

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger-

**Prognostische Wertigkeit der CK 20-Detektion mittels RT-PCR als Nachweismethode
für disseminierte Tumorzellen im Blut und Knochenmark beim Pankreaskarzinom:
eine prospektive Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Dieler, Maren

aus Rhede

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt
1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. H. Wolters
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. D. Domagk
Tag der mündlichen Prüfung:	13. November 2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Wolters
Koreferent:

ZUSAMMENFASSUNG

Dieler

Maren

Prognostische Wertigkeit der CK 20-Detektion mittels RT-PCR als Nachweismethode für disseminierte Tumorzellen im Blut und Knochenmark beim Pankreaskarzinom: eine prospektive Studie

Fragestellung: Durch frühzeitige Mikrometastasierung ist die Sterblichkeit am Pankreaskarzinom trotz zunehmender R0-Resektionsraten und sinkender peri-operativer Mortalität unverändert hoch. Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Wertigkeit von CK 20-haltigen Zellen im Blut und Knochenmark herauszustellen und ihre Eignung als unabhängigen Prognosefaktor für das Pankreaskarzinom zu evaluieren. Es soll gezeigt werden, dass der Nachweis von CK 20-haltigen Zellen im Blut oder Knochenmark mit einem höheren Tumorstadium korreliert und einen Indikator für eine schlechtere Prognose darstellt.

Methoden: Bei 33 Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom wurde von 2000 bis Ende 2003 prä-operativ Knochenmark und Blut entnommen, welches anschließend unter standardisierten Bedingungen mittels der auf Reverser Transkriptase beruhender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf Zytokeratin 20 untersucht wurde. Die Patienten wurden über 36 Monate beobachtet und die Überlebenszeiten dokumentiert.

Ergebnisse: Der Nachweis disseminierter Tumorzellen korrelierte weder im Knochenmark noch im Blut signifikant mit dem Tumorstadium. In der vorliegenden Studie ist der Nachweis von Zytokeratin 20-exprimierenden Zellen kein Indikator für eine schlechtere Prognose.

Schlussfolgerung: Die klinische Etablierung dieser Methode als Prognoseindikator kann daher zurzeit nicht empfohlen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2008

Inhaltsverzeichnis

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
II VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN	4
1. Einleitung	6
1.1 Maligne Tumoren	6
1.2 Die Anfänge der Zytologie	7
1.3 Klinische Staging-Methode Knochenmarkpunktion	8
1.4 Stand der Wissenschaft	9
1.5 Prinzip der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	11
1.6 Hypothese und Fragestellung - Ziel der Arbeit.....	12
2. Das Pankreaskarzinom	13
2.1 Epidemiologie.....	13
2.2 Ätiologie.....	13
2.3 Lage des Pankreas im Situs und Lokalisation der Tumoren	14
2.4 Histologie.....	15
2.5 Klassifikation	15
2.5.1 TNM-Klassifikation	15
2.5.2 UICC-Klassifikation - Staging	16
2.6 Diagnostik und Therapie	16
3. Patienten	20
3.1 Patientenkollektiv	20
3.2 Alters- und Geschlechterverteilung zum Zeitpunkt der Probenentnahme	22
3.3 Tumorstadium bei Diagnose.....	22
3.4 Differenzierungsgrad G	23
3.5 Operation, Resektionsrand und zusätzliche Therapie	23
4. Material und Methoden	24
4.1 Materialgewinnung.....	24
4.1.1 Gewinnung von Knochenmark	24
4.1.2 Gewinnung von Blut.....	24
4.2 Aufarbeitung der Proben.....	24
4.2.1 Isolierung von Lymphozyten	27
4.2.2 RNA – Isolierung	28
4.2.3 Reinheitskontrolle der isolierten RNA	30
4.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	30
4.2.5 Nachweis der Amplifikationsprodukte – Gel-Elektrophorese	34
4.3 Statistische Methoden	36
5. Ergebnisse	38
5.1 Prä-operativer Tumorzellnachweis im Blut und Knochenmark.....	38
5.2 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	38
5.3 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	39
5.4 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.....	41
5.5 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit von Therapieplan und Tumorabsetzungsrand	41
5.6 Überlebensraten.....	42
5.6.1 Überlebenszeit nach Kaplan-Meier für beide Geschlechter	42
5.6.2 Überlebenszeit nach Kaplan-Meier für verschiedene Altersklassen.....	42
5.6.3 Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier für die unterschiedlichen Tumorstadien.....	43
5.6.4 Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier nach Blutbefund.....	44
5.6.5 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier nach Knochenmarkbefund	45
5.7 Tumorzellnachweis im Blut und Knochenmark - Prognostische Relevanz.....	46
5.7.1 Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und Blut und dem Tumorstadium nach UICC	46
5.7.2 Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und Blut und der Überlebensrate	47
6. Diskussion.....	49

6.1 Diskussion der Methode	50
6.1.1 Allgemein	50
6.1.2 Speziell	61
6.1.3 Sensitivität und Spezifität.....	64
6.2 Bewertung des Patientenkollektivs	69
6.2.1 Lokalisation des Primärtumors	69
6.2.2 Alter	69
6.2.3 Geschlecht	70
6.2.4 Staging	70
6.2.5 Operation	71
6.2.6 Überlebensrate	74
6.3 Ergebnisse	76
6.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Studie	76
6.3.2 Unterschiede beim Nachweis von CK 20 zwischen Blut und Knochenmark	77
6.3.3 Bewertung der Ergebnisse	78
6.4 Konklusion	85
7. Zusammenfassung	87
8. Literaturverzeichnis	89
9. Anhang	108
9.1 UICC-Stadien (Übersicht)	108
9.2 Vergleichsstudien (Übersicht)	109
10. Lebenslauf	110
11. Danksagung	111

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CK	Zytokeratin
RNA	Ribonuclein Acid (Ribonukleinsäure)
DNA	Desoxyribonuclein Acid (Desoxyribonukleinsäure)
TNM	Tumor-Node-Metastases (Tumor-Lymphknoten-Metastasen)
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)
MRD	Minimal Residual Disease (minimale Resterkrankung)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
UV-Licht	ultraviolettes Licht
CA	Cancer Antigen
TSGF	Tumor-Supplied Growth Factor
hCG	Human Chorionic Gonadotropin (humanes Chorion-Gonadotropin)
PET	Positronen Emissions Tomography
FDG	Fluor-Deoxyglykose
CT	Computer Tomography
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatiko-Graphie
JÜR	Jahres-Überlebensrate
bp	Basenpaare
5FU	5-Fluoruracil
CI	Confidence Interval (Konfidenzintervall)
ESPAC	European Study Group of Pancreatic Cancer
IORT	Intraoperative Radiotherapie

II VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

	Seite
1. Einleitung:	
Abb. 1.1: Grundprinzipien MRD	9
2. Pankreaskarzinom:	
Abb. 2.1: Whipple-Operation	18
3. Patienten	
Tab. 3.1: Alters- und Geschlechtsverteilung	22
Tab. 3.2: UICC-Stadienverteilung	22
Tab. 3.3: Differenzierungsgrad G	23
Tab. 3.4: Durchgeführte Therapie und Tumorabsetzungsråder	23
4. Material und Methoden	
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der nested-PCR	26
Abb. 4.2: Schichtung der Blut- bzw. Knochenmarkbestandteile nach der Dichtegradienten-Zentrifugation	28
Tab. 4.1: Pipettierschema PCR I	32
Tab. 4.2: Inkubationsschema	33
Tab. 4.3: Pipettierschema PCR II	34
5. Ergebnisse	
Tab. 5.1: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	39
Tab. 5.2: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit vom Tumorstadium (UICC)	40
Tab. 5.3: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad G	41
Tab. 5.4: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit von Therapieplan und Tumorabsetzungsrand	41

Tab. 5.5:	Überlebensraten in Abhängigkeit vom Blutbefund	44
Tab. 5.6:	Überlebensraten in Abhängigkeit vom Knochenmarkbefund	45
Tab. 5.7:	Abhängigkeit zwischen CK 20-Nachweis und Tumorstadium	46
Tab. 5.8:	Univariate Analyse zum Faktor Alter	47
Tab. 5.9:	Univariate Analyse zum Faktor Knochenmarkbefund	47
Tab. 5.10:	Univariate Analyse zum Faktor Blutbefund	47
Tab. 5.11:	Multivariate Analyse zum Vergleich der verschiedenen Faktoren	48
Abb. 5.1:	Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier für die unterschiedlichen Tumorstadien	43
Abb. 5.2:	Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier nach Blutbefund	44
Abb. 5.3:	Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier nach Knochenmarkbefund	45
Anhang:		
Tab. 9.1:	Stadieneinteilung Pankreaskarzinom nach UICC (2003)	108
Tab. 9.2:	Übersicht über die CK 20-RT-PCR Vergleichsstudien	109

1. Einleitung

1.1 Maligne Tumoren

Im Jahr 2005 starben laut WHO weltweit 7,6 Millionen Menschen an einem Malignom. Tumoren stellen hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Sie machen 13 % der Todesursachen weltweit aus. Jedes Jahr wird bei rund 11 Millionen Menschen ein Malignom diagnostiziert. Im Jahr 2020 erwartet man 16 Millionen neu diagnostizierte Tumorerkrankungen [WHO 2005]. Für Europa schätzt man, dass im Jahr 2006 etwa 3,2 Millionen Karzinome neu diagnostiziert wurden (53 % bei Männern, 47 % bei Frauen), davon waren etwa 430.000 Mammakarzinome, 413.000 kolorektale Karzinome und 390.000 Lungenkarzinome. Die Zahl neu diagnostizierter Karzinome ist pro Jahr seit 2004 um vermutlich 300.000 angestiegen. Schätzungsweise 1,7 Millionen Menschen sind in Europa im Jahr 2006 an den Folgen ihres Krebsleidens verstorben (56 % Männer, 44 % Frauen). Die häufigste Todesursache war das Lungenkarzinom (335.000), gefolgt vom kolorektalen Karzinom (207.000) und vom Mammakarzinom (132.000) [Ferley 2007].

Trotz großer Fortschritte in der Medizin sind noch immer die wenigsten Karzinome heilbar. Die WHO setzt daher auf Prävention durch Senkung der Risikofaktoren wie Rauchen, ungesunde Ernährung und Exposition gegenüber Karzinogenen und Umweltgiften [WHO 2005]. Die andere einzig sinnvolle Strategie scheint momentan die Früherkennung und adäquate Einschätzung des Stadiums zu sein, um jedem betroffenen Patienten die optimale Therapie zukommen zu lassen. Dazu ist es elementar, die Vorgänge, die zur Tumorentstehung führen, sowie das Verhalten der Tumorzellen genauestens zu kennen und sich zunutze zu machen.

1.2 Die Anfänge der Zytologie

Seit mehr als hundert Jahren suchen Wissenschaftler nach Möglichkeiten, aus einfach zu gewinnendem Probenmaterial Aussagen über die Expansion und das Metastasierungsverhalten der Tumoren machen zu können. Die Untersuchungsmethoden haben sich deutlich weiterentwickelt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts, nämlich 1908, veröffentlichte Königer erstmals seine Beobachtungen. Untersuchungen von Exsudaten aus Pleura- und Peritonealhöhlen zeigten, dass „die zytologischen Befunde bei den verschiedenen Krankheitsprozessen ganz erhebliche Unterschiede zeigen und dass sie unter gewissen Umständen absolut typisch und von pathognomischer Bedeutung sind“. Er legte damit den Grundstein für die Zytologie [Königer 1908]. Die von ihm untersuchten Ergüsse teilte er in serofibrinös tuberkulöse Exsudate, akut infektiöse Exsudate und Endotheliose (hier sind alle nicht infektiösen traumatischen Ergüsse und solche, die aus Neubildungen entstanden sind, zusammengefasst).

Viele Mediziner beschäftigten sich mit den karzinomverdächtigen Zellen in den Ergüssen und kamen überwiegend zu den gleichen Ergebnissen. Jedoch: „...es ist zwar anerkannt, dass der Befund zahlreicher polymorpher, ungleicher Zellen, besonders wenn sie mit Vakuolen versehen sind und in Haufen zusammen liegen, mehr für Krebszellen, als wie für gewöhnliche Endothelzellen spricht, aber die Formverschiedenheit der Endothelzellen bei entzündlichen Prozessen der serösen Häute ist doch oft so mannigfaltig, dass sich häufig diagnostische Zweifel ergeben.“ [Rieder 1895]. Man vertrat die Meinung, dass außer den Endothelzellen und solchen, die dafür gehalten wurden, in den Ergüssen eigentlich andere Zellen, nämlich die Geschwulstzellen, Kennzeichen der Malignome waren. Die Schwierigkeit lag nun also darin, diese Geschwulstzellen eindeutig zu definieren. Königer lenkte die Aufmerksamkeit auf den Kern, welcher als sehr groß bezeichnet wurde und der mindestens eine Vakuole enthält [Königer 1908]. 1919 wurde auf dem 9. nordischen Kongress für Innere Medizin in Kopenhagen noch einmal der Versuch einer Erklärung abgegeben, wonach Malignomzellen besonders große (bis zu 70 µm), dunkler färbbare Zellen mit häufig mehr als einem Zellkern und mehr als einem Kernkörperchen, ebenfalls auffällig groß

(bis 4 µm), sind [Königer 1908]. Insgesamt waren die Arbeiten zu diesem Thema jedoch unbefriedigend und gerieten mehr oder weniger in Vergessenheit.

Im Jahr 1928 veröffentlichte U. Quensel [Quensel 1928] von der Universität Uppsala in Schweden seine Untersuchungsreihe zu „zytologischen Untersuchungen von Ergüssen der Brust- und Bauchhöhlen mit besonderer Berücksichtigung der karzinomatösen Exsudate“. Er konnte atypische Malignomzellen von Endothelzellen bei Entzündungen unterscheiden und bestätigte damit die schon vorher vermuteten Tumorkriterien. Unter den 77 Karzinom-Fällen, deren Diagnosen autoptisch gesichert wurden, und nicht-karzinomatöse Vergleichsproben beschreibt Quensel auch einen Pankreastumor: ein 57-jähriger Mann mit Kachexie und Aszites starb 12 Tage nachdem eine Aszitesprobe genommen wurde. Bei der Sektion wurden außer dem Primärtumor und einigen Lymphknotenmetastasen keine Auffälligkeiten gefunden. Im Peritonealerguss fanden sich keine atypischen Zellen im Sinne eines Malignoms, sondern eine große Ansammlung von Endothelzellen.

1.3 Klinische Staging-Methode Knochenmarkpunktion

Nicht jedes Karzinom bildet ein einfach zu untersuchendes Exsudat. Der Kliniker suchte also nach einer effizienten Methode, mit der Tumorzellen frühzeitig detektiert werden konnten. Dazu gehörten schon damals Blut- und Knochenmarkproben. Das Knochenmark gilt als Ort eines intensiven Zellaustausches zwischen zirkulierendem Blut und mesenchymalem Interstitium. In den 30er Jahren versuchten erstmals Rohr und Hegglin [Rohr und Hegglin 1936] Tumorzellen im Knochenmark anhand morphologischer Strukturen zu identifizieren. Sie hatten 74 Patienten mit bekannten Malignomen (und post mortem autoptischer Diagnosesicherung) sternalpunktiert. In 10 (fünf Bronchuskarzinome, zwei Magenkarzinome, ein Prostatakarzinom und zwei Retotelsarkome) von 12 Fällen mit radiologisch gesichertem Knochenbefall konnten sie einwandfrei maligne Zellen im giemsa-gefärbten Knochenmarkausstrich identifizieren. Pathognomische Kennzeichen waren für sie 1. ungewöhnliche Größe, 2. eigenartige Veränderungen des Kernkörperchens, 3. die Relation Kernkörperchen (Anzahl) zu Kern.

1.4 Stand der Wissenschaft

Der wissenschaftliche und medizinische Progress ermöglicht es heute, in anderen Dimensionen und mit kleineren Zellkompartimenten wie dem Genom und sogar einzelnen Basenpaaren zu arbeiten. Durch differenziertere Untersuchungen des Zellkerns, der ja bereits seit Beginn der zytologischen Onkologie im Mittelpunkt der Forschung steht, ist es gelungen, karzinomatöse Zellen durch bestimmte in der Umgebung atypische Genomsequenzen zu identifizieren. Viele Patienten entwickeln nach einer totalen Tumorresektion zu einem späteren Zeitpunkt Metastasen. Nach dem heutigen Stand der Forschung scheint die Rezidivbildung unter anderem von im Blut und Knochenmark persistierenden, okkulten, malignen Zellen auszugehen, die sich im Rahmen der frühen Metastasierung aus dem Tumorzellverband gelöst haben und nach Invasion von Lymphbahnen oder Blutgefäßen in andere Kompartimente gelangt sind. Man bezeichnet das Auftreten dieser Tumorzellen als „Minimal Residual Disease“ (MRD), also als „Minimale Resterkrankung“.

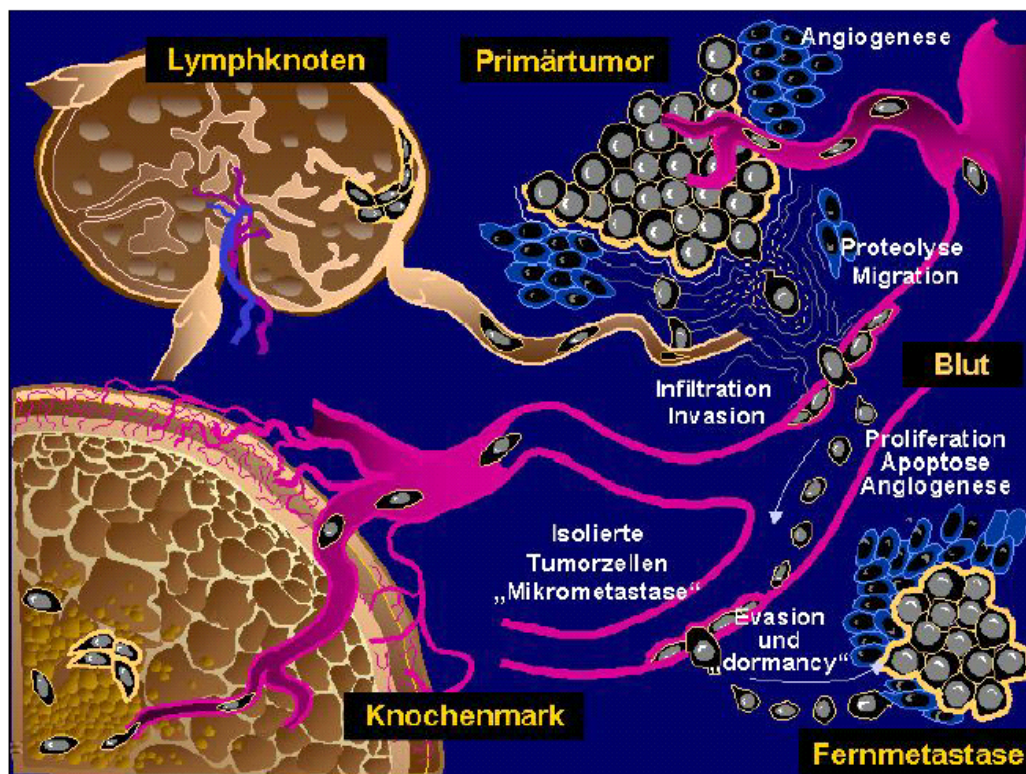


Abb. 1.1: Grundprinzipien der lokalen Tumorprogression und Metastasierung im Sinne einer „minimalen residualen Tumorkrankheit“ [Nekarda 2001]

Man unterscheidet heute (im Blut) zirkulierende von (ins Knochenmark) disseminierten Tumorzellen. Definitionsgemäß muss man weiter zwischen isolierten „disseminierten Tumorzellen“ (ohne umgebende Stromareaktion) oder „Mikrometastasen“ (= Tumorzell-Cluster mit einem Durchmesser > 2 mm und Stromareaktion) differenzieren [Hermanek 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Begriffe jedoch synonym benutzt, da nicht ganz klar ist, ob mit der verwendeten Technik auch Tumorzell-Cluster detektiert werden (siehe Kapitel 6.1.1.2.1).

Da die Mikrometastasierung durch die gängigen diagnostischen Untersuchungstechniken wie Bildgebung und Tumormarker nicht erkennbar ist, sind der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut und Knochenmark sowie deren Bedeutung für die Entwicklung manifester Metastasen seit letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können heute im hämatopoetischen Gewebe zirkulierende Tumorzellen epithelialer Tumoren durch epitheliale Gensequenzen mit extrem hoher Sensitivität detektiert werden. Eine besondere Rolle spielen dabei verschiedene Zytokeratine (CK). Zytokeratine sind Polypeptide, die in epitheliale Gewebe des gastrointestinalen Systems als Intermediärfilamente gewebespezifische Zytoskelettfilamente vereinen und so die Struktur und Stabilität von Epithelzellen aufrechterhalten [Moll 1982; Kirfel 2003]. Die Zusammensetzung der CK-Filamente ist nicht in allen Epithelien identisch, sondern hängt vom Epitheltyp und von dessen Differenzierung ab. Derzeit sind etwa 20 Zytokeratine bekannt. Der Schwerpunkt dieser Studie lag auf dem Zytokeratin 20, welches man mit der Mukosa des Intestinums, dem Urothel sowie den Merkel-Zellen verbindet. Wenn diese Schleimhäute karzinomatös entarten, können Tumorzellen freigesetzt werden, die das CK 20-Gen besitzen [Moll 1992]. Mit geeigneten Maßnahmen (z.B. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)) können diese Zellen aus dem hämatopoetischen Gewebe isoliert werden.

1.5 Prinzip der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Das Prinzip der RT-PCR besteht in der Amplifizierung, also Vervielfältigung, des Tumorzell-Genoms, d.h. eines bestimmten DNA-Abschnittes. Durch die exponentielle Anreicherung können auch kleinste Mengen Tumor-DNA im Untersuchungsmaterial gefunden werden [Schönfeld 1997; Z'graggen 2001].

Die fehlerfreie Replikation doppelsträngiger DNA ist die Voraussetzung für die Zellteilung *in vivo*. Dabei synthetisieren DNA-Polymerasen als Bestandteil einer komplexen Maschinerie an einzelsträngiger DNA als Vorlage den jeweiligen neuen komplementären DNA-Strang. Da dieser Prozess nur bei Desoxyribonukleinsäure durchführbar ist, muss eventuell einsträngige Ribonukleinsäure (wie in dieser Studie) zunächst in die doppelsträngige komplementäre, sogenannte cDNA (complementary DNA) umgewandelt werden. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Im nächsten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen cDNA durch Aufspaltung der Doppelhelix bei starker Hitzeeinwirkung. Die folgende komplementäre Basenanlagerung an die einsträngige DNA geschieht durch die oben erwähnten Polymerasen. Sie benötigen zum Start der Reaktion ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, an der die Synthese des zweiten Stranges beginnen kann, und die vier Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Die „Start“-DNA entsteht, wenn ein kurzes Stück synthetische einzelsträngige DNA (etwa 20 Nukleotide lang, daher auch Oligonukleotid genannt), ein sogenannter Primer, der Reaktion zugesetzt wird. Primer können maschinell mit jeder gewünschten Sequenz hergestellt werden und geben durch ihre Sequenz vor, welcher Gen-Abschnitt vervielfältigt wird. Sie fungieren als Initiationsmoleküle und beginnen die Vervielfältigung nach Anlagerung an die Einzelstrang-DNA (Annealing-Phase) [Gunther 1993]. Die Synthese der DNA erfolgt immer vom 5'-Ende zum 3'-Ende, so dass die Synthese an zwei komplementären DNA-Strängen immer in gegenläufige Richtung abläuft.

Die Amplifikationsprodukte werden durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, hier Ethidiumbromid, in der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht [Bloch 1991]. Auf die Weise ist es möglich, Tumorzellen qualitativ zu identifizieren.

1.6 Hypothese und Fragestellung - Ziel der Arbeit

Die einzige Therapie des Pankreaskarzinoms, die als potentiell kurative Therapie durchgeführt wird, ist bisher die radikale Tumoresektion. Trotz zunehmender R0-Resektionsfrequenzen und deutlich gesunkener perioperativer Mortalität sind die Überlebensraten durch frühzeitige Metastasierung und Rezidivbildung gering. Die Frage nach klinisch praktikablen Methoden zur Identifizierung einer Hochrisikogruppe unter den Pankreaskarzinom-Patienten, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnte, gewinnt, besonders seit Chemo- und Radiotherapeutika an Toxizität verlieren und an Wirkung zunehmen, immer mehr an Bedeutung. Unzählige Bestrebungen, einen sensitiven und spezifischen prognostischen Marker für das Pankreaskarzinom zu finden, schlugen bisher fehl. Für andere Malignome ist der Nachweis disseminierter Tumorzellen, v.a. im Knochenmark, längst zu einem wichtigen Prognosefaktor geworden. Es sollte auch für das Pankreaskarzinom eine einfache, leicht durchführbare Methode gefunden werden, die im klinischen Alltag Ärzten und Patienten hilft, die individuelle Prognose durch eine optimierte Therapie zu verbessern.

Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Bedeutung von CK 20-haltigen Zellen im Blut und Knochenmark herauszustellen und ihre Eignung als unabhängiger Prognosefaktor für das Pankreaskarzinom zu evaluieren. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass der Nachweis von CK 20-haltigen Zellen im Blut oder Knochenmark des Patienten mit einem höheren Tumorstadium korreliert und ein Indikator für eine schlechtere Prognose darstellt. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase nested-Polymerase-Ketten-Reaktion als qualitative Nachweismethode für disseminierte Tumorzellen sollten auch kleinste Mengen (bis zu einer Tumorzelle unter 10^7 Zellen) Tumorzellreste im Blut und Knochenmark detektiert und auf ihre prognostische Aussagekraft geprüft werden.

Die Methode der CK 20-mRNA-Detektion mittels RT-nested-PCR sollte als grundsätzliches Stagingverfahren beim Pankreaskarzinom etabliert werden.

2. Das Pankreaskarzinom

2.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom stellt mit 3 % aller bösartigen Tumoren nach dem Kolon- und dem Magenkarzinom das dritthäufigste Malignom des Verdauungstraktes des Erwachsenen dar. Es ist für etwa 6 % aller Krebstodesfälle verantwortlich und ist die vierthäufigste Krebstodesursache [RKI 2006; Jemal 2007]. Für das Jahr 2007 rechnete man damit, dass 34.000 Patienten in den USA am Pankreaskarzinom versterben und 37.000 neu diagnostiziert werden [Jemal 2007]. Die Inzidenz- und Mortalitätsraten dürften vergleichbar sein mit denen in Westeuropa. Im europäischen Vergleich liegen die Erkrankungsraten in Deutschland für Männer an Platz zehn, für Frauen an Platz fünf [RKI 2006]. Jährlich erkranken etwa je 6000 Männer und Frauen neu in Deutschland [RKI 2006]. Die Inzidenz hat in den letzten 50-60 Jahren in vielen Ländern kontinuierlich zugenommen [RKI 2008] und ist seit einigen Jahren bei 10/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Männer: 12/100.000; Frauen: 8/100.000) relativ stabil [RKI 2008].

Das Pankreaskarzinom tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf, mit einem Häufigkeitsgipfel im 6. Lebensjahrzehnt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68 Jahren, für Frauen bei 75 Jahren. Diagnosen vor dem 45. Lebensjahr sind selten [Böcker 2001; RKI 2008; Winter 2006; Cepeda 2006; Lillemoe 2000].

2.2 Ätiologie

Als gesicherter Risikofaktor für das Pankreaskarzinom gilt bisher nur das Zigarettenrauchen [Howe 1991; Doll 1994; Lin 2002; Bonelli 2003; IARC 1986; RKI 2008]. Nicht sicher geklärt ist, ob Alkoholabusus und die chronische Pankreatitis als Risikofaktoren anzusehen sind [Lowenfels 1993; Dite 2002; Whitcomb 2004] oder ob es sich bei Letzterer um eine Begleitreaktion beim Pankreaskarzinom handelt, die möglicherweise auftritt, bevor das Karzinom klinisch manifest wird [Talamini 2006]. Ebenfalls nicht geklärt ist, ob Diabetes mellitus [Bonelli 2003; Baron 2004; Krechler 2004; Lubinski 2004; Tanaka 2005; Wang 2006; Lin 2002] Ursache oder Symptom

(siehe Kapitel 2.6) eines Pankreaskarzinoms ist. Der übermäßige Verzehr von tierischen Produkten (Fleisch, Fisch, Eier), insbesondere von geräuchertem Fleisch [Larsson 2005; Risch 2003], und die jahrzehntelange regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure [Baron 2004; Jacobs 2004; Schernhammer 2004] werden als weitere prädisponierende Faktoren diskutiert, haben aber eine geringere Bedeutung. Wegen großer geographischer und ethnischer Inzidenzunterschiede wird aufgrund epidemiologischer Studien auch eine genetische Abhängigkeit diskutiert [Lin 2002; Whitcomb 2004]. Es werden das K-ras-Onkogen und einige Tumorsuppressorgene (p53, BRCA2) für das Auftreten von Pankreaskarzinomen verantwortlich gemacht [Lubinski 2004; Mu 2004; Tanaka 2005]. Ebenso von einem erhöhten Erkrankungsrisiko für dieses Karzinom geht man bei Patienten aus, deren Familien durch sogenannte hereditäre familiäre Tumor-Prädispositionssyndrome belastet sind. Hierzu zählen die familiäre chronische Pankreatitis, das Peutz-Jeghers-Syndrom, das FAMMM-Syndrom (familial atypical multiple mole melanoma-syndrome) oder das melanoma-pancreatic cancer syndrome, HIBC (hereditary ovarian breast cancer) und HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome). Es wird darüber diskutiert, diesen Patienten großzügigere Vorsorgeuntersuchungen oder sogar die präventive Pankreatektomie zu empfehlen [Rieder 2004]. Da jedoch nur 1,1-3,5 % aller Pankreaskarzinome familiär verursacht sind [Bartsch 2004], ist dieses Risiko insgesamt als vernachlässigbar gering anzusehen.

2.3 Lage des Pankreas im Situs und Lokalisation der Tumoren

Das Pankreas, eine gemischt exokrine und endokrine Drüse, liegt im Retroperitoneum, ist etwa 13-18 cm lang, wiegt etwa 80 g und erstreckt sich leicht s-förmig von der Konkavität des Duodenums nach links aufsteigend bis zur Milz. Dem im duodenalen C eingebetteten Kopf (Caput) folgt der Körper (Corpus), der schließlich in den Schwanz (Cauda) übergeht [Schiebler 1999].

Die Tumoren des Pankreas können unterschiedlich lokalisiert sein. Sie finden sich zu 70 % im Pankreaskopf, zu 20 % im Pankreaskörper und zu 10 % im Pankreasschwanzbereich. Etwa 10 % der Tumoren folgen nicht dieser Einteilung und befinden sich im gesamten Pankreas. Tumoren des Processus uncinatus werden zu den Pankreaskopftumoren subsumiert [Böcker 2001].

2.4 Histologie

Tumoren des Pankreas können von exokrinen oder von endokrinen Zellen ausgehen. Das Pankreaskarzinom, um das es in dieser Arbeit geht, ist ein Karzinom des exokrinen Pankreas. Am häufigsten sind die Adenokarzinome vom duktalem Typ (80-85 %), die ausgehen vom Epithel der kleinen Pankreasgänge. Mit seinen Varianten (muzinöses nichtzystisches Karzinom, Siegelringzellkarzinom, adenosquamatöses Karzinom und undifferenziertes Karzinom) bildet das Adenokarzinom einen Anteil von über 90 %. Die restlichen 10 % gehen vom Drüsenepithel aus (azinäres Karzinom). Beide Karzinomtypen zeichnen sich durch eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung [Böcker 2001].

2.5 Klassifikation

2.5.1 TNM-Klassifikation

Zur Charakterisierung des Progressions- bzw. Metastasierungsrisikos von Pankreaskarzinomen werden bisher das primäre/lokale Ausmaß der Erkrankung (T-Stadium), der Lymphknotenstatus (N-Stadium) und die Fernmetastasierung (M-Stadium) nach einem Modell der internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer, UICC) herangezogen. Die folgende Aufstellung gibt einen genauen Überblick über die Einteilung [TNM Klassifikation 2005]:

T - Tumor = Beurteilung des Primärtumor

TX Primärtumor nicht beurteilbar

T0 kein Anhalt für Primärtumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor beschränkt auf das Pankreas, Durchmesser 2 cm oder weniger

T2 Tumor beschränkt auf das Pankreas, Durchmesser größer als 2 cm

T3 Tumor erstreckt sich direkt ins Duodenum, Ductus choledochus oder peripankreatisches Gewebe

T4 Tumor erstreckt sich direkt in Magen, Milz, Kolon oder benachbarte große Gefäße

N - Noduli = Beurteilung der regionalen Lymphknoten

- NX regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
- N0 keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- N1 regionale Lymphknotenmetastasen
- N1a Metastase in einem einzelnen Lymphknoten
- N1b Metastasen in multiplen Lymphknoten

M- Metastasen = Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen nicht beurteilbar
- M0 keine Fernmetastasen nachweisbar
- M1 nachweisbare Fernmetastasen vorhanden

2.5.2 UICC-Klassifikation - Staging

Das Staging durch die UICC richtet sich nach der TNM-Klassifikation und stellt eine zusammengefaßte Übersicht über die Tumorausbreitung dar (siehe Anhang, Tabelle 9.1) [TNM Klassifikation 2005].

2.6 Diagnostik und Therapie

Frühsymptome sind selten und uncharakteristisch und leiten sich aus der Lokalisation der Tumoren ab. Die meisten Pankreaskarzinome (vor allem die Korpus- und Kaudakarzinome) werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Das Hauptsymptom des manifesten Pankreaskarzinoms ist der Gewichtsverlust (85-100 %), ein sehr unspezifisches Symptom. Bei Karzinomen im Kopfbereich des Pankreas kann frühzeitig ein Ikterus (häufig assoziiert mit Steatorrhö und Pruritus) als Leitsymptom auftreten (60-80 %), wenn der Tumor zur Okklusion eines Gallengangs führt (Courvoisier-Zeichen positiv). Ein weiteres unspezifisches Symptom ist der Schmerz (75-80 %), lokalisiert im Epigastrium oder im kaudalen Rückenbereich und zunehmend beim Essen oder im flachen Liegen [Böcker 2001; Porta 2005; Tanaka 2005; Freelove 2006]. Die Symptome entstehen also primär durch die lokale Massenzunahme oder durch Metastasen und nicht durch eine Störung der exokrinen oder endokrinen

Pankreasfunktionen. Dennoch kann auch ein neu aufgetretener Diabetes Mellitus erstes Symptom eines Pankreaskarzinoms sein [Hollerbach 2001; Krechler 2004; Tanaka 2005; Wang 2006]. Tumormarker (Cancer Antigene (CA) 19-9, 50, 72-4, 242, TSGF und human Chorionic Gonadotropin (beta-hCG)), einzeln oder in Kombination, können bei der postoperativen Verlaufskontrolle hilfreich sein [Hoffmann 2007] und werden sogar als geeignetes Mittel zum Staging oder zur Früherkennung deklariert [Jiang 2004]. Ein optimales Screening-Verfahren zur Erkennung von möglicherweise heilbaren Frühformen steht jedoch nicht zur Verfügung.

Das wichtigste diagnostische Verfahren ist die Positronen Emissions Tomography (PET) mit ¹⁸F-Fluor-Deoxyglykose (FDG), die heute in Kombination mit der konventionellen CT (PET-CT) eine genaue anatomische Lokalisation maligner Herde (Primärtumor oder Metastasen) im Körper möglich macht [Heinrich 2006; Ruf 2005]. Durch die neue Technik des PET-CT verliert die weniger sensitive Magnetresonanztomographie (MRT) immer mehr an Bedeutung und ist heute keine essentielle, sondern nur eine zusätzliche Untersuchungsmethode. Obwohl laut Gangi die Frühdiagnose des Pankreaskarzinoms im CT vor der klinischen Manifestation möglich ist [Gangi 2004], bleibt der Nachweis metastasierter Lymphknoten oder eines kleinen Primärtumors mit dieser Methode doch eher zweifelhaft [Pakzad 2006; Shiratori 2006]. Bei negativem CT-Befund eines klinischen Verdachts auf einen malignen Prozess im Pankreas oder zur weiteren Evaluierung (Klärung der Tumorentität, Therapieplanung) sollte daher eine endoskopische Ultrasonographie durchgeführt werden, deren Aussagekraft durch eine ultraschallgesteuerte Feinnadelaspiration/-biopsie [Heinrich 2006; Turi 2006; Shiratori 2006] oder heute eher durch die endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) deutlich gesteigert werden kann [Heinrich 2006; Shiratori 2006]. Die ERCP bietet sich außerdem dann an, wenn eine Stentimplantation im Bereich der galleabführenden Wege eine mögliche palliative Therapieoption darstellt [Heinrich 2006].

Bei einem möglicherweise kurativen Therapieansatz durch die radikale Tumoresektion sollte unverzüglich eine diagnostische/explorative Laparatomie durchgeführt werden, während der die Diagnose durch eine Schnellschnittuntersuchung gesichert wird. Der

Tumor kann dann gegebenenfalls in der gleichen Sitzung reseziert werden. Allerdings weisen nur 10-30 % der Patienten einen potentiell kurativ resektablen Tumor auf [Böcker 2001; RKI 2008]. Diese Patienten haben nach der radikalen chirurgischen Tumorexstirpation laut Literatur immerhin eine 5-JÜR von ca. 10-30 %, mit einer medianen Überlebenszeit von 15-25 Monaten [Christein 2005; Cleary 2004; Sohn 2000; Ridwelski 2005; Han 2006; Riall 2006]. Standard ist heute die Whipple'sche Operation (SW) oder eine Operation nach Traverso-Longmire mit Pyloruserhalt (PPPD) [Traverso 1978 und 1980]. Beiden gemeinsam ist die En-bloc-Resektion des Pankreaskopfes bzw. des vom Tumor befallenen Teiles sowie die radikale Entfernung des distalen Magens, des Duodenums, der Gallenblase mit distalem Ductus choledochus und den benachbarten Lymphknotenstationen. Die Rekonstruktion erfolgt über verschiedene Anastomosen, deren Komplikationsrate durch Anastomoseninsuffizienz durch den Einsatz von mikrochirurgischen Operationstechniken deutlich erniedrigt werden konnte. Dadurch ist die perioperative Mortalitätsrate über die letzten Jahrzehnte entschieden gesunken [Riall 2006].

Nachfolgend finden sich Abbildungen, die den Situs vor und nach einer Whipple-Operation darstellen.

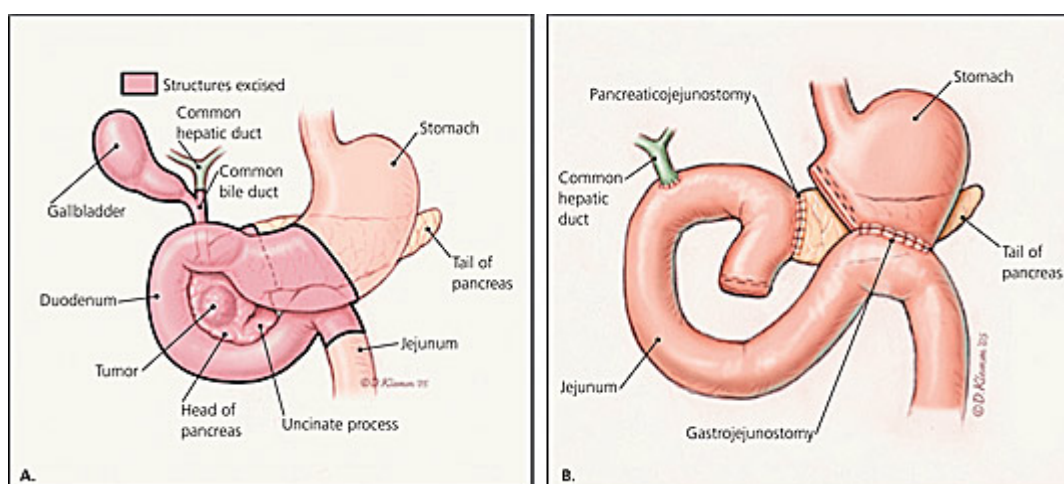


Abb. 2.1: Whipple-Operation: A. Anatomie vorher, B. Anatomie nachher (mit Pankreatikojejuno-, Hepatikojejuno- und Gastrojejunostomie) [Freelove 2006]

Eine adjuvante Chemotherapie kann das Überleben deutlich verbessern. Standard ist heute die Therapie mit Gemcitabine und/oder 5-Floururacil, einzeln oder kombiniert mit einer Radiotherapie. Durch eine geringere Toxizität neuerer Therapieansätze ist die Lebensqualität nur noch geringfügig eingeschränkt [Brunner 2006]. Auch ein neoadjuvanter Therapieansatz wird für das Pankreaskarzinom bzw. für bestimmte Risikogruppen unter den Pankreaskarzinom-Patienten diskutiert [Neoptolemos 2001 und 2004; Neuhaus 2005; Arkosy 2005; Berardi 2005; Deberne 2007; Oettle 2007]. Unbehandelt führt die Erkrankung innerhalb weniger Monate zum Tod [Böcker 2001; RKI 2006].

3. Patienten

3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von 2000 bis Ende 2003 wurden 117 Patienten mit dem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom in der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie des Universitätsklinikums Münster hospitalisiert und explorativ laparotomiert.

Vor der explorativen Laparatomie, während der dann je nach Befund das weitere Vorgehen geplant wurde, wurde den Patienten Blut (je drei Proben: arteriell, peripher venös und zentral venös) entnommen und unter Narkose eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Diesen invasiven Maßnahmen ging immer ein Aufklärungsgespräch und die schriftliche Einverständniserklärung des Patienten zur Teilnahme an der Studie voraus.

Aufgrund mangelnder Qualität des Knochenmarkaspirates (Punctio sicca, Haushaltsgen negativ) wurden 39 Patienten von weiteren Auswertungen ausgeschlossen.

Von den verbleibenden 78 Patienten wurden 33 Patienten nach histologischer Sicherung eines Pankreaskarzinoms in die Studie eingeschlossen (andere intestinale Tumoren wie z. B. Karzinome der Papilla Vateri oder Gallengangs-Karzinome waren ein Ausschlusskriterium). Drei Patienten, deren Tod nicht tumorbedingt war (Todesursache kardial oder infektiös) sind in dieser Studie nicht berücksichtigt worden.

Die Erfassung der Patientendaten erfolgte prospektiv während der Nachsorgephase. Die Nachbeobachtungszeit des Gesamtkollektivs lag bei 36 Monaten. Follow-up-Informationen konnten der onkologischen Sprechstunde der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie des Universitätsklinikums Münster entnommen werden. Hierhin kam der Großteil der Patienten regelmäßig zur offiziellen Tumornachsorge. Daten zu Patienten, die sich dieser Nachsorge entzogen, wurden durch Informationen aus Arztbriefen und Angaben der Hausärzte ergänzt.

Für die vorliegende Auswertung relevante Daten waren:

- Name, Geburtsdatum und Anschrift des Patienten
- Name und Anschrift des behandelnden Hausarztes
- Operationsbericht (mit Operationszeitpunkt und –verfahren)
- Histologie mit postoperativer, histopathologischer Tumorklassifikation (TNM-Stadium) und Differenzierungsgrad des Tumors (G)
- Angaben über einen Residualtumor (R-Stadium)
- Ergebnis der Knochenmarkpunktion und der Blutuntersuchung
- Angaben zu einer eventuell durchgeführten Zusatzbehandlung (Radio-/Chemotherapie)
- Todesdatum und Todesursache bzw. Datum der letzten Vorstellung in der onkologischen Sprechstunde oder beim Hausarzt

Für die folgenden Auswertungen und Signifikanzprüfungen sind die Daten von 33 Patienten benutzt worden, von denen im Rahmen der Nachbeobachtung 27 (81 %) Patienten verstorben sind, sechs (19 %) lebten zum Ende der Studie noch.

Wegen der hohen und vor allem frühzeitigen Letalität der Erkrankung wurden die Zielereignisse nicht auf die Überlebenswahrscheinlichkeit an sich, sondern auf die Länge des Überlebens untersucht. Im Speziellen sind dies der Median (6 Monate (0-36)) sowie die 1- und 2-JÜR (21 und 19 %).

3.2 Alters- und Geschlechterverteilung zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei 62,12 Jahren (Standardabweichung 12,48), der Median bei 64 Jahren. Der jüngste Patient war 31, der älteste 82 Jahre alt. Das Verhältnis erkrankter Männer zu Frauen lag bei 1,75:1.

Alter bei Diagnose (in Jahren)	Geschlecht		Gesamt (n)
	Weiblich (n)	Männlich (n)	
30-39	1	1	2
40-49	1	1	2
50-59	3	4	7
60-69	4	8	12
70-79	2	5	7
80 und älter	1	2	3
Gesamt	12	21	33

Tab. 3.1: Alters- und Geschlechtsverteilung

3.3 Tumorstadium bei Diagnose

Die Einteilung der Tumorstadien erfolgte nach der offiziellen TNM-Klassifikation und der 2005 aktualisierten UICC-Klassifikation [TNM-Klassifikation 2005]. Auf die Darstellung der einzelnen Faktoren T-, N- und M-Stadium ist an dieser Stelle verzichtet worden, da sich die Ergebnisse in der UICC-Einteilung widerspiegeln.

UICC-Stadium	Anzahl der Patienten (n)
II A (T 3, N0, M0)	2
II B (T1-3, N1, M0)	6
III (T 4, jedes N, M0)	11
IV (jedes T, jedes N, M1)	14
Gesamt	33

Tab. 3.2: UICC-Stadienverteilung

3.4 Differenzierungsgrad G

	Anzahl der Patienten (n)
G I (gut differenziert)	2
G II (mäßig differenziert)	17
G III (schlecht differenziert)	14
Gesamt	33

Tab.3.4: Differenzierungsgrad G

3.5 Operation, Resektionsrand und zusätzliche Therapie

	R0 (n)	R1 (n)	inoperabel (n)
nur Palliativ-OP	-	-	6 (100 %)
Palliativ-OP und Chemotherapie	-	-	12 (100 %)
Palliativ-OP und Chemo- und Radiotherapie	-	-	7 (100 %)
nur Totalresektion	3 (75 %)	1 (25 %)	-
Totalresektion und Chemotherapie	2 (67 %)	1 (33 %)	-
Totalresektion und Radiotherapie	1 (100 %)	-	-
Gesamt	6 (17 %)	2 (14 %)	25 (69 %)

Tab.3.4: Durchgeführte Therapie und Tumorabsetzungsänder

4. Material und Methoden

4.1 Materialgewinnung

4.1.1 Gewinnung von Knochenmark

Die Proben wurden präoperativ aus beiden Beckenkämmen unter sterilen Bedingungen entnommen. Mit einer Knochenmarkpunktionskanüle wurden beide Spinae iliacae anteriores superiores punktiert und anschließend 3-10 ml Knochenmark pro Seite über einen Adapter direkt in einen 10-ml-Vacutainer-Behälter aspiriert.

4.1.2 Gewinnung von Blut

Die Blutentnahme wurde nach Einleitung der Anästhesie und vor Beginn der Operation über liegende Venenverweilkatheter, die aus anästhesiologischer Indikation notwendig waren, durchgeführt. Die Katheter befanden sich peripher am Arm, zentralvenös in der Vena jugularis und arteriell in der Arteria radialis oder ulnaris, die nahe dem Handgelenk punktiert war. Es wurden je 4 ml Blut unter sterilen Bedingungen entnommen und über einen Adapter direkt in einen mit 7,2 mg EDTA gefüllten Vacutainer-Behälter aspiriert. Für die Auswertung wurde eine Blutprobe dann als positiv angesehen, wenn in einer der drei Proben CK 20 nachgewiesen werden konnte.

4.2 Aufarbeitung der Proben

Während des gesamten Vorgangs wurde unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung spezieller Schutzkleidung (z.B. Handschuhe) gearbeitet. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte zeitnah und nach einer standardisierten Methode. Die zweiseitige CK 20-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde angewendet wie bei Soeth et al. beschrieben [Soeth 1996].

Das CK 20-Gen besteht aus ca. 18 Kilobasenpaaren (exact 18061 Basenpaare) mit 8 Exons und 7 Introns. Die Größe der mRNA liegt bei ca. 1,5 Kilobasenpaaren (exakt 1461 Basenpaare). Diese Daten wurden der EMBL/GenBank/DDBJ Database 1993 von

Moll et al. überlassen [Moll 1993]. Zielsequenz in dieser Arbeit ist eine Basenabfolge innerhalb der mRNA des Zytokeratin 20 Gens.

Pro Patientenprobe wurden jeweils 10^7 mononukleäre Zellen für die RT-PCR verwendet. Zunächst wurde die zelluläre RNA aus den Zellen herausgelöst und der Abschnitt, auf dem die spezifische Basenabfolge lokalisiert ist, wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in einer nested-PCR amplifiziert, d.h. es wurden zwei Amplifikationszyklen hintereinander geschaltet. Im ersten Zyklus wurde dabei ein äußeres Primerpaar verwendet, welches ein größeres cDNA-Fragment überspannt. Im zweiten Zyklus wurde ein kleineres nested-Primerpaar verwendet, welches innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes eine kleinere cDNA-Sequenz umfasst.

Um die Integrität der RNA sicherzustellen, wurde parallel zu jeder ersten PCR eine cDNA-Sequenz des Haushaltgens Histon 3.3 koamplifiziert. In der zweiten PCR (nested-PCR) wurde keine RNA-Kontroll-PCR mehr durchgeführt, da die RNA-Qualität nach der ersten PCR nachweisbar sein musste.

Die PCR-Primer-Sequenzen für den ersten Amplifikationszyklus von CK 20 und dem Haushaltgen Histon 3.3 sind von Futscher und Blake [Futscher 1993] sowie von Soeth und Vogel [Soeth 1997] veröffentlicht:

CK 20:

Äußeres Primerpaar (PCR I; Sequenz 5' → 3')

5'Primer (upstream) = CK 20 Iu = GCG TTT ATG GGG GTG CTG GAG

3'Primer (downstream) = CK 20 Id = AAG GCT CTG GGA GGT GCG TCT C

Inneres Primerpaar (PCR II; Sequenz 5' → 3')

5'Primer (upstream) = CK 20 IIu = TCG GCG GGG ACC TGT TTG

3'Primer (downstream) = CK 20 IID = CAG TGT TGC CCA GAT GCT TGT TG

Haushaltsgen Histon 3.3 Primerpaar (Sequenz 5' → 3')

5'Primer (upstream) = 5H3 = CCA CTG AAC TTC TGA TTC GC

3'Primer (downstream) = 3H3 = GCG TGC TAG CTG GAT GTC TT.

Die folgende Abbildung gibt die Vorgänge der aufeinander folgenden PCRs schematisch wieder:

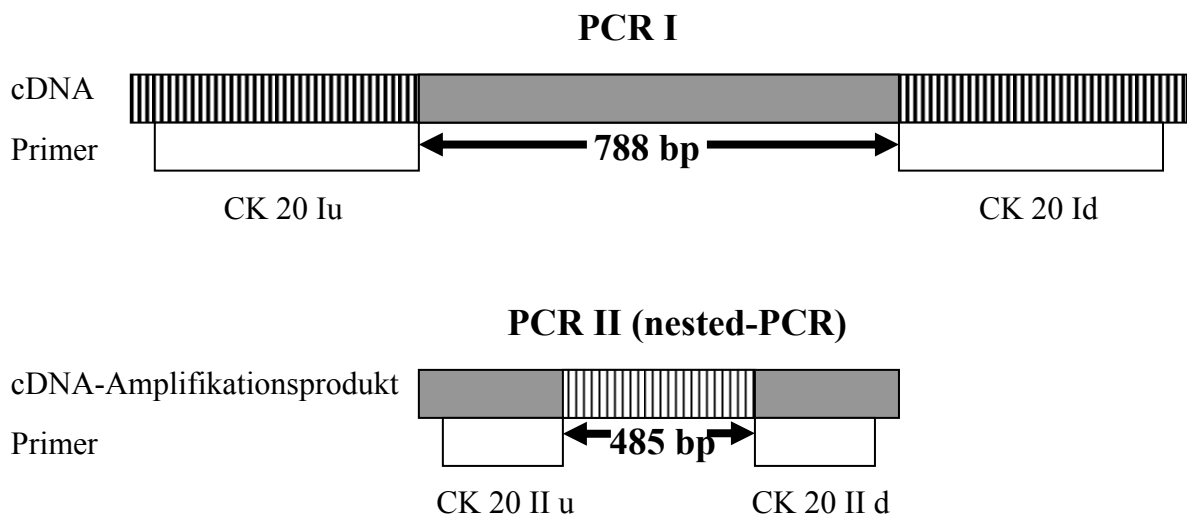


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der nested-PCR

Das Amplifikationsprodukt der ersten PCR (graues Fragment) weist eine Produktlänge von 788 bp auf. Diese cDNA-Sequenz wurde in einer zweiten PCR (nested-PCR) auf ein 485 bp langes Fragment (Endprodukt) reduziert. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Das Amplifikationsprodukt des Haushaltsgens sollte eine Produktlänge von 215 bp aufweisen.

4.2.1 Isolierung von Lymphozyten

4.2.1.1. Reagenzien und Lösungen für die Isolierung von Lymphozyten

Folgende Reagenzien und Hilfsmittel wurden für die Isolierung von Lymphozyten verwendet:

- 10 ml Vacutainer (170 I.U.; BD vacutainer systems, UK)
- 4 ml K2E (EDTA, 7.2 mg; BD vacutainer systems, UK)
- Zentrifugationsröhrchen 50 ml (Nunc, München)
- Ficoll-Isopaque-Lösung (Pharmacia, Freiburg)
- Phosphate-Buffered-Saline (PBS; Invitrogen Liefertechnologies, Karlsruhe)
- DEPC-H₂O (RNase-freies Wasser)

4.2.1.2 Isolierung von Lymphozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Zunächst erfolgte die Isolierung mononukleärer Zellen mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit einer Ficoll-Lösung. Die Probe wurde sorgfältig über der Ficoll-Lösung in einem Zentrifugationsröhrchen geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 500 x Erdschwerkraft (g) über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Durch die niedrige Viskosität, die entsprechende Dichte der Blut- bzw. Knochenmarkbestandteile und die osmotischen Eigenschaften der Ficoll-Lösung führt die Zentrifugation zur differenzierten Migration und zur Ausbildung von Schichten, die verschiedene Zelltypen enthalten. Die unterste Schicht enthält Erythrozyten, die durch die Ficoll-Lösung aggregieren und deshalb komplett sedimentieren. Die Schicht unmittelbar über den Erythrozyten bilden vorwiegend Granulozyten, deren Dichte groß genug ist, um durch die Ficoll-Schicht zu migrieren. Wegen ihrer geringen Dichte werden Lymphozyten und Monozyten mit den anderen langsam sedimentierenden Teilchen, wie z. B. Thrombozyten, an der Grenze zwischen Plasma (geringste Dichte) und Ficoll-Schicht gefunden (siehe Abbildung 4.2).

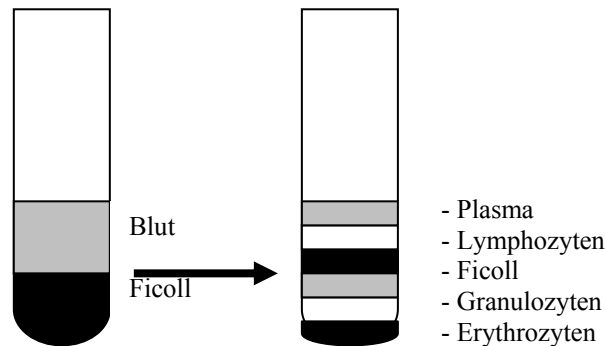


Abb. 4.2: Schichtung der Blut- bzw. Knochenmarkbestandteile nach der Dichtegradienten-Zentrifugation

Die obere Schicht, das Plasma, wurde verworfen. Die Lymphozytenschicht wurde sorgfältig in ein zweites Gefäß abpipettiert. Mögliche Thrombozyten-/Plasma- oder Ficoll-Reste wurden durch Waschung mit PBS entfernt. Der Überstand wurde dekantiert und es folgte eine Vitalitätsprüfung nach der Trypan-Blau-Ausschluss-Methode, bei der sich tote Zellen blau anfärben, da der Azofarbstoff das Zytoplasma toter Zellen durchqueren kann, nicht aber das lebender Zellen.

4.2.2 RNA – Isolierung

4.2.2.1 Reagenzien und Lösungen zur Isolierung von DNA aus mononukleären Zellen

- 500 µl RNAzol (Guanidinium-Isothiozyanat-Lösung, Wak-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland)
- 200 µl Chloroform
- 200 µl Isopropanol
- Ethanol (70 %)
- DEPC-H₂O (RNAse-freies Wasser)

4.2.2.2 Durchführung der RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde in Anlehnung an das Verfahren von Chomczynski und Sacchi [Chomczynski 1987] durchgeführt, modifiziert nach Siebert und Chenchik [Siebert 1993].

Zunächst erfolgte die Lyse der Zellen (Denaturierung von Zell- und Zellkernmembranen), um die Nukleinsäuren aus dem Kern zu entlassen. Dazu wurden 10^7 Lymphozytenzellen mit RNAzol resuspendiert. Im Anschluss daran wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß Chloroform zugefügt. Nach 30 Sekunden Vortexen, kurzzeitiger Inkubation auf Eis und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und $13.000 \times$ Erdanziehungskraft (g), wurde eine deutliche Trennung in eine obere, klare, wässrige und eine untere, blaue Phase sichtbar. Die untere Phase, die DNA und andere Proteine enthielt, wurde verworfen; der Überstand, der gelöste RNA enthielt, wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol aufgefüllt. Das Gemisch wurde geschwenkt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren, und erneut auf Eis inkubiert sowie weitere 30 Minuten bei 4°C und $13.000 \times$ Erdanziehungskraft (g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet war weiß bis klar durchsichtig und wurde zweimalig mit Ethanol (70 %) gewaschen, indem es jeweils 15 Minuten bei $13.000 \times$ Erdanziehungskraft (g) zentrifugiert wurde. Nachdem der Überstand verworfen worden war, trocknete das Pellet etwa 45 Minuten bei Raumtemperatur unter einem Zellstofftuch, bis alle Ethanolreste verdunstet waren. Die sedimentierte RNA konnte nun in RNase-freiem Wasser suspendiert werden.

4.2.3 Reinheitskontrolle der isolierten RNA

4.2.3.1 Hilfsmittel für die Reinheitskontrolle der RNA

BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg

4.2.3.2 Prinzip der Reinheitskontrolle der RNA

Eine unerlässliche Bedingung für die Durchführung einer präzisen RT-PCR ist die Gewinnung einer reinen und in ihrer Integrität vollständig erhaltenen RNA. Die Reinheitskontrolle wurde nach dem Prinzip der Multi-Wellenlängen-Messung durchgeführt. Hierbei nutzt man die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften reiner Nucleinsäuren (Absorptionsmaximum: 260 nm) und der verunreinigenden Proteine (v. a. durch ihre aromatischen Aminosäurebestandteile wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin weisen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf). Durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm wurde die Reinheit der RNA abgeschätzt. Im Idealfall einer absolut reinen Nucleinsäurelösung erhält man eine $A_{260/280}$ -Ratio von 2.0. Für die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich RNA-Präparationen mit einer $A_{260/280}$ -Ratio von mehr als 1,5 verwendet.

4.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

4.2.4.1 Reverse Transkription

4.2.4.1.1 Reagenzien und Lösungen für die reverse Transkription

- DEPC-H₂O (RNase-freies Wasser)
- Primer (2 µl CK 20 Id (50 pmol/µl) bzw. 0,5 µl 3H3 (50 pmol/µl))
- first strand buffer-Reaction Mix (4 µl 5x; Invitrogen Life-Technologies, Karlsruhe)
- 0,1 M Dithiothreitol (DTT; 2 µl)
- Desoxynucleotidtriphosphate 10 mM (dNTP; 1 µl)
- Superscript (superscript II reverse transcriptase; 1 µl; Invitrogen Life-Technologies, Karlsruhe)

4.2.4.1.2 Durchführung der reversen Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wurde die isolierte zelluläre RNA enzymatisch in zelluläre komplementäre DNA (cDNA) überführt. Bei jeder reversen Transkription wurden ein Leerwert (10 µl DEPC-H₂O anstelle der Patienten-RNA) und eine Positivkontrolle (2 µl RNA-Einsatz anstelle der Patienten-RNA) mitgeführt. Um Sekundärstrukturen an der RNA aufzulösen, wurden zunächst CK 20-Id-Primer und 3H3-Primer mit 10 µl Patienten-RNA/Leerwert bzw. 2 µl der Positivkontrolle in einem sterilen Reaktionsgefäß gemischt. Volumen unter 12 µl wurden auf 12 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Lösungen wurden 10 Minuten bei 70°C im Thermoblock inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt.

Nach einer zweiminütigen Ruhephase wurde ein Mix aus first strand buffer, Dithiothreitol, Desoxynucleotidtriphosphate und Superscript II jeweils zu den verschiedenen Ansätzen pipettiert. Es ergab sich ein Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 20 µl, welches gut durchmischt und anschließend abzentrifugiert wurde. Die Herstellung der komplementären DNA (cDNA) erfolgte durch die reverse Transkription durch Inkubation im Thermoblock über 50 Minuten bei 42°C. Anschließend wurde das Enzym Reverse Transkriptase inaktiviert durch eine fünfminütige Hitze-Inaktivierung bei 95°C, gefolgt von einer fünfminütigen Abkühlung bei 4°C.

Die so entstandene cDNA konnte sofort für die PCR eingesetzt oder bei – 20 °C für maximal ein Jahr gelagert werden.

4.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Initial wurde parallel zu jeder CK 20-Sequenz jeweils eine cDNA-Sequenz des Haushaltsgens Histon3.3 koamplifiziert. Dazu wurde die cDNA aus derselben Reversen Transkription verwendet, um die Integrität der RNA sowie den korrekten Ablauf der RNA-Extraktion und Reversen Transkription zu überprüfen. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen unter dem Laminar-Air-Flow statt. Es wurden ausschließlich sterile Einmalpipetten und autoklavierte Arbeitsmaterialien verwendet.

4.2.4.2.1 Reagenzien und Lösungen für die PCR

- 10 x PCR-Puffer (mit der Taq-Polymerase geliefert, Invitrogen Life-Technologies, Karlsruhe)
- dNTP- Mix (10 mM)
- MgCl₂
- Primer (siehe Kapitel 4.2, je 50 pmol/μl)
- 1,25 U Taq-Polymerase (Invitrogen Life-Technologies, Karlsruhe)
- 9700 Thermocycler (Perkin Elmer)

4.2.4.2.2 Erste PCR (100 μl Ansatz) - Durchführung

Für jede Patientenprobe und die entsprechende RNA-Kontrolle des Haushaltsgens Histon 3.3 wurden zwei verschiedene Prämixe hergestellt:

CK 20		RNA-Kontrolle (Histon 3.3)	
10 x PCR-Puffer	10 μl	10 x PCR-Puffer	10 μl
dNTP- Mix (10 mM)	8 μl	dNTP- Mix (10 mM)	8 μl
MgCl ₂	3 μl	MgCl ₂	3 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl	Taq-Polymerase	0,5 μl
CK 20 I u – Primer	2 μl	3H3-Primer	1,5 μl
CK 20 I d - Primer	1 μl	5H3-Primer	2 μl

Tab. 4.1: Pipettierschema PCR I

In alle CK 20-Ansätze wurden je 15µl cDNA, in die Kontrollen je 5 µl RNA zugegeben und das Gemisch wurde auf je 100 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Die Inkubation erfolgte im Perkin Elmer 9700 Thermocycler. Die DNA-Amplifikation lief in verschiedenen Schritten ab: Zunächst fand die initiale Aktivierung bei 95°C statt. Die DNA wurde in einem weiteren Schritt bei 95°C denaturiert. Es folgte die Anlagerung der Primer (Annealing) bei 55°C und anschließend die DNA-Extension bei 72°C. Die terminale Extension erfolgte ebenfalls bei 72°C, dem Temperatur-Optimum der relativ hitzestabilen DNA-Polymerase des Süßwasserfisches *Thermus aquaticus*.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die zeitlichen Abläufe:

Aktivität	Temperatur (°C)	Zeit (sec)
Initiale Aktivierung	95	180
Denaturierung	95	30
Annealing	55	45
Amplifikation		
1) 35 Zyklen	72	60
2) terminal	72	420
Abkühlung	4	

Tab. 4.2: Inkubationsschema PCR

Abschließend wurde der Amplifikationsprozess auf mögliche Störungen durch das Gerät überprüft.

4.2.4.2.3 Zweite PCR (50 µl Ansatz) - Durchführung

Für jede Patientenprobe wurde der folgende Prämix hergestellt:

CK 20	
10 x PCR-Puffer	5 µl
dNTP- Mix (10 mM)	4 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
CK 20 II u – Primer	1 µl
CK 20 II d - Primer	1 µl

Tab. 4.3: Pipettierschema PCR II

In alle CK 20-Ansätze wurde 1µl der cDNA-Sequenz aus der ersten PCR zugegeben und das Gemisch wurde mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte nach demselben Schema wie bei der ersten PCR (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.4.2.2). Das Amplifikat konnte bis zur zeitnahen Weiterverarbeitung bei 4°C oder bei – 20°C für maximal 1 Jahr aufbewahrt werden.

4.2.5 Nachweis der Amplifikationsprodukte – Gel-Elektrophorese

4.2.5.1 Reagenzien, Lösungen und Hilfsmittel für die Gel-Elektrophorese

- Blaumarker (2 µl Ethidiumbromid)
- Polyacrylamidgel (PAA) (10%), bestehend aus:
 - 10 ml dd H₂O (destilliertes Wasser)
 - 4 ml Acrylamid (30 %)
 - 1,5 ml Tris-Borsäure-Ethylendiamintetraessigsäure (10 x TBE)
 - 100 µl 10%iges Amoniumpersulfat (APS)
 - 16 µl N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamine (TEMED)
- DNA-Längenstandard VIII (2µl)
- PE310-Kapillar-Sequencer (PE, Applied Biosystems, Weiterstadt)

4.2.5.2 Durchführung der Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese erfolgte die Auftrennung der cDNA-Fragmente der CK 20- und Histon-3.3-Sequenzen, die zuvor in beiden PCR-Zyklen amplifiziert wurden. Dazu wurden zunächst die PCR-Produkte mit Blaumarker versetzt und in eine Tasche eines Polyacrylamidgels (10 %) pipettiert. Für die vergleichende Beurteilung der Größe der DNA-Amplifikate wurden 2 µl DNA-Längenstandard VIII mit einem gleichen Volumen Blaumarker versetzt und ebenfalls in eine Tasche des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in der Biometra-Gelkammer über 40 Minuten bei 60 mA.

Um die Korrektheit der Amplifikation von CK 20 zu gewährleisten, wurden die PCR-Produktsequenzen mit einem PE310-Kapillar-Sequenzer analysiert. Die Gelauswertung erfolgte manuell. Dabei durfte die Wasserkontrolle keine Amplifikate enthalten, die Kontrolle des Haushaltgens Histon sollte ein Fragment von 215 bp ergeben und die Größe des CK 20-spezifischen Signals sollte nach dem ersten Amplifikationszyklus 788 bp und nach der nested-PCR 485 bp betragen (siehe Kapitel 4.2).

4.3 Statistische Methoden

Untersucht wurden bei 33 Patienten die Beziehungen zwischen Tumorstadium und Überlebenszeit und dem Nachweis von CK 20-exprimierenden Zellen im Blut und Knochenmark. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit SPSS 9.0 für Windows der Firma SPSS Incorporated durchgeführt.

Zunächst erfolgte die deskriptive Analyse der erhobenen Daten. Alle relevanten Erhebungsmerkmale (Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Überlebenszeit) wurden deskriptiv tabelliert und hinsichtlich prozentualer Verteilung der patienten- und tumorbezogenen Merkmale sowie der ermittelten Knochenmark- und Blutbefunde untersucht. Die Ergebnisse wurden gegebenenfalls als Median und/oder als Durchschnitt mit jeweiliger Standardabweichung bei einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Für die Analyse der Überlebenszeit wurde die Zeit von der Operation bis zum Tod in Monaten berechnet. Die Patienten, die bei Abschluss der Beobachtungen noch lebten, wurden zum Zeitpunkt der letzten Kontrolle zensiert. Die statistischen Tests wurden jeweils zu einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt ($p \leq 0.05$).

Die graphische Darstellung der Überlebenszeiten erfolgte in Form von Kaplan-Meier-Plots. Unterschiede zwischen den Überlebenszeitkurven wurden mit dem Log-rank-Test auf Signifikanz getestet ($p \leq 0,05$). Auch die mediane Überlebenszeit sowie die 1- und 2-JÜR wurden berechnet. Wegen der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms wurde auf eine Auswertung der Daten zum rezidivfreien Überleben und der Überlebenszeiten über 36 Monate hinaus verzichtet.

Die Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von CK 20-haltigen Zellen im Knochenmark und Blut und dem Tumorstadium nach UICC wurde mit Hilfe eines Log-linearen Regressionmodells untersucht. Dabei wurde das Alter als möglicher Einflussfaktor berücksichtigt. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % definiert.

Anschließend wurden die auf das Gesamtüberleben einflussnehmenden Faktoren mit Hilfe der Cox-Regression analysiert. Ziel der Analyse war die Überprüfung, ob das Vorkommen von CK 20-exprimierenden Zellen im Blut oder Knochenmark einen

Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Die Analyse konzentrierte sich deshalb neben diesen beiden Faktoren auf Faktoren, von denen eine Einflussnahme anzunehmen war: das Alter (in Dekaden) und die UICC-Klassifikation. T-, N- und M-Stadium wurden nicht gesondert in die Berechnungen einbezogen, da sie bereits im UICC-Stadium erfasst sind. Diese Parameter sollten daher aus dem statistischen Modell, basierend auf dem Prinzip der Multikollinearität, ausgeschlossen werden. Zunächst wurden die Einflussfaktoren univariat exploriert, um zu testen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen je zwei Variablen vorliegt. Danach erfolgte die multivariate Analyse aller Einflussfaktoren gemeinsam, um eine eventuelle Abhängigkeit der einzelnen Faktoren untereinander zu überprüfen. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % definiert. Als Maß für die Stärke des Zusammenhanges werden adjustierte Hazard Ratios angegeben.

5. Ergebnisse

Im Rahmen der Studie wurde 33 Patienten, die an einem Pankreaskarzinom litten, je eine Blut- und eine Knochenmarkprobe entnommen. Aus diesen Proben wurde RNA mononukleärer Zellen isoliert, mit der dann eine nested-PCR durchgeführt wurde, um CK 20-haltige Zellen als Mikrometastasen zu detektieren. Die Patienten wurden auf ihre Überlebenszeit beobachtet und es sollte eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium sowie der Überlebenszeit und dem Nachweis zytokeratinhaltiger Zellen im Blut oder Knochenmark herausgestellt werden.

5.1 Prä-operativer Tumorzellnachweis im Blut und Knochenmark

Bei etwa zwei Drittel der Patienten (23/33 (69 %)) konnten zytokeratinhaltige Zellen im Blut nachgewiesen werden und bei gut der Hälfte (17/33 (51,5 %)) der Patienten im Knochenmark. Bei dem restlichen Drittel bzw. der anderen Hälfte der Patienten konnte in keiner der untersuchten Proben ein positives Resultat bestätigt werden. Bei fast allen Patienten (16 von 17), die Mikrometastasen im Knochenmark aufwiesen, sind ebenfalls im Blut zytokeratinhaltige Zellen entdeckt wurden. Neun der zehn Patienten, bei denen keine der untersuchten Blutproben positiv für Zytokeratin 20 war, waren komplett frei von Mikrometastasen, wiesen also auch keine zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark auf. Lediglich ein Patient, bei dem alle drei Blutproben negativ getestet worden waren, hatte zytokeratinhaltige Zellen im Knochenmark.

5.2 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Blut- und Knochenmarkbefunde in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht. Da ein Häufigkeitsgipfel in der 6. Lebensdekade vorliegt, ist das Patientengut für die folgende Untersuchung in Gruppen unterteilt worden. Die eine umfasst alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 60 Jahre waren, die andere Gruppe wird von Patienten gebildet, die zum Zeitpunkt der Diagnose mindestens 60 Jahre alt waren:

		Positiver Blutbefund	Positiver Knochenmarkbefund	Beides positiv
Geschlecht	M (n=21)	14 (67 %)	10 (48 %)	9 (43 %)
	W (n=12)	9 (75 %)	7 (58 %)	7 (58 %)
Alter	<60 Jahre (n= 11)	6 (55 %)	5 (45 %)	5 (45 %)
	≥ 60 Jahre (n= 22)	17 (77 %)	12 (55 %)	11 (50 %)
Gesamt (n = 33)		23 (69 %)	17 (51,5 %)	16 (48,5 %)

Tab. 5.1: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Der Altersmedian der Patienten, die keine zytokeratinhaltige Zellen im Blut aufwiesen, lag bei 58 Jahren (31 bis 77 Jahre). Er lag damit fast zehn Jahre unter dem Median der Patienten, in deren Blut Tumorzellen detektiert werden konnten (Median = 67; 36 bis 82 Jahre). Bei Betrachtung des Knochenmarkbefundes fällt ein nicht ganz so gravierender Unterschied auf: Patienten mit positivem Knochenmarkbefund wiesen einen Altersmedian von 61 Jahren auf (31 bis 77 Jahre), während bei Patienten mit tumorzellfreiem Knochenmark der Altersmedian bei 64 Jahren lag (45 bis 87 Jahre).

5.3 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Blut- und Knochenmarkbefunde in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Auf die separate Darstellung für T-, N- und M-Stadium ist verzichtet worden, da sich diese Kriterien in der UICC-Klassifizierung widerspiegeln:

	Positiver Blutbefund	Positiver Knochenmarkbefund	Beides positiv
II A (T3, N 0, M0; n = 2)	1 (50 %)	1 (50 %)	1 (50 %)
II B (T1-3, N1, M0; n = 6)	2 (33 %)	1 (17 %)	-
III (T4, jedes N, M0; n = 11)	10 (91 %)	8 (73 %)	8 (73 %)
IV (jedes T, jedes N, M1; n = 14)	10 (71 %)	7 (50 %)	7 (50 %)
Gesamt (n = 33)	23 (69 %)	17 (51,5 %)	16 (48,5 %)

Tab. 5.2: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, haben die Patienten im UICC-Stadium III zu einem wesentlich höheren Prozentsatz zum Zeitpunkt der Operation disseminierte Tumorzellen im Blut und/oder Knochenmark als in den anderen Stadien. Während für den Knochenmarkbefund kein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden Gruppen existiert (CK 20+: Mean = 5 ± 1 ; CK 20-: Mean = $5,24 \pm 0,83$), ist beim Blutbefund ein minimaler Trend feststellbar: Patienten, in deren Blutproben keine disseminierten Tumorzellen gefunden werden konnten, hatten im Durchschnitt ein minimal besseres Tumorstadium (CK 20+: Mean = $5,26 \pm 0,81$; CK 20- = $4,8 \pm 1,14$).

Anhand der obigen Daten ist offensichtlich, dass die Nachweisbarkeit von CK 20 mit dem Stadium ansteigt, um beim Stadium III sein Maximum zu erreichen. Obwohl im Stadium IV eine niedrigere Detektionsrate erzielt wird, ist insgesamt ein eindeutiger Trend erkennbar.

5.4 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

	Positiver Blutbefund	Positiver Knochenmarkbefund	Beides positiv
G I (gut differenziert; n= 2)	2 (100 %)	2 (100 %)	2 (100 %)
G II (mäßig differenziert; n = 17)	9 (53 %)	8 (47 %)	8 (47 %)
G III (schlecht differenziert; n = 14)	12 (85 %)	7 (50 %)	6 (43 %)
Gesamt (n = 33)	23 (69 %)	17 (51,5 %)	16 (48,5 %)

Tab. 5.3: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad G

5.5 Tumorzellnachweis in Abhängigkeit von Therapieplan und Tumorabsetzungsrand

	Positiver Blutbefund	Positiver Knochenmarkbefund	Beides positiv
nur Palliativ-OP (n = 6)	6 (100 %)	5 (83 %)	5 (83 %)
Palliativ-OP u. Chemotherapie (n = 12)	7 (58 %)	5 (42 %)	5 (42 %)
Palliativ-OP u. Chemo- u. Radiotherapie (n = 7)	7 (100 %)	5 (71 %)	5 (71 %)
nur Totalresektion (n = 4)	1 (25 %)	2 (50 %)	1 (25 %)
Totalresektion u. Chemotherapie (n = 3)	2 (66 %)	-	-
Gesamt (n = 33)	23 (69 %)	17 (51,5 %)	16 (48,5 %)

Tab. 5.4: Nachweis disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark in Abhängigkeit von Therapieplan und Tumorabsetzungsrand

5.6 Überlebensraten

Das gesamte Patientenkollektiv überlebte im Median sechs Monate (0-36). Die 1-JÜR für alle Patienten lag bei 19,5 %, die 2-JÜR bei 15 %. Sechs Patienten lebten am Ende der Nachbeobachtungszeit von 36 Monaten noch.

Im Folgenden sollen die Überlebensraten in Abhängigkeit von den Zielparametern Alter, Geschlecht, Tumorstadium und Nachweis von zytokeratinhaltigen Zellen im Blut und im Knochenmark dargestellt werden.

5.6.1 Überlebenszeit nach Kaplan-Meier für beide Geschlechter

Beide Geschlechter überlebten im Median 6 Monate (Frauen: 0-36, Männer: 1-36). Die Prognose ist vom Geschlecht unabhängig ($p = 0,8039$). Auf eine graphische Darstellung ist wegen der Eindeutigkeit des Ergebnisses verzichtet worden.

5.6.2 Überlebenszeit nach Kaplan-Meier für verschiedene Altersklassen

Zur Vereinfachung wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt (< 60 Jahre oder ≥ 60 Jahre). Patienten, die jünger als 60 Jahre waren ($n = 11$), überlebten im Median 6 Monate (1-13); Patienten, die 60 Jahre oder älter waren ($n = 22$), überlebten im Median 7 Monate (0-36). Bei einem p von 0,4252 besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Bezug auf das Gesamtüberleben. Auf eine graphische Darstellung ist wegen der Eindeutigkeit des Ergebnisses verzichtet worden.

5.6.3 Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier für die unterschiedlichen Tumorstadien

Bei Betrachtung der Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Tumorstadium findet man wie erwartet im Log-rank-Test einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Tumorstadien ($p = 0,0397$).

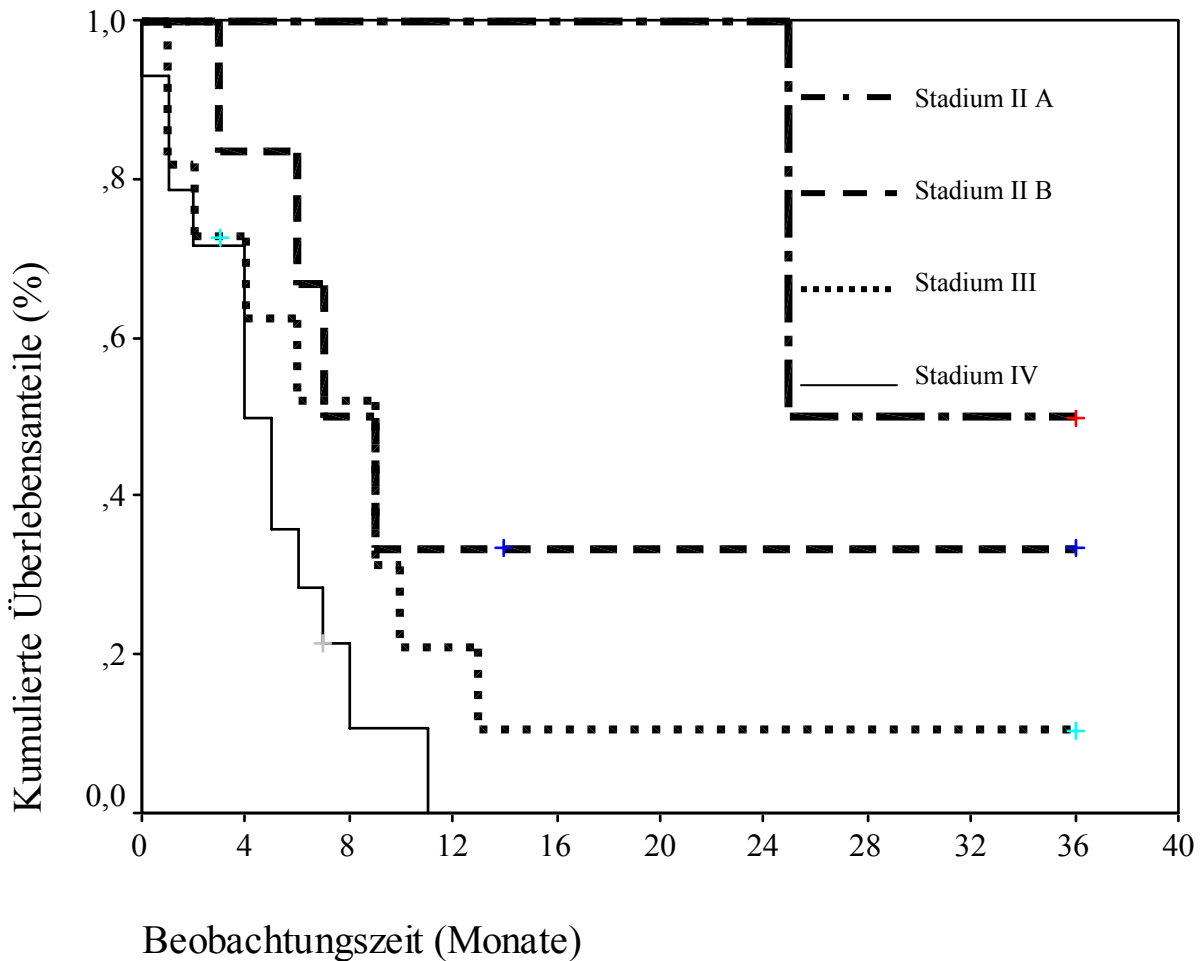


Abb. 5.1: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit vom Tumorstadium (Stadium II A: $n = 2$, medianes Überleben: 25 Monate (25-36); Stadium II B: $n = 6$, medianes Überleben: 7 Monate (3-36); Stadium III: $n = 11$, medianes Überleben: 9 Monate (1-36); Stadium IV: $n = 14$, medianes Überleben: 4 Monate (0-11))

5.6.4 Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier nach Blutbefund

Patienten, in deren Blutproben disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, überlebten im Median 6 Monate (0-36). Für Patienten mit tumorzellfreien Blutproben konnte ein medianes Überleben von 9 Monaten (1-36) beobachtet werden. Eine statistische Signifikanz für diesen Unterschied liegt jedoch bei einem p von 0,1851 nicht vor.

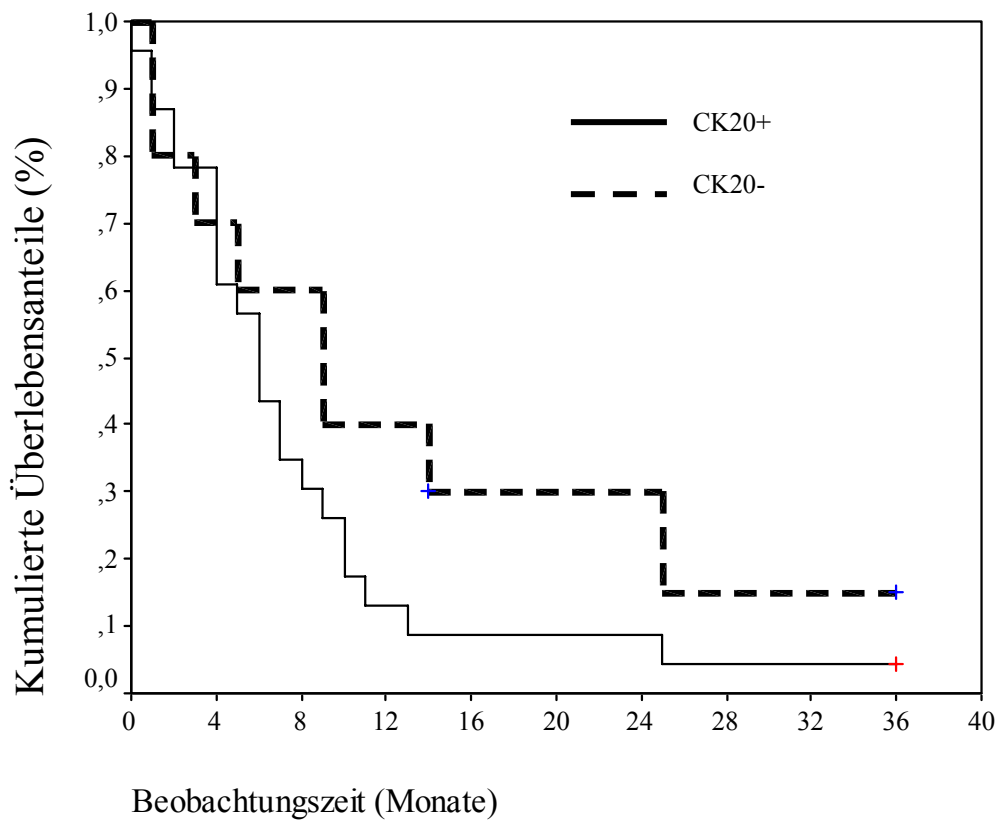


Abb. 5.2: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit vom Blutbefund (CK+: n = 23; CK-: n = 10)

Die Überlebensraten der Patienten in Abhängigkeit vom Blutbefund sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

	Median (Monate)	1-JÜR (%)	2-JÜR (%)
CK+ (n = 23)	6 (0-36)	12	8
CK- (n = 10)	9 (1-36)	40	30

Tab. 5.5: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Tumorzellnachweis im Blut

5.6.5 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier nach Knochenmarkbefund

Beide Patientengruppen überlebten im Median 6 Monate. Es besteht also kein Unterschied in der Überlebenszeit dieser beiden Patientengruppen ($p = 0,7367$). Auch die Graphik dazu ist eindeutig.

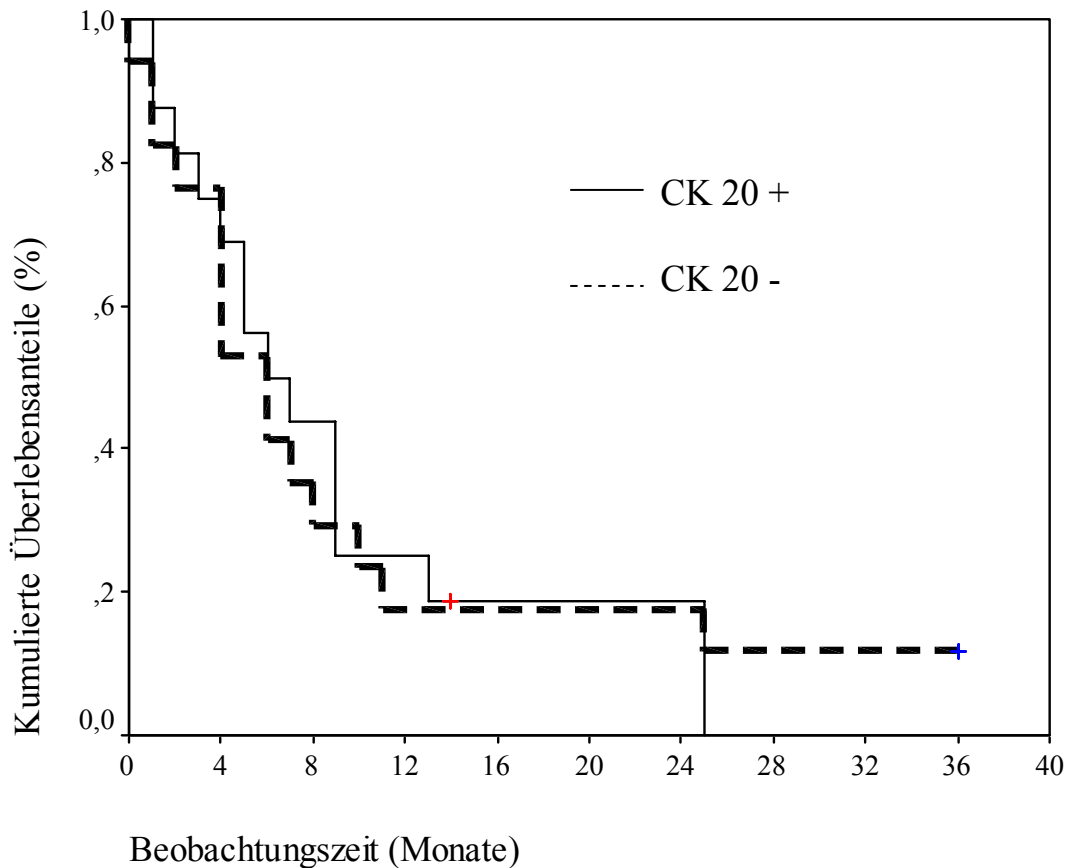


Abb. 5.3: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit vom Knochenmarkbefund (CK+: $n = 17$; CK-: $n = 16$)

Die Überlebensdaten in Abhängigkeit vom Befund im Knochenmark sind in Tabelle 5.6 dargestellt:

	Median (Monate)	1-JÜR (%)	2-JÜR (%)
CK+ ($n = 17$)	6 (0-36)	19	19
CK- ($n = 16$)	6 (1-25)	25	20

Tab. 5.6: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Tumorzellnachweis im Knochenmark

5.7 Tumorzellnachweis im Blut und Knochenmark - Prognostische Relevanz

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit der Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Blut und Knochenmark und/oder andere Faktoren eine Prädiktion der Überlebensraten für die Patienten erlaubt. Das UICC-Stadium wurde dabei als unabhängiger Faktor eingesetzt. Geklärt werden sollte der Zusammenhang zum Alter (in Dekaden) und zum Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Blut und im Knochenmark (positiv vs negativ). Zusätzliche Faktoren wie Infiltrationstiefe (T), Lymphknotenbefall (N) oder Fernmetastasen (M) wurden nicht separat in die Berechnungen einbezogen, da sie bereits im UICC-Stadium enthalten sind. Diese Parameter sind daher, basierend auf dem Prinzip der Multikolarität, aus dem statistischen Modell ausgeschlossen worden.

5.7.1 Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und Blut und dem Tumorstadium nach UICC

Mit Hilfe eines Log-linearen Regressionsmodells wurde die Nachweisbarkeit von Tumorzellen in Blut und/oder Knochenmark in Abhängigkeit vom Tumorstadium (UICC-Stadium) untersucht. Es sollte bewiesen werden, dass ein höheres Tumorstadium mit einer erhöhten Nachweisbarkeit von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Blut und/oder im Knochenmark einhergeht. Zusätzlich wurde das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (in Dekaden) einbezogen, um eventuelle Altersabhängigkeiten zu erfassen. Keiner der untersuchten Parameter wies bei einem Konfidenzintervall von 95 % eine statistische Signifikanz auf. Es kann also nicht bestätigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut und dem Tumorstadium besteht.

Zielparameter	Signifikanz (p-Wert)	95 %-Konfidenzintervall des Korrelationskoeffizienten
Alter bei Diagnose (in Dekaden)	0,470	-0,379 bis 0,179
CK 20-Nachweis im Knochenmark	0,914	- 0,764 bis 0,849
CK 20-Nachweis im Blut	0,250	- 1,383 bis 0,375

Tab. 5.7: Abhängigkeit zwischen CK 20-Nachweis und Tumorstadium

5.7.2 Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und Blut und der Überlebensrate

5.7.2.1 Univariate Analyse mit zwei Einflussvariablen (Cox Regression)

In den Analysen nach dem Cox-Modell wurde zunächst neben dem UICC Stadium nur ein weiterer Faktor berücksichtigt. Dabei wurden die Faktoren Alter zum Diagnosezeitpunkt (in Dekaden) und der Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und im Blut in Abhängigkeit vom bekannten Prognosefaktor UICC-Stadium untersucht. Wie erwartet konnte in diesen Einzelanalysen bei einem Signifikanzniveau von 5 % das UICC-Stadium als signifikanter Einflussfaktor bestätigt werden. Die übrigen Faktoren hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf das Gesamtüberleben. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs werden adjustierte Hazard Ratios angegeben.

Modellparameter	P-Wert	Hazard ratio (95 % CI)
UICC-Stadium	0.0257	1.6938 (1.0661-2.6909)
Alter bei Diagnose (in Dekaden)	0.6120	1.0882 (0.7850-1.5085)

Tab. 5.8: Cox'sche Regression mit UICC-Stadium und Alter als Einflussgrößen im statistischen Modell. Signifikante Einflussvariablen sind fett markiert.

Zielparameter	P-Wert	Hazard ratio (95 % CI)
UICC-Stadium	0.0251	1.6807 (1.0672-2.6470)
CK 20-Nachweis Knochenmark	0.5964	0.8110 (0.3736-1.7608)

Tab. 5.9: Cox'sche Regression mit UICC-Stadium und CK 20-haltigen Zellen im Knochenmark als Einflussgrößen im statistischen Modell. Signifikante Einflussvariablen sind fett markiert.

Zielparameter	P-Wert	Hazard ratio (95 % CI)
UICC-Stadium	0.0482	1.5955 (1.0036-2.5363)
CK 20-Nachweis Blut	0.4940	0.7318 (0.2992-1.7903)

Tab. 5.10: Cox'sche Regression mit UICC-Stadium und CK 20-haltigen Zellen im Blut als Einflussgrößen im statistischen Modell. Signifikante Einflussvariablen sind fett markiert.

5.7.2.2 Analyse mit allen Einflussvariablen

Im nächsten Schritt wurden die o.g. Faktoren gemeinsam mit Hilfe des Cox'schen Regressionsmodells analysiert, um den unabhängigen prognostischen Effekt der einzelnen Variablen zu prüfen. Wie in Tabelle 5.11 ersichtlich ist, konnte auch in dieser Analyse das UICC-Stadium als signifikanter Einflussfaktor bestätigt werden. Für die übrigen Faktoren, insbesondere für den Nachweis von Zytokeratin 20-haltigen Zellen im Knochenmark und/oder im Blut, muss man feststellen, dass sie auch in diesem statistischen Modell keine signifikanten Einflussvariablen darstellen. Trotz einer Tendenz zu längerem Überleben bei CK 20-freiem Knochenmark, bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Überlebenszeit bei Patienten mit CK 20-positivem oder CK 20-negativem Knochenmarkbefund.

Zielparameter	P-Wert	Hazard ratio (95 % KI)
UICC-Stadium	0.0337	1.6926 (1.0415-2.7507)
Alter bei Diagnose (in Dekaden)	0.5168	1.1126 (0.8059-1.5360)
CK 20-Nachweis Knochenmark	0.2544	0.5961 (0.2449-1.4510)
CK 20-Nachweis Blut	0.2740	0.5728 (0.2449-1.4510)

Tab. 5.11: Ergebnisse der multivariaten Analyse mit dem Cox'schen Regressionsmodell. Signifikante Ergebnisse sind fett markiert.

6. Diskussion

In der Onkologie gilt dem Aufspüren persistierender Tumorzellen ein besonderes Augenmerk, da sich bei einer Aussaat, egal ob lymphogen oder hämatogen, die Prognose sofort erheblich verschlechtert und eine Heilung praktisch nicht mehr erreicht werden kann. Deshalb machten es sich viele Arbeitsgruppen in den letzten Jahren zur Aufgabe, nach diesen Tumorzellen zu fahnden und ein einfaches, klinisch anwendbares sowie äußerst sensitives und spezifisches Verfahren für ihre Entdeckung zu entwickeln.

Zur Charakterisierung des Progressions- bzw. Metastasierungsrisikos von Pankreaskarzinomen werden bisher das primäre/lokale Ausmaß der Erkrankung (T-Stadium), der Lymphknotenstatus (N-Stadium) und die Fernmetastasierung (M-Stadium) herangezogen. Es gibt viele Ansätze in verschiedenste Richtungen, um weitere prognostisch relevante Faktoren zu finden. Da eine karzinomatöse Erkrankung bzw. der Wiederausbruch einer solchen in der Regel bei gezielter Suche durch bildgebende Verfahren erst ab einer Tumorzellzahl von 10^8 bis 10^9 erkannt werden kann [Böcker 2001], muss der Nachweis isolierter disseminierter Tumorzellen als prognostischer Faktor angesehen werden. Allerdings ist die biologische Relevanz disseminierter Tumorzellen bis heute unklar [Hosch 2002; Vogel 2001; Z'graggen 2001]. Einerseits kann das präoperative Vorhandensein disseminierter Tumorzellen Hinweise auf die Fähigkeit eines Tumors zur Metastasierung geben. Andererseits kann es sich um ein vorübergehendes Ausschwemmen von Tumorzellen handeln [O'Sullivan 1997]. Ebenso gut können die Tumorzellen im Knochenmark die Folge und nicht der Ursprung des Tumorprogresses sein [Z'graggen 2001]. Die Eigenschaften dieser Zellen sind Gegenstand intensiver Forschung. Man geht davon aus, dass sie sich überwiegend in einem schlafähnlichen, persistierenden Zustand befinden, in dem keine Proliferation erfolgt [Pantel 1993, 1999]. Welche Zellen aus dem Primärtumor disseminiert sind, durch welche Einflüsse und zu welchem Zeitpunkt die Zellteilung wieder aufgenommen wird und eine Expansion stattfindet, ist ebenso wenig geklärt wie die Frage, welche Tumorzellen überhaupt in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Ziel ist es also noch immer, die Zusammenhänge und Mechanismen der Tumorentwicklung zu verstehen, um sie sich in einem nächsten Schritt in der Therapie zunutze zu machen.

6.1 Diskussion der Methode

6.1.1 Allgemein

In der Literatur wird die Tumorzelldetektion mittels RT-nested-PCR als eine Technik angesehen, mit der sich allgemein eine sehr hohe Sensitivität erzielen lässt. Da sie jedoch gleichzeitig eine sehr empfindliche Methode ist, besteht vor allem beim Einsatz als Routinemethode die Gefahr der Kontamination. Deshalb haben sorgfältiges Arbeiten und die Einhaltung von Standards, um Störfaktoren zu minimieren, oberste Priorität.

Die Interpretation der Ergebnisse verschiedener Studien und die Beurteilung ihrer klinischen Signifikanz sind schwierig und werden durch eine Vielzahl von Problemen kompliziert; Lokalisation und Art der Punktion, die Anzahl der Proben und Menge des Aspirats haben ebenso wie Methode, Marker, Primer, illegitime Transkription, Kontamination mit Fremd-DNA und die Detektion biologisch inaktiver Tumorzellen (dormant cells) einen beachtlichen Einfluss auf die Ergebnisse und machen daher den direkten Vergleich der Studien schwierig. Borchers et al. [Borchers 2000] machten auf dieses Problem aufmerksam, indem sie eine vergleichende Studie durchführten, bei der sie unterschiedliche Materialien mit verschiedenen Methoden auf diverse Marker untersuchten. Es kam zu differierenden Ergebnissen für gleiche Gewebeproben.

6.1.1.1 Evaluation des Mediums

Das Blut eignet sich ebenso wie das Knochenmark während des gesamten Krankheitsverlaufs hervorragend als Probematerial, da es minimalinvasiv gewonnen wird und damit eine gute Compliance der Patienten angenommen werden kann. Beides sind außerdem Orte hoher Zelldichte, und Zellen epithelialen Ursprungs, wie die Tumorzellen solider Tumoren, lassen sich gut in mesenchymalem Gewebe auffinden [Schlimok 1990; Burchill 1995]. Das Konzept dieser Tumorzell-Detektion wurde Anfang der 80er Jahre von Wissenschaftlern am Royal Marsdon Hospital und am Ludwig Institute durch die Anwendung von Immun-Antikörpern spezifiziert [Dearnaley 1981].

6.1.1.1 Knochenmark

Rohr und Hegglin beschrieben 1936 erstmals den Nachweis disseminierter Tumorzellen aus Knochenmarkaspiraten des Sternums [Rohr 1936]. Der Nachweis von Zellen erfolgte damals nach morphologischen Kriterien.

In den 70er-Jahren beschäftigten sich Hämatologen eingehender mit dem Knochenmark und nutzten es für diagnostische Zwecke und zum Staging von Tumoren aus dem hämato-lymphogenen Formenkreis [Rosenberg 1972]; 1979 untersuchten Cohen et al. [Cohen 1979] das Knochenmark von 104 Patienten mit verschiedenen nicht-hämatologischen Karzinomen (Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinom, Rhabdomyosarkom und Chordom) und fanden eine große Übereinstimmung (70-80 %) zwischen ihren Ergebnissen und den etablierten Stagingverfahren (klinische Knochenbeteiligung, röntgenologischer und skelettszintigraphischer Nachweis von Metastasen). Sie plädierten dafür, bei ausgewählten Karzinompatienten nicht auf die Möglichkeit des Metastasennachweises im Knochenmark durch Biopsie zu verzichten.

Ende der 70er- und Anfang der 80er-Jahre versuchten immer mehr Fachrichtungen, aus dem Knochenmark sinnvolle Informationen zu erhalten. Dieses Bestreben war nicht immer von Erfolg gekrönt. Es gab viele Niederlagen und die Leitlinien änderten sich von Jahr zu Jahr. Früh versuchten die Urologen, mit Hilfe von Tumorzellen im Knochenmark prognostische Aussagen machen zu können. Crisp plädierte 1976 zunächst dafür, gerade bei röntgenologisch unauffälligem Knochenbefund die Untersuchung des Knochenmarks zu nutzen [Crisp 1976]. Bereits zwei Jahre später jedoch warnte Pontes davor, mit colorimetrischen und immunchemischen Methoden untersuchte Knochenmarkproben zum Staging von Prostatakarzinomen zu benutzen. Er fand einen Anteil von 61 % falsch-positiven Ergebnissen bei der Vergleichsgruppe [Pontes 1978]. Auch beim Bronchuskarzinom konnten keine durchschlagenden Erfolge erzielt werden. 1979 untersuchten Gutierrez et al. das Knochenmark ihrer Bronchuskarzinom-Patienten und rieten, ebenso wie Mead et al. 1985, von einer routinemäßigen Knochenmarkpunktion ab [Gutierrez 1979; Mead 1985].

Auch Untersuchungen beim Neuroblastom [Carlsen 1981] und beim Mammakarzinom [Cruciani 1983] Anfang der 80er Jahre konnten die Knochenmarkpunktion beim

Staging nicht als unabhängigen Prognosefaktor bestätigen, es konnten lediglich Tendenzen festgestellt werden.

1984 warfen Frisch et al. in einer groß angelegten Studie mit 1800 Proben von 1725 Patienten mit verschiedenen Karzinomen neue Diskussionen um die Knochenmarkbiopsie im klinischen Stagingverfahren auf und ermunterten zu weiteren Untersuchungen [Frisch 1984].

Inzwischen ist sowohl für das Mammakarzinom [Braun 2000; Wiedswang 2006; Slade 2007] als auch für das Neuroblastom [Cheung 2004; Corrias 2004] das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt und etabliert. Für das Mammakarzinom gibt es Studien, die eine Regression disseminierter Tumorzellen im Blut oder Knochenmark unter adjuvanter und auch unter palliativer Chemotherapie belegen [Manhani 2001].

Neben anderen Karzinomen [Soeth 1997] konnte inzwischen auch für das Pankreaskarzinom in einigen Studien dargelegt werden, dass das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (überwiegend nachgewiesen mit der Immunocytochemie) tendenziell mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [van Heek 2001; Roder 1999; Vogel 2001 und 2002; Soeth 2005]. Viele Studien sind jedoch negativ ausgefallen [Bostick 1998; Braun 1999; Juhl 1994; Vogel 1999], so dass eine generelle Empfehlung für den Routineeinsatz dieser Methode im klinischen Alltag bisher nicht ausgesprochen wurde. Ein Grund für das Scheitern sind sehr unterschiedliche Detektionsraten. Die hohe Variabilität der Detektionsraten kann unter anderem auf die unterschiedliche Lokalisation der Knochenmarkaspiration zurückgeführt werden. Bonavina et al. sowie O'Sullivan et al. konnten substantiell höhere Nachweisraten im Knochenmark von Rippen im Vergleich zu Beckenkämmen dokumentieren (79 % vs. 8 % und 80 % vs. 15 %). Eine Erklärung hierfür könnte die höhere Perfusionsrate sein [O'Sullivan 1999; Bonavina 2001]. Des Weiteren geht man davon aus, dass die Tumorzellen umgebende Faktoren einen Einfluss auf ihr Verhalten haben. In-Vitro-Studien mit Mammakarzinomzellen haben ergeben, dass die Tumorzellen vom Knochenmarkstroma erkrankter Patienten zum Wachstum und zur

Streuung angeregt wurden [Nicola 2003]. Für das kolorektale Karzinom konnten diese Erkenntnisse nicht bestätigt werden [Kjonnixsen 1992; Dong 1994; Fodstadt 1994]. Geht man davon aus, dass das kolorektale Karzinom dem Pankreaskarzinom in seinem Verhalten sehr ähnlich ist, könnte dadurch erklärt werden, warum nur bei einem kleinen Teil der Patienten Skelettmetastasen zu finden sind. Das Pankreaskarzinom metastasiert typischerweise nicht in das Knochenmark und den Knochen, sondern eher intraabdominell bzw. in die Leber [Griffin 1990; Westerdahl 1993; Frelove 2006]. Trotzdem sind zum Zeitpunkt der Diagnose bei einem größeren Teil der Patienten disseminierte Tumorzellen im Knochenmark zu finden. Während das loko-regionäre und intra-abdominelle Wachstum durch konventionelle diagnostische Möglichkeiten überprüft werden kann, erfolgt diese systemische Ausbreitung zunächst unbemerkt.

6.1.1.1.2 Blut

Bis dato sind Untersuchungen zu disseminierten Tumorzellen im Blut weitaus seltener Gegenstand intensiver Forschung. Literatur dazu ist deutlich limitiert und zusätzlich stark divergierend in ihren Ergebnissen. Als sicher gilt, dass alle soliden Tumoren, die bis jetzt untersucht wurden, nach Einbruch in das Gefäßsystem Tumorzellen über das Blut streuen und dass diese epithelialen Tumorzellen dort detektiert werden können [Burchill 1995]. Doch die Detektionsraten im Blut werden generell als niedriger angegeben und das Blut dadurch als suboptimaler Detektionsort dargestellt [Soeth 1997; Wyld 1998; Foodstad 1998]. Eine häufige Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die, dass Tumorzellen eventuell diskontinuierlich vom Primärtumor in die Zirkulation abgegeben und/oder nicht gleichmäßig verteilt werden [Castells 1998; Jonas 1996]. Letzterem Problem kann man entgegenwirken, indem mehrere Blutproben abgenommen und untersucht werden. In einigen Studien konnte so ein Anstieg der Detektionsrate erreicht werden [Wyld 1998; Wharton 1999]. Deshalb ist in dieser Studie präoperativ neben zentralvenösem Blut auch arteriell und peripher venöses Blut entnommen worden, welches neben dem portalvenösen Kreislauf zusätzlich den Lungenkreislauf und den großen arteriellen Kreislauf durchlaufen hat.

Die prognostische Aussagekraft von disseminierten Tumorzellen im Blut wurde bisher am ausführlichsten beim Kolorektalen Karzinom und beim Mammakarzinom

untersucht. Während sich beim Mammakarzinom der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark durchgesetzt hat, sind die Resultate der Untersuchungen des peripheren Blutes noch lange nicht eindeutig, abgesehen von der Einstimmigkeit vieler Arbeitsgruppen darin, dass der Tumorzellnachweis im Blut dem im Knochenmark unterlegen ist und weitere Studien notwendig sind, um diese Methode als Routinemethode zu etablieren [Pierga 2004; Benoy 2006; Wiedswang 2006]. Ähnlich sieht es beim Kolorektalen Karzinom aus. Bosch postulierte zwar bereits 2003, dass disseminierte Tumorzellen, die perioperativ mit cytologischen oder immunhistochemischen Methoden detektiert werden, als unabhängiger Prognosefaktor benutzt werden sollten und hierdurch eine Gruppe von Patienten identifiziert werden könne, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleide. Allerdings differenziert er nicht zwischen peripherem und intraoperativ gewonnenem mesenterialen Blut sowie Flüssigkeit, die durch eine Peritoneal Lavage gewonnen wurde und durch die kontinuierliche Tumorausbreitung einen wesentlich höheren Anteil an Tumorzellen enthalten kann [Bosch 2003]. Bei den wenigen anderen Tumor-Entitäten, zu denen es Studien gibt (solide gynäkologische Tumoren [Schouli 2003] und Neuroblastom [Mattano 1992; Bernard 2001; Cheung 2004; Kuroda 2005]), sind ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig, um prognostische Relevanz nachzuweisen. Auch für das Pankreaskarzinom konnte bisher kein Markernachweis im Blut als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt werden [Z'graggen 2001; Juhl 1994; Vogel 1999; Hoffmann 2007]. Der Tumorzellnachweis im Blut ist bis dato rein informativ und nicht prognostisch verwertbar.

6.1.1.2 Probenaufbereitung

Ein Problem der Methode ist die Anfälligkeit gegenüber äußeren Einflüssen. Problematisch sind DNA-Verunreinigungen in den für die Analytik verwendeten Reagenzien und Materialien sowie Kontaminationen, die während der Probenaufbereitung und Analyse auftreten können. Daher müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden, um Kontaminationen und in dessen Folge falsch-positive Ergebnisse in der Diagnose zu vermeiden.

Die Patientenproben müssen sorgfältig und unter sterilen Bedingungen gewonnen werden, am besten in einem geschlossenen System. Als problematisch anzusehen ist in diesem Zusammenhang die Entnahme der Proben durch einen frischen Hautstich (Knochenmarkpunktion), durch den möglicherweise epitheliale Zellen in die Probe gelangen. Einer Kontamination des Blutes in diesem Arbeitsschritt wurde durch die Blutentnahme über den liegenden Venenverweilkatheter, das Verwerfen der initialen Probemenge sowie die Verwendung des geschlossenen Blutentnahmesystems vorgebeugt. Zu beachten ist weiterhin, dass der Zusatz von Natrium-Heparin im Blut zu einer Inhibition der Taq-Polymerase führen kann [Nohara 1999; Satsangi 1994]. Aus diesem Grund ist in der vorliegenden Studie lediglich EDTA dem Blut zugesetzt worden.

Im weiteren Arbeitsablauf muss unter besonderen sterilen, standardisierten Arbeitsbedingungen (z.B. standardisiertes Autoklavieren) gearbeitet werden. Durch das Tragen von Handschuhen wird die Verunreinigung der Materialien durch Hautzellen auf ein Minimum reduziert. (Einmal-) Pipettenspitzen wurden nach jedem Schritt gewechselt und verworfen, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.

Neben den Arbeitsvorgängen haben jedoch auch die Methoden und die verwendeten Reagenzien einen Einfluss auf die Ergebnisse. Deshalb wurden alle Lösungen mit RNase-freiem Wasser nach Ge (Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC)) angesetzt [Ge 1998]. Des Weiteren wurden, wenn möglich, alle Arbeitsvorgänge auf Eis bzw. in Kühlzentrifugen bei ca. 4 °C durchgeführt, um die Aktivität freier RNase maximal zu reduzieren (Temperaturoptimum der RNAsen liegt zwischen 35 und 70 °C [Sana 2006]).

Problematisch für die Etablierung im klinischen Alltag ist sicher auch die Kanzerogenität einiger Materialien, wie zum Beispiel des Ethidiumbromids oder der UV-Strahlung. Durch sorgfältiges Arbeiten und einfache Hilfsmittel, wie das Tragen von Handschuhen, können diese Gefahren jedoch deutlich reduziert werden.

6.1.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Aufgrund einer möglichen Expression von CK 20 in Granulozyten (siehe unten) [Jung 1998; van Eekelen 2000; Vlems 2002] ist die Methode der Wahl für die Isolierung der Zielzellen (Verwendung von Vollblut, Isolation der gesamten Lymphozyten durch Lyse der Erythrozyten oder Isolation der mononukleären Zellfraktion durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten) noch nicht endgültig geklärt. Bisher gibt es kein Verfahren, mit dem auch Granulozyten-Reste sicher aus der Probe eliminiert werden.

Bei Studien mit Vollblut, d.h. ohne vorherige Isolation einer Zellfraktion, wurden hohe Anteile von falsch-positiven Ergebnissen bzw. der Nachweis einer Hintergrundexpression von CK 20 in Negativkontrollen festgestellt [Schuster 2004]. In verschiedenen Studien hat sich die Separation von mononukleären Zellen mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gegenüber der Erylyse wegen der Toxizität der verwendeten Reagenzien Ammoniumchlorid und Kaliumhydrogenykarbonat als effektiver erwiesen [Schitteck 2001; Mikolojek 2002].

Ein Schwachpunkt, der die Ficoll-Gradienten-Separation als Routine-Verfahren in Frage stellt, ist ein potentieller Tumorzellverlust, wie von Krüger nachgewiesen wurde [Krüger 2000]. Es sind jedoch unbedingt weitere Studien erforderlich, um diese Beobachtung sicher zu belegen. Ebenfalls ist nicht geklärt, wie sich etwa Tumorzell-Cluster von mehreren zusammengelagerten Tumorzellen während einer Zentrifugation über einen Dichtegradienten verhalten, und ob diese möglicherweise während der Prozedur verloren gehen.

6.1.1.2.2 Isolierung von RNA

Bei den gängigen Verfahren zur Nukleinsäure-Isolierung werden sämtliche Zellen aufgelöst. Dadurch wird das Probematerial weitgehend zerstört und steht nicht mehr für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die ursprüngliche Methode der Zellauflösung mit Guanidinium-Thiozyanat, 1979 von Chirgwin und Mitarbeitern entwickelt [Chirgwin 1979], wurde zunächst im Jahre 1987 von Chomczynski und Sacchi [Chomczynski 1987] durch die Zugabe eines Phenol-Chloroform-Mixes praktikabel gemacht. Mit der neuen Methode ließen sich größere Probenmengen in kürzerer Zeit untersuchen. Dies führte jedoch zu einer ungewollten DNA-Kontamination und damit zu ungenauen Ergebnissen. Siebert und Chenchik modifizierten die Technik weiter und erreichten eine Reduzierung der DNA-Kontaminationsraten durch eine zusätzliche 30-minütige Zentrifugation nach Zusatz von Isopropanol [Siebert 1993]. Diese, auch in der vorliegenden Studie verwendete Technik, hat sich bis heute etabliert und wurde erfolgreich in vielen Arbeiten verwendet.

6.1.1.2.3 Reinheitskontrolle der isolierten RNA

Die Reinheitskontrolle wurde nach dem Prinzip der Multiwellenlängenmessung durchgeführt. Studien ergaben, dass sowohl das Lösungsmedium als auch der pH-Wert der Lösung einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis haben. Wilfinger und Mitarbeiter beschrieben eine Verbesserung der $A_{260/280}$ ratio von 1,5 auf 2 durch eine Anhebung des pH-Wertes von 5,4 auf 8 [Wilfinger 1997]. Beim Gebrauch von 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris-HCl) bei einem pH-Wert von 7-10 beschrieb Okamoto eine Erhöhung der ratio auf mehr als 2,17, während er beim Einsatz von RNase-freiem Wasser, im Gegensatz zum destillierten Wasser, eine Erhöhung der Absorption bei 280 nm und damit eine Verringerung der ratio feststellte [Okamoto 2000]. Durch den Einsatz von RNase-freiem Wasser, welches eher zu einem geringeren Absorptions-Quotienten führt, und die Festlegung des Qualitätsmerkmals „Absorptionsquotient muss größer sein als 1,5“ kann von einer weitgehend intakten, reinen und proteinfreien RNA ausgegangen werden, so dass die folgende PCR die größtmögliche Ausbeute erbringen sollte.

6.1.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die histologische Methode (z.B. Immunhistologie/-chemie), eine kosten- und zeitintensive Technik, bei der in der Routineuntersuchung Mikrometastasen leicht übersehen werden können und die so zu widersprüchlichen Studienergebnissen geführt hat, konnte sich bisher nicht im klinischen Alltag etablieren. Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden in die Tumordiagnostik ergab sich ein weites Feld neuer Möglichkeiten. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der PCR durch die bekannten Primersequenzen erweist sich als Vorteil gegenüber der Immunhistochemie. Während der immunhistochemische Nachweis mehrere Tage dauern kann, lassen sich Tumorzellen mittels auf reverser Transkriptase basierender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) häufig innerhalb weniger Stunden nachweisen. Es kann außerdem eine größere Zellzahl mit einer höheren Sensitivität untersucht werden [Borchers 2000; Chausovsky 1999; Perey 2001; Smith 2000]. Laut Schönfeld et al. ist es möglich, eine einzelne Tumorzelle durch die RT-PCR in 10^6 Knochenmarkzellen zu detektieren [Schönfeld 1997]. Z'graggen et al. war es sogar gelungen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 96 % eine Tumorzelle unter 2×10^6 zu entdecken [Z'graggen 2001]. Für die Polymerase-Kettenreaktion wird vielfach eine Sensitivität von bis zu 1×10^7 beschrieben [Soeth 1996; Zippelius 1997; Traweek 1993; Jung 1998; Fields 1996], während die maximal erreichbare Sensitivität für die Immunzytologie als 2×10^6 angegeben wird [Naume 1998]. Die Wichtigkeit einer möglichst hohen Sensitivität wird deutlich, wenn man sich veranschaulicht, dass die klinische Anwendung einer Methode, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, nur dann Sinn macht, wenn es möglich ist, in einem Zellpool von einer Million Zellen eine einzige Tumorzelle zu finden. Der Sensitivitätsunterschied zwischen Immunzytologie und PCR wird bei Tumorzellverdünnungen von 10^{-6} bis 10^{-7} relevant. In diesem Verdünnungsbereich liefert die Polymerasekettenreaktion noch zuverlässig einen Tumorzellnachweis, während er außerhalb der Nachweisgrenze der Immunzytologie liegt.

Die Polymerase-Kettenreaktion hat sich bisher als sensitivste Methode für den Nachweis okkultur Tumorzellen erwiesen. Sie wurde Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis (Nobelpreis für Chemie 1993) konzipiert und in Zusammenarbeit mit Ehrlich und Mitarbeitern [Mullis 1987] zur Anwendung gebracht. Gegen Ende der 80er wurde

die Methode weiterentwickelt zu einem zweistufigen Prozess, der heutigen nested-PCR. Auf diese Weise konnte die Sensitivität erheblich gesteigert werden [Levedakou 1989; Delfau 1990; Banerjee 1997]. In einem weiteren Entwicklungsschritt wurde die sogenannte real time-PCR (Echtzeit-PCR) entwickelt, die den quantitativen Nachweis der Markergene ermöglicht. Ihre Vorteile sind die kürzere Analysedauer und ein verringertes Kontaminationsrisiko durch ein während des gesamten Prozesses geschlossenes System. Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle sicher, dass der quantitative Nachweis der real time-PCR im Gegensatz zum rein qualitativen Nachweis bei der konventionellen PCR, stark abhängig ist vom Tumorzellaufkommen im Medium zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Durch die bereits oben erwähnte diskontinuierliche Tumorzellstreuung und die zufällige Verteilung der Tumorzellen im gesamten Kompartiment (Blut oder Knochenmark), ist das Resultat sicher nicht repräsentativ und sollte nicht ohne Skepsis als Prognosefaktor verwertet werden. Auch vor dem Hintergrund der Heterogenität der Tumorzellen und unterschiedlicher Expressionslevel der Marker, relativiert sich jegliche quantitative Korrelation zwischen der nachgewiesenen Konzentration des Markers und der Tumorzelllast. Ein weiterer Nachteil ist die Abhängigkeit korrekter Werte von der RNA-Integrität; hohe RNA-Qualität ist die Voraussetzung für valide Werte. Ein anderes Problem ist die Schwierigkeit, falsch-positive Ergebnisse durch illegitime Hintergrundexpression (siehe unten) von richtigen Ergebnissen zu unterscheiden. Bei quantitativen Ansätzen ist daher das Festsetzen eines Schwellenwertes notwendig, was andererseits zum Verlust richtiger Ergebnisse führen kann. Des Weiteren ist bei dieser Methode für eine sichere Interpretation eine Optimierung der Parameter obligat, damit es mit jedem Zyklus nach Möglichkeit zu einer kompletten Verdoppelung der Amplifikate kommt. Aus oben genannten Gründen kann daher eine quantitative Aussage nur über die Anzahl nachgewiesener cDNA bzw. RNA getroffen werden, nicht über die tatsächliche Tumorzelllast. Der Vorteil dieser kostenintensiveren Methode muss also noch evaluiert werden [Fleige 2007].

Ein Nachteil der konventionellen PCR ist sicher die Tatsache, dass hier keine Differenzierung vorhandenen Genmaterials stattfindet. Das heißt, durch die hohe Anfälligkeit für eine Kontamination kann es zu einem Verlust der Spezifität kommen

[Fleige 2007; Bustin 1998; Soong 2001]. So können z.B. DNA-Fragmente, die aus degenerierten Tumorzellen freierwerden und ins Blut ausgeschwemmt werden, von phagozytären Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Enthalten sie eine Targetsequenz, die in der RT-PCR amplifiziert wird, werden die Ergebnisse somit durch das nur scheinbare Vorhandensein neoplastischer Zellen fehlinterpretiert.

Normalerweise wird eine Denaturierung bei 94 °C für 1 min empfohlen, die Zeit kann jedoch durch Erhöhung der Temperatur verkürzt werden [Imnis 1990]. Damit ist der Prozess der Denaturierung für 30 sec bei 95°C in der vorliegenden Studie vorschriftsgemäß durchgeführt worden.

Die Elongation/Extension sollte bei 70 bis 72 C (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) für 0,5 - 3 min pro Zyklus durchgeführt werden. Da die Taq-Polymerase eine Halbwertszeit von 30 min hat, sollte die Anzahl der Zyklen nicht höher als 25 - 35 pro Durchlauf sein. Laut Imnis und Gelfand [Imnis 1990] sind 25 - 30 Zyklen ausreichend, um die Zielsequenz als Bande sichtbar zu machen. Durch den so genannten „Plateau-Effekt“ ab 30 Zyklen steigert eine zunehmende Anzahl von Zyklen nicht den Ertrag (ab 0,3-1,0 nM). Als Ursachen hierfür werden die Degradation der Reagenzien, die End-Produkt-Inhibition und die Konkurrenz der Primer-Bindung bei hoher Produkt-Konzentration (10 nM) [Imnis 1990] genannt.

Die beiden Schritte der nested-PCR sind als einzelne Vorgänge anzusehen. Hier wird die Spezifität der Produkte deutlich erhöht, da alle nicht-spezifischen Produkte des ersten Amplifikationszyklus im zweiten Zyklus nicht mehr amplifiziert werden.

6.1.2 Speziell

6.1.2.1 Marker: Zytokeratin 20

Da das Pankreaskarzinom ein Adenokarzinom ist, eignen sich als gewebespezifische Marker besonders die Zytokeratine [Burchill 1995]. Keratine sind als Intermediärfilamente Hauptbestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen [Böcker 2001; Hosch 2002]. Es gibt 20 weitgehend zellspezifische Zytokeratine [Böcker 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell nach Zellen gesucht, die Zytokeratin 20 exprimieren. Moll et al. wurden 1992 auf diesen Subtyp aufmerksam [Moll 1992] und entschlüsselten bereits ein Jahr später das entsprechende Genom [Moll 1993]. CK 20 wird unter anderem von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert und sollte in hämatopoetischen Zellen nicht nachweisbar sein. Yun wies eine Gewebespezifität von 97,6 % für CK 20 nach. Er belegte, dass dieser Marker nur von Epithelzellen zu einem ausreichend, in single-round-RT-PCRs detektierbaren Level exprimiert wird [Yun 2000]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Zytokeratin 20 aufgrund der charakteristischen Expression in gastrointestinalen Epithelzellen und dem unveränderten Expressionsmuster beim Übergang von normalem zu malignem Wachstum einen sehr spezifischen und sensitiven Marker für den Nachweis gastrointestinaler Tumoren darstellt [Soeth 1996, 1997; Burchill 1995; Jung 1998; Calnek 1993; Moll 1993; Wyld 1998]. Während Moll und Matros das Tumorgewebe direkt untersuchten [Moll 1992 und 1993; Matros 2006], haben Chausovsky et al. [Chausovsky 1999] Blutproben von Patientengruppen mit nachgewiesenen Metastasen verschiedener Karzinome und von einer Kontrollgruppe untersucht und kamen auf dasselbe Ergebnis. Chausovsky et al. haben festgestellt, dass bei den Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, speziell mit Pankreaskarzinomen, in einem sehr viel höheren Prozentsatz Zytokeratin 20-exprimierende Zellen gefunden werden können (Kolonkarzinom 64 %, Magenkarzinom 67 % und Pankreaskarzinom 79 %) als bei Patienten mit einem Lungenkarzinom (8 %) oder der gesunden Kontrollgruppe (0 %). Man muss jedoch einräumen, dass die Frage nach der konsistenten Expression von CK 20 in Tumorzellen nach wie vor nicht geklärt ist (siehe 6.1.3.2).

6.1.2.2 Primer

Der Primer ist ein kritischer Parameter, wenn es um die erfolgreiche Amplifikation der RNA geht [Ishii 2001]. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden 1996 von Soeth et al. publiziert [Soeth 1996].

Zunächst wurde eine Optimierung der Annealing-Temperatur angestrebt. Sowohl die Länge als auch die Sequenz des Primers steht in direktem Zusammenhang mit der Annealing-Temperatur [Rychlik 1990]. Es wird empfohlen, eine Annealing-Temperatur zu wählen, die etwa 5°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur liegt [Imnis 1990]. Die Schmelztemperatur T_m wurde mit folgender Formel berechnet [Wu 1991]:

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) \text{ } ^\circ\text{C}.$$

Daraus ergeben sich folgende Schmelztemperaturen:

Äußeres Primerpaar (PCR I; Sequenz 5' →3')

5'Primer (upstream) = CK 20 Iu = 68°C

3'Primer (downstream) = CK 20 Id = 72°C

Inneres Primerpaar (PCR II; Sequenz 5' →3')

5'Primer (upstream) = CK 20 IIu = 60°C

3'Primer (downstream) = CK 20 IID = 68°C.

Die im Prozess benutzte Annealing-Temperatur von 55°C liegt genau 5°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur von 60°C und entspricht damit dem Optimum.

Ist die Annealing-Temperatur zu niedrig, werden die Wasserstoff-Brücken zwischen den Basenpaaren nicht richtig gebildet und einer oder beide Primer setzen eventuell nicht an der Zielsequenz an, sondern binden an unspezifischen Stellen, deren Sequenz geringfügig von der Zielsequenz abweicht. Das kann von Vorteil sein, wenn auch ähnliche (z.B. durch Mutationen veränderte) oder angrenzende Zielsequenzen erfasst

werden sollen. Bei einer spezifischen Amplifikation ergibt sich hier jedoch das Problem einer möglichen Unterexpression der Zielsequenz. Auch eine zu hohe Annealing-Temperatur kann zu einer verringerten Primerbindung führen mit der Konsequenz einer Verminderung der Amplifikationsprodukte [Rychlik 1990; Ishii 2001]. Eine wichtige Schlussfolgerung aus dem oben Erwähnten ist, dass die Annealing-Temperaturen der einzelnen Primer möglichst dicht beieinander liegen sollten, um die höchste Effizienz zu zeigen. Laut Rychlik benötigt ein Primer in der Regel nicht mehr als 30 Sekunden, um effizient anzulagern. Die verwendete Zeit von 45 Sekunden für das Annealing dürfte also dementsprechend ausreichend gewesen sein.

Die optimale Länge eines Primers ist abhängig von der Zusammensetzung und vom Temperatur-Optimum des Gegen-Primers. Abgesehen davon, sollte die Primersequenz so komplex sein, dass die Wahrscheinlichkeit, dass er an eine andere Sequenz als die Zielsequenz anlagert, sehr gering ist. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $\frac{1}{4}$ kann eine einzelne Base (A,G,C oder T) gefunden werden. Für ein Basen-Duplett liegt die Chance bei $\frac{1}{16}$. Eine Abfolge von 16 Basen ist rein statistisch nur einmal in 4^{16} Basen zu finden. Das entspricht der Größe des menschlichen Genoms. Aus diesem Grund sollte der gewählte Primer mehr als 17 Basen enthalten (die vorliegenden Primer sind 18-21 Basen lang). Bei zu langen Primern jedoch erhöht sich selbst bei hohen Annealing-Temperaturen die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Bindungen [Rychlik 1990].

Die Zusammensetzung des Primers sollte ausgewogen sein, A, G, C und T sollten in etwa gleichen Anteilen vorkommen, wobei C und G mit 50 - 60 % wegen der stabileren Bindung leicht überwiegen sollten [Imnis 1990]. In diesem Punkt entsprechen die verwendeten Primer mit einem G/C-Anteil von 54 - 64 % nicht ganz den empfohlenen Kriterien.

6.1.3 Sensitivität und Spezifität

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die die Sensitivität und Spezifität der Methode der RT-PCR als Nachweismethode für okkulte Tumorzellen evaluieren. Dabei kamen die unterschiedlichen Arbeitsgruppen in einigen Bereichen zu einander widersprechenden Ergebnissen.

Auf eine Kontrollgruppe wurde in der vorliegenden Studie bewusst verzichtet. Die Etablierung der CK 20 RT-PCR als generelle Nachweismethode für disseminierte Tumorzellen beim Pankreaskarzinom wurde in einer früheren Fall-Kontroll-Studie an der Universität Münster mit der gleichen Methode untersucht [Schnieder 2003]. In dieser Studie wurden 12 der 32 Karzinompatienten positiv getestet (Sensitivität von 37,5 %). Kein Patient der Kontrollgruppe (n = 34) war CK 20-positiv (Spezifität von 100 %). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien, meistens jedoch mit höheren Sensitivitätsraten. Zhang et al. wiesen CK 20 bei Pankreaskarzinom-Patienten mit einer Sensitivität von 57,5 % nach bei 100 % Spezifität [Zhang 2005]. Chausovsky et al. untersuchten 1999 Patienten mit verschiedenen Tumoren auf die Expression von CK 20 im Blut. Für das Pankreaskarzinom wurde hier mit 78,5 % eine deutlich höhere Sensitivität erreicht bei ebenfalls keinen falsch-positiven Ergebnissen (100 % Spezifität) in der gesunden Kontrollgruppe [Chausovsky 1999]. Die Abwesenheit von CK 20 bei gesunden Freiwilligen konnte auch in weiteren Studien bestätigt werden. Wang et al. konnten lediglich bei einem von 30 gesunden Freiwilligen CK 20 im peripheren Blut nachweisen. [Wang 2006]. 10 Jahre zuvor haben Soeth et al. mittels RT-PCR ebenfalls bei nur einem Patienten der Kontrollgruppe (n = 16) CK 20 im Knochenmark gefunden. Dieser Patient litt an familiärer adenomatöser Polyposis [Soeth 1996].

Schoenfeld et al. untersuchten 1997 den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Brustkrebs. Dabei stellten sie eine zehnmal höhere Sensitivität bei gleicher Spezifität für die Detektion CK 19-positiver Zellen durch die RT-PCR im Gegensatz zu immunhistochemischen Methoden fest [Schönfeld 1997]. Trotz einer besseren Sensitivität stellen die großen Unterschiede bezüglich der Sensitivitätsrate und das Vorkommen CK-positiver Zellen im Blut oder Knochenmark gesunder Probanden die klinische Relevanz dieser Nachweismethode in Frage. Im

Folgenden soll daher auf die Ursachen für falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse eingegangen werden.

6.1.3.1 Spezifität - Ursachen für falsch-positive Ergebnisse

Die Spezifität eines Testes beschreibt die Eignung eines Verfahrens bei Gesunden keine falsch-positiven Werte zu produzieren. Die Ursachen für falsch-positive Ergebnisse können ganz unterschiedlicher Art sein. Der wahrscheinlich einfachste Grund ist die Kontamination der Probe mit Fremd-DNA oder RNA, z.B. durch Hautpartikel. Ein weiteres Problem ist, dass es durch die Auflösung der Zellen beim Freisetzen von Genmaterial zu einer Mischung aus RNA von Tumorzellen (Ziel-RNA) mit anderer RNA (Nicht-Ziel-RNA) kommt, die durch die verwendeten Verfahren nicht elimiert werden kann. Dies kann zu Problemen bei der PCR-Amplifikation von Sequenzen für die Gen-Detektion und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Um eine Expression von nicht-Ziel-RNA auszuschließen, wurde aus Sicherheitsgründen nach einem Vorschlag von Ge [Ge 1998] vorgegangen. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser gewaschen. Anschließend wurde zur Überprüfung der Korrektheit der Amplifikate die Gel-Ektrophorese mit Auswertung der Basenpaarlängen der PCR nachgeschaltet. Hierdurch wird eine Expression der Zielgene überprüft, Nicht-Ziel-RNA fällt durch veränderte Basenpaarlängen auf.

Die mangelnde Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion wird von vielen Forschern als limitierender Faktor im Nachweis von Mikrometastasen genannt. Die Arbeitsgruppen kamen in den vergangenen Jahren zu kontroversen Ergebnissen. Große Unterschiede hinsichtlich der erreichbaren Spezifität der RT-PCR waren vor allem für andere Zielsequenzen, wie z.B. die des Zytokeratins 19, gefunden worden. In einigen der verwendeten PCR-Essays fanden sich bis zu 75 % falsch-positive Ergebnisse [Krismann 1995; Jung 1997, 1998 und 1999; Zippelius 1997], andere Arbeitsgruppen dagegen erreichten hohe Spezifitätsraten mit ausschließlich negativen PCR-Befunden in den Kontrollgruppen ohne Karzinom [Zach 1999; Burchill 1995].

Eine ektope illegitime Transkription (low-level-Transkription gewebespezifischer Gene in nicht-spezifischen Zellen) durch die Existenz von Pseudogenen [Tschentscher 1997;

Z'graggen 2001; Dimmler 2001] wird unter anderem als Störfaktor diskutiert. Laut Hesse et al. exprimieren von den bisher 208 entschlüsselten Keratin-Genen tatsächlich nur 49 Gene mit Keratinen. Die übrigen Gensequenzen sind inaktive Fragmente oder Pseudogene, die in über 90 % als Gene der Keratine 8 oder 18 transkribiert werden [Hesse 2001]. Laut Ruud sind für den Marker CK 20 bisher keine Pseudogene bekannt [Ruud 1999]. Arbeiten von Dimmler et al. ergaben folgendes Ergebnis: Sie verglichen die „background expression“ verschiedener Zytokeratine (7, 8, 18, 19 und 20) in Zellreihen von gastrointestinalen Karzinomen und gesunden Kontrollgruppen und fanden bei letzterer Expressionen der Zielgene zwischen 16,7 % (CK 7) und 95 % (CK 18). Zytokeratin 20 wurde nur zu 29 % exprimiert. Der Anteil falsch-positiver Ergebnisse liegt somit unter den verglichenen Zytokeratinen an zweitniedrigster Stelle [Dimmler 2001]. Dimmler et al. sehen für diesen, auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Marker, kein Problem in der illegitimen Transkription der Zielgene. Das Risiko falsch-positiver Ergebnisse für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Marker (CK 20) sieht er als vernachlässigbar gering an.

Die Spezifität des Markers wurde auch durch die von einigen Arbeitsgruppen nachgewiesene Hintergrundexpression in normalen Granulocyten aus Blut, Knochenmark und anderen Körperflüssigkeiten von nicht an Krebs erkrankten Patienten in Frage gestellt [Jung 1999; van Eekelen 2000; Vlems 2002]. Neben der low-level Expression in Granulozyten ist auch eine low-level Expression in anderen hämatopoetischen Zellen als möglicher Störfaktor beschrieben worden. So konnten Traweek et al 1993 [Traweek 1993] eine Expression der Zytokeratine 8, 18 und 19 in Stromazellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs nachweisen. Krismann et al fanden [Krismann 1995] eine Expression von CK 19-mRNA in Zellen des peripheren Blutes. Es könnte also sein, dass trotz der strengen Regulierung des Gens die Zielsequenz durch low-level Expression exprimiert und in der RT-PCR detektiert wird.

Eine mögliche Ursache für die „background expression“ von Zytokeratinen durch gesunde Zellen ist möglicherweise eine Induktion durch Cytokine oder Interleukine. Jung et al. befassten sich 1998 [Jung 1998] intensiv mit der Rolle, die die Auswahl der Kontrollgruppe auf die Resultate der RT-PCR (Zielsequenzen: CEA und CK 19) haben

könnte. Sie teilten das inhomogene Patientenkollektiv in kleinere homogenere Gruppen auf und untersuchten diese separat auf falsch-positive Ergebnisse. Die gesunden Patienten und solche mit hämatologischen Erkrankungen erbrachten ausschließlich negative Ergebnisse, die Gruppe der Patienten mit entzündlichen Erkrankungen dagegen bis zu 60 % positive. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass durch eine Inflammationsreaktion des Körpers eine Induktion hämatopoetischer Zellen zur Expression dieser normalerweise epithelspezifischen Marker erfolgen könnte. Um den Einfluss der chronischen Entzündungsreaktion des Körpers als möglichen biologischen Faktor auf die mRNA-Transkription genauer zu untersuchen, führten Jung und Mitarbeiter in vivo und in vitro Untersuchungen mit Zytokinen durch und erklärten die 60 % falsch-positiven Ergebnisse in dieser Studie mit dem Einfluss von Interleukinen und Zytokinen, die bei chronischen Entzündungsreaktionen freigesetzt werden [Jung 1998]. In einer späteren Studie (Zielsequenz CK 20) litt ebenfalls die Kontrollgruppe mit der höchsten Expression (40 %) in normalen Granulozyten an chronischen Entzündungsreaktionen [Jung 1999]. Trotzdem muss man sich wohl wegen der hohen Expressionsrate bei Entzündungsreaktionen auch beim CK 20, wie bereits bei anderen zunächst sehr vielversprechenden Markermolekülen, von der Hoffnung verabschieden, mit diesem Zytokeratin eine Zielsequenz gefunden zu haben, die hochspezifisch ausschließlich von Karzinomzellen expremiert wird.

6.1.3.2 Sensitivität - Ursachen für falsch-negative Ergebnisse

Eine einfache Ursache für falsch-negative Proben könnte sein, dass die Ziel-RNA durch Unterbrechung der Kühlkette oder durch Kontamination mit RNAsen zerstört wurde. Des Weiteren könnten nicht genauer eruierbare Fehler in der RT-PCR aufgetreten sein, durch die Qualitätskontrollen sollte dieser Fehler jedoch gering sein. Andere Ursachen könnten tumorbedingt sein, z.B, dass das Expressionsniveau des Markers zu niedrig ist weil die Anzahl der Tumorzellen in der Probe nicht groß genug ist (hier wird die Notwendigkeit einer ausreichend großen Menge Probematerial deutlich), um einen Nachweis zu erbringen. Ungeklärt ist bisher die Frage, ob möglicherweise der Differenzierungsgrad der Tumoren einen Einfluss auf die Sensitivität haben kann, wenn z.B. die Zellklone so niedrig differenziert sind, dass sie den gewebespezifischen Marker

überhaupt nicht mehr exprimieren können. Während Matros feststellte, dass nur 63 % der überwiegend mittel- bis wenig differenzierten Primärtumoren überhaupt CK 20 exprimierten [Matros 2006], definierte Soeth eine Subgruppe von Patienten mit gut bis mittelmäßig differenzierten Tumoren, die besonders für die Zytokeratinuntersuchung als Prognoseindikator geeignet scheint [Soeth 2005]. Wildi et al. haben sogar nur in 11 von 24 (46 %) Tumorgewebeproben CK 20 mittels RT-PCR nachweisen können [Wildi 1999]. Zu bedenken ist jedoch, dass sich die Expressionslevel in disseminierten Tumorzellen möglicherweise von den Expressionsmustern im Primärtumor unterscheiden [Ghossein 2000]. So sind unterschiedlich hohe Expressionslevel für verschiedene Tumorgewebe, Zelllinien und Metastasen festgestellt worden [Guadagni 2001]. Eine Limitierung der Detektierbarkeit erfahren disseminierte Tumorzellen also durch unzureichende Transkription tumorassoziierter oder epithelspezifischer Gene, durch ungenügende Expression des Markers in mikrometastatischen Absiedlungen und durch die große Heterogenität der Tumorzellen selbst innerhalb eines Individuums [Zippelius 1997; Smith 2000; Aubele 1999; Lassmann 2002 und 2004]. Deshalb könnte die Sensitivität durch einen Ansatz, der mit mehreren Markern gleichzeitig arbeitet, erhöht werden [Bustin 1998; Conzelmann 2005; Guadagni 2001; Kufer 2002].

Die Arbeitsgruppe um Traystman et al. [Traystman 1997] beschäftigte sich intensiv mit der Möglichkeit einer Entstehung falsch-negativer PCR-Befunde und beschrieb die Schwierigkeiten bei der Herstellung von hohen Tumorzell-Verdünnungsstufen wie einer Tumorzelle in 10^7 mononukleären Zellen. Da die Anzahl der Tumorzellen im Rahmen des Verdünnungsprozesses mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden kann, ist die Wahrscheinlichkeit einer falsch-negativen Probe bei hohen Verdünnungen umso größer, je kleiner die Gesamtzellmenge ist. Aus ethischen Gründen war in unseren Versuchen die verwendete Materialmenge der Patientenproben auf 10^7 mononukleäre Zellen begrenzt. Es wäre also zu erwarten, dass die Anzahl an positiven PCR-Ergebnissen bei höheren Zellzahlen in den eingesetzten Proben noch zunähme. Andererseits wird von Traystman et al. auch eine Zunahme der falsch-positiven PCR-Ergebnisse mit zunehmender Menge diskutiert, so dass durch Erhöhung der eingesetzten Zellzahl allein keine Verbesserung der Sensitivität der PCR-Methode zu erwarten ist.

6.2 Bewertung des Patientenkollektivs

In die Studie wurden nur Patienten mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom als Primärtumor aufgenommen, so dass ein Zweitmalignom als Ursache für die disseminierten Tumorzellen ausgeschlossen werden kann. Ein Problem beim Vergleich unterschiedlicher Studien zum Nachweis der prognostischen Relevanz Zytokeratin-positiver Zellen bei verschiedenen Tumoren sind die oft heterogenen Patientengruppen hinsichtlich des Tumorstadiums, die stark variierenden Patientenzahlen und die unterschiedlichen Nachbeobachtungszeiträume. In dieser Studie beeinflussen vor allem die geringe Größe und die Heterogenität der Patientengruppe die Aussagekraft der Ergebnisse. Deshalb soll zunächst einmal geprüft werden, ob die Studienpopulation einer normalen Studienpopulation entspricht oder ob es Ausreißer gibt, die möglicherweise einen Einfluss auf die Vergleichbarkeit mit anderen Studien oder die Aussagekraft der Ergebnisse haben.

6.2.1 Lokalisation des Primärtumors

Die Lokalisation der Tumoren folgt den Verteilungen in den Literaturangaben (siehe Kapitel 2.3; 24 (73 %) Pankreaskopf-, 6 (18 %) Pankreaskörper- und 3 (9 %) Pankreasschwanzkarzinome) [Böcker 2001].

6.2.2 Alter

Das Haupterkrankungsalter der Patienten dieser Studie lag zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr und deckt sich damit mit den Literaturangaben und der Altersverteilung anderer Studien (siehe Kapitel 2.1). Gleiches gilt für den Altersmedian von 64 Jahren (31 bis 82 Jahre). Etwa ein Drittel der Patienten war unter 60 Jahre alt (siehe Tabelle 3.1) [Ridwelski 2001; Böcker 2001; Winter 2006; Cepeda 2006; Lin 2005; Z'graggen 2001; Roder 1999; Lillemoe 2000; Eloubeidi 2006; Howard 2006].

Die Überlebenszeit einiger älterer Patienten lag bei bis zu 36 Monaten, während die der unter 60-Jährigen bei maximal 14 Monaten lag. Das Alter hat jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben (siehe Kapitel 6.2). Eine statistische Signifikanz konnte weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse bestätigt werden (siehe Tabellen 5.8 und 5.11). Zu einem gleichen Ergebnis kam auch das

Robert-Koch-Institut [RKI 2008]. Des Weiteren konnten für den geprüften Marker keine Altersabhängigkeiten nachgewiesen werden.

6.2.3 Geschlecht

Das Erkrankungsverhältnis Männer zu Frauen lag in dieser Studie, wie auch in der Literatur beschrieben, eindeutig auf Seiten der Männer. Mit 1,75:1 liegt es im ähnlichen Bereich offizieller Angaben des Robert-Koch-Institutes mit 1,5:1 [RKI 2008] und anderer Veröffentlichungen (1,12-2:1) [Ridwelski 2005; Roder 1999].

Die Gesamt-5-JÜR in Deutschland beträgt 5 % für Männer und 4 % für Frauen [RKI 2006]. Laut Krejci [Krejci 2007] hat sich in einer 10-Jahres-Studie ebenfalls herausgestellt, dass Frauen eine signifikant schlechtere Prognose haben. Das kann in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Das Überleben ist vom Geschlecht unbeeinflusst (siehe Kapitel 5.6.1). Wegen der Eindeutigkeit wurde auf eine Darstellung im uni- bzw. multivariaten Modell verzichtet.

6.2.4 Staging

Das Tumorstadium, der Lymphknotenstatus des Primärtumors und die Metastasierung sind entsprechend gängigen Literaturangaben [Ridwelski 2005; TNM-Klassifikation 2005; Böcker 2001] etablierte Prognoseparameter beim Pankreaskarzinom.

Über 70 % der Patienten mit Pankreaskarzinom mussten bei der Diagnosestellung bereits in die UICC-Stadien III und IV eingeordnet werden (siehe Tabelle 3.2). Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Arbeitsgruppen; die Patienten der vorliegenden Studie folgten damit dem bekannten und vielfach beschriebenen Trend und entsprechen den Erwartungen [Z'graggen 2001; Ridwelski 2005; Böcker 2001; Roder 1999; Jemal 2002; Green 2004; Zhang 2005; Soeth 2005; Chausovsky 1999; Hoffmann 2007; Riall 2006].

Sowohl im Log-rank-Test (Kapitel 5.6.3) als auch im Cox-Regressionsmodell (Kapitel 5.7.2.1 und 5.7.2.2) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenszeiten einzelner Tumorstadien festgestellt und das UICC-Stadium somit in beiden Analysen als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt werden. Das mediane

Überleben ist im Stadium IIA mit 25 Monaten überdurchschnittlich gut, während in den Stadien IIB und III mit 7 und 6 Monaten kaum ein Unterschied erkennbar ist. Das mediane Überleben in den Stadien III und IV ist etwas schlechter als das der Patienten von Z'graggen et al. von 2001 [Z'graggen 2001] (6 vs. 10 Monate; 4 vs. 6 Monate). Das mediane Überleben im Stadium II ist mit 17 Monaten bei beiden Studien identisch.

6.2.5 Operation

Bei 76 % aller Patienten in dieser Studie wurde die Operation wegen Inoperabilität abgebrochen. Das heißt, nur 24 % der Patienten waren operabel und konnten sich der Radikaloperation unterziehen (siehe Tabelle 3.4). Damit liegt der Anteil der radikalen Resektionen in etwa im Bereich der Literaturangaben [Böcker 2001; RKI 2008; Roder 1999; Z'graggen 2001; Delpero 2004; Warshaw 1992; Conlon 1996], wo von resektablen Tumoren bei bis zu einem Drittel der Pankreaskarzinom-Patienten berichtet wird (10-30 %). Einige Autoren sprechen von Resektionsraten von bis zu 50 % bei fortgeschrittenem Tumorstadium [Vogel 1999; Freda 2004; Ridwelski 2005; Schliemann 2003]. Hier ist die kurative Intention doch eher fragwürdig.

6.2.5.1 Operationstyp

Die häufigste Operation zur Tumorentfernung in der Studie war die Operation nach Whipple-Kausch, die bei 6 der 8 (75 %) durchgeführten Operationen angewendet wurde. Dieses Vorgehen war auch in anderen Studien die Operation der Wahl (68-84 % der durchgeführten Radikaloperationen) [Freda 2004; Z'graggen 2001]. Zwei Patienten wurden pylorus-erhaltend operiert. Ursprünglich wurde angenommen, dass eine komplette Pankreatektomy im Bezug auf Rezidivbildung und Überlebensrate erfolgreicher sein würde als eine subtotale Pankreatektomy [Westerdahl 1993; Gudjonsson 1987]; dies hat sich jedoch nicht bestätigt. Die pylorus-erhaltende Pankreatektomy wird im Gegensatz zur klassischen Whipple-Operation als erfolgreicher im Bezug auf die postoperative metabolische Funktion und die Hormonregulation beschrieben. Sie bietet dadurch eine höhere Lebensqualität ohne signifikanten Unterschied in der Radikalität, in der Rezidivbildung und im Überleben [Khe 2004; Kennedy 2007; Seiler 2005; Beger 2003; Freda 2004; Lim 2003; Klinkenbijn 1992; Tsao 1994]. Laut Lim et al. [Lim 2003] ist nicht die Art der Operation, sondern die

korrekte Ausführung die entscheidende Determinante: Pankreasresektionen, die in Lehrkrankenhäusern mit hohem Operationsaufkommen durchgeführt worden waren, waren mit einer signifikant höheren Überlebensrate assoziiert.

6.2.5.2 Resektionsrand

Die R0-Resektionsrate liegt in der vorliegenden Studie bei 75 %. Das heißt, sechs der acht radikal operierten Patienten hatten histologisch tumorfreie Absetzungsränder. Zwei Patienten (25 %) hatten einen R1-Absetzungsrand bei einer Operation nach Kausch-Whipple, R2-Resektionen kamen nicht vor. Die Angaben liegen im Bereich der Werte von Howard (70 % R0-Resektionen) [Howard 2006]. Ridwelski et al. kamen 2005 auf eine höhere R0-Resektionsrate von 85 %, aber auch die Rate der R2-resezierten Patienten ist in seiner Studie mit 5 % höher [Ridwelski 2005]. Wenn der Chirurg während der Operation mit ursprünglich kurativer Intention feststellen muss, dass kein tumorfreier Absetzungsrand erreicht werden kann, wird die Behandlung laut Barugola als Palliativmaßnahme angesehen [Barugola 2007]. Jedoch die ursprüngliche Meinung, dass nur ein mikroskopisch tumorfreier Absetzungsrand eine Chance auf Heilung bietet und Patienten mit einem R1-Absetzungsrand eine schlechtere Überlebensrate haben [Westerdahl, 1993; Imamura 1999; Neoptolemos 2001; Howard 2006], wird nicht von allen Autoren bestätigt. Durch eine R0-Resektion wird lediglich die lokale Rezidivrate erniedrigt, nicht aber die gesamte Überlebensrate. Laut Hishinuma [Hishinuma 2006] sterben die meisten Pankreaskarzinom-Patienten nicht am lokalen Rezidiv, sondern an Fernmetastasen. Eine frühe Metastasierung in beiden Gruppen (R0- und R1-resezierte Patienten), vor allem in die Leber, zeigt deutlich, dass diese Erkrankung von Anfang an als systemische Erkrankung angesehen werden muss.

6.2.5.3 Lymphadenektomie

In der vorliegenden Studie wurde eine sorgfältige Standard-Lymphadenektomie durchgeführt. Eine erweiterte Lymphadenektomie beim Pankreaskarzinom, wie von einigen Autoren empfohlen, hat sich in großen randomisierten Studien nicht als vorteilhaft erwiesen. Es konnten keine verbesserten Überlebensraten erreicht werden, bei einer höheren Komplikationsrate und einer Verschlechterung der Lebensqualität

(hohes Risiko für persistierende Diarrhoen) [Kleeff 2006; Farnell 2005; Yeo 2002; Pederzoli 1997; Pedrazzoli 1998].

6.2.5.4 Erweiterte Therapiemaßnahmen

So wie die Operation ist auch die weitere Therapie abhängig vom Lokalbefund und Metastasen.

Adjuvante Therapie

Viele Studien haben die Auswirkungen von adjuvanter Therapie auf die Rezidivbildung und die Überlebensrate von Patienten mit Pankreaskarzinom untersucht. Als gesichert gilt heute, dass eine Tumoresektion alleine nicht ausreichend ist [zitiert nach AWMF 2006 und Traverso 2006]. Die größte Studie ist bisher die ESPAC-1-Studie, die einen deutlichen Überlebensvorteil unter adjuvanter Therapie mit 5FU gegenüber einer Radio-Chemotherapie oder keiner Therapie zeigt [Neoptolemos 2001 und 2004]. Der therapeutische Gewinn ist jedoch begrenzt durch eine deutliche Verschlechterung der Lebensqualität durch eine erhöhte Komplikationsrate mit vermehrter Hospitalisierung [van Tienhoven 2000]. Aus diesem Grund wird heute die Therapie mit Gemcitabine empfohlen, die bei gleichen Ergebnissen in Bezug auf Überleben und Rezidivbildung eine Reduzierung toxischer Effekte gezeigt hat [Neuhaus 2005; Deberne 2007; Oettle 2007].

Die intraoperative Radiotherapie (IORT) konnte bisher keinen Vorteil gegenüber einer konventionellen postoperativen Radiotherapie zeigen. Es konnte lediglich die lokale Rezidivrate gesenkt werden. Auf die Gesamtüberlebensrate hatte sie keinen Einfluß [Dobelbower 1990].

In neuesten Studien zeigte eine Interferon-basierte adjuvante Therapie erste Erfolge [Picozzi 2003], was aber sicher noch weiter evaluiert werden muss.

Im Patientenkollektiv der vorliegenden Studie waren alle Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten hatten, sowohl im Knochenmark als auch im Blut frei von disseminierten Tumorzellen.

Palliative Therapie

Bei den palliativ behandelten Patienten liegt ein ähnliches Ungleichgewicht vor wie bei den Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten hatten. Die Patienten, die eine Radio- und/oder Chemotherapie erhalten hatten, wiesen in einem geringeren Prozentsatz CK 20-positive Zellen im Blut und/oder Knochenmark auf als die Patientengruppe ohne jede Therapie.

Von der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften [zitiert nach AWMF 2006] besteht bei metastasiertem Pankreaskarzinom die Indikation zur palliativen Chemotherapie. Als Standard etabliert hat sich heute der Einsatz von Gemcitabine. Die palliative Chemotherapie führt zur Lebensverlängerung sowie zur Verbesserung der Lebensqualität und des „klinischen Benefits“ (clinical benefit), d.h. insbesondere zu verringertem Schmerzmittelverbrauch und geringerem Gewichtsverlust.

6.2.6 Überlebensrate

In der Literatur wird die Überlebensrate für Pankreaskarzinom-Patienten noch immer als sehr schlecht angegeben. Die Gesamt-5-JÜR in Deutschland beträgt 4 - 5 % [RKI 2006]. In Einzelfällen wird von Langzeitüberlebenden von bis zu 10 Jahren berichtet [Spinelli 2006]. Aufgrund extrem divergierender Ergebnisse zum Langzeit-Überleben mit Pankreaskarzinom, wurde in Finnland eine aufwendige Studie [Carpelan-Holmström 2004] durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass von 89 Patienten, die 5 Jahre nach Diagnosestellung noch lebten (1,8 %), tatsächlich nur bei 10 Patienten nach histologischer Re-Evaluierung ein duktales Pankreaskarzinom bestätigt werden konnte. Neun dieser Patienten verstarben im Laufe des Follow-up (median: 5,4 Jahre), sieben davon am Tumor. Ein einziger Patient mit einem initialen Stadium 1B lebte am Ende der Nachbeobachtungszeit, nach 13,4 Jahren, noch. Carpelan-Holmström et al. nennen als Hauptgrund für eine hohe Langzeit-Überlebensrate eine falsche Initialdiagnose. Das finnische Krebsregister gibt daher die 5-JÜR für knapp 5000 Patienten, die zwischen 1990 und 1996 mit einem histologisch oder autoptisch gesicherten Pankreaskarzinom diagnostiziert worden sind, mit 0,2 % an. Die 5-JÜR nach Resektion wird mit 10-30 % beziffert. Das mediane Überleben nach Resektion beträgt laut gängigen

Literaturangaben etwa 12 bis 25 Monate [Christein 2005; Cleary 2004; Sohn 2000; Ridwelski 2005; Han 2006; Riall 2006]. Das ist deutlich höher als in der vorliegenden Studie, wo die Patienten im Median 7 Monate nach Resektion überlebten. Auch das mediane Überleben des gesamten Patientenguts ist mit 6 Monaten wesentlich schlechter als in anderen Studien angegeben [Hoffmann 2007; Soeth 2005; Z'graggen 2001). Nur eine population-based Studie aus den USA mit über 2000 Patienten ergab eine mediane Überlebenszeit von 5 Monaten, die noch schlechter ist als die der vorliegenden Studie [Eloubeidi 2006].

Eine mögliche Erklärung bietet die Histologie. Christein et al. berichteten in einer 2005 veröffentlichten Studie [Christein 2005] mit knapp 100 Patienten von medianen Überlebensraten nach En-bloc-Resektionen zwischen 15,5 Monaten für duktale Adenokarzinome und 30,2 Monaten für muzinöse Cystadenokarzinome. Auch Han et al. [Han 2006] bestätigten für duktale Adenokarzinome eine deutlich schlechtere Prognose.

Die Überlebensraten der palliativ behandelten Patienten sind vergleichbar mit denen von Ridwelski et al. [Ridwelski 2005].

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Studie

6.3.1.1 CK 20-Nachweis im Blut

In der vorliegenden Studie wurden bei 23 von 33 Patienten (69,7 %) CK 20-positive Zellen im Blut gefunden. Der höchste Anteil lag bei den Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose ein Tumorstadium III aufwiesen (91 %). Obwohl auch im Stadium IV beinahe drei Viertel der Patienten CK 20-positive Zellen im Blut präsentierten, konnte in der Log-linearen Regression keine Korrelation zwischen dem Auffinden von CK 20-positiven Zellen im Blut und dem Tumorstadium nachgewiesen werden ($p = 0,250$). Das mediane Überleben der Patienten mit Tumorzellnachweis im Blut betrug 6 Monate (1-JÜR 12 %, 2-JÜR 8 %), Patienten mit tumorzellfreiem Blut lebten im Median 9 Monate nach Diagnosestellung (1-JÜR 40 %, 2-JÜR 30 %). Dieser scheinbare Überlebensvorteil der Patienten ohne CK 20-Nachweis erwies sich als statistisch nicht signifikant.

6.3.1.2 CK 20 Nachweis im Knochenmark

In der vorliegenden Studie wurden bei 17 von 33 Patienten (51,5 %) CK 20-positive Zellen im Knochenmark gefunden. Der höchste Anteil lag auch hier bei den Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose ein Tumorstadium III aufwiesen (73 %). Im Stadium IV konnten bei der Hälfte der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose CK 20-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden, während nur einer von acht Patienten im Stadium II einen positiven Befund hatte. Auch hier konnte in der Log-linearen Regression keine Korrelation zwischen dem Nachweis von CK 20-positiven Zellen im Knochenmark und dem Tumorstadium gezeigt werden ($p = 0,9140$). Das mediane Überleben der Patienten betrug in beiden Subgruppen 6 Monate. Patienten mit Tumorzellnachweis im Knochenmark zeigten eine 1-JÜR und 2-JÜR von 18 %. Patienten mit tumorzellfreiem Blut wiesen eine 1-JÜR von 25 % und eine 2-JÜR von 20 % auf. Dieser minimale Überlebensvorteil der Patienten ohne CK 20-Nachweis erwies sich ebenfalls als statistisch nicht signifikant.

6.3.2 Unterschiede beim Nachweis von CK 20 zwischen Blut und Knochenmark

In der vorliegenden Studie konnten bei deutlich mehr Patienten CK 20-positive Zellen im Blut nachgewiesen werden als im Knochenmark. Nur ein Patient mit tumorzellfreiem Blut wies Tumorzellen im Knochenmark auf. Auch Hoffmann et al. konnten im Blut deutlich mehr okkulte Pankreastumorzellen nachweisen als im Knochenmark [Hoffmann 2007]. Z'graggen und Soeth erhielten dagegen in etwa gleiche Werte für beide Gewebearten [Z'graggen 2001; Soeth 2005]. So wurden bei Soeth bei 39 (33 %) von 117 Patienten, von denen beide Proben verwertet werden konnten, CK 20-positive Zellen im Knochenmark und bei 38 (32 %) Patienten im Blut gefunden, jedoch nur 16 (13,7 %) Patienten wurden in beiden Kompartimenten als positiv getestet. Bei anderen Tumoren, vor allem beim Mammakarzinom, ist es eher umgekehrt: im Knochenmark werden tendenziell mehr Tumorzellen detektiert [Lindemann 1992; Schönfeld 1997; Soeth 1997; Weitz 1999; Vogel 2001; Corrias 2004; Pierga 2004; Wiedswang 2006; Benoy 2006]. Als Gründe dafür werden qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den Zellen im Blut und Knochenmark, Unterschiede bezüglich Überleben bzw. Eliminierung durch das Immunsystem und methodische Aspekte wie Tumorzellverlust durch Clotting genannt. Deutlich höhere Nachweisraten im Knochenmark werden auch mit einer Tumorzellanreicherung im Knochenmark im Sinne einer Filterwirkung des Blutes begründet. Mit diesen Argumenten lassen sich insbesondere die niedrigen Detektionsraten im Blut beim Mammakarzinom erklären, wo es durch die oben beschriebenen Stromaveränderungen (siehe Kapitel 6.1.1.1) zu einer erhöhten Konzentration der Tumorzellen im Knochenmark kommen kann. Da diese Eigenschaften jedoch vermutlich auf gastro-intestinale Karzinome nicht zutreffen, findet man hier eher gleiche Detektionsraten.

Eine mögliche Ursache für die höhere Detektionsrate im Blut gegenüber dem Knochenmark in der vorliegenden Studie können ungleiche Volumina der Proben sein. Bei jedem Patienten wurden 3 x 4 ml (12 ml) Blut entnommen. Da auf jeder Seite 3 – 10 ml Knochenmark entnommen wurde, könnte möglicherweise bei einigen Patienten, eine zu geringe Menge Punktat zu einem falsch-negativen Ergebnis geführt haben. Man könnte dies jedoch auch als Bestätigung der folgenden Theorie ansehen: bei gastro-intestinalen Tumoren befinden sich die disseminierten Tumorzellen nach Streuung vom

Primärtumor über das Blut nur vorübergehend im Knochenmark und werden hier entweder eliminiert (was auch den fehlenden prognostischen Einfluss erklären würde) oder wieder ins Blut ausgeschwemmt.

6.3.3 Bewertung der Ergebnisse

Zur Bewertung der Ergebnisse soll ein Vergleich zu aktueller Literatur herangezogen werden. Dazu ist anzumerken, dass es nur wenige Studien mit demselben Design gibt (Medium: Blut/Knochenmark; Marker: CK 20; Methode: nested-RT-PCR).

Van Heek veröffentlichte 2001 eine Studie, in der das Knochenmark von 35 Patienten mit Pankreas- oder Papillenkarzinom immunocytochemisch auf CK 8 und 18 untersucht wurde. Hier wurde zwar ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben der CK-positiv getesteten Patienten festgestellt, van Heek rät jedoch von einer routinemäßigen Anwendung ab, da ein zu hoher Anteil falsch-positiver Ergebnisse festgestellt wurde [van Heek 2001]. Eine andere Studie wurde im Januar 2007 von Hoffmann veröffentlicht. Hier wurden 37 Patienten mit Pankreaskarzinomen in allen Stadien auf CK 19 in Blut und Knochenmark untersucht. Weder in der nested-PCR noch in der Real-time-PCR konnte ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden.

Unzählige Bestrebungen, einen verlässlichen prognostischen Marker für das Pankreaskarzinom zu finden, schlugen bisher fehl. Es wird davon abgeraten, disseminierte Tumorzellen als Prognosefaktor für das Pankreaskarzinom zu verwenden, da die meisten Studien, abgesehen von der Arbeit von Soeth et al. und Zhang et al. von 2005, zu diesem Thema negativ ausgefallen sind [Bostick 1998; Braun 1999; Juhl 1994; Vogel 1999]. Es konnten lediglich Tendenzen festgestellt werden.

Mit dem gleichen Studiendesign wie die vorliegende Studie veröffentlichte Chausovsky im Jahr 1999 als Erster eine Studie, in der er 28 Patienten mit Pankreaskarzinom auf CK 20 im Blut mittels RT-PCR untersuchte. Ziel dieser Studie war die Etablierung des Markers für die Detektion zirkulierender Pankreas-Tumorzellen im Blut. Die Autoren schlagen zwar eine Nutzung des Markers für Verlaufskontrollen und Chemotherapie

vor, räumen aber ein, dass weitere Studien notwendig sind, um diese Methode klinisch zu etablieren. Über eine mögliche prognostische Aussagekraft des Markers wird in dieser Studie nichts gesagt [Chausovsky 1999].

Im Jahr 2005 wurden gleich zwei - gleichzeitig aber auch die einzigen - andere Studien mit dem gleichen Design veröffentlicht, die eine von Soeth et al. [Soeth 2005], die andere von Zhang et al. [Zhang 2005]. Zhang et al. untersuchten das Blut von 40 Patienten mit Pankreaskarzinom auf CK 20 mittels RT-PCR, Soeth et al. untersuchten Blut (154 Proben) und Knochenmark (135 Proben) von insgesamt 172 Patienten.

Die Ergebnisse der von Zhang und Soeth 2005 veröffentlichten Studien, wonach der Nachweis von CK 20 im Blut und Knochenmark ein prognostischer Marker ist und einen Indikator für eine schlechtere Überlebensrate darstellt, können mit den vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Der routinemäßige Einsatz der auch in dieser Studie eingesetzten Methode kann daher nicht generell empfohlen werden.

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der drei wichtigsten Vergleichsstudien tabellarisch im Anhang in Tabelle 9.2 dargestellt.

Im Folgenden sollen die Ursachen für die unterschiedlichen Resultate der drei genannten [Chausovsky 1999; Zhang 2005; Soeth 2005] im Vergleich zur vorliegenden Studie diskutiert werden.

6.3.3.1 Anzahl der Patienten

Die Anzahl der Patienten variiert stark. Während Zhang und Chausovsky mit 40 bzw. 28 Patienten eine Population ähnlicher Größe untersuchten, waren an der Studie von Soeth et al. mit 172 Patienten deutlich mehr Personen beteiligt. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei Soeth für die Verarbeitung der Daten jeweils unterschiedliche Subgruppen ausgewählt wurden und nicht von einem einheitlichen Patientenkollektiv für die gesamte Studie gesprochen werden kann. So sind nur von 117 der 172 Patienten beide Proben in die Bearbeitung eingegangen, während von 18 Patienten nur Blutproben und von 37 nur Knochenmarkproben verwendet wurden. Auch

sind Patientenproben enthalten, die z.B. für ein Kompartiment negativ getestet wurden, während aber keine Aussagen zum anderen Kompartiment vorliegen. Dadurch entstehen Ungleichgewichte in der Patientengewichtung und ein direkter Vergleich der Daten ist nicht ganz unproblematisch.

6.3.3.2 Anteil der CK 20-positiven Proben

Eine ähnlich hohe Detektionsrate CK 20-positiver Zellen im Blut wie in der vorliegenden Studie (69,7 %) wird lediglich von Chausovsky et al. erreicht (78,5 %). Bei Zhang et al. konnten 23 von 40 Patienten positiv auf CK 20 getestet werden. Damit ist der Anteil mit 57,5 % etwas niedriger als in der vorliegenden Studie. Deutlich niedriger dagegen war die Detektionsrate bei Soeth et al. (33,8 %).

Mit dem Nachweis im Knochenmark verhält es sich genauso. Die Detektionsrate von 51,5 % in der vorliegenden Studie ist deutlich höher als bei Soeth. Nur 45 von 135 (33,3 %) Proben konnten positiv auf CK 20 getestet werden.

Es stellt sich natürlich die Frage nach Gründen für die so unterschiedlichen Detektionsraten. Ausgeschlossen werden kann eine mögliche intra-operative Tumorzellstreuung, da das Blut ausschließlich prä-operativ entnommen wurde. Ein Grund für die niedrigen Detektionsraten bei Zhang und Soeth könnte der Zusatz von Heparin zu den Patientenproben sein. Heparin ist bekannt als Inhibitor der Taq-Polymerase, sodass es möglicherweise zu falsch-negativen Ergebnissen gekommen ist. Weitere technische Gründe können sein, dass die Blutproben, zumindest bei Soeth, mit einem Volumen von 20 ml zwar größer waren als in der vorliegenden Studie, aber nur an einer Stelle (zentralvenös) entnommen wurden (in der vorliegenden Studie wurden allen Patienten 3 Blutproben an unterschiedlichen Stellen (zentralvenös, arteriell und periphervenös) entnommen). Auch die Knochenmarkproben bei Soeth et al. wurden nur einseitig und nicht wie in der vorliegenden Studie von beiden Beckenkämmen gewonnen. Durch die oben beschriebene zufällige Verteilung der Tumorzellen im Blut und Knochenmark und die inkonsistente Tumorzellstreuung des Primärtumors ist die Chance, Tumorzellen in der Probe zu haben, bei weniger Entnahmestellen deutlich geringer (siehe Kapitel 6.1.1.1.2).

Ein weiterer Grund könnte in dem vorliegenden Patientenkollektiv an sich liegen: wie bereits oben erwähnt, ist die CK 20-Expression durch Zytokeratine eine häufige Fehlerquelle. So weisen viele Patienten mit einer entzündlichen Begleiterkrankung (z.B. Pankreatitis) ebenfalls CK 20-positive Zellen im Knochenmark auf. In der vorliegenden Studie wurden zwar Zweitmalignome als Ursache für eine CK 20-Expression ausgeschlossen, entzündliche Begleiterkrankungen der Patienten wurden allerdings nicht berücksichtigt. Dies erscheint jedoch notwendig, vor allem in Anbetracht der Ergebnisse einer großen Langzeit-Studie von Talamini et al. [Talamini 2006], wonach bei einem Großteil der Patienten eine intraduktale muzinöse Neoplasie die Ursache und nicht die Folge einer chronischen Pankreatitis ist.

Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Detektionsraten könnte ein Unterschied hinsichtlich des Schweregrades der Tumorerkrankung sein. So ist auffällig, dass Zhang et al. in ihrer Studie nur Patienten einschlossen, die unter kurativem Ansatz radikal reseziert wurden. Keiner der Patienten hatte Fernmetastasen. Die Patienten wurden nach dem TNM-Stadium nur in 2 Stadien klassifiziert: 11 Patienten wiesen ein Stadium II, 29 Patienten ein Stadium III auf. Bei Soeth et al. wurden 59 % der Patienten radikal reseziert. Das sind deutlich mehr als in der vorliegenden Studie, wo etwa drei Viertel der Patienten palliativ behandelt wurden und knapp die Hälfte der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen (42 %) zeigte. Geht man davon aus, dass die CK 20-positiven Zellen disseminierte Tumorzellen sind, die einen Hinweis auf eine hämatogene Streuung des Tumors darstellen, ist ein hoher Anteil an CK 20-positiven Zellen bei den Patienten in den Stadien III und IV eine logische Konsequenz. Auch bei den Knochenmarkbefunden ist der Anteil der positiv getesteten Patienten in den Stadien III und IV am höchsten; hier sind knapp 90 % der positiv getesteten Patienten zu finden. Die oben erwähnte Hypothese wird bestätigt bei Betrachtung der Daten von Chausovsky. In seiner Studie war der insgesamt Anteil an CK 20-positiv getesteten Patienten mit 78 % noch höher als in der vorliegenden Studie. Auch hier waren alle Patienten eingeschlossen (kurativ resezierte und palliativ behandelte Patienten). Obwohl keine genaue Tumorstadien-Einteilung angegeben ist, so fällt bei Betrachtung der Daten auf, dass die Patienten, die Lymphknoten- oder Fernmetastasen in Lunge, Knochen oder Leber haben, positiv getestet wurden, während die Patienten, in

deren Blut kein CK 20 nachgewiesen werden konnte, keine Fernmetastasen sondern eher eine Tumorausbreitung per continuum zeigten (Duodenum, Peritoneum und Retroperitoneum). Nur ein einziger Patient hatte Lebermetastasen bei einem negativen Blutbefund. Die Frage, warum nicht alle Patienten mit Metastasen (Fern- oder Lymphknotenmetastasen) CK 20-positive Zellen im Blut aufwiesen, lässt sich einfach damit beantworten, dass möglicherweise durch die oben erwähnte diskontinuierliche Streuung des Primärtumors und die zufällige Verteilung der Tumorzellen im Kompartiment Blut keine Tumorzellen in der Probe vorhanden waren. Eine weitere Erklärung ist die Heterogenität der Tumoren. Laut Schmitz-Winnenthal [Schmitz-Winnenthal 2006] und Matros [Matros 2006], die Tumorgewebe von resezierten Pankreaskarzinomen mit der RT-PCR auf CK 20-Expression untersuchten, exprimiert überhaupt nur eine Subgruppe von Patienten (76 und 63 %) diesen Marker. Das wiederum wirft die Frage auf, warum im Stadium III bei 91 % der Patienten CK 20-positive Zellen im Blut nachgewiesen werden konnten. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: entweder ist eine zufällige ungleichmäßige Verteilung der Subgruppe in diesem Tumorstadium gegeben, oder das von Matros und Schmitz-Winnenthal eruierte schlechtere Gesamtüberleben der Patienten, deren Tumoren CK 20 exprimieren, impliziert ein aggressiveres Wachstum und frühzeitige Metastasierung und deshalb eine Anhäufung von überdurchschnittlich vielen Patienten mit CK 20-exprimierenden Tumoren in hohen Tumorstadien.

6.3.3.3 Unterschiede in der Signifikanz der Korrelation zwischen CK 20-Nachweis und Tumorstadium

Es wäre denkbar, dass große Tumoren häufiger zu einer Disseminierung neigen als kleinere Primärtumoren. Hierfür fand sich jedoch in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis. Eine signifikante Korrelation zwischen CK 20-Nachweis und Tumorstadium kann auch von Soeth et al. nicht für alle Subgruppen bestätigt werden. Bei genauerer Betrachtung der in Tabelle 9.2 dargestellten Ergebnisse fällt auf, dass bei den Blutproben ein kaum erkennbarer Unterschied der Detektionsraten (etwa 1 %) zwischen den Tumorstadien I/II und III besteht und bei den Knochenmarkproben sogar die Detektionsrate im Stadium IV etwa 3 % niedriger ist als im Stadium III. Lediglich bei dem gesamten Patientenkollektiv ist eine ansatzweise gleichmäßige Verteilung zu

erkennen, jedoch keine proportionale (Unterschied zwischen Stadium I/II und III beträgt etwa 22 %, zwischen Stadium III und IV nur 4 %). Dabei ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass sich dieses Patientenkollektiv aus verschiedenen Subgruppen zusammensetzt. Auch in der vorliegenden Studie ist eine Zunahme der Detektionsrate mit steigendem Tumorstadium zu erkennen. Vom Stadium II zu III gibt es einen Anstieg von etwa 53 %. Die dann folgende Abnahme der Detektionsrate um 20 % zu Stadium IV ist wohl einer der Hauptgründe dafür, dass hier keine signifikante Relation zwischen Detektionsrate und Tumorstadien gegeben ist. Entscheidend scheint also in diesem Zusammenhang die sehr hohe Detektionsrate im Stadium III zu sein. Bei Zhang et al. verdoppelt bis verdreifacht sich die Detektionsrate von Stadium II auf III (von 27 auf 67 %). Damit haben wir auch hier im Stadium III eine deutlich höhere Detektionsrate als bei Soeth et al. und der Unterschied ist statistisch signifikant. Als Einflussparameter fällt hier die Stadium-IV-Patientengruppe weg, die eine sehr hohe Detektionsrate zeigen müsste, um die Signifikanz der Korrelation für ein normales Patientenkollektiv mit Stadium-IV-Patienten aufrecht zu erhalten.

6.3.3.4 Unterschiede in der Signifikanz der Korrelation zwischen CK 20-Nachweis und Gesamtüberleben

Es gibt sicherlich mehrere Ursachen, die genannt werden können, um die fehlende statistische Signifikanz hinsichtlich der Korrelation zwischen Gesamtüberleben und Detektionsraten zu erklären. Methodische bzw. tumorbiologische Ursachen können ebenso wie Ursachen, die sich aus der Patientenpopulation ergeben, verantwortlich gemacht werden. So ist zum Beispiel darauf hinzuweisen, dass in der vorliegenden Studie die adjuvante Therapie uneinheitlich war. Dadurch kann nicht bei allen Patienten von den gleichen Voraussetzungen ausgegangen werden (wenn man einen prognostisch signifikanten Einfluss der heute gängigen Chemo- und/oder Radiotherapien voraussetzt) und die Vergleichbarkeit zu anderen Studien ist eingeschränkt (vor allem zu der von Zhang et al., bei der keiner der Patienten eine adjuvante Therapie erhalten hat). Eine weitere methodische Ursache kann möglicherweise ein hoher Anteil falsch-positiver Ergebnisse sein. Vor allem im Hinblick auf immer höhere Sensitivitätsraten, widerlegt das die früher gängige Meinung, dass das ektope Vorkommen von CK 20-positiven Zellen mit dem Vorliegen einer MRD gleichzusetzen ist.

Obwohl von einigen Autoren Pankreaskarzinome, die CK 20 exprimieren, als aggressivere Tumoren dargestellt werden, die mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert sind [Matros 2006], kann man den Nachweis von CK 20-positiven Zellen in Form von disseminierten Tumorzellen nicht generell mit einer schlechteren Prognose in Verbindung bringen. Grund dafür sind die sogenannten „dormancy cells“. Es gibt verschiedene Studien, die darlegen, dass nicht das Auftreten der okkulten epithelialen Zellen allein verantwortlich ist für ein schlechteres Gesamtüberleben, sondern deren Anzahl und spezifische tumorbiologische Eigenschaften im Sinne eines malignen Potentials. Dazu gehören z.B. der Verlust von HLA-Klasse-1-Antigenen [Schlimok 1990; Pantel 1991], der die Zellen vor einer Eliminierung durch das phagolymphozytäre System schützt, die Expression von Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptoren (uPA-R) [Heiss 1995; Allgayer 1997], die die Stimulation der Zellen durch Urokinase ermöglicht, und die Überexpression von erbB-2-Onkogenen [Pantel 1993; Pantel/Izbicki 1993] oder den proliferationsassoziierten Molekülen p120 und ki-67. All diese Faktoren korrelieren mit einer schlechteren Prognose. Somit ist also noch nicht eindeutig geklärt, ob CK 20-positive Zellen lediglich Ausdruck eines besonders aggressiven Tumorwachstums darstellen oder ob sie selbst einen direkten prognostischen Einfluss auf das Auftreten von Rezidiv und Fernmetastasierung haben. Ein weiterer Grund für das unterschiedliche Verhalten disseminierter Tumorzellen kann in der Annahme begründet sein, dass sich die Tumorzellen in der G0-Phase befinden und somit nicht proliferieren. Paraguassu-Braga et al. [Paraguassu-Braga 2003] fanden heraus, dass leukämische Zellen, die durch Gap-Junctions mit Stromazellen des Knochenmarks verbunden sind, nicht proliferieren und somit vor Apoptose und Chemotherapeutika geschützt werden. Auch bei Lymphknotenmetastasen geht man heute von zum Teil biologisch inaktiven Zellen in der G0-Phase aus, die durch bisher nicht bekannte Faktoren nach einer gewissen Latenzzeit, maligne Potenz entwickeln und zu manifesten Metastasen werden [Schlag 1998; Pantel 1997]. Dieses zeit-limitierte Proliferationspotential wurde auch für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark festgestellt [Pantel 1995; Uhr 1997] und kann bei genauerer Betrachtung durch die Daten von Zhang et al. bestätigt werden. Hier traten innerhalb der ersten 24 Monate bei den CK 20-positiv getesteten Patienten zunehmend Metastasen auf (bis 82,6 % nach 24 Monaten), und zwar signifikant häufiger als bei den negativ getesteten Patienten. Nach

24 Monaten gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr: 82,6 % der CK 20-positiven hatten Metastasen im Gegensatz zu 76,5 % der CK 20-negativen Patienten ($p = 0,631$). Ähnlich sind die Ergebnisse in der vorliegenden Studie, wenn man sich das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkbefund anschaut: nach 12 Monaten ist ein deutlicherer Überlebensvorteil der CK 20-negativ getesteten Patienten erkennbar als nach 24 Monaten (18 vs. 25 Monate und 18 vs. 20 Monate). Nicht geklärt ist damit allerdings die Frage, warum bei einem Großteil der Patienten (bei Zhang 76,5 %), die zum Zeitpunkt der Tumorentfernung keine CK 20-positiven Zellen im Blut oder Knochenmark hatten, nach einer Latenzzeit von 24 Monaten Metastasen auftreten. Hier scheint es einen weiteren Mechanismus zu geben, der bisher nicht geklärt ist, oder diese Zellen sind nicht detektiert worden und die Patienten dadurch als falsch-negativ anzusehen (z.B. durch Expression eines anderen Markers oder ein niedriges Expressionsniveau).

Ein weiterer Hinweis, der das Ergebnis der vorliegenden Studie erklären kann, findet sich in den Ergebnissen von Soeth et al.. Nach ihrer Darstellung kann der Nachweis von CK 20-positiven Zellen im Blut und/oder Knochenmark vor allem bei gut bis mittelmäßig differenzierten Tumoren als Prognose-Indikator benutzt werden. In der vorliegenden Studie hat jedoch etwa die Hälfte der Patienten mit einem G3-klassifizierten eher einen schlecht differenzierten Tumor. Nur zwei Patienten wurden mit einem gut differenzierten G1-Tumor diagnostiziert. Die Daten von Zhang et al. stützen die Hypothese von Soeth et al. Hier ist der Anteil der G1-differenzierten Tumoren mit 35 % deutlich höher als in der vorliegenden Studie.

6.4 Konklusion

Insgesamt kann man also sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht im Widerspruch zu den übrigen bisher zu diesem Thema durchgeführten Studien stehen, sondern sich durchaus mit ihnen vereinbaren lassen. Ein Schwachpunkt der vorliegenden Studie ist sicher die kleine und inhomogene Patientenpopulation, die zufällige statistische Außenseiter nur begrenzt abfangen kann. Auch die statistischen Untersuchungen, die, vor allem im Bezug auf die Multikollinearität, möglicherweise zu umfangreich für die kleine Patientengruppe waren, können zu einer Verfälschung bzw.

Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben. Trotzdem kann man sagen, dass dieses spezielle Patientenklientel der vorliegenden Studie deutlich macht, dass die Methode nicht ohne weiteres als generelles Routineverfahren eingesetzt werden sollte, sondern dass weitere differenzierte Studien notwendig sind, um das Verfahren sinnvoll in den Klinikalltag zu integrieren.

7. Zusammenfassung

Die Sterblichkeit am Pankreaskarzinom ist in den westlichen Industrieländern unverändert hoch. Trotz zunehmender R0-Resektionsraten und deutlich gesunkener peri-operativer Mortalität treten häufig im weiteren Krankheitsverlauf frühzeitig Metastasen und Rezidive auf. Man vermutet, dass das Ausmaß der systemischen Tumorausbreitung durch die gängigen diagnostischen Untersuchungstechniken nicht ausreichend erfasst wird und bei vielen Patienten zum Zeitpunkt der Operation bereits eine okkulte Tumorzellstreuung vorliegt.

Ziel dieser Studie war es, die prognostische Relevanz zytokeratinhaltiger Zellen im Blut und Knochenmark von Patienten mit Pankreaskarzinomen zu evaluieren und gegebenenfalls diese Methode als Staging-Verfahren zu etablieren. Hierzu wurde den Patienten prä-operativ Knochenmark und Blut entnommen, welches anschließend unter standardisierten Bedingungen mittels der auf Reverser Transkriptase beruhender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf Zytokeratin 20 untersucht wurde.

Zytokeratine werden von Adenokarzinomen besonders häufig expremiert und sind Bestandteile des Zytoskeletts. Sie kommen jedoch natürlicherweise nicht in Zellen hämatopoetischen Ursprungs vor. Somit können zytokeratin-expremierende Zellen in diesen Kompartimenten (Blut oder Knochenmark) als Tumorzellen identifiziert werden.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte zunächst deskriptiv. Die Überlebenszeiten wurden nach Kaplan-Meier dargestellt. Unterschiede wurden mittels des Log-rank Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Der Einfluss verschiedener Parameter auf das Gesamtüberleben sowie die Prüfung auf prognostische Relevanz einzelner Faktoren erfolgte mit Hilfe der Log-linearen und der Cox-Regression.

33 Patienten konnten hinsichtlich der Expression von Zytokeratin 20 untersucht werden. Die Nachbeobachtungszeit betrug 36 Monate. Die Patienten überlebten im Median 6 Monate, die 1-JÜR betrug 21 %, die 2-JÜR 19 %.

Bei 23 der 33 untersuchten Patienten (69 %) konnten Zytokeratin 20-exprimierende Zellen im Blut nachgewiesen werden, bei 17 (51 %) im Knochenmark.

Der Nachweis der disseminierten Tumorzellen korrelierte weder im Blut noch im Knochenmark signifikant mit dem Tumorstadium. In der vorliegenden Studie ist der Nachweis von Zytokeratin 20-exprimierenden Zellen kein Indikator für eine schlechtere Prognose. Die klinische Etablierung dieser Methode als Prognoseindikator kann daher zurzeit nicht empfohlen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

8. Literaturverzeichnis

Allgayer H, Heiss MM, Riesenberg R, Grutzner KU, Tarabachi A, Babic R, et al. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R) one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res.* 1997; 57:1394-9.

Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften. Leitlinie der Dt. Ges. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Dt. Krebsgesellschaft (DKG): Exokrines Pankreaskarzinom. AWMF-Leitlinien-Register Nr.032/010; Stand: Oktober 2006; www.leitlinien.net.

Arkosy P, Sasi SL, Enyedi A, Szanto J, Andras C, Sapy P. Curative surgical treatment of inoperable pancreatic cancer after neoadjuvant therapy. *Magy Seb.* 2005 Feb; 58(1): 29-33.

Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Hutzler P, et al. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999 Apr 15; 110(2):94-102.

Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Campbell DR. A two-step enriched-nested PCR technique enhances sensitivity for detection of codon 12 K-ras mutations in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 1997 Jul; 15(1):16-24.

Baron JA. What now for Aspirin and cancer prevention? *Journal of the National Cancer Institute* 2004 Jan 7; 96(1): 4-5.

Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grützmann R, Gerdes B, Pilarsky C, et al. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer.* 2004 July 20; 110(6):902-906.

Barugola G, Falconi M, Bettini R, Boninsegna L, Casarotto A, Salvia R, Bassi, et al. The determinant factors of recurrence following resection for ductal pancreatic cancer. *JOP.* 2007 Jan 9; 8(Suppl 1):132-140.

Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH. Treatment of pancreatic cancer: Challenge of the facts. *World J Surg.* 2003 Oct; 27(10):1075-84.

Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpé S, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2006; 94:672-80.

Berardi R, Verdecchia L, Scartozzi M, Cascinu S. New frontiers in the neoadjuvant therapy of pancreatic adenocarcinoma: Apart from therapeutical protocols. *JOP.* 2005; 6(Suppl 1):118-121.

Bernard F, Aerts I, Margueritte G, Astruc J. Micrometastases in pediatric oncology. *Bull Cancer*. 2001 Jun; 88(6):577-80.

Bloch W. A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry*. 1991 Mar 19; 30(11):2735-47.

Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 2. Auflage. München: Urban & Fischer; 2001. S. 39; S.189; S. 761-63.

Bonavina L, Soligo D, Quirici N, Bossolasco P, Cesana B, Lemberghini DG, et al. Bone marrow-disseminated tumor cells in patients with carcinoma of the esophagus or cardia. *Surgery* 2001; 129:15-22.

Bonelli L, Aste H, Bovo P, Cavallini G, Felder M, Gusmaroli R, et al. Exocrine pancreatic cancer, cigarette smoking and diabetes mellitus: a case-control study in northern Italy. *Pancreas*. 2003 Aug; 27(3):143-9.

Borchers H, Wolff JM, Brehmer B, Beniers AJMC, Jakse G. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion und Immuncytochemie an Knochenmarkspiraten und peripherem Blut zum Nachweis mikrodisseminierter Prostatakarzinome. *Der Urologe*. 2000 Juni; 39: 565-71.

Bosch B, Guller U, Schnider A, Maurer R, Harder F, Metzger U, et al. Perioperative detection of disseminated tumour cells is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2003 Jul; 90(7):882-8.

Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 1998 Aug; 16(8):2632-40.

Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med Oncol*. 1999 Sep; 16(3):154-65.

Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage 1, 2 or 3 breast cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342:525-33.

Brunner TB, Tinkl D, Grabenbauer GG, Meyer T, Brueckl WM, Sauer R. Maintenance chemotherapy after chemoradiation improves survival of patients with locally advanced pancreatic carcinoma: a retrospective analysis of prospectively recruited patients. *Strahlenther Onkol*. 2006 Apr; 182(4):210-5.

Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Cancer*. 1995; 71:278-281.

Bustin SA, Dorudi S. Molecular assessment of tumor stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Mol Med Today*. 1998; 4:389-396.

Calnek D, Quarani A. Differential localization by in situ hybridization of distinct keratin mRNA species during intestinal epithelial cell development and differentiation. *Differentiation*. 1993; 53:95-104.

Carlsen NL, Nielsen OH, Hertz H. Neuroblastoma. Evaluation of 60 cases. *Acta Paediatr Scand*. 1981 Jan; 70(1):61-66.

Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Pique JM. Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1998; 78:1368-72.

Cepeda OA, Gammack JK. Cancer in older men: a gender-based review. *Aging Male*. 2006 Sep; 9(3):149-58.

Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer*. 1999 Dec 1; 86(11):2398-2405.

Cheung IY, Sahota A, Cheung NK. Measuring circulating neuroblastoma cells by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Cancer*. 2004 Nov 15; 101(10):2303-8.

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979 Nov 27; 18(24):5294-9.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr; 162(1):156-9.

Christein JD, Kendrick ML, Iqbal CW, Nagorney DM, Farnell MB. Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *J Gastrointest Surg*. 2005 Sep-Oct; 9(7):922-7.

Cleary SP, Gryfe R, Guindi M, Greig P, Smith L, Mackenzie R, et al. Prognostic factors in resected pancreatic adenocarcinoma: analysis of actual 5-year survivors. *J Am Coll Surg*. 2004 May; 198:722-31.

Cohen Y, Gershoni-Baruch R, Lichtic C. Bone marrow biopsy in patients with malignant neoplasms other than lymphoma or leukaemia. *Acta Haematol*. 1979; 62(4):181-4.

Conlon DC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg*. 1996; 223:273-279.

Conzelmann M, Linnemann U, Berger MR. Molecular detection of clinical colorectal cancer metastasis: how should multiple markers be put to use? *Int J Colorectal Dis.* 2005; 20:137-146.

Corrias MV, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Piccolo MSL, et al. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec; 10:7978-95.

Crisp J. Random bone marrow biopsy in the staging of carcinoma of the prostate. *Br J Urol.* 1976 Aug; 48(4):265-7.

Cruciani G, Fiorentini GM, Rosti G, Tienghi A, Bardella D, Magni E, Marangolo M. Clinical relevance of bone marrow biopsy in staging and follow-up of breast cancer. *Tumori.* 1983 April 30; 69(2):143-50.

Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Stelle K, Coombes RC, Clink HM, et al. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer.* 1981; 44:85-90.

Deberne M, Huguet F, Le Scodan R, Hammel P, Andre T. Adjuvant and neoadjuvant treatment for pancreatic adenocarcinoma in 2006. *Bull Cancer.* 2007 Jan 1; 94(1):72-80.

Delfau MH, Kerckaert JP, Collyn d'Hooghe M, Fenaux P, Laï JL, Jouet JP, Grandchamp B. Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia.* 1990 Jan; 4(1):1-5.

Delpero JR. Surgical resection of pancreatic adenocarcinoma: indications and contraindications, prognostic factors and survival, recent advances. *Cancer Radiother.* 2004 Nov; 8(Suppl 1):73-9.

Dimmler A, Gerhards R, Betz C, Günther K, Reingruber B, Horbach T, et al. Transcription of cytokeratin 8, 18 and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratin 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumour cells. *Lab Invest.* 2001 Oct; 81(10):1351-61.

Dite P, Pazourkova M, Ruzicka M, Precechtelova M, Novotny I, Dastyh M. Chronic pancreatitis as a risk factor for pancreatic carcinoma. *Vnitr Lek.* 2002 Jul; 48(7):638-41.

Dobelbower RR, Bronn DG. Radiotherapy in the treatment of pancreatic cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1990; 4:969-83.

Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking. 40 years' observation on male british doctors. *BMJ.* 1994 Oct 8; 309(6959):901-11.

Dong Z, Radinsky R, Fan D, Tsan R, Bucana CD, Wilmanns C, et al. Organ-specific modulation of steady-state *mdr* gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86:913-20.

Eloubeidi MA, Desmond RA, Wilcox CM, Wilson RJ, Manchikalapati P, Fouad MM, et al. Prognostic factors for survival in pancreatic cancer: a population-based study. *Am J Surg*. 2006 Sep; 192(3):322-9.

Farnell MB, Pearson RK, Sarr MG, DiMagno EP, Burgart LJ, Dahl TR, et al. A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery*. 2005; 138:618-28.

Ferley J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar; 18(3):581-92.

Fields KK, Effenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1996; 14(6):1868-76.

Fleige S, Pfaffl MW. Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. *Laborwelt*. 2007; 5(8):4-8.

Fodstad O, Kjonniksen I. Microenvironment revisited: time for reappraisal of some prevailing concepts of cancer metastasis. *J Cell Biochem*. 1994; 56:23-8.

Fodstad O, Overli GE, Hovland B, Andresen M, Olsen OE, Hoifodt HK. New method for phenotypic characterization of micrometastatic cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1998; 39:436.

Freda F, Nunziata L, Antropoli M, D'Amodio AS, Manganiello A, Petronella P. Outcome of surgical treatment of carcinoma of the pancreas. *Tumori*. 2004 Jan-Feb; 90(1):27-31.

Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2006 Feb 1; 73(3):485-92.

Frisch B, Bartl R, Mahl G, Burkhardt R. Scope and value of bone marrow biopsies in metastatic cancer. *Invasion Metastasis*. 1984; 4(Suppl 1):12-30.

Futscher BW, Blake LL, Gerlach JH, Grogan TM, Dalton WS. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *mdr1* mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. *Anal Biochem*. 1993 Sep; 213(2):414-21.

Gangi S, Fletcher JG, Nathan MA, Christensen JA, Harmsen WS, Crownhart BS, Chari ST. Time interval between abnormalities seen on CT and the clinical diagnosis of pancreatic cancer: retrospective review of CT scans obtained before diagnosis. *Am J Roentgenol*. 2004 Apr; 182(4):897-903.

Ge M, Zhang Y, Li L, Xi B, Wang M, Huang T. Interference of human processed pseudogene and corresponding counter-measures in reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1998 Jun 10; 15(3):170-2.

Ghossein, RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer*. 2000; 36:1681-1694.

Gottlieb S. Resectable pancreatic cancer needs surgery, then chemotherapy. *BMJ*. 2004 Mar 20; 328:661.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer; 2002.

Griffin JF, Smalley SR, Jewell W, Paradelo JC, Reymond RD, Hassanein RE, Evans RG. Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1990; 66:56-61.

Guadagni F, Kantor J, Aloe S, Carone MD, Spila A, D'Alessandro R, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res*. 2001 Mar 15; 61(6):2523-32.

Gudjonsson B. Cancer of the pancreas. 50 year of surgery. *Cancer*. 1987; 60:2284-303.

Gunther KE, Cohn RJ, Mendelow BV. Polymerase chain reaction in cancer diagnosis. *S Afr Med J*. 1993 Jul; 83(7):514-6.

Gutierrez AC, Vincent RG, Sandberg AA, Takita H, Stanley H. Evaluation of sternal bone marrow aspiration for detection of tumor cells in patients with bronchogenic carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1979 Mar; 77(3):392-5.

Han SS, Jang JY, Kim SW, Kim WH, Lee KU, Park YH. Analysis of long-term survivors after surgical resection for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2006 Apr; 32(3):271-5.

Heinrich S, Goerres GW, Schafer M, Sagmeister M, Bauerfeind P, Pestalozzi BC. Positron emission tomography/computed tomography influences on the management of resectable pancreatic cancer and its cost-effectiveness. *Ann Surg*. 2005 Aug; 242(2):235-43.

Heiss MM, Allgayer H, Grutzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, et al. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med*. 1995; 1:1035-9.

Hermanek P. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res*. 1999; 19:2771-2774.

Hesse M, Magim TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and an surprisingly high number of pseudogenes, related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci.* Jul 2001; 114(Pt14): 2569-75.

Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10:511-8.

Hoffmann K, Kerner C, Wilfert W, Mueller M, Thiery J, Hauss J, Witzigmann H. Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients. *World J Gastroenterol.* 2007 January 14; 13(2): 257-263.

Hokland P, Heron I. The Isopaque-Ficoll method re-evaluated: selective loss of autologous rosette-forming lymphocytes during isolation of mononuclear cells from human peripheral blood. *Scand J Immunol.* 1980; 11(3):353-6.

Hollerbach S, Reiser M, Schmiegel HW. Die Pankreasraumforderung: Diagnostik und endoskopische Therapiemöglichkeiten. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126:126-35.

Hosch SB, Steffani KD, Scheunemann P, Izbicki JR. Micrometastases from HBP malignancies and metastatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surgery.* 2002; 9: 583-91.

Howard TJ, Krug JE, Yu J, Zyromski NJ, Schmidt CM, Jacobson LE. A margin-negative R0 resection accomplished with minimal postoperative complications is the surgeon's contribution to long-term survival in pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2006 Dec; 10(10):1338-45.

Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB. Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer.* 1991 Feb 1; 47(3):323-8.

Imamura M, Hsotosani R, Kogire M. Rationale of the so-called extended resection for pancreatic invasive ductal carcinoma. *Digestion.* 1999; 60(Suppl1):126-9.

Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. *PCR Protocols.* Academic Press, New York. 1990: 3-12.

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Tobacco smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1986; 38:279-84.

Ishii K, Fukui M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *AEM.* 2001 Aug; 67(8):3753-55.

Jacobs EJ, Connell CJ, Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Thun MJ. Aspirin use and pancreatic cancer mortality in a large United States Cohort. *J Natl Cancer Inst.* 2004 April 7; 96(7):524-8.

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer.* 2004; 101:3-27.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007; 57:43-66.

Jiang JT, Wu CP, Deng HF, Lu MY, Wu J, Zhang HY. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2004 June 1; 10(11):1675-77.

Jonas S, Windeatt S, Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulation in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut.* 1996; 39:717-21.

Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, Henne-Bruns D, Kremer B, Schmiegel W. Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer.* 1994; 57:330-35.

Jung R, Ahmand-Nejad P, Wimmer M, Gerhard M, Wagener C, Neumaier M. Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Review. *Eur J Clin Chem Biochem.* 1997; 35:3-10.

Jung R. Detection of micrometastases by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer.* 1999; 81:870-873.

Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcription polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro, *Br J Cancer.* 1998; 78:1194-98.

Kennedy EP, Yeo CJ. The case for routine use of adjuvant therapy in pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2007 Jun 1; 95(7):597-603.

Khe T, Tran C, Smeenk HG, van Eijck CHJ, Geert K, Wim C, et al. Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard whipple procedure. *Ann Surg.* 2004 November; 240(5):738-745.

Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jan; 60(1):56-71.

Kjonniksen I, Breistol K, Fodstadt O. Site-dependent differences in sensitivity of LOX human melanome tumors in nude rats to dacarbazine and mitozolomide, but not to doxorubicin and cisplatin. *Cancer Res.* 1992; 52:1347-51.

Kleeff J, Michalski C, Friess H, Buchler MW. Pancreatic cancer from bench to 5-year survival. *Panreas.* 2006; 33:111-18.

Klinkenbijnl JH, van der Schelling GP, Hop WC, van Pel R, Bruining HA, Jeekel J. The advantages of pylorus-preserving pancreatoduodenectomy in malignant disease of the pancreas and periampullary region. *Ann Surg.* 1992; 216:142-45.

Königer. Die zytologische Untersuchungsmethode, ihre Entwicklung und ihre klinische Verwertung an den Ergüssen seröser Höhlen. Jena: G Fischer; 1908.

Krechler T, Novotny J, Zeman M, Krska Z, Svestka T, Svab J, et al. Pancreatic carcinoma and diabetes mellitus. *Cas Lek Cesk.* 2004; 143(2):97-100.

Krejčí T, Leffler J, Poloucek P. Long-term results after radical resections for pancreatic ductal adenocarcinoma--10 years experience. *Rozhl Chir.* 2007 Apr; 86(4):174-79.

Krismann M, Todt B, Schröder J, Garreis D, Müller KM, Seeber S, et al. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transkriptiase polymerase chain reaction analysis for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Onc.* 1995; 13:2769-2775.

Krüger W, Jung R, Kröger N, Gutensohn K, Fiedler W, Neumaier M, et al. Sensitivity of assays designed for the detection of disseminated epithelial tumor cells is influenced by cell separation methods. *Clin Chem.* 2000; 46:435-436.

Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, et al. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res.* 2002 Jan 1; 62(1):251-61.

Kuroda T, Honna T, Morikawa N, Kitano Y, Fuchimoto Y, Terawaki K, et al. Tumor cell dynamics and metastasis in advanced neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2005 Nov; 21(11):859-63.

Larsson SC, Hakanson N, Permert J, Wolk A. Meat, fish, poultry and egg consumption in relation to risk of pancreatic cancer: a prospective study. *Int J Cancer.* 2006 Jun 1; 118(11):2866-70.

Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, Nekarda H, Soong R, Ruger R, et al. Identification of occult tumor cells in node negative lymph nodes of colorectal cancer patients by cytokeratin 20 gene and protein expression. *Int J Colorectal Dis.* 2004; 19:87-94.

Lassmann S, Bauer M, Soong R, Schreglmann J, Tabiti K, Nahrig J, et al. Quantification of CK 20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR

and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity. *J Pathol.* 2002; 198:198-2006.

Levedakou EN, Landegren U, Hood LE. A strategy to study gene polymorphism by direct sequence analysis of cosmid clones and amplified genomic DNA. *Biotechniques.* 1989 May; 7(5):438-42.

Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: State-of-the-art care. *Cancer J Clin.* 2000; 50:241-268.

Lim JE, Chien MW, Earle CC. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg.* 2003; 237:74-85.

Lin PW, Shan YS, Lin YJ, Hung CJ. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD vs. Whipple procedure. *Hepatogastroenterology.* 2005 Sep-Oct; 52(65):1601-4.

Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, et al. A prospective cohort study of cigarette smoking and pancreatic cancer in Japan. *Cancer Causes Control.* 2002 Apr; 13(3):249-54.

Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet.* 1992; 340: 685-9.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *New Engl J Med.* 1993 May 20; 328(20):1433-7.

Lubinski J, Phelan CM, Ghadirian P, Lynch HT, Garber J, Weber B, et al. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Familial Cancer.* 2004; 3:1-10.

Lüthen R. Gastroenterology diagnosis of pancreatic carcinoma. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 2000 Nov 30; 89(48):1993-2001.

Manhani AR, Manhani R, Soares HP, Bendit I, Lopez F, Nicoletti AGB, et al. CK 19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Apr; 66(3):249-54.

Matros E, Bailey G, Clancy T, Zimmer M, Ashley S, Whang E, Redston M. Cytokeratin 20 expression identifies a subtype of pancreatic adenocarcinoma with decreased overall survival. *Cancer.* 2006 Feb; 106(3):693-702.

Mattano LA Jr, Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1992 Sep 1; 52(17):4701-5.

Mead GM, Williams CJ, Thompson J, Smith AG, Whitehouse JM. Bone marrow examination in small cell carcinoma of the bronchus: an unnecessary procedure? *Haematol Oncol.* 1985 Jul-Sept; 3(3):159-63.

Mikołajek W. Optimization for preparation and expansion of ex-vivo human umbilical blood cells for transplantation. *Ann Acad Med Stetin.* 2002; 48:99-115.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelial, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982; 31 (1):11-24.

Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1992 Feb; 140: 427-47.

Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation.* Jun 1993; 53(2): 75-93.

Mu D-Q, Peng Y-S, Xu Q-J. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol.* 2004 Feb 15; 10(4):471-475.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335-50.

Naume B, Bogen E, Nesland JM, Beiske K, Gilen E, Renolen A, et al. Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone marrow/peripheral blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int J Cancer.* 1998; 78:556-560.

Nekarda H. Faktoren der tumorinvasions-assoziierten Proteolyse als Prognoseparameter beim residuumfrei resezierten Magenkarzinom. Habilitationsschrift. Fakultät für Medizin der Technischen Universität München. Klinikum Rechts der Isar. 2001.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24; 350:2713-15.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, Almond J, Beger HG, Pederzoli P, et al. Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2001; 234:758-768.

Neuhaus P, Oettle H, Post S, Gellert K, Schramm H, Zulke C, et al. A randomized, prospective, multicenter, phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients with resected pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16S):4013.

Nicola MH, Bizon R, Machado JJ, Sollero T, Rodarte RS, Nobre JS, et al. Breast cancer micrometastases: different interactions of carcinoma cells with normal and cancer patients' bone marrow stromata. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20(5):471-9.

Nohara O, Gilchrist M, Déry RE, Stenton GR, Hirji NS, Befus AD. Reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction for gene expression in rat mast cells and macrophages. *J Immunol Methods*. 1999 Jun 24; 226(1-2):147-58.

O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M, Shanahan F. Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut*. 1997; 40(4):512-515.

O'Sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, Stuart R, Kelly J, Kiely MD, et al. Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterol*. 1999; 116:543-548.

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007 Jan 17; 297(3):267-77.

Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med*. 2000 Jun; 5(6):657-9.

Pakzad F, Groves AM, Ell PJ. The role of positron emission tomography in the management of pancreatic cancer. *Semin Nucl Med*. 2006 Jul; 36(3):248-56.

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91:1113-24.

Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmar W, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:1162-8.

Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, et al. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1993; 53:1027-31.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85(17):1419-24.

Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, et al. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 1991; 51:4712-5.

Pantel K, von Knebel-Doebertiz M, Izbicki JR, Riethmüller G. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg* 1997; 68:1241-50.

Paraguassu-Braga FH, Borojevic R, Bouzas LF, Barcinski MA, Bonomo A. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. *Cell Death Differ*. 2003 Sep; 10(9):1101-8.

Pederzoli P, Bassi C, Falconi M, Pedrazzoli S. Does the extent of lymphatic resection affect the outcome in pancreatic cancer? *Digestion*. 1997; 58:536-41.

Pedrazzoli S, Di Carlo V, Dionigi R, Mosca F, Pederzoli P, Pasquali C, et al. Lymphadenectomy study group. Standard vs extended lymphadenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas: a multicenter, prospective, randomized study. *Ann Surg*. 1998; 228:508-17.

Perey L, Benhattar J, Peters R, Jaunin P, Leyvraz S. High tumour contamination of leukaphereses in patients with small cell carcinoma of the lung: a comparison of immunocytochemistry and RT-PCR. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30; 85(11):1713-21.

Picozzi VJ, Kozarek RA, Traverso LW. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*. 2003; 185:476-80.

Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb; 10:1392-1400.

Pontes JE, Choe BK, Rose NR, Pierce JM Jr. Bone marrow acid phosphatase in staging of prostatic cancer: how reliable is it? *J Urol*. 1978 June; 119(6):772-6.

Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005 Jun; 7(5):189-97.

Quensel U. Zytologische Untersuchungen von Ergüssen der Brust- und Bauchhöhlen mit besonderer Berücksichtigung der karzinomatösen Exsudate. *Acta Med Scandinav*. 1928; 68(Suppl 23):1-107.

Riall TS, Nealon WH, Goodwin JS, Zhang D, Kuo YF, Townsend CM Jr, Freeman JL. Pancreatic cancer in the general population: improvements in survival over the last decade. *J Gastrointest Surg*. 2006 Nov; 10(9):1212-24.

Ridwelski K, Meyer F, Fahlke J, Kasper U, Roessner A, Lippert H. Stellenwert von Cytokeratin- und CA 19-9-Antigen im immunhistologischen Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten beim Pankreaskarzinom. *Chirurg*. 2001; 72:920-926.

Ridwelski K, Meyer F, Schmidt U, Lippert H. Results of surgical treatment in ampullary and pancreatic carcinoma and its prognostic parameters after R0-resection. *Zentralbl Chir.* 2005 August; 130(4):353-61.

Rieder H, Bartsch DK. Familial pancreatic cancer. *Fam Cancer.* 2004; 3(1):69-74.

Rieder. Untersuchung von Pleura- und Peritoneum-Exsudat bei maligner Ovarialgeschwulst. *Deutsches Archiv für klinische Medizin*, BD 54, 1895, S. 544.

Risch HA. Etiology of pancreatic cancer, with a hypothesis concerning the role of N-Nitroso compounds and excess gastric acidity. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jul 2; 95(13):948-60.

Robert-Koch-Institut Deutschland. Broschüre zu Krebs - Krebs in Deutschland. 2006 Feb 16; 36. <http://www.rki.de>.

Robert-Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie. Dachdokumentation Krebs. Stand: Jan 2008. <http://www.rki.de>.

Robert-Koch-Institut. Datenbankabfrage Inzidenz für Pankreaskarzinom in Deutschland. Stand: Feb 2008. <http://www.rki.de>.

Roder JD, Thorban S, Pantel K, Siewert JR. Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg.* 1999; 23:888-891.

Rohr K, Hegglin R. Tumorzellen im Sternalpunktat. Metastasennachweis maligner Geschwülste im Knochenmark. *Dt Archiv für Klin Medizin* 1936; 179:62-79.

Rosenberg SA. Proceeding: the clinical evaluation and staging of patients with malignant lymphoma. *Proc Natl Cancer Conf.* 1972; 7:369-74.

Ruf J, Lopez Hanninen E, Oettle H, Plotkin M, Pelzer U, Stroszczyński C, et al. Detection of recurrent pancreatic cancer: comparison of FDG-PET with CT/MRI. *Pancreatology.* 2005; 5(2-3):266-72.

Ruud P, Fodstadt O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer.* 1999; 80:119-125.

Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research.* 1990; 18(21):6409-6412.

Sana B, Ghosh D, Saha M, Mukherjee J. Purification and characterization of an extracellular, uracil specific ribonuclease from a *Bizionia* species isolated from the marine environment of the Sundarbans. *Microbiol Res.* 2006 Apr 25; 163(1):31-8.

Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, Bunce M, Bell JI. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet.* 1994 Jun 11; 343(8911):1509-10.

Schernhammer ES, Kang JH, Chan AT, Michaud DS, Skinner HG, Giovannucci E, et al. A prospective study of Aspirin use and the risk of pancreatic cancer in woman. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jan 7; 96(1):22-8.

Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. *Anatomie*. 8. Auflage. Berlin: Springer Verlag; 1999. S. 576-580.

Schittek B, Blaheta HJ, Ellwanger U, Garbe C. Polymerase chain reaction in the detection of circulating tumour cells in peripheral blood of melanoma patients. *Recent Results Cancer Res.* 2001; 158:93-104.

Schlag PM. The 'sentinel node' concept: more questions raised than answers provided? *Oncologist.* 1998; 3(5):VI-VII.

Schlieman MG, Ho HS, Bold RJ. Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg.* 2003 Sep; 138(9):951-5.

Schlimok G, Riethmüller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol.* 1990; 1:207-15.

Schmitz-Winnenthal FH, Volk C, Helmke B, Berger S, Hinz U, Koch M, et al. Expression of cytokeratin-20 in pancreatic cancer: an indicator of poor outcome after R0 resection. *Surgery.* 2006 Jan; 139(1):104-8.

Schnieder S. Detektion von mRNA und Cytokeratin 20 im peripheren Blut von Pankreaskarzinompatienten. Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doctor medicinae der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität. 2003.

Schönfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnet HD, Gazet JC, Sacks N, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer.* 1997 May; 33(6): 854-61.

Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Gröne J, et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer.* 2004 Jan 10; 108(2):219-27.

Sehouli J, Könsgen D, Nimpsch R, Stengel D, Oskay G, Mustea A. Prognostic significance of epithelial cells in the blood of patients with gynaecological malignancies. *Anticancer Res.* 2003 Sep-Oct; 23(5b):4133-40.

Seiler CA, Wagner M, Bachmann T, Redaelli CA, Schmied B, Uhl W. Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection - long term results. *Br J Surg.* 2005 May; 92(5):547-56.

Shiratori K. Early diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 2006 Jul; 107(4):164-7.

Siebert PD, Chenchik A. Modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which greatly reduces RNA contamination. *Nucleic Acids Research*. 1993; 21(8):219-220.

Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Jan; 4(1):30-41.

Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lüchtenborg M, Sinnet HD, et al. Response of circulating tumour cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Onc*. 2000; 18:1432-39.

Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer*. 1996 Aug 22; 69(4):278-82.

Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res*. 1997 Aug 1; 57(15):3106-10.

Soeth E, Grigoleit U, Moellmann B, Roder C, Schniewind B, Kremer B, et al. Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates a poor survival. *J Cancer Res Clinic Oncol*. 2005 Oct; 131(10):669-76.

Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas - 616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 2000 Dec; 4(6):567-79.

Soong R, Beyser K, Basten O, Kalbe A, Rueschoff J, Tabiti K. Quantitative reverse chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2001 Nov; 7(11):3423-9.

Spinelli GP, Zullo A, Romiti A, Di Seri M, Tomao F, Miele E, et al. Long-term survival in metastatic pancreatic cancer. A case report and review of the literature. *JOP*. 2006 Sep 10; 7(5):486-91.

Talamini G, Zamboni G, Salvia R, Capelli P, Sartori N, Casetti L, et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms and chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2006; 6(6):626-34.

Tanaka M. Important clues to the diagnosis of pancreatic cancer. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2005; 50:69-72.

Wittekind C, Klimpfinger M. *UICC: TNM-Atlas*. 5. Auflage. Berlin: Springer Verlag; 2005.

Traverso LW, Longmire WP Jr. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg Gynecol Obstet.* 1978 Jun; 146(6):959-62.

Traverso LW, Longmire WP Jr. Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. Follow-up evaluation. *Ann Surg.* 1980 Sep; 192(3):306-9.

Traverso LW. Pancreatic cancer: surgery alone is not sufficient. *Surg Endosc.* 2006 Apr; 20(Suppl 2):446-9.

Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin-gen-expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1993 Apr; 142(4):1111-8.

Traystman MD, Cochran GT, Hake SJ, Kuszynski CA, Mann SL, Murphy BJ. Comparison of molecular cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction (CK 19 RT-PCR) and immunocytochemical detection of micrometastatic breast cancer cells in hematopoietic harvests. *J Hematother.* 1997 Dec; 6(6):551-561.

Tsao JL, Rossi RL, Lowell JA. Pylorus preserving pancreatoduodenectomy. Is it an adequate cancer operation? *Arch Surg.* 1994; 129:405-12.

Tschentscher P, Wagener C, Neumaier M. Sensitiv and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseudogenes from contaminating genomic DNA. *Clin Chem.* Dec 1997; 43(12):2244-50.

Turi S, Weickert U, Bohrer MH, Riemann JF. Space-occupying lesion of the pancreas - how frequently not due to a suspected ductal adenocarcinoma? *Z Gastroenterol.* 2006 Feb; 44(2):161-6.

Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Viletta ES. Cancer dormancy opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med.* 1997 May; 3(5):505-9.

Van Eekelen JA, Shamma FV, Wee L, Heikkila R, Osland A. Quantitative analysis of cytokeratin 20 gene expression using RT-PCR and capillary electrophoresis with fluorescent DNA detection. *Clin Biochem.* 2000; 33:457-464.

Van Heek NT, Tascilar M, van Beekveld JL, Drillenburger P, Offerhaus GJA, Gouma DJ. Micrometastases in bone marrow of patients with suspected pancreatic and ampullary cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2001 Dec; 27(8):740-5.

Van Tienhoven G. Primary and adjuvant radiochemotherapy of pancreatic carcinoma. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 2000 Nov 30; 89(48):2011-6.

Vlems F, Soong R, Diepstra H, Punt C, Wobbes T, Tabiti K, et al. Effect of blood sample handling and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay sensitivity on detection of CK 20 expression in healthy donor blood. *Diagn Mol Pathol.* 2002 Jun; 11(2):90-7.

Vogel I, Kalthoff H. Disseminated tumour cells – their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas. *Virchows Arch.* 2001; 439:109-117.

Vogel I, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B. Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma. *Pancreatology.* 2002; 2(2):79-88.

Vogel I, Krüger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, Henne-Bruns D, et al. Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytochemistry: a new prognostic factor. *Clin Canc Research.* 1999 Mar; 5:593-99.

Wang F, Gupta S, Holly EA. Diabetes mellitus and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Aug; 15(8):1458-63.

Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1992; 326:455-465.

Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willecke F, et al. Detection of colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Canc Research.* 1999 Jul; 5:1830-36.

Westerdahl J, Andren-Sandberg A, Ihse I. Recurrence of exocrine pancreatic cancer-local or hepatic? *Hepatogastroenterology.* 1993 Aug; 40(4):384-7.

Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec; 5(12):4158-63.

Whitcomb DC. Inflammation and cancer v. chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287:315-319.

WHO (World Health Organisation). 58th World Health Assembly approved resolution on cancer prevention and control. May 2005. <http://www.who.int>.

Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer.* 2006 Apr 15; 118(8):2013-9.

Wildi S, Kleef, J, Mauyama H, Maurere CA, Friess H, Büchler MA, et al. Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:2840-2847.

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* 1997 Mar; 22(3): 474-6,478-81.

Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, et al. 1423 Pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: a single-institution experience. *J Gastrointest Surg.* 2006 Nov; 10(9):1199-1211.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.* 1991 Apr; 10(3):233-8.

Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse- transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer.* 1998; 79:288-93.

Yeo CJ, Cameron JL, Lillemore KD, Sohn TA, Campbell KA, Sauter PK, et al. Pancreatoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, part 2: randomized controlled trial evaluating survival, morbidity and mortality. *Ann Surg.* 2002; 236:355-66.

Yun K, Merrie AEH, Gunn J, Phillips LV, McCall JL. Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: validation by K-ras mutations. *J Pathol.* 2000; 191:21-26.

Z'graggen K, Centeno BA, Fernandez-del Castillo C, Jimenez RE, Werner J, Warshaw AL. Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients. *Surgery.* 2001; 5:537-546.

Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehewarter W, Grischkowsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Onc.* 1999; 17:215.

Zhang YL, Feng JG, Gou JM, Zhou LX, Wang P. Detection of CK 20 mRNA in peripheral blood of pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 21; 11(7):1023-7.

Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol.* 1997 Jul; 15(7):2701-8.

9. Anhang

9.1 UICC-Stadien (Übersicht)

		UICC	Primärtumor	regionale Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Carcinoma in situ	0	T is	N0	M0
I	Tumor auf Pankreas beschränkt	I A	T 1	N0	M0
		I B	T 2	N0	M0
II	Pankreas und angrenzendes Gewebe	II A	T 3	N0	M0
		II B	T 1-3	N0	M0
III	Beteiligung regionaler Lymphknoten	III	T 4	Jedes N	M0
IV	Fernmetastasen	IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 9.1: Stadieneinteilung Pankreaskarzinom nach UICC (2003)

9.2 Vergleichsstudien (Übersicht)

	Vorliegende Studie (n = 33)		Soeth et al. 2005 (n = 172)		Zhang et al. 2005 (n = 40)	Chausovsky et al. 1999 (n = 28)
Medium	Blut	Knochenmark	Blut	Knochenmark	Blut	Blut
Anzahl Patienten	33	33	154	135	40	28
CK 20 positiv	69,7 %	51,5 %	33,8 %	33,3 %	57,5 %	78,5 %
Alter (in Jahren)	62,12 (Mean) (31-82) < 60: 33,3 % ≥ 60: 66,6 %		≤ 50: 14,8 % 51-70: 65,5 % > 70: 20,7 %	≤ 50: 14,1 % 51-70: 63,7 % > 70: 22,2 %	56,5 (Mean) (35-75) < 60: 52,5 % ≥ 60: 47,5 %	65,93 (Mean) (38-84) < 60: 25 % ≥ 60: 75 %
Geschlechtsverteilung M : F	1,75 : 1		0,93 : 1	0,98 : 1	2,33 : 1	n.a.
Tumorstadium III	33,3 %		31,2 %	28,8 %	72,5 %	21,4 %
Anteil Patienten mit Fernmetastasen	42,5 %		41,5 %	45,9 %	0 %	57,1 %
Resektionsraten	24 %		60 %	57 %	100 %	n.a.
Medianes Überleben (Monate)	6		11		15-23	n.a.
Korrelation zwischen CK 20 Nachweis und Tumorstadium	NEIN p = 0,47	NEIN p = 0,19	I/II vs III/IV JA (p = 0,005) III vs. IV JA (p = n.a.)	I/II vs III/IV JA (p = 0,005) III vs. IV NEIN (p = n.a.)	JA p = 0,021	n.a.
Korrelation zwischen CK 20 Nachweis und Gesamtüberleben	NEIN p = 0,25	NEIN p = 0,27	JA* p = 0,05		JA p = 0,0003	n.a.

n.a. = nicht angegeben

Tab. 9.2: Übersicht über die CK 20 RT-PCR Studien

10. Lebenslauf

Zur Person

Name	Dieler
Vorname	Maren
Geburtsdatum	05.11.1979
Geburtsort	Rhede
Vater	Hans-Peter Dieler, Betriebswirt
Mutter	Maria Dieler, geb. Pels, Verwaltungsangestellte
Geschwister	Roland Dieler, 23 Jahre, Student

Schullaufbahn/Ausbildung

Grundschule	1986-1990	St. Josef Grundschule
weiterführende Schule	1990-1999	Gymnasium Remigianum, Abitur
Ausbildung	1999-2000	Krankenpflegeschule des St. Marien-Hospitals in Borken
Studium der Medizin	2000-2006	Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Staatsexamen

Praktika

1994	14 Tage Praktikum in der Praxis Dr. Stefan Paus, Praxis für Orthopädie und Sportmedizin, Borken
1999	60 Tage Krankenpflegepraktikum im St. Marien-Hospital, Borken
2002 - 2004	insgesamt 4 je 1-monatige Famulaturen in verschiedenen Fachrichtungen
2005-2006	Tertiale des praktischen Jahres in Stellenbosch/Südafrika (Innere Medizin), Bern/Schweiz (Chirurgie) und UK Münster (Urologie)

Berufslaufbahn

seit Juni 2006	Drug Safety Officer bei PAION Deutschland GmbH
seit März 2008	Head of Pharmacovigilance/Stufenplanbeauftragte bei PAION Deutschland GmbH

Aachen, den 01. April 2008

Maren Dieler

11. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung, Geduld, Motivation und dafür, dass sie nie aufgegeben haben, an die Promotion ihrer Tochter zu glauben

Meinem Bruder, Freunden und Bekannten, für die Rücksicht, die sorgfältige Durchsicht und Korrekturen

Herrn Priv.-Doz. Dr. med Heiner Wolters als Doktorvater für die Bereitschaft, die Arbeit zu übernehmen, für die hervorragende Betreuung, insbesondere für die Einführung in die Thematik, die wissenschaftliche Unterstützung, die konstruktive Kritik an der schriftlichen Abfassung, sowie für die ständige Bereitschaft und Zeit und die unermüdliche Unterstützung und Geduld

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Senninger, für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an seiner Klinik durchzuführen

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Haier für die konstruktiven Ratschläge, die wissenschaftlichen Anregung, die Unterstützung und die Korrekturen

Herrn Dr. Dietmar Volz sowie Herrn Dr. Matthias Winkel für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen

Frau Otten aus der Onkologischen Nachsorge für die hervorragende Archivierung der Patientenakten und die Bereitstellung selbiger

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie der WWU Münster für ihre Kooperation und Unterstützung