

Aus der Abteilung für Allgemeinchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Dir. komm. Professor Dr. J. R. Izbicki

INZIDENZ UND PROGNOTISCHE RELEVANZ FRÜHER LYMPHATISCHER
TUMORZELLAUSSAAT BEI KARZINOMEN DES PANKREASKOPFES SOWIE
DER PAPILLA VATERI

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

SYLVIA METZ

aus Hamburg

HAMBURG 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Universität Hamburg am: 01.07.2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fach-
bereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Prof. Dr. J. Izbicki
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter:	PD Dr. S.B. Hosch
Prüfungsausschuss, 3 Gutachter:	Prof. Dr. K. Pantel

Meiner Familie und meinem Mann, die mich während der gesamten Zeit so liebevoll unterstützt haben.

Inhalt:

1. Einleitung	Seite 5
1.1 Das Pankreaskarzinom	Seite 5
1.2 Das Karzinom der Papilla Vateri	Seite 11
1.3 Mikrometastasen als Prognoseparameter	Seite 12
1.4 Studienziel	Seite 13
2. Material und Methoden	Seite 14
2.1 Das Studiendesign	Seite 14
2.2 Charakterisierung der Patienten	Seite 15
2.3 Materialgewinnung und immunhistochemische Analyse	Seite 19
2.4 Die immunhistochemische Färbung	Seite 20
2.5 Die APAAP-Methode	Seite 21
2.6 Der Antikörper Ber-EP4	Seite 23
2.7 Die Auswertung	Seite 25
2.8 Beispiele für Färbeergebnisse	Seite 26
2.9 Statistische Analyse der Daten	Seite 27
3. Ergebnisse	Seite 28
3.1 Inzidenz von Mikrometastasen	Seite 28
3.2 Einfluss der Mikrometastasen auf die Prognose im Fall des Pankreaskopfkarzinoms	Seite 30
3.3 Ergebnisse der Analyse im Fall des Karzinoms der Papilla Vateri	Seite 31
3.4 Tabellen und Abbildungen	Seite 33

4. Diskussion	Seite 45
4.1 Zielsetzung	Seite 45
4.2 Die Färbung	Seite 46
4.3 Der Antikörper	Seite 48
4.4 Prognostische Bedeutung	Seite 49
4.5 Ber-EP4 als Hinweis auf besondere Metastasierungseigenschaften	Seite 51
4.6 Adjuvante Therapieformen - Ein Ausblick	Seite 53
5. Zusammenfassung	Seite 56
6. Literaturverzeichnis	Seite 58
7. Danksagung	Seite 67
8. Lebenslauf	Seite 68
9. Erklärung	Seite 69

1. Einleitung

Die maligne Transformation körpereigener Zellen, ein sogenanntes Krebsleiden, gehört in den westlichen Industrienationen zu den am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen. Die überwiegende Mehrheit der an Krebs erkrankten Erwachsenen leidet an malignen epithelialen Tumoren, den Karzinomen.

Hierzu gehören auch die Karzinome des Pankreas, die am häufigsten in der Pankreaskopffregion lokalisiert sind, sowie im Bereich der Papilla Vateri, der aufgrund ihrer besonderen anatomischen Lage eine spezielle Bedeutung zukommt.

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist im Vergleich zu anderen Karzinomen eher selten, im internationalen Vergleich nimmt der Tumor den 13. Rang ein [Parkin, D.M., et al.; 1993], allerdings mit einer steigenden Inzidenz.

Generell werden häufiger Männer als Frauen von Karzinomen des Pankreas betroffen; als Risikofaktoren wurden außerdem die chronische Pankreatitis, der langjährige Konsum von Zigaretten, Alkohol und Kaffee, sowie industriell genutzte Chemikalien, fettreiche Ernährung und Diabetes mellitus diskutiert [Caldwell, C.B., et al.; 1994].

In den meisten Fällen gehen Karzinome des Pankreas von den Drüsenzellen des exokrinen Organanteiles aus (duktales Adenokarzinom), sehr viel seltener entstehen endokrine Tumoren, die eine Vielzahl von Hormonen und andere zellulär wirksame Substanzen produzieren können [Klöppel, G., et al.; 1991].

Aufgrund der ungünstigen Lage im Retroperitoneum ist das Pankreas einer klinischen Untersuchung weitestgehend entzogen. Daher ist eine wirkungsvolle präventive Diagnostik nicht möglich.

Auch unter Zuhilfenahme aufwendiger und zum Teil invasiver apparativer Methoden wie Abdomensonographie, ERCP und Computertomographie des Abdomen ist die frühzeitige Diagnose von Organveränderungen schwierig. Hinzu kommt, dass Pankreastumoren häufig klinisch unspezifische Symptome verursachen, wie Gewichtsabnahme, Inappetenz und Rückenschmerzen [Klempnauer, J., et al.; 1995]. Erst der schmerzlose Ikterus weist bei vielen Patienten auf die Lokalisation ihrer Erkrankung hin; dies ist jedoch in vielen Fällen ein Spätsymptom, das heißt der Tumor ist bereits weit fortgeschritten und somit nicht mehr kurativ behandelbar.

Doch auch Pankreaskarzinome, die in frühen Tumorstadien entdeckt und operativ behandelt werden, haben trotz modernster Operationsmethoden und sinkender postoperativer Mortalität [Cameron, J.L., et al.; 1993; Traverso, L.W., et al.; 1978; Reinders, M.E., et al.; 1995] eine niedrige Fünf-Jahres-Überlebensrate, die zwischen 5% und 20% angegeben wird [Reinders, M.E., et al.; 1995; Peters, J.H., et al.; 1991; Zerbi, A., et al.; 1995; Gall, F.P., et al.; 1991; Delcore, R., et al.; 1996; Yeo, C.J., et al.; 1998]. Der Grund hierfür liegt nicht zuletzt auch in einer frühzeitigen lymphogenen Aussaat, wodurch der postoperativen Beurteilung der regionären Lymphknoten eine erhebliche prognostische Bedeutung zukommt [Reinders, M.E., et al.; 1995; Gall, F.P., et al.; 1991; Delcore, R., et al.; 1996; Yeo, C.J., et al.; 1998]. Im Fall der Karzinome des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri gehören zu den regionären Lymphknoten alle peripankreatischen Lymphknotenstationen:

- Superior: Oberhalb von Pankreaskopf und –körper
- Inferior: Unterhalb von Pankreaskopf und –körper
- Anterior: Vordere pankreatikoduodenale, pylorische und proximale mesenteriale Lymphknoten
- Posterior: Hintere pankreatikoduodenale Lymphknoten, Lymphknoten am Ductus choledochus und proximale mesenteriale Lymphknoten
- Lienal: Lymphknoten am Milzhilus und um den Pankreasschwanz

Pankreaskarzinome sind in den meisten Fällen in der Pankreaskopffregion lokalisiert, seltener im Bereich des Pankreas corpus oder –schwanzes, es handelt sich häufig um duktales Adenokarzinome [Klöppel, G., et al.; 1991; Love, R.R., et al.; 1994].

Entsprechend allen anderen gastrointestinalen Karzinomen stützt sich die Klassifikation des Pankreaskarzinoms auf Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Unio Internationalis Contra Cancrum (UICC). Diese Einteilung dient der prognostischen Einschätzung eines Tumors und beinhaltet die vier Hauptaspekte Tumorlokalisation, Histomorphologie mit Tumortyp und Differenzierungsgrad, sowie die Tumorausbreitung vor und nach Therapie.

1997 ist die bis dahin gültige Einteilung von 1992 aufgrund deutlicher Diskrepanzen zwischen der Stadieneinteilung der Tumoren und der tatsächlichen Prognose der Patienten überarbeitet und geändert worden [Sobin, L.H., et al.; 1997].

Die Einstufung der in dieser Untersuchung enthaltenen Karzinome stützt sich auf die zum Zeitpunkt der Operationen noch aktuellen Empfehlungen der WHO [Jass, J.R., et al.; 1990] und der UICC aus dem Jahr 1992 [Hermanek, P., et al.; 1992; Hermanek, P.; 1994; Hermanek, H., et al.; 1992], die neue Stadieneinteilung der UICC würde entsprechend der schlechten Prognose bei vielen Studienteilnehmer zu einer Höherstufung des UICC-Stadiums führen.

Den Tabellen 1 bis 5, 6a und 6b lassen sich die wesentlichen Unterschiede der alten und neuen Stadieneinteilung entnehmen.

Die Tabellen 1 bis 4 verdeutlichen die aktuelle Einteilung bezüglich des Differenzierungsgrades und der Tumorausbreitung, wobei die Ergebnisse des prätherapeutischen Stagings im TNM-System, die Resultate der postoperativen histopathologischen Aufarbeitung des Gewebes jedoch im Rahmen des pTNM-Systems zusammengefasst werden; die Angaben in Klammern beziehen sich auf die Abweichungen der neuen UICC-Einteilung von der alten.

Bezüglich des Tumorstatus nach Therapie kommt die R-Klassifikation zur Anwendung, die in Tabelle 5 erläutert wird.

Entsprechend prognostischer Daten werden die verschiedenen TNM-/pTNM-Stufen nach den Empfehlungen der UICC zu Stadien zusammengefasst, die eine Aussage über das Ausmaß der Erkrankung erlauben sollen. Auch hier werden die Unterschiede der alten und neuen Einteilung gegenübergestellt (Tabelle 6a und 6b).

Tabelle 1. Differenzierungsgrade des Primärtumors (UICC 1992 und 1997)

G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert

Tabelle 2. Primärtumorausbreitung Pankreaskopfkarzinom nach TNM/pTNM-Klassifikation nach den Empfehlungen der UICC von 1997; (in Klammern: 1992)

T/pTX	Primärtumor nicht beurteilbar (UICC 1992: T/pTX)
T/pT0	Kein Hinweis für einen Primärtumor (UICC 1992: T/pT0)
T/pT1	Primärtumor begrenzt auf das Pankreas, größter Durchmesser ≤ 2 cm (UICC 1992: T/pT1a)
T/pT2	Primärtumor begrenzt auf das Pankreas, größter Durchmesser ≥ 2 cm (UICC 1992: T/pT1b)
T/pT3	Direkte Tumorausbreitung in Duodenum, D. choledochus und/oder peripankreatisches Gewebe (UICC 1992: T/pT2)
T/pT4	Direkte Tumordinfiltration in Magen, Milz, Kolon und/oder große Nachbargesäße (UICC 1992: T/pT3)

Tabelle 3. Klassifizierung der lymphogenen Ausbreitung nach den Empfehlungen der UICC von 1997 (in Klammern: 1992)

N/pNX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar (UICC 1992: N/pNX)
N/pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (UICC 1992: N/pN0)
N/pN1a	Metastase in einem einzelnen regionären Lymphknoten (UICC 1992: N/pN1)
N/pN1b	Metastasen in mehreren regionären Lymphknoten (UICC 1992: N/pN1)

Tabelle 4. Klassifizierung der Fernmetastasen (UICC 1992 und 1997)

M/pMX	Fernmetastasierung nicht beurteilbar
M/pM0	Keine Fernmetastasen
M/pM1	Fernmetastasen liegen vor

Tabelle 5. R-Klassifikation (UICC 1992 und 1997)

RX	Residualtumor nicht beurteilbar
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tabelle 6a. Stadiengruppierung Pankreaskopfkarzinom nach Empfehlungen der UICC von 1992:

	M0		M1
	N0	N1	
T1	I II	III	IV
T2			
T3			

Tabelle 6b. Stadiengruppierung Pankreaskopfkarzinom nach Empfehlungen der UICC von 1997:

	M0		M1
	N0	N1	
T1	I II	III	IVb
T2			
T3			
T4	IVa		

1.2 Das Karzinom der Papilla Vateri

Bei den Tumoren, die im Bereich der Ampulla Vateri lokalisiert sind, handelt es sich um eine topographische Sonderform der Pankreaskarzinome. Sie unterscheiden sich von den übrigen Karzinomen des Pankreas durch ihre vergleichsweise frühe klinische Manifestation, da es bereits bei relativ kleinen Primärtumoren zu einer Abflussbehinderung im Bereich des Ductus choledochus und damit zu einem Ikterus und rezidivierenden Cholangitisschüben kommen kann.

Aus diesem Umstand resultiert die bessere Prognose dieser Tumoren, die im Allgemeinen in einem früheren Tumorstadium erkannt und operiert werden. Aufgrund der besonderen anatomischen Verhältnisse ergibt sich eine eigenständige TNM-Klassifikation, die in Tabelle 7 aufgeführt wird.

Aus dieser eigenständigen Klassifizierung resultiert auch eine spezielle Stadieneinteilung für das Papillenkarzinom (Tabelle 8), die übrigen Klassifikationsmerkmale unterliegen derselben Einstufung, wie im Falle der Pankreaskopftumoren.

Tabelle 7. TNM /pTNM-Klassifikation des Papillenkarzinoms (UICC 1992 und 1997)

T/pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
T/pT0	Kein Hinweis für einen Primärtumor
T/pT1	Tumor auf die Papille begrenzt
T/pT2	Tumor infiltriert die Duodenalwand
T/pT3	Tumor infiltriert das Pankreasgewebe um bis zu 2 cm
T/pT4	Tumor infiltriert das Pankreasgewebe um mehr als 2 cm

Tabelle 8. Stadiengruppierung Papillenkarzinom (UICC 1992 und 1997)

	M0		M1
	N0	N1	
Tis	0	III	IV
T1	I		
T2	II		
T3			
T4	IV		

1.3 Mikrometastasen als Prognoseparameter

Als prognostisch bedeutungsvoller Faktor für Patienten mit Karzinomen sowohl der Pankreaskopfgregion als auch der Papilla Vateri hat sich neben der lokalen Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Operation auch der Status der regionären Lymphknoten erwiesen [Delcore, R., et al.; 1996; Yeo, C.J., et al.; 1998; Kubuschok, B., et al.; 1999; Izbicki, J.R., et al.; 1997; Hosch, S.B., et al.; 2000].

Jedoch auch bei Patienten mit wenig fortgeschrittenen Tumoren und histopathologisch unauffälligen regionären Lymphknoten kommt es postoperativ häufig zu einem Tumorrezidiv in Form einer Fernmetastasierung. Eine Beurteilung der postoperativen Prognose mit den histopathologischen Standardmethoden ist also ungenau und wird dem tatsächlichen klinischen Verlauf in vielen Fällen nicht gerecht [Klempnauer, J., et al.; 1995].

Aus diesem Grund muss man annehmen, dass es bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung zu einer Aussaat von einzelnen Tumorzellen in die regionären Lymphknoten kommt, die mit den herkömmlichen Stagingmethoden nicht erfasst werden kann.

Mit Hilfe moderner immunhistochemischer Färbemethoden und unter Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Tumorzellantigene ist es möglich,

diese Zellen sichtbar zu machen und ihren prognostischen Einfluss zu untersuchen, wie zum Beispiel im Fall des Mamma-Karzinoms [Trojani, M., et al.; 1987; International Breast Cancer Study Group; 1990].

Dies ist auch bei einer Reihe anderer Karzinome gelungen. So konnte bereits bei Patienten mit malignem Melanom [Gilboa, E.; 1996], Bronchialkarzinom [Passlick, B., et al.; 1994], kolorektalem Karzinom [Greenon, J.K., et al.; 1994], Ösophaguskarzinom [Izbicki, J.R., et al.; 1997; Hosch, S.B., et al.; 1998] und Magenkarzinom [Maehara, Y., et al.; 1996] eine Einzelzelldissemination in Lymphknoten nachgewiesen, sowie Hinweise für ihre prognostische Bedeutung gefunden werden.

In allen genannten Untersuchungen wurde eine signifikant schlechtere Prognose bei Vorhandensein von Mikrometastasen in Lymphknoten nachgewiesen.

1.4 Studienziel

In der vorliegenden Untersuchung wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Rahmen immunhistochemischer Assays eine okkulte Tumorzelldissemination in histopathologisch tumorfreien Lymphknoten von Patienten mit Karzinomen des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri untersucht.

Durch die postoperative Nachbeobachtung der Patienten wurde außerdem geprüft, inwieweit diese Mikrometastasen einen Einfluss auf die postoperative Prognose im Sinne eines erhöhten Rezidivrisikos haben.

Nicht zuletzt sollte zudem die Frage beantwortet werden, ob die immunhistochemische Färbung von Einzelzellen des Tumors in Lymphknoten zur Identifikation von Patienten mit erhöhtem Rezidivrisiko geeignet ist und ob diese Patienten zur Verbesserung der postoperativen Prognose einer adjuvanten Tumortherapiestudie zugeführt werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Das Studiendesign

Diese Studie wurde genehmigt von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg.

Die Patienten sind im Rahmen der Operationsaufklärung über die Teilnahme an der Untersuchung informiert worden und haben ihr zugestimmt.

Zwischen April 1992 und Dezember 1998 wurden 173 Patienten mit Karzinomen der Bauchspeicheldrüse nach Whipple operiert. Die postoperative Einstufung bezüglich des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades erfolgte nach den Richtlinien der 4. Auflage der TNM-Klassifikation der „Unio Internationalis Contra Cancrum“ (UICC) aus dem Jahr 1992 [Hermanek, P., et al.; 1992].

Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Patienten nach histopathologischen Kriterien frei von lymphogenen Metastasen sein (N0) oder zumindest nur regionale Lymphknotenmetastasen haben (N1). Patienten mit fraglichem Tumorrest oder Metastasen wurden von der Studie ausgeschlossen; ebenso alle, die an endokrinen Tumoren der Bauchspeicheldrüse litten oder deren Tumor sich als eine Metastase einer anderen Tumorentität im Bereich des Pankreas herausstellte.

Aufgrund der späten Manifestation der Pankreastumoren mussten daher zahlreiche Patienten wegen des weit fortgeschrittenen Tumorstadiums von der Studie ausgeschlossen werden.

Von den im Untersuchungszeitraum operierten Patienten konnten 52 Personen in die Studie aufgenommen werden, die aufgrund ihres Tumorstadiums und des benötigten Probenmaterials, bestehend aus Primärtumorproben, Anteilen der peripheren Lymphknoten und

Knochenmarksaspirat, über die notwendigen Voraussetzungen verfügten. Die Gruppe bestand aus 28 Männer (53,8 %) und 24 Frauen (46,2 %).

36 der Patienten (69,2 %) litten an einem Karzinom des Pankreaskopfes und 16 (30,8 %) an Tumoren der Papilla Vateri.

Da in vielen Fällen Patienten mit Tumoren der Papilla Vateri bereits früh an Symptomen wie Ikterus oder Cholangitisschüben leiden und deshalb häufig in einem früheren Stadium der Erkrankung operiert werden, mussten die unterschiedlichen Tumorlokalisationen in der Untersuchung getrennt betrachtet werden, um die Ergebnisse des Follow-Up vergleichen zu können.

Die Operation nach Whipple besteht in einer Resektion des Pankreaskopfes, des distalen Magens und des Duodenums, sowie der Gallenblase und der Leberpforte. Anschließend wird die Magen-Darm-Passage mittels einer Gastrojejunostomie wiederhergestellt, außerdem erfolgt die Anlage einer Hepatikoenterostomie und einer Pankreatikojejunostomie. Während des Eingriffs erfolgt eine radikale Entfernung der regionalen Lymphknoten [Jass, J.R., et al.; 1990; Hermanek, P., et al.; 1992; Hermanek, P.; 1994; Sobin, L.H., et al.; 1997; Hermanek, P., et al.; 1997].

2.2 Charakterisierung der Patienten

Von den 36 Tumoren des Pankreaskopfes waren 20 (55,6 %) mäßig differenziert (G2) und 16 (44,4 %) gering differenziert (G3). Es gab in unserem Kollektiv keinen gut differenzierten Tumor des Pankreaskopfes.

Von den 16 Papillentumoren waren 2 (12,5 %) gut, 8 (50,0 %) mäßig und 6 (37,5 %) gering differenziert.

Die Einteilung der Tumorstadien nach den alten Richtlinien der TNM-Klassifikation von 1992 sind für Pankreaskopftumoren und Papillentumoren getrennt in den Tabellen 10 und 11 angegeben.

Nach den Richtlinien der UICC (1992) ergab sich die folgende postoperative Stadieneinteilung:

Im Falle der Karzinome des Pankreaskopfes fanden sich 19 Tumoren des Stadiums I (52,8 %), 2 Tumoren des Stadiums II (5,6 %), 15 Patienten litten an einem Tumorstadium Grad III (41,7 %).

In der Gruppe der Patienten mit Karzinomen der Papilla Vateri fand sich ein Tumor des Stadiums I (6,3 %), 7 Tumoren des Stadiums II (43,8 %), 7 Tumoren des Stadiums III (43,8 %) und ein Stadium IV (6,3 %).

Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten zwischen 33 und 83 Jahren alt, das mittlere Alter betrug 60,6 Jahre.

Im gesamten Studienkollektiv ist keiner der Patienten postoperativ, das heißt innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstorben.

Im Rahmen der postoperativen Beobachtungszeit wurden alle Patienten zunächst in 3-monatigen Abständen untersucht, nach 2 Jahren wurden die Untersuchungsintervalle auf 6 Monate erhöht. Die Untersuchungen beinhalteten neben der körperlichen Untersuchung eine Thoraxröntgenaufnahme, eine abdominelle Computertomographie, Abdomensonographie, eine endoskopische Untersuchung des oberen Gastrointestinaltraktes, sowie die Kontrolle der Tumormarker CEA (Karzinoembryonales Antigen) und CA 19-9. Der mittlere Beobachtungszeitraum der Patienten betrug 18,8 Monate (3-73).

Tabelle 9. Charakterisierung der Patienten (n=52):

	Patienten	%
Männlich	28	53,8
Weiblich	24	46,2
Mittleres Alter (Standardabweichung) 60,6 Jahre ($\pm 11,9$)		

Tabelle 10. Tumoreigenschaften Tumorlokalisation Pankreaskopf (n=36):

	Patientenzahl	%
Differenzierungsgrad:		
G1	Ø	Ø
G2	20	55,6
G3	16	44,4
TNM-Klassifikation*):		
pT1	2	5,6
pT2	28	77,8
pT3	6	16,7
pN0	21	58,3
pN1	15	41,7
*) Einteilung aufgrund der histopathol. Klassifikation (HE-Färbung) nach den UICC-Richtlinien von 1992		
Stadieneinteilung (1992):		
UICC Stadium I	19	52,8
UICC Stadium II	2	5,6
UICC Stadium III	15	41,7

Tabelle 11. Tumoreigenschaften Tumorlokalisation Papilla Vateri (n=16):

	Patientenzahl	%
Differenzierungsgrad:		
G1	2	12,5
G2	8	50,0
G3	6	37,5
TNM-Klassifikation*):		
pT1b	1	6,3
pT1	∅	∅
pT2	7	43,8
pT3	7	43,8
pT4	1	6,3
pN0	9	56,3
pN1	7	43,8
*) Einteilung aufgrund der histopathol. Klassifikation (HE-Färbung) nach den UICC-Richtlinien von 1992		
Stadieneinteilung (1992):		
UICC Stadium I	1	6,3
UICC Stadium II	7	43,8
UICC Stadium III	7	43,8
UICC Stadium IV	1	6,3

2.3 Materialgewinnung und immunhistochemische Analyse

An die Tumorresektion schloss sich in allen Fällen eine radikale Entfernung der regionären peripankreatischen Lymphknoten an, zu denen die bereits erwähnten Lokalisationen zählen: Superiore, inferiore, anteriore, posteriore und lienale Lymphknotenstationen.

Zur wissenschaftlichen Analyse der Resektionspräparate wurden während jeder Operation ein kleiner Teil des Primärtumors entfernt und im chirurgischen Forschungslabor immunhistochemisch untersucht. Der Hauptanteil des Tumorgewebes sowie der Resektionsrand wurden mit den gängigen histopathologischen Methoden aufgearbeitet.

Der Operateur entfernte die regionären Lymphknoten und ordnete sie den unterschiedlichen anatomischen Regionen zu. Die Gewebeproben wurden danach entsprechend ihrer Lokalisation nummeriert. Die entnommenen Lymphknoten wurden anschließend in zwei Hälften geteilt, von denen eine Hälfte in Paraffin eingebettet und den gängigen histologischen Untersuchungsmethoden (HE-Färbung) in der pathologischen Abteilung zugeführt wurde.

Die zweite Hälfte der entfernten Lymphknoten und ein Anteil des Primärtumors wurden innerhalb weniger Stunden nach der Gewinnung in Tissue Tek (4583, Miles Inc.) gebettet, um dann sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren zu werden. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung des Materials.

Diejenigen Lymphknoten, die histopathologisch keine Tumorabsiedelung erkennen ließen, wurden immunhistochemisch auf die Anwesenheit einzelner Tumorzellen untersucht.

Von jeder dieser gesammelten Lymphknotenhälften wurden mittels Gefrierschnitttechnik im Kryostat 6 bis 8 μm dünne Schnitte in drei Ebenen angefertigt, die auf beschichtete Objektträger aufgetragen und bis zur endgültigen Färbung und Fixierung bei -25°C aufbewahrt wurden.

Die weitere Bearbeitung erfolgte mit einer immunhistochemischen Färbung mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 (M0804, Dako, Hamburg), der speziell gegen die Oberflächenmerkmale epithelialer Zellen gerichtet ist. Da es Zellen dieser Klassifizierung in einem gesunden Lymphknoten nicht gibt, ist es mit dieser Färbung möglich, einzelne epitheliale Tumorzellen sichtbar zu machen und so in lymphatischem Gewebe nachzuweisen.

Insgesamt wurden auf diese Weise die Schnitte von 107 Lymphknoten aufgearbeitet und immunhistochemisch untersucht.

2.4 Die immunhistochemische Färbung

Um einzelne Tumorzellen in lymphatischen Gewebsverbänden darstellen zu können, benötigten wir eine Färbemethode, die bezüglich Sensitivität und Spezifität besonders herausragt und außerdem durch eine gute Reproduzierbarkeit möglichst konstante Färbeergebnisse gewährleistet.

Daher entschieden wir uns für den Einsatz einer indirekten immunenzymatischen Methode zur Darstellung der Antikörper-Reaktion mit dem Oberflächenantigen. Hierzu verwendeten wir ein polyvalentes Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin (Z0259, Dako, Hamburg) als Antiserum und präformierte Komplexe aus alkalischer Phosphatase und monoklonalen Anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörpern (APAAP-Komplex) (D0651, Dako, Hamburg).

Diese sogenannte APAAP-Methode bedient sich einer Immun-Komplex-Bildung, die auf der Bindung spezifischer Primärantikörper an die Oberflächenantigene der nachzuweisenden Zellen beruht.

Die monoklonalen Primärantikörper stammen von Mäusen, ein sogenannter „Brückenantikörper“ bindet aufgrund seiner „Anti-Maus“-Eigenschaften an den Primärantikörper auf der Zelloberfläche und verbindet diesen mit dem APAAP-Komplex.

Die Methode gewährleistet durch die relativ hohe Enzymdichte aufgrund der Brückenbildung ein intensives Färbeergebnis, so dass eine hohe Sensitivität erreicht wird.

Der hier verwendete Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) hat gegenüber dem ebenfalls etablierten Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP) einige Vorteile:

Einerseits befinden sich in kryoasservierten Geweben wesentlich geringere Mengen der gewebeeigenen, sogenannten endogenen Alkalischen Phosphatase, wogegen die Peroxidaseaktivität in Gefrierschnitten uneingeschränkt vorhanden ist, was zu einer unspezifischen Färbereaktion führen würde.

Die endogenen Enzyme der Lymphknoten müssen zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen vor Zugabe der Substrate wirkungsvoll blockiert werden, was im Falle der Alkalischen Phosphatase durch Zugabe von Levamisole (L9756 Sigma, Deisenhofen) geschieht. Die endogenen Peroxidasen hingegen werden durch Zusatz von Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) inaktiviert; dies führt jedoch häufig zu einer unerwünschten Denaturierung der Antigene der Zielzellen.

Im Falle der APAAP-Methode reagiert nach Blockade der gewebeeigenen Enzyme in der anschließenden Farbreaktion nur die an den Sekundärantikörper gebundene Alkalische Phosphatase, was zu einer Verstärkung des Kontrastes und damit zu einem leichteren Auffinden der markierten Zellen innerhalb des Lymphknotens führt.

2.5 Die APAAP-Methode (Färbeschema)

Zunächst werden die Kryostat-Schnitte für 30 Minuten bei Zimmertemperatur aufgetaut und getrocknet, anschließend erfolgt das Anfixieren der Präparate in einem fünfminütigen Acetonbad.

Nach der Rehydrierung des Gewebes in TRIS-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4) (15504-020 Life Technologies, Karlsruhe) für 15 Minuten folgt der erste Inkubationsschritt. Alle Inkubationen finden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt.

Die Schnitte werden mit einer 1:10 Verdünnung aus TBS und AB-Serum, dem antikörperfreien Humanserum von Spendern der Blutgruppe AB

(Biotest Diagnostics 805135, Dreieich, Deutschland), beschichtet und 20 Minuten inkubiert.

Dieser Schritt dient der Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbungen durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Kollagen und anderen Bindungselementen. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper Ber-EP4 (Maus-IgG1, Dako, Hamburg) für 45 Minuten in einer Verdünnung von 1:400, bzw. 0.625 µg/ml.

Diese Konzentration war zuvor in einer Verdünnungsreihe zur Optimierung der Färbeergebnisse ermittelt worden.

Anschließend werden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS gespült, um eine Verunreinigung der Geweboberfläche mit Primärantikörper zu vermeiden.

Der Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Brückenantikörper stammt vom Kaninchen (Z0259, Dako, Hamburg) und wird in einer Verdünnung von 1:50 verwendet, dies entspricht einer Konzentration von 64 µg/ml. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten.

Nach erneutem dreimaligem Waschen der Präparate mit TBS folgt das Beschichten der Schnitte mit APAAP-Komplex, der ebenfalls von der Maus stammt. Dieser ist mit einem zweiten Arm gegen Epitope des Kaninchens gerichtet und wird daher an den Brückenantikörper gebunden.

Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten mit einer Verdünnung von 1:100 (0,9 µg/ml) und dem erneuten Waschen in TBS folgt die Färbereaktion.

Das Substrat der Färbung ist hierbei Naphtholphosphat-Ester; durch die Alkalische Phosphatase erfolgt eine Aufspaltung des Substrats in Phenolkomponenten und Phosphat. Bei dem anschließenden Farbumschlag reagieren die Phenole mit Neufuchsin, einem Dinatriumsalz (sogenanntes Chromogen), zu einem unlöslichen roten Azofarbstoff.

Das Substrat besteht aus drei verschiedenen Lösungen:

Lösung 1 enthält 150 ml TRIS-Puffer (0.05M), 1,7 g NaCl und 60 mg Levamisole, anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit Hilfe von HCl

und NaOH auf 8,24 eingestellt. Diese Lösung dient der anfangs bereits erwähnten Blockade der gewebeeigenen Alkalischen Phosphatase.

Für die Herstellung der **Lösung 2** werden in 0,75 ml N,N-Dimethylformamid (D4254, Sigma) 30 mg Naphthol-AS-BI-phosphat (N2250, Sigma) gelöst.

Lösung 3 besteht aus 0,3 ml Neufuchsin 5% (5 g N0638, Sigma in 100 ml 2N HCl) und 7,5 ml Natriumnitrit 4% (300 mg S2252, Sigma in 7,5 ml Aqua dest.), die Komponenten müssen vor der Färbung mit den anderen beiden Lösungen 60 Sekunden reagieren.

Nach dem Mischen der Lösungen 2 und 1 wird Lösung 3 hinzu gegeben; es folgt eine Inkubation der Präparate in dem Substrat für 30 Minuten im Dunkeln, da die Färbelösung lichtempfindlich ist.

Nach einer abschließenden Spülung der Objektträger mit Aqua dest. wird die Kernfärbung mit Hämatoxylin Gill (1.09249.0500 Merck, Darmstadt) durchgeführt, deren Intensität durch Waschen der Schnitte in alkalischem Leitungswasser für 5 Minuten optimiert wird.

Zum Eindeckeln der Präparate erfolgt zunächst ein Übersichten mit Crystal Mount Abdeckmedium (MØ 3, Biomedica); nach dem Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur erhalten die Objekte ein Deckgläschen, das mit Permount (SP 15.500, Fisher Scientific) befestigt wird.

2.6 Der Antikörper Ber-EP4

Der verwendete Primärantikörper Ber-EP4 (M0804, Dako, Hamburg) ist ein monoklonaler Antikörper der Immunglobulinsubklasse IgG1_κ, der durch Reinigung von Kulturüberständen der Zelllinie MVF-7 gewonnen wird. Er eignet sich sowohl für die Färbung von in Paraffin gebetteten Geweben als auch für Kryostatschnitte.

Ber-EP4 reagiert zuverlässig mit allen epithelialen Normalgeweben mit Ausnahme der apikalen Zellschichten von Plattenepithelien und epidermalen Keratinozyten, Hepatozyten und Parietalzellen.

Auch die meisten Karzinome können mittels Ber-EP4 immunhistochemisch gefärbt werden [Latzka, U., et al.; 1990; Momburg, F., et al.; 1987; Izbicki, J.R., et al.; 1996].

Mit Ausnahme des hepatozellulären Karzinoms (HCC), des Nierenzellkarzinoms und des Adenokarzinoms der Mamma zeigten alle bisher untersuchten Karzinome auch bei weitgehender Entdifferenzierung eine positive Reaktion mit Ber-EP4 [Latzka, U., et al.; 1990; Sheibani, K., et al.; 1991].

Ber-EP4 ist gegen zwei Glykopeptide auf der Oberfläche epithelialer Zellen gerichtet, die Molekularmassen von 34 kD, beziehungsweise 39 kD haben und die von epithelialen Zellen sowie den meisten Karzinomen exprimiert werden.

Zur Verifizierung der Spezifität von Ber-EP4 führten wir APAAP-Färbungen an kryoasserviertem Lymphknotengewebe von Patienten mit mesenchymalen oder benignen Tumoren, sowie entzündlichen Erkrankungen durch.

Es zeigte sich, dass diese Schnitte im Gegensatz zu den Präparaten der Karzinompatienten ausnahmslos Ber-EP4-negativ waren.

Alle Primärtumoren unserer Studie zeigten die Expression der zu detektierenden Glykoproteine auf der Oberfläche in ausreichender Ausprägung, so dass Ber-EP4 als geeigneter Marker für das Vorhandensein von Metastasen der Karzinome des Pankreaskopfes und der Papillenkarzinome in Lymphknoten angesehen werden kann.

Mit Hilfe von Kontrollfärbungen, die am Pathologischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf durchgeführt wurden, zeigte sich, dass bei Vorhandensein Ber-EP4-positiver Zellen in Lymphknoten in den angrenzenden Schnitten mittels konventioneller Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine Metastasierung zu identifizieren war.

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse durch unspezifische Reaktionen führten wir bei jedem gefärbten Lymphknoten eine Isotypkontrolle mit dem Mausantigen MOPC-21 (IgG1, M-9269, Sigma Immuno Chemicals) in gleicher Verdünnung durch.

Hierbei handelt es sich um ein gegen kein spezifisches Epitop gerichtetes Non-Immuns Serum, das ebenfalls der Immunglobulinsubklasse IgG1 angehört.

Als sogenannte „Positivkontrolle“ zu Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse diente bei jeder Färbung ein Präparat Ber-EP4-positiver (epithelialer) Kolonmukosa.

2.7 Die Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher.

Definitionsgemäß wurden einzelne oder kleine Gruppen, sogenannte Cluster, von maximal 3 Ber-EP4-positiven Zellen in einem histopathologisch als tumorfrei beurteilten Lymphknoten als Mikrometastasen bewertet.

Die bevorzugte Lage von Tumorzellen sowohl im Randsinus oder in den von Lymphkapillaren gebildeten Intermediärsinus, als auch dem zentralen Marksinus eines Lymphknotens [Allison, R.T., et al.; 1994], sowie die veränderte Morphologie und die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns waren weitere Kriterien, nach denen die Beurteilung der Ber-EP4-positiven Zellen erfolgte.

Fanden sich nach diesen Kriterien Mikrometastasen in den untersuchten Schnitten, so wurden mehrfach benachbarte Schnitte desselben Lymphknotens mit der HE-Färbung, die in der histopathologischen Routine verwendet wird, gefärbt. In keinem der so gefärbten Schnitte konnte jedoch ein Tumorzellnachweis geführt werden, was den erheblichen Vorteil durch die gesteigerte Sensitivität der Methode gegenüber der Normalfärbung hervorhebt.

2.8 Beispiele für Färbeergebnisse

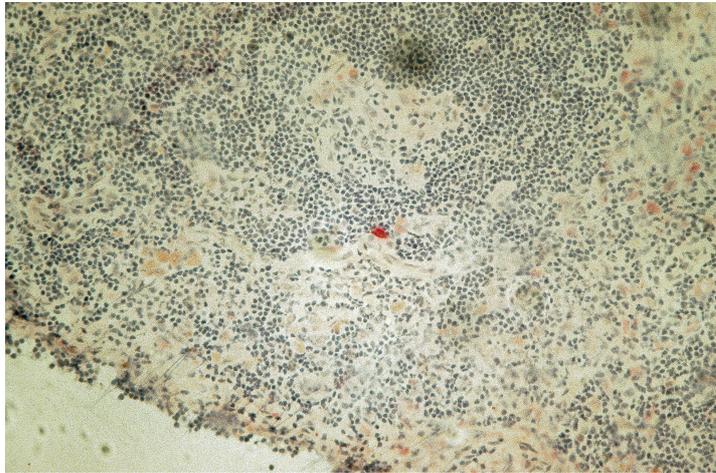


Abbildung 1: Ber-EP4-positive Zelle im Intermediärsinus

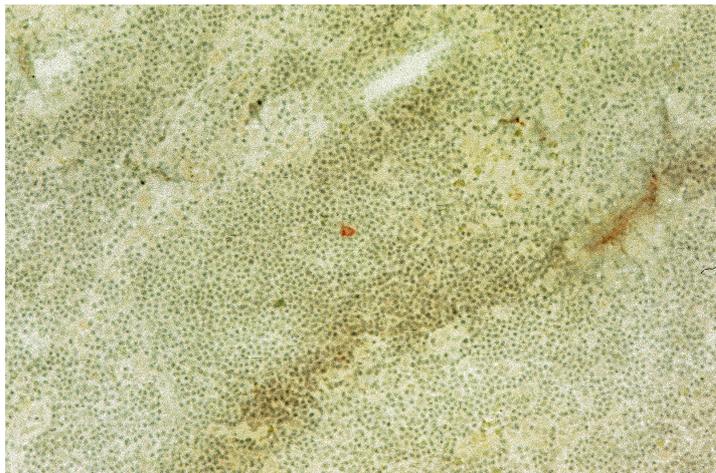


Abbildung 2: Disseminierte Tumorzelle im Zellverband

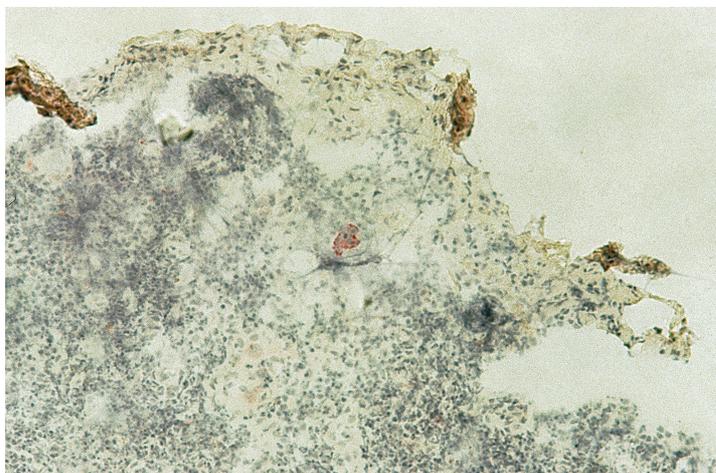


Abbildung 3: Zellcluster im Randsinus

2.9 Statistische Analyse der Daten

Für die statistische Auswertung wurden die nicht parametrischen Variablen mit 4-Felder Tafeln und dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet und wann immer nötig mit dem Fisher-Exact-Test auf die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse hin überprüft.

Das lokalrezidivfreie Intervall, das fernmetastasenfreie Intervall, die Gesamtüberlebenszeit und der Zeitraum des rezidivfreien Überlebens wurden nach der Methode von Kaplan und Meier berechnet.

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-rank-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Um die Unabhängigkeit bestimmter im Log-rank-Test signifikanter Parameter von anderen etablierten Prognoseparametern zu zeigen, wurde das Cox-Regressionsmodell verwendet [Cox, D.R.; 1972].

3. Ergebnisse

Im Rahmen unserer Studie wurden 107 Lymphknoten von insgesamt 52 Patienten mit Tumoren des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri untersucht. Die Analyse der Daten wurde in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation betrachtet, da die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich beider Tumorlokalisationen deutliche Unterschiede bezüglich der Rezidivfreiheit und der Überlebensdauer erbrachten.

Die untersuchten Lymphknoten waren histopathologisch ausnahmslos als tumorzellfrei eingestuft worden.

Um den Detektionsvorteil für Mikrometastasen im Lymphknoten mittels Immunhistochemie zu verdeutlichen, wurden bei Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Lymphknoten die angrenzenden Schnitte mit HE-Färbung gefärbt und als Kontrolle verglichen. Es zeigte sich, dass in keiner der Kontrollfärbungen eine Tumorzellaussaat sichtbar wurde.

Da sich bereits in mehrfachen Kontrollfärbungen ein allgemeines Ansprechen von Adenokarzinomzellen unterschiedlicher Herkunft [Latzka, U., et al.; 1990; Momburg, F., et al.; 1987; Izbicki, J.R., et al.; 1996] auf eine Färbung mit Ber-EP4 sowohl bei Primärtumoren, wie auch in metastatischem Gewebe gezeigt hatte, wurde im weiteren Verlauf der Studie auf ein regelmäßiges Mitführen einer diesbezüglichen Kontrolle verzichtet.

3.1 Inzidenz von Mikrometastasen

An der Studie nahmen insgesamt 36 Patienten mit Tumoren des Pankreaskopfes teil, die restlichen 16 Patienten litten an Malignomen der Papilla Vateri.

Insgesamt, das heißt ohne Berücksichtigung der Tumorlokalisation, enthielten 32 Lymphknoten (29,9 %) von 25 der 52 Patienten BerEP4-positive Zellen in den Sinus und im Interstitium, dies entspricht einem Anteil von 48,1 %.

Bei den 30 Patienten mit dem histopathologischen Stadium N0 ließen sich in 36,7 % der Fälle (11 Patienten) Ber-EP4-positive Zellen nachweisen, verglichen mit 14 Patienten (63,6 %) von 22 Patienten mit dem Stadium N1.

Das Auftreten von Mikrometastasen in Lymphknoten korrelierte nicht mit dem histopathologischen Tumorgrading, wie Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad oder Tumorstadium.

Sowohl in der Gruppe der Patienten mit Pankreaskopfkarzinom als auch bei den Personen, die an Papillentumoren litten, konnte in einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 18,8 Monaten (3-73 Monate) festgestellt werden, dass der Nachweis von Mikrometastasen in Lymphknoten signifikant mit einer Reduktion des rezidivfreien Überlebenszeitraumes korrelierte.

Tabelle 12. Tumorstadium und Mikrometastasen

UICC 1992	Patientenzahl	Anzahl Pat. mit Mikrometastasen*) (in %)
pT1 (inkl. pT1b)	3	0 Pat. (0 %)
pT2	35	18 Pat. (51,4 %)
pT3	13	7 Pat. (53,8 %)
pT4 (Papille)	1	0 Pat. (0 %)
pN0	30	11 Pat. (36,7 %)
pN1	22	14 Pat. (63,6 %)
*) in histopathologisch tumorfrei eingestuften Lymphknoten		

3.2 Einfluss der Mikrometastasen auf die Prognose im Fall des Pankreaskopfkarzinoms

Von den 36 Patienten in dieser Gruppe waren 21 Patienten histopathologisch N0 eingestuft worden und 15 Patienten erhielten die Einstufung N1.

Betrachtet man die Gruppe N0, so zeigten sich bei 8 Patienten (38,1 %) in insgesamt 10 Lymphknoten Ber-EP4-positive Zellen; wogegen in der Gruppe N1 von den tumorzellfrei beurteilten Lymphknoten 15 Präparate von 11 Patienten (73,3 %) Mikrometastasen enthielten.

Bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 17,5 Monaten (3 bis 73 Monate) zeigte sich eine signifikant höhere rezidivfreie Überlebenszeit bei den Patienten, die immunhistochemisch freie Lymphknoten aufwiesen.

Während die mediane rezidivfreie Überlebenszeit bei den Patienten ohne Nachweis von Mikrometastasen 19 Monate betrug (Mittelwert 39 Monate), dauerte es im Median lediglich 6 Monate (Mittel: 10 Monate), bis Patienten mit nachgewiesener minimaler Tumorzell dissemination ein Rezidiv ihres Tumors erlitten ($p=0,0008$).

Auch bei Betrachtung des Überlebenszeitraumes bis zum Tod durch die Tumorerkrankung fanden sich signifikante Unterschiede ($p=0,004$) im Vergleich der Patienten mit und ohne Mikrometastasen. Während die Patienten ohne Ber-EP4-positive Zellen im Median mehr als 20 Monate überlebten (Mittelwert 47 Monate), dauerte die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit Mikrometastasen lediglich 11 Monate (Mittelwert 13 Monate) an.

Im Verlauf der postoperativen Nachbeobachtung der Patienten fiel auf, dass auch die Fernmetastasierung signifikant von der Anwesenheit von Mikrometastasen in Lymphknoten beeinflusst wird ($p=0,0158$), nicht jedoch die Ausbildung eines Lokalrezidivs ($p=0,2345$).

Weder das jeweilige Tumorstadium noch der Differenzierungsgrad des Tumors beeinflussten die Prognose der Patienten hinsichtlich Gesamtüberlebenszeit oder Auftreten von Tumorrezidiven, ob Lokalrezidiv oder Fernmetastasen.

Lediglich der histopathologische Lymphknotenstatus N hatte, wie nicht anders zu erwarten, einen Einfluss auf Tumorrezidiv ($p=0,0051$), Metastasierung ($p=0,0242$) und Gesamtüberleben ($p=0,0025$).

Der Einfluss auf die Ausbildung eines Lokalrezidivs war jedoch, genauso wie bei den Mikrometastasen, nicht signifikant ($p=0,3338$).

Nach diesen Ergebnissen wurde zusätzlich eine multivariate Analyse der Daten nach dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt, um die Bedeutung der Mikrometastasen als unabhängiger prognostischer Faktor zu überprüfen. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass Mikrometastasen in Lymphknoten bezüglich des rezidivfreien Überlebens (relatives Risiko 0,22 CI [0,078-0,621], $p=0,004$) und der Gesamtüberlebensdauer (relatives Risiko 0,34 CI [0,123-0,943], $p=0,038$) einen signifikanten prognostischen Einfluss haben. Auch bezüglich der Ausbildung von Fernmetastasen ergab das Vorhandensein von Mikrometastasen einen unabhängigen prognostischen Aussagewert (relatives Risiko 0,23 CI [0,062-0,848], $p=0,027$).

Der histopathologische Lymphknotenstatus hatte bezüglich des Gesamtüberlebens (relatives Risiko 0,329 CI [0,115-0,937], $p=0,037$) ebenfalls prognostische Relevanz, nicht jedoch im Hinblick auf das rezidivfreie Überleben (relatives Risiko 0,464 CI [0,175-1,23], $p=0,123$).

Weder die Größe des Primärtumors T noch der Differenzierungsgrad G waren unabhängige prognostische Faktoren bezüglich Rezidivfreiheit oder Gesamtüberlebensdauer der Patienten.

3.3 Ergebnisse der Analyse im Fall des Karzinoms der Papilla Vateri

Insgesamt 16 Personen umfasst die Gruppe der Patienten mit Tumoren der Papilla Vateri. 9 Patienten wurden histopathologisch pN0 eingestuft, es

fanden sich in 4 Präparaten von 3 Patienten (33,3 %) Ber-EP4-positive Zellen. Bei den 7 Patienten der Kategorie pN1 wurden in 3 Lymphknoten von 3 Personen (42,9 %) Mikrometastasen detektiert.

Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug in dieser Gruppe 21,9 Monate (4 bis 68 Monate), im Gegensatz zu der Gruppe mit Tumoren des Pankreaskopfes hatte das Vorhandensein Ber-EP4-positiver Zellen jedoch keinen Einfluss auf die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen oder eines Lokalrezidivs.

Lediglich bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und des rezidivfreien Überlebens der Patienten fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit immunhistochemisch freien Lymphknoten und Personen mit nachgewiesenen Mikrometastasen. Möglicherweise ist dieses überraschende Studienergebnis mit der geringen Anzahl von Patienten zu erklären, die in diese Untersuchung einbezogen werden konnten.

Während Patienten ohne Ber-EP4-positive Zellen im Median mehr als 23 Monate (49 Monate im Mittel) überlebten, war die mediane Gesamtüberlebensdauer der Patienten mit Mikrometastasen auf 8 Monate (Mittelwert: 10 Monate) beschränkt ($p=0,0454$).

Alle übrigen untersuchten Parameter wie Tumorgroße, Zelldifferenzierungsgrad und histopathologischer Lymphknotenstatus waren ohne signifikanten prognostischen Einfluss bezüglich Gesamtüberleben, rezidivfreiem Überleben und Zeit bis zum Auftreten eines Lokalrezidivs oder Fernmetastasen.

Aufgrund der relativ geringen Fallzahlen verzichteten wir im Falle des Papillenkarzinoms auf eine multivariate Analyse der Daten nach dem Cox-Regressionsmodell.

3.4 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 13. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das Gesamtüberleben (Tumorlokalisation Pankreaskopf)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4- negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4- positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	7/17 (41,2)	16/19 (84,2)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>20	11	0,004

Tabelle 14. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das rezidivfreie Überleben (Tumorlokalisation Pankreaskopf)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4- negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4- positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	9/17 (52,9)	17/19 (89,5)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	19	6	0,0008

Tabelle 15. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das lokalrezidivfreie Überleben (Tumorlokalisierung Pankreaskopf)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	9/17 (52,9)	8/19 (42,1)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	19	14	0,2345

Tabelle 16. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das Überleben ohne Fernmetastasen (Tumorlokalisierung Pankreaskopf)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	5/17 (29,4)	11/19 (57,9)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>14	9	0,0158

Tabelle 17. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das Gesamtüberleben (Tumorlokalisation Papilla Vateri)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	3/10 (30,0)	4/6 (66,7)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>23	8	0,0454

Tabelle 18. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das rezidivfreie Überleben (Tumorlokalisation Papilla Vateri)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	4/10 (40,0)	5/6 (83,3)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>15	6	0,0472

Tabelle 19. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das lokalrezidivfreie Überleben (Tumorlokalisation Papilla Vateri)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	4/10 (40,0)	1/6 (16,7)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>15	>4	0,7356

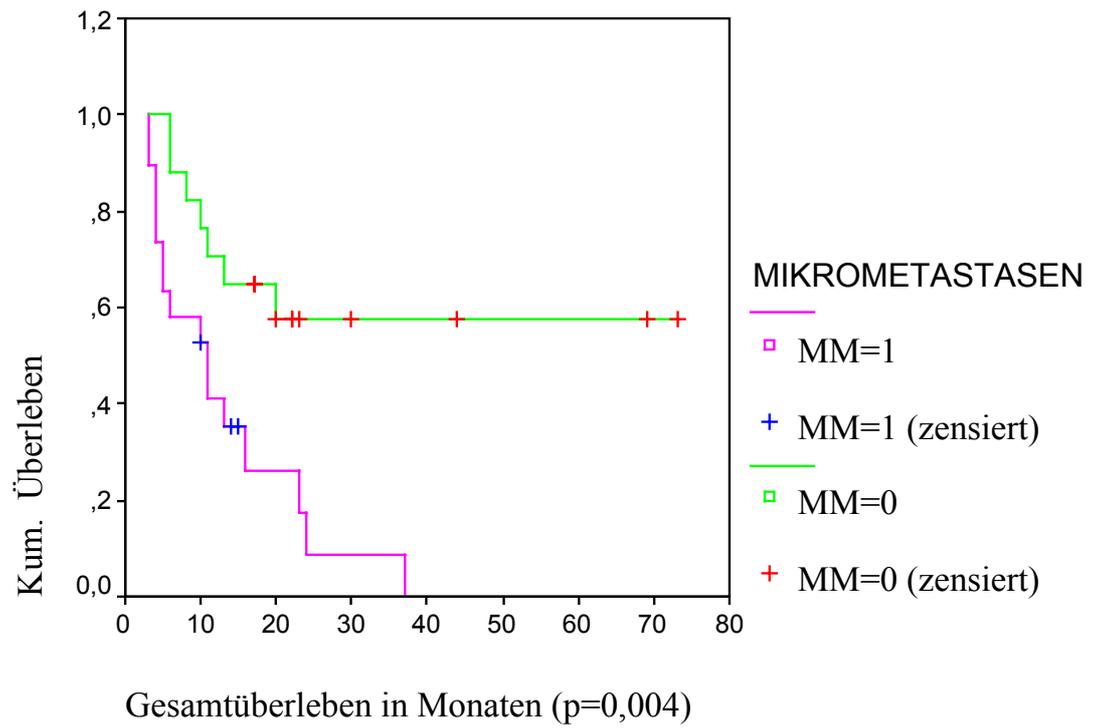
Tabelle 20. Prognostischer Einfluss der Mikrometastasen auf das Überleben ohne Fernmetastasen (Tumorlokalisation Papilla Vateri)

	Patienten ohne Mikrometastasen (Ber-EP4-negativ)	Patienten mit Mikrometastasen (Ber-EP4-positiv)	Logrank
Ereignisse bei allen Pat./n(%)	3/10 (30,0)	2/6 (33,3)	
Mediane Überlebenszeit in Monaten	>15	>5	0,5638

Graphik 1a.

Kaplan-Meier-Kurve:

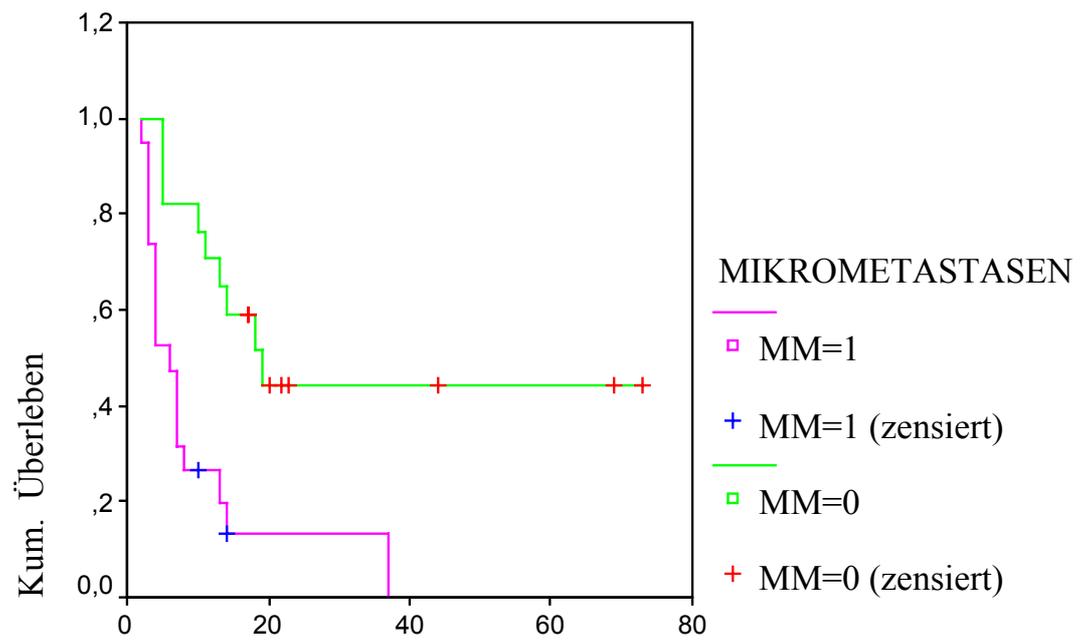
Gesamtüberlebenszeit (Pankreaskopf)



Graphik 2a.

Kaplan-Meier-Kurve:

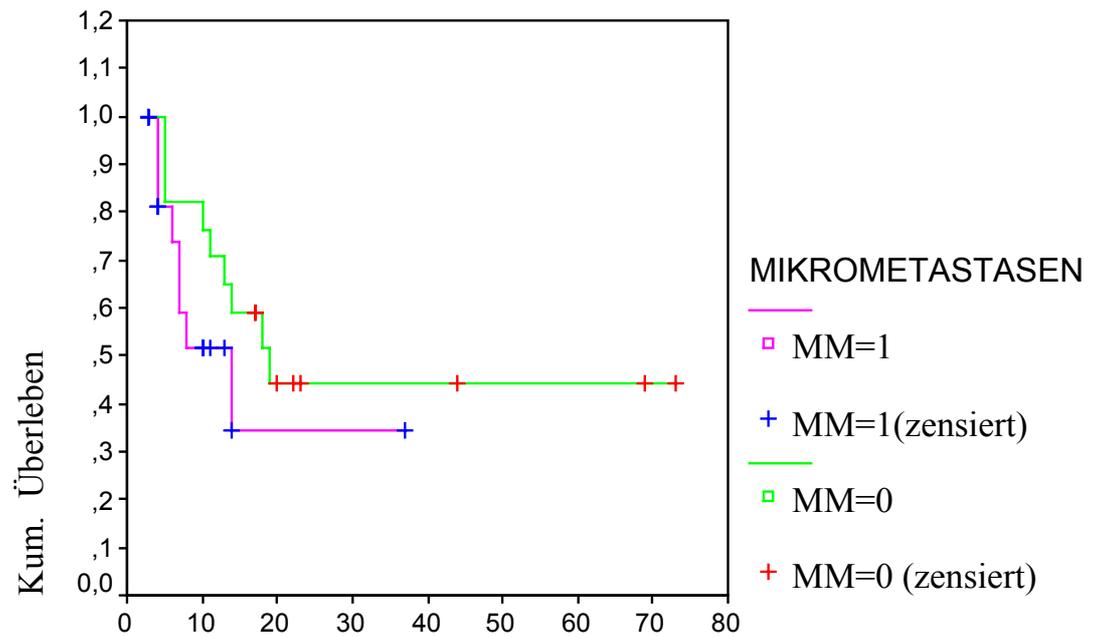
Rezidivfreies Überleben (Pankreaskopf)



Graphik 3a.

Kaplan-Meier-Kurve:

Lokalrezidivfreies Überleben (Pankreaskopf)

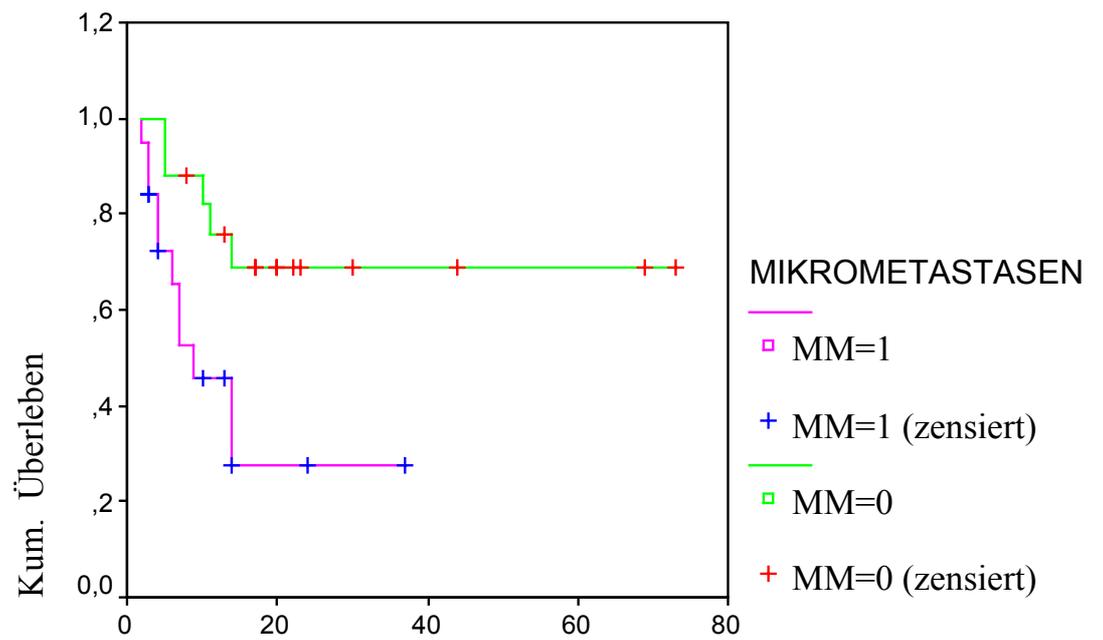


Lokalrezidivfreies Überleben in Monaten (p=0,2345)

Graphik 4a.

Kaplan-Meier-Kurve:

Überleben ohne Fernmetastasen (Pankreaskopf)

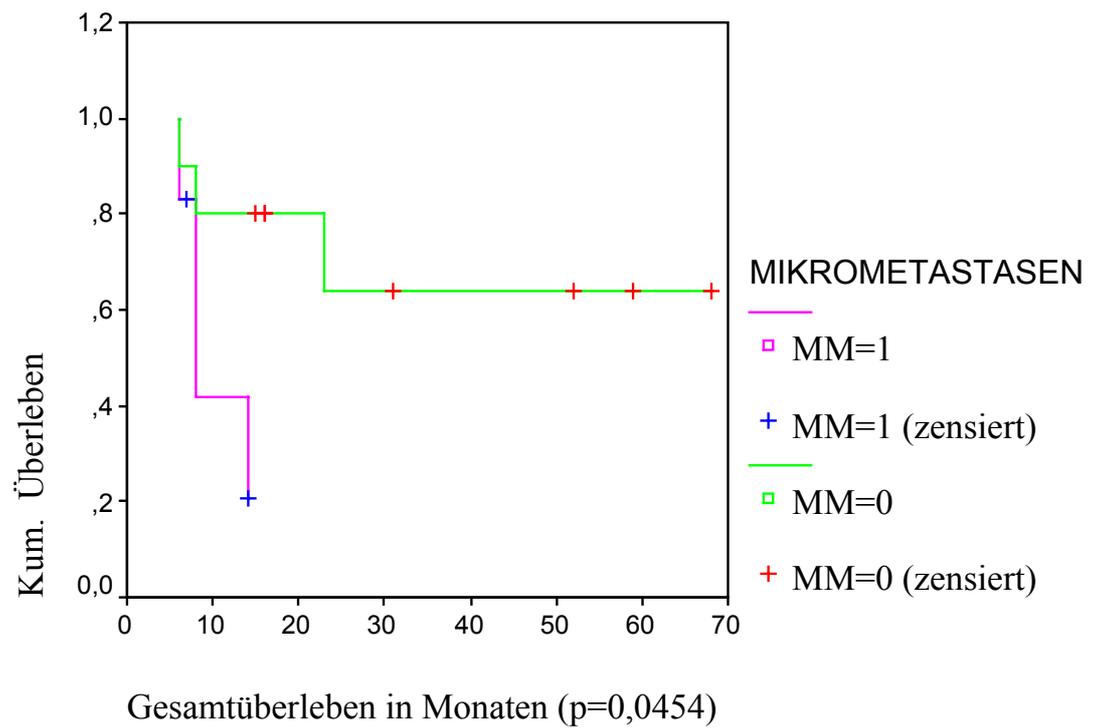


Überleben ohne Fernmetastasen in Monaten (p=0,0158)

Graphik 1b.

Kaplan-Meier-Kurve:

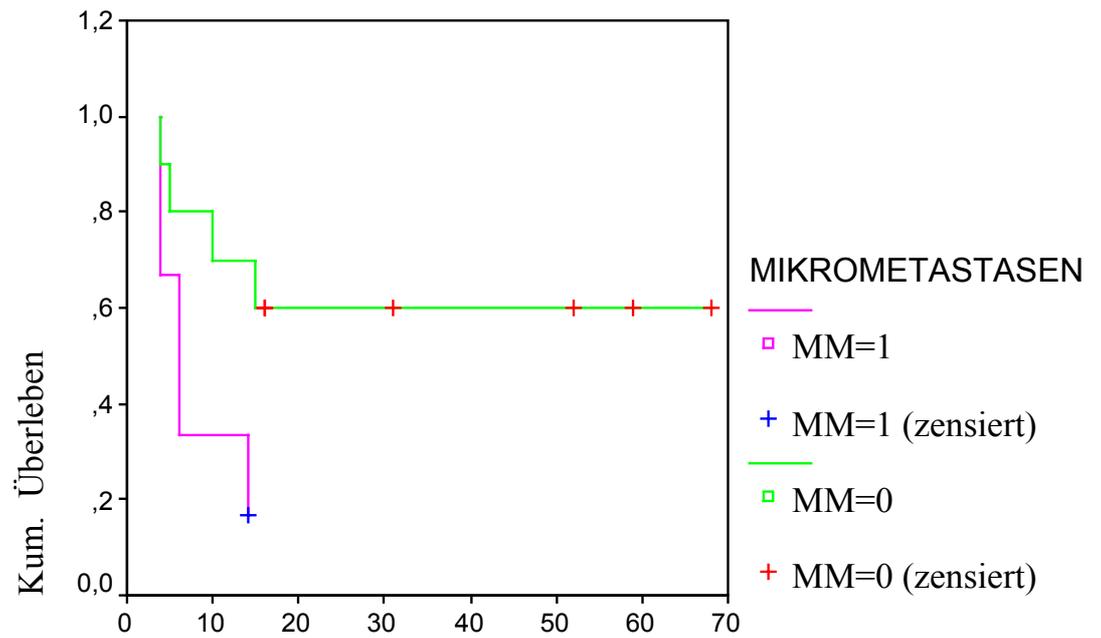
Gesamtüberleben (Papilla Vateri)



Graphik 2b.

Kaplan-Meier-Kurve:

Rezidivfreies Überleben (Papilla Vateri)



Rezidivfreies Überleben in Monaten (p=0,0472)

Tabelle 21. Ergebnisse der multivariaten Cox Regressionsanalyse (Pankreaskopftumor) bezüglich des Gesamtüberlebens

Risikofaktor	Relatives Risiko	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
Mikrometastasen in Lymphknoten (Ber-EP4-positiv vs. -negativ)	0,34	0,123-0,943	0,038
Histopathologischer Status (pN0 vs. pN1)	0,329	0,115-0,937	0,037
Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3/4)	0,62	0,223-1,72	0,358
Tumorstadium (T1/2 vs. T3/4)	1,173	0,397-3,47	0,773

Tabelle 22. Ergebnisse der multivariaten Cox Regressionsanalyse (Pankreaskopftumor) bezüglich des rezidivfreien Überlebens

Risikofaktor	Relatives Risiko	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
Mikrometastasen in Lymphknoten (Ber-EP4-positiv vs. -negativ)	0,22	0,078-0,621	0,004
Histopathologischer Status (pN0 vs. pN1)	0,464	0,175-1,23	0,123
Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3/4)	0,731	0,279-1,917	0,524
Tumorstadium (T1/2 vs. T3/4)	1,457	0,491-4,322	0,497

Tabelle 23. Ergebnisse der multivariaten Cox Regressionsanalyse (Pankreaskopftumor) bezüglich lokalrezidivfreiem Überleben

Risikofaktor	Relatives Risiko	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
Mikrometastasen in Lymphknoten (Ber-EP4-positiv vs. -negativ)	0,364	0,105-1,262	0,111
Histopathologischer Status (pN0 vs. pN1)	0,83	0,26-2,647	0,752
Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3/4)	0,518	0,159-1,689	0,275
Tumorstadium (T1/2 vs. T3/4)	4,833	0,582-40,156	0,145

Tabelle 24. Ergebnisse der multivariaten Cox Regressionsanalyse (Pankreaskopftumor) bezüglich Fernmetastasierung

Risikofaktor	Relatives Risiko	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz
Mikrometastasen in Lymphknoten (Ber-EP4-positiv vs. -negativ)	0,23	0,062-0,848	0,027
Histopathologischer Status (pN0 vs. pN1)	0,494	0,16-1,524	0,22
Differenzierungsgrad (G1/2 vs. G3/4)	0,5	0,148-1,685	0,263
Tumorstadium (T1/2 vs. T3/4)	2,178	0,435-10,905	0,343

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Zielsetzung

Aufgrund ihres klinisch symptomarmen Verlaufes und der sehr unspezifischen Symptome sind Karzinome des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri zum Zeitpunkt der Diagnose häufig schon weit fortgeschritten und lassen lediglich palliative Therapieansätze zu [Gall, F.P., et al.; 1991; Büchler, M., et al.; 1993].

Doch auch im Fall einer frühen Diagnose in einem wenig fortgeschrittenen Tumorstadium erleiden sehr viele Patienten nach radikaler Tumorresektion mit ausgedehnter Lymphadenektomie ein frühes Tumorrezidiv [Gudjonsson, B.; 1995]. Diese Rezidive lassen sich generell therapeutisch nur schlecht beherrschen und stellen für alle Patienten mit malignen Erkrankungen die Haupttodesursache dar [Poste, G., et al.; 1980].

Daher ist die Prognose der Pankreas- und Papillenkarcinome trotz modernster Operationstechniken, rückläufiger postoperativer Mortalität [Cameron, J.L., et al.; 1993; Traverso, L.W., et al.; 1978; Büchler, M., et al.; 1993; Böttger, T., et al.; 1997] und gründlichem präoperativem Staging zur Eingrenzung einer kurativen Operationsindikation weiterhin unbefriedigend geblieben [Reinders, M.E., et al.; 1995; Peters, J.H., et al.; 1991; Zerbi, A., et al.; 1995; Gall, F.P., et al.; 1991].

Insbesondere Patienten mit postoperativ nachgewiesenem Tumorbefall der Lymphknoten weisen eine schlechte postoperative Prognose bezüglich eines Rezidivs auf. Die histopathologische Einstufung der regionalen Lymphknoten ist daher neben der R0-Resektion einer der entscheidenden prognostischen Parameter [Reinders, M.E., et al.; 1995; Gall, F.P., et al.; 1991]; der Grund hierfür liegt in einer frühen lymphogenen Metastasierung der Pankreastumoren.

Doch auch bei Patienten mit histopathologisch negativem Lymphknotenstatus kommt es nicht selten postoperativ zu einem Tumorrelaps, häufig in Form von Fernmetastasen.

Unsere Studie basiert auf dem Gedanken, dass bereits einzelne, histopathologisch nicht nachzuweisende Tumorzellabsiedelungen, sogenannte Mikrometastasen, in den Lymphknoten der Patienten zu diesen Rezidiven führen könnten.

Durch die Einführung monoklonaler Antikörper ist ein Anfärben einzelner epithelialer Zellen in mesenchyalem Lymphknotengewebe mittels immunhistochemischer Assays möglich geworden [Byrne, J., et al.; 1987; Passlick, B., et al.; 1994; Raymond, W.A., et al.; 1989; Latza, U., et al.; 1990]. Wir versuchten daher, einzelne Tumorzellen in Lymphknoten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ber-EP4 und der immunhistochemischen APAAP-Methode nachzuweisen und in einem postoperativen Follow-Up den prognostischen Wert dieser Zellen zu beurteilen.

Das Ziel dieser Untersuchungen war, diejenigen Patienten zu erkennen, bei denen bereits zum Zeitpunkt der Operation eine minimale Tumorzellabsiedelung in die regionalen Lymphknoten als möglicher Ausgangspunkt einer beginnenden Metastasierung stattgefunden hatte.

4.2 Die Färbung

Zur Darstellung der einzelnen Tumorzellen in den Lymphknoten wählten wir die immunhistochemische APAAP-Methode, die für unsere Zwecke einige Vorteile besitzt.

Hierbei handelt es sich um eine gut etablierte Methode, die aufgrund der starken Affinität der monoklonalen Antikörper gegen das Zielantigen eine hohe Spezifität besitzt [Cordell, J.L., et al.; 1984].

Um bei der sehr geringen Anzahl von Zielzellen im Lymphknoten eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, verwendeten wir eine indirekte

Nachweismethode, bei der zur Verstärkung des Färbeergebnisses ein sogenannter konjugierter Sekundärantikörper an den verwendeten Primärantikörper gebunden wird.

Zur Steigerung des Kontrastes der Farbreaktion wurden „Brücken-Antikörper“ (z.B. Kaninchen-Anti-Maus-Ig) eingesetzt, die den Primärantikörper gegen das nachzuweisende Antigen (z.B. Maus-Anti-Mensch) mit einem tertiären Antikörper (z.B. Maus-Ig) verbinden, und die außerdem eine hohe Verdünnung des Primärantikörpers ermöglichen, was wiederum zu einer höheren Spezifität durch geringere ungerichtete Bindungen der Antikörper führt.

Die Tertiärantikörper bestehen aus einem Komplex aus Enzymen und Anti-Enzym-Antikörpern, diese bewirken die nachfolgende Farbumschlagsreaktion.

Der hier verwendete Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) hat gegenüber dem ebenfalls etablierten Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (PAP) einige Vorteile, wie die geringere gewebeeigene Enzymkonzentration und die einfachere und risikoärmere Blockade der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zur Peroxidase. Aus diesen Gründen wählten wir für unsere Untersuchungen die APAAP-Methode.

Im Gegensatz zu immunhistochemischen Färbungen ist das Färbeergebnis bei der Immunfluoreszenz-Methode direkt nach der Antikörper-Reaktion unter einem speziellen Fluoreszenzmikroskop beurteilbar, da die hierbei verwendeten Antikörper an einen Fluorochromfarbstoff gekoppelt sind.

Bei der immunhistochemischen APAAP-Methode dagegen müssen die Schnitte am Schluss der Aufbereitung in einer Substratmischung inkubiert werden, um die gebundenen Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen.

Der im Substrat vorhandene Naphtholphosphat-Ester wird durch die Alkalische Phosphatase der Tertiärantikörper zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Es bildet sich ein unlöslicher Azofarbstoff aus einer Reaktion der Phenole mit dem Chromogen Neufuchsin, einem Diazoniumsalz, dieser färbt die antigenbesetzten epithelialen Zellen rot.

4.3 Der Antikörper

Der verwendete Primärantikörper Ber-EP4 (Dako Code-Nr. M 804) ist ein monoklonaler Antikörper der Immunglobulinsubklasse IgG1_κ, der durch Reinigung des Kulturüberstandes der MVF-7 Zelllinie gewonnen wird. Er eignet sich sowohl für die Färbung von Paraffin-, als auch Kryostatschnitten [Passlick, B., et al.; 1994] und bindet zuverlässig an Antigene epithelialer Zellen.

Ber-EP4 ist gegen zwei Glykopeptide gerichtet, die eine Molekularmasse von 34 kD, beziehungsweise 39 kD haben und ubiquitär auf der Oberfläche und im Zytoplasma fast aller epithelialer Gewebe und der meisten Karzinome vorkommen. Die Funktion dieser Proteine konnte wissenschaftlich bisher nicht geklärt werden.

In früheren Studien ist dieser Antikörper zur Differenzierung zwischen malignen Mesotheliomen und Adenokarzinomen eingesetzt worden [Gaffey, M.J., et al.; 1992; Sheibani, K., et al.; 1991].

Auch weitestgehend entdifferenzierte Karzinome wiesen eine Expression des Zielantigens auf, wogegen Lymphknotengewebe von Patienten, die an entzündliche Erkrankungen oder benignen Tumoren litten, in unseren Testfärbungen im Rahmen der Vorbereitung der Studie keine Ber-EP4-positiven Zellen enthielt [Passlick, B., et al.; 1994].

Daher kann man bei diesen Glykopeptiden von einem zuverlässigen Marker für eine epitheliale Histiogenese ausgehen.

Mit Ausnahme von Hepatozellulären Karzinomen und Adenokarzinomen der Nieren und der Mamma zeigten bisher alle untersuchten Karzinome eine positive Reaktion mit Ber-EP4 [Lacza, U., et al.; 1990; Sheibani, K., et al.; 1991]; und auch alle Primärtumoren unserer Studie zeigten die Expression der zu detektierenden Glykoproteine auf der Oberfläche in ausreichender Ausprägung, so dass Ber-EP4 im Falle der Tumoren des Pankreaskopfes und der Papillenregion als geeigneter Marker für das Vorhandensein epithelialer Tumormetastasen in Lymphknoten angesehen werden kann.

4.4 Prognostische Bedeutung

Die Suche nach einzelnen Tumorabsiedelungen in Lymphknoten mittels immunhistochemischer und anderer Nachweismethoden wurde bereits an einigen Tumorentitäten durchgeführt. Trojani [Trojani, M., et al.; 1987] beschreibt in einer Untersuchung an Patientinnen mit Karzinomen der Mamma in 14 % der Fälle eine Einzelzelldissemination in Lymphknoten; die Ludwig Breast Cancer Study Group [International Breast Cancer Study Group; 1990] fand bei Patientinnen im Lymphknotenstadium N0 einen Anteil von 9 % mit Einzelzellabsiedelungen.

Im Fall des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms finden sich Studienergebnisse mit Einzelzelldissemination in Lymphknoten bei 15,2 % der nodal negativen Patienten [Passlick, B., et al.; 1994], bei Magenkarzinomen in 23,5 % [Maehara, Y., et al.; 1996] und in 28 % bei Patienten mit Colonkarzinomen im Stadium pN0 [Greenon, J.K., et al.; 1994].

Unsere Untersuchungen an insgesamt 107 Lymphknoten von 52 Patienten ergaben bei 32 Lymphknoten von 25 Patienten (48,1 %) den Nachweis einzelner Ber-EP4-positiver Zellen.

Der Anteil an nachgewiesenen Ber-EP4-positiven Zellen liegt in unserem Patientenkollektiv deutlich höher als in den meisten Studien, die andere Tumorentitäten zum Thema haben.

Eine ähnlich hohe Anzahl von Lymphknoten mit Einzelzelldissemination wie im Fall der Tumoren des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri fand sich in einer Studie an Patienten mit Karzinomen des Ösophagus [Hosch, S.B., et al.; 2000]; hierbei zeigte sich eine Einzelzellaussaat in 71% der Fälle.

Zur Vermeidung eines Sammelfehlers im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wurden in den ersten Untersuchungen bei Auffinden von Ber-EP4-positiven Zellen die angrenzenden Gewebeschnitte mit einer herkömmlichen Hämatoxylin-Eosin-Färbung aufgearbeitet. In keinem der so

bearbeiteten Schnitte fand sich eine sichtbare Metastase, so dass man davon ausgehen kann, dass das Ergebnis in der höheren Sensitivität unserer Färbemethode liegt und nicht von einem systematischen Fehler bedingt wird.

Dass im Fall der Ösophaguskarzinome und der Karzinome des Pankreaskopf- und Papillenbereiches erheblich höhere Raten an lymphogen disseminierten Tumoreinzelzellen gefunden wurden, zeigt unseres Erachtens die erhebliche Aggressivität dieser Karzinome, die sich in der sehr frühzeitigen systemischen Verbreitung der Zellen und der dementsprechend schlechten Prognose für die Patienten widerspiegelt.

Sowohl im Fall der Pankreastumoren als auch bei den Karzinomen des Ösophagus hatte der Nachweis von Ber-EP4-positiven Zellen in den regionalen Lymphknoten der Patienten einen signifikanten Einfluss auf die Prognose bezüglich des rezidivfreien Überlebens und auch der Gesamtüberlebensdauer, und zwar unabhängig von der histopathologischen Einstufung ihres Lymphknotenstatus.

Die mittlere Gesamtüberlebensdauer dieser Patienten verkürzte sich von 47 Monaten auf 13 Monate bei Tumoren des Pankreaskopfes ($p=0,004$) und von 49 Monate auf 10 Monate im Falle eines Papillentumors ($p=0,0454$). Es zeigte sich, dass die Aussaat einzelner Tumorzellen in regionäre Lymphknoten unabhängig von anderen Faktoren des Tumorstagings, wie Tumorgröße, Differenzierung und Lymphknotenstatus war.

Es handelt sich bei den immunhistochemisch identifizierbaren isolierten Tumorzellen also um einen eigenständigen und unabhängigen prognostischen Faktor.

Bemerkenswerterweise betrug die mediane Überlebenszeit aller Patienten ohne Nachweis Ber-EP4-positiver Zellen mit 20 Monaten genau doppelt so lange wie die derjenigen mit lymphogener Einzelzellaussaat (10 Monate im Median); und zwar war die Überlebenszeit auch ohne Berücksichtigung der histopathologischen Einstufung ($pN0/pN1$) bei Patienten ohne Ber-EP4- positive Zellen signifikant verlängert.

Aufgrund dieser Studienergebnisse erscheint es uns sinnvoll, diejenigen Patienten mit immunhistochemisch nachgewiesenen Ber-EP4-positiven Zellen in den regionalen Lymphknoten in Anlehnung an die Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen [Allison, R.T., et al.; 1994; Cote, R.J., et al.; 1991; Greenon, J.K., et al.; 1994; Veronese, S.M., et al.; 1993; Maehara, Y., et al.; 1996] als nodal positiv einzustufen, da diese Klassifizierung eher der tatsächlichen Prognose ihres Tumorleidens entspricht.

Im Falle der Patienten unserer Studie würde dies in 36,7 % der Fälle zu einer Änderung des postoperativen Stagings im Sinne einer Höherstufung führen.

4.5 Ber-EP4 als Hinweis auf besondere Metastasierungseigenschaften

In unserer Studie erlitten die Patienten mit nachgewiesenen Ber-EP4-positiven Zellen in den regionalen Lymphknoten signifikant häufiger ein Tumorrezidiv als diejenigen, bei denen keine lymphogene Einzelzellaussaat gefunden werden konnte. Der Krankheitsverlauf ähnelte in diesen Fällen bezüglich Gesamtüberlebensdauer und rezidivfreiem Überleben demjenigen von Patienten mit einem histopathologisch nachgewiesenen Lymphknotenstadium pN1. In der Mehrzahl der Fälle kam es zur Ausbildung von Fernmetastasen; seltener trat ein lokoregionäres Rezidiv auf.

Überraschenderweise hatten jedoch auch Patienten mit histopathologischen Lymphknotenmetastasen (pN1) bei Nachweis Ber-EP4-positiver Zellen in den tumorfrei eingestuften Lymphknoten eine deutlich reduzierte rezidivfreie Überlebenszeit und Gesamtüberlebensdauer.

Die Ausbildung von Fernmetastasen aus disseminierten Einzelzellen in tumorfreiem Gewebe ist nach der „Seed-and-Soil“-Hypothese von Paget [Paget, S.; 1889] besonders von den Einflüssen und dem Milieu des umgebenden Gewebes auf die Tumorzellen abhängig. Neben dem

Vorhandensein geeigneter Wachstumsfaktoren in der Umgebung ist jedoch auch die Fähigkeit der Tumorzellen, sich diese Bedingungen zunutze zu machen, von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung manifester Metastasen [Hosch, S.B., et al.; 2000].

Die Fähigkeit zur Metastasierung ist eine Entwicklung der Tumorzellen, die unabhängig vom lokalen Tumorwachstum in einzelnen Zellen des Verbandes entsteht [Fidler, I.J., et al.; 1977].

Es scheint daher möglich, dass es sich bei den Zellen mit dem Oberflächenantigen Ber-EP4 um Anteile besonders aggressiver Subklone handelt, die die Fähigkeit besitzen, bereits in einem sehr frühen Tumorstadium organübergreifend zu streuen [Poste, G., et al.; 1980; Nowell, P.C.; 1976; Pimm, M.V., et al.; 1977; Hosch, S.B., et al.; 2000].

Interessanterweise konnten wir beobachten, dass es bei Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa im Primärpräparat nicht zwangsläufig zu einer Einzelzelldissemination in Lymphknoten oder zu einer Fernmetastasierung kommen muss. Anscheinend ist allein der Zugang der Tumorzellen zum lymphatischen System noch nicht ausreichend für eine organübergreifende Aussaat des Tumors.

Neben den Fähigkeiten der Tumorzellen, sich in Fremdgeweben anzusiedeln scheint es zusätzlich andere Faktoren zu geben, die den Vorgang der Metastasierung beeinflussen.

Hierzu gehören zum Beispiel die Anzahl der gestreuten Tumorzellen sowie ihre biologischen Eigenschaften [Mühlhöfer, A., et al.; 1998]; so kann es durch die tumorbedingte Aktivierung des Immunsystems zu einem körpereigenen Abwehrmechanismus in Form einer lokoregionären Reaktion kommen.

Andere Tumorzellen hingegen, die anscheinend über einen Selektionsvorteil im Sinne einer veränderten Immunogenität verfügen, breiten sich scheinbar ohne Einschränkung im betroffenen Organismus aus. Daher scheinen Veränderung der Immunogenität im Rahmen der Transformation der Zellen einen entscheidenden Einfluss zu haben [Garrido, F., et al.; 1997; Bodmer, W.F., et al.; 1993; Darrow, T.L., et al.; 1989; Fleming, K.A., et al.; 1981; Hosch, S.B., et al.; 2000]

Bei der beschriebenen Lymphangiosis carcinomatosa könnte es sich daher eher um versprengte Tumorzellen handeln, die keine Fähigkeit zu einer aktiven Ansiedelung und Wachstum in fremden Geweben besitzen.

Da das Vorhandensein des Ber-EP4-Antigens auf der Zelloberfläche jedoch zu einer signifikanten Verschlechterung der Prognose der Betroffenen führte, könnte diese Eigenschaft zu den beschriebenen Selektionsvorteilen von Tumoren gehören.

Ber-EP4-positive Zellen sind daher offenbar frühe Indikatoren für das systemische Fortschreiten einer Tumorerkrankung zu einem Zeitpunkt, an dem mit herkömmlichen Färbemethoden noch keine Metastasierung im ursprünglichen Sinne erkennbar ist.

Es ist daher denkbar, dass der Nachweis von Tumorzellen mit dem Ber-EP4-Oberflächenantigen in den regionalen Lymphknoten bei histopathologisch negativem Ergebnis (pN0) in Zukunft ein Auswahlkriterium für die Anwendung einer adjuvanten Tumorthherapie werden könnte, da die alleinige chirurgische Intervention bei nachgewiesener Dissemination Ber-EP4-positiver Zellen als nicht kurativ beurteilt werden muss [Izbicki, J.R., et al.; 1997].

4.6 Adjuvante Therapieformen – Ein Ausblick

Neben der chirurgischen Intervention existieren zum jetzigen Zeitpunkt kaum etablierte Therapieformen für Patienten mit Tumoren des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri. Allerdings gibt es bereits mehrere Studienansätze, die die Möglichkeiten postoperativer, sogenannter adjuvanter, Therapieformen zu kurativen Zwecken erarbeiten sollen.

Um postoperativ diejenigen Patienten herauszufiltern, deren Tumorleiden sich bereits zum Zeitpunkt der Operation in einem Stadium der systemischen Ausbreitung befindet und die daher von einer solchen Therapie profitieren könnten, eignet sich die immunhistochemische Untersuchung der regionären Lymphknoten auf Ber-EP4-positive Zellen. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden bei den regionalen Lymphknoten

in jeder Ebene 3 Schnitte gefärbt und untersucht, unseres Erachtens ist die Aufarbeitung des Gewebes in diesem Umfang als Screeningmethode noch durchführbar und führt andererseits auch zu zuverlässigen Ergebnissen.

Da es sich bei den Tumoren des Pankreaskopfes und der Papillenregion um nahezu chemotherapeutisch resistente Zellen handelt [Lehnert, M.; 1996], ist eine weitergehende Forschung zu Entwicklung geeigneter Therapieformen nötig.

Vielversprechend sind Versuche, die Wirkung der vorhandenen Chemotherapeutika durch Sensibilisierung der Zielzellen mittels Infektion mit apathogenen adenoassoziierten Viren zu steigern, ohne dabei die toxischen Nebenwirkungen der Therapie zu verstärken [Klein-Bauerschmidt, P., et al.; 1996].

Die Mehrzahl der disseminierten Tumorzellen im Körper von Patienten befindet sich jedoch nachgewiesenermaßen in einem sogenannten „dormant state“, ist also mitotisch inaktiv und damit einer Chemotherapie schlecht zugänglich [Pantel, K., et al.; 1993].

Aus diesem Grund scheint die Chemotherapie keine überzeugende Methode einer adjuvanten Therapie zu sein, sondern eher geeignet, bei Inoperabilität des Befundes eine palliative Therapieoption zu ermöglichen.

Seitdem durch die Hybridtechnik [Kohler, G., et al.; 1992] die technischen Voraussetzungen gegeben sind, spezifische monoklonale Antikörper herzustellen, stellt dies eine weitere Therapiemöglichkeit dar.

In ersten klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium hat die Anwendung monoklonaler Antikörper zwar keine überzeugenden Ergebnisse erbracht [Sears, H.F., et al.; 1985; Sears, H.F., et al.; 1982; Welt, S., et al.; 1990; Buchler, M., et al.; 1990; Goodman, G.E., et al.; 1993; Welt, S., et al.; 1994; Mellstedt, H., et al.; 1991; Buchler, M., et al.; 1991].

Es gibt jedoch experimentelle in-vitro und in-vivo Studien, in denen der Einsatz monoklonaler Antikörper bei kleinen Zellverbänden zu einer deutlichen Tumorregression führte [Schlimok, G., et al.; 1995]. So konnten zum Beispiel die postoperative Prognose von Patienten mit

Kolonkarzinomen im UICC III Stadium nach vollständiger Tumorresektion durch die adjuvante Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A bezüglich Tumorsterblichkeit und Rezidivrate signifikant verlängert werden [Riethmüller, G., et al.; 1994; Riethmüller, G., et al.; 1998].

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper-Therapie sich besser für die Behandlung isolierter Tumorzellen und kleinerer Zellcluster eignet [McNeil, C.; 1995], als für große Tumormassen, die eine geringere Angriffsfläche für die makromolekularen Antikörper bieten [Jain, R.K.; 1990].

Eine primär chirurgischen Behandlung zur Reduktion der Tumorlast mit einer anschließenden Antikörper-Therapie scheint daher eine vielversprechende Kombination zur Verbesserung der Prognose von Patienten mit früh metastasierenden Karzinomen zu sein [Tepper, J.E., et al.; 1992; Kalser, M.H., et al.; 1985].

5. Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten mit Karzinomen des Pankreaskopfes und der Papilla Vateri ist trotz moderner Diagnostik zur Früherkennung und wachsender Möglichkeiten in der Therapie weiterhin schlecht.

Es muss daher angenommen werden, dass die hohe Rezidivrate dieser Tumoren auf eine frühe Tumorzell dissemination zurückzuführen ist, die weder mit den präoperativ eingesetzten bildgebenden Verfahren noch mit den histopathologischen Standardmethoden erfasst wird.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wiesen wir eine okkulte Einzelzell dissemination in regionale Lymphknoten im Fall der Karzinome des Pankreaskopfes und der Papillenregion mit immunhistochemischen Färbemethoden nach; diese ging mit einem signifikant verkürzten rezidivfreien Intervall und Überlebensdauer der Patienten einher.

In die Studie eingeschlossen wurden 52 Patienten, von denen 36 an Karzinomen des Pankreaskopfes und 16 an Tumoren der Papilla Vateri litten. Diese wurden aufgrund des präoperativen Stagings in kurativer Absicht nach Whipple operiert.

Während der Operation wurden systematisch Tumorproben und Proben der entnommenen regionalen Lymphknoten gesammelt.

So konnten 107 Lymphknoten, die nach den histopathologischen Standardmethoden als „tumorfrei“ eingestuft worden waren, mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ber-EP4 immunhistochemisch auf das Vorhandensein einzelner disseminierter Tumorzellen untersucht werden.

Von den untersuchten 107 Lymphknoten enthielten 32 (29,9 %) Ber-EP4-positive Zellen bei 25 von 52 Patienten (48,1 %).

Der Nachweis dieser Zellen erwies sich bei der Aufarbeitung des Follow Up in der multivariaten Cox Regressionsanalyse im Falle der Pankreaskopftumoren als unabhängiger prognostischer Faktor für das

rezidivfreie und auch das Gesamtüberleben der Betroffenen ($p=0,004$, bzw. $p=0,038$).

Bei Patienten mit Karzinomen der Papillenregion hatte der Nachweis einzelner Tumorzellen in den regionalen Lymphknoten signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,0454$) und das rezidivfreie Überleben ($p=0,0472$); diese Werte wurden allerdings aufgrund der relativ geringen Fallzahlen nicht mittels Cox Regressionsanalyse auf ihre Unabhängigkeit geprüft.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die immunhistochemische Aufarbeitung von Lymphknoten zur Einschätzung der postoperativen Prognose herangezogen werden sollte.

Da nur Patienten mit sowohl histopathologisch als auch immunhistochemisch tumorfreien Lymphknoten durch die alleinige operative Therapie als kurativ behandelbar eingestuft werden können, ist der Nachweis lymphogener Mikrometastasen möglicherweise ein zukünftiges Selektionskriterium für den Einsatz adjuvanter TumortheraPIeformen, die bereits in klinischen Studien getestet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Allison, R.T., Baron, S., and Peckitt, N. ; Lymph node micro-metastasis: an investigation, including three-dimensional reconstruction. *Br.J.Biomed.Sci.* 51: 109-113. 1994
2. Bodmer, W.F., Browning, M.J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D.C., and Bodmer, J.G.; Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 690: 42-49. 1993
3. Böttger, T., Boddin, J., Küchle, R., and Junginger, T.; Hat das Ausmaß der Lymphknotenresektion eine Einfluss auf die Morbidität und Prognose nach Pankreaskopfresektion wegen eines duktales oder periampullären Pankreaskarzinoms? *LangenbecksArch.Chir.* 382: 209-215. 1997
4. Buchler, M., Friess, H., Malfertheiner, P., Schultheiss, K., Muhrer, K.H., Kraemer, H.P., and Beger, H.G.; Studies of pancreatic cancer utilizing monoclonal antibodies. *Int.J.Pancreatol.* 7: 151-157. 1990
5. Buchler, M., Friess, H., Schultheiss, K., Gebhardt, C., Kubel, Muhrer, K.H., Winkelmann, M., Wagener, T., Klapdor, R., Kaul, M., et al.; A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer. *Cancer* 68: 1507-1512. 1991
6. Büchler, M., Ebert, M., and Beger, H.G.; Grenzen chirurgischen Handelns beim Pankreaskopfkarzinom. *LangenbecksArch.Chir.Suppl. (Kongressbericht)*: 460-464. 1993
7. Byrne , J., Waldron, R., McAvinchey, D., and Dervan, P.; The use of monoclonal antibodies for the histopathological detection of mammary axillary micrometastases. *J.Surg.Oncol.* 13: 409-411. 1987

8. Caldwell, C.B., and Brennan, M.F.; *Manual of Clinical Oncology*. 6.Ed., 1994; Springer, New York; Berlin; Heidelberg
9. Cameron, J.L., Pitt, H.A., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Kaufman, H.S., and Coleman, J.; One hundred and forty-five consecutive pancreaticoduodenectomies without mortality. *Ann.Surg.* 217: 430-438. 1993
10. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Adulaziz, Z., Macdonald, S., Pulford, K.A.F., Stein, H., and Mason, D.Y.; Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J.Histochem.Cytochem.* 32: 219-229. 1984
11. Cote, R.J., Rosen, P.P., Lesser, M.L., Old, L.J., and Osborne, M.P.; Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.* 9: 1749-1756. 1991
12. Cox, D.R.; Regression models and life tables. *J.Stat.Soc.* 34: 187-220. 1972
13. Darrow, T.L., Slingsluff, C.L., and Seigler, H.; The role of HLA class I antigens in recognition of melanoma cells by tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J.Immunol.* 142: 3329-3335. 1989
14. Delcore, R., Rodriguez, F.J., Forster, J., Hermreck, A.S., and Thomas, J.H.; Significance of lymph node metastases in patients with pancreatic cancer undergoing curative resection. *Am.J.Surg.* 172: 463-469. 1996
15. Fidler, I.J., and Kripke, M.; Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197: 893-895. 1977
16. Fleming, K.A., McMichael, A., Morton, J.A., Woods, J., and McGee, J.O'D.; Distribution of HLA class I antigens in normal tissue and in mammary cancer. *J.Clin.Pathol.* 34: 779-784. 1981

17. Gaffey, M.J., Mills, S.E., Swanson, P.E., Zarbo, R.J., Shah, A.R., and Wick, M.R.; Immunoreactivity for Ber-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors and malignant mesotheliomas. *Am.J.Surg.Path.* 16: 593-599. 1992
18. Gall, F.P., Kessler, H., and Hermanek, P.; Surgical treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Eur.J.Surg.Oncol.* 17: 173-183. 1991
19. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pèrez-Villar, J.J., Lòpez-Botet, M., Duggan-Keen and Stern, P.L.; Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol.Today* 18: 89-95. 1997
20. Gilboa, E.; Immunotherapy of cancer with genetically modified tumor vaccines. *Sem.Oncol.* 23: 101-107. 1996
21. Goodman, G.E., Hellstrom, I., Yelton, D.E., Murray, J.L., O'Hara, S., Meaker, E., Zeigler, L., Palazollo, P., Nicaise, C., Usakewicz, J., et al.; Phase I trial of chimeric (human-mouse) monoclonal antibody L6 in patients with non-small-cell lung, colon, and breast cancer. *CancerImmunol.Immunother.* 36: 267-273. 1993
22. Greenson, J.K., Isenhardt, C.E., Rice, R., Mojzisek, C., Houchens, D., and Martin, E.W.; Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes`B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. *Cancer* 73: 563-569. 1994
23. Gudjonsson, B.; Carcinoma of the pancreas: critical analysis of costs, results of resections and the need for standardized reporting. *J.Am.Coll.Surg.* 181: 483-503. 1995
24. Hermanek, H., Scheibe, O., Spiessl, B., and Wagner, G.; *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* Springer, Berlin; Heidelberg; New York; 1992
25. Hermanek, P., and Sobin, L. H.; *TNM Classification of Malignant Tumours.* 4. Ed., 1992; Springer, New York; Berlin; Heidelberg

26. Hermanek, P., Hutter, R.V., Sobin, L.H., Wagner, G., and Wittekind, Ch.; TNM Atlas. Illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumours. 4. Ed. 1997; Springer, Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo
27. Hermanek, P.; What`s new in TNM. *Path.Res.Pract.* 190: 97. 1994
28. Hosch, S.B., Pantel, K., and Izbicki, J.R.; Cryptic tumor cells in lymph nodes of patients with esophageal cancer. *N.Engl.J.Med.* 338: 550. 1998
29. Hosch, S.B., Kraus, J., Scheunemann, P., Izbicki, J.R., Schneider, C., Schumacher, U., Witter, K., Speicher, M.R., and Pantel, K.; Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res.* 60: 6836-6840. 2000
30. International Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 335: 1565-1568. 1990
31. Izbicki, J.R., Passlick, B., Hosch, S.B., Kubuschok, B., Schneider, C., Busch, C., Knoefel, W.T., Thetter, O., and Pantel, K.; Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in Non-Small-Cell Lung Cancer: Significance of nodal micrometastasis. *J.Thor.Cardiovasc.Surg.* 112: 623-630. 1996
32. Izbicki, J.R., Hosch, S.B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C.E., and Pantel, K.; Prognostic significance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N.Engl.J.Med.* 337: 1188-1194. 1997
33. Jain, R.K.; Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *CancerRes.* 50: 814s-819s. 1990
34. Jass, J.R., Sobin, L.H., and Watanabe, H.; The World Health Organization`s histologic classification of gastrointestinal tumors. A commentary to the second edition. *Cancer* 66: 2162-2167. 1990

35. Kalsner, M.H., and Ellenberg, S.; Pancreatic cancer-adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch.Surg.* 120: 899-903. 1985
36. Klein-Bauerschmidt, P., von Knebel-Doeberitz, M., and Ehrbar, M.; Improved efficiency of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells. *Eur.J.Cancer* 32A: 1774. 1996
37. Klempnauer, J., Ridder, G.J., and Pichlmayr, R.; Prognostic factors after resection of ampullary carcinoma: multivariate survival analysis in comparison with ductal cancer of the pancreatic head. *Br.J.Surg.* 82: 1686-1691. 1995
38. Klöppel, G., and Maillet, B.; Histological typing of pancreatic and periampullary carcinoma. *Eur.J.Surg.Oncol.* 17: 139-152. 1991
39. Kohler, G., and Milstein, C.; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity; 1975 (classical article). *Biotechnology* 24: 524-526. 1992
40. Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J.R., Thetter, O., and Pantel, K.; Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *J.Clin.Oncol.* 17: 19-24. 1999
41. Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, N., and Stein, H.; BerEP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J.Clin.Pathol.* 43: 213-219. 1990
42. Lehnert, M.; Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur.J.Cancer* 32A: 912. 1996
43. Love, R.R., Bosch, F.X., Gill, P.G., Hamilton, C.R., Hossfeld, D.K., and Sherman Jr., C.D.; *Manual of Clinical Oncology*. 6.Ed., 1994; Springer, New York; Berlin; Heidelberg
44. Maehara, Y., Oshiro, T., Endo, K., Baba, H., Oda, S., Ichiyoshi, Y., Kohnoe, S., and Sugimachi, K.; Clinical significance of occult

- micrometastases in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 119: 397-402. 1996
45. McNeil, C.; A new generation of monoclonal antibodies arrives at the clinic. *J.Natl.CancerInst.* 87: 1658-1660. 1995
46. Mellstedt, H., Frödin, J.E., Masucci et al.; The therapeutic use of monoclonal antibodies in colorectal carcinoma. *SeminOncol.* 2: 462-477. 1991
47. Momburg, F., Moldenhauer, G., Hammerling, G.J., and Moller, P.; Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 47: 2883-2891. 1987
48. Mühlhöfer, A., Kronawitter, U., and Zoller, W.G.; Prognostische Wertigkeit von immunhistochemisch nachgewiesenen Tumorzellen in Lymphknoten von Patienten mit R0-reseziertem Ösophaguskarzinom. *Z.Gastroenterol.* 36: 478-481. 1998
49. Nowell, P.C.; The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.1976
50. Paget, S.; The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* i: 571-573. 1889
51. Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J.R., and Riethmüller, G.; Differential expression of proliferation associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J.Natl.Cancer.Inst.* 85: 1419-1424. 1993
52. Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J.; Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985; *Intern. J. Cancer* 54: 594-606. 1993
53. Passlick, B., Izbicki, J.R., Kubuschok, B., Nathrath, W., Thetter, O., Pichlmeier, U., Schweiberer, L., Riethmüller, G., and Pantel, K.; Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph

- nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* 12: 1827-1832. 1994
54. Peters, J.H., Carey, L.C.; Historical review of pancreaticoduodenectomy. *Am.J.Surg.* 161:219-225. 1991
55. Pimm, M.V., and Baldwin, R.W.; Antigenic differences between primary methycolanthrene-induced rat sarcomas and post-surgical recurrences. *Int.J.Cancer* 20: 37-43. 1977
56. Poste, G., and Fidler, I.J.; The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283: 139-146. 1980
57. Raymond, W.A., Leong, A.S.; Immunoperoxidase staining in the detection of lymph node metastases in stage I breast cancer. *Pathology* 21: 11-15. 1989
58. Reinders, M.E., Allema, J.H., van Gulik, T.M., et al.; Outcome of microscopically nonradical, subtotal pancreaticoduodenectomy (Whipple's resection) for treatment of pancreatic head tumors. *World.J.Surg.* 19: 410-415. 1995
59. Riethmüller, G., Schneider-Gädicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., Buggisch, P., and Witte, J.; Randomized trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes`C colorectal carcinoma. *Lancet* 343: 1172-1183. 1994
60. Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., and Pichlmayr, R.†; Monoclonal antibody therapy for resected Dukes`C colorectal cancer: Seven-year outcome of a multicenter randomised trial. *J.Clin.Oncol.* 16: 1788-1794. 1998
61. Schlimok, G., and Riethmüller, G.; Monoclonal antibodies in the therapy of minimally residual solid tumors. *Onkologie* 18: 403. 1995

62. Sears, H.F., Herlyn, D., Steplewski, Z., and Koprowski, H.; Phase II clinical trial of a murine monoclonal antibody cytotoxic for gastrointestinal carcinoma. *CancerRes.* 45: 5910-5913. 1985
63. Sears, H.F., Mattis, J., Herlyn, D., Häyry, P., Atkinson, B., Ernst, C., Steplewski, Z., and Koprowski, H.; Phase I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet* 1: 762-765. 1982
64. Sheibani, K., Shin, S.S., and Weiss, L.M.; Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am.J.Surg.Pathol.* 15: 779-784. 1991
65. Sobin, L.H., and Wittekind, Ch.; TNM classification of malignant tumors. 5. Ed. 1997; John Wiley & Sons, New York
66. Tepper, J.E.; Combined radiotherapy and chemotherapy in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Semin.Oncol.* 19: 96-101. 1992
67. Traverso, L.W., Longmire, W.P.; Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy. *Surg.Gynecol.Obstet.* 146: 959-962. 1978
68. Trojani, M., de Mascarel, I., Bonichon, F., Coindre, J.M., and Delsol, G.; Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br.J.Cancer* 55: 303-306. 1987
69. Veronese, S.M., Gambacorta, M., Gottardi, O., Scanzi, F., Ferrari, M., and Lampertico, P.; Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 71: 3926-3931. 1993
70. Welt, S., Divgi, C.R., Kemeny, N., Finn, R.D., Scott, A.M., Graham, M., Germain, J.S., Richards, E.C., Larson, S.M., Oettgen, H.F., et al.; Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. *J.Clin.Oncol.* 12: 1561-1571. 1994
71. Welt, S., Divgi, C.R., Real, F.X., Yeh, S.D., Garin-Chesa, P., Finstad, C.L., Sakamoto, J., Cohen, A., Sigurdson, E.R., Kemeny, N., Carswell,

E.A., Oettgen, H.F., and Old, L.J.; Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: A phase I study of monoclonal antibody A33. *J.Clin.Oncol.* 8: 1894-1906. 1990

72. Yeo, C.J., and Cameron, J.L.; Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch.Surg.* 383: 129-133. 1998

73. Zerbi, A., Balzano, G., Fatuzzo, R., Calori, G., Braga, M., and DiCarlo, V.; Comparison between pylorus-preserving and Whipple pancreaticoduodenectomy. *Br.J.Surg.* 82: 975-979. 1995

7. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer und Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. S. B. Hosch, der mir das Thema der Doktorarbeit überließ, mir seine Zeit widmete und in vielen Gesprächen wertvolle Anregungen und Unterstützung gab.

Herrn Professor Dr. med. J. R. Izbicki danke ich für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit, in seiner Abteilung unter besten Bedingungen wissenschaftlich arbeiten zu können.

Ebenfalls großen Dank schulde ich Dr. A. Rehders, Dr. N. Stöcklein und Dr. P. Scheunemann, die ihre Erfahrungen in wissenschaftlichem Arbeiten stets bereitwillig mit mir teilten, sowie Franziska Stern, Silke Brillhof und auch Michaela Maas, die mit ihrer technischen Unterstützung im Labor, aber auch freundlichem Zuspruch viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sylvia Metz
Geburtsdatum: 23.09.1971
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet
Konfession: evangelisch-lutherisch

Schulbildung:

1978-1982: Grundschule Barsbüttel
1982-1991: Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Kleines Latinum
Abiturnote: 1,9

Hochschulbildung:

1992-1999: Universität Hamburg, Studium der Humanmedizin
September 1994: Ärztliche Vorprüfung; Note: befriedigend
August 1995: 1. Abschnitt der Ärtzl. Prüfung; Note: Befriedigend
März 1998: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note: Gut
April 1999: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Note: Gut
Abschluss des Medizinstudiums mit der Gesamtnote: Gut.

Berufliche Weiterbildung:

1.8.1999-31.1.2001: Ärztin im Praktikum; III. Medizinische Abteilung,
Allg. Krankenhaus Barmbek
Seit 12. März 2001: Weiterbildung zur Fachärztin für
Allgemeinmedizin mit Weiterbildungsabschnitten
in den Fachbereichen Innere Medizin, Pädiatrie,
Allgemeinmedizin und Chirurgie

Veröffentlichung: Early lymphatic tumor cell dissemination pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas*, Vol. 15, No. 2, pp. 154-159, 1997

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.