999) 4965-4968
- 41. Jaehne, J., Meyer, H.-J., Soudah, B., Maschek, H., Pichlmayr, R.**
Peritoneal lavage in gastric carcinoma
Dig Surg 6 (1989) 26-28
- 42. Jensen, M.L., Johansen, P.**
Immunocytochemical staining of serous effusions: an additional method in the routine cytology practice?
Cytopathol 5 (1994) 93-103
- 43. Johnston, W.W., Szpak, C.A., Thor, A., Simpson, J.F., Schlom, J.**
Application of immunocytochemistry to clinical cytology
Canc Inv 5 (1987) 593-611
- 44. Jonas, S., Weinrich, M., Tullius, S.G., Al-Abadi, H., Steinbrich, R., Radke, C., Klupp, J., Neuhaus, P.**
Microscopic tumor cell dissemination in gastric cancer
Surg Today 34 (2004) 101-106

- 45. Juhl, H., Kalthoff, H., Krüger, U., Henne-Bruns, D., Kremer, B.**
Immunzytologischer Nachweis mikrometastatischer Zellen bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren
Zentralbl Chir 120 (1995) 116-122
- 46. Juhl, H., Stritzel, M., Wroblewski, A., Henne-Bruns, D., Kremer, B., Schmiegel, W., Neumaier, M., Wagener, C., Schreiber, H.-W., Kalthoff, H.**
Immunocytological detection of micrometastatic cells: Comparative evaluation, of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients
Int J Cancer 57 (1994) 330-335
- 47. Kaplan, E.L., Meier, P.**
Nonparametric estimation from incomplete observations
J Am Stat Assoc 53 (1958) 457- 481
- 48. Karpeh, M.S.**
Einfluss des laparoskopischen Staging auf die Therapie des Magenkarzinoms
Chirurg 73 (2002) 306-311
- 49. Kitagawa, Y., Burian, M., Kitajima, M.**
Methods of sentinel lymph node mapping
Chirurg 75 (2004) 751-756
- 50. Kitagawa, Y., Fujii, H., Mukai, M., Kubota, T., Otani, Y., Kitajima, M.**
Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer
Br J Surg 89 (2002) 604-608
- 51. Kiyasu, Y., Kaneshima, S., Koga, S.**
Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer
Cancer Res 41 (1981) 1236-1239

- 52. Kochi, M., Fujii, M., Kanamori, N., Kaiga, T., Kawakami, T., Aizaki, K., Kasahara, M., Mochizuki, F., Kasakura, Y., Yamagata, M.**
Evaluation of serum CEA and CA 19-9 levels as prognostic factors in patients with gastric cancer
Gastric Cancer 3 (2000) 177-186
- 53. Koder, Y., Nakanishi, H., Yamamura, Y., Shimizu, Y., Torii, A., Hirai, T., Yasui, K., Morimoto, T., Kato, T., Kito, T., Tatematsu, M.**
Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology
Int J Cancer 79 (1998) 429-433
- 54. Koder, Y., Yamamura, Y., Shimizu, Y., Torii, A., Hirai, T., Yasui, K., Morimoto, T., Kato, T.**
Peritoneal washing cytology: Prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection
J Surg Oncol 72 (1999) 60-65
- 55. Koder, Y., Nakanishi, H., Ito, S., Yamamura, Y., Kanemitsu, Y., Shimizu, Y., Hirai, T., Yasui, K., Kato, T., Tatematsu, M.**
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 235 (2002) 499-506
- 56. Koder, Y., Nakanishi, H., Ito, S., Yamamura, Y., Kanemitsu, Y., Shimizu, Y., Hirai, T., Yasui, K., Kato, T., Tatematsu, M.**
Quantitative detection of disseminated cancer cells in the greater omentum of gastric carcinoma patients with real-time RT-PCR:
a comparison with peritoneal lavage cytology
Gastric Cancer 5 (2002) 69-76

- 57. Kulke, M., Savarese, D.M.F.**
Management of advanced gastric cancer
www.uptodate.com (2004)
- 58. Lamerz, R., Strieber, P., Borlinghaus, P., Schmid, L.**
Tumormarker
In: "Manual, Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge", Heiss, M.M. (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag
München Bern Wien New York, 2001, 6.Auflage, 43-49
- 59. Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, H., Stein, H.**
Ber-EP4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia
J Clin Pathol 43 (1990) 213-219
- 60. Lee, C.C., Lo, S.S., Wu, C.W., Shen, K.H., Li, A.F., Hsieh, M.C., Lui, W.Y.**
Peritoneal recurrence of gastric adenocarcinoma after curative resection
Hepatogastroenterology 50 (2003) 1720-1722
- 61. Lindblom, A., Liljegren, A.**
Tumour markers in malignancies
Regular review
BM J 320 (2000) 424-427
- 62. Lüttges, J., Neumann, K., Pfluger, K.-H., Schmitz-Moormann, P.**
Differentialzytologie von Ergussflüssigkeiten unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern
Pathologie 9 (1988) 137-142
- 63. Maehara, Y., Kusumoto, T., Takahashi, I., Kakeji, Y., Baba, H., Akazawa, K., Sugimachi K.**
Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer
Oncology 51 (1994) 859-862

- 64. Martin, J., Goellner, J.**
Abdominal fluid cytologie in patients with gastrointestinal malignant lesions
Mayo Clin Proc 61 (1986) 467-471
- 65. Maruyama, K., Gunven, P., Okabayashi, K., Sasako, M., Kinoshita, T.**
Lymph node metastases of gastric cancer
General pattern in 1931 patients
Ann Surg 210 (1989) 596-602
- 66. Matsuoka, T., Yashiro, M., Nishimura, S., Inoue, T., Fujihara, T., Sawada, T., Kato, Y., Seki, S., Hira Kawa-Ys Chung, K.**
Increased expression of alpha2beta1-integrin in the peritoneal dissemination of human gastric carcinoma
Int J Mol Med 5 (2000) 21-25
- 67. Mezger, J., Stötzer, O., Schilli, G., Bauer, S., Wilmanns, W.**
Können Karzinomzellen in Aszites- und Pleurapunktaten durch den immunzytochemischen Nachweis der „panaepithelialen Antigene“ EMA, egp34, BW-495 und TAG-76 zuverlässig identifiziert werden?
Pathologe 12 (1991) 30-34
- 68. Morell, A.R.**
CEA serum levels in non-neoplastic disease
Int J Biol Mark 7 (1992) 160-166
- 69. Nakajima, T., Harashima, S., Hirata, M., Kajitani, T.**
Prognostic and therapeutic values of peritoneal cytology in gastric cancer
Acta Cytologica 22 (1978) 225-229
- 70. Nakane, Y., Okamura, S., Akehira, K., Boku, T., Okusa, T., Tanaka, K., Hioki, K.**
Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients
Cancer 73 (1994) 2703-2708

- 71. Nakanishi, H., Kodera, Y., Torii, A., Hirai, T., Yamamura, Y., Kato, T., Kito, T., Tatematsu, M.**
Detection of carcinoembryonic antigen-expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chain reaction
Jpn J Cancer Res 88 (1997) 687-692
- 72. Nakanishi, H., Kodera, Y., Yamamura, Y., Ito, S., T., Kato, T., Ezaki, T., Tatematsu, M.**
Rapid quantitative detection of carcinoembryonic antigen- expression free tumor in the peritoneal cavity of gastric-cancer patients with real-time RT-PCR on the lightcycler
Int J Cancer 89 (2000) 411-417
- 73. Nekarda, H., Geß, C., Stark, M., Mueller, J.D., Fink, U., Schenck, U., Siewert, J.R.**
Immuncytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma
Br J Cancer 79 (1999) 611-619
- 74. Nishiyama, M., Takshima, I., Tanaka, T., Yoshida, K., Toge, T., Nagata, N., Iwamori, S., Tamura, Y.**
Carcinoembryonic antigen levels in the peritoneal cavity: Useful guide to peritoneal recurrence and prognosis for gastric cancer
World J Surg 19 (1995) 133-137
- 75. Onorato, A., Ohkura H., Okajima, K., Sasako, M., Kinoshita, T., Maruyama, K.**
Nonanatomic prognostic factors for gastric cancer patients: significance of tumor markers
In: „Recent advances in management of digestive cancers“ Takahashi, T., (ed) Springer, Berlin Heidelberg New York, 1993, 596-602

- 76. Oyama, K., Terashima, M., Takagane, A., Maesawa, C.**
Prognostic significance of peritoneal minimal residual disease in gastric cancer detected by reverse transcription-polymerase chain reaction
Br J Cancer 91 (2004) 435-443
- 77. Raj, G.V., Moreno, J.G., Gomella, L.G.**
Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors
Cancer 82 (1998) 1419-1442
- 78. Robert Koch- Institut (2002)**
Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trend
<http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2002/BROSCHUERE2002.PDF>
- 79. Robinson, R.J., Royston, D.**
Comparison of monoclonal antibodies AUA1 and BER EP4 with anti-CEA for detecting carcinoma cells in serous effusions and distinguishing them from mesothelial cells
Cytopathol 4 (1993) 267-271
- 80. Roder, J., Böttcher, K., Siewert, J.R., Busch, R., Hermanek, P., Meyer, H.**
Prognostic factors in gastric carcinoma
Cancer 72 (1993) 2089-2097
- 81. Rösch, Th.**
Endosonographic staging of gastric cancer: a review of literature results
Gastrointest Clin North Am 3 (1995) 549-557
- 82. Roukos, D.H.**
Current status and future perspectives in gastric cancer management
Cancer Treat Rev 26 (2000) 243-255

- 83. Sadeghi, B., Arvieux, C., Glehen, O., Beaujard, A., Rivoire, M., Baulieux, J., Fontaumard, E., Brachet, A., Caillot, J.L., Faure, J.L., Porcheron, J., Peix, J.L., Francois, Y., Vignal, J., Gilly, F.N.**
Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies
results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study
Cancer 88 (2000) 358-364
- 84. Schmid, A., Kremer, B.**
Chirurgische Prinzipien beim Magencarcinom
Chirurg 71 (2000) 974-986
- 85. Schmidt, O., Tannapfel, A., Wittekind, Ch., Hohenberger, W.**
Wertigkeit cytologischer Untersuchungen beim Staging solider Tumoren
Chirurg 68 (1997) 90-93
- 86. Schott, A., Vogel, I., Krueger, U., Kalthoff, H., Schreiber, H.-W., Schmiegel, W., Henne-Bruns, D., Kremer, B., Juhl, H.**
Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker
Ann Surg 227 (1998) 372-379
- 87. Sandler, A., Böttcher, K., Etter, M., Siewert, J.R.**
Das Magenkarzinom
Internist 41 (2000) 817-830
- 88. Sandler, A., Etter, M., Böttcher, K., Siewert, J.R.**
Resektionsausmaß in der Chirurgie des Magenkarzinoms
Chirurg 73 (2002) 316-324
- 89. Sandler, A., Siewert, J.R.**
Diagnostik und Staging beim Magenkarzinom
Dtsch Med Wochenschr 125 (2000) 323-326

- 90. Sendler, A., Siewert, J.R.**
Aktuelle Therapie des Magenkarzinoms
Dtsch Med Wochenschr 125 (2000) 359-362
- 91. Sendler, A., Stein, H.J., Fink, U., Siewert, J.R.**
Neue Therapieansätze bei Tumoren des oberen
Gastrointestinaltrakts (Oesophagus, Magen)
Chirurg 71 (2000) 1447-1457
- 92. Sheibani, K., Shin, S.S., Kezirian, J., Weiss, L.M.**
Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant
mesothelioma versus adenocarcinoma
Am J Surg Pathol 11 (1991) 779-7845
- 93. Shield, P.**
Peritoneal washing cytology
Cytopathol 15 (2004) 131-141
- 94. Shimotsuma, M., Shields, J.W., Simpson-Morgan, M.W., et al**
Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum
associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity
Lymphology 26 (1993) 90-101
- 95. Siewert, J.R.**
Auf dem Weg zur Individualisierung der Therapie des Magenkarzinoms
Chirurg 73 (2002) 305
- 96. Siewert, J.R., Böttcher, K., Roder, J.D., Fink, U.,**
Palliative treatment from the surgical point of view
In: „Gastric cancer“ Nishi, M., Ichikawa, H., Nakajima, T., Maruyama, K.,
Tahara, E., (eds), Springer, Berlin Heidelberg New York, 1993

- 97. Siewert, J.R., Sandler, A.**
Potential and futility of sentinel node detection for gastric cancer
Recent Results Cancer Res 157 (2000) 259-269
- 98. Siewert, J.R., Stein, H.J.**
Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction
Br J Surg 85 (1998) 1457-1459
- 99. Simon, B., Podolsky, D.K., Moldenhauer, G., Isselbacher, K.J., Gattioni-Celli, S., Brand, S.J.**
Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein
Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 2755-2759
- 100. Stoop, J. A., Hendriks, J.G., Berends, D.**
Identification of malignant cells in serous effusions using a panel of monoclonal antibodies BER-EP4, MCA-b-12 and EMA
Cytopathology 3 (1992) 297-302
- 101. Suzuki, T., Ochiai, T., Hayashi, H., Hori, S., Shimada, H., Isono, K.**
Peritoneal lavage cytology findings as prognostic factor for gastric cancer
Semin Surg Oncol 17 (1999) 103-107
- 102. Suzuki, T., Ochiai, T., Hayashi, H., Nakajima, K., Yasumoto, A., Hishikawa, E., Shimada, H., Horiuchi, F., Ohki, S., Isono, K.**
Importance of positive peritoneal lavage cytology findings in the stage grouping of gastric cancer
Surg Today 29 (1999) 111-115
- 103. Tanaka, T., Kumagai, K., Shimizu, K., Masuo, K., Yamagata, K.**
Peritoneal metastasis in gastric cancer with particular reference to lymphatic advancement; Extranodal invasion is a significant risk factor for peritoneal metastasis
J Surg Oncol 75 (2000) 165-171

- 104. Vogel, P., Rüschoff, J., Kümmel, S., Zirngibl, H., Hofstädter, F., Hohenberger, W., Jauch, K.-W.**
Immuncytology improves prognostic impact of peritoneal tumour cell detection compared to conventional cytology in gastric cancer
Eur J Surg Oncol 25 (1999) 515-519
- 105. Warshaw, A.**
Implications of peritoneal cytology for staging of early pancreatic cancer
Am J Surg 161 (1990) 26-30
- 106. Wilke, H., Preusser, P., Fink, U., Achterrath, W., Meyer, H.J., Stahl, M., Lenaz, L., Meyer, J., Siewert, J.R., Gerlings, H., Köhne-Wömpner, C.H., Harstrick, A., Schmoll, H.-J.,**
New developments in the treatment of gastric carcinoma
Semin Oncol 17 (1990) 61-70
- 107. Wittekind, C., Meyer, H.J., Bootz, F.**
Magen (ICD-0 C16)
In: „UICC International Union Against Cancer Klassifikation maligner Tumoren“, Springer-Verlag
Berlin, 2001, 6. Auflage, 59-62
- 108. Wohrer, S.S., Raderer, M., Hejna, M.**
Palliative chemotherapy for advanced gastric cancer
Ann Oncol 11 (2004) 1585-1595
- 109. Wu, C.-C., Chen, J.-T., Chang, M.-C., Ho, W.-L., Chen, C.-Y., Yeh, D.-C., L., T.-J., P'eng F.-K.**
Optimal surgical strategy for potentially curable serosa-involved gastric carcinoma with intraperitoneal free cancer cells
J American Coll Surg 184 (1997) 611-617

- 110. Wu, G., Zhu, Z., In, S.**
Viability and deviability of cancer cells from peritoneal cavity or primary focus in patients with gastric cancer
1st International Gastric Cancer Congress, Kyoto, Japan (1995) 1735-1740
- 111. Yamazaki, H., Oshima, A., Murakami, R., Endoh, A., Ubukata, T.**
A long-term follow-up study of patients with gastric cancer detected by mass screening
Cancer 63 (1989) 613-617
- 112. Yonemura, Y., Endou, Y., Fujimura, T., Fushida, S., Bandou, E., Kinoshita, K., Sugiyama, K., Sawa, T., Kim, B.-S., Sasaki, T.**
Diagnostic value of preoperative RT-PCR-based screening method to detect carcinoembryonic antigen-expressing free cancer cells in the peritoneal cavity from patients with gastric cancer
ANZ J Surg 71 (2001) 521-528
- 113. Yonemura, Y., Fujimura, T., Ninomiya, I., Kim, B.-S., Bandou, E., Sawa, S., Kinoshita, K., Endo, Y., Sugiyama, K., Sasaki, T.**
Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 mRNA
Clin Cancer Res 7 (2001) 1647-1653
- 114. Yonemura, Y., Ninomiya, I., Kayi, M., Sugiyama, K., Fujimura, K., Sawa, S., Katayama, K., Tanaka, S., Hirono, Y., Miwa, K., Miyazaki, I.**
Prophylaxis with intraoperative chemohyperthermia against peritoneal recurrence of serosal invasion-positiv gastric cancer
World J Surg 19 (1995) 450-455
- 115. Yoo, C.H., Noh, S.H., Shin, D.W., Choi, S.H., Min, J.S.**
Recurrence following curative resection for gastric carcinoma
Br J Surg 87 (2000) 236-242

- 116. Yoshikawa, T., Tsuburaya, A., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Yanoma, S., Noguchi, Y.**
Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer
Cancer Lett 151 (2000) 81-86
- 117. Yoshikawa, T., Yanoma, S., Tsuburaya, A., Kobayashi, O., Sairenji, M., Motohashi, H., Noguchi, Y.**
Angiogenesis inhibitor, TNP-470, suppresses growth of peritoneal disseminating foci
Hepatogastroenterology 47 (2000) 298-302
- 118. Yu, W., Whang, I., Suh, I., Averbach, A., Chang, D., Sugarbaker, P.H.**
Prospective randomized trial of early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant to resectable gastric cancer
Ann Surg 228 (1998) 347-354
- 119. Ziselman, E., Harkavy, S., Hogan, M., West, W., Atkinson, B.**
Peritoneal washing cytology
Acta Cytologica 28 (1984) 105-110

9. Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 2.1	Alkalische-Phosphatase (AP)-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex-Methode	34
Abbildung 4.1	Gesamtüberleben und Residualtumor	53
Abbildung 4.2	Gesamtüberleben und freie Tumorzellen in den einzelnen diagnostischen Patientenkollektiven, n= 313	54
Abbildung 4.3	Gesamtüberleben und freie Tumorzellen in den einzelnen diagnostischen Patientenkollektiven Ber-Ep4 im Vergleich mit CEA, n= 313	54
Abbildung 4.4	Überleben und freie Tumorzellen bei 230 R0-reserzierten Patienten	56
Abbildung 4.5	Überleben des R0- Kollektivs und Ber-Ep4- und CEA-Ergebnisse, n= 230	56
Abbildung 7.1:	Lavage SPAP-Färbung, 20-fache Vergrößerung	83
Abbildung 7.2:	Lavage mit Ber-Ep4 Färbung, 40-fache Vergrößerung	83
Abbildung 7.3:	Lavage mit positiver Ber-Ep4-Färbung unter 40-facher Vergrößerung	84
Abbildung 7.4:	Lavage mit positiver CEA-Färbung unter 40-facher Vergrößerung	84

Abbildung 7.5: positive Ber-Ep4-Färbung einer Lavage, aber keine
Tumorzellkriterien bei 40-facher Vergrößerung 85

Abbildung 7.6: PBS-Negativ-Kontrolle einer Lavage bei 20-facher Vergrößerung
85

10. Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1.1	Stadiengruppierung nach UICC 2001(107, S.60,61)	4
Tabelle 1.2	Prognosefaktoren beim Magenkarzinom	11
Tabelle 1.3	PC Stadieneinteilung nach Gilly et al. (23, S.124)	16
Tabelle 2.1	Angewandte Operationsverfahren	28
Tabelle 2.2	Stadienverteilung (UICC, 2001) bei 313 Magenkarzinompatienten	29
Tabelle 4.1	Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus Immunzytologie mit CEA	36
Tabelle 4.2	Zusammenfassende Beurteilung des Vergleichs der Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus der Immunzytologie mit CEA	37
Tabelle 4.3	Nachweis intraabdominaler freier Tumorzellen und R-Status des Gesamtstudienkollektivs (n= 313	38
Tabelle 4.4	Nachweis intraabdominaler ‚freier‘ Tumorzellen und TNM Einteilung bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs	39
Tabelle 4.5	Verteilung Färbeergebnisse zur UICC-Stadieneinteilung des Gesamtstudienkollektivs n= 313	40

Tabelle 4.6	Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und histomorphologische Kriterien bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs	42
Tabelle 4.7	Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und weitere histomorphologische Kriterien bei 313 Patienten des Gesamtkollektivs	43
Tabelle 4.8	Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus Immunzytologie mit CEA bei 230 R0-resezierten Patienten	45
Tabelle 4.9	Zusammenfassende Beurteilung des Vergleichs der Immunzytologie mit Ber-Ep4 versus der Immunzytologie mit CEA bei 230 R0-resezierten Patienten	46
Tabelle 4.10	Nachweis intraabdominaler ‚freier‘ Tumorzellen und TNM Einteilung bei 230 Patienten des R0-Kollektivs	47
Tabelle 4.11	Verteilung intraabdomineller Tumorzellen und UICC-Stadium beim R0-Kollektiv	48
Tabelle 4.12	Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und histomorphologische Kriterien bei 230 Patienten des R0-Kollektivs	50
Tabelle 4.13	Nachweis intraabdomineller freier Tumorzellen und histomorphologische Kriterien bei 230 Patienten des R0-Kollektivs	51
Tabelle 5.1	Vergleich veröffentlichter Studien mit unseren Ergebnissen nach Publikationsjahren aufgelistet	66

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Hjalmar Nekarda für die Überlassung des Themas, für die Hilfe bei der Auswertung der Färbungen, für die hilfreichen fachlichen Diskussionen und Ratschläge für die intensive und kontinuierliche Betreuung meiner Arbeit und für seine Geduld, die mich immer wieder zur Weiterführung dieser Arbeit ermutigt hat.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. med. Robert Rosenberg, Assistent an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar für die Unterstützung bei der Auswertung innerhalb dieser Studie, Durchsicht des Manuskriptes und seine wertvollen Anregungen.

Für die überaus freundliche Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen, sowie für ihre hilfsbereiten und tatkräftigen Unterstützung danke ich Frau Carmen Marthens, medizinisch-technische Assistentin des Chirurgisch-Onkologischen Labors der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar.

Ausdrücklich seien auch meine Eltern und meine Schwester erwähnt, die mit großem Einsatz und Verständnis meinen Werdegang gefördert und mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte die Reihe meiner Danksagung mit Dr. med Rainer Haseneder abschließen, der mir aufgrund der Bereitstellung seiner Formatvorlage viel Ärger vor dem Computer ersparen konnte.