

Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Markus W. Bächler

Abteilung für Allgemein-, Viszeral und Transplantationschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Markus W. Bächler

Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Pankreaskarzinom anhand der Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen im Blut

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades in der Zahnheilkunde

an der

Medizinischen Fakultät Heidelberg

der

Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

Wladislav Seibold

aus

Nowosibirsk, Russland

2018

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Claus R. Bartram

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Markus Diener

Betreuer: Herr Priv.-Doz. Dr. Ulrich Bork

Für meine Eltern, meine Frau und meine Kinder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Einteilung der Pankreastumoren.....	3
1.1.3 Pathogenese	3
1.1.4 Lokalisation und Metastasierung	6
1.1.5 Klassifikationen von Tumoren	7
1.1.6 Therapie.....	12
1.1.7 Prognose.....	14
1.2 Diagnostik.....	15
1.3 Nachsorge.....	16
1.4 Klinische Problematik	16
1.5 Disseminierte Tumorzellen.....	17
1.6 Das Veridex CellSearch System	19
1.7 Fragestellung	20
2 Patienten und Methoden	21
2.1 Vorstellung der Studie.....	21
2.2 Patienten	21
2.2.1 Patientenauswahl.....	21
2.2.2 Patientenscreening.....	22
2.3 Gewinnung der Blutproben und Erfassung der zirkulierenden Tumorzellen.....	23
2.4 Das Veridex CellSearch System	23
2.4.1 Das CellSearch Circulating Tumor Cell Kit	24
2.4.2 Aufbereitung der in den CellSave Preservative Tubes gelagerten Proben mit dem CellTracks AutoPrep System.....	25
2.4.3 Der CellTracks Analyzer II	27
2.5 Statistische Auswertung.....	29
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Studienpopulation	31

3.2	Die Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen	33
3.3	Auswertung der prognostischen Parameter	36
4	Diskussion	43
4.1	Resümee der Fragestellung	43
4.2	Ist das Veridex CellSearch System ein geeignetes Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen?.....	44
4.3	Diskussion der vorliegenden Ergebnisse	45
4.4	Die Rolle zirkulierender Tumorzellen	46
4.5	Ausblick.....	47
5	Zusammenfassung.....	48
6	Literaturverzeichnis.....	50
7	Eigene Publikation	55
8	Lebenslauf	56
8.1	Personalien	56
8.2	Schulischer Werdegang	56
8.3	Ausbildung & Studium.....	56
8.4	Arbeit.....	57
8.5	Größere Fortbildungen.....	57
8.6	Mitgliedschaften.....	57
9	Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BRCA2	Breast cancer 2
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcino-Embryonic Antigen
CI	Confidence interval
CT	Computertomographie
CTC	Circulating tumor cell
cTNM	Clinical Tumor, nodes, metastases - Staging
DTC	Disseminated tumor cell
DPC4	Deleted in pancreatic cancer locus 4
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
HR	Hazard Ratio
IPMN	Intraductal papillary mucinous neoplasm
IQR	Interquartilsabstand
MCN	Mucinous cystic neoplasm
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
OS	Overall survival
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasm
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PFS	Progression-free survival
SD	Standard deviation
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNM - Staging	(primary) Tumor, nodes, metastases - Staging
UICC	Union internationale contre le cancer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Progressionsmodell der PanINs	5
Abbildung 2:	Modell der metastatischen Kaskade von Tumorzellen	17
Abbildung 3:	CellSearch Circulating Tumor Cell Kit	24
Abbildung 4:	CellTracks AutoPrep System	26
Abbildung 5:	CellTracks Analyzer II	27
Abbildung 6:	Darstellung der als Tumorzellen in Frage kommender Objekte durch den CellTracks Analyzer II	28
Abbildung 7:	Zusammenhang zwischen dem Progressionsfreien Überleben und dem präoperativen Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der gesamten Kohorte	37
Abbildung 8:	Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und dem präoperativen Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der gesamten Kohorte	38
Abbildung 9:	Progressionsfreies Überleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der kurativen Gruppe	40
Abbildung 10:	Gesamtüberleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der kurativen Gruppe	40
Abbildung 11:	Progressionsfreies Überleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der palliativen Gruppe	41
Abbildung 12:	Gesamtüberleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der palliativen Gruppe	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Bauchspeicheldrüsenkrebs in Deutschland	2
Tabelle 2:	UICC Klassifikation des Pankreaskarzinoms	8
Tabelle 3:	UICC Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms	9
Tabelle 4:	UICC Klassifikation des histopathologischen Differenzierungsgrades	10
Tabelle 5:	UICC Klassifikation der Lymph- und Venenbeteiligung	10
Tabelle 6:	UICC Klassifikation von Residualtumoren	11
Tabelle 7:	Einteilung der Zuverlässigkeit der jeweiligen Klassifikation	11
Tabelle 8:	Präfixe des TNM Staging	12
Tabelle 9:	Charakteristika der Studienpopulation	32
Tabelle 10:	Abhängigkeit der Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen in der Gesamtkohorte	34
Tabelle 11:	Univariate Analyse eventueller Zusammenhänge klinisch-pathologischer Parameter mit dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen	35
Tabelle 12:	Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der gesamten Kohorte	36
Tabelle 13:	Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der gesamten Kohorte	39
Tabelle 14:	Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der kurativen Gruppe	42

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Pankreaskarzinom nimmt mit weltweit 338.000 Neuerkrankungen im Jahr 2012 [1] zurzeit die zwölfte Stelle unter den häufigsten Krebsarten ein. Dies entspricht ca. 2% aller Krebsneuerkrankungen für das Jahr 2012 weltweit [2]. Aufgrund der sehr hohen Letalität und geringen 5-Jahre-Überlebensrate [3] war Bauchspeicheldrüsenkrebs im Jahr 2012 weltweit gleichzeitig an siebter Stelle der Krebstodesursachenstatistik [1].

Pankreaskarzinome treten dabei besonders gehäuft in den westlichen Industrienationen auf [3]. Die höchste Anzahl an Neuerkrankungen 2012 war dabei in Nord Amerika und die niedrigste im Mittleren Afrika festgestellt worden [2]. In Europa war Bauchspeicheldrüsenkrebs 2012 mit ca. 104.000 Neuerkrankungen an achter Stelle der häufigsten Krebsarten [2]. Die Mortalität und Inzidenz sind beim Pankreaskarzinom aufgrund der ungünstigen Prognose nahezu identisch [4].

In Deutschland wurden 2012 16.451 Neuerkrankungen mit Bauchspeicheldrüsenkrebs diagnostiziert was 7,86 Fällen pro 100.000 Einwohner entsprach, damit befindet sich Deutschland was das Erkrankungsrisiko angeht europaweit im oberen Mittelfeld [2]. Die altersstandardisierten Neuerkrankungs- und Sterberaten sind in Deutschland seit Ende der 1990er Jahre vor allem bei den Frauen leicht gestiegen, und auch die absoluten Fallzahlen steigen aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung stetig an [4]. Im Schnitt werden Männer mit 71 Jahren und Frauen mit 75 Jahren mit Bauchspeicheldrüsenkrebs diagnostiziert [5]. Pankreaskarzinome werden aufgrund keiner oder nur unspezifischer Symptome oft erst spät erkannt, was sich entsprechend negativ auf die 5-Jahres-Überlebensrate auswirkt. Diese liegt in Deutschland für Männer bei 9% und für Frauen bei 10% [4].

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Bauchspeicheldrüsenkrebs in Deutschland [4]

Inzidenz	2013		2014		Prognose für 2018	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	8.750	8.690	8.550	8.580	9.500	9.500
rohe Erkrankungsrate ¹	22,2	21,1	21,6	20,8	23,5	22,9
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	14,5	10,7	13,9	10,4	14,4	11,1
mittleres Erkrankungsalter	72	75	72	75		
Mortalität						
	2013		2014		2015	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Sterbefälle	8.273	8.328	8.231	8.384	8.497	8.659
rohe Sterberate ¹	21,0	20,2	20,7	20,3	21,2	20,9
standardisierte Sterberate ^{1,2}	13,4	9,7	13,0	9,5	13,2	9,8
mittleres Sterbealter ³	73	77	73	77	73	77
¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median						
Prävalenz und Überlebensraten			5 Jahre		10 Jahre	
			Männer	Frauen	Männer	Frauen
Prävalenz			8.900	8.800	10.900	11.000
absolute Überlebensrate (2013-2014) ⁴			8 (7-10)	9 (7-12)	5 (4-8)	6 (5-8)
relative Überlebensrate (2013-2014) ⁴			9 (8-12)	10 (7-14)	8 (6-11)	8 (6-11)
⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)						

Als einer der gesicherten Risikofaktoren gilt neben höherem Alter vor allem das Tabakrauchen, wobei auch Passivrauchen eine Rolle spielt [3]. Essensgewohnheiten scheinen von geringerer Bedeutung als bei anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes zu sein, dennoch haben auch beim Pankreaskarzinom eine ausgeglichene Ernährung mit viel Obst und Gemüse, sowie eine angemessene Kalorienzufuhr, welche sowohl durch Ernährung als auch durch Sport geregelt werden kann, sich positiv auf das Risiko einen Pankreastumor zu entwickeln ausgewirkt [3, 6]. Entsprechend negativ ist dagegen starkes Übergewicht (Adipositas), sowie Diabetes mellitus Typ 2. Zudem scheint auch ein übermäßiger Alkoholkonsum die Entstehung des Tumors zu begünstigen. Ein weiterer Risikofaktor ist eine langjährige Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die Pankreatitis, welche oftmals ebenfalls durch langjährigen Alkoholabusus hervorgerufen oder auch vererbt werden kann [3, 4]. Auch Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem Bauchspeicheldrüsentumor haben ein erhöhtes Risiko selbst zu erkranken, inwieweit dafür ein ähnlicher Lebensstil und Umweltfaktoren oder gemeinsame Erbanlagen verantwortlich sind, ist allerdings noch nicht geklärt [4]. Des Weiteren führen seltene genetisch bedingte Krebs syndrome wie z.B. das

Hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom, oder auch Lynch-Syndrom genannt, auch beim Pankreaskarzinom zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko [7]. Ebenfalls nachteilig scheinen die Auswirkungen von beruflich bedingten Schadstoffbelastungen wie den chemischen Kanzerogenen Naphthylamin, Benzidin und Nitrosaminen zu sein [8].

1.1.2 Einteilung der Pankreastumoren

Pankreastumoren werden je nach Ursprungsgewebe und dem Grad der Bösartigkeit in mehrere Arten unterteilt. Die beiden Überkategorien bilden dabei die exokrinen und endokrinen Pankreastumoren. Die mit großem Abstand häufigste Art ist das duktales Adenokarzinom (englisch PDAC für Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) welches aus dem exokrinen Anteil des Pankreas hervorgeht und über 90% aller diagnostizierten Pankreastumoren ausmacht [9].

Weitere seltenere Tumoren des exokrinen Pankreas sind die Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) [10], das Azinuszellkarzinom, das seröse Zystadenom, [11] der Muzinös zystische Tumor und andere [12].

Des Weiteren werden auch bei dem endokrinen Anteil des Pankreas mehrere Tumorarten unterschieden. Diese sind ebenfalls recht selten, ihre Prävalenz wird auf ca. 1/100.000 geschätzt. Die neuroendokrinen Tumoren des Pankreas kann man in eine funktionell aktive und eine funktionell inaktive Gruppe einteilen. Die funktionell aktiven machen dabei ca. 60% aus und werden nach den Hormonen benannt, welche sie unkontrolliert ausschütten, so z.B. Insulinome, Gastrinome und Glucagonome [13]. Diese können durch ihre Hormonproduktion zu charakteristischen Syndromen wie z.B. dem Zollinger-Ellison Syndrom führen [14]. Die funktionell inaktiven Tumoren des endokrinen Pankreas dagegen schütten keine Hormone aus und führen daher auch zu keiner hormonellen Symptomatik mit entsprechenden Syndromen [13].

1.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas ist noch nicht vollständig geklärt und weiterhin Gegenstand der Forschung. Soweit bekannt handelt es sich um eine in ihrer Reihenfolge relativ festgelegte Ansammlung von Mutationen welche sowohl zur Aktivierung bestimmter Onkogene als auch

zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt. Einer der ersten wichtigen Schritte auf dem Weg von gesundem exokrinen Pankreasgewebe zum PDAC ist dabei die Mutation im K-RAS Protoonkogen [15]. K-RAS gehört zur RAS Familie der GTP-bindenden Proteine welche über mehrere Signalkaskaden an der Regulierung von unter anderem Wachstum, Differenzierung und Überleben einer Zelle beteiligt sind [16]. Als nächstes kommt es zur Inaktivierung des p16 Tumorsuppressorgens [17] welches eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus spielt und auch mit mehreren vererbbaeren Melanom-Erkrankungen in Verbindung gebracht wird [18].

Ebenfalls meist zu Beginn der Entwicklung des Gewebes hin zum PDAC kommt es zu Fehlfunktionen der Telomere, diese sind in der gesunden Zelle dafür zuständig, dass nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen pro Zelle möglich ist, und es in der Zelle danach entweder zur Apoptose oder Seneszenz kommt [8]. Interessanterweise wird das Überleben von Zellen mit einer Telomer-Fehlfunktion vor allem durch den Verlust des p53-Tumorsuppressorgens unterstützt, zu dessen Verlust es normalerweise erst später in der Entwicklung des PDAC kommt [8, 19].

Das p53 Tumorsuppressorgen schützt den Organismus vor einer Vielzahl von genotoxischen und anderen äußeren Einflüssen indem es bei zu stark verkürzten Telomeren einer Zelle und damit verbundener Instabilität des Genoms aktiviert wird und zur Apoptose oder Seneszenz führt [19]. Neben Mutationen am Chromosom 17p (auf welchem sich das Gen für den Aufbau von p53 befindet) werden in weit fortgeschrittenen Neoplasien des Pankreas vor allem noch Mutationen auf dem Chromosom 18 q (auf diesem befindet sich das Gen für DPC4, auch als SMAD4 bekannt) und eine biallellische Inaktivierung des BRCA2 gefunden. DPC4/SMAD4 und BRCA2 sind beides Tumorsuppressorgene [15]. SMAD4 gehört zur Familie der SMAD-Proteine und spielt vor allem eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion des TGF- β Signalwegs welcher unter anderem die Proliferation, Differenzierung, Mobilität und die Apoptose von Zellen beeinflusst [20]. BRCA2 (Breast cancer 2) ist ebenfalls ein Protein und für die Reparatur der DNA, insbesondere durch homologe Rekombination von Doppelstrangbrüchen, zuständig [21]. Wie der Name schon sagt wird es vor allem mit Brustkrebs, aber auch anderen Krebsarten in Verbindung gebracht [22].

Die Entwicklung von Pankreaskarzinomen kann auch histologisch nachverfolgt werden und wird momentan in zwei Arten eingeteilt. Sie läuft einerseits über die Zwischenstufen PanIN 1 bis 3 (für Pancreatic intraepithelial neoplasm) ab, wobei die Anzahl der Mutationen und die Entartung des Gewebes von 1 bis 3 immer weiter zunehmen, bis es am Ende schließlich zum invasiven PDAC kommt. Die Entwicklung beginnt mit der Überexpression der Her-2/neu und Punktmutationen innerhalb der K-ras Gene. Später findet die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 und zum Schluss die Inaktivierung der Gene p53, DPC4 und BRCA2 statt [15].

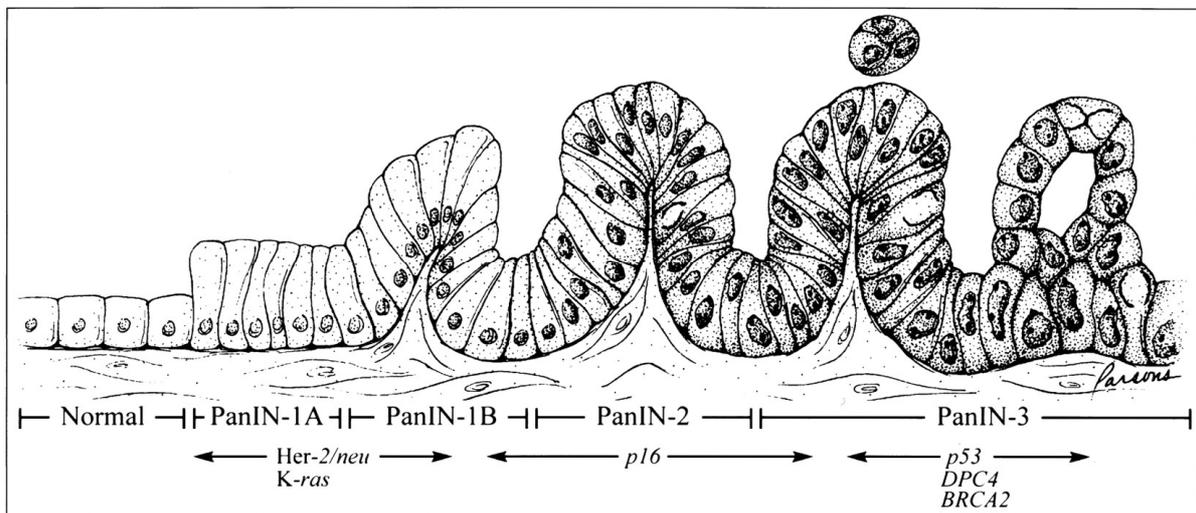


Abbildung 1: Progressionsmodell der PanINs [15]

Die Prävalenz von PanINs steigt mit dem Alter der Patienten an, ca. 30% der älteren Bevölkerung weisen solche leichten bis mittelgradigen Veränderungen der Pankreaszellen auf. Auf der anderen Seite sind zudem sogenannte IPMNs (für Intraductal papillary mucinous neoplasm) und MCNs (für Mucinous cystic neoplasm) bekannt, welche ebenfalls Vorstufen von PDACs bilden. Diese haben eine andere histologische Struktur und kommen seltener vor als PanINs, mit welchen sie sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Mutationen aufweisen. Die Beziehungen dieser Vorstufen und ihre genauen Zellursprünge werden momentan noch erforscht [8].

1.1.4 Lokalisation und Metastasierung

Die exokrinen Tumoren des Pankreas, deren Hauptanteil das duktales Adenokarzinom ausmacht, entstammen dem exokrinen Teil des Pankreas und zwar zu 75% dem Pankreaskopf, zu 15-20% dem Pankreaskorpus und zu 5-10% dem Pankreasschwanz [23]. Die PanINs entstehen dabei normalerweise aus dem Gängepithel und den Azinuszellen der kleineren (<5mm) Gänge des Pankreas, während die IPMNs dem Hauptgang des Pankreas, dem Ductus pancreaticus, oder einem seiner Äste entstammen. Die MCNs schließlich kommen ebenfalls in den kleineren Gängen des Pankreas und zwar vor allem bei Frauen vor [24]. Die neuroendokrinen Tumoren des Pankreas, welche ca. 1-2% aller Pankreastumoren ausmachen, entstammen den sogenannten Langerhans-Inseln des Pankreas [25].

Unter Metastasierung versteht man das Übergreifen von Krebs von einem Organ auf ein anderes, die auf diese Weise neu entstandenen Lokalisationen des Primärtumors werden Metastasen oder Sekundärtumoren genannt [26]. Die Vorgänge der Metastasierung sind im Vergleich zu anderen Gebieten der Karzinomforschung relativ unbekannt trotz intensiver Forschung, was paradox anmutet, wenn man bedenkt, dass die Mehrzahl der Todesopfer von soliden Tumoren auf die Metastasen zurückzuführen sind und nur ein geringer Anteil auf die Ausbreitung eines großen Primärtumors in die unmittelbar angrenzenden Organe. Damit Metastasen entstehen können müssen die Krebszellen eine Vielzahl von Schritten erfolgreich absolvieren, dazu gehören das Auflösen der Zell-Zell-Verbindungen verbunden mit dem Ausbrechen aus dem Gewebe des Primärtumors, das Eindringen in ein Gefäßbett (lymphatisches oder die Blutbahn), das Überleben im Körperkreislauf des Wirts, die Extravaskularisation aus dem Gefäßsystem und die erfolgreiche Adaptation im neuen Gewebe [27]. Aufgrund der hohen Anzahl an nötigen Mutationen für die erfolgreiche Überwindung all dieser Barrieren, wird die Metastasierung üblicherweise als ein recht spät auftretendes Ereignis in der Entwicklung eines Tumors angesehen [28].

Zum Todeszeitpunkt können bei bis zu 90% der an einem Pankreastumor erkrankten Patienten Metastasen nachgewiesen werden. Die Patienten bei denen Metastasen nachgewiesen werden können, haben üblicherweise Hunderte bis gar Tausende von Metastasen in ihrem Körper, wobei dafür die Inaktivierung von SMAD4 die wichtigste Rolle zu spielen scheint. Patienten mit

gar keinen oder nur wenigen Metastasen (bis maximal 10) zum Todeszeitpunkt weisen dagegen meist intakte SMAD4 Proteine auf. Die Krebszellen der Metastasen differenzieren sich dabei auch nach dem Vorgang der Metastasierung in den neuen Geweben immer weiter, sodass eine große Vielfalt an Zellen mit sowohl den ursprünglichen Mutationen der PanINs als auch völlig neuen Mutationen entsteht [27]. Pankreastumoren entwickeln sehr oft sowohl hämatogene als auch lymphogene Metastasen. Das häufigste Ziel der hämatogenen Metastasen ist die Leber. Auch die Metastasierung in die angrenzenden Lymphknoten, das Peritoneum, und die Lunge werden häufig beobachtet. Zudem infiltrieren Pankreastumoren aber auch oft per continuitatem benachbarte Organe wie Duodenum, Milz und die angrenzenden Lymphknoten & Lymph- sowie Blutgefäße [8, 27].

1.1.5 Klassifikationen von Tumoren

Eine einheitliche Klassifikation von Tumoren bietet vielerlei Vorteile. So hilft sie dabei sich über die Ausdehnung der Krebserkrankung eines Patienten weltweit verständigen zu können und dient als Grundlage für die weitere Prognose und individuelle Therapieplanung für einen Patienten. Zudem kann sie auch genutzt werden um auf internationaler Ebene Vergleiche zwischen unterschiedlichen Studien und Behandlungsmethoden ziehen zu können und unterstützt somit die Krebsforschung.

Die Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) ist eine der international verbreitetsten Tumorklassifikationen und existiert seit den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Sie wurde seitdem immer wieder aktualisiert, zuletzt im Jahr 2017. Diese Klassifikation basiert auf dem TNM System, einer Arbeit des französischen Professors Pierre Denoix. Dieser entwickelte zwischen 1943 und 1952 mit dem TNM System eine Möglichkeit die Ausbreitung der meisten soliden Tumoren im Körper schnell und übersichtlich zu beschreiben. TNM ist dabei eine Abkürzung der drei entscheidenden Faktoren dieser Klassifikation:

- die Größe und Ausdehnung des Primärtumors (**tumor**)
- den eventuellen Befall von Lymphknoten (**nodes**)
- die eventuell vorhandene Streuung des Primärtumors in Form von **Metastasen (metastases)** [29]

Neben der UICC Klassifikation gibt es noch weitere verbreitete Einteilungen welchen jedoch ebenfalls das TNM Staging zu Grunde liegt. Dazu gehören die Klassifikation der JPS (Japan Pancreas Society), der FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) und dem AJCC (American Joint Committee on Cancer). Letztere wurde mit der Einteilung der UICC 1987 zu einer Klassifikation zusammengefasst [30, 29].

Die derzeit gültige Einteilung der UICC für Pankreaskarzinome sieht folgendermaßen aus:

Tabelle 2: UICC Klassifikation des Pankreaskarzinoms [29]

T - Primärtumor	
TX	Keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Carcinoma in situ. Tumorzellen innerhalb des Pankreas nachweisbar, die Basallamina ist noch intakt
T1	Tumor nur innerhalb des Pankreas und nicht größer als 2cm im Durchmesser
T2	Tumor nur innerhalb des Pankreas und größer als 2cm im Durchmesser
T3	Ausbreitung des Tumors außerhalb des Pankreas, jedoch noch keine Beteiligung großer Blutgefäße
T4	Ausbreitung des Tumors außerhalb des Pankreas, mit Beteiligung großer Blutgefäße
N – Lymphknoten	
NX	Keine Beurteilung der Lymphknoten möglich
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen nachweisbar
M - Metastasen	
MX	Keine Beurteilung von Fernmetastasen möglich
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Mit den aus der TNM Klassifizierung gewonnenen Daten lassen sich Patienten mit malignen Pankreastumoren in einzelne Stadien einteilen, aus welchen sich wiederum Rückschlüsse auf die individuellen Prognosen und Therapien ziehen lassen.

Tabelle 3: UICC Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms [29]

UICC Stadium	TNM Klassifikation			Erläuterungen
0	Tis	N0	M0	Carcinoma in situ. Tumorzellen innerhalb des Pankreas nachweisbar, die Basallamina ist noch intakt
IA	T1	N0	M0	Tumor nur innerhalb des Pankreas und nicht größer als 2cm im Durchmesser
IB	T2	N0	M0	Tumor nur innerhalb des Pankreas und größer als 2cm im Durchmesser
IIA	T3	N0	M0	Ausbreitung des Tumors außerhalb des Pankreas, jedoch noch keine Beteiligung großer Blutgefäße
IIB	T1-3	N1	M0	Ausbreitung des Tumors innerhalb oder außerhalb des Pankreas, ohne Beteiligung großer Blutgefäße. Sowie Befall der regionären Lymphknoten.
III	T4	N0-1	M0	Ausbreitung des Tumors außerhalb des Pankreas, mit Beteiligung großer Blutgefäße. Befall der regionären Lymphknoten möglich
IV	T1-4	N0-1	M1	Fernmetastasen nachweisbar, meist in der Leber, Lunge oder der Peritonealhöhle

Neben diesen Hauptfaktoren gibt es noch einige weitere Kriterien nach denen Pankreaskarzinome klassifiziert werden können. So gibt eine histopathologische Untersuchung der Tumorzellen Auskunft über den Differenzierungsgrad des Tumors und damit wichtige Hinweise über den Fortschritt der Erkrankung. Dazu werden die Zellen in folgende Grade eingeteilt:

Tabelle 4: UICC Klassifikation des histopathologischen Differenzierungsgrades [29]

GX	Keine Beurteilung des Differenzierungsgrades möglich
G1	Gut differenzierte Zellen, kaum Abweichungen zum gesunden Pankreasgewebe
G2	Mittelgradig differenzierte Zellen, mäßige Abweichungen zum gesunden Pankreasgewebe
G3	Wenig differenzierte Zellen, Ähnlichkeiten zum gesunden Pankreasgewebe nur noch rudimentär vorhanden
G4	Undifferenzierte Zellen, oftmals keine Ähnlichkeit mehr zum ursprünglichen Pankreasgewebe erkennbar

Zusätzlich lässt sich der Tumor nach dem Grad des Befalls der benachbarten Lymph- und Venensysteme genauer einteilen:

Tabelle 5: UICC Klassifikation der Lymph- und Venenbeteiligung [29]

Lymphsystembeteiligung	
L0	Keine Tumorzellen im Lymphsystem nachweisbar
L1	Tumorzellen im Lymphsystem nachweisbar
Venengefäßbeteiligung	
V0	Keine Tumorzellen in den Venengefäßen nachweisbar
V1	Tumorzellen in den Venengefäßen mikroskopisch nachweisbar
V2	Tumorzellen in den Venengefäßen makroskopisch nachweisbar

Des Weiteren ist es wichtig zu wissen ob nach einer bereits erfolgten Therapie ein Residualtumor im Patienten verblieben ist. Dieser Residualtumor kann dabei sowohl an der Stelle des alten Tumors oder an einer anderen Stelle im Körper des Patienten als Folge von Metastasen auftreten. Informationen dazu liefert folgende Einteilung:

Tabelle 6: UICC Klassifikation von Residualtumoren [29]

RX	Keine Beurteilung eines eventuell vorhandenen Residualtumors möglich
R0	Kein Anhalt für einen Residualtumor
R1	Residualtumor mikroskopisch nachweisbar
R2	Residualtumor makroskopisch nachweisbar

Eine weitere bedeutende Einteilung betrifft die Sicherheit der jeweils vorliegenden Klassifikation. Diese Einteilung reflektiert die jeweilige Untersuchungsmethode und wird mit einem „C“ (englisch für „certainty“) und einer entsprechenden Zahl hinten an die TNM Klassifikation angehängt:

Tabelle 7: Einteilung der Zuverlässigkeit der jeweiligen Klassifikation [29]

C1	Allgemeine klinische Untersuchung, Standard-Röntgen-Aufnahme
C2	Spezielle Untersuchungen mit CT, MRT, Ultraschall, endoskopische Untersuchung
C3	Chirurgisch gewonnene Informationen mit Biopsie oder Zytologie
C4	Chirurgisch gewonnenes Gewebe, welches histopathologisch vollständig untersucht wurde
C5	Durch eine Autopsie gewonnenes Gewebe, welches histopathologisch vollständig untersucht wurde

Weiterhin gibt es in der TNM Klassifikation noch eine Reihe von Präfixen die zusätzliche Informationen liefern können:

Tabelle 8: Präfixe des TNM Staging [29]

α	Klassifikation erfolgte nach einer Autopsie
γ	Klassifikation erfolgte nach einer vorausgehenden Therapie
r	Klassifikation erfolgte nach einem Wiederauftreten des Tumors (Rezidiv), nach einer vorausgehenden Therapie
u	Klassifikation erfolgte nach einer Ultraschalluntersuchung
c	Klassifikation nach einer klinischen Untersuchung (entspricht normalerweise dem certainty Grad C1-C3)
p	Klassifikation nach einer pathologischen Untersuchung (entspricht normalerweise dem certainty Grad C4-C5)

1.1.6 Therapie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist zur Zeit eine der am schwersten zu therapierenden Tumorarten. Obwohl die Signalkaskaden innerhalb der Pankreastumorzellen inzwischen relativ gut erforscht sind, konnte noch kein wirksames Medikament entwickelt werden, welches dieses Wissen effektiv zur Heilung des Tumors umsetzt [31]. Eine Behandlung mit kurativer Intention ist nur in 20-30% der Fälle möglich. Die kurative Standardbehandlung eines duktales Adenokarzinoms sieht momentan folgende Optionen vor: Chirurgischer Eingriff, Chemotherapie, Bestrahlung und Kombination aus Chemotherapie und Bestrahlung. Welche dieser Therapiemöglichkeiten bei einem Patienten heute eingesetzt wird hängt vor allem vom Stadium des Tumors und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten ab [32].

Tumore des exokrinen Pankreas wie das PDAC welche sich noch im Stadium 0, I und II befinden, sowie PDAC Tumore im Stadium III mit einer noch wenig ausgeprägten Beteiligung der Blutgefäße werden als chirurgisch resektabel bzw. potentiell resektabel eingestuft. Dies ist jedoch aufgrund der meist späten Diagnose nur bei jedem fünften Patienten mit einem Tumor des exokrinen Pankreas der Fall [33]. Tumoren des endokrinen Pankreas dagegen wachsen in der Regel langsamer und können öfter reseziert werden [32]. Bei all diesen Patienten ist eine möglichst komplette chirurgische Entfernung des Tumors die Therapie der Wahl. Dies ist die zurzeit einzige Therapieoption mit einer

realistischen Chance den Patienten langfristig von seinem Tumor zu heilen. Bei ca. 80% der Patienten wird die Pankreaskopfresektion nach Kausch / Whipple ausgeführt, einer partiellen Duodenopankreatektomie bei welcher der Pankreaskopf, der Zwölffingerdarm, die Gallenblase, der distale Gallengang, das Antrum des Magens und angrenzende Lymphknoten entfernt werden. Seltener, bei Patienten mit einer größeren Ausbreitung des Tumors, wird eine Pankreaslinksresektion mit vollständiger Entfernung des Pankreas und der Milz oder eine totale Duodenopankreatektomie durchgeführt [33].

Zusätzlich zum chirurgischen Eingriff empfiehlt sich im UICC Stadium > I, falls der Gesundheitszustand der Patienten es zulässt, eine Nachbehandlung mit einer Chemotherapie mit Zytostatika wie z.B. Gemcitabin oder 5-Fluoruracil, entweder alleine oder in Kombination mit einer Bestrahlungstherapie. Diese adjuvante Therapie dient vor allem dazu noch eventuell vorhandene vereinzelte Tumorzellen, welche bei der Operation nicht entfernt wurden, abzutöten und somit ein erneutes Auftreten des Tumors zu verhindern. Bei Patienten mit schlechterem Allgemeinzustand, bei welchen die postoperative Regeneration absehbar länger dauern und damit die adjuvante Therapie verzögern oder gar verhindern würde, sowie bei Patienten mit einem potentiell resezierbaren Tumor kann die Chemo- / Bestrahlungstherapie auch als sogenannte neoadjuvante Therapie bereits vor dem chirurgischen Eingriff angewendet werden um die Tumorausdehnung präoperativ zu verkleinern [32, 33]. Die Ergebnisse im Vergleich zwischen adjuvanter und neoadjuvanter Therapie scheinen dabei keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Heilung der Patienten aufzuweisen [34]. Palliative chirurgische Eingriffe zur Linderung der Beschwerden des Patienten wie z.B. eine vor der Whipple-OP stattfindende operative Sicherstellung der Durchgängigkeit des Gallengangs mittels eines Stents werden zurzeit kontrovers diskutiert. So führen solche präoperativen Eingriffe oftmals zu Komplikationen, welche unter Umständen die eigentliche Operation des Tumors hinauszögern oder gar verhindern können [35].

Etwa 80% der Tumoren des exokrinen Pankreas, und seltener Tumoren des endokrinen Pankreas, sind bei ihrer Diagnose bereits zu weit entwickelt um operativ komplett entfernt werden zu können, weil sie entweder das sie umgebende Gewebe, und dabei vor allem die großen Blutgefäße, zu tief infiltriert haben oder gar schon nachweisbare Metastasen in anderen Organen

gebildet haben. Solche Tumoren werden in der Regel nicht mehr chirurgisch behandelt, da dies zu keiner Erhöhung der Lebenserwartung der Patienten führt [31]. Bei diesen Patienten empfiehlt sich eine Chemotherapie, eventuell kombiniert mit einer Bestrahlungstherapie. Dabei kann jedoch in den allermeisten Fällen keine Heilung des Tumors erzielt werden, das Ziel dieser Therapien ist dann vor allem eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer [32]. Dabei galt Gemcitabin auch in diesen Fällen lange Zeit als das Standardmedikament, welches den Patienten im Durchschnitt ca. 4 Monate zusätzliche Lebenszeit einbringt. Neuere Studien geben jedoch Folfirinox, einer Kombination aus den 4 Zytostatika Fluoruracil, Folinsäure (Leucovorin), Irinotecan und Oxaliplatin den Vorzug. Folfirinox kann im Vergleich zu Gemcitabin allein die Lebenserwartung um nochmals ca. 4 Monate steigern und erhält insgesamt die Lebensqualität der Patienten, trotz höherer Toxizität des Medikaments, länger auf einem höheren Niveau da es tumorbedingte Beschwerden wie Schmerzen und Gewichtsverlust besser zu lindern vermag [36]. Mehrere Studien der Gastrointestinal Study Group und der Eastern Cooperative Oncology Group haben zudem gezeigt, dass eine Chemotherapie sowohl mit Gemcitabin als auch mit 5-Fluoruracil und weiteren Medikamenten noch bessere Ergebnisse in Hinsicht auf die Überlebensdauer von Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor des Pankreas bietet, wenn sie mit einer Bestrahlungstherapie kombiniert wird [37, 38].

1.1.7 Prognose

Trotz vieler neuer Erkenntnisse über die Pankreastumoren innerhalb der letzten Jahrzehnte, bleibt die Prognose für Patienten die damit diagnostiziert werden weiterhin sehr schlecht. Die 5 Jahres-Überlebensrate nach Erstdiagnose liegt momentan je nach Quelle bei 4% bis 6%, was vor allem auf den Mangel an wirkungsvollen diagnostischen Mitteln zurückzuführen ist. Die meisten Pankreastumoren werden mit den zurzeit gängigen Methoden zu spät erkannt [31, 39]. Bei Patienten mit resezierten Pankreastumoren variiert die 5 Jahres-Überlebensrate je nach Klinik, hat sich jedoch in den letzten Jahren aufgrund zunehmender Erfahrung und Konzentration der chirurgischen Eingriffe auf wenige spezialisierte Kliniken tendenziell etwas verbessert und liegt aktuell bei ca. 20% mit einer mittleren Überlebensdauer von 15 bis 22 Monaten [33, 40].

1.2 Diagnostik

Die meisten Pankreastumoren, unter anderem auch das PDAC, machen sich erst sehr spät in ihrer Entwicklung durch ausgeprägte Symptome bemerkbar. Zu diesem Zeitpunkt hat der Tumor meist bereits entweder lokal eine recht große Ausdehnung erreicht oder schon Metastasen gebildet. Die meisten dieser Symptome sind allgemein und unspezifisch, dazu gehören vor allem Schmerzen im Oberbauch, welche auch oft in den Rücken ausstrahlen, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und als etwas spezifischere Symptome der schmerzlose Ikterus und eventuell Lehmfarbener Stuhlgang [5, 41]. Des Weiteren werden Pankreastumoren oft von Verdauungsbeschwerden und einem erstmaligen Auftreten des Diabetes mellitus begleitet [41].

Entsteht der Verdacht auf das Vorliegen eines Pankreastumors, sollte vor einem chirurgischen Eingriff ein präoperatives Staging durchgeführt werden, um einen Überblick über die Ausdehnung des Tumors, die Möglichkeit der Resektion und eventuelle Metastasen zu bekommen. Zur Routinediagnostik gehören die Anamnese, die körperliche Untersuchung, die Endosonographie, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie, oft in Kombination mit einer Magnetresonanztomographie (MRCP), die dabei entstehenden Schnittbilder haben den Vorteil, dass sie zudem auch zum Staging des Tumors genutzt werden können [5]. In einigen Fällen wird dazu auch die Positronen-Emissions-Tomographie eingesetzt [42]. Zusätzlich kann der Pankreastumor durch die Pathologie untersucht werden. Dazu kann entweder während der Endosonographie oder durch eine Punktion der Bauchdecke mit einer feinen Nadel eine Gewebeprobe zur Untersuchung entnommen werden [5, 41].

Bei Bestätigung des Verdachts auf einen Pankreastumor sollte anschließend vor der Operation der Tumormarker CA 19-9 bestimmt werden. Dieser dient einerseits als ein weiterer Hinweis auf die Größe des Tumors und andererseits als Kontrolle des Behandlungsverlaufs. Sein Wert fällt üblicherweise nach der kompletten operativen Entfernung des Tumors rapide ab, sollte jedoch später erneut in regelmäßigen Abständen gemessen werden, weil sein erneuter Anstieg einen Hinweis für ein Wiederauftreten des Tumors liefern kann. Da dieser Wert jedoch auch aufgrund anderer Erkrankungen erhöht sein kann, ist er zur Primärdiagnostik leider nicht geeignet [5].

1.3 Nachsorge

Auch nach erfolgreich verlaufener Operation eines Pankreastumors sollten die Patienten regelmäßig untersucht werden um im Falle eines Wiederauftretens des Tumors möglichst früh behandelt werden zu können. Bei den Follow-up Untersuchungen spielen vor allem die Anamnese und der CA 19-9 Wert eine große Rolle. Und auch die Ernährung und Schmerztherapie sind für viele Patienten oftmals ein wichtiges Thema. Viele Patienten brauchen nach der Operation von außen zugeführte Enzyme um die eingeschränkte Funktion der Bauchspeicheldrüse ausgleichen und die Nahrung gut verdauen zu können [32]. Je nach Ausprägung der beim Patienten auftretenden Schmerzen können zudem entweder Nichtopioid-Analgetika, unterschiedlich starke Opioide [43] oder gar ein chirurgischer Eingriff zur Schmerzlinderung indiziert sein [44]. Des Weiteren sind Patienten bei denen das komplette Pankreas entfernt wird auf das Einnehmen von Insulin angewiesen [5].

1.4 Klinische Problematik

Wie bereits erwähnt ist eines der größten Probleme bei der Behandlung von Pankreastumoren die meist erst sehr spät gestellte Diagnose. Zudem ist es schwierig nur aufgrund des UICC-Staging, welches vor allem auf morphologischen Eigenschaften wie der Ausdehnung des Primärtumors, der Beteiligung größerer benachbarter Blutgefäße und der Existenz von Fernmetastasen basiert, eine zuverlässige Prognose für einen Patienten zu erstellen.

Und nicht zuletzt wäre es auch sehr wichtig zu wissen, ob nach der operativen Entfernung des Primärtumors noch vereinzelte Tumorzellen im Patienten verblieben sind, welche zu einem Rezidiv führen könnten. Solche sogenannten disseminierten Tumorzellen sind mit den zurzeit üblichen diagnostischen Mitteln noch nicht nachweisbar. Ihre Identifikation und Elimination sind jedoch gleichzeitig von größter Bedeutung für die langfristig erfolgreiche Behandlung des Patienten. Mit einem diagnostischen Mittel, welches diese disseminierten Tumorzellen nachweisen kann, ließe sich eine exaktere Prognose stellen und die Behandlung entsprechend besser anpassen [45].

1.5 Disseminierte Tumorzellen

Disseminierte Tumorzellen (DTCs) sind Zellen des Primärtumors welche sich aus seinem Zellverband gelöst haben und als einzelne Zellen über die Blut- und Lymphgefäße in den Körperkreislauf und weitere Organe gelangen. Disseminierte Zellen in der Blutbahn werden auch als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. (Mikro)Metastasen sind im Gegensatz dazu Tumorzellen welche bereits alle Schritte der Metastasierung durchlaufen haben, also die Blut- und Lymphbahnen bereits wieder verlassen, ein Gewebe invadiert haben und dort eine Stromareaktion hervorgerufen haben [46, 47].

Das Vorkommen disseminierter Tumorzellen bei einem Patienten steht im Verdacht die Prognose stark beeinflussen zu können, weil es in direktem Zusammenhang mit der Bildung von Metastasen steht. Und wie bereits vorher erwähnt sind es in den meisten Fällen die Metastasen, und nicht der Primärtumor an sich, welche für den Tod eines Patienten verantwortlich sind. Aus diesem Grund hat man nach neuen sensibleren Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung dieser Zellen gesucht, um sie in das Staging bzw. die Diagnose einfließen lassen zu können [27, 47].

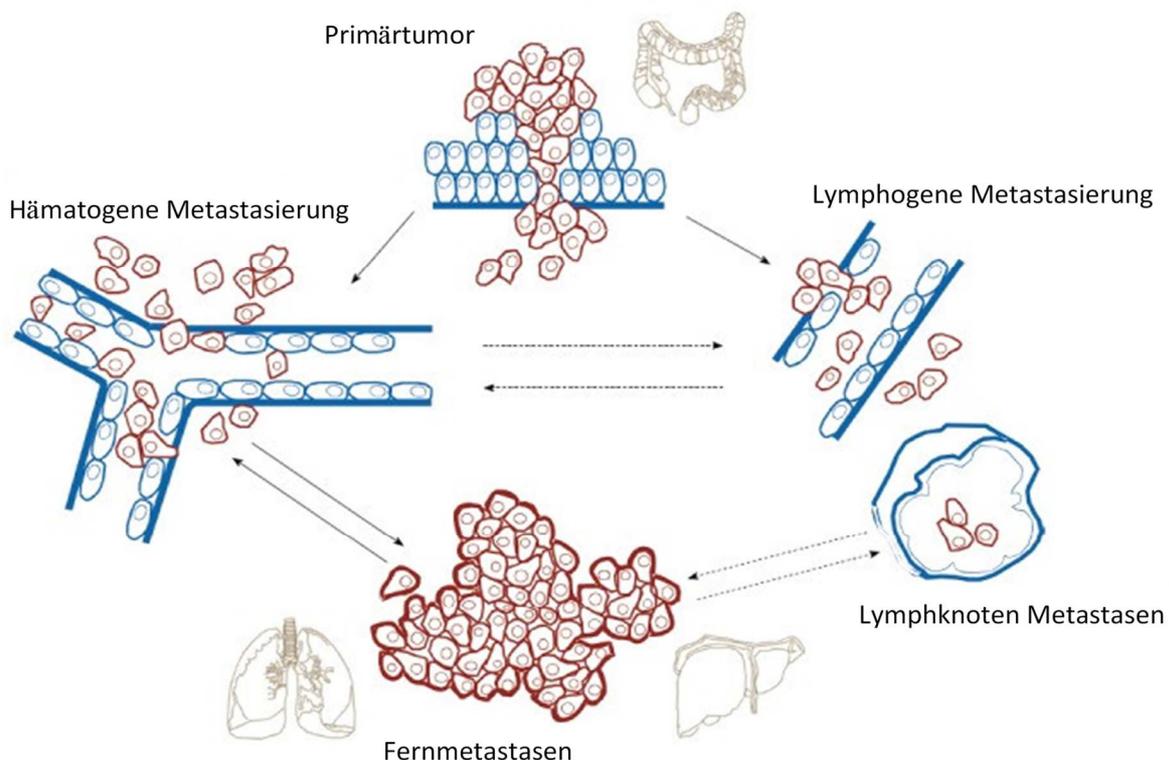


Abbildung 2: Modell der metastatischen Kaskade von Tumorzellen [74]

Die Krebszellen (in der Abbildung rot dargestellt) lösen sich vom Primärtumor und dringen mit Hilfe unterschiedlicher Mechanismen, wie der Epithelial-mesenchymalen Transition, in den Blutkreislauf / das lymphatische System (Lymphgefäße und Lymphknoten) ein. Diese disseminierten Tumorzellen können zu Fernmetastasen in z.B. der Leber oder Lunge führen. Mehr als 90% der zirkulierenden Tumorzellen im Blutkreislauf gehen allerdings vorher zugrunde ohne die nötigen Eigenschaften erlangt zu haben, um Fernmetastasen bilden zu können. Die disseminierten Tumorzellen in den Lymphknoten können entweder Mikrometastasen bilden oder als isolierte Tumorzellen in den Lymphknoten verbleiben. Letztere können mit Hilfe der konventionellen HE-Färbung nicht entdeckt werden. Es besteht wahrscheinlich eine Kommunikation zwischen dem Blutkreislauf und dem lymphatischen System und es wird vermutet, dass CTCs im lymphatischen System ebenfalls Fernmetastasen bilden können. Des Weiteren wird vermutet, dass Metastasen selbst die Fähigkeit haben Tumorzellen zurück in den Blutkreislauf zu entsenden. Zudem besteht eine Kommunikation zu disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (nicht in der Abbildung 2 dargestellt), dort können die Tumorzellen über mehrere Jahre ruhend verbleiben bevor sie eventuell wieder in den Blutkreislauf übergehen und Fernmetastasen bilden. Gepunktete Linien stellen vermutete Verbindungen dar und durchgezogene Linien zeigen etablierte und akzeptierte Mechanismen der Metastasierung [74].

Die klinische Bedeutung des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurde bereits in früheren Studien bestätigt [48], allerdings hat dieses Verfahren aufgrund des mit der Entnahme der Probe verbundenen Aufwandes und Schmerzen für den Patienten noch keinen Einzug in die Routinediagnostik gefunden. Zirkulierende Tumorzellen aus der Blutbahn könnten dagegen relativ bequem mit einer peripheren Blutprobe entnommen werden, was die Diagnostik um ein vielfaches praxistauglicher machen würde. Auf diese Weise ließen sich einerseits Patienten mit einem erhöhten Risiko der Metastasenbildung frühzeitig, effizient und kostengünstig herausfiltern und andererseits auch der Krankheitsverlauf besser verfolgen lassen. Somit könnten entsprechende individuellere Therapiemaßnahmen wie ein adjuvantes Vorgehen früher und gezielter eingesetzt und die Überlebenschancen verbessert werden [47].

Disseminierte Tumorzellen werden auch als Marker für andere Tumorarten untersucht. So sterben an Brustkrebs erkrankte Patienten zum Großteil in Folge von Metastasen. Ein Zustand, der ähnlich wie bei Pankreaskarzinomen neue frühzeitige und zuverlässige Diagnosemethoden verlangte. Und tatsächlich wurde das Auftreten von CTCs bei Brustkrebs Patienten als wichtiger und unabhängiger Marker für sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben bestätigt [47, 50]. Ähnlich verhält es sich auch bei der Diagnostik von Prostatakrebs wo sich disseminierte Tumorzellen ebenfalls etabliert haben [73, 81]. Für metastasierende kolorektale Karzinome wurde die prognostische Bedeutung von CTCs im Blutkreislauf ausführlich untersucht und bereits 2010 in einer Metaanalyse bestätigt. Und inzwischen konnten disseminierte Tumorzellen auch für kolorektale Karzinome in frühen Stadien als ein wichtiger und unabhängiger prognostischer Marker nachgewiesen werden [55]. CTCs sind also bereits bei mehreren anderen Tumorarten als ein zuverlässiger Marker etabliert.

1.6 Das Veridex CellSearch System

Das Veridex CellSearch System der Firma Veridex LLC ist ein semiautomatisches diagnostisches Mittel zur in vitro Entdeckung, Markierung und Aufzählung von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) und weiteren Zellfragmenten epithelialen Ursprungs im peripheren Vollblut [49]. Der Nachweis von CTCs im Blut eines Patienten steht in Verbindung mit einem verringerten progressionsfreien Überleben und einem verringerten Gesamtüberleben dessen bei kolorektalen-, Prostata- und Mamma-Karzinomen im metastasierenden Stadium [50]. Somit hilft das Veridex CellSearch System dem Onkologen bei der Prognose und der Überwachung von Krebspatienten, welche von Metastasen betroffen sein könnten. Das Veridex CellSearch System ist dabei momentan das einzige auf dem Markt befindliche System zur Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen in Patienten mit metastasiertem Brust-, Prostata- oder Kolorektal-Karzinom, das von der Federal Drug Administration der USA zugelassen wurde. Die Ergebnisse dieses semiautomatischen Systems sollten von einem Pathologen oder einer ähnlich qualifizierten Person überprüft werden und dienen als Ergänzung zur Routinediagnostik wie der Anamnese, körperlichen Untersuchung oder bildgebenden Verfahren [49].

1.7 Fragestellung

Obwohl Pankreastumoren und vor allem das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung sind, waren Fortschritte hinsichtlich der Überlebensprognose bisher selten und von mäßigem Erfolg. Man konnte in dieser Zeit viele Erkenntnisse über die komplexen Mechanismen der Pathogenese, die beteiligten Signalkaskaden und die Vorgänge der Metastasierung des PDAC gewinnen. Jedoch konnten trotz all dieses neuen Wissens die Diagnose und Behandlung noch nicht zufriedenstellend optimiert werden und das PDAC bleibt weiterhin einer der prognostisch ungünstigsten Tumoren [31]. Dabei sind vor allem die Patienten im UICC-Stadium III und IV mit einer schlechten Prognose assoziiert, da hier der Tumor bereits die großen benachbarten Blutgefäße wie die Arteria mesenterica superior und den Truncus coeliacus erreicht oder gar Metastasen gebildet hat. Denn bei ihnen muss der Tumor nach momentanem Forschungsstand als entweder nur bedingt oder gar nicht resektabel eingestuft werden. Die komplette chirurgische Entfernung des PDAC gilt jedoch zurzeit als die einzige Behandlungsoption mit einer realistischen Heilungsprognose, allerdings kommt es bei der Mehrheit der Operierten immer noch zu einem Rezidiv [41]. Gleichzeitig stellen diese Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit ca. 80% auch den größten Anteil der mit einem Pankreastumor Diagnostizierten [31]. Es wäre also wünschenswert neue Diagnosemöglichkeiten zu einer frühzeitigen Identifikation von Pankreas-tumoren zu entwickeln. Zudem stellt sich die Frage ob es neben den CTCs eventuell noch weitere bisher nicht untersuchte Kriterien gibt welche für die Prognose von Bedeutung sind? Und lassen sich solche Kriterien mit dem Veridex CellSearch System ebenfalls finden? Um diese Fragen zu beantworten ist es von entscheidender Bedeutung das Auftreten der zirkulierenden Tumorzellen und eventuell weiterer Parameter im Blut sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen und beurteilen zu können. In der vorliegenden Arbeit sollen die zirkulierenden Tumorzellen aus präoperativ entnommenen Blutproben von Patienten mit einem diagnostizierten Pankreaskarzinom verglichen und beurteilt werden. Die Analyse der CTCs fand dabei mit Hilfe des Veridex CellSearch Systems statt. Des Weiteren sollen, zum besseren Verständnis der klinischen Bedeutung der CTCs und weiterer untersuchten Parameter, diese auf ihre Korrelation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht werden.

2 Patienten und Methoden

2.1 Vorstellung der Studie

Die Daten für die vorliegende prospektive Studie wurden anhand von 190 Patienten mit Verdacht auf ein Pankreaskarzinom erhoben. Alle 190 Patienten wurden zwischen Oktober 2009 und Oktober 2012 aufgrund eines duktales Adenokarzinoms in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg operiert. Jedem Patienten wurde präoperativ Blut entnommen und mit Hilfe des Veridex CellSearch Systems die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) bestimmt. Die Patienten wurden im Schnitt über einen Zeitraum von 28 Monaten hinsichtlich sowohl eines allgemeinen Überlebens (OS) als auch eines Progressionsfreien Überlebens (PFS) beobachtet.

2.2 Patienten

2.2.1 Patientenauswahl

Jeder Patientenfall wurde hinsichtlich der Behandlungsoptionen vor der jeweiligen Operation in einem multidisziplinären Team diskutiert. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, bei welchen eine Operation mit kurativer Absicht als nicht mehr empfehlenswert erschien (z.B. bei weit gestreuten Metastasen oder sehr großer Ausdehnung des Primärtumors), Patienten bei welchen eine weitere maligne Erkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre vorlag, sowie Patienten welche zuvor eine neoadjuvante (Bestrahlungs-)Chemotherapie bekommen hatten.

Jeder Patient wurde für die vor der Operation stattfindende Blutentnahme ausführlich aufgeklärt und das schriftliche Einverständnis zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke eingeholt. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigt (Antragsnummer 323/3004).

2.2.2 Patientenscreening

Das standardisierte präoperative Screening der Patienten beinhaltete eine körperliche Untersuchung, routinemäßige Labor Tests, einen Röntgen-Thorax und eine Untersuchung des Abdomens mittels einer mit Kontrastmittel durchgeführten Computertomographie (CT) oder einer Magnetresonanztomographie (MRT) und einer Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP).

Bei allen Patienten wurde anschließend eine Laparotomie mit kurativer Absicht durchgeführt. Als Kontraindikationen für eine Tumoresektion galten eine intraoperative Diagnose von Fernmetastasen, eine Peritonealkarzinose sowie ein fortgeschrittener Befall ($>180^\circ$ des Umfangs) der Arteria mesenterica superior und/oder des Truncus coeliacus [51]. Eine isolierte Beteiligung der Vena mesenterica superior oder der Vena portae galt nicht als eine Kontraindikation für eine Resektion [52].

Die Nachsorgeuntersuchungen wurden entweder beim den Patienten betreuenden Onkologen oder im Europäischen Pankreas Zentrum der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt. Die Untersuchungen beinhalteten eine klinische Untersuchung, einen Ultraschall des Abdomens und wo sinnvoll und erforderlich eine Computertomographie und routinemäßige Labor Tests inklusive einer Bestimmung des Tumormarkers Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA19-9).

Die Einteilung in die TNM Klassifikation erfolgte gemäß den Richtlinien des American Joint Committee on Cancer [53]. Bei Patienten welche einem explorativen oder palliativen Eingriff unterzogen wurden, wurden der Primärtumor und/oder vorhandene Metastasen histologisch bestätigt und die TNM Klassifikation klinisch erhoben (cTNM). Die R1 Resektion wurde entsprechend der Definition von Esposito definiert als der Abstand des Tumors vom Resektionsrand von $\leq 1\text{mm}$ [54].

Eine adjuvante Therapie mit entweder 5-Fluoruracil oder Gemcitabin wurde unabhängig vom Tumor Status allen Patienten empfohlen, deren Verfassung eine postoperative Chemotherapie zuließ.

2.3 Gewinnung der Blutproben und Erfassung der zirkulierenden Tumorzellen

Die Gewinnung der Blutproben von Patienten, welche einer Resektion des Tumorgewebes unterzogen werden sollten, erfolgte unmittelbar vor dem Eingriff aus dem zentralvenösen Blutkompartiment. Die Blutproben von je mindestens 7,5ml wurden nach der Entnahme in CellSave Preservative Tubes (CellSave, Veridex LLC, NJ, USA) umgefüllt, welche stabilisierende Faktoren für die Konservierung der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) enthalten. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und die Separierung der zirkulierenden Tumorzellen erfolgte der Herstelleranweisung entsprechend mit dem CellTracks Autoprep System (Veridex LLC).

Die halbautomatische Analyse der Blutproben mit Hilfe des CellTracks Analyzer II Systems wurde von zwei speziell geschulten und für die Patientendaten verblindeten Mitarbeitern voneinander unabhängig für jeden Patienten durchgeführt. Da die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen in gesunden Probanden bereits ausgiebig untersucht wurde [55, 56] und die Ergebnisse sich stets der Zahl null annäherten, wurde für diese Studie keine direkte Kontrollgruppe aufgestellt. Als Grenze für einen positiven Test auf zirkulierende Tumorzellen wurde im Einklang mit anderen Studien welche sich der Untersuchung von CTCs in Frühstadien von Tumoren widmeten der Wert von ≥ 1 CTC pro 7.5ml Blut genommen [55].

2.4 Das Veridex CellSearch System

Das von der amerikanischen Firma Veridex LLC entwickelte Veridex CellSearch System ermöglicht die Identifikation und quantitative Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen epithelialen Ursprungs im Vollblut. Das System besteht aus den folgenden Komponenten:

- CellSearch Circulating Tumor Cell Kit
- CellSave Preservative Tubes
- CellTracks AutoPrep System
- CellTracks MagNest
- CellTracks Analyzer II

2.4.1 Das CellSearch Circulating Tumor Cell Kit

Das CellSearch Circulating Tumor Cell Kit dient der Anreicherung und Identifikation von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) epithelialen Ursprungs im entnommenen Vollblut.

Erreicht wird dies mit Hilfe von verschiedenen Reagenzien: Ein Anti-EpCAM Ferrofluidreagenz, mit an mikroskopische Eisenpartikel (sogenannte Ferrofluide) gebundenen Antikörpern. Diese Kombination von Antikörpern und Ferrofluiden bindet sehr spezifisch an das von den zirkulierenden Tumorzellen exprimierte Epithelzellen-Adhäsionsmolekül-Antigen (Epithelial Cell Adhesion Molecule = EpCAM). Dadurch wird ein selektives Aussortieren und die immunomagnetische Anreicherung der CTCs ermöglicht.



Abbildung 3: CellSearch Circulating Tumor Cell Kit

(Abbildung aus: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsearch-ctc-kit>, Zugriff am 04.05.2017)

Neben dem Anti-EpCAM Ferrofluidreagenz enthält das Kit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Anfärbung der Zellkerne und die immunofluoreszenten Antikörper, Anti-CD45-Allophycocyanin (APC) und Anti-CK-Phycoerythrin (CK-

PE) zum Anfärben von Leukocyten bzw. der für Epithelzellen charakteristischen intrazellulären Zytokeratintypen 8, 18 und 19.

Des Weiteren sind im CellSearch Circulating Tumor Cell Kit ein Abfangreagenz (capture enhancement reagent), welches durch eine kontrollierte Aggregation der Ferrofluide die Abfangrate der CTCs erhöht, und drei unterschiedliche Puffer enthalten. Die Puffer dienen dazu die Zellmembran für die fluoreszenten Färbereagenzien permeabel zu machen, die Zellen für die Identifikation zu fixieren und die Proben zu reinigen [57].

2.4.2 Aufbereitung der in den CellSave Preservative Tubes gelagerten Proben mit dem CellTracks AutoPrep System

Das CellTracks AutoPrep System ist ein semi-automatisch funktionierendes Gerät zur automatischen und standardisierten Aufbereitung der Blutproben.

Das CellSearch Circulating Kit enthält 15ml große konische Röhren in welche zunächst die sich in den CellSave Preservative Tubes befindlichen 7,5ml Vollblut umgefüllt werden. Daraufhin werden zudem 6,5ml eines Dilutionspuffer hinzugefügt, die konischen Röhren verschlossen und das Vollblut mit dem Dilutionspuffer durch fünfmaliges Umwenden vermischt.

Als Nächstes wird das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 800facher g-Kraft bei abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Anschließend sollten die Proben innerhalb einer Stunde in das CellTracks AutoPrep System eingelegt werden. Das CellTracks AutoPrep System übernimmt anschließend das Hinzufügen der restlichen Reagenzien, das Durchmischen und die Inkubation der Proben, sowie alle Aspirationsvorgänge.

Als erstes wird dabei der sich nach der Zentrifugation gebildete Überstand von Plasma und Dilutionspuffer aspiriert. Danach wird das Anti-EpCAM Ferrofluidreagenz, das Abfangreagenz und der Dilutionspuffer hinzugefügt. Daraufhin führt das CellTracks AutoPrep System die magnetische Inkubation und Separation der Proben durch. Die Proben werden dabei einem starken magnetischen Feld ausgesetzt, was zum Absetzen der immunomagnetisch markierten Zellen (CTCs) an den Wänden der Röhren führt, während ungebundene Zellen und das restliche Plasma aspiriert werden. Als Nächstes wird das magnetische Feld wieder abgeschaltet und die verbliebenen mit dem

Ferrofluidreagenz markierten Zellen in etwas Pufferlösung gelöst. Nun werden 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Anti-CD45-Allophycocyanin (APC) und Anti-CK-Phycoerythrin (CK-PE), sowie ein Permeabilisationspuffer in die Röhrchen gegeben. Dieser ermöglicht es den drei fluoreszenten Anfärbereagenzien in die immunomagnetisch markierten Zellen einzudringen. Nach der Inkubation dieser Reagenzien wird das magnetische Feld erneut aktiviert und ungebundene Anfärbereagenzien aspiriert, sowie ein Zellfixiermittel hinzugegeben.

Während all dieser Schritte wird die anfänglich aus 7,5ml Vollblut bestehende Probe auf ca. 300µl reduziert. Die Probe mit den nun isolierten und immunomagnetisch angefärbten Zellen und Zellfragmenten wird vom CellTracks AutoPrep System in eine Kassette in der MagNest-Magnetvorrichtung eingebracht und in der Zellpräsentationsvorrichtung platziert. Die MagNest können anschließend entnommen werden. Während einer ca. 20 minütigen Inkubationszeit bei Dunkelheit und Raumtemperatur wandern die immunomagnetisch markierten Zellen und Zellfragmente aufgrund eines magnetischen Feldes innerhalb der MagNest-Vorrichtung an die Oberfläche der Kassette und werden für die Analyse mit Hilfe des CellTracks Analyzer II ausgerichtet [57].

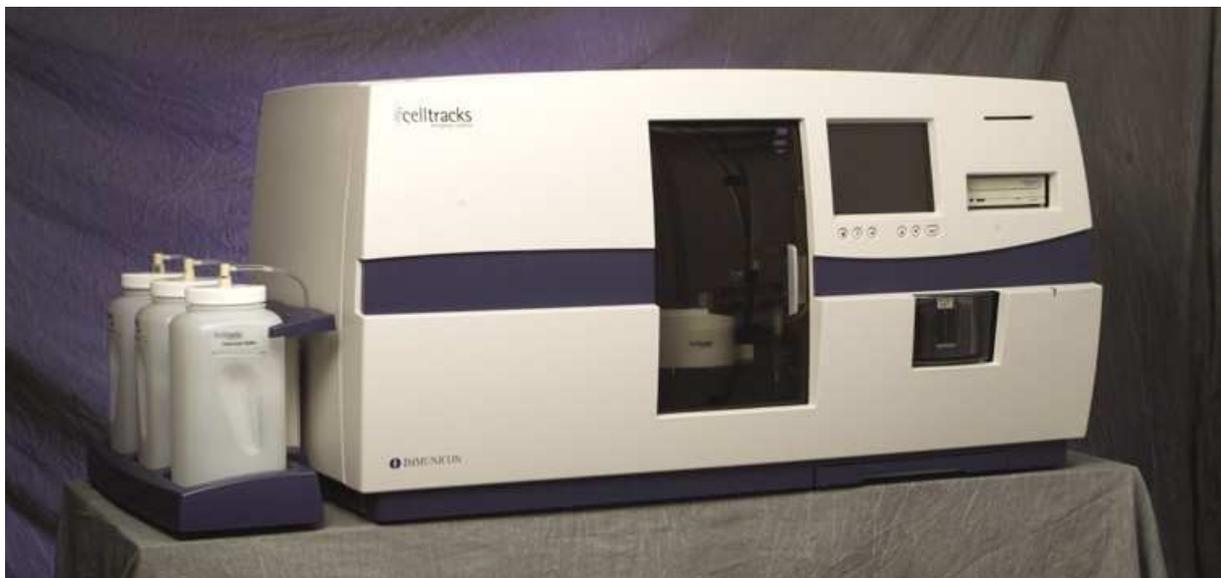


Abbildung 4: CellTracks AutoPrep System

(Abbildung modifiziert aus:

<http://mms.businesswire.com/bwapps/mediaserver/ViewMedia?mgid=177162&vid=5&download=1>,
Zugriff am 04.05.2017)

2.4.3 Der CellTracks Analyzer II

Die Analyse der Blutproben und damit verbundene Zählung der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) erfolgt mit Hilfe des CellTracks Analyzer II, bei welchem es sich um ein semi-automatisches Fluoreszenzmikroskop handelt, und einen speziellen Computer mit installierter CellTracks Software.

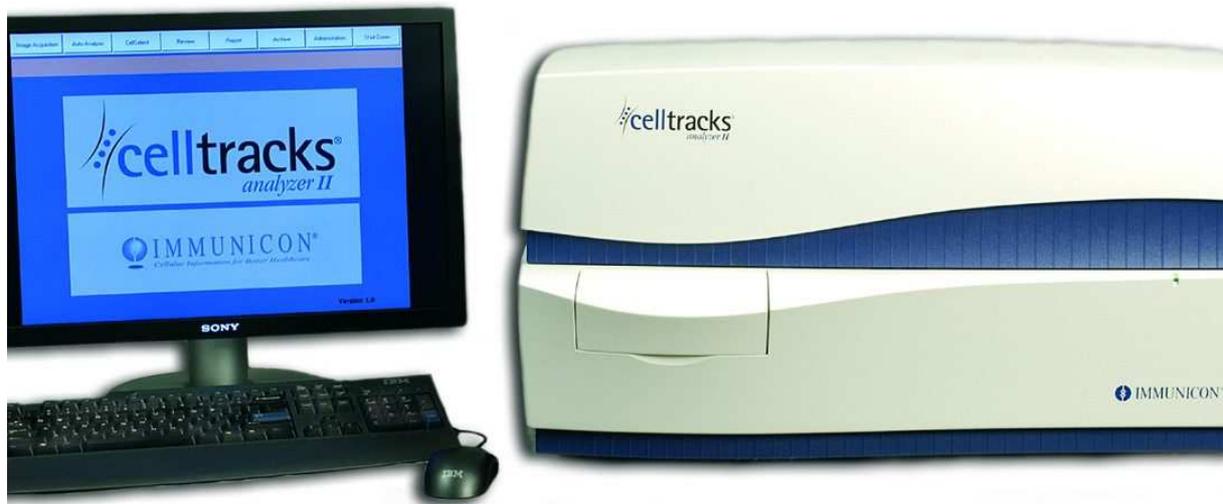


Abbildung 5: CellTracks Analyzer II

(Abbildung aus: <http://hs-design.com/news/top-medical-innovation-for-2009>, Zugriff am 04.05.2017)

Der CellTracks Analyzer II verfügt über vier Filter um die zuvor fluoreszent markierten, immunomagnetisch selektierten und ausgerichteten Zellen und Zellfragmente zu zählen. Das semiautomatische Mikroskop scannt nach dem Einlegen der MagNest insgesamt vier Mal die gesamte Oberfläche einschließlich der Ränder der MagNest Kassette. Nach dem Scanvorgang werden die Bilder aller vier Filter kombiniert, vom Computer hinsichtlich zuvor definierter Parameter ausgewertet und aufgenommene Bilder von Objekten welche als zirkulierende Tumorzellen in Frage kommen automatisch in einer Tabelle dem Anwender dargestellt.

Die endgültige Beurteilung und Klassifikation der Zellen und Zellfragmente findet durch einen geschulten Anwender statt. In unserem Fall wurde jede Probe von zwei Anwendern unabhängig voneinander untersucht. Positiv

markierte Objekte wurden als Tumorzellen eingestuft, wenn sie eine runde bis ovale Zellform und einen im Zytoplasma sichtbaren Kern besaßen, sowie der Phänotyp EpCAM+, CK+, DAPI+ und CD45- vorlag. Bei Unstimmigkeiten in der Auswertung einzelner Objekte wurden diese erneut untersucht, bis man sich auf eine Diagnose einigen konnte. Die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen wurde stets pro Probe, also 7,5ml Vollblut, bestimmt [57].

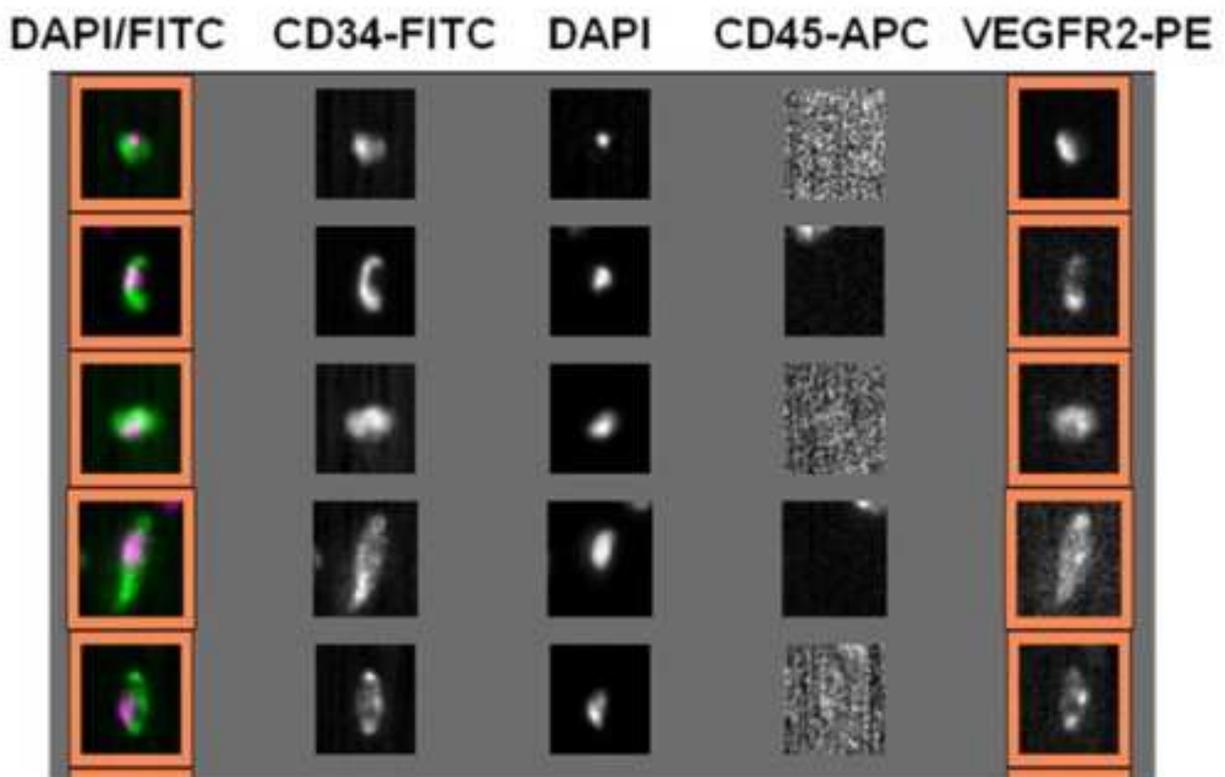


Abbildung 6: Darstellung der als Tumorzellen in Frage kommender Objekte durch den CellTracks Analyzer II

(Abbildung modifiziert aus:

https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/217/3554681/PMC3554681_pone.0055079.g003.png, Zugriff am 04.05.2017)

2.5 Statistische Auswertung

Die Studie hatte zum Ziel herauszufinden wie effektiv zirkulierende Tumorzellen in der peripheren Blutbahn erkannt werden können und welchen Einfluss ihre Entdeckung auf die Prognose eines an einem potenziell malignen Pankreastumor erkrankten Patienten hat.

Kategorische Daten wurden als absolute und relative Häufigkeiten dargestellt und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen. Kontinuierliche Daten wurden als Median und als Intervall dargestellt und mit Hilfe des t-Tests verglichen. Das allgemeine Überleben (OS) wurde definiert als der Zeitraum zwischen der Resektion des Tumorgewebes und dem Todeszeitpunkt des Patienten, unabhängig von der Todesursache. Das progressionsfreie Überleben wurde definiert als der Zeitraum zwischen der Resektion des Tumorgewebes und entweder dem Zeitpunkt eines Wiederauftretens des Primärtumors, dem Auftreten von Metastasen oder dem Todeszeitpunkt, je nachdem was als erstes eintrat.

Patienten bei denen die letzte Nachuntersuchung innerhalb von zwei Wochen nach der Resektion stattgefunden hatte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Patienten die nicht mehr für Nachuntersuchungen zur Verfügung standen und bei denen kein Wiederauftreten des Tumors bekannt war oder die bei der letzten Kontaktaufnahme noch am Leben waren, wurden bis zum zuletzt bekannten Zeitpunkt ihres Zustandes in die Statistik eingeschlossen.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten wurden mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers verglichen, sowie die nicht angepassten Überlebenswahrscheinlichkeiten mit dem Log-Rang-Test geprüft und die Differenzen mit den nicht angepassten Hazard Ratios (HRs) zusammen mit 95%igen Konfidenzintervallen (CIs) quantifiziert. Mit Hilfe von multivariablen Cox-Regressionen wurden die Auswirkungen von zirkulierenden Tumorzellen für folgende Parameter verglichen:

- UICC-Stadium (\leq II gegenüber $>$ II)
- Das Alter des Patienten
- Das Geschlecht des Patienten

- Präoperativer Wert des Tumormarkers CA19-9 ($\leq 37 \mu\text{g/l}$ gegenüber $>37 \mu\text{g/l}$)
- Der R Status (<2 gegenüber 2)

Zur Vermeidung von verzerrten Ergebnissen und um alle erhobenen Daten nutzen zu können, wurden fehlende Informationen für alle Cox-Regressionsanalysen mit Hilfe multipler Imputationen extrapoliert [57,58]. Alle p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle p-werte waren zweiseitig. Die statistischen Analysen wurden mit der Statistik Software R Version 3.1.2 (www.r-project.org) und STATA erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 190 Patienten, bei denen ein Verdacht auf ein Pankreaskarzinom vorlag, prospektiv aufgenommen (Tabelle 9). Die Studienpopulation setzte sich aus 112 (58,9%) Männern und 78 (41,1%) Frauen zusammen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 65,5 Jahre. Retrospektiv lag bei der Mehrheit der Patienten ein T3 Tumor vor (n=123; 64,7%) und bei 164 Patienten (86,3%) wurden bei der letzten pathologischen Untersuchung Lymphknotenmetastasen festgestellt.

Die 190 Patienten wurden in eine potentiell kurative Gruppe mit 137 Patienten (72,1%) und eine palliative Gruppe mit 53 Patienten (27,9%) eingeteilt. Die erste Gruppe wurde dabei mit kurativer Absicht operiert, während bei der zweiten Gruppe ein chirurgischer Eingriff mit rein explorativer und/oder palliativer Absicht erfolgte. Bei 18 der 53 Patienten aus der palliativen Gruppe war der Grund für das Unterlassen einer Operation mit kurativer Absicht das intraoperative Auffinden von Fernmetastasen. Bei den restlichen 35 Patienten dieser Gruppe wurde der Primärtumor aufgrund seiner anatomischen Ausdehnung während der OP als nicht resektabel eingestuft. Beide Gruppen wurden als Ganzes (gesamte Kohorte) und jeweils für sich alleine untersucht. Die Tabelle 9 fasst die klinisch-pathologischen Charakteristika für jeweils die kurative und palliative Gruppe, sowie für die gesamte Kohorte zusammen.

123 Patienten der gesamten Kohorte (64,7%) wiesen ein duktales Adenokarzinom im Frühstadium auf, welches nach der UICC Stadieneinteilung einem Stadium von \leq II B entsprach. In der palliativen Gruppe hatten die allermeisten Patienten (52 Patienten, 98,1%) dagegen mit einem UICC Stadium von III bzw. IV bereits einen Pankreastumor im Spätstadium entwickelt. Bei diesen Patienten waren also entweder eine Beteiligung großer benachbarter Gefäße oder Fernmetastasen gegeben.

Bei 127 Patienten (92,1%) der kurativen Gruppe konnte histologisch ein duktales Adenokarzinom nachgewiesen werden. Während bei 12 Patienten der kurativen Gruppe andere Formen eines Pankreastumors vorlagen: 3 neuro-

endokrine Karzinome, 2 anaplastische Karzinome, 4 adenosquamöse Karzinome und 3 intraduktale papillär-muzinöse Tumore (IPMTs). Bei 84 Patienten (61,3%) der kurativen Gruppe wurde eine Duodenopankreatektomie durchgeführt (entweder klassisch oder als Pankreaskopfresektion nach Kausch / Whipple mit Erhalt des Pylorus). 19 Patienten (13,9%) erhielten eine distale Pankreatektomie, weitere 19 Patienten (13,9%) eine totale Pankreatektomie und 15 Patienten (10,9%) eine multiviszzerale Resektion [60].

Tabelle 9: Charakteristika der Studienpopulation [60]

Kriterien	Kurative Gruppe	Palliative Gruppe	Gesamte Kohorte
n	137	53	190
Alter (Jahre)			
Median (IQR)	66 (57; 71)	64 (58; 71)	65,5 (57,2; 71)
Geschlecht			
männlich	76 (55,5)	36 (67,9)	112 (58,9)
weiblich	61 (44,5)	17 (32,1)	78 (41,1)
T Status			
Tis	3 (2,2)	0 (0)	3 (1,6)
T1	1 (0,7)	0 (0)	1 (0,5)
T2	3 (2,2)	0 (0)	3 (1,6)
T3	122 (89,1)	1 (1,9)	123 (64,7)
T4	8 (5,8)	52 (98,1)	60 (31,6)
N Status			
N0	25 (18,2)	0 (0)	25 (13,2)
N1	112 (81,8)	52 (98,1)	164 (86,3)
M Status			
M0	128 (93,4)	2 (3,8)	130 (68,4)
M1	9 (6,6)	18 (34)	27 (14,2)
UICC Stadium			
0	2 (1,5)	0 (0)	2 (1,1)
I	4 (2,9)	0 (0)	4 (2,1)
II	116 (84,7)	1 (1,9)	117 (61,6)
III	6 (4,4)	34 (64,2)	40 (21,1)
IV	9 (6,6)	18 (34)	27 (14,2)
Histologie			
PDAC (duktales Adenokarzinom)	127 (92,7)	48 (90,6)	175 (92,1)
andere	10 (7,3)	2 (3,8)	12 (7,8)

R Status			
R0	28 (20,4)	0 (0)	28 (14,7)
R1	106 (77,4)	4 (7,5)	110 (57,9)
R2	0 (0)	19 (35,8)	19 (10)
Lokalisation des Primärtumors			
Pankreaskopf	110 (80,3)	43 (81,1)	153 (80,5)
Pankreaskorpus/schwanz	20 (14,6)	10 (18,8)	30 (15,7)
Papilla/ distaler Gallengang	6 (4,4)	0 (0)	6 (3,2)
Art der chirurgischen Therapie			
Duodenopankreatektomie	84 (61,3)	0 (0)	84 (44,2)
Distale Pankreatektomie	19 (13,9)	0 (0)	19 (10)
Totale Pankreatektomie	19 (13,9)	0 (0)	19 (10)
Multiviszzerale Resektion	15 (10,9)	0 (0)	15 (7,9)
Exploration/palliativer Eingriff	0 (0)	53 (100)	53 (27,9)
CA 19-9			
Median (IQR)	83 (35; 132)	87 (46; 124)	84,5 (38,2; 129,8)
Nachweis intakter CTCs (≥1 CTC)			
Patienten ohne CTCs	111 (81)	36 (67,9)	147 (77,4)
Patienten mit CTCs	12 (8,8)	7 (13,2)	19 (10)
keine Angabe möglich	14 (10,2)	10 (18,9)	24 (12,6)

3.2 Die Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen

Von den 190 Patienten der gesamten Kohorte konnten mit Hilfe des Veridex CellSearch Systems lediglich bei 19 Patienten (10%) zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden. Dabei konnten in der kurativen Gruppe bei 8,8% (12 Patienten) und in der palliativen Gruppe bei 13,2% (7 Patienten) der Untersuchten in den Proben CTCs (zirkulierende Tumorzellen) festgestellt werden.

Tabelle 10 zeigt die Detektionsrate der CTCs in Abhängigkeit vom Tumorstadium gemäß der UICC Einteilung für Pankreaskarzinome. Die Detektionsrate war unterschiedlich für Patienten mit Pankreastumoren im Frühstadium (UICC Stadium ≤IIB, 8,3%) und für Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC Stadien III und IV, 13%). Dieser Unterscheid verfehlte jedoch die statistische Signifikanz ($p=0,064$).

Tabelle 10: Abhängigkeit der Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen in der Gesamtkohorte [60]

	UICC Stadium I + II	UICC Stadium III + IV	Gesamtzahl	P-Wert
Patientenanzahl	121	69	190	
Intakte zirkulierende Tumorzellen (CTCs)				0,064
CTC Anzahl = 0	100 (82,6)	47 (68,1)	147 (77,4)	
CTC Anzahl ≥ 1	10 (8,3)	9 (13)	19 (10)	
keine Angabe möglich	11 (9,1)	13 (18,8)	24 (12,6)	

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen und unterschiedlichen klinisch-pathologischen Variablen wurden hauptsächlich univariate Analysen durchgeführt. Diese Analysen hatten den Zweck, klinische Parameter mit einem Einfluss auf das Auftreten von zirkulierenden Tumorzellen, ausfindig zu machen.

Diese univariaten Analysen ergaben eine deutliche Verbindung zwischen dem Auffinden von CTCs und dem Auftreten von Metastasen. Zirkulierende Tumorzellen konnten bei 7 von 23 Patienten (30,4%) mit Fernmetastasen (M1) nachgewiesen werden, bei Patienten mit M0 Status wurden lediglich bei 10 von 118 Patienten (8,5%; $p=0,015$) CTCs nachgewiesen.

Der M Status war der einzige klinisch-pathologische Parameter bei welchem ein starker Zusammenhang zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen vorlag. Bei den anderen Parametern inklusive des T- und N-Status, der Lokalisation des Primärtumors, sowie der präoperativ gemessenen Tumormarker CEA und CA19-9 konnte keine eindeutige Wechselwirkung mit dem Nachweis von CTCs festgestellt werden. Tabelle 11 gibt eine Übersicht dieser Ergebnisse [60].

Tabelle 11: Univariate Analyse eventueller Zusammenhänge klinisch-pathologischer Parameter mit dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen [60]

	intakte CTCs = 0	intakte CTCs ≥ 1	Gesamtmenge	P-Wert
Patientenanzahl	147	19	166	
Patientenalter				0,206
Median (IQR)	66 (57,5;70)	69 (60,5;78)	66(58;71)	
Geschlecht				1,0
männlich	85 (57,8)	11 (57,9)	96 (57,8)	
weiblich	62 (42,2)	8 (42,1)	70 (42,2)	
T-Status				0,383
T0	3 (2)	0 (0)	3 (1,8)	
T1	1 (0,7)	0 (0)	1 (0,6)	
T2	3 (2)	0 (0)	3 (1,8)	
T3	100 (68)	10 (52,6)	110 (66,3)	
T4	40 (27,2)	9 (47,4)	49 (29,5)	
N-Status				0,538
N0	22 (15)	1 (5,3)	23 (13,9)	
N1	124 (84,4)	18 (94,7)	142 (85,5)	
M-Status				0,015
M0	108 (73,5)	10 (52,6)	118 (71,1)	
M1	16 (10,9)	7 (36,8)	23 (13,9)	
R-Status				0,156
R0	21 (14,3)	3 (15,8)	24 (14,5)	
R1	91 (61,9)	9 (47,4)	100 (60,2)	
R2	13 (8,8)	5 (26,3)	18 (10,8)	
Lokalisation				0,27
Pankreaskopf	122 (83)	13 (68,4)	135 (81,3)	
Pankreaskorpus/schwanz	19 (12,9)	5 (26,3)	24 (14,5)	
Papilla/ Gallengang	5 (3,4)	1 (5,3)	6 (3,6)	
Art der chirurgischen Therapie				0,362
Distale Pankreatektomie	13 (8,8)	3 (15,8)	16 (9,6)	
Exploration/palliativer Eingriff	36 (24,5)	7 (36,8)	43 (25,9)	
Totale Pankreatektomie	31 (21,1)	2 (10,5)	33 (19,9)	
Duodenopankreatektomie	67 (45,6)	7 (36,8)	74 (44,6)	
CEA				0,656
Mittelwert (SD)	24,9 (19,7)	27,1 (20,5)	25,1 (19,7)	
CA 19-9				0,492
Median (IQR)	82 (35,5;127,5)	88 (61,5;131)	82,5 (38,2; 128,8)	

3.3 Auswertung der prognostischen Parameter

Von den 190 Patienten der gesamten Kohorte waren nach einer Follow-up Zeit von durchschnittlich 28 Monaten (95%-Konfidenzintervall von 27 bis 31 Monaten) 89 Patienten (46,8%) gestorben und 31 Patienten (16,3%) nicht mehr auffindbar. Bei insgesamt 95 Patienten (50%) kam es entweder zu einem Wiederauftreten des Tumors oder zum Tod. Die mittlere progressionsfreie Überlebensdauer (PFS) betrug 17 Monate (12 Monats PFS Quote von 61,6%, 95%-Konfidenzintervall von 53,0 bis 69,1) und die Gesamtüberlebensdauer (OS) betrug 20 Monate (12 Monats PFS Quote von 70,0%, 95%-Konfidenzintervall von 61,7 bis 76,8).

Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der präoperativen Bestimmung zirkulierender Tumorzellen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens, wurden multivariate Analysen mit bereits bekannten Risikofaktoren anhand der gesamten Kohorte durchgeführt. Diese Analysen wiesen das UICC Stadium des Tumors sowie eine präoperativ im Blut erhöhte Menge des Tumormarkers Carbohydrate-Antigen 19-9 als prognostische Parameter für PFS und OS auf. Eine Übersicht dieser Untersuchungen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der gesamten Kohorte [60]

	Parameter	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	P-Wert
PFS	CTC (≥ 1 versus 0)	2,05	0,90 bis 4,14	0,087
	Alter	0,99	0,97 bis 1,01	0,51
	Geschlecht (m versus w)	0,86	0,56 bis 1,34	0,52
	UICC (\leq II versus $>$ II)	0,42	0,27 bis 0,66	0,000
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,87	1,13 bis 3,09	0,014
	R-Status (2 versus $<$ 2)	2,17	0,30 bis 15,64	0,44
OS	CTC (≥ 1 versus 0)	1,49	0,72 bis 3,05	0,27
	Alter	0,99	0,96 bis 1,01	0,40
	Geschlecht (m versus w)	0,87	0,56 bis 1,36	0,56
	UICC (\leq II versus $>$ II)	0,38	0,24 bis 0,61	0,000
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,90	1,13 bis 3,20	0,015
	R-Status (2 versus $<$ 2)	1,69	0,23 bis 12,22	0,60

Wie in Abbildung 7 zu sehen wiesen Patienten der gesamten Kohorte bei welchen präoperativ mindestens eine intakte zirkulierende Tumorzelle im Blut nachgewiesen wurde ein deutlich verringertes Progressionsfreies Überleben (PFS) auf, als Patienten ohne einen Nachweis von CTCs. Der durchschnittliche PFS Wert lag bei 10 versus 20 Monaten, der Log-Rang-Test ergab einen P-Wert von 0,0174, die nicht bereinigte Hazard Ratio lag bei 2,12 und das 95%-Konfidenzintervall lag bei 1,11 bis 4,06).

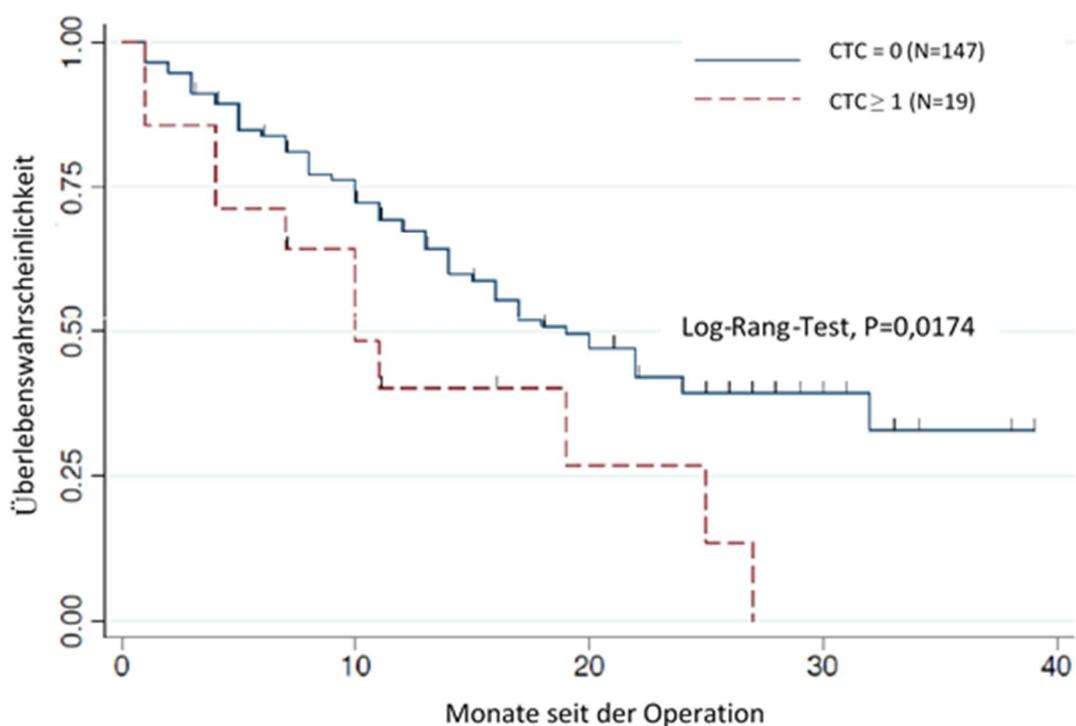


Abbildung 7: Zusammenhang zwischen dem Progressionsfreien Überleben und dem präoperativen Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der gesamten Kohorte [60]

Der Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben (OS) innerhalb der gesamten Kohorte und dem Nachweis von präoperativ vorliegenden CTCs ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Ergebnisse waren hier ähnlich wie beim Progressionsfreien Überleben: Der durchschnittliche OS-Wert lag bei 12 versus 22 Monaten bei Patienten ohne präoperativ nachweisbare CTCs, der Log-Rang-Test ergab einen P-Wert von 0,2425, die nicht bereinigte Hazard Ratio lag bei 1,54 und das 95%-Konfidenzintervall lag bei 0,73 bis 3,22). Beim Gesamtüberleben erreichte dieser Unterscheid jedoch nicht die statistische Signifikanz.

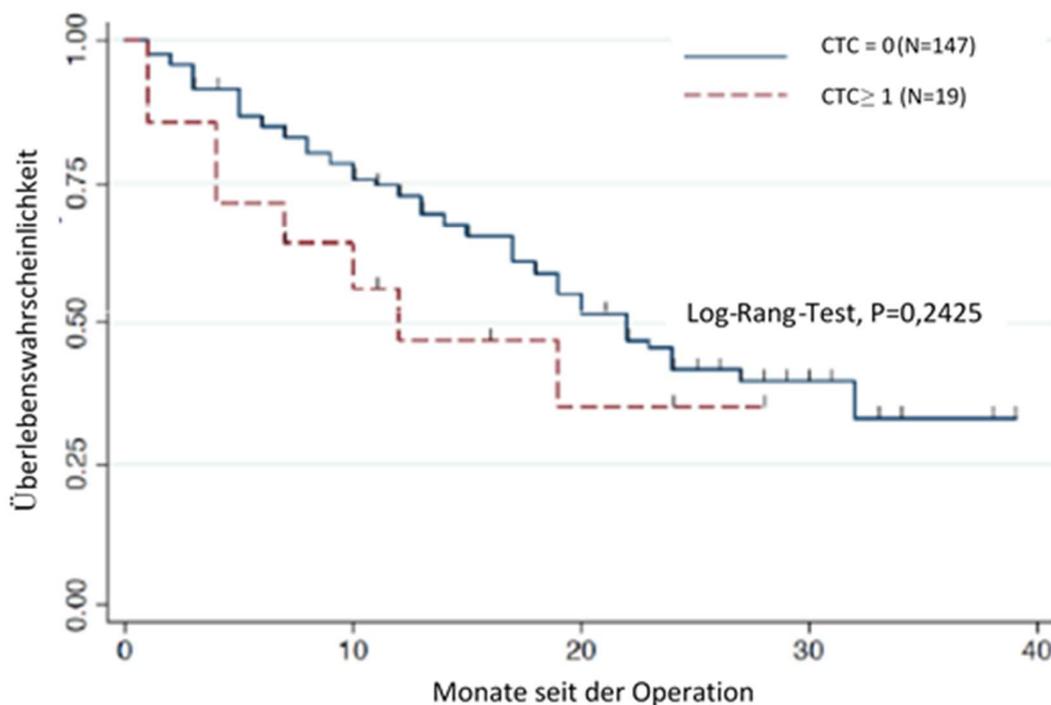


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und dem präoperativen Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der gesamten Kohorte [60]

Tabelle 13 zeigt die Multivariate Analyse der Risikofaktoren für PFS und OS. Der starke Einfluss präoperativ nachgewiesener zirkulierender Tumorzellen auf das Progressionsfreie Überleben innerhalb der gesamten Kohorte erwies sich auch hierbei als unabhängig. Der P-Wert lag bei dieser Analyse bei 0,027, die bereinigte Hazard Ratio bei 2,10 und das 95%-Konfidenzintervall bei 1,09 bis 4,08.

Tabelle 13: Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der gesamten Kohorte [60]

	Parameter	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	P-Wert
PFS	CTC (≥1 versus 0)	2,10	1,09 bis 4,08	0,027
	Alter	0,99	0,96 bis 1,01	0,4
	Geschlecht (m versus w)	0,83	0,52 bis 1,32	0,44
	UICC (≤II versus >II)	0,37	0,23 bis 0,60	0,000
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,65	0,99 bis 2,75	0,054
	R-Status (2 versus <2)	5,47	0,73 bis 40,96	0,098
OS	CTC (≥1 versus 0)	1,56	0,74 bis 3,27	0,24
	Alter	0,98	0,96 bis 1,01	0,39
	Geschlecht (m versus w)	0,77	0,48 bis 1,21	0,25
	UICC (≤II versus >II)	0,36	0,22 bis 0,58	0,000
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,62	0,96 bis 2,75	0,072
	R-Status (2 versus <2)	3,71	0,49 bis 27,74	0,20

Eine getrennte Analyse der kurativen und palliativen Gruppe brachte folgende Ergebnisse hervor:

In der kurativen Gruppe war die Auswirkung von präoperativ nachgewiesenen zirkulierenden Tumorzellen mit einem P-Wert=0,0301 von statistischer Signifikanz für das Progressionsfreie Überleben, während die Auswirkung auf das Gesamtüberleben mit einem P-Wert=0,3870 auch hier statistisch nicht signifikant war. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen jeweils die Werte für das Progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

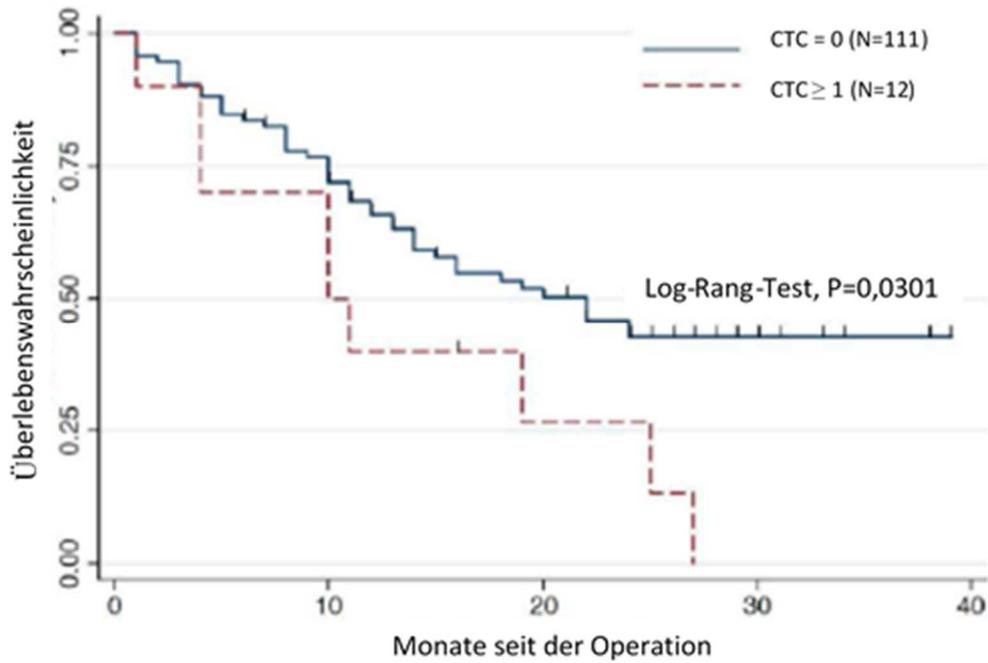


Abbildung 9: Progressionsfreies Überleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der kurativen Gruppe [60]

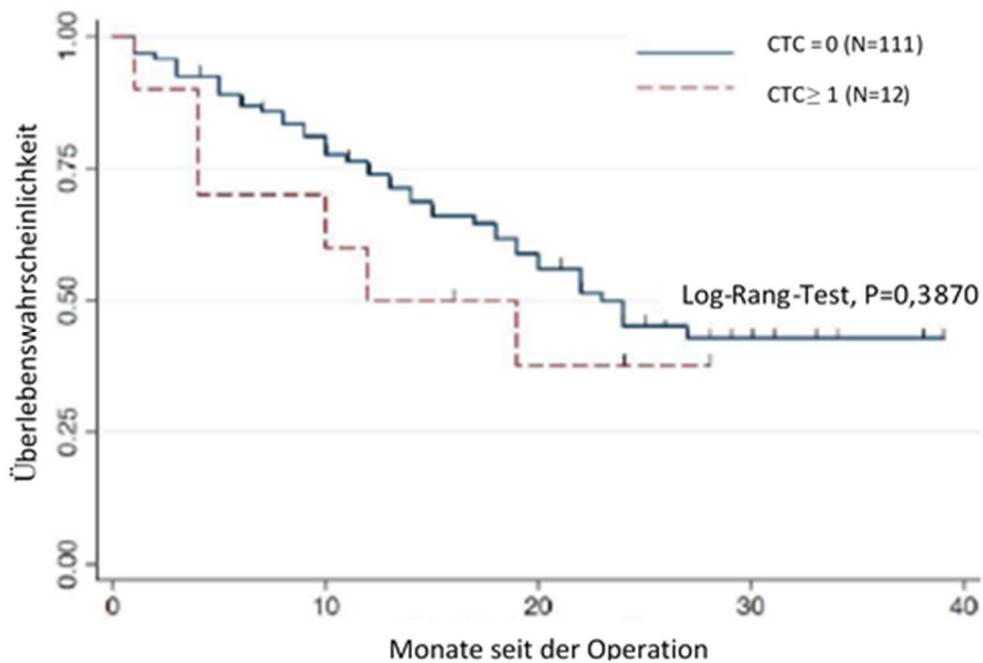


Abbildung 10: Gesamtüberleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der kurativen Gruppe [60]

In der palliativen Gruppe konnte weder für das Progressionsfreie Überleben, noch für das Gesamtüberleben ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem präoperativen Nachweis zirkulierender Tumorzellen festgestellt werden. Für das PFS betrug der P-Wert=0,2945 und für das OS war der P-Wert=0,3987. Allerdings muss bei den Ergebnissen für die palliative Gruppe die geringe Ereignismenge bedacht werden. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen jeweils die Werte für das Progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

Die in den Tabellen 12 und 13 zusammengefassten Ergebnisse der Multivariaten Analysen zeigten zudem wie erwartet, dass sowohl ein fortgeschrittenes UICC Stadium von III und IV als auch ein erhöhter präoperativ gemessener Wert des Tumormarkers CA19-9 von statistischer Signifikanz für das Progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben in der gesamten Kohorte und auch in der kurativen Gruppe war [60].

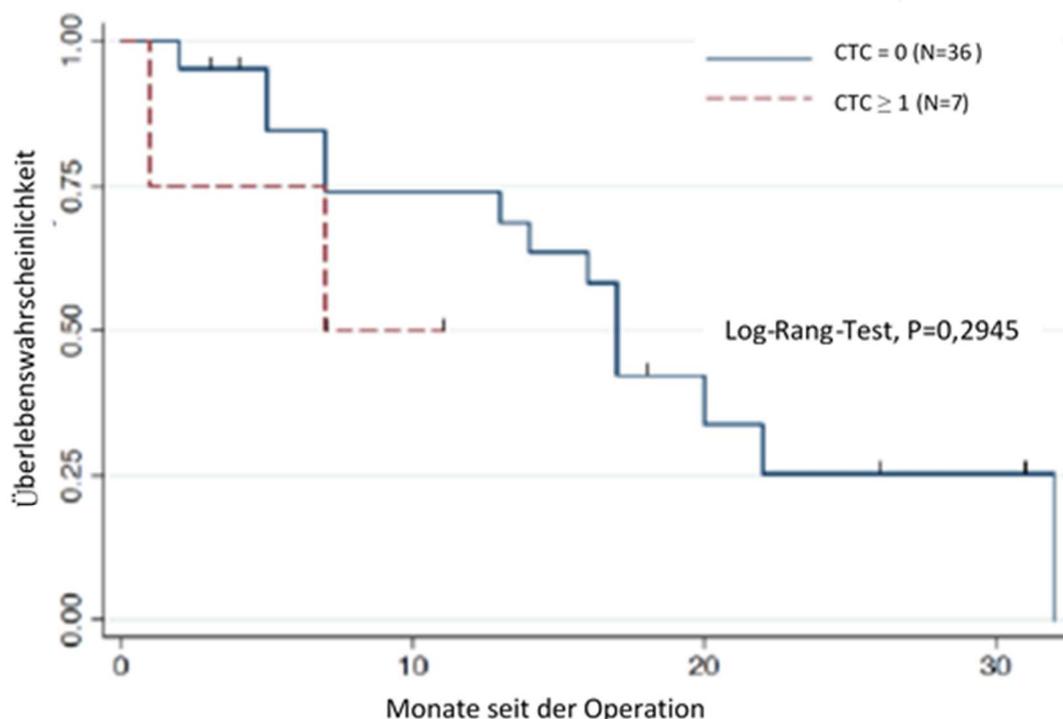


Abbildung 11: Progressionsfreies Überleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der palliativen Gruppe [60]

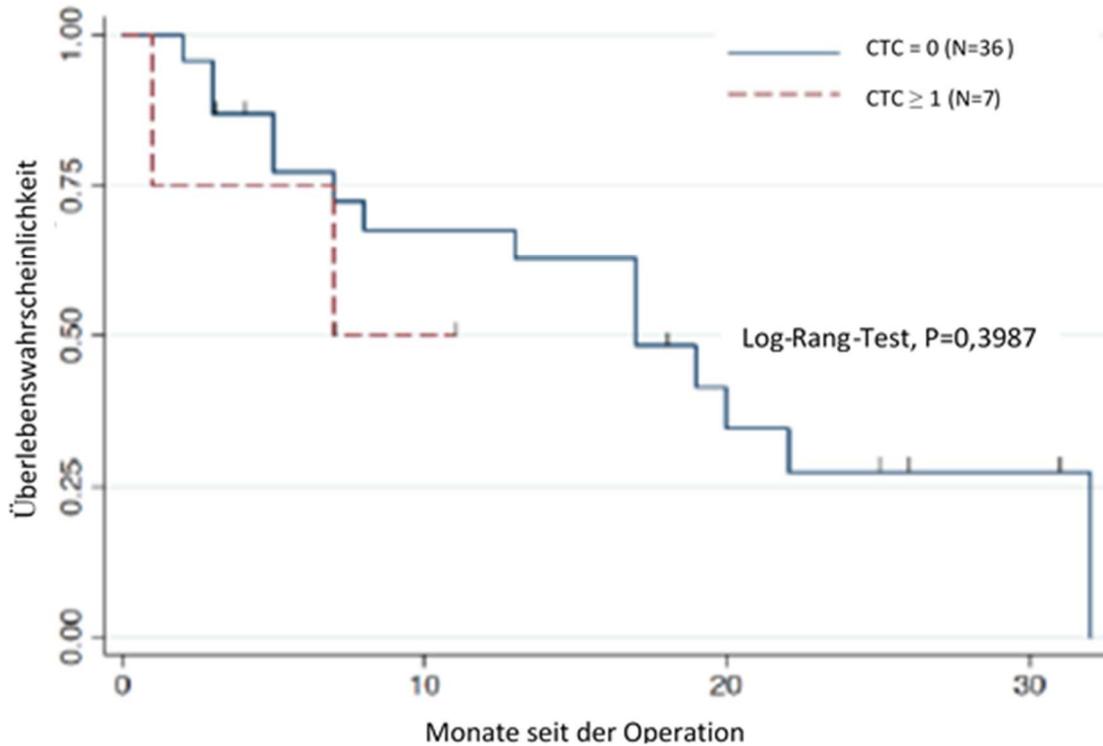


Abbildung 12: Gesamtüberleben und der präoperative Nachweis von intakten zirkulierenden Tumorzellen in der palliativen Gruppe [60]

Tabelle 14: Multivariate Analyse der Risikofaktoren für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben innerhalb der kurativen Gruppe [60]

	Parameter	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	P-Wert
PFS	CTC (≥1 versus 0)	1,93	0,90 bis 4,14	0,087
	Alter	0,99	0,96 bis 1,01	0,47
	Geschlecht (m versus w)	1,00	0,59 bis 1,70	0,98
	UICC (≤II versus >II)	0,28	0,13 bis 0,63	0,002
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,65	0,92 bis 2,94	0,088
OS	CTC (≥1 versus 0)	1,38	0,56 bis 3,43	0,47
	Alter	0,99	0,96 bis 1,01	0,56
	Geschlecht (m versus w)	0,99	0,57 bis 1,70	0,97
	UICC (≤II versus >II)	0,26	0,12 bis 0,57	0,001
	CA 19-9 (erhöht versus normal)	1,86	1,00 bis 3,47	0,048

4 Diskussion

4.1 Resümee der Fragestellung

Pankreaskarzinome im Allgemeinen und das PDAC (duktales Adenokarzinom) im Besonderen sind aufgrund ihrer aggressiven Biologie und der daraus resultierenden hohen Mortalität seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch waren Fortschritte hinsichtlich der Diagnostik und Überlebensprognose von Pankreastumoren bisher selten und von mäßigem Erfolg [31].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine neue Art der Diagnostik für Pankreastumoren mit Hilfe des Veridex CellSearch Systems zu testen. Es sollte untersucht werden wie zuverlässig zirkulierende Tumorzellen (CTCs) damit aufgefunden werden können und ob die identifizierten CTCs als unabhängiger Parameter für eine Überlebensprognose genutzt werden können. Hierfür wurden mögliche Zusammenhänge zwischen dem präoperativen Nachweis von CTCs, weiteren klinischen Parametern und dem Überleben der Patienten mit einem diagnostizierten Pankreastumor untersucht.

Es konnte in dieser prospektiven, 190 Patienten umfassenden Untersuchung mit einer standardisierten Messmethode gezeigt werden, dass eine statistisch signifikante Verbindung zwischen dem Auftreten von zirkulierenden Tumorzellen und dem progressionsfreien Überleben besteht und es auch eine deutliche Tendenz bezüglich des Gesamtüberlebens gibt. Präoperativ nachgewiesene CTCs können also als Ergänzung zu den etablierten Standard-Testverfahren dienen, um eine genauere Diagnose des Fortschritts der Erkrankung und daraus resultierende individuellere Prognose und Therapie zu ermöglichen. Die vorliegende Studie sollte helfen die Bedeutung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen besser zu verstehen und mit diesem Wissen Pankreastumore in Zukunft besser behandeln zu können.

4.2 Ist das Veridex CellSearch System ein geeignetes Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen?

Es wurden bereits viele Methoden wie die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), die Immunzytochemie oder die Durchflusszytometrie zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen untersucht. Diese Nachweismethoden haben jedoch alle den Nachteil, dass sie trotz ihrer Komplexität in der Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse, der Sensitivität, der Spezifität variieren können und auch keine Aussage über die exakte Anzahl der CTCs liefern.

Das semiautomatisierte und standardisierte Verfahren des CellSearch Systems macht es möglich die Untersuchungsergebnisse verschiedener Studien zum Nachweis und Quantität von zirkulierenden Tumorzellen miteinander zu vergleichen. Das Veridex System konnte die hohe Reproduzierbarkeit seiner Untersuchungsergebnisse, seine Zuverlässigkeit bereits in zahlreichen Studien unter Beweis stellen [56, 57]. Zudem ist die Probengewinnung und Untersuchung in der Praxis relativ leicht und minimalinvasiv durchführbar. Die vom Veridex CellSearch System ausgesuchten Zielgene EpCAM und die Zytokeratine 8, 18 und 19 sind hochspezifisch für zirkulierende Tumorzellen und werden im Blut ansonsten normalerweise nicht exprimiert [57,61].

Die Nachteile dieses Verfahrens liegen unter anderem in den relativ hohen Investitionskosten und einer notwendigen Schulung der das Gerät bedienenden Mitarbeiter. Die hohe Sensitivität des CellSearch Systems auf die im Blut vorhandenen zirkulierenden Tumorzellen wurde ebenfalls bereits mehrfach bestätigt. Sie setzt allerdings ein Vorhandensein des EpCAM Antigens auf der Tumorzelle voraus, was nicht bei allen Tumorzellen der Fall ist [57]. Und gerade bei Tumorzellen des Pankreas wurde bereits festgestellt, dass sie EpCAM in einem deutlich geringeren Ausmaß exprimieren als Tumorzellen die dem Kolon, der Brust oder der Prostata entstammen [62, 63]. Zudem ist das untersuchte Volumen mit 7,5ml im Vergleich zur gesamten Blutmenge eines Patienten sehr klein, was es schwierig macht Aussagen zum gesamten Blutvolumen zu machen [56].

4.3 Diskussion der vorliegenden Ergebnisse

Frühere Untersuchungen zur prognostischen Rolle von zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit Pankreastumoren haben bereits auf einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und einem verkürzten Progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben hingewiesen. Allerdings handelte es sich dabei um kleiner angelegte Studien mit im Schnitt um die 50 Patienten. Zudem wurden beim Großteil der Probanden aufgrund des weit fortgeschrittenen Krankheitsstadiums keine kurativen chirurgischen Eingriffe durchgeführt und die Detektionsmethoden für zirkulierende Zellen waren nicht einheitlich, ein CellSearch System kam lediglich bei fünf dieser Arbeiten zum Einsatz [64-67].

Bei der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des standardisierten CellSearch Systems Daten von 190 prospektiv aufgenommenen Patienten ausgewertet, von welchen ein Großteil in kurativer Absicht operiert wurde. Die Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen in unserer Studie lag bei 10% und war damit im Vergleich zu bisher vorliegenden Untersuchungen, bei welchen Detektionsraten von 23,4% bis 96,2% gemeldet wurden, deutlich geringer [64-68]. Bei den vorigen Untersuchungen handelte es sich allerdings wie erwähnt um Studien an palliativ behandelten Patienten in weit fortgeschrittenen Tumorstadien, bei welchen man von einer deutlich größeren Menge an zirkulierenden Tumorzellen im Blut ausgehen kann.

Neben den präoperativ nachgewiesenen zirkulierenden Tumorzellen konnten wie erwartet das UICC Stadium und der präoperativ gemessene Wert des Tumormarkers CA 19-9 als statistisch signifikante Faktoren für das Progressionsfreie Überleben und auch für das Gesamtüberleben festgestellt werden. Der Tumormarker CA 19-9 wird häufig als Kontrollparameter für Karzinome des Gastrointestinaltrakts verwendet. Ca 19-9 ist jedoch weder tumor- noch organspezifisch und wird sowohl von Tumorzellen als auch von gesunden Schleimhautzellen exprimiert [69]. CA 19-9 ist dafür bekannt die Adhäsion zirkulierender Tumorzellen zum Endothel zu verstärken und an der hämatogenen Metastasierung beteiligt zu sein, womit sein Nachweis mit dem verringerten PFS und OS in Zusammenhang gebracht werden kann [70, 71].

Bei der Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gilt es mehrere Punkte zu berücksichtigen. Aufgrund der geringen Detektionsrate für CTCs von 10% erwies sich die 190 Patienten umfassende gesamte Kohorte, trotz einer starken Tendenz, als zu klein um eine statistische Signifikanz hinsichtlich der Relevanz des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen für das Gesamtüberleben zu erreichen. Untergruppenanalysen konnten ebenfalls aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt werden. Da alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten in nur einer großen chirurgischen Klinik behandelt wurden, können eventuell Unterschiede sowohl bezüglich der Patientenauswahl als auch ihrer Einstufung als kurativ operierbar im Vergleich zu Studien an kleineren Kliniken vorliegen. Von den ursprünglich 190 Patienten waren mit 31 (16,3%) relativ viele dem Follow up verloren gegangen. Ebenfalls relativ hoch ist im Vergleich zu vorigen Studien die Anzahl von 53 (27,8%) zunächst mit kurativer Absicht operierter Patienten bei welchen während der explorativen Laparotomie ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung festgestellt wurde. Die Anzahl an mit einem R1 bzw. R2 Status eingestuft Patienten war relativ hoch, da die histopathologische Einteilung gemäß den Vorgaben von Esposito et al. erfolgte [54, 60]. Bei den insgesamt 9 (6,6%) mit kurativer Absicht operierten Patienten welche dem M1 Stadium zugeordnet wurden, geschah dies aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Studie Patienten mit positiv getesteten Interaortokavalen Lymphknoten als M1 positiv eingestuft wurden [60].

4.4 Die Rolle zirkulierender Tumorzellen

Die Vermutung zirkulierende Tumorzellen könnten an der Entstehung von Metastasen beteiligt sein wurde bereits vor ca. 150 Jahren von T.R. Ashworth geäußert [72]. Heute werden CTCs immer häufiger als unabhängige Parameter für die Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle von Patienten mit kolorektalen-, Prostata- und Mamma-Karzinomen sowohl im frühen als auch fortgeschrittenen Erkrankungsstadium verwendet [47, 55, 73-75]. Unser Wissen über die CTCs hat in den letzten 20 Jahren stark zugenommen, allerdings bleiben viele Fragen wie die individuellen Fähigkeiten zirkulierender Tumorzellen und ihre genaue Rolle bei der Entwicklung des Tumors und der Entstehung von Metastasen weiterhin offen [73, 74, 76]. Auch hinsichtlich der

Korrelation ihres präoperativen Nachweises mit der Prognose für den Patienten gibt es noch viel Forschungsbedarf. Es konnte anhand von Mamma-Karzinomen gezeigt werden, dass bei weitem nicht alle zirkulierenden Tumorzellen in der Lage sind Metastasen zu bilden [77]. In der Tat scheint die Bildung von Metastasen ein sehr ineffektiver Vorgang zu sein. Nach aktuellem Wissensstand werden die meisten CTCs bereits in der Blutbahn zerstört, lange bevor es zu ihrer Extravaskularisation aus dem Gefäßsystem und der Adaptation im neuen Gewebe kommt [78-80].

4.5 Ausblick

Es konnte in der Vergangenheit bereits mit Hilfe von großen multizentrischen Untersuchungen gezeigt werden, dass bei fortgeschrittenen kolorektalen-, Prostata- und Mammakarzinomen ein Zusammenhang zwischen der Detektion zirkulierender Tumorzellen und einer schlechteren Prognose sowohl für das Progressionsfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben besteht [50, 81-83]. Wie in Kapitel 4.4 erwähnt bleiben jedoch weiterhin viele Fragen bezüglich disseminierter Tumorzellen offen. In Zukunft sollte in großen multizentrischen Studien mit standardisierten Untersuchungsmethoden die genaue Rolle der CTCs bei Pankreaskarzinomen weiter untersucht werden. Das Hauptziel ist dabei momentan herauszufinden welche zirkulierenden Tumorzellen tatsächlich Metastasen bilden können und damit den größten Einfluss auf die Tumorentwicklung und Prognose haben. Dabei kann das Veridex CellSearch System aufgrund des standardisierten Verfahrens von großem Nutzen sein. Es sollte zudem bedacht die Entwicklung anderer Verfahren mit ähnlicher Sensitivität und Spezifität zur qualitativen und quantitativen Messung zirkulierender Tumorzellen berücksichtigt werden [84]. Weitere Studien könnten sich damit befassen, das Verfahren mit der größten Genauigkeit hinsichtlich der Detektion und Zählung zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Mit 16.451 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2012 gehören Pankreaskarzinome bei uns zu den häufigeren Krebsarten. Es ist jedoch vor allem die sehr hohe Letalität und geringe 5-Jahre-Überlebensrate welche diese Erkrankung zu einem großen gesundheitlichen Problem in den westlichen Industrienationen macht. Weltweit erkranken ca. 340 000 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs. Damit befinden sich Pankreaskarzinome an der zwölften Stelle unter den häufigsten Krebsarten, gleichzeitig sind sie in der Krebstodesdiagnostik jedoch an siebter Stelle. In Europa war Bauchspeicheldrüsenkrebs 2012 mit ca. 104.000 Neuerkrankungen im Jahr an 8.er Stelle der häufigsten Krebsarten. Zudem steigen die absoluten Fallzahlen aufgrund einer immer älter werdenden Bevölkerung stetig an.

Wie bei den meisten anderen soliden Tumorarten ist die Mehrheit der Todesfälle auf die Metastasierung des Primärtumors zurückzuführen. Die Pathogenese der Pankreaskarzinome ist noch nicht vollständig geklärt und zur Zeit Gegenstand der Forschung. Paradoxerweise ist dabei vor allem der Vorgang der Metastasierung noch relativ unbekannt. Seit längerem bekannt ist allerdings, dass an der Entstehung der Metastasen sogenannte zirkulierende Tumorzellen (CTCs) beteiligt sind, welche dem Primärtumor entstammen. Es konnte bereits bei fortgeschrittenen kolorektalen-, Prostata- und Mammakarzinomen nachgewiesen werden, dass ein Auftreten solcher zirkulierenden Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose zusammenhängt. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel mit Hilfe eines quantitativen und qualitativen präoperativen Nachweises von CTCs im Blut der Patienten die prognostische Relevanz von CTCs bei Patienten mit Pankreaskarzinomen zu prüfen.

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 190 Patienten, bei denen ein Verdacht auf ein Pankreaskarzinom vorlag, prospektiv aufgenommen. In 137 Fällen wurde zwischen Oktober 2009 und Oktober 2012 aufgrund eines duktales Adenokarzinoms in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg mit kurativer Absicht operiert. 53 Patienten wurden bei erst intraoperativ diagnostiziertem fortgeschrittenem Krankheitsstadium palliativ behandelt.

Jedem Patienten wurde unmittelbar vor dem Eingriff aus dem zentralvenösen Blutkompartiment eine Blutprobe von 7,5ml entnommen und mit Hilfe des Veridex CellSearch Systems auf zirkulierende Tumorzellen untersucht. Die Patienten wurden im Schnitt über einen Zeitraum von 28 Monaten hinsichtlich sowohl eines allgemeinen Überlebens (OS) als auch eines progressionsfreien Überlebens (PFS) beobachtet.

Mit der Tumorzelldetektion zusammenhängende Parameter wurden jeweils für die gesamte Kohorte, die kurative Gruppe von 137 Patienten und die palliative Gruppe von 53 Patienten mit univariaten und multivariaten Analysen ausgewertet. Die Ergebnisse der multivariaten Analysen zeigten, dass sowohl ein fortgeschrittenes UICC Stadium von III und IV als auch ein erhöhter präoperativ gemessener Wert des Tumormarkers CA19-9 von statistischer Signifikanz für das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben in der gesamten Kohorte und auch in der kurativen Gruppe war. Patienten der gesamten Kohorte und der kurativen Gruppe bei welchen präoperativ intakte zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen wurden wiesen ein deutlich verringertes progressionsfreies Überleben (PFS) auf. Für das Gesamtüberleben wurde die statistische Signifikanz nicht erreicht. In der palliativen Gruppe konnte in der vorliegenden Studie weder für das progressionsfreie Überleben, noch für das Gesamtüberleben ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem präoperativen Nachweis zirkulierender Tumorzellen festgestellt werden. Allerdings sollte dabei die geringe Ereignismenge in dieser Gruppe berücksichtigt werden.

Zusammenfassend konnte zum ersten Mal in einer großen prospektiven Kohorte von Patienten mit potenziell kurativ resektablen Pankreaskarzinomen mit einer standardisierten qualitativen und quantitativen Nachweismethode ein Zusammenhang zwischen der präoperativen Detektion zirkulierender Tumorzellen und einem verringerten Progressionsfreien Überleben nachgewiesen werden. Zudem konnte bei diesen auf CTCs positiv getesteten Patienten eine starke Tendenz zum schlechteren Gesamtüberleben festgestellt werden. Zukünftige Studien an großen Patientenkollektiven sind notwendig um die beste Methode zur quantitativen und qualitativen Analyse zirkulierender Tumorzellen von Pankreaskarzinomen herauszufinden, die Biologie dieser CTCs weiter zu erforschen, ihre relevantesten Untergruppen herauszufinden und unsere Ergebnisse in großangelegten multizentrischen Studien zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
2. *Pancreatic cancer - UK incidence statistics*. 2013, Office for National Statistics.
3. Michaud DS, *Epidemiology of pancreatic cancer*. *Minerva Chir*, 2004 Apr. 59(2): 99-111.
4. Kaatsch, et al., *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 2017, Robert-Koch-Institut
5. Weg-Remers, *Bauchspeicheldrüsenkrebs – Krebsinformationsdienst*. 2014, Deutsches Krebsforschungszentrum
6. Lowenfels AB, Maisonneuve P, *Epidemiology and prevention of pancreatic cancer*. *Japanese journal of clinical oncology*, 2004 May, 34(5):238-44.
7. Schneider R, et al, *Das Lynch-Syndrom – Epidemiologie, Klinik, Genetik, Screening, Therapie*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2012; 50: 217-225.
8. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA, *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes & Development*, 2006 May; 20:1218-1249.
9. Stewart BW, Wild CP, *World Cancer Report 2014*. World Health Organization. 2014, 5(7).
10. Zamora C, et al. *Intraductal papillary or mucinous tumors (IPMT) of the pancreas: report of a case series and review of the literature*. *The American journal of gastroenterology*, 2001 May; 96(5):1441-7.
11. Hruban RH, Bishop Pitman M, Klimstra DS, *Atlas of tumor pathology: Tumors of the pancreas. Fourth series*, ARP Press, Washington, DC, 2006.
12. Klöppel G, et al. *Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas*. Springer; 2nd edition, April 1998.
13. Klöppel G, *Tumoren des endokrinen Pankreas*. *Der Pathologe*, July 2003, Volume 24, Issue 4, pp 265-271.
14. Jensen RT, Norton JA, *Endocrine tumors of the pancreas and gastrointestinal tract*. In: Feldman M, et al. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 9th ed Philadelphia, 2010: chap 32.
15. Hruban RH, et al. *Progression model for pancreatic cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2000a, 6: 2969-2972.
16. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ, *Increasing complexity of Ras signaling*. *Oncogene*, September 1998, 17: 1395-1413.
17. Yamano M, Fujii H, Takagaki T, et al. *Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma*. *The American journal of pathology*, Juny 2000, 156: 2123-2133.
18. Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Måsbäck A, Westerdahl J, Olsson H, Ingvar C, *High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2 August 2000: 92 (15):1260-1266.
19. Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA, *p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis*. *Cell*, 14 Mai 1999, 97: 527-538.
20. Liu F, *SMAD4/DPC4 and pancreatic cancer survival. Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin. Cancer Res., 7:*

- 4115-4121, 2001. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, Dezember 2001, 7(12): 3853-3856.
21. Orelli BJ, Bishop DK, *BRCA2 and homologous recombination*. Breast Cancer Research: BCR, July 2001, 3(5): 294-298.
 22. Hamann U, *Brustkrebs – Sind es die Gene oder die Umwelt?* Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, September 2003
 23. Dragovich T, Harris JE, Erickson RA, Larson CR, *Pancreatic Cancer – Practice Essentials*. Medscape; Verfügbar unter: <http://emedicine.medscape.com/article/280605-overview> Zugriff am 22. Juni 2014
 24. Maitra A, Hruban RH, *Pancreatic Cancer*. Annu Rev Pathol, Februar 2008; 3: 157-188.
 25. Yao JC, Eisner MP, Leary C, Dagohoy C, Phan A, Rashid A, Hassan M, Evans DB, *Population-Based Study of Islet Cell Carcinoma*. Annals of Surgical Oncology, Dezember 2007; 14(12): 3492-3500.
 26. Klein CA, *Cancer. The metastasis cascade*. Science 321 (5897): 1785-1787.
 27. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA, *Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression*. Oncogene, 7 November 2013, 32 (45): 10. 1038/onc.2013.29.
 28. Hanahan D, Weinberg RA, *The hallmarks of cancer*. Cell, 7 Januar 2000, 100 (1): 57-70.
 29. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition*. 2009
 30. Kondo S, *Japanese Pancreas Society Staging Systems for Pancreatic Cancer*, Pancreatic Cancer, 2010: 1035-1050.
 31. Maria L Rossi, Azeem A Rehman, Christopher S Gondi, *Therapeutic options for the management of pancreatic cancer*. World J Gastroenterol. 28 August 2014, 20(32): 11142-11159.
 32. *Pancreatic cancer*, American Cancer Society, Verfügbar unter: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003131-pdf.pdf> Zugriff am 10. September 2014
 33. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW, *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*, The British journal of surgery, Mai 2004, 91(5): 586-94.
 34. Kim HJ, Czischke K, Brennan MF, Conlon KC. *Does neoadjuvant chemoradiation downstage locally advanced pancreatic cancer?* Journal of gastrointestinal surgery, September-Oktober 2002, 6(5):763-769.
 35. Jinkins LJ, Parmar AD, Han Y, Duncan CB, Sheffield KM, Brown KM, Riall TS, *Current trends in preoperative biliary stenting in patients with pancreatic cancer*. Surgery. August 2013; 154:179-189.
 36. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL et al. *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. The New England journal of medicine, 12 Mai 2011, 364 (19): 1817-1825.
 37. [Autoren unbekannt] *Treatment of locally unresectable carcinoma of the pancreas: comparison of combined-modality therapy (chemotherapy plus radiotherapy) to chemotherapy alone*. Gastrointestinal Tumor Study Group, Journal of the National Cancer Institute, 20 July 1988,80 (10): 751-755.
 38. Loehrer PJ, Feng Y, Cardenas H, Wagner L, Brell JM, Cella D, Flynn P, Ramanathan RK, Crane CH, Alberts SR, et al. *Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients*

- with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial.* Journal of Clinical Oncology, 1 November 2011, 29 (31): 4105-4112.
39. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M, *Pancreatic cancer.* Lancet, 13. August 2011, 378 (9791): 607-620.
 40. Lemmens VE, Bosscha K, van der Schelling G, Brenninkmeijer S, Coebergh JW, de Hingh IH, *Improving outcome for patients with pancreatic cancer through centralization.* The British journal of surgery, Oktober 2011, 98: 1455-1462.
 41. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH, *Recent progress in Pancreatic Cancer,* CA Cancer J Clin, September 2013, 63 (5): 318-348.
 42. Schellenberg D, Quon A, Minn AY, et al. *¹⁸Fluorodeoxyglucose PET is prognostic of progression-free and overall survival in locally advanced pancreas cancer treated with stereotactic radiotherapy.* International journal of radiation oncology, biology, physics, 1 August 2010, 77 (5): 1420-1425.
 43. *Leben mit Krebs – Medikamente und Möglichkeiten,* Deutsches Krebsforschungszentrum Krebsinformationsdienst, Verfügbar unter: <http://www.krebsinformationsdienst.de/leben/schmerzen/schmerzen-behandlung-durchfuehrung.php> Zugriff am 29. September 2014
 44. Wong GY, Schroeder DR, Carns PE, Wilson JL, Martin DP, Kinney MO, Mantilla CB, Warner DO, *Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial.* JAMA, 3. März 2004, 291 (9): 1092-1099.
 45. Chakraborty S, Baine MJ, Sasson AR, Batra SK, *Current Status of Molecular Markers for Early Detection of Sporadic Pancreatic Cancer.* Biochim Biophys Acta, Januar 2011, 1815 (1): 44-64.
 46. Hermanek P, *Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems.* Anticancer research, Juli – August 1999; 19 (4A): 2771-2774.
 47. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K, *Clinical relevance and biology of circulating tumor cells.* Breast Cancer Res. 2011; 13 (6): 228.
 48. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B, *Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.* Nature reviews. Cancer, Mai 2008; 8 (5): 329–340.
 49. *CellSearch – Circulating Tumor Cell Test.* Janssen Diagnostics LLC, Verfügbar unter: <https://www.cellsearchctc.com> Zugriff am 30. September 2014.
 50. Cristofanilli M, Budd TG, Ellis MJ, et al. *Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer.* The New England Journal of Medicine, 19 August 2004; 351: 781–791.
 51. Weitz J, Rahbari NN, Koch M, Büchler MW: *The “artery first” approach for resection of pancreatic head cancer.* J Am Coll Surg. 2010, 210 (2): e1-4-
 52. Jr W, Kienle P, Schmidt J, Friess H, Büchler MW: *Portal vein resection for advanced pancreatic head cancer.* J Am Coll Surg. 2007, 204 (4): 712-716. 10.1016/j.jamcollsurg.2007.01.004.
 53. AJCC: *AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition..* 7th edition. 2010.
 54. Esposito I, Kleeff J, Bergmann F, Reiser C, Herpel E, Friess H, et al. *Most pancreatic cancer resections are R1 resections.* Ann Surg Oncol. 2008 Jun, 15(6): 1651-60.
 55. Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. *Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study.* Br J Cancer [Internet]. Verfügbar unter:

<http://www.nature.com/bjc/journal/vaop/ncurrent/abs/bjc201588a.html> Zugriff am 17. August 2016.

56. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. Clin Cancer Res. 2004 Oct15;10(20):6897-904.
57. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. Clin Cancer Res, 2007. 13(3): p. 920-8.
58. Kenward MG, Carpenter J. *Multiple imputation: current perspectives*. Stat Methods Med Res. 2007 Jun;16(3):199-218.
59. Sterne JAC, White IR, Carlin JB, Spratt M, Royston P, Kenward MG, et al. *Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: potential and pitfalls*. BMJ. 2009;338:b2393.
60. Bork U, Kasenda B, Schölch S, Hackert T, Welsch T, et al. *Circulating Tumor Cells and Outcome in Resectable Pancreatic Cancer: A Prospective Study*. Veröffentlichung in preparation.
61. Balzar M, et al. *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. J Mol Med (Berl), 1999. 77(10): p. 699-712.
62. Fong D, Seeber A, Terracciano L, Kasal A, Mazzoleni G, Lehne F, et al. *Expression of EpCAM(MF) and EpCAM(MT) variants in human carcinomas*. J Clin Pathol. 2014 May;67(5):408-14.
63. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. *Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition*. BMC Cancer. 2012;12: p. 178.
64. Kurihara T, Itoi T, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Tsuji S, et al. *Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result*. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2008;15(2):189-95.
65. Hirooka S, Yanagimoto H, Satoi S, Yamamoto T, Toyokawa H, Yamaki S, et al. *The role of circulating dendritic cells in patients with unresectable pancreatic cancer*. Anticancer Res. 2011 Nov;31(11):3827-34.
66. Khoja L, Backen A, Sloane R, Menasce L, Ryder D, Krebs M, et al. *A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker*. Br J Cancer. 2012 Jan 31;106(3):508-16.
67. Bidard FC, Huguet F, Louvet C, Mineur L, Bouché O, Chibaudel B, et al. *Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial*. Ann Oncol. 2013 Aug;24(8):2057-61.
68. Han L, Chen W, Zhao Q. *Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis*. Tumor Biol. 2014 Mar 1;35(3):2473-80.
69. Yakabe T, et al., *Clinical significance of CEA and CA 19-9 in postoperative follow-up of colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2010. 17(9): p. 2349-56.
70. Dabelsteen E, *Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas*. J Pathol, 1996. 179(4): p. 358-69.
71. Kawamura Y.J., et al. *Colorectal carcinoma with extremely low CA 19-9*. Gastroenterol Res Pract, 2009. 2009: p. 780263.
72. Ashworth TR, *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. Aust Med J, 1869. 14: p. 146-7.

73. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. *Circulating tumor cells and circulating tumor DNA*. Annu Rev Med. 2012;63: p. 199-215.
74. Bork U, Grützmann R, Rahbari NN, Schölch S, Distler M, Reissfelder C, et al. *Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer*. World J Gastroenterol. 2014 Aug 14;20(30): 10296-304.
75. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, et al. *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. Lancet Oncol. 2012 Jul;13(7):688-95.
76. Steinert G, Schölch S, Niemiets T, Iwata N, García SA, Behrens B, et al. *Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer*. Cancer Res. 2014 Mar 15;74(6):1694-704.
77. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. *Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay*. Nat Biotechnol. 2013 Jun;31(6): p. 539-44.
78. Fidler IJ, *Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine*. J Natl Cancer Inst, 1970. 45(4): p. 773-82.
79. Weiss L, *Metastatic inefficiency*. Adv Cancer Res, 1990. 54: p. 159-211.
80. Fidler IJ, *7th Jan Waldenstrom Lecture. The biology of human cancer metastasis*. Acta Oncol, 1991. 30(6): p. 668-75.
81. Moreno JG, et al. *Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer*. Urology, 2005. 65(4): p.713-8.
82. Cohen SJ, et al. *Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2006. 6(2): p. 125-32.
83. Wind J, et al. *Circulating tumour cells during laparoscopic and open surgery for primary colonic cancer in portal and peripheral blood*. Eur J Surg Oncol, 2009. 35(9): p. 942-50.
84. Nagrath S, et al. *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, 2007. 450(7173): p. 1235-9.

7 Eigene Publikation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung im folgenden Artikel :

Bork U, Kasenda B, Schölch S, Hackert T, Welsch T, Kahlert C, Hinz U, Nitschke P, Seibold W, Reissfelder C, Büchler MW, Weitz J & Rahbari NN. Circulating Tumor Cells and Outcome in Resectable Pancreatic Cancer: A Prospective Study

8 Lebenslauf

8.1 Personalien

Name und Vorname: Seibold, Wladislav
Geburtsdatum: 01.11.1984
Geburtsort: Nowosibirsk (Russland)
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Wohnanschrift: Geroldsauer Str. 135
76534 Baden-Baden
Eltern: Stanislaw Seibold, Bautechniker
Tatjana Seibold, technische Zeichnerin

8.2 Schulischer Werdegang

Schulausbildung: 09/90 – 10/95 Allgemeinbildende Schule Nowosibirsk (Russland)
11/95 – 07/96 Grundschule Illingen (Saarland)
09/96 – 07/97 Realschule Illingen (Saarland)
09/97 – 07/05 Gymnasium Pforzheim (Baden-Württemberg)
Abschluss: Abitur

8.3 Ausbildung & Studium

Ausbildung: 09/05 – 12/05 Ausbildung zum Rettungssanitäter in der
Rettungsassistentenschule des ASB in Mannheim, mit anschließender
Tätigkeit als
Rettungssanitäter im Rahmen des FSJ bis zum 08/06
Studium: 10/06 – 12/11 Studium der Zahnmedizin an der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Approbation: 23. Januar 2012

8.4 Arbeit

Arbeit: 04/12 – 11/14 Ausbildungs/Entlastungsassistent in einer Praxis für Allgemeine Zahnheilkunde in Pforzheim (Baden-Württemberg)
12/14 – 12/16 angestellter Zahnarzt in einer Praxis für Allgemeine Zahnheilkunde in Baden-Baden (Baden-Württemberg)
Ab 01/17 angestellter Zahnarzt in einer Praxis für Allgemeine Zahnheilkunde in Karlsbad (Baden-Württemberg)

8.5 Größere Fortbildungen

Fortbildungen: 07/14 – 05/15 Curriculum Implantologie 9+1 der DGOI
06/15 – 11/15 Curriculum Endodontie bei TEC 2 in Zusammenarbeit mit der University Pennsylvania
03/16 – 11/16 Aufbaufortbildung Next Level Endo bei TEC 2 in Zusammenarbeit mit der University Pennsylvania inkl. eines 3 tägigen Aufenthaltes an der University Pennsylvania

8.6 Mitgliedschaften

Mitgliedschaften: International Congress of Oral Implantologists, Deutsche Gesellschaft für Orale Implantologie

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med Markus Diener** dafür in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit durchführen zu können.

Bei PD **Dr. med. Ulrich Bork** möchte ich mich ganz herzlich für die gute und geduldige Betreuung dieser Arbeit bedanken. Bei Fragen und Problemen war er immer unterstützend für mich da.

Weiterhin gilt mein Dank dem Ärzteteam der chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg, ohne ihre Arbeit wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor AG Weitz für die freundliche Aufnahme und Hilfe bedanken.

Meinen lieben Eltern und meiner liebevollen Frau, welche immer an mich geglaubt und mich stets unterstützt haben. Meinen Kindern für die Kraft die sie mir geben.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Familie und Freunden für ihren Beistand und aufmunternde Worte.

10 Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema
Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Pankreaskarzinom anhand der Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen im Blut
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift