Aus der Klinik und Poliklinik
für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki

Expression der Gefäßmarker CD 31 (PECAM-1) und CD 105 (Endoglin) beim sporadischen und hereditären neuroendokrinen Pankreastumor

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Melanie Marja Kristiina Seehase
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am 12.10.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Emre Yekebas

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Ulrike W. Denzer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Martin Merkel

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 6

1.1 NEUROENDOKRINE PANKREAS-TUMOREN 6

1.1.1 Terminologie und Klassifikation 7

1.1.2 Epidemiologie 7

1.1.3 Tumorentitäten 8

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese sporadischer und hereditärer Tumoren 9

1.1.5 Klinik 11

1.1.5.1 Insulinom 11

1.1.5.2 Gastrinom (Zollinger-Ellison-Syndrom) 11

1.1.5.3 Glukagonom 11

1.1.5.4 VIPom (Verner-Morrison-Syndrom) 12

1.1.5.5 Karzinoidsyndrom (Hyperserotonismus) 12

1.1.5.6 Funktionell inaktive endokrine Tumoren 12

1.1.6 Diagnostik 13

1.1.6.1 Histomorphologische Diagnostik 13

1.1.6.2 Biochemische Diagnostik 13

1.1.6.3 Molekulare Gendiagnostik 14

1.1.6.4 Ultraschall-, CT- und MRT-Diagnostik 15

1.1.6.5 Nuklearmedizinische Diagnostik 15

1.1.7 Therapie 16

1.1.7.1 Chirurgische Intervention 16

1.1.7.2 Biotherapie 16

1.1.7.3 Chemotherapie 17

1.1.8 Natürlicher Krankheitsverlauf und Prognose 17

1.2 CD31 (PECAM-1) 18

1.3 CD105 (ENDOGLIN) 19

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 21

3 MATERIAL UND METHODEN 22

3.1 LABORGERÄTE UND EINWEGARTIKEL 22

3.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 23

3.3 PUFFERLÖSUNGEN/FARBSTOFFSUBSTRAT 24

3.4 VERDÜNNUNGSMEDIEN 25

3.5 ANTIKÖRPER UND NEGATIVKONTROLLEN 25

3.6 IMMUNHISTOCHEMIE 25
3.6.1 Prinzip der Immunhistochemie 25
3.6.2 APAAP-Methode 27
3.6.3 Gewebefixierung 28
3.6.4 Paraffineinbettung 28
3.6.5 Herstellung der Paraffinschnittpräparate 29
3.6.6 Nachweis von CD31 und CD105 29
3.6.7 Gegenfärben, Dehydratation, Eindecken 31
3.7 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG 31
3.8 BEWERTUNG DER MIKROGEFÄßDICHTE 32
3.9 BESTIMMUNG DES MIB-1 (KLON KI-67)-LABEL-INDEX 33
3.10 PATIENTEN 33
3.10.1 Tumorklassifikation 33
3.10.2 Klinische Patientendaten 34
3.11 OPERATIONSMETHODEN 36
3.12 STATISTIK 38

4 ERGEBNISSE 39

4.1 UNIVARIANTE ÜBERLEBENSANALYSE 39
4.2 MVD IN KORRELATION ZU KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN FAKTOREN 53
4.2.1 MVD bei CD31-Markierung 53
4.2.2 MVD bei CD105-Markierung 55
4.2.3 MVD bei CD31- und CD105-Markierung in Zusammenhang mit der Tumorklassifikation 57
4.2.4 Ratio CD31/CD105 58
4.3 KORRELATION DER CD31- UND CD105-SPEZIFISCHEN MVD 60

5 DISKUSSION 62

6 ZUSAMMENFASSUNG 69

7 LITERATURVERZEICHNIS 70

8 ANHANG 79

8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 79
8.2 TABELLENVERZEICHIS 80
8.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 81
8.4 DANKSAGUNG 84
8.5 CURRICULUM VITAE 85
8.6 ERKLÄRUNG 86

1. Einleitung

1.1 Neuroendokrine Pankreas-Tumoren

Neuroendokrine Pankreas-Tumoren sind insgesamt selten, gehören jedoch zu den häufigsten endokrinen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes. Sie machen circa 1-2 Prozent aller Pankreas-Tumoren aus und sind aufgrund ihrer relativ guten Prognose von erheblicher klinisch-biologischer Relevanz [1-3]. Sie werden im Erwachsenenalter in allen Altersklassen und bei ausgeglichener Geschlechterverteilung diagnostiziert und sind im Kindesalter extrem selten. Ihr Auftreten ist sporadisch oder hereditär zum Beispiel (z.B.) im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Typ 1 [4]. NEPT werden nach der World-Health-Organization (WHO) in benigne hochdifferenzierte neuroendokrine Tumoren und maligne hochdifferenzierte neuroendokrine Karzinome und niedrigdifferenzierte neuroendokrine Karzinome klassifiziert [2, 5]. Die Tumoren zeigen ein relativ uniformes histologisches Erscheinungsbild, besitzen aber eine erhebliche Heterogenität bezüglich ihrer Klinik und Biologie, die häufig durch Hormonaktivität hervorgerufen wird und weisen ein langsames aber schwer zu beeinflussendes Wachstum auf [6]. Dominante Einflüsse charakteristischer Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene sind bislang nicht bekannt, die wichtigsten Regulatoren der NEPT-Proliferation sind Wachstumsfaktoren epithelialer Zellen und deren Rezeptoren, die häufig autokrin oder parakrin wirken [7]. Als prognostische Parameter galten bislang nur die Tumorgröße, Mitosezahl sowie die Proliferationsrate mittels Ki-67(MIB-1)-Färbung. Die häufigsten neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas sind hochdifferenzierte benigne neuroendokrine Tumoren oder maligne hochdifferenzierte neuroendokrine Karzinome, von denen wiederum 50-60% funktionell aktiv sind. Das heißt (d.h.) es können charakteristische Syndrome durch weitgehend unkontrollierte Sekretion bestimmter Hormone hervorgerufen werden, die diesen Tumoren ihren Namen geben [2]. Nichtfunktionelle NEPT, d.h. endokrine Pankreastumoren ohne hormonelle Symptomatik stellen entweder Zufallsbefunde dar oder werden durch eine lokale Symptomatik, wie z.B. Oberbauchbeschwerden entdeckt. Sie werden mittlerweile häufiger entdeckt, was auf eine verbesserte Diagnostik und gesteigerte Resektionsrate zurückzuführen ist, nicht jedoch auf eine tatsächliche Häufigkeitszunahme [4].

1.1.1 Terminologie und Klassifikation

Der Begriff des neuroendokrinen Tumors bzw. des neuroendokrinen Karzinoms löst den des Karzinoids ab, da dieser nicht mehr ausreicht, um dem gesamten morphologischen und biologischen Spektrum der Neoplasien des disseminierten neuroendokrinen Zellsystems gerecht zu werden. Dieser Begriff wurde in der neuen WHO-Klassifikation von 2000 verwirklicht [3]. Zuvor gab es zum einen die Klassifikation von Williams und Sandler aus dem Jahr 1963, welche die Karzinoide nach embryogenetischen Gesichtspunkten in Vorderdarm- (foregut: Lunge, Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), Mitteldarm- (midgut: hinteres Jejunum, Ileum, Appendix, Zökum), und Enddarmkarzinoide (hindgut: Kolon und Rektum) unterteilte. Diese setzte sich in der täglichen Diagnostik aufgrund von Ungenauigkeiten für die Unterscheidung biologisch relevanter Tumorentitäten jedoch nicht durch [8]. Zum anderen ist die veraltete WHO-Klassifikation von 1980 zu nennen. Diese wurde aber mit ihrer Unterteilung der „Karzinoide“ in enterochromaffine (EC-Zell-), Gastrin (G-Zell-) und nicht näher spezifizierte Karzinoide ebenso nicht der biologischen Vielfalt der Tumoren gerecht. Die neue WHO-Klassifikation unterscheidet im Einzelnen zwischen dem hoch differenziertem neuroendokrinen Tumor mit benignem Verhalten oder fraglicher Dignität, dem hoch differenziertem neuroendokrinen Karzinom mit niedrig malignem Verhalten und dem niedrig differenziertem neuroendokrinem, meist kleinzelligem Karzinom mit hoher Malignität [9]. Die Bezeichnung „neuroendokrin“ begründet sich aus der phänotypischen Verwandtschaft dieser Tumoren mit neuralen Zellen bezüglich der Expression bestimmter Proteine wie Synaptophysin, Chromogranin A und neuronenspezifische Enolase (NSE) [10].

1.1.2 Epidemiologie

Neuroendokrine Pankreas-Tumoren gehören zu den häufigsten endokrinen Neoplasien des Abdominaltraktes, sind insgesamt jedoch selten [1, 2]. Etwa 0,4-1,5% aller Autopsiefälle machen die kleinen (<1cm), in jeglicher Hinsicht asymptomatischen endokrinen Pankreastumoren aus. Die Prävalenz funktionell aktiver oder inaktiver endokriner Pankreastumoren wird auf 1/100.000 geschätzt. Die Inzidenz des Insulinoms wird mit 4/10.000.000 angegeben, dies ist der häufigste funktionelle neuroendokrine Tumor. Die Inzidenz des Gastrinoms beträgt 1,5/1.000.000 [2]. Das Auftreten der Tumoren ist bei beiden Geschlechtern im Erwachsenenalter gleich häufig, die Altersspanne reicht vom 20. bis zum 70. Lebensjahr, nur im Kindesalter sind diese Tumoren selten zu finden [1].

1.1.3 Tumorentitäten

Die meisten endokrinen Tumoren des Pankreas sind hoch differenzierte NET oder neuroendokrine Karzinome, von denen wiederum 50-60% funktionell aktiv sind. Das bedeutet, dass diese Tumoren charakteristische Syndrome wie beispielsweise das Cushing-Syndrom, Glukagonom-Syndrom, Hypoglykämie-Syndrom, Verner-Morrison-Syndrom, Zollinger-Ellison-Syndrom oder die Akromegalie durch die weitgehend unkontrollierte Sekretion von Insulin, Gastrin, vasoaktivem intestinalem Polypeptid (VIP), Glukagon oder anderen noch selteneren Hormonen wie adrenokortikotropes Hormon (ACTH) oder Wachstumshormon (GH) hervorrufen [11]. Jedoch ist dieser Trend rückläufig, da mittlerweile verbesserte klinische und morphologische Diagnostik und verbesserte Operationstechniken möglich und Pankreasresektionen häufiger geworden sind. NEPT kommen in allen Bereichen des Pankreas vor. Es sind makroskopisch gut begrenzte, zumeist solitäre runde Tumoren, die einen Durchmesser zwischen 1-4 cm aufweisen. Mikroskopisch findet sich zumeist eine trabekuläre, solide oder (pseudo-) glanduläre Anordnung der Tumorzellen. Die Kerne der eher monomorphen Zellen mit feingranuliertem eosinophilen Zytoplasma sind rundlich-oval mit einer feinen Chromatinstruktur und kleinen Nukleolen. Inkorporierte normale Gangstrukturen und/oder Inseln finden sich gelegentlich. Nur in seltenen Fällen finden sich hochgradig polymorph solid wachsende proliferationsaktive Zellen in endokrinen Tumoren, die von undifferenzierten Karzinomen histomorphologisch schwer zu unterscheiden sind [1]. Häufig verhalten sich die NEPT maligne, obwohl sie doch histologisch hoch differenziert sind. Vor allem gilt dies für Gastrinome, VIPome, Glukagonome und nichtfunktionelle Tumoren, eine Ausnahme bildet jedoch das Insulinom, es verhält sich benigne. Abgesehen von Leber- und Lymphknoten-Metastasen und einer Tumorinfiltration in benachbarte Organe gelten als wichtigste Malignitätskriterien eine Tumorgröße über 2 cm, eine Gefäßinvasion und eine proliferative Aktivität über 2% [12].

1. Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor
• *Benignes Verhalten:* beschränkt auf Pankreas, Größe <2 cm, nicht angioinvasiv, 2 Mitosen/HPF und 2% Ki-67 positive Zellen
– funktionell aktiv: Insulinom
– funktionell inaktiv
• *Benignes oder niedrigmalignes Verhalten (fragliche Dignität):* beschränkt auf Pankreas, Größe 1-2 cm, >2% Ki-67 positive Zellen oder angioinvasiv
– funktionell aktiv: Gastrinom, Insulinom, VIPom, Glukagonom, Somatostatinom oder ektopisches hormonell induziertes Syndrom
– funktionell inaktiv
2. Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom
• *Niedrigmalignes Verhalten:* Invasion angrenzender Organe und/oder Metastasen
– funktionell aktiv: Gastrinom, Insulinom, VIPom, Glukagonom, Somatostatinom oder ektopisches hormonell induziertes Syndrom
– funktionell inaktiv
3. Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom
• *Hochmalignes Verhalten*

Tab. 1: ***Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas***
Solcia et al., 2000

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese sporadischer und hereditärer Tumoren

Neuroendokrine Tumoren treten sporadisch und hereditär auf. Die sporadischen pankreatischen endokrinen Tumoren sind häufiger als hereditäre. Sie liegen meistens solitär vor, im Gegensatz zu den häufig multipel auftretenden Tumoren im Rahmen hereditärer Tumordispositionen. Weitgehend unbekannt ist die Ätiologie und Pathogenese sporadischer NEPT. Es konnte ein „loss of heterozygosity“ (LOH), d.h. ein Verlust der Heterozygotie für verschiedene Chromosomenregionen wie z.B. dem nahe dem p53-Locus gelegenem Chromosom 17p gezeigt werden. Onkogen-Aktivierungen (wie z.B. k-ras) oder Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen (wie z.B. p53) sind selten [1, 13]. Auch die Beteiligung des amplifizierten Protoonkogens HER2/neu konnte nachgewiesen werden [14,

[15]. Mutationen führen hier zu einer Zunahme der spezifischen Funktion, welche als „Gain-of-function"-Mutationen bezeichnet werden. Erst seit kurzem ist bekannt, dass auch bei sporadischen Tumoren somatische multiple endokrine Neoplasie (MEN) Typ1-Mutationen vorkommen, sie stehen meist im Zusammenhang mit einer allelischen Deletion des MEN1-Genlokus. Bei den familiären Tumorsyndromen sind oftmals mehrere endokrine und nichtendokrine Organsysteme betroffen, als klassische Beispiele lassen sich das Von-Hippel-Lindau-Syndrom, die Neurofibromatose Typ 1, das Cowden-Syndrom und die MEN1 und MEN2 nennen. Allerdings ist in der Differenzialdiagnose der NEPT nur die familäre MEN1 von praktischer klinischer Bedeutung, sie wird autosomal-dominant vererbt. Das 610-Aminosäurenprotein Menin fungiert als Tumorsuppressor und interagiert mit Proteinen der transkriptionellen Regulation und Genomstabilität, u.a. mit JunD, c-Jun und Mitgliedern der Smad- und NF-kB-Familie [15, 16]. Durch seine Inaktivierung kommt es zur Ausbildung der multifokalen endokrinen Tumoren, dies wird als „loss-of-function"-Mutation bezeichnet. Neben dem Pankreas sind vor allem die Nebenschilddrüsen, das Duodenum sowie die Adenohypophyse betroffen, selten treten Läsionen der Nebennierenrinde, des Thymus, der Lunge der Haut, des zentralen Nervensystems oder der Weichteile auf. Mit steigendem Lebensalter weist die MEN1 eine 100%ige Penetranz auf [1].

1.1.5 Klinik

1.1.5.1 Insulinom

Die Hyperinsulinämie im Rahmen eines Insulinoms bewirkt eine Hypoglykämie, die wiederum zu einer Neuroglukopenie führt, bedingt durch Störungen der kortikalen und subkortikalen Funktionen und der Aktivierung des adrenergen Nervensystems. Die Symptome einer Neuroglukopenie sind Doppelsehen, Verwirrtheit, Aggressivität, Krämpfe und Bewusstlosigkeit. Die adrenerge Gegenregulation stellt sich mit Schwitzen, Schwäche, Heißhunger, Übelkeit und Palpitationen dar. Typisch für das Insulinom ist die Whipple-Trias: 1. Symptome einer Neuroglukopenie treten vor allem nach längeren Fastenperioden, z.B. am frühen Morgen oder späten Vormittag bzw. nach körperlicher Anstrengung auf. 2. Gleichzeitig lässt sich eine Hypoglykämie nachweisen. 3. Die Symptomatik verschwindet nach der Gabe von Glukose. Häufig ist bei diesen Patienten eine Gewichtszunahme zu beobachten, da diese unbemerkt wahrnehmen, dass sich ihre Symptome durch Kohlenhydrataufnahme bessern. Neuroglukopenische Phasen treten bei Insulinompatienten mit verschieden Häufigkeiten von mehrmals täglich bis zu ein paar Mal im Jahr auf [17, 18].

1.1.5.2 Gastrinom (Zollinger-Ellison-Syndrom)

Die ungebremste Gastrinsekretion beim Gastrinom bedingt bei mehr als 90% der Patienten eine rezidivierende Ulkuskrankheit. Komplikationen in Form von Ulkusblutungen oder –perforationen werden bei ungenügender Säuresuppression beobachtet. Nahezu alle Patienten leiden unter einer ösophagealen Refluxkrankheit, die gegenüber standarddosierten Protonenpumpeninhibitoren resistent ist. Dadurch erklären sich die Leitsymptome wie Oberbauchbeschwerden, retrosternale Schmerzen und Sodbrennen. Bei der Hälfte aller Patienten treten sekretorische, d.h. bei Nahrungskarenz fortbestehende Diarrhoen in den frühen Morgenstunden auf. Sie sind Folge der Volumenbelastung des Darms durch die exzessiv gebildete Säure und dementsprechend voluminös und wässrig. Eine Steatorrhoe kann sich zudem entwickeln, wenn Pankreasenzyme inaktiviert werden [19, 20].

1.1.5.3 Glukagonom

Pankreas-Glukagonome sind zumeist funktionell inaktiv. Die Symptomatik der Patienten eines aktiven Glukagonoms reicht von ausgeprägten Gewichtsverlusten und Anämie bis

hin zum Diabetes mellitus. Charakteristisch ist das nekrolytische, migratorische Erythem mit sekundärer Blasen bildender Dermatitis, das häufig lange fehldiagnostiziert wird [21, 22].

1.1.5.4 VIPom (Verner-Morrison-Syndrom)

Das VIPom wird auch pankreatische Cholera genannt, denn das Hauptsymptom sind massive, wässrige Durchfälle, bis zu mehreren Litern täglich, hervorgerufen durch die Sekretionsprodukte Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Peptid-Histidin-Isoleucin (PHI). Häufig besteht zudem eine ausgeprägte Exsikkose durch den Flüssigkeitsverlust, kombiniert mit einer substitutionspflichtigen Hypokaliämie. VIP hemmt die Magensekretion, stimuliert die Pankreas- und Dünndarmsekretion und bewirkt eine Hypotension und Vasodilatation. Stuhlvolumina < 700 g/Tag schließen ein VIPom aus [23].

1.1.5.5 Karzinoidsyndrom (Hyperserotonismus)

Charakteristika des Karzinoidsyndroms sind zum einen die Flushsymptomatik, d.h. die anfallsweise Hautrötung mit Hitzegefühl, v.a. im Gesicht und Oberkörper lokalisiert, zum anderen Diarrhoen.

50% der Patienten weisen eine Endokardfibrose auf, die zu einer Trikuspidal- und Pulmonalinsuffizienz und zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen kann. Viele Patienten leiden unter uncharakteristischen rezidivierenden, krampfartigen Bauchschmerzen, häufig postprandial, bedingt durch autokrin freigesetzte Tumorprodukte, die zu einer Darmwandischämie führen können. Seltene Symptome sind Bronchialobstruktionen mit Husten und Dyspnoe, livide Teleangiektasien im Gesicht und Hyperpigmentationen der unteren Extremitäten infolge eines Vitamin-B_6-Mangels [24, 25].

1.1.5.6 Funktionell inaktive endokrine Tumoren

Funktionell inaktive endokrine Tumoren sind deutlich häufiger als funktionell aktive Tumoren. Sie machen sich meistens erst im metastasierten Stadium durch eine lokale Symptomatik bemerkbar [26].

1.1.6 Diagnostik

1.1.6.1 Histomorphologische Diagnostik

Neben den H.E.- und PAS-Standardfärbungen am formalinfixierten Biopsiepräparat ist der kombinierte Einsatz der neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A (Cg A) notwendig. Ein Hinweis auf Malignität und zur Abschätzung der proliferativen Aktivität gibt der Marker Ki-67 (Klon Mib-1) [9]. Zudem können verschiedene Antikörper zum Nachweis der Hormone VIP, Glukagon, Somatostatin, Insulin, Gastrin oder Serotonin eingesetzt werden.

1.1.6.2 Biochemische Diagnostik

Die biochemische Diagnose des Insulinoms wird mit dem Hungertest gestellt. Die Patienten unterziehen sich einer 48-72 stündigen Nahrungskarenz, währenddessen nur die Aufnahme von Wasser erlaubt ist. Es erfolgen im Abstand von 4 Stunden Blutentnahmen zur Bestimmung von Glukose, Insulin und C-Peptid. Sollte der Blutglukose-Wert auf 60 mg/dl abfallen, werden die Intervalle der Blutentnahmen auf 1 bis 2 Stunden verkürzt. Diagnostisch relevant sind Blutzucker-Werte < 50 mg/dl mit begleitenden Hypoglykämiesymptomen, sie terminieren den Hungerversuch. Die Diagnose wird gesichert, indem am Ende des Hungerversuchs, nicht adäquat zum niedrigen Blutzuckerwert abgefallene Insulin- und C-Peptid-Werte gemessen werden. Zudem kann am Ende des Hungerversuchs noch Glukagon appliziert werden. Es ist beim Insulinompatienten für einen raschen Blutzuckeranstieg verantwortlich, da es die durch die antiglykogenolytische Insulinwirkung die in der Leber gespeicherten Glykogenreserven aktiviert, die beim Nicht-Insulinompatienten nicht mehr vorhanden sind [17, 18].

Eine Hypergastrinämie und eine erhöhte Säuresekretion sind diagnostisch wegweisend für das Gastrinom. Die Basalsekretion (basal acid output, BAO) in der Magensaftanalyse beträgt bei diesen Patienten > 10-15 mmol HCl/h. Ein Serumgastrinspiegel > 1000 pg ist bei einem sauren Magensaft pH <2 oder einer hohen BAO beweisend. Eine andere Möglichkeit zur Diagnosesicherung stellt der Sekretintest dar. Er wird vor allem bei gering erhöhten Werten durchgeführt. Hierzu werden beim nüchternen Patienten 2 Blutproben in 15minütigem Abstand abgenommen und anschließend innerhalb von 30 Sekunden Sekretin in einer Dosierung von 1 Konzentrationseinheit (KE)/kg Körpergewicht appliziert. Nach 2, 4, 15 und 30 Minuten erfolgen Blutentnahmen zur Gastrinbestimmung. Bei einem Anstieg des Gastrins um 100% in 10 Minuten ist der Sekretintest positiv ausgefallen [19, 20].

Hohe Plasmaglukagonspiegel, die gegenüber dem Normwert um das 10-1000fache erhöht sind, weisen biochemisch auf ein Glukagonom hin [22].

Beim VIPom finden sich neben der substitutionspflichtigen Hypokaliämie erhöhte VIP-Spiegel im Plasma. Zur Diagnostik muß die Blutprobe heparinisiert, mit Apoproteinen versetzt und sofort danach eingefroren werden, da plasmatische Proteasen das VIP rasch zerstören [23].

Beim Karzinoidsyndrom dient der Serotoninhauptmetabolit 5-Hydrxy-Indolessigsäure (5-HIES) als diagnostischer Leitparameter, er ist im angesäuerten 24-h-Sammelurin erhöht gemessen worden mit einer Spezifität und Sensitivität von > 90%. Zu beachten ist, dass bestimmte Nahrungsmittel und Medikamente die 5-HIES-Konzentration beeinflussen können und somit 2 getrennte Sammelperioden erforderlich sind [24, 25].

Bei allen neuroendokrinen Tumoren ist der unspezifische aber sensitive Serummarker Cg A nachweisbar. Er ist der wichtigste biochemische Verlaufsparameter funktionell inaktiver endokriner Tumoren. Cg A besteht aus 439 Aminosäuren und ist Bestandteil der Membran von Sekretgranula neuroendokriner Zellen. Die Tumorlast lässt sich nur eingeschränkt aus der absoluten Höhe eines Cg A-Spiegels ableiten, da neben dem Cg A aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül in neuronalen, endokrinen und Tumorzellen kleinere Peptide, wie z.B. Vasostatin, Chromostatin und Pankreastatin freigesetzt werden, die von den Anti Cg A-Antikörpern in unterschiedlichem Ausmaß erkannt werden und nicht in gleichem Umfang wie Cg A freigesetzt werden. Hohe Cg A-Spiegel gelten als prognostisch ungünstig. Die Bestimmung des Plasma-Cg A eignet sich nicht als Suchmethode für endokrine Tumoren, ist jedoch als Verlaufsparameter des Tumorwachstums beim einzelnen Patienten gut geeignet. Serotonin (5-HT) ist als diagnostischer Leitparameter ungeeignet, da es auch beim Gesunden infolge einer Blutentnahme zu erhöhten Werten kommt, denn 5-HT wird in Thrombozyten gespeichert und bei deren Lyse freigesetzt [27, 28].

1.1.6.3 Molekulare Gendiagnostik

Bei gegebener Indikation (z.B. positiver Familienanamnese) erfolgt der Nachweis von MEN1-Mutationen mithilfe der Gendiagnostik. Die Erkennung von asymptomatischen Mutationsträgern, die ein hohes Erkrankungsrisiko besitzen ist eine wichtige Konsequenz hieraus, da ein standardisiertes Screeningverfahren bestehend aus radiologischer Bildgebung und klinisch-biochemischen Parametern zur Verfügung steht und zur regelmäßigen Untersuchung genutzt werden sollte [29].

1.1.6.4 Ultraschall-, CT- und MRT-Diagnostik

Für die Primärtumor- und Ausbreitungsdiagnostik bei Patienten mit funktionellen und nichtfunktionellen neuroendokrinen Tumoren besitzt der Einsatz bildgebender Verfahren einen hohen Stellenwert. Zunächst wird die mit einer 60%igen Sensitivität behaftete transabdominelle Sonographie eingesetzt. Nicht ganz so gute Ergebnisse lassen sich bei Tumoren <1cm erzielen, zudem ist die Überlagerung des Pankreas mit gasgefüllten Darmschlingen problematisch. Die einzige Voraussetzung für diese Untersuchung stellt die Nüchternheit des Patienten dar. Die Qualität ist stark untersucherabhängig. Als hilfreich erwiesen hat sich bei der Diagnostik hypervaskularisierten Tumoren der Einsatz von Doppler- bzw. Powerdoppler-Sonographie und Kontrastmittel. Ein anerkanntes Standardverfahren in der präoperativen Diagnostik stellt die Computertomographie (CT) dar. Ein entscheidender Vorteil für den Nachweis kleiner und nur wenig kontrastmittelanreichernder Tumore stellt die Einführung der Mehrzeilentechnik in der CT (MSCT) dar, diese ist kontrastmittelgestützt und mindestens arteriell und portalvenös. Eine umfassende Aussage zur Tumorlokalisation und zur Infiltrationsdiagnostik in umgebendes Gewebe lässt die Magnetresonanztomographie (MRT) in Kombination mit kontrastmittelgestützter MR-tomographischer Darstellung mit der MR-Cholangiopankreatikographie (MRCP) und MR-Angiographie (MRA) zu. Diese Methode ist der früher üblichen Endosonographie mittlerweile überlegen [30-32].

1.1.6.5 Nuklearmedizinische Diagnostik

Die Somatostatinrezeptorszintigraphie (SRS) als Ganzkörperuntersuchungsmethode stellt die zentrale Modalität der Bildgebung mit einer Sensitivität und Spezifität von bis zu 90% dar [30]. Diese Untersuchung wird primär zum Nachweis Rezeptor-positiver gastroenteropankreatischer Tumoren, aber auch zum Nachweis von Metastasen angewandt. In einem Untersuchungsgang ist eine Ganzkörperdiagnostik möglich, bei der auch sehr kleine Primärtumoren und Metastasen, die kleiner als 1 cm groß sind, szintigraphisch detektiert werden. Somatostatin wird außer im Hypothalamus auch in den D-Zellen des Pankreas gebildet. Es ist ein cyclisches Peptid aus 14 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 1638. Bei der Somatostatin-Szintigraphie wird mit ^{111}Indium markiertes Octreotid oder mit ^{99m}Technetium markierte Somatostatinanaloga injiziert. Hierbei handelt es sich um synthetische Somatostatin-Analoga mit einer längeren Wirkungsdauer, die an die Somatostatin-Rezeptoren binden und somit den Tumor nachweisen. Szintigraphische Aufnahmen erfolgen 4-6h, 20-26h und 44-50h nach

Injektion. Die Strahlenbelastung dieser Untersuchung liegt deutlich unter der einer Ganzkörper-CT, die Zufuhr von 1 Liter (l) Flüssigkeit vor der Untersuchung reduziert die Strahlenexposition durch eine rasche renale Ausscheidung und eine frühzeitige Blasenentleerung. Zum Nachweis ossärer Metastasten wird die Knochenszintigraphie herangezogen, da sie gegenüber der Octreotidszintigraphie sensitiver ist. Die Positronenemissionstomographie (PET) stellt ein weiteres optionales Verfahren dar, welches als das Sensitivste angesehen werden kann. Die Untersuchungszeit beträgt maximal 3h und ist somit der Octreotidszintigraphie (44-50h) deutlich überlegen. Allerdings ist die PET derzeit nur in spezialisierten Zentren verfügbar [33, 34].

1.1.7 Therapie

1.1.7.1 Chirurgische Intervention

Oft ist der Krankheitsprozess zum Zeitpunkt der Diagnosestellung neuroendokriner Tumoren bereits so weit fortgeschritten, dass ein kurativer operativer Eingriff nicht mehr möglich ist. Grundsätzlich kommen als Operations-Methoden die partielle Pankreatoduodenektomie nach Whipple, die pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso, die Pankreaslinksresektion, die duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion nach Beger und die Tumorresektion bzw. das Tumordebulking, also die Reduzierung der Tumormasse (s.u.) in Betracht [33] [35].

1.1.7.2 Biotherapie

Hierbei kommen Wirkstoffe zum Einsatz, die die Erkrankung stabilisieren, die Symptomatik positiv beeinflussen und das Überleben verlängern sollen. Es handelt sich um körpereigene Substanzen zur Behandlung hormoneller Syndrome. Somatostatinanaloga (SSA) haben allgemein einen hemmenden Einfluss auf verschiedene Zielgewebe und hemmen insbesondere die Gastrinsekretion, die Glukagonfreisetzung und die VIP-Freisetzung. Zudem haben sie einen antiproliferativen Effekt. Sie kommen zur symptomatischen Therapie zum Einsatz beim Gastrinom, Glukagonom, VIPom, Karzinoidsyndrom und vereinzelt beim Insulinom. Als primär immunmodulierende Substanz wurde Interferon-α in die Therapie neuroendokriner Tumoren eingeführt. Interferone haben ein breites Wirkungsspektrum. Sie induzieren Rezeptoren, die möglicherweise als Tumorsuppressorgene agieren, hemmen die Proteinbiosynthese und darüber hinaus die Progression des Zellzyklus von der G_1- in die S-Phase. Zudem induziert Interferon die Apoptose mit Ersatz von Tumor- durch Bindegewebe, vermittelt

eine vermehrte Expression von Klasse-1-Major-Histocompatibility-Complex (MHC)-Antigenen und markiert somit Tumorzellen als Zielzellen zytotoxischer T-Lymphozyten. Es lässt sich außerdem ein antiangiogener Effekt vermuten [36-38].

1.1.7.3 Chemotherapie

Tumorprogress und/oder durch andere Therapieoptionen nichtkontrollierte tumorbedingte Symptome sind die beiden Kriterein für die Indikation zur systemischen Chemotherapie. Eine Monotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU) oder Doxorubicin beispielsweise ist nur bei Patienten durchzuführen, bei denen eine Kombinationschemotherapie kontraindiziert ist. Als Standardtherapie ist die Kombination aus Streptozotocin und Doxorubicin anzusehen. Insulinome und VIPome haben die höchste Chemotherapiesensitivität, die Kombinationschemotherapie ist sogar gegenüber den SSA zu erwägen. Bei weit fortgeschrittenem Tumorprogress ist eine palliative Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid wirksam [39, 40].

1.1.8 Natürlicher Krankheitsverlauf und Prognose

Der Verlauf einer neuroendokrinen Tumorerkrankung, also unbeeinflusst von Therapiemaßnahmen hängt von dem Tumorwachstum und der Kontrolle der hormonbedingten Symptomatik ab. Die Prognose ist abhängig vom natürlichen Krankheitsverlauf und ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur eingeschränkt zu beurteilen, da das Tumorwachstum unbekannt ist. Die histologische Bestimmung der Ki67-Aktivität dient als Surrogatparameter der Wachstumsgeschwindigkeit. Ein langsames Tumorwachstum wird als günstig beurteilt, ebenso die Lokalisation und Entfernung des Primärtumors. Eine weitere wichtige prognostische Variable stellt die Metastasierung dar. Das Vorliegen von Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird als ungünstig bewertet. Die mittlere Überlebenszeit eines Patienten mit einem metastasierten NEPT beträgt 4 Jahre, wobei Verläufe bis zu 10 und mehr Jahren möglich sind [2, 41, 42].

1.2 CD31 (PECAM-1)

CD31, auch Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) genannt, ist ein transmembranöses Glykoprotein mit einer Masse von 130 kDA das zur Familie der Immunglobuline zählt. Es wird auf Leukozyten und Thrombozyten exprimiert, aber auch auf Endothelzellen, wo es sich in den Interzellularverbindungen anreichert [43]. Die Expression von CD31 auf der Oberfläche von hämatopoetischen und vaskulären Zellen maligner Erkrankungen ist beschrieben [44]. Neben der Rolle als Adhäsionsprotein ist CD31 an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt. CD31 hat selbst keine katalytischen Eigenschaften, die zytoplasmatische Domäne besteht aus 2 Tyrosinresten, deren erhaltene Signalsequenz als Immunrezeptor tyrosinhaltiges inhibitorisches Motiv (ITIM) bezeichnet wird. CD31 ist in Abhängigkeit seiner zytoplasmatischen Beschaffenheit in der Lage, sowohl Zellaktivität zu initiieren als auch darauf zu antworten [45]. CD31 wirkt an verschiedenen wichtigen biologischen Prozessen mit, einschließlich der Emigration und Diapedese von Leukozyten bei Entzündungsprozessen (Transmigration), T-Zell-Aktivierung, Thrombozytenaggregation und Homöostase, Wundheilung, Regulation der Immunantwort und bei der Erhaltung der vaskulären endothelialen Barrierefunktion. Zudem konnte bewiesen werden, dass CD31 eine Rolle beim Wachstum von Kapillaren durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem (Angiogenese) spielt. Dies ist unentbehrlich in normalen Prozessen wie Wundheilung und Ovulation findet aber auch im Rahmen pathologischer Prozesse wie Entzündungen und Tumoren statt. In Letzterem ist die Angiogenese unkontrolliert und gefährlich [46]. CD31 kann in unterschiedlichen Zellsystemen die Apoptose unterdrücken und somit die Entwicklung maligner Erkrankungen fördern und Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika vermitteln [44, 47]. Andererseits führt die Apoptose nicht zu einer vermehrten Expression von CD31. Es wird angenommen, dass in einigen Tumorzellen von Melanomen und Zelllinien von Adenokarzinomen ein intrazellulärer Pool von CD31 für die Regulation der Expression von CD31 auf der Oberfläche sowie für das Tumorzellwachstum und die Metastasierung verantwortlich ist [48].

1.3 CD105 (Endoglin)

CD105 wird auch als Endoglin bezeichnet. Dies ist ein homodimeres Zellmembranglykoprotein mit einer Masse von 180 kDa, das hauptsächlich auf Endothelzellen, aber auch auf Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten exprimiert wird. Auf proliferierenden Blutgefässen von benignen und malignen Zellen und bei Hypoxie wird es übermäßig exprimiert, weshalb CD105 als relevanter endothelialer Proliferationsmarker angesehen wird [49, 50]. Eine Hoch-Regulation von CD105 im Endothel verschiedener Tumorgewebe wie beispielsweise Kolon, Brust, Gehirn, Lunge, Prostata und Zervix wurde in Studien mit diversen Antikörpern nachgewiesen. CD105 bildet Komplexe mit dem Transforming-growth-factor type Beta (TGF-β)-Rezeptor I und II in Endothelzellen, kann aber auch unabhängig auf Zelloberflächen existieren. Die externe Domäne von CD105 bindet mit hoher Affinität die Isoformen TGF-β-1 und TGF-β-3, nicht jedoch TGF-β-2. Es werden 2 Isoformen von CD105 mit Bindungskapazität für TGF-β (L und S), die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, charakterisiert [49, 51]. Gemeinsam mit Betaglycan, einer weiteren Komponente des TGF-β-Rezeptor-Komplexes bildet CD105 den so genannten TGF-β-Rezeptor-Komplex-III (TGF-β-RIII) [52, 53]. Die Funktionen von TGF-β und CD105 sind eng miteinander verknüpft. Die Effekte von TGF-β werden von CD105 moduliert. TGF-β ist ein zu den Zytokinen zählender Wachstumsfaktor mit multiplen biologischen autokrinen sowie parakrinen Effekten, wie z.B. der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Modulation der Immunantwort und Wundheilung [49, 54, 55]. TGF-β spielt allerdings ebenso eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen, einschließlich Angiogenese, Immunsuppression und Metastasierung. Diverse Komponenten des TGF-β-Systems funktionieren als Tumorsuppressoren. Sie ermöglichen die Entwicklungshemmung von Tumoren in frühen Stadien. Wenn diese Komponenten mutieren und unwirksam werden ist die Voraussetzung zur Entstehung einer Krebserkrankung geschaffen. TGF-β inhibiert die Entwicklung von Akut-Lymphatischen-Leukämien vom T-Zell-Typ indem es die T-Zell-Proliferation unterdrückt [56]. Für Tumoren der Brustdrüse konnte gezeigt werden, dass TGF-β an der Motilität und Invasivität der malignen Zellen beteiligt ist und ebenso bei der Entwicklung von Krankheiten des Pankreas [57, 58]. Die biologischen Effekte werden mittels Rezeptoren vermittelt. Sechs verschiedene Rezeptoren sind bislang bekannt, wobei CD105 erst kürzlich entdeckt wurde [59]. TGF-β und seine Rezeptoren sind Ziel für Antikörper-

Therapien und Enzymkinase-Inhibitoren, da sie entscheidend an der Entwicklung maligner Prozesse beteiligt sind [52].

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war es, in einer retrospektiven Studie die mikrovaskuläre Dichte mithilfe der Gefäßmarker CD31 (PECAM-1) und CD105 (Endoglin) hinsichtlich ihrer möglichen prognostischen Anwendbarkeit bei hereditären und sporadischen neuroendokrinen Pankreastumoren zu untersuchen. In verschiedenen Untersuchungen an Brust-, Bronchial- und Nierenzellkarzinomen konnte gezeigt werden, dass sich die mikrovaskuläre Dichte (MVD) von Geweben als unabhängiger prognostischer Marker für maligne Erkrankungen besonders eignet [49]. Eine erhöhte mikrovaskuläre Dichte korreliert mit einem kürzeren Überleben allgemein und insbesondere mit einem verkürztem rezidivfreiem Überleben, dies konnte u.a. für Kolon-, Prostata- und Zervixkarzinome und duktale Adenokarzinome des Pankreas festgestellt werden [49, 60, 61]. Für verschiedene Malignome, insbesondere solide Tumoren wie Mamma-Karzinome und kolorektale Karzinome konnte bereits belegt werden, dass sowohl CD31 als auch CD105 prognostische Relevanz besitzen und in entartetem Gewebe stärker exprimiert werden als in gesundem [62-64]. Bezüglich der Signifikanz beider Marker konnte festgestellt werden, dass CD105 eindeutig höhere Bedeutsamkeit hinsichtlich der Prognose zeigt. Verschiedene Untersuchungen von Brustkrebs-Patientinnen und -Patienten konnten dies deutlich machen [65, 66].In dieser Arbeit sollte die Korrelation klinisch-pathologischer Parameter mit der Expression bzw. der Quantität der Gefäßmarker CD31 und CD105 bei neuroendokrinen Pankreastumoren untersucht und verglichen werden. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, ob über die Expression eine Aussage über die Prognose der Erkrankung möglich ist. Zu dieser Studie gehört ein Untersuchungskollektiv bestehend aus 42 an neuroendokrinen Pankreastumoren erkrankten und zum Teil (z.T.) auch daran verstorbenen Patienten, die in einem Zeitraum von 1994 bis 2005 beobachtet wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte und Einwegartikel

Becherglas 500 ml/1000ml	Fa. Schott Duran
Deckgläser 24 x 46 mm, No.1	Fa. Marienfeld
Einmalpipette 3 ml	Fa. Elkay, Irland
Eppendorf Tubes 0,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Erlenmeierkolben 100m/5000ml	Fa. Schott Duran
Faltenfilterpapier	Fa. Schleicher & Schnell, Dassel
Inkubator	Heraeus Instruments
Küvetten	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Küvetteneinsatz	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Labor pH-Meter	WTW GmbH & Co, Weilheim
Laborwecker	Fa. C. Roth, Karlsruhe
Magnetrührer	Fa. Gerhardt
Messzylinder 1000 ml	Fa. Brand
Messzylinder 100 ml	Fa. Schott Duran
Mikroskop	Fa. Olympus
Mikroskop	Fa. Zeiss, Jena
Objektträger	Fa. Marienfeld
Paraffinausgußstation	Fa. Mikrom, Heidelberg
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt
Polystyrol-Pinzette	J. Söllner GmbH, Deggendorf
Schlittenmikrotom	Fa. Mikrom, Heidelberg
Waage	sartorius Laboratory
Wasserbad	Fa. Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Aquatex	Fa. Merck, Darmstadt
BSA-Pulver, A-4503	Fa. Sigma, Steinheim
Dimethylformamid	Fa. Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat reinst	Fa. Merck, Darmstadt
Eosin Y Solution	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol 80%, 96%, 100%	Fa. Walter CMP GmbH & Co.
Eukitt	Fa.O. Kindler GmbH & Co.
Formaldehyd	Fa. Merck, Darmstadt
Isopropanol 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%	Fa. Walter CMP GmbH & Co
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fa. Merck, Darmstadt
MAYER`s Hematoxylin Solution	Fa. Sigma, Steinheim
Naphtol-AS-Biphosphate	Fa. Sigma, Steinheim
Natriumnitrit	Fa. Merck, Darmstadt
Natronlauge 1N/2N	Fa. Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Fa. Merck, Darmstadt
Paraffin	Fa. Merck, Darmstadt
Protease(Pronase)-Pulver Type XXIV Bacterial	kml.Fa. Sigma, Steinheim
Roti-Histol	Fa. Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 1normal (N)/2N	Fa. Merck, Darmstadt
Sodium Chloride	Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland
Tetramisole hydrochloride	Fa. Sigma, Steinheim
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Trisma base, minimum 99,9% titration	Fa. Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Merck, Darmstadt
Xylol	Fa. Votre Partenaire Chemie, Frankreich
Zitronensäuremonohydrat	Fa. Merck, Darmstadt

3.3 Pufferlösungen/Farbstoffsubstrat

Citrat-Puffer	Lösung A	29,41 Gramm (g) Zitronensäuremonohydrat werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst
	Lösung B	29,41 g Tri- Na- Citrat Dihydrat werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst

Für 1 Liter Citratpuffer werden 18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B mit 900 ml destilliertem Wasser gemischt und der pH-Wert auf 6 eingestellt.

TRIS-Puffer	**(**Ansatz für 5 Liter) 30 g TRISMA-Pulver 42,5 g Na Cl 100 ml HCl (2 N) Auffüllen mit destilliertem Wasser bis 5 Liter pH-Wert auf 7,4 einstellen
APAAP-Substrat	
Lösung 1	1,21 g TRISMA-Pulver 1,7 g NaCl 0,08 g Tetramisol 200 ml destilliertes Wasser pH-Wert auf 8,24 einstellen
Lösung 2	0,033g Naphtolbiphosphat 1 ml Dimethylformamid (1 Minute bei Raum-temperatur inkubieren)
Lösung 3	0,4 g Natriumnitrit 10 ml destilliertes Wasser
Lösung 4	400 µl Neufuchsin (5 g Neufuchsin ad 100 ml 2N HCl)

Lösung 3 zu Lösung 4 geben, eine Minute lang inkubieren. Dann Lösung 2 und die gemischten Lösungen 4 und 3 in Lösung 1 geben, kurz mischen und schnell filtrieren.

3.4 Verdünnungsmedien

1.) TRIS-Puffer

2.) TRIS-Puffer mit BSA-Pulver 1%ig
0,5 g BSA-Pulver + 50 ml TRIS – Puffer

3.5 Antikörper und Negativkontrollen

Antikörper

CD31	Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, mouse IgG1, Clone JC70A, Synonym platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1, Code No. M0823 Fa. Dako Cytomation
CD105	Monoclonal Mouse Anti-Human CD105, Endoglin, mouse IgG, Sn6h, Code No. M3527, Synonym GP160, Fa. Dako Cytomation

Negativkontrolle

MOPC-141	mouse IgG2b, kappa, M 8894, Fa. SIGMA

3.6 Immunhistochemie

3.6.1 Prinzip der Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren haben in der Medizin und Biologie eine zunehmende Bedeutung erreicht. Aufgrund der Verfeinerung der immunhistochemischen Techniken

werden Sensitivität und Spezifität stetig verbessert. Heute ist diese Technik v.a. Bestandteil der Pathologie und Anatomie, wo zahlreiche pathohistologische Strukturen diagnostiziert und erforscht werden. Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, dass im Gewebe vorhandene antigene Determinanten mit spezifischen Antikörpern reagieren, und diese über ein Enzym oder einem fluoreszierenden Farbstoff im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein und stammen von verschiedenen Tierspezies. Monoklonale Antikörper sind nur gegen eine Determinante gerichtet und besitzen dadurch eine höhere Spezifität als polyklonale Antikörper. Zahlreiche Methoden zur immunhistochemischen Darstellung sind bekannt. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper direkt mit einem Marker konjugiert. Dieses Verfahren ist sehr schnell, aber teuer, da Antikörper in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Bei der indirekten Methode erfolgt der Nachweis mit einem weiteren Antikörper, dem so genannten Sekundärantikörper, der wiederum von einem dritten Antikörper oder einem Komplex gebunden werden kann und somit eine Brückenfunktion darstellt. In der Praxis finden v.a. die APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode, die PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase)-Methode und die ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode Anwendung [67, 68].

3.6.2 APAAP-Methode

Die APAAP-Methode ist eine indirekte Komplexmethode. Zunächst bindet der Primärantikörper an das im Gewebe liegende Antigen. Damit der so genannte APAAP-Komplex anschließend binden kann, muss ein Brückenantikörper eingesetzt werden, der dieselbe Herkunft hat, wie der Primärantikörper. Der APAAP-Komplex ist ein Enzym-anti-Enzym-Komplex, der aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase besteht, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind [67, 69].

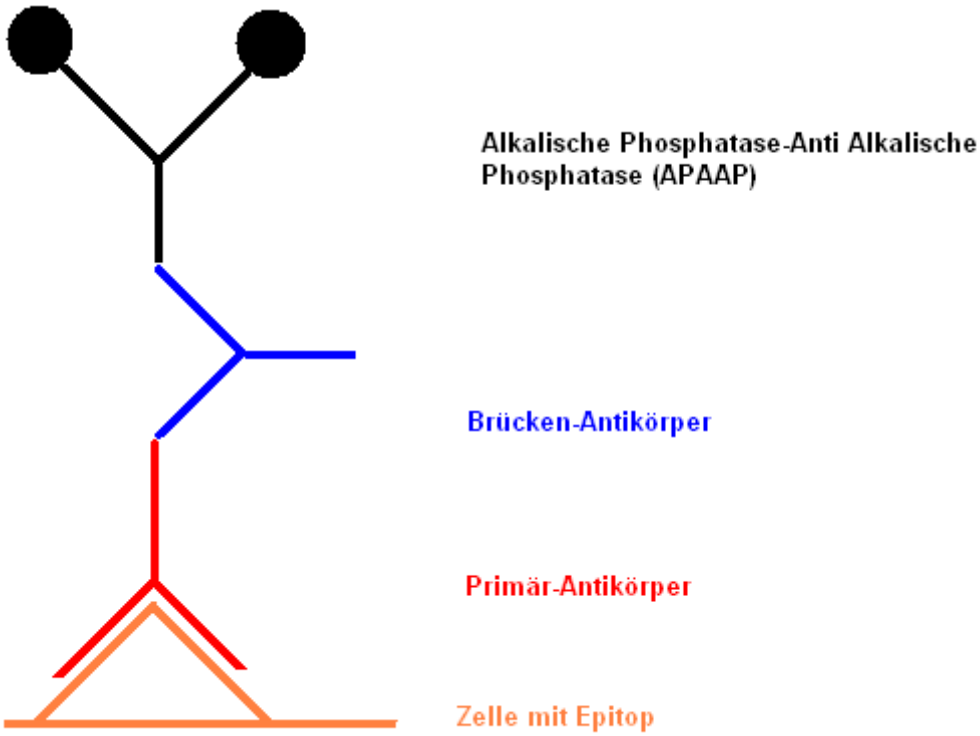


Abb. 1: *Schematische Darstellung der APAAP-Methode*

3.6.3 Gewebefixierung

Die NEPT-Gewebe wurden in einer wässrigen Formalinlösung fixiert. Dies stellt die gebräuchlichste Art der Gewebeerhaltung postmortal dar. Hierzu wurden die Gewebe 8-18 Stunden bei Raumtemperatur in 10%iger, gepufferter Formalinlösung (KH_2PO_4, Na_2HPO_4, Formaldehyd 37%, destilliertes Wasser) fixiert und anschließend 2 bis 6 Stunden in Leitungswasser gespült.

3.6.4 Paraffineinbettung

Die fixierten Gewebe müssen, bevor sie geschnitten werden können, eingebettet werden. Dies erfolgte in Paraffin. Vor der Einbettung erfolgten folgende Dehydrierungsschritte:

45-60 Min Isopropanol 20%
45-60 Min Isopropanol 40%
45-60 Min Isopropanol 60%
45-60 Min Isopropanol 80%
45-60 Min Isopropanol 90%
45-60 Min Isopropanol 100% Nr. 1
45-60 Min Isopropanol 100% Nr. 2
8-16 Stunden Isopropanol 100% Nr. 3
1 Stunde Xylol Nr. 1
1 Stunde Xylol Nr. 2
1 Stunde Xylol Nr. 3

Nach dem Durchlaufen der Dehydrierungsreihe erfolgte das Einbringen der Gewebe in das heiße Paraffin. Zunächst 4 Stunden in ein Paraffin bei 55-65° Celsius, dann 8 bis 16 Stunden in ein zweites Paraffin bei 55-65° Celsius und anschließend 4 Stunden in ein drittes Paraffin, ebenfalls bei 55-65° Celsius. Aus dem Paraffin werden die Gewebe in Blöcke eingegossen und sind nach dem Erkalten gebrauchsfertig zum Schneiden.

3.6.5 Herstellung der Paraffinschnittpräparate

Die Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom 6µm dick geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden zunächst auf einem ca. 20° Celsius kaltem Wasserbad aufgefangen, dann auf einem ca. 45° Celsius heißem Wasserbad gestreckt und danach auf einen Objektträger glatt aufgezogen. Abschließend folgte das Trocknen der Schnittpräparate über Nacht bei ca. 37° Celsius bis 45° Celsius in einem Wärmeschrank.

3.6.6 Nachweis von CD31 und CD105

1. Entparaffinieren:
2 x 5 Min Rotihistol

2. Rehydrierung:
2 x 2 Min Ethanol 100%
2 x 2 Min Ethanol 96%
2 x 2 Min Ethanol 80%

3. Spülung:
3 x 2 Min TRIS-Puffer

Als nächster Arbeitsschritt war zur Herausarbeitung der Antigene, mit Ausnahme von CD105, eine Vorbehandlung im Wasserbad mit einer Pufferlösung notwendig. Die genauen Angaben werden im jeweiligen Protokoll angegeben. Bei CD105 war eine Vorbehandlung mit 1%iger Pronase notwendig. Danach wurden die Objektträger für 3 mal 2 Minuten im TRIS-Puffer gespült. Alle weiteren Inkubationen, bis auf die im APAAP-Substrat, erfolgten in einer feuchten Kammer und im Wärmeschrank bei 37°C mit jeweils 150µl Inkubat. Als letzter Schritt zur Vorbereitung für die Immunhistochemie erfolgte eine Inkubation mit Normalserum. Dieses Normalserum ist zur Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen der Primärantikörper an freien reaktiven Gewebsantigenen, und stammt von der gleichen Tierspezies, wie der Sekundärantikörper.
Zum Nachweis von CD31 wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Im Anschluss war zum Nachweis dieses Gefäßmarkers eine Vorbehandlung mit TRIS-Puffer im 95° Celsius heißem Wasserbad für 20 Minuten notwendig. Nach einer Abkühlungsdauer von 15 Minuten wurden die Schnitte für 3 mal 5 Minuten im TRIS-Puffer gespült und dann das

Normalserum (Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), Code No. X 0903, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:1000 mit TRIS/BSA 1% aufpipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen der Objektträger wurde der Primärantikörper Anti-CD31 in einer 1:50 Verdünnung mit TRIS/BSA 1% aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde hier MOPC-141, Mouse IgG2b, Kappa, der Firma SIGMA verwendet. Im Anschluss an diese 30minütige Inkubation, wurden die Präparate 3 mal 2 Minuten im TRIS – Puffer gespült. Im weiteren Verlauf wurde der Brücken-Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, Code No. Z 0259, Fa. Dako Cytomation) in einer 1:50 Verdünnung mit TRIS/BSA 1% aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. . Nach erneuten 3 mal 2 Minuten Waschen im TRIS – Puffer wurde der APAAP-Antikörper (APAAP Mouse Monoclonal, Code No. D 0651, Lot 049, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:50 mit TRIS/BSA 1% aufgetragen und wiederum für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte erneut 3 mal 2 Minuten Waschen im TRIS-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten im APAAP-Substrat bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert.

Zum Nachweis von CD105 wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren mit Pronase 1% vorbehandelt. Die Inkubation erfolgte für 7 Minuten, gestoppt wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser, gefolgt von 3 mal 5 Minuten Spülen im TRIS-Puffer. Danach wurde das Normalserum (Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), Code No. X 0903, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:1000 mit TRIS/BSA 1% aufpipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Nach Abklopfen der Objektträger wurde der Primärantikörper Anti-CD105 in einer 1:50 Verdünnung mit TRIS/BSA 1% aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde hier MOPC-141, Mouse IgG2b, Kappa, der Firma SIGMA verwendet. Im Anschluss an die 45minütige Inkubation, wurden die Präparate 3 mal 2 Minuten im TRIS – Puffer gespült. Im weiteren Verlauf wurde der Brücken-Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, Code No. Z 0259, Fa. Dako Cytomation) in einer 1:50 Verdünnung mit TRIS/BSA 1% aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. . Nach erneuten 3 mal 2 Minuten Waschen im TRIS – Puffer wurde der APAAP-Antikörper (APAAP Mouse Monoclonal, Code No. D 0651, Lot 049, Fa. Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:50 mit TRIS/BSA 1% aufgetragen und wiederum für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgte erneut 3 mal 2 Minuten Waschen im TRIS-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten im APAAP-Substrat bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert.

3.6.7 Gegenfärben, Dehydratation, Eindecken

Nachdem durch immunhistochemische Untersuchungsmethoden die gesuchten Wachstumsfaktoren, Marker und Rezeptoren markiert werden konnten, wurden die Schnitte 2 mal 1 Minute mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 1 Minute mit Mayer`s Hämatoxylin gegengefärbt. Diese Gegenfärbung ist notwendig, um die nicht spezifisch gefärbten Anteile des Gewebes von den Gefärbten besser zu unterscheiden. Insbesondere werden durch den blauen Farbstoff Hämatoxylin Zellkerne gefärbt, andere Strukturen im Hintergrund geringer. Danach wurden die Präparate erneut 2 mal kurz mit destilliertem Wasser gespült dann 4 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und hiernach noch 2 mal kurz mit destilliertem Wasser gespült. Alle Schnitte konnten nun mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquatex eingedeckt werden.

3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung ist eine Sukzedanfärbung, d.h., die einzelnen Färbungsschritte erfolgen nacheinander. Sie basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption. Hämalaun wird üblicherweise progressiv gefärbt. Das bedeutet, daß der Färbegrad während der Färbung kontrolliert, und die Färbung bei gewünschtem Farbergebnis abgebrochen wird. Hämalaun ist positiv geladen und bindet sich an die sauren Bestandteile der DNS, hierdurch wird eine Kernfärbung erzielt. Eosin wird regressiv gefärbt, es wird also erst überfärbt und anschließend differenziert. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiven Gewebsbestandteile, hierdurch wird eine Plasmafärbung erzielt. Zur H.E.-Übersichtsfärbung wurden die Paraffinschnitte zum Entparaffinieren zunächst für 2 mal 5 Minuten in Xylol eingebracht. Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurde 100 %iges, 96 %iges und 80 %iges Ethanol für jeweils 2 mal 2 Minuten verwendet. Danach wurden die Objektträger für 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen, um hiernach 1 Minute mit Mayer´s Hämatoxylin gefärbt zu werden. Es folgte das Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser und anschließend das ca. 30 sekündige Färben in Eosin, wiederum von Spülen unter fließendem Leitungswasser gefolgt. Dann wurden die Schnitte dehydriert, zunächst mit 80%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol für jeweils 2 mal 2 Minuten und abschließend mit Xylol für 2 mal 5 Minuten. Das Eindecken und Konservieren der Präparate erfolgte mit Eukitt.

3.8 Bewertung der Mikrogefäßdichte

Die Grundlage für die quantitative Bewertung der Vaskularisation des untersuchten Tumormaterials erfolgte auf Grundlage der 1991 von Weidner et. al veröffentlichten Studie zur Angiogenese bei Brustkrebs [70]. Zunächst wurde mit dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung (10er Okular x 4er Objektiv) die Stellen der stärksten Tumorvaskularisation, die so genannten Hot Spots, aufgesucht. Diese wurden entsprechend ihrer Blutgefäßdichte einem subjektiven Grading von 1 bis 4 unterzogen, wobei Grad 1 einer schwachen und Grad 4 einer starken Vaskularisation entsprach. Anschließend erfolgte bei 200facher und 400facher Vergrößerung die Bestimmung der spezifischen Gefäßdichte von CD31 und CD105 durch das Auszählen von 20 Gesichtsfeldern, entsprechend einer Sicht von 1 mm^2.
In der vorliegenden Studie wurde die quantitative Auswertung der NET-Präparate an einem Lichtmikroskop CX 41 der Firma Olympus durchgeführt, wobei nach Aufsuchen der Hot Spots die Gefäßzahl bei 400facher Vergrößerung (40er Objektiv x 10erOkular) mit dem entsprechenden Sichtfelddurchmesser von 1 mm bestimmt wurde. Abweichend von Weidners Studie wurde auf eine subjektive Beurteilung der Gefäßdichte im Sinne eines Gradings verzichtet. Nach der immunhistochemischen Färbung erfolgte die Auszählung von 20 Gesichtsfeldern pro Präparat. Unter Verwendung der folgenden mathematischen Formel: $F = \pi \cdot x \cdot r^2$, wobei F für die Kreisfläche und r für den Kreisradius steht, wurde die Sichtfeldfläche in mm^2 ausgerechnet (3,14 x 0,25mm^2 = 0,196mm^2). Danach erfolgte die Bestimmung der Gefäßzahl pro Quadratmillimeter (Gefäße/mm^2), indem der Quotient aus der Gefäßzahl und der jeweiligen Sichtfeldfläche (in mm^2) gebildet wurde. Für die statistische Auswertung wurden nach dem Grad der Vaskularisierung jeweils zwei Gruppen gebildet, wobei Gruppe 1 einer niedrigen und Gruppe 2 einer hohen mikrovaskulären Gefäßdichte entspricht. Zudem wurde ein Quotient der mikrovaskulären Gefäßdichte von CD31 und von CD105 gebildet und nachfolgend ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt, wobei Gruppe1 dem Quotienten ≤ 5 und Gruppe 2 dem Quotienten >5 entsprach.

3.9 Bestimmung des MIB-1 (Klon Ki-67)-Label-Index

Zur Bestimmung des MIB-1 (Klon Ki-67)-Label-Index wurden in Anlehnung an eine Studie zur Untersuchung der Proliferationsaktivität von Meningiomen jeweils mindestens 10 willkürliche Gesichtsfelder der NEPT-Präparate mit mindestens 2000 Zellkernen bei einer identischen Gesichtsfeldgröße ausgezählt [71].

3.10 Patienten

Die in diese retrospektive Studie eingegangenen 42 Patienten mit neuroendokrinen Pankreastumoren wurden zwischen 1995 und 2004 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert. Es liegen schriftliche Einverständniserklärungen aller Patienten zur Nutzung der resezierten Proben vor. Alter der Patienten betrug 27 bis 79 Jahre. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 51,1 Jahren, der Median beträgt 54 Jahre. 22 (52,4%) der Patienten waren männlichen Geschlechts, 20 (47,6%) Patienten weiblich.

3.10.1 Tumorklassifikation

Alle Tumoren wurden gemäß der WHO-Klassifikation von 2000 in benigne hochdifferenzierte neuroendokrine Tumore und maligne niedrigdifferenzierte und hochdifferenzierte neuroendokrine Karzinome eingeteilt [9, 72]. Es fanden sich 10 (23,7%) hochdifferenzierte, benigne neuroendokrine Tumoren, 29 (69%) hochdifferenzierte, niedrigmaligne neuroendokrine Karzinome und 3 (7%) niedrigdifferenzierte, hochmaligne Karzinome. Diese Klassifikation basiert auf der Tumorgröße, Gefäßinvasion, Proliferationsaktivität, histologischer Differenzierung und der Hormonaktivität. Bei 5 (11,8%) Patienten wurde zudem ein MEN-1-Syndrom nachgewiesen, bei einem (2,4%) Patienten ein von Hippel-Lindau-Syndrom.

3.10.2 Klinische Patientendaten

13 (31%) Patienten gaben bei der Aufnahme in das Krankenhaus als klinisches Leitsymptom Oberbauchbeschwerden an, 7 (16,7%) Patienten wiesen eine Hypoglykämie auf, 2 (4,8%) Patienten Gewichtsverluste und weitere 2 (4,8%) Patienten zeigten einen Ikterus.

16 (38,1%) der Tumoren waren im Pankreaskopf lokalisiert, 5 (11,8%) im Pankreaskorpus, 4 (9,4%) im Pankreasschwanz, 4 (9,4%) im Pankreaskopf und –korpus, 6 (14,3%) im Pankreaskorpus und –schwanz und 4 (9,4%) multipel im Pankreas. Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv wurde Hormonaktivität bei 11 (26,2%) Tumoren nachgewiesen. 14 (33,2%) Patienten erlitten ein Rezidiv, bei dem es sich in 3 (7%) Fällen um Lokalrezidive handelte und in 11 (26,2%) Fällen um Metastasen. 3 (7%) Metastasen waren hierbei in der Leber lokalisiert, 8 (19%) in Lymphknoten. 5 (11,8%) Rezidive wurden operiert, davon waren 4 (9,4%) Metastasen und 1 (2,4%) Lokalrezidiv. Insgesamt verstarben im Studienzeitraum 21 (50%) der Patienten, 14 (33,2%) davon direkt an den Folgen ihrer Tumorerkrankung.

Variable Daten	**Patienten (%)**
Insgesamt	**42**
Männlich	22 (52,4%)
Weiblich	20 (47,6%)
WHO-Klassifikation neuroendokriner Pankreas-Tumoren	
Benigne hochdifferenzierte Tumoren	9 (21,3%)
Maligne hochdifferenzierte Karzinome	29 (69%)
Maligne niedrigdifferenzierte Karzinome	4 (9,4%)
Tumorlokalisation	
Kopf	16 (38,1%)
Korpus	5 (11,8%)
Schwanz	4 (9,4%)
Kopf und Korpus	4 (9,4%)
Korpus und Schwanz	6 (14,3%)
Multipel	4 (9,4%)
Tumorgröße	
≤ 2 cm	10 (23,7%)
>2 cm	32 (76,1%)
Hormonproduktion	
Ja	11 (26,2%)
Nein	31 (73,7%)
MIB-1 (Klon Ki-67)	
≤ 10%	28 (66,67%)
> 10%	14 (33,32%)
OP-Methoden	
palliativ	7 (16,7%)
PPPD, DEPKR, DP	21 (50%)
Whipple	7 (16,7%)
Enukleation	7 (16,7%)
Multiple endokrine Neoplasie (MEN)-1	
Ja	5 (11,8%)
Nein	37 (88,1%)
Tumorrezidiv	***insgesamt 14 (33,2%)***
Lokalrezidiv	3 (7%)
Metastasen	11 (26,2%)

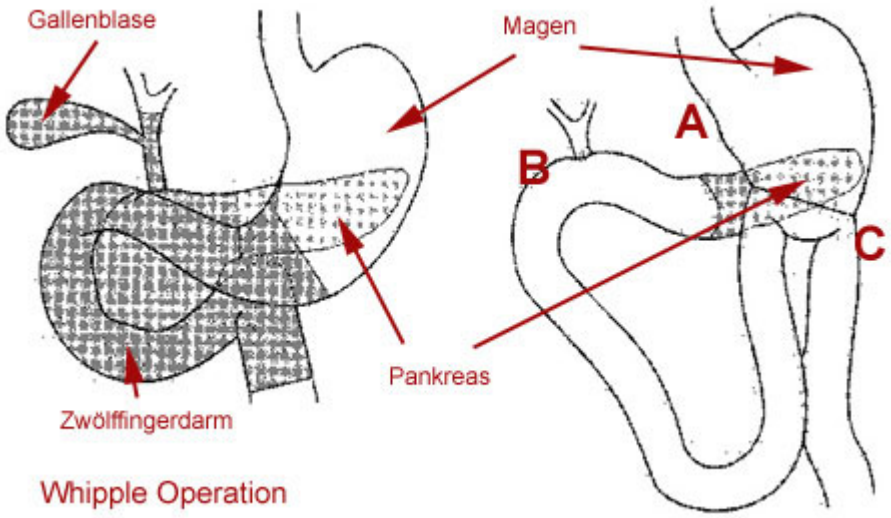
Tab. 2: ***Zusammenfassung der Patientendaten***

3.11 Operationsmethoden

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv wurden verschiedene Operations (OP)-Methoden zur Exstirpation des Tumors angewandt. Bei 7 (16,7%) Patienten waren die Tumoren inoperabel, hier wurde nur explorativ laparotomiert beziehungsweise (bzw.) eine Stanzbiopsie entnommen. Als OP-Methoden in Betracht kamen, die partielle Pankreatoduodenektomie nach Whipple, die pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso, die distale Pankreasresektion (DP), auch Pankreaslinksresektion genannt, die duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion (DEPKR) nach Beger und die Tumorresektion bzw. das Tumordebulking, also die Reduzierung der Tumormasse in palliativer Absicht. In Abhängigkeit der Tumorklassifikation ergab sich folgende Verteilung der OP-Verfahren: Von den Patienten mit einem hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor erhielten 4 (9,5%) eine Operation nach Whipple, PPPD, DP oder DEPKR, 5 (11,9%) eine Tumor-Enukleation und keiner (0%) eine palliative OP. Von den Patienten mit einem hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinom unterzogen sich 23 (54,8%) einer der oben genannten OP-Methoden, bei 2 (4,8%) Patienten wurde der Tumor enukleiert und 4 (9,5%) wurden palliativ behandelt. Patienten, die an einem niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinom erkrankten wurden in einem (2,4%) Fall mit einer DP versorgt, es gab keine (0%) Enukleation, 3 (7,1%) Patienten erhielten eine palliative OP.

7 (16,7%) Patienten wurden nach der Whipple´schen Methode operiert. Diese Resektionstechnik setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Die bogenförmige quere Oberbauchlaparatomie ist der Zugangsweg der Wahl. Es erfolgt die Eröffnung der Bursa omentalis mit Freilegung der Pankreasunter- und –oberkante sowie die Darstellung des Truncus coeliacus und des Ligamentum (Lig.) hepatoduodenale. Dann wird die Verschieblichkeit des Pankreaskopfes überprüft und das Duodenum mobilisiert. Der Pankreaskopf wird stumpf von der Vena (V.) cava abgelöst, der distale Choledochusabschnitt sowie der duodenojejunale Übergang durch Inzision des Treitz´schen Bandes mit stumpfer Mobilisation der Pars retroduodenalis werden freigelegt. Nun wird der Ductus choledochus angeschlungen und die V. portae nach Durchtrennung der Arteria (A.) gastroduodenalis freigelegt. Es erfolgt die Dissektion der Pankreasrückfläche mit einer Overholt-Klemme nach Anlage von Haltefäden am Pankreas und Durchzug eines Zügels. Nun kann der untere Teil des Magen reseziert und die Bauchspeicheldrüse über dem noch liegenden Zügel durchtrennt werden. Nach Ablösen

des Pankreas von der Pfortader bzw. V. mesenterica superior erfolgt die retrograde Cholezystektomie und Durchtrennung des zuvor angeschlungenen Ductus choledochus mit Dissektionsligatur der A. pancreaticoduodenalis inferior. Danach wird das Jejunum durchtrennt und das blind verschlossene Ende unter den Mesenterialgefäßen hindurchgeleitet. Der Pankreasgang wird mit Prolamin okkludiert, abschließend erfolgt eine terminoterminale Pankreatojejunostomie. Alternativ ist eine Pankreatogastrotomie und die Wiederherstellung der Intestinaltraktpassage durch eine antekolische Gastroenterostomie mit Braun´scher Fußpunktanastomose und Anlage einer terminolateralen biliodigestiven Anastomose und teleskopartiger Einpflanzung des Pankreasrestes in die Jejunumschlinge möglich [73].



A: Pankreas-Darm-Verbindung

B: Gallengang-Darm-Verbindung (biliodigestive Verbindung)

C: Magen-Darm-Verbindung

Abb. 2: ***Schematische Darstellung der Whipple-Operation***[1]

[1] *www.pancreas-help.com/karzinom.html*

6 (14,29%) der Patienten erhielten eine PPPD nach Traverso. Hierbei wird im Unterschied zur Whipple´schen OP kein Magenanteil reseziert. Das verbliebene Duodenum wird ca. 2 cm hinter dem Pylorus an das Jejunum anastomosiert, die Choledochojejunostomie ist der bei der Whipple´schen Methode ähnlich. Die DP wurde bei 10 (23,7%) Patienten durchgeführt. Hierbei bleibt der Pankreaskopf mit dem Ductus pancreaticus, der Ductus choledochus sowie die Magenpassage erhalten. Reseziert wird der Pankreasschwanz, möglicherweise auch ein Teil des Corpus pancreaticus und in den meisten Fällen auch die Milz. Die DEPKR wurde bei 5 (11,8%) Patienten durchgeführt. Hierbei wird der Pankreaskopf aus dem Duodenum enukleiert, der Abfluss der Galle aus dem Ductus choledochus in das Duodenum bleibt ungestört. Die Gallenblase wird jedoch entfernt, um späteren Komplikationen des Galleabflusses vorzubeugen. Der erhaltene Pankreasteil wird an eine ausgeschaltete Jejunumschlinge anastomosiert. Bei 7 (16,7%) Patienten war nur eine palliative Operation wie beispielsweise das Tumordebulking möglich.

3.12 Statistik

Die für die vorliegende Studie erhobenen Daten erfasste das Microsoft® Excel 2000-Programm. Anschließend wurden sie in das Statistik-Computerprogramm SPSS für Windows (Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL) exportiert und mit tabellenkalkulatorischen und statistischen Funktionen analysiert und ausgewertet. Die Signifikanz erfasster Patientendaten und der immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse wurde mit dem zweiseitigem Fisher´s Exact Test berechnet. Für alle Untersuchungen zur Patientenprognose wurde das Rohüberleben als Endpunkt gewählt. Die Berechnung und die graphische Darstellung der kumulierten Überlebensraten erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode[74]. Für die statistische Beurteilung von Unterschieden zwischen kumulierten Überlebenskurven wurde der Log-Rank-Test verwendet. Ein p-Wert $\leq 0{,}05$ wurde als signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Univariante Überlebensanalyse

Die klinischen und histopathologischen Daten der 42 Patienten mit NEPT wurden in Tabelle 2 zusammengefasst. Der Krankheitsverlauf der Patienten wurde in Hinblick auf die Gesamtüberlebenszeit über einen Nachbeobachtungszeitraum von durchschnittlich 42,17 Monaten (medianes Follow-up 35,42 Monate; Range 128 Monate: Minimum 1 Monat, Maximum 129 Monate) bezüglich einer möglichen Korrelation mit der immunhistochemisch dargestellten MVD untersucht.

Für die CD31-spezifische MVD wurden 2 Gruppen gebildet. Gruppe 1 setzte sich aus ≤ 50 Gefäßen/mm² zusammen, Gruppe 2 aus > 50 Gefäßen/mm² (Abb. 3+4). Die CD31-spezifische MVD schwankte zwischen 22 Gefäßen (2,92 Gefäße/mm²)und 1088 Gefäßen (136 Gefäße/mm²).

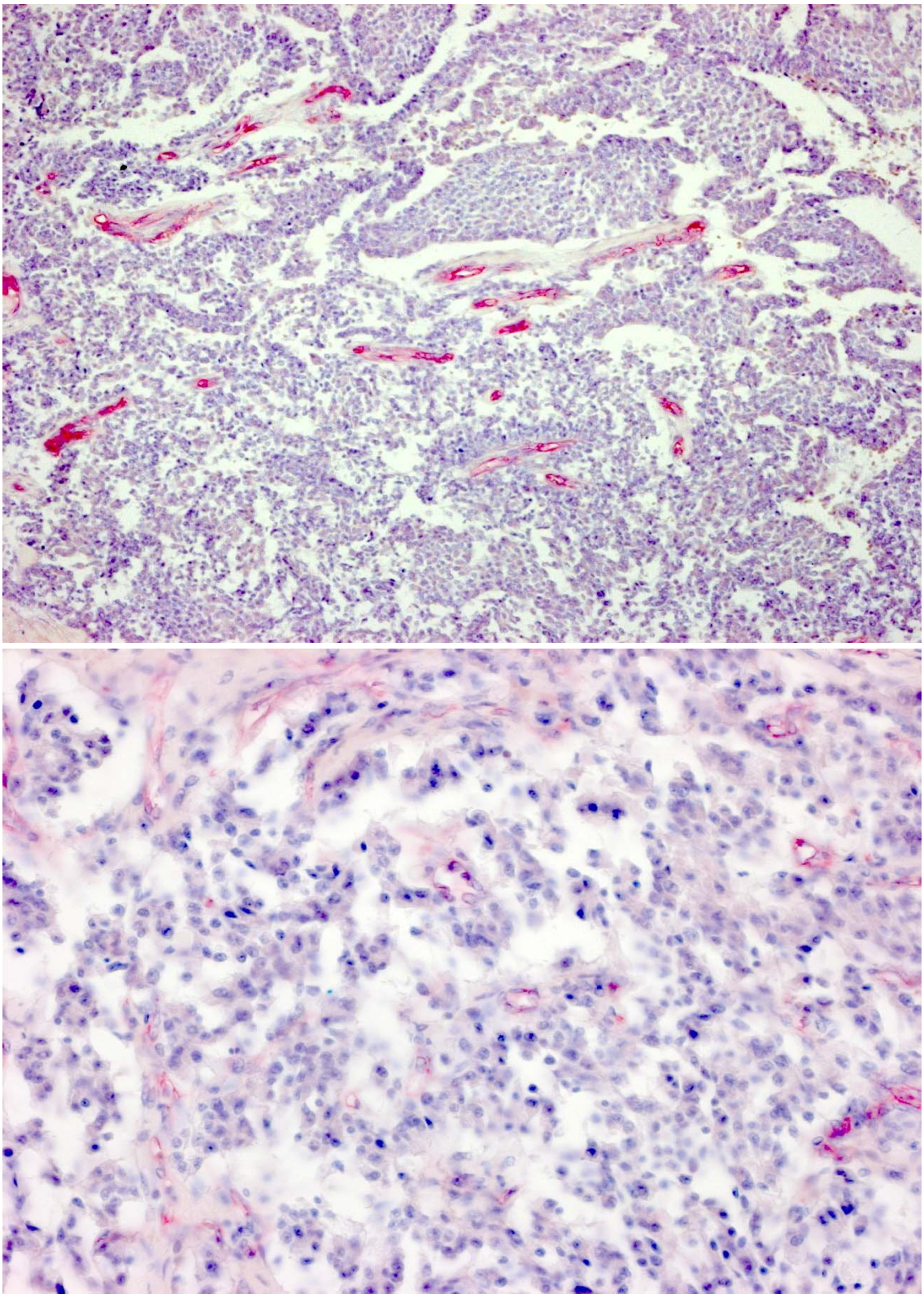


Abb. 3: ***Beispiel einer CD31-positiven immunhistochemischen Färbung, die der Gruppe 1 zugeordnet wurde. Die intratumorale MVD ist gering (100- und 200-fache Vergrößerung).***

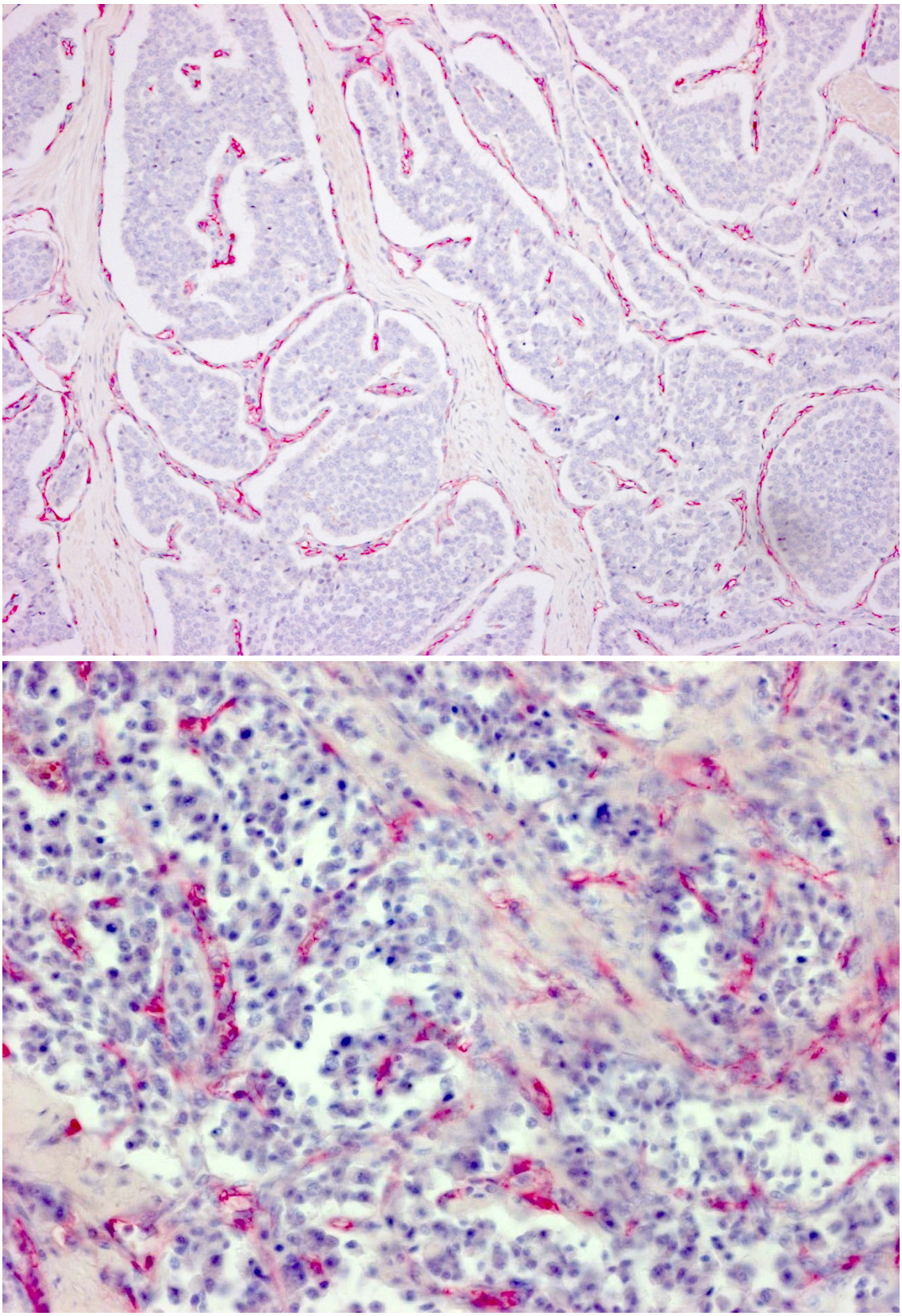


Abb. 4: ***Beispiel einer CD31-positiven immunhistochemischen Färbung, die der Gruppe2 zugeordnet wurde. Die intratumorale MVD ist hoch (100- und 200-fache Vergrößerung).***

Für die CD105-spezifische MVD wurden auch 2 Gruppen gebildet. Gruppe 1 bestand aus ≤ 20 Gefäßen/mm², Gruppe 2 aus > 20 Gefäßen/mm² (Abb. 5+6). Die CD105-spezifische MVD schwankte insgesamt zwischen 11 Gefäßen (1,375 Gefäße/mm^2) und 920 Gefäßen (115 Gefäße/ mm^2).

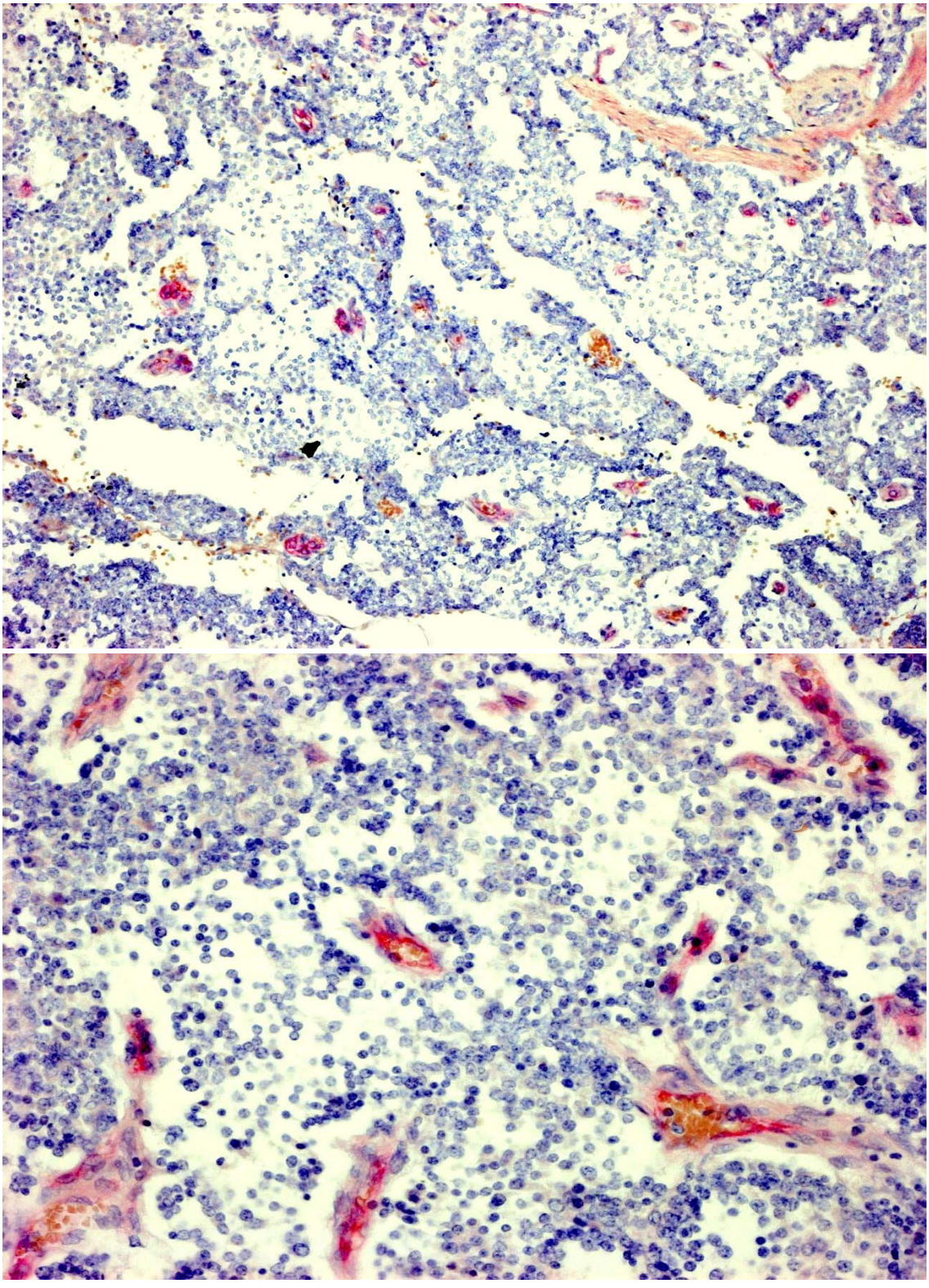


Abb. 5: ***Beispiel einer CD105-positiven immunhistochemischen Färbung, die der Gruppe 1 zugeordnet wurde. Die intratumorale MVD ist gering (100- und 200-fache Vergrößerung).***

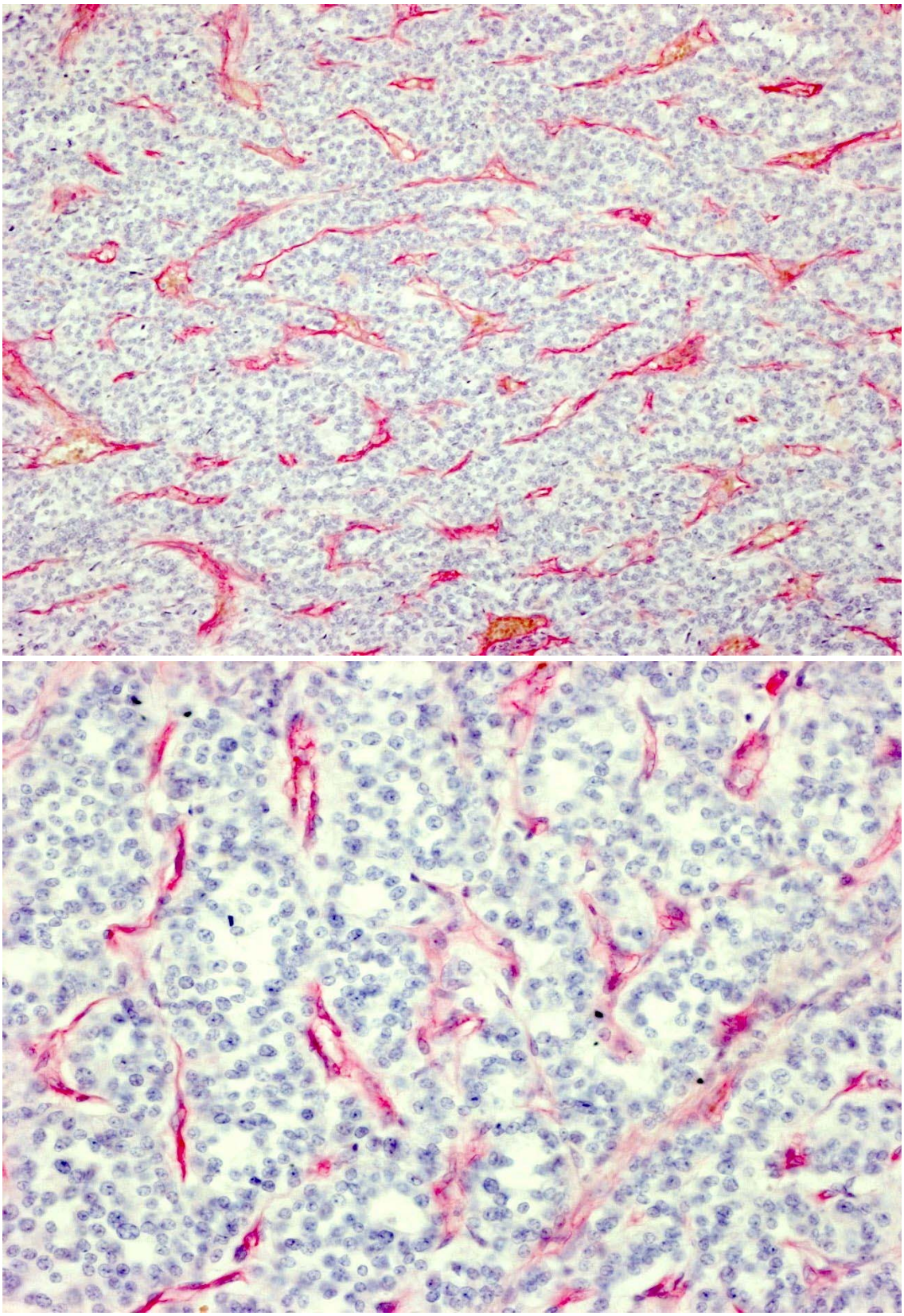


Abb. 6: ***Beispiel einer CD105-positiven immunhistochemischen Färbung, die der Gruppe 2 zugeordnet wurde. Die intratumorale MVD ist hoch (100- und 200-fache Vergrößerung).***

Die proliferative Aktivität, der so genannte Ki-67 (Klon MIB-1)-Label-Index wurde mit der Überlebenszeit und den klinisch-pathologischen Daten korreliert. Auch hier erfolgte die Bildung von 2 Gruppen für Ki-67-Werte. Gruppe 1 umfasste Werte ≤ 10%, Gruppe 2 > 10%. Außerdem wurden 2 Gruppen zur Ratio der Tumoren aus dem Quotienten der CD31- und CD105 spezifischen MVD gebildet. Gruppe 1 wurde aus Werten ≤ 5 gebildet, Gruppe 2 aus Werten >5. Die tumorspezifischen Faktoren sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die aus der univarianten Analyse (Kaplan-Meier-Methode) resultierenden Ergebnisse für die Überlebenszeit sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Faktor	Gruppe	Anzahl (n)	Signifikanz (p-Wert)
MVD CD31 (Gefäße/mm²)	1	17	0,87
	2	25	
MVD CD105 (Gefäße/mm²)	1	20	0,232
	2	22	
MIB-1 (Klon Ki-67) (%)	1	28	0,017
	2	14	
MVD-Ratio CD31/CD105	1	27	0,622
	2	15	

Tab. 3: ***Tumorspezifische Faktoren***

Es konnte kein signifikanter Unterschied für CD31 zwischen den beiden untersuchten Gruppen und der Überlebenszeit festgestellt werden (95% CI: 25-103 Monate; p= 0,87). Das mediane rezidivfreie Überleben in Gruppe 1 mit der geringen MVD betrug 81 Monate (95% CI; 0-170 Monate), in Gruppe 2 mit der hohen MVD 64 Monate (95% CI: 22-106 Monate). Auch für den Gefäßmarker CD105 konnte keine Korrelation zwischen beiden untersuchten Gruppen und dem Überleben festgestellt werden (95% CI: 25-103 Monate, p=0,232). Das mediane rezidivfreie Überleben der Patienten der Gruppe1 (geringe MVD) betrug 25 Monate (95% CI: 0-65 Monate), die Patienten der Gruppe2 (hohe MVD) 81 Monate (95% CI: 58-103 Monate). Im Gesamtkollektiv wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und dem Überleben gefunden (95% CI: 25-103 Monate, p=0.017). Patienten der Gruppe 1 (≤ 10%) überlebten im Median 66 Monate, Patienten der Gruppe 2 (>10%) 7 Monate (95% CI: 0-18 Monate). Die in der Abbildung 3 dargestellten Überlebenskurven zeigen den signifikanten Zusammenhang mit

dem Ki-67-Label-Index. Patienten mit einem Ki-67-Anteil > 10% hatten eine verkürzte Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit einem Ki-67-Anteil ≤ 10%.

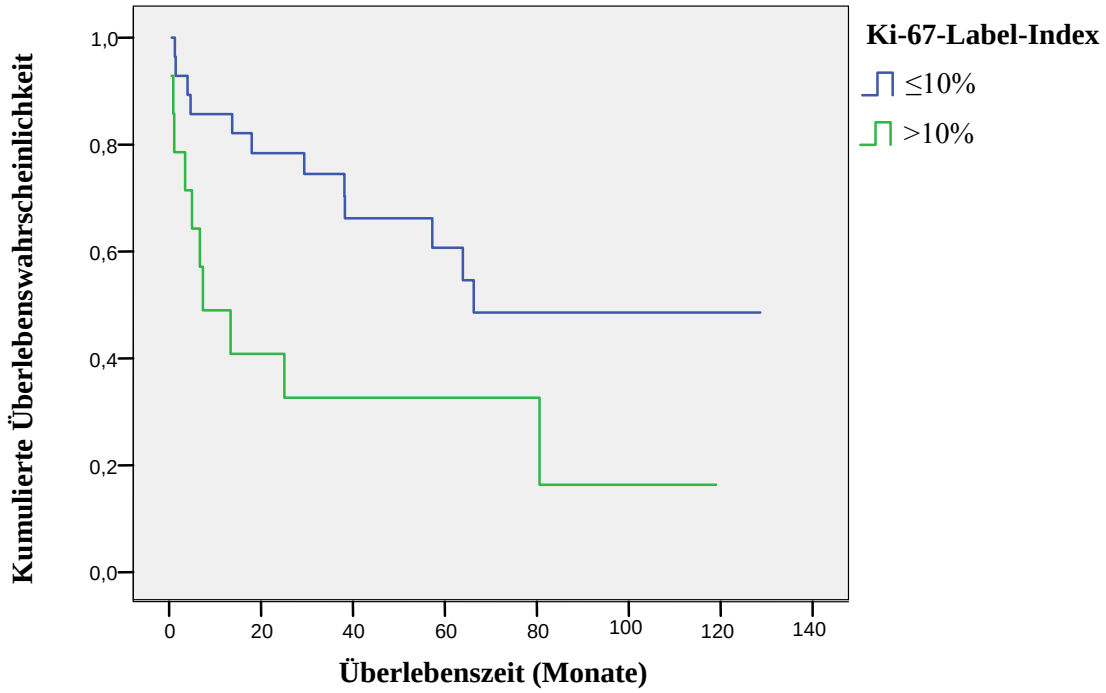


Abb. 7: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit des Ki-67-Label-Index, (p=0,017)***

Nach Bildung des Quotienten der CD31-spezifischen MVD zu der CD105-spezifischen MVD wurde dieses Verhältnis mit der Überlebenszeit korreliert. Die Analyse blieb ohne signifikanten Wert (95% CI: 25-103 Monate, p=0,622).

Die aus der univarianten Analyse (Kaplan-Meier-Methode) resultierenden Ergebnisse für die Überlebenszeit sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Faktor	Gruppe	Anzahl (n)	Signifikanz (p)
NEPT-Klassifikation:			
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	1	9	0,008
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	2	29	
Niedrig differenziertes Neuroendokrines Karzinom	3	4	
Tumorgröße:			
≤ 4 cm	1	24	0,087
> 4 cm	2	18	
Tumorlokalisation:			
Kopf	1	16	0,041
Korpus	2	5	
Schwanz	3	7	
Kopf/Korpus	4	4	
Korpus/Schwanz	5	6	
Multipel	6	4	
OP-Methoden:			
Palliativ	1	7	0,017
Whipple, DEKPR, PPPR, DP	2	28	
Enukleation	3	7	
Hormonaktivität:			
Ja	1	11	0,05
Nein	2	31	
Geschlecht:			
Männlich	1	22	0,045
Weiblich	2	20	
Tumorrezidiv:			
Lokalrezidiv	1	3	0,881
Lymphknotenmetastasen	2	8	
Lebermetastasen	3	3	

Tab. 4: ***Univariante Analyse prognostischer Faktoren für das Überleben bei NEPT, (n: 42, p≤0,05)***

Die Gruppierung der NEPT richtete sich nach der WHO-Klassifikation. Gruppe1 bildeten die hoch differenzierten neuroendokrinen Tumoren. Gruppe 2 wurde aus den hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinomen gebildet, hier betrug die mediane Überlebenszeit 64 Monate (95% CI: 19-110 Monate). Gruppe 3 bestand aus den niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen, hier betrug die mediane Überlebenszeit 5 Monate (95% CI: 1-9 Monate). Eine statistisch signifikante Korrelation der Tumorklassifizierung mit der Überlebenszeit konnte nachgewiesen werden, Patientin, bei denen ein niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom diagnostiziert wurde, verstarben früher, als Patienten mit einem hoch differenziertem neuroendokrinen Tumor oder Karzinom. Das mediane Überleben aller Patienten betrug 64 Monate (95% CI: 25-103 Monate, p = 0,008).

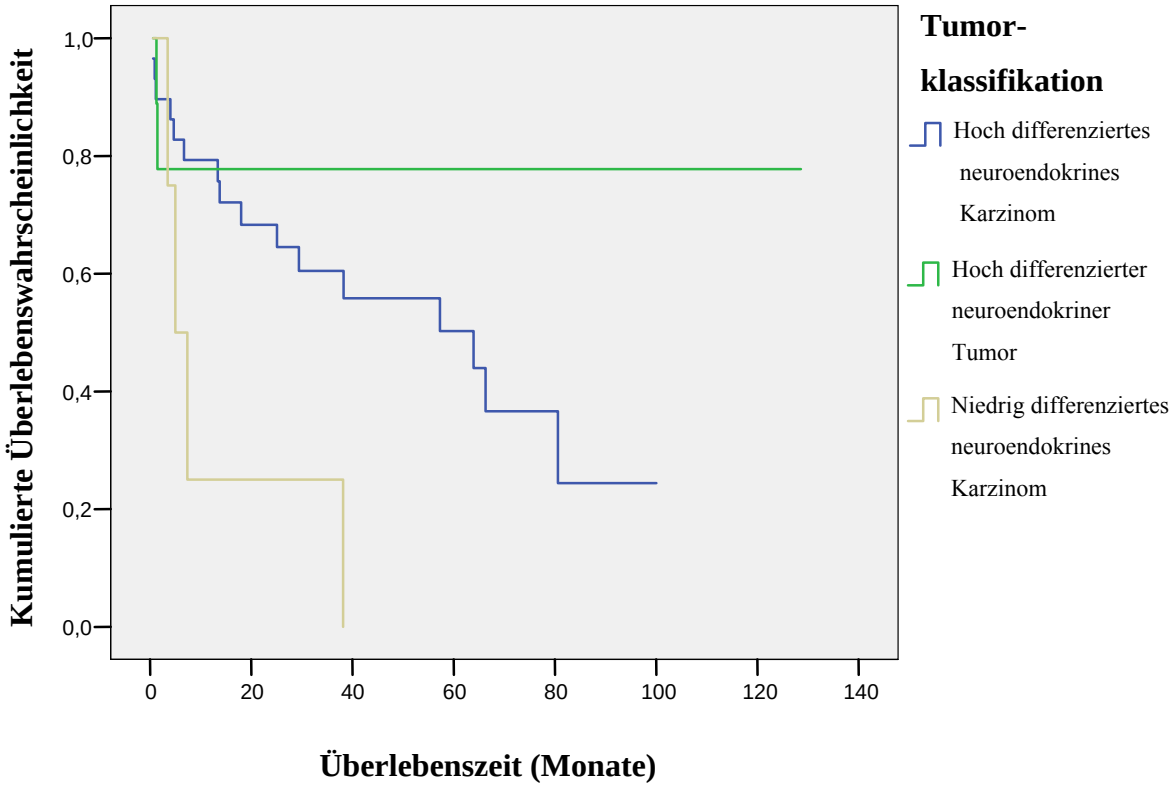


Abb. 8: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorklassifikation, (p=0,008)***

Die Korrelation der Tumorgröße mit der Überlebenszeit war statistisch nicht signifikant. Patienten mit einem großen Tumor verstarben früher, als Patienten mit einem kleinen Tumor. Gruppe 1 setzte sich aus den Patienten mit einer Tumorgröße ≤4 cm zusammen,

Gruppe 2 aus Patienten mit einer Tumorgröße >4 cm, medianes Überleben 29 Monate (95% CI: 1-58 Monate).

Insgesamt betrug die mittlere Überlebenszeit 81 Monate (p = 0,087).

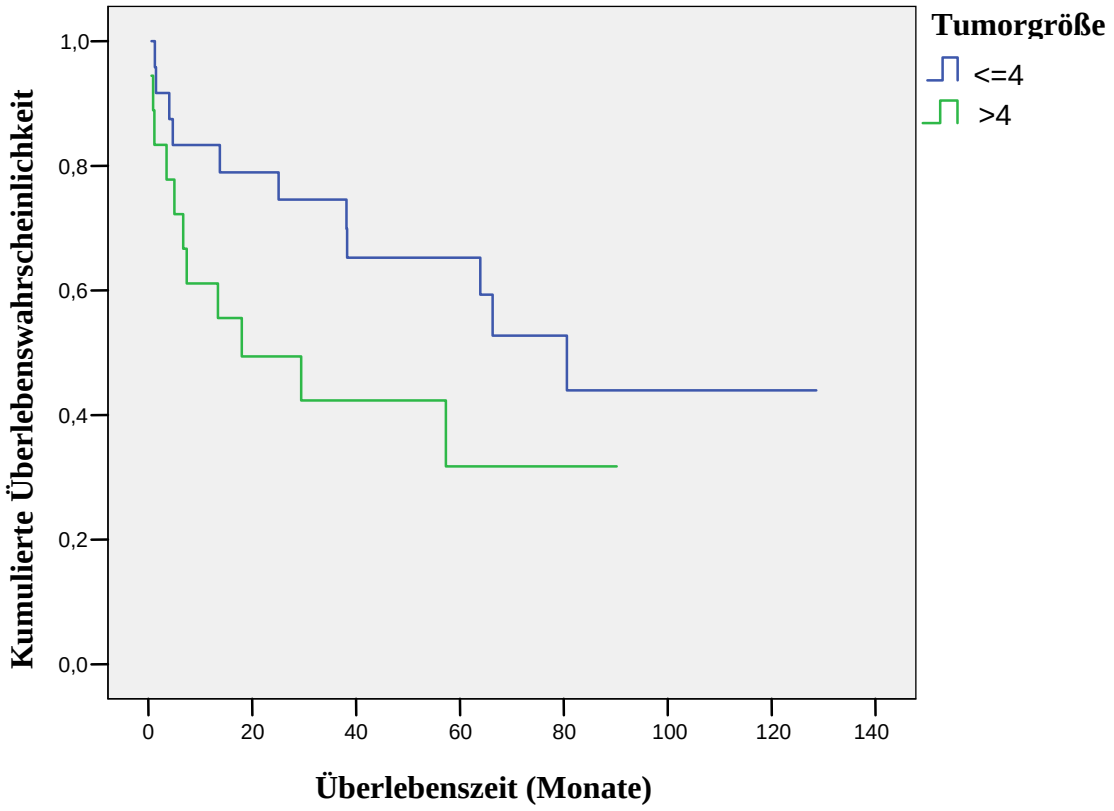


Abb. 9: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorgröße, (p=0,037)***

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Überlebenszeit und der Tumorlokalisation konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Gruppe 1 setzte sich aus Pankreaskopftumoren zusammen, Gruppe 2 bestand aus den Pankreaskorpustumoren. Gruppe 3 setzte sich aus den Pankreasschwanztumoren zusammen, medianes Überleben 5 Monate (95% CI: 0-14 Monate). Gruppe 4 bestand aus den Pankreaskopf- und korpustumoren, medianes Überleben 57 Monate (95% CI: 19-96 Monate). Gruppe 5 beinhaltete die Pankreaskorpus- und schwanztumoren, medianes Überleben 81 Monate (95% CI: 0-194 Monate). Gruppe 6 enthielt die multipel im Pankreas lokalisierten Tumoren, medianes Überleben 25 Monate (95% CI: 7-43 Monate). Es ergab sich eine schlechtere Prognose für Patienten mit einem Tumor im Pankreasschwanz bzw. –

kopf/korpusbereich und multipel lokalisierte Tumoren. Insgesamt betrug die mittlere Überlebenszeit 64 Monate (95% CI: 25-103 Monate, p = 0,041).

Eine statistisch signifikante Korrelation konnte außerdem für die Überlebenszeit in Bezug auf die OP-Methode nachgewiesen werden. Gruppe 1 enthielt Patienten, die eine palliative OP erhielten, das mediane Überleben betrug 7 Monate (95% CI: 6-9 Monate). Gruppe 2 setzte sich aus Patienten zusammen, die eine Whipple-OP, DEKPR, PPPR oder DP erhielten, das mediane Überleben betrug 66 Monate (95% CI: 45-88 Monate). Gruppe 3 bestand aus Patienten, die eine Enukleation erhielten. Patienten, die eine palliative Operation erhielten, verstarben eher als die Patienten, die eine Enukleation oder kurative OP erhielten. Insgesamt belief sich die Überlebenszeit auf 64 Monate (95% CI: 25-103 Monate, p = 0,017).

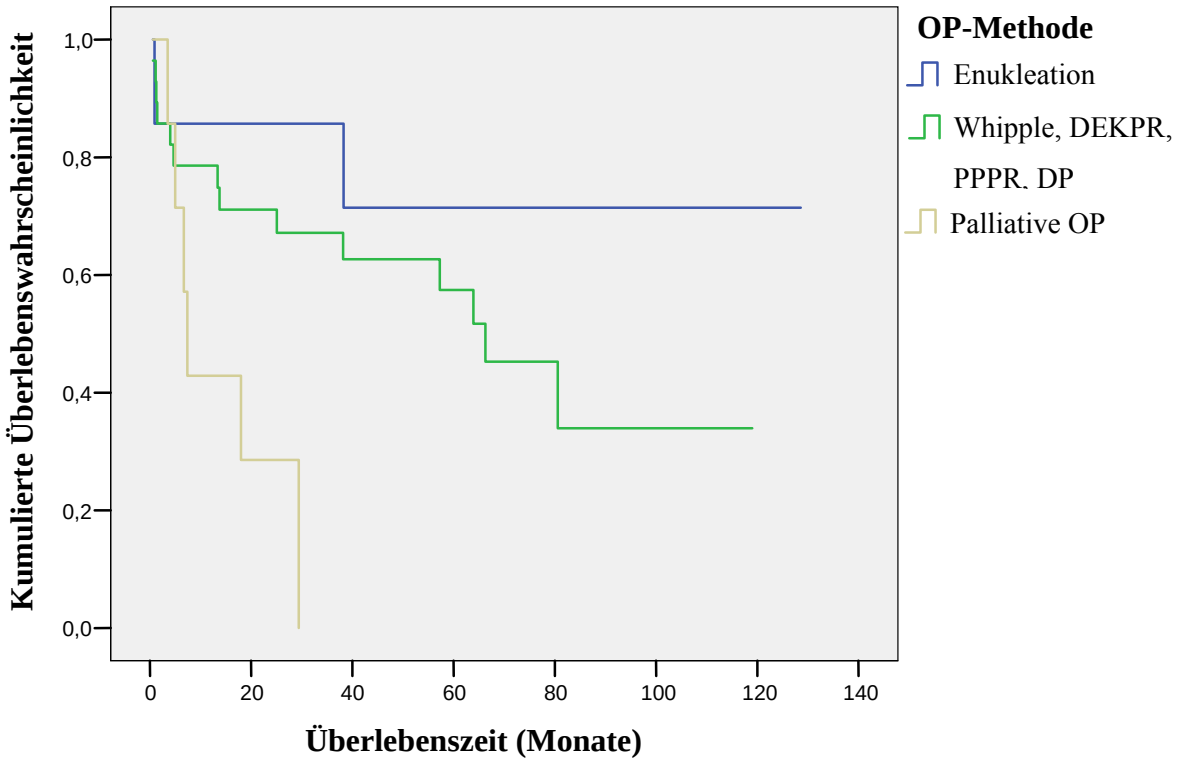


Abb. 10: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der OP-Methode, (p=0,017)***

Für die Überlebenszeit konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation in Bezug auf das Geschlecht nachgewiesen werden. Die männlichen Patienten wurden in 25Gruppe 1 zusammenfasst, die mediane Überlebenszeit betrug 40 Monate (95% CI: 3-47 Monate).

Gruppe 2 setzte sich aus den weiblichen Patienten zusammen. Eine bessere Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit konnte für weibliche Patienten nachgewiesen werden. Insgesamt belief sich die Überlebenszeit auf 64 Monate (95% CI: 25-103 Monate, p = 0,045).

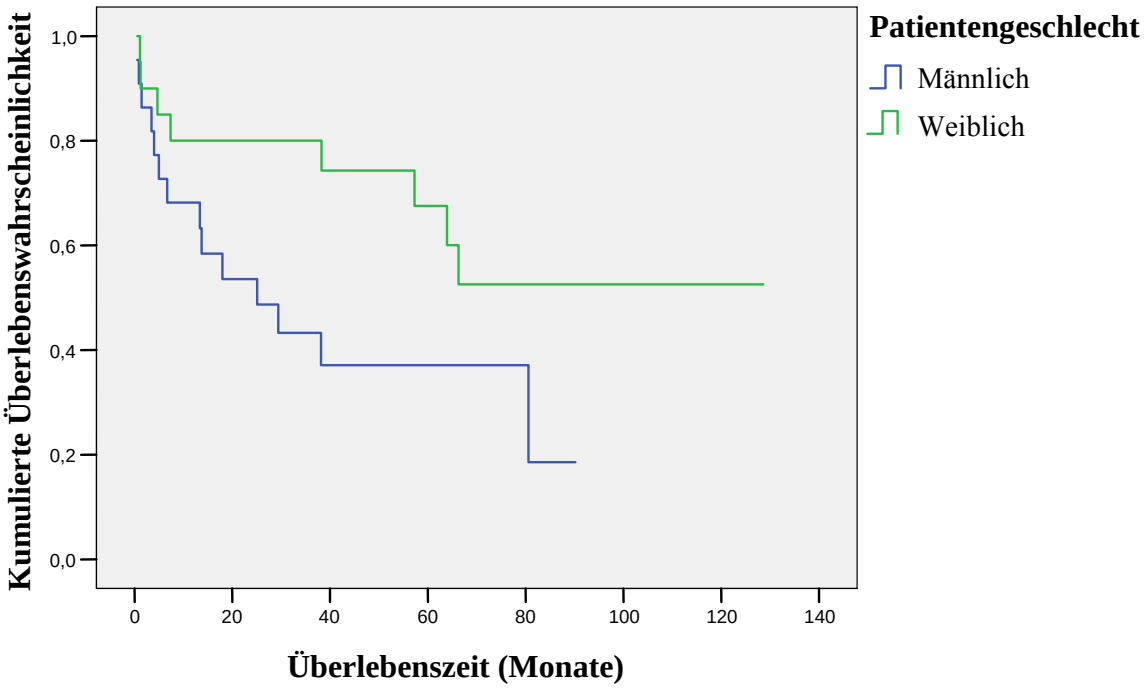


Abb. 11: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit des Patienten-Geschlechtes, (p=0,045)***

Eine statistisch signifikante Korrelation konnte auch für die Überlebenszeit in Bezug auf die hormonale Aktivität der Tumoren nachgewiesen werden. Gruppe 1 setzte sich aus hormoninaktiven Tumoren zusammen, das mediane Überleben betrug 22 Monate (95% CI: 0-82 Monate). Gruppe 2 bestand aus hormonaktiven Tumoren. Eine bessere Überlebensprognose wurde für die hormonaktiven Tumoren nachgewiesen. Insgesamt belief sich die Überlebenszeit auf 64 Monate (95% CI: 25-103 Monate, p = 0,05).

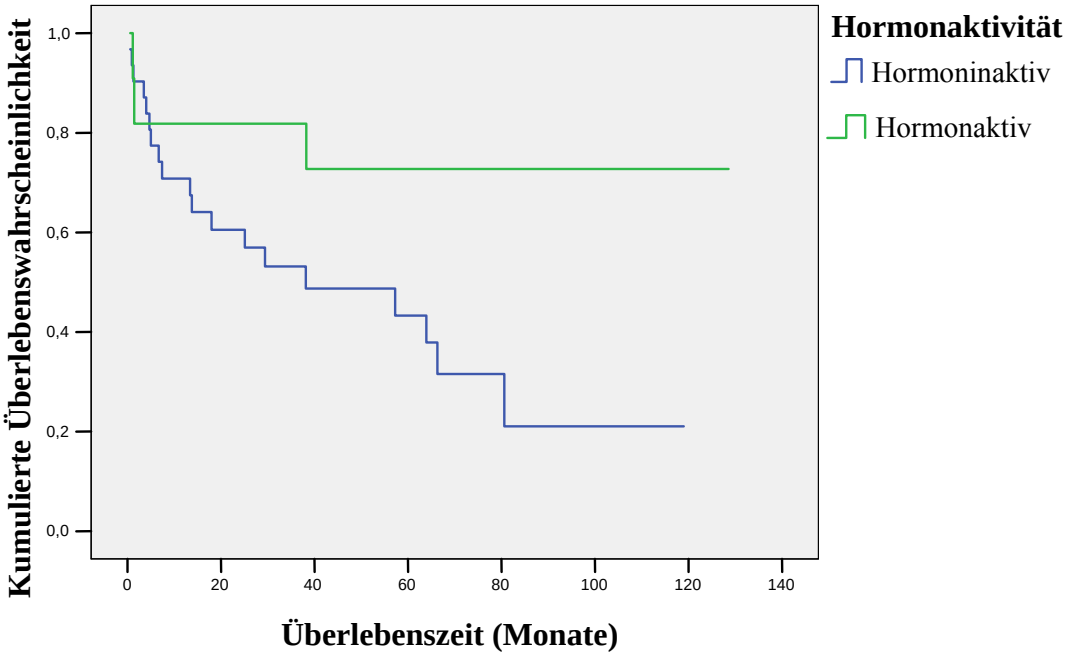


Abb. 12: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Hormonaktivität der Tumoren, (p=0,05)***

Es resultierte keine statistische Signifikanz aus der Korrelation der Überlebenszeit mit dem Auftreten von Rezidiven. Gruppe 1 umfasst die Lokalrezidive, das mediane Überleben war 25 Monate (95% CI: 7-43 Monate).). Gruppe 2 beinhaltet Lymphknotenmetastasen mit einer medianen Überlebenszeit von 38 Monaten (95% CI: 0-78 Monate). In Gruppe 3 sind Lebermetastasen erfasst, das mediane Überleben beträgt 29 Monate (95% CI: 9-50 Monate, p = 0,881).

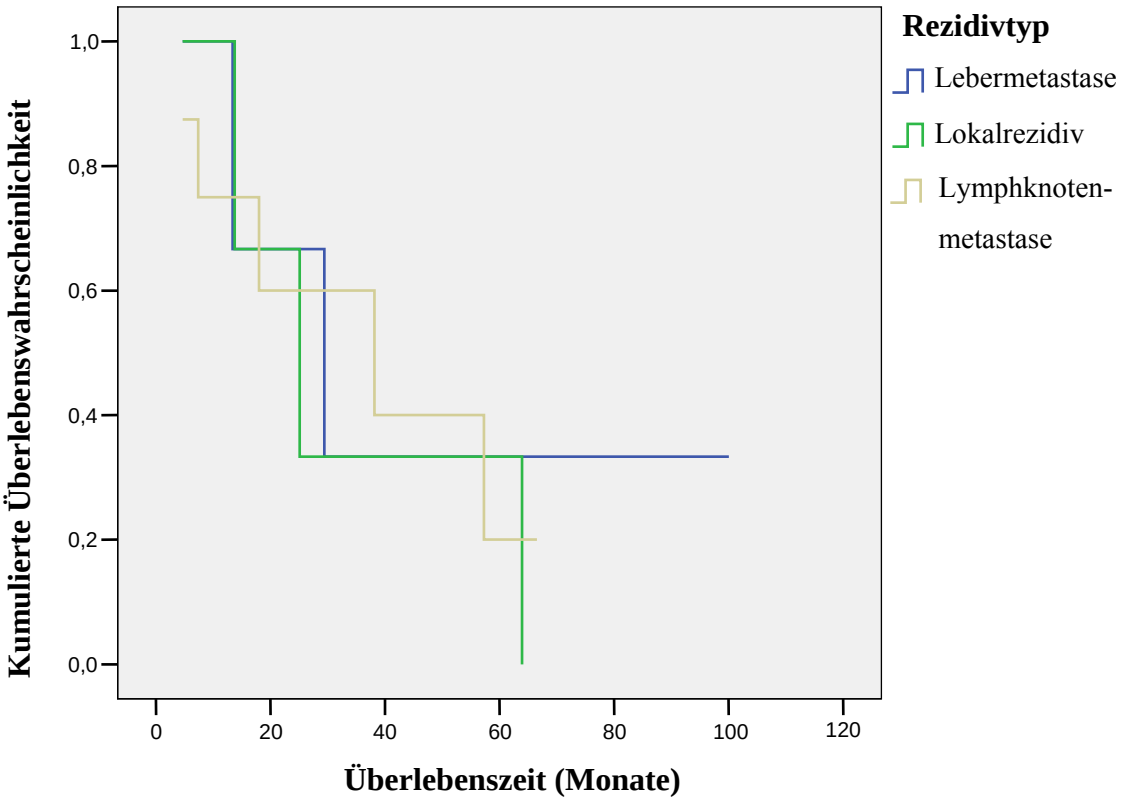


Abb. 13: ***Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Tumorrezidive, (p=0,881)***

4.2 MVD in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren

4.2.1 MVD bei CD31-Markierung

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Korrelation der MVD mit den klinischen und pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der NEPT mit dem Gefäßmarker CD31 zusammengefasst. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Gefäßmarkers CD31 und den folgenden Parametern der Patienten: Tumorklassifikation ($p = 1,0$, Fisher´s Exact Test), Tumorlokalisation ($p = 0,908$, Fisher´s Exact Test), Tumorgröße ($p = 1,0$, Fisher´s Exact Test), Operationsmethode ($p = 0,334$, Fisher´s Exact Test), Hormonaktivität ($p = 0,733$, Fisher´s Exact Test), Ki-67-Expression ($p = 0,184$, Fisher´s Exact Test) und Tumorrezidiv ($p = 0,987$, Fisher´s Exact Test).

Merkmal	Fallzahl	MVD CD31 Gruppe 1	MVD CD31 Gruppe 2	p-Wert
Tumor-Klassifikation:				
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	9	4	5	1,0
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	29	11	18	
Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom	4	2	2	
Tumorlokalisation:				
Kopf	16	7	9	0,908
Korpus	5	2	3	
Schwanz	7	4	3	
Kopf/Korpus	4	1	3	
Korpus/Schwanz	6	2	4	
Multipel	4	1	3	
Tumorgröße:				
≤4 cm	24	8	16	0,348
> 4 cm	18	9	9	
OP-Methode:				
Palliativ	7	4	3	0,334
Whipple, DEKPR, PPPR, DP	28	9	19	
Enukleation	7	4	3	
Hormonaktivität:				
Ja	31	12	19	0,733
Nein	11	5	6	
Ki-67-Expression:				
≤ 10%	28	9	19	0,184
> 10%	14	8	6	
Tumorrezidiv:				
Lokalrezidiv	3	1	2	0,987
Lymphknotenmetastasen	8	3	5	
Lebermetastasen	3	1	2	

Tab. 5: ***Korrelation der MVD mit klinischen und pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der NEPT mit dem Gefäßmarker CD31; (n=42, Fisher's Exact Test, p ≤ 0,05)***

4.2.2 MVD bei CD105-Markierung

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Korrelation der MVD mit den klinischen und pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der NEPT mit dem Gefäßmarker CD105 zusammengefasst. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Gefäßmarkers CD105 und den folgenden Parametern der Patienten: Tumorklassifikation ($p = 0{,}199$, Fisher´s Exact Test), Tumorlokalisation ($p = 0{,}824$, Fisher´s Exact Test), Tumorgröße ($p = 0{,}071$, Fisher´s Exact Test), Operationsmethode ($p = 0{,}056$ Fisher´s Exact Test), Hormonaktivität ($p = 1{,}0$, Fisher´s Exact Test), Ki-67-Expression ($p = 1{,}0$, Fisher´s Exact Test) und Tumorrezidiv ($p = 0{,}553$, Fisher´s Exact Test).

Merkmal	Fallzahl	MVD CD105 Gruppe 1	MVD CD105 Gruppe 2	p-Wert
Tumor-Klassifikation:				
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	9	2	7	0,199
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	29	15	14	
Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom	4	3	1	
Tumorlokalisation:				
Kopf	16	7	9	0,824
Korpus	5	3	2	
Schwanz	7	2	5	
Kopf/Korpus	4	2	2	
Korpus/Schwanz	6	4	2	
Multipel	4	2	2	
Tumorgröße:				
≤4 cm	24	8	16	0,06
> 4 cm	18	12	6	
OP-Methode:				
Palliativ	7	6	1	0,056
Whipple, DEKPR, PPPR, DP	28	10	18	
Enukleation	7	4	3	
Hormonaktivität:				
Ja	31	15	16	1,0
Nein	11	5	6	
Ki-67-Expression:				
≤ 10%	28	13	15	1,0
> 10%	14	7	7	
Tumorrezidiv:				
Lokalrezidiv	3	1	2	0,553
Lymphknotenmetastasen	8	5	3	
Lebermetastasen	3	1	2	

Tab. 6: ***Korrelation der MVD mit klinischen und pathologischen Variablen bei Endothelmarkierung der NEPT mit dem Gefäßmarker CD105; (n=42, Fisher's Exact Test, p ≤ 0,05)***

4.2.3 MVD bei CD31- und CD105-Markierung in Zusammenhang mit der Tumorklassifikation

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Korrelation der MVD bei Endothelmarkierung der NEPT mit den Gefäßmarkern CD31 und CD105 in Zusammenhang mit der Tumorklassifikation zusammengefasst. Hier lässt sich erkennen, dass bei CD105 spezifischer Gefäßmarkierung eine geringe MVD insbesondere bei den niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen auftritt.

Tumorklassifikation	**MVD bei CD31 Mittelwert +/- Standardabweichung**	**MVD bei CD105 Mittelwert +/- Standardabweichung**
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (n=9)	**68,3 +/- 25,72**	**43,53 +/- 24,54**
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (n=29)	**67 +/- 44,91**	**27,51 +/- 32,18**
Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (n=4)	**51,32 +/- 14,33**	**14,9 +/- 18,46**
Alle Tumoren (n=42)	**65,88 +/- 39,3**	**29,74 +/- 30,28**

Tab. 7: ***Korrelation der MVD bei CD31- und CD105-Markierung in Zusammenhang mit der Tumorklassifikation (n=42)***

4.2.4 Ratio CD31/CD105

In Tabelle 8 wurden die Korrelationen des Verhältnisses der CD31- zur CD105-spezifischen MVD mit den klinischen und pathologischen Variablen dargestellt. Für die folgenden Parameter konnte keine signifikante Korrelation mit dem MVD-Quotienten belegt werden: Tumorklassifikation (p = 0,214, Fisher´s Exact Test), Tumorlokalisation (p = 0,381, Fisher´s Exact zweiseitiger Test), Operationsmethode (p = 0,323 Fisher´s Exact Test), Hormonaktivität (p = 1,0, Fisher´s Exact Test) und MIB-1 (Klon Ki-67)-Expression (p = 1,0, Fisher´s Exact Test). Eine signifikante Korrelation ergab sich jedoch mit dem MVD-Quotienten und der Tumorgröße (p = 0,027, Fisher´s Exact Test).

Merkmal	Fallzahl	MVD CD31/ MVD CD105 Gruppe 1	MVD CD31/ MVD CD105 Gruppe 2	p-Wert
Tumor-Klassifikation:				
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	9	8	1	0,214
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	29	17	12	
Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom	4	2	2	
Tumorlokalisation:				
Kopf	16	11	5	0,381
Korpus	5	2	3	
Schwanz	7	6	1	
Kopf/Korpus	4	3	1	
Korpus/Schwanz	6	2	4	
Multipel	4	3	1	
Tumorgröße:				
≤4 cm	24	19	5	0,027
> 4 cm	18	8	10	
OP-Methode:				
Palliativ	7	3	4	0,323
Whipple, DEKPR, PPPR, DP	28	20	8	
Enukleation	7	4	3	
Hormonaktivität:				
Ja	31	20	11	1,0
Nein	11	7	4	
MIB-1 (Klon Ki-67)-Expression:				
≤ 10%	28	18	10	1,0
> 10%	14	9	5	

Tab. 8: ***Korrelation des Verhältnisses der CD31-spezifischen zur CD105-spezifischen MVD mit den klinischen und pathologischen Variablen (n=42, Fisher's Exact zweiseitiger Test, p ≤ 0,05)***

4.3 Korrelation der CD31- und CD105-spezifischen MVD

Bei der Analyse der Beziehung der CD31- zur CD105-spezifischen MVD ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation. Der Pearson Korrelationskoeffizient für ordinal skalierte Werte betrug r = 0,0001.

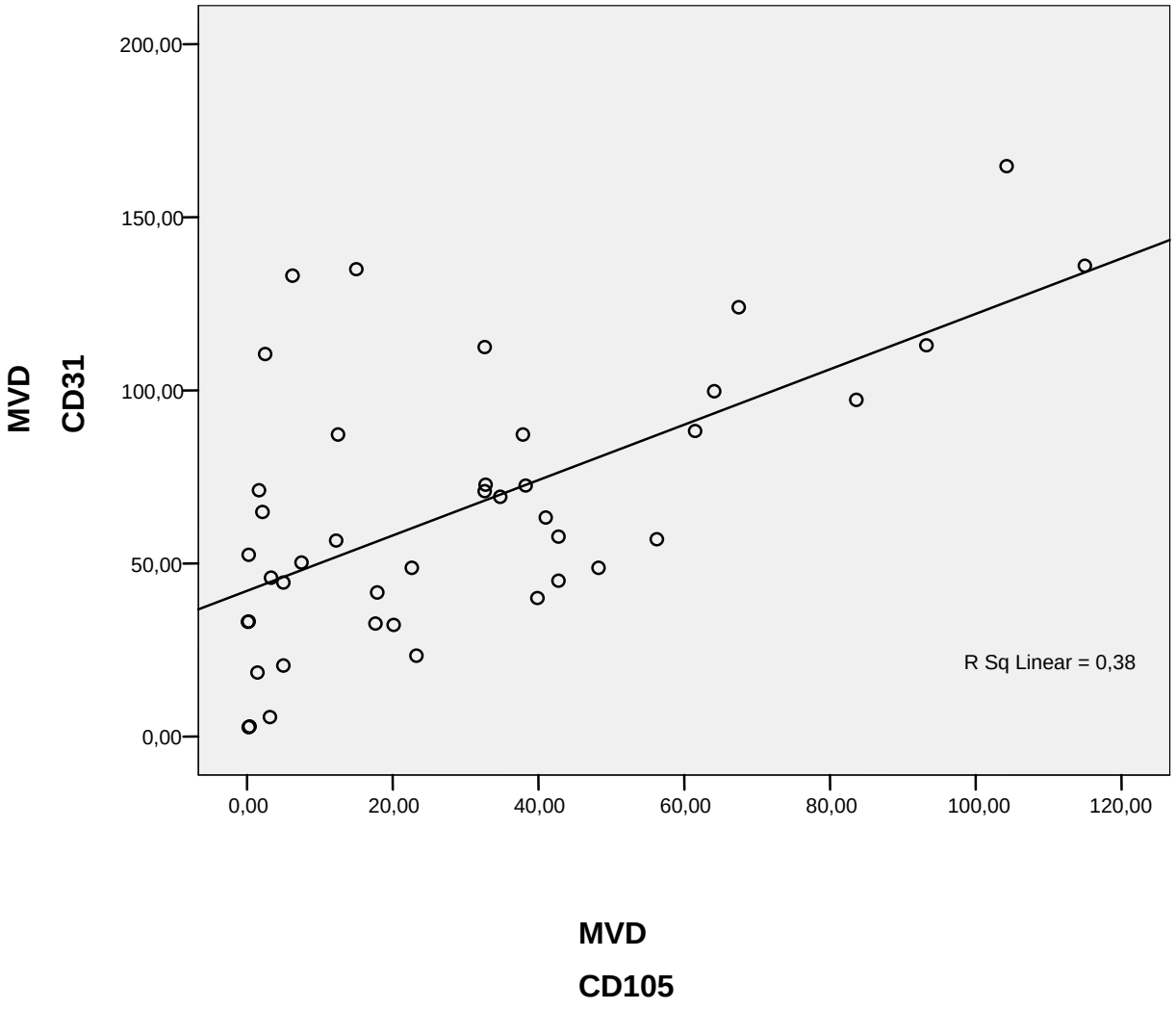


Abb. 4: ***Regressionskurve der CD31- und CD105-spezifischen MVD***

		MVD CD31	MVD CD105
MVD CD31	Pearson Correlation	1	0,616
	Sig. (2-tailed)		0,000
	N	42	42
MVD CD105	Pearson Correlation	0,616	1
	Sig. (2-tailed)	0,000	
	N	42	42

Tab. 9: ***Zweiseitig signifikante Korrelation, Pearson´s Koeffizient r = 0,0001***

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die mikrovaskuläre Dichte mithilfe der Gefäßmarker CD31 (PECAM-1) und CD105 (Endoglin) bei 42 Patienten mit neuroendokrinen Pankreastumoren untersucht und verglichen, um eine Aussage zu ihrer prognostischen Relevanz treffen zu können. CD31 ist ein Pan-Endothelmarker, der in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, CD105 ist ein Zellmembranmolekül vaskulärer Endothelzellen, das spezifisch proliferierende Gefäße markiert [46, 62, 63, 75]. Als wichtigste prognostische Marker neuroendokriner Tumoren allgemein gelten der Grad der Tumorzelldifferenzierung (Tumorklassifikation), die Lokalisation im Pankreas und das Vorhandensein extrahepatischer Metastasen [76]. Speziell für neuroendokrine Tumoren des Pankreas gelten als prognostische Parameter bislang die Tumorgröße, die Mitosezahl sowie die Proliferationsrate mittels MIB-1(Klon Ki-67)-Label-Index [2]. Zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte in Assoziation mit ihrer klinischen Bedeutsamkeit wurden bereits mehrere Untersuchungen durchgeführt. In einer Studie von Karademir et al. wurden 22 Patienten mit duktalen Adenokarzinomen des Pankreas in einem Follow-up untersucht. Hierbei konnte bewiesen werden, dass die Gefäßdichte einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, der mit der Überlebenszeit korreliert. Eine hohe Gefäßdichte war zudem mit einer schlechten Tumordifferenzierung, erhöhter Proliferationsaktivität und Tumorgrößen über 3 cm im Durchmesser assoziiert [60]. In einer Studie von Marion-Audibert et al. wurden bei 77 Patienten mit endokrinen Pankreastumoren die WHO-Klassifikation, der Hormonstatus, die Tumorgröße, das Auftreten von Metastasen und die Überlebenszeit zu der CD34-spezifischen Mikrogefäßdichte in Beziehung gesetzt. In gut differenzierten benignen Tumoren war die Gefäßdichte signifikant erhöht, jedoch nicht in malignen Karzinomen. Der Hormonstatus war nicht hoch mit der Gefäßdichte korreliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Karademir et al. war hier eine geringe MVD assoziiert mit dem Auftreten von Metastasen bei Tumoren die im Durchmesser kleiner als 2 cm waren und/oder einen Proliferationsindex kleiner als 2% aufwiesen und einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit nach chirurgischer Intervention. Mit der Bestimmung der quantitativen Gefäßdichte konnten hier Patienten identifiziert werden, die trotz günstiger konventioneller histoprognostischer Faktoren ein Risiko für eine ungünstige Entwicklung hatten [61]. Analog dazu zeigte eine Untersuchung von Anastassiou et al. bei Patienten mit einem klarzelligen Nierenzell-Karzinom, dass die Gesamt-Überlebenszeit länger war, wenn eine hohe CD31-Endotheldichte im Tumor gezählt wurde, als bei Patienten, deren

Tumoren nur eine geringe CD31-Dichte aufwiesen [77]. In einer Studie zum prognostischen Potential von CD105 beim klarzelligen Nierenzell-Karzinom wurde die Expression dieses Proliferationsmarkers mit klinischen Variablen und der Überlebenszeit verglichen. Auch hier ergab sich eine günstigere Prognose zur Überlebenszeit bei Tumoren, in der die CD105-Expression ausgeprägt vorhanden war [78]. Eine Untersuchung von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen konnte belegen, dass eine geringe CD105-spezifische Gefäßdichte im Tumorgewebe mit größeren und aggressiveren Tumoren einherging als bei höheren Gefäßdichten, eine Aussage zur Prognose ließ sich aus den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht treffen[79]. Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Untersuchung von Tumoren hinsichtlich der Gefäßmarker CD31 und CD105. Es wurden u.a. Überlebenszeiten, Metastasen und Rezidive korreliert. Allgemein bestätigte sich die Aussage, dass sowohl CD31 als auch CD105 prognostische Relevanz bei Neoplasien besitzen. Beide Marker werden in entartetem Gewebe stärker exprimiert als in gesundem. Bezüglich der Signifikanz beider Marker konnte festgestellt werden, dass CD105 eindeutig höhere prognostische Bedeutsamkeit bei Malignomen erlangt. In einer Studie, die sich mit der Untersuchung von Speicheldrüsentumoren wie dem adenoid-zystischen Karzinom und dem polymorphen low-grade Adenokarzinom befasste, konnte bewiesen werden, dass die Expression von CD31 mit der Invasion von Gefäßen und einer schlechten Prognose für die Patienten einherging [80]. Das Ergebnis gilt jedoch nur für 3 Patientenfälle. Dieses Untersuchungskollektiv ist sicher nicht geeignet, um eine allgemein gültige Aussage treffen zu können. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenzahl wären hier sinnvoll, um tatsächlich eine evidenzbasierte Aussage treffen zu können. Eine Studie von Noack et al. zur Tumorgenese der benignen Plazentatumoren Chorioangiom und Hämangiom ergab, dass hier CD31 deutlich stärker exprimiert wurde, im Vergleich zu normalen Plazenten [81]. Allerdings ist nicht bekannt, wie es sich bei malignen Plazentatumoren verhält. In einer Untersuchung, die sich mit der prognostischen Bedeutung der Quantität von CD31 auseinandersetzte wurden 167 Patienten mit Brustkrebs in einem Follow-up untersucht. Hierbei wurde das Patientenkollektiv in Untergruppen eingeteilt, je nachdem, ob ein axillärer Lymphknotenbefall vorlag oder nicht. Die Expression von CD31 in Tumorgewebe war signifikant mit einer schlechten Prognose für die Gesamtüberlebenszeit assoziiert, wobei der Lymphknotenstatus keine Rolle spielte. Eine CD31-markierte Tumoroberfläche von mehr als 20% korrelierte bei allen Patienten und den Lymphknoten-positiven Patienten mit der Metastasen-freien Überlebenszeit, nicht jedoch bei den Lymphknoten-negativen Patienten. Außerdem

korrelierte bei Lymphknoten-positiven Patienten die Expression von CD31 mit der kurzfristigen Rezidiv-freien Überlebensrate, dies gilt jedoch nicht für Lymphknoten-negative Patienten. Somit ist CD31 als ein wichtiger prognostischer Faktor bei Brustkrebs für die Gesamtüberlebenszeit und die Rezidiv-freie Überlebenszeit anzusehen [64]. In einer neueren Untersuchung die sich mit dem Vergleich von CD31 und Vascular endothelial cadherin bei Patienten mit Brustkrebs beschäftigte, konnte ebenfalls bewiesen werden, dass eine hohe CD31-Dichte im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose für die Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist [65]. Andere Untersuchungen zur Prognose bei Patienten mit Brustkrebs beschäftigten sich mit der Expression von CD105. Es konnte bewiesen werden, dass eine hohe CD105-Gefäßdichte im Tumorgewebe mit einer schlechteren Überlebenszeit-Prognose und einem höheren Metastasierungsrisiko einhergeht. Ein Vergleich von Mamma-Karzinomen mit kolorektalen Karzinomen und anderen soliden Tumoren bezüglich Endoglin machte deutlich, dass erhöhte Endoglin-Werte im Serum mit der Metastasierung dieser Tumoren assoziiert sind. Somit scheint CD105 ein nützlicher Marker zur Kontrolle von Rezidiven und Metastasen bei Patienten mit soliden Tumoren zu sein [63, 66]. Im direkten Vergleich von CD31 und CD105 bei Brustkrebs-Patienten wird deutlich, dass CD105 stärkere prognostische Signifikanz besitzt als CD31 [62]. Verschiedene Untersuchungen bei Patienten mit malignen Melanomen ergaben, dass die CD31-positive Mikrogefäßdichte bei den Patienten erhöht war, bei denen Metastasen nachgewiesen werden konnten. Die Metastasen-freie Patientengruppe wies keine erhöhte CD31-positive Mikrogefäßdichte auf. Somit ist bei diesem Krankheitsbild die Bestimmung von CD31 im Tumorgewebe aufschlussreich hinsichtlich des weiteren Verlaufs des Tumorprozesses [82, 83]. Ein Vergleich der lymphatischen Mikrogefäßdichte und der Blut-Mikrogefäßdichte bei malignen Melanom-Patienten zeigte, dass nicht nur die CD31-positiven Tumorgewebsdichten bei Patienten mit Metastasen erhöht waren, sondern dass CD31 außerdem ein starker prognostischer Faktor für die Gesamtüberlebenszeit und die Rezidiv-freie Überlebenszeit darstellt [84]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die CD105-positive Gefäßdichte in Tumorgewebe maligner Melanome deutlich erhöht war, im Vergleich zu normalen Geweben des Kortex, Zerebellums, Thymus, Tonsillen, Milz, Lymphknoten und der Haut. Dies konnte auch für kindliche Hirntumoren demonstriert werden [85]. In einer Untersuchung zum oralen spinozellulären Karzinom wurde die CD31-positive Mikrogefäßdichte mit dem Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Größe, histologischer Differenzierung und Wachstumsgeschwindigkeit verglichen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die quantitative Gefäßdichte mit der

Lymphknotenmetastasierung korreliert [86]. In einer Studie zur Aussagefähigkeit von CD105 beim oralen spinozellulären Karzinom konnte belegt werden, dass die Expression von CD105 im Tumorgewebe signifikant höher war, als in normalem Gewebe. Außerdem ergab sich eine deutlich schwächere CD105-spezifische Färbung bei Tumoren im T1-Stadium im Vergleich zu Tumoren im T2-, T3- oder T4-Stadium [87]. Ergebnisse in Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von CD105 bei kolorektalen Karzinomen beliefen sich ebenso auf ein erhöhtes Metastasierungsrisiko bei Vorliegen einer hohen CD105-positiven Mikrogefäßdichte [63, 88]. Bei einer Studie zu T-Zell-Lymphomen wurde die Assoziation von CD31 und Metastasierung bestätigt [89]. Untersuchungen zur chronisch-lymphatischen B-Zell-Leukämie ergaben hingegen keine einheitlichen Resultate zur Überlebenszeit bei der Expression von CD31 auf B-Zellen [90]. Eine Studie zur Untersuchung der prognostischen Relevanz von CD105 beim Prostata-Karzinom ergab, dass eine erhöhte CD105-spezifische Gefäßdichte im Tumorbereich mit einer schlechteren Prognose zur Gesamt-Überlebenszeit assoziiert war [91]. Bei Patienten mit Adenokarzinomen des Oesophagus und Barrett-Metaplasien konnte bewiesen werden, dass CD105 ein spezifischer und sensitiver Tumorangiogenese-Marker ist und im direkten Vergleich mit CD31 höhere prognostische Signifikanz aufweist und positiv korreliert ist mit dem Auftreten von angiolymphatischer Invasion, Lymphknotenmetastasen, Tumorstadien und der Überlebenszeit [92]. Eine Studie die sich mit Endometrium-Karzinomen und ihrer Prognose beschäftigte ergab, dass CD105 mit der Tumorproliferation und Tumorstadien insofern assoziiert ist, dass bei erhöhter CD105-positiver Gefäßdichte eine verkürzte Überlebenszeit und eine erhöhte Metastasierungstendenz vorliegt und CD105 somit einen geeigneten prognostischen Marker darstellt [93]. Im direkten Vergleich konnte für Endometrium-Karzinome gezeigt werden, dass die CD105-spezifische Mikrogefäßdichte in den Tumoren höher war, als die Dichte für CD31. Eine positive Korrelation bestand für beide Marker hinsichtlich der Tumordifferenzierung und der Invasionstiefe. Bezüglich angiolymphatischer Invasion, Lymphknotenmetastasen und dem Tumorstadium konnte nur für CD105 ein positiver Zusammenhang demonstriert werden. Dieser Marker ist somit auch bei diesen Tumoren spezifischer und sensitiver und von höherer prognostischer Relevanz als CD31 [94]. In einem direkten Vergleich von CD31 und CD105 bei Astrozytomen konnte gezeigt werden, dass sich CD105 als Marker besser eignet um die Angiogenese zu evaluieren und Aussagen hinsichtlich der Prognose zu treffen als CD31. Die CD105-spezifische Gefäßdichte war in allen histologischen Tumorklassifizierungen niedriger als die CD31-spezifische

Gefäßdichte und deutlich enger mit dem Schlüsselfaktor der Angiogenese, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) korreliert [95]. Auch für andere Hirntumoren wie das Glioblastom konnte in einer Studie bewiesen werden, dass CD105 eine höhere prognostische Signifikanz hinsichtlich der Angiogenese aufweist, als CD31 [75]. Eine Untersuchung, die sich mit der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen beschäftigte konnte belegen, dass CD31 universell und ohne signifikante Unterschiede in den Blutgefässen von Adenokarzinomen und von normaler Mukosa exprimiert wurde. CD105 hingegen wurde in Karzinom-assoziierten Blutgefäßen und Tumorzellen übermäßig stark exprimiert, in Kapillarendothelzellen normaler Mukosa schwach. Signifikante Unterschiede konnten in der CD105-Expression in normaler Mukosa im Vergleich mit Adenomen, Karzinomen in Adenomen und Adenokarzinomen gemessen werden [96]. Bei kolorektalen Karzinomen wurde außerdem eine positive Korrelation der CD31- und CD105-spezifischen MVD mit der Invasion angiolymphatischer Gefäße und Lymphknotenmetastasen beschrieben. Die CD105-Dichte korreliert zudem mit dem Auftreten von Lebermetastasen. CD105 ist ein stärker spezifischer und sensitiver Marker für Tumorangiogenese als CD31. Zudem hat er prognostische Bedeutung durch die positive Korrelation mit Lymphknoten- und Lebermetastasen [97]. Eine große Zahl von Studien beschäftigt sich u. a. mit der Frage, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der CD31-positiven MVD und der CD105-spezifischen Gefäßdichte in verschiedenen Tumorentitäten besteht. Eine Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle belegte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Gefäßzahl (CD31) und dem aktivierten Gefäßendothel (CD105) in den Tumoren. Eine Zunahme der Gefäßzahl führte zu einem quantitativen Anstieg des aktivierten Endothels [98]. In einer Studie die sich mit Glioblastomen beschäftigte, konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD105-spezifischer MVD und CD31-spezifischer MVD, sowie zwischen CD105 und dem Proliferationsmarker MIB-1 (Klon Ki67) festgestellt werden [75]. Auch eine Studie zu hepatozellulären Karzinomen kam zu diesem Ergebnis [79].

In der hier vorliegenden Studie erfolgte die statistische Korrelation der erhobenen intratumoralen Gefäßdichten der einzelnen Antikörper mit klinischen und pathologisch-anatomischen Faktoren der Tumoren. Die Beziehung zwischen der CD31-spezifischen MVD und der CD105-spezifischen MVD wurde analysiert. Eine statistisch signifikante positive Korrelation wurde gemessen, der Pearson Korrelationskoeffizient für ordinal skalierte Werte betrug $p = 0{,}0001$. So konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung der CD31-positiven MVD in NEPT in diesem Patientenkollektiv immer auch zu einem Anstieg der

CD105-positiven MVD führte. Die Korrelation des Verhältnisses der CD31-spezifischen MVD zur CD105-spezifischen MVD zeigte in Bezug auf die Tumorgröße ebenfalls statistische Signifikanz (p = 0,027, Fisher´s Exact zweiseitiger Test). Es konnte ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorklassifizierung und dem tumorspezifischen Überleben mit dieser Studie nachgewiesen werden (p = 0,008, Fisher´s Exact zweiseitiger Test). Das mediane Überleben in der Gruppe der hochdifferenzierten neuroendokrinen Karzinome betrug 64 Monate (19-110 Monate), in der Gruppe der niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinome 5 Monate (1-9 Monate). Je geringer die Tumorzelldifferenzierung ausgeprägt ist, desto geringer ist die Überlebenswahrscheinlichkeit. Diese Studie beweist zudem den signifikanten Zusammenhang der Überlebenszeit mit dem MIB-1 (Klon Ki-67)-Label-Index. Eine längere Überlebenszeit, Medianwert: 66 Monate, konnte bei den Patienten mit Werten ≤ 10% gemessen werden. MIB-1 (Klon Ki-67)-Werte > 10% ergaben im Vergleich eine mediane Überlebenszeit von 7 Monaten (0-18 Monate). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Überlebenszeit mit der Tumorlokalisation konnte mit dieser Studie auch bewiesen werden. Im Median überlebten die Patienten länger, bei denen der Tumor im Pankreaskopf oder Pankreaskorpus lokalisiert war (57 bzw. 81 Monate) als die Patienten, wo sich der Tumor im Pankreasschwanz oder multipel im Pankreas (5 bzw. 25 Monate) befand. Dies ist insofern nachvollziehbar, da Tumoren im Pankreaskopf aufgrund dieser Lage zumeist eher symptomatisch werden, als Tumoren, die im Pankreasschwanz lokalisiert sind. Die Tumorgröße in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit ergab in dieser Studie keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Verschiedene Studien u.a. zum Mamma-Karzinom, spinozellulärem Karzinom, kolorektalen Karzinom und Prostata-Karzinom belegten, daß eine hohe CD105-spezifische MVD mit einer schlechteren Prognose zur Gesamtüberlebenszeit und zum Metastasierungsrisiko korrelierte [63, 66, 88, 91] Interessanterweise konnte mit dieser Studie konnte aber nachgewiesen werden, dass eine geringere CD105- spezifische MVD besonders häufig bei niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen vorhanden war. Somit konnte hier festgestellt werden, daß eine niedrige MVD mit einer schlechteren Prognose zur Überlebenszeit korrelierte. Auch wenn dieses Ergebnis keine statistische Signifikanz zeigte, war hier eine eindeutige Tendenz erkennbar. Dies mag z. T. an dem relativ kleinen Patientenkollektiv von 42 Patienten liegen. Die statistische Aussagekraft eines kleinen Kollektivs muss kritischer betrachtet werden, als die meist recht groß angelegten Untersuchungen mit über 50 Patienten in den Literaturangaben. Bei der mikroskopischen Auswertung sollte

berücksichtigt werden, dass eine Fehlentscheidung in der Auswahl des Areals im Tumorgewebe mit den höchsten Gefäßanteilen, den so genannten „Hot Spots“, bei einer geringen Anzahl untersuchter Präparate deutlicher ins Gewicht fällt als bei einer großen Anzahl an Präparaten. Deshalb muss auch diese Fehlerquelle in Erwägung gezogen werden. Bei der CD31-spezifischen Färbung konnte kein Zusammenhang der Tumorklassifikation mit dem Ausmaß der MVD festgestellt werden. Somit lässt sich hier die Aussage übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Literatur treffen, daß CD105 höhere prognostische Signifikanz aufweist als CD31. Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse dieser Studie belegt werden, daß statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der tumorspezifischen Überlebenszeit und der Tumorklassifizierung, dem MIB-1 (Klon Ki-67) Label-Index, der Tumorlokalisation und der CD105-spezifischen MVD bestehen. Außerdem zeigt diese Studie, daß die Bestimmung der beiden Gefäßmarker CD31 und CD105 hinsichtlich ihrer Funktion als prognostische Marker durchaus geeignet ist. In Anlehnung an diverse andere Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, dem Endometrium-Karzinom oder dem Oligodendrogliom, erscheint die Möglichkeit der Inhibition der Angiogenese einer der aussichtsvolleren Therapieansätze zur Verbesserung der Behandlung von an NEPT erkrankten Patienten zu sein [49, 63, 66, 93, 99]. Um dies sicher belegen zu können, müssten jedoch zukünftig weitere Studien und Untersuchungen angestellt werden.

6 Zusammenfassung

Bei 42 Patienten mit histologisch gesicherten neuroendokrinen Pankreastumoren wurde in einer retrospektiven Studie in Kombination mit der immunhistochemischen Ermittlung der intratumoralen Gefäßdichte die Korrelation der Angiogenese zu potentiell prognostisch bedeutsamen, klinischen und pathologisch- anatomischen Faktoren untersucht. Als Marker für die sensitive und spezifische Kennzeichnung von Endothelzellen fanden die monoklonalen Antikörper gegen das Zellmembranglykoprotein des Endothels CD105 (Endoglin) und gegen das endotheliale Thrombozytenadhäsionsmolekül CD31 (PECAM-1) Verwendung. Die so angefärbten Mikrogefäße wurden bei 200-facher Mikroskopvergrößerung entsprechend einer Fläche von 0,196 mm² pro Gesichtsfeld ausgezählt. Anschließend erfolgte die statistische Korrelation der erhobenen intratumoralen Gefäßdichten der einzelnen Antikörper mit klinischen und pathologisch-anatomischen Faktoren der Tumoren. Grundsätzlich konnten Aussagen zur signifikanten Korrelation der Überlebenszeit von NEPT-Patienten mit der Tumorklassifikation, der Tumorlokalisation, der Hormonaktivität und der MIB-1 (Klon Ki-67)-Expression bestätigt werden. Im Resultat konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation der durchschnittlichen CD31-spezfischen bzw. CD105-spezifischen MVD-Werte mit den verschiedenen Tumorparametern wie der Tumorklassifikation, der Tumorgröße, der Tumorlokalisation, der Operationsmethoden, der Hormonaktivität, der MIB-1 (Klon Ki-67)-Expression und der Überlebenszeit der Patienten gemessen werden. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine geringere CD105-spezifische MVD besonders häufig bei niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen vorhanden war, die mit einer verkürzten Überlebenszeit korrelierte. Hier ließ sich eindeutig eine Tendenz erkennen, auch wenn das Ergebnis keine statistische Signifikanz zeigte. Eine hochsignifikante Korrelation ergab sich aus den intratumoralen Gefäßdichten des Endothelmarkers CD31 und des Proliferationsmarkers CD105. Insgesamt wird somit die Bestimmung von CD31 und CD105 bei NEPT hinsichtlich Ihrer Bedeutsamkeit als prognostische Marker durch die Ergebnisse dieser Studie unterstützt. Zugleich lässt sich die Aussage treffen, daß CD105 höhere prognostische Signifikanz als CD31 aufweist und dass die Inhibition der Angiogenese zukünftig einen aussichtsvollen Therapieansatz bei neuroendokrinen Pankreaskarzinomen darstellen könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. Anlauf M, Sipos B, Kloppel G. [Tumors of the endocrine pancreas]. *Pathologe* 2005;26(1):46-51.

2. Kloppel G. [Tumors of the endocrine pancreas]. *Pathologe* 2003;24(4):265-71.

3. Rindi G, Capella C, Solcia E. Introduction to a revised clinicopathological classification of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract. *Q J Nucl Med* 2000;44(1):13-21.

4. Klöppel G, M.Anlauf,J.Lüttges. Klassifikation und Pathologie der neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Trakts und Pankreas. *Onkologe* 2004;10:570-79.

5. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* 1994;55 Suppl 3:11-23.

6. Wiedenmann B. Auch seltenes muß man wissen! *Onkologe* 2004;10:559.

7. Grotzinger C. Tumour biology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004;80 Suppl 1:8-11.

8. Solcia E, Sessa F, Rindi G, Villani L, Riva C, Buffa R, et al. Classification and histogenesis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Eur J Clin Invest* 1990;20 Suppl 1:S72-81.

9. Kloppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:13-27.

10. Heitz PU, Komminoth P, Lackie PM, Zuber C, Roth J. [Demonstration of polysialic acid and N-CAM in neuroendocrine tumors]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1990;74:376-7.

11. Kloppel G, Anlauf M. Epidemiology, tumour biology and histopathological classification of neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19(4):507-17.

12. Heymann MF, Joubert M, Nemeth J, Franc B, Visset J, Hamy A, et al. Prognostic and immunohistochemical validation of the capella classification of pancreatic neuroendocrine tumours: an analysis of 82 sporadic cases. *Histopathology* 2000;36(5):421-32.

13. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994;54(6):1556-60.

14. Evers BM, Rady PL, Sandoval K, Arany I, Tyring SK, Sanchez RL, et al. Gastrinomas demonstrate amplification of the HER-2/neu proto-oncogene. *Ann Surg* 1994;219(6):596-601; discussion 02-4.

15. Karges W, Schaaf L, Dralle H, Boehm BO. Clinical and molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. *Langenbecks Arch Surg* 2002;386(8):547-52.

16. Karges W, Adler G. [Clinical genetics of neuroendocrine tumors]. *Med Klin (Munich)* 2003;98(12):712-6.

17. Fajans SS, Vinik AI. Insulin-producing islet cell tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18(1):45-74.

18. Soga J, Yakuwa Y, Osaka M. Insulinoma/hypoglycemic syndrome: a statistical evaluation of 1085 reported cases of a Japanese series. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17(4):379-88.

19. Creutzfeldt W, Arnold R, Creutzfeldt C, Track NS. Pathomorphologic, biochemical, and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger-Ellison syndrome). *Hum Pathol* 1975;6(1):47-76.

20. Isenberg JI, Walsh JH, Grossman MI. Zollinger-Ellison syndrome. *Gastroenterology* 1973;65(1):140-65.

21. Arnold R, Wied M, Behr TH. Somatostatin analogues in the treatment of endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3(6):643-56.

22. Soga J, Yakuwa Y. Glucagonomas/diabetico-dermatogenic syndrome (DDS): a statistical evaluation of 407 reported cases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5(3):312-9.

23. Jensen RT. Pancreatic endocrine tumors: recent advances. *Ann Oncol* 1999;10 Suppl 4:170-6.

24. Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. *N Engl J Med* 1999;340(11):858-68.

25. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A panel of 11 region-specific radioimmunoassays for measurements of human chromogranin A. *Regul Pept* 2004;117(3):219-27.

26. La Rosa S, Sessa F, Capella C, Riva C, Leone BE, Klersy C, et al. Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours. *Virchows Arch* 1996;429(6):323-33.

27. Oberg K, Stridsberg M. Chromogranins as diagnostic and prognostic markers in neuroendocrine tumours. *Adv Exp Med Biol* 2000;482:329-37.

28. Seregni E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 2:S69-72.

29. Karges W, Schaaf L, Dralle H, Boehm BO. Concepts for screening and diagnostic follow-up in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108(5):334-40.

30. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993;20(8):716-31.

31. Lopez Hanninen E, Amthauer H, Hosten N, Ricke J, Bohmig M, Langrehr J, et al. Prospective evaluation of pancreatic tumors: accuracy of MR imaging with MR cholangiopancreatography and MR angiography. *Radiology* 2002;224(1):34-41.

32. Ricke J, Hanninen EL, Amthauer H, Lemke A, Felix R. Assessment of the vascularization of neuroendocrine tumors by stimulated acoustic emission of SH U 508A ultrasound contrast agent and color or power Doppler sonography. *Invest Radiol* 2000;35(4):253-9.

33. Adams S, Baum RP, Adams M, Wenisch HJ, Schumm-Draeger PM, Encke A, et al. [Clinical value of somatostatin receptor scintigraphy. Studies of pre- and intraoperative localization of gastrointestinal and pancreatic tumors]. *Med Klin (Munich)* 1997;92(3):138-43.

34. Joseph K, Stapp J, Reinecke J, Skamel HJ, Hoffken H, Benning R, et al. [Receptor scintigraphy using 111In-pentetreotide in endocrine gastroenteropancreatic tumors]. *Nuklearmedizin* 1993;32(6):299-305.

35. Plockinger U, Wiedenmann B. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system: the role of early diagnosis, genetic testing and preventive surgery. *Dig Dis* 2002;20(1):49-60.

36. Oberg K, Norheim I, Lind E, Alm G, Lundqvist G, Wide L, et al. Treatment of malignant carcinoid tumors with human leukocyte interferon: long-term results. *Cancer Treat Rep* 1986;70(11):1297-304.

37. Kvols LK, Buck M, Moertel CG, Schutt AJ, Rubin J, O'Connell MJ, et al. Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201-995). *Ann Intern Med* 1987;107(2):162-8.

38. Detjen KM, Welzel M, Farwig K, Brembeck FH, Kaiser A, Riecken EO, et al. Molecular mechanism of interferon alfa-mediated growth inhibition in human neuroendocrine tumor cells. *Gastroenterology* 2000;118(4):735-48.

39. Arnold R, Rinke A, Schmidt C, Hofbauer L. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19(4):649-56.

40. Tomao S, Romiti A, Spigone B, Oliveti A, Campisi C, Zullo A. [Chemotherapy in gastroenterologic neuroendocrine tumors]. *Recenti Prog Med* 2001;92(6):395-9.

41. Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* 1997;79(4):813-29.

42. Vinik AI, McLeod MK, Fig LM, Shapiro B, Lloyd RV, Cho K. Clinical features, diagnosis, and localization of carcinoid tumors and their management. *Gastroenterol Clin North Am* 1989;18(4):865-96.

43. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, et al. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(5):C1181-90.

44. Bergom C, Gao C, Newman PJ. Mechanisms of PECAM-1-mediated cytoprotection and implications for cancer cell survival. *Leuk Lymphoma* 2005;46(10):1409-21.

45. Thompson RD, Wakelin MW, Larbi KY, Dewar A, Asimakopoulos G, Horton MA, et al. Divergent effects of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo. *J Immunol* 2000;165(1):426-34.

46. Rubio L, Burgos JS, Morera C, Vera-Sempere FJ. Morphometric study of tumor angiogenesis as a new prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma patients. *Pathol Oncol Res* 2000;6(3):210-6.

47. O'Brien CD, Cao G, Makrigiannakis A, DeLisser HM. Role of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of PECAM-1 in PECAM-1-dependent cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(4):C1103-13.

48. Lutzky VP, Carnevale RP, Alvarez MJ, Maffia PC, Zittermann SI, Podhajcer OL, et al. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem* 2006.

49. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J* 2003;17(9):984-92.

50. Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001;188(1):1-7.

51. Rane SG, Lee JH, Lin HM. Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(1-2):107-19.

52. Pinkas J, Teicher BA. TGF-beta in cancer and as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2006.

53. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267(27):19027-30.

54. Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. Focus on Basic Science: Transforming Growth Factor-beta and Wound Healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2006;18(1):55-62.

55. Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 1996;133(5):1109-21.

56. Downing JR. TGF-beta signaling, tumor suppression, and acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351(6):528-30.

57. Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278(5):3275-85.

58. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 1993;23(9):2340-5.

59. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30(3):293-8.

60. Karademir S, Sokmen S, Terzi C, Sagol O, Ozer E, Astarcioglu H, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7(5):489-95.

61. Marion-Audibert AM, Barel C, Gouysse G, Dumortier J, Pilleul F, Pourreyron C, et al. Low microvessel density is an unfavorable histoprognostic factor in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 2003;125(4):1094-104.

62. Dales JP, Garcia S, Andrac L, Carpentier S, Ramuz O, Lavaut MN, et al. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol* 2004;24(5):1197-204.

63. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, et al. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001;7(3):524-32.

64. Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Andrac L, Bonnier P, et al. CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: correlation with patient follow-up. *Am J Clin Pathol* 1997;107(5):534-41.

65. Martin TA, Watkins G, Lane J, Jiang WG. Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin. *Histopathology* 2005;46(4):422-30.

66. Charpin-Taranger C, Dales JP, Garcia S, Andrac-Meyer L, Ramuz O, Carpentier-Meunier S, et al. [The immunohistochemical expression of CD105 is a marker for high metastatic risk and worse prognosis in breast cancers]. *Bull Acad Natl Med* 2003;187(6):1129-45; discussion 45-6.

67. Scholl S, S.Schaub-Kuhnen. Praxis der Immunhistochemie. München Jena: Urban Fischer Verlag, 2000.

68. Denk H. Spezielle Untersuchungsmethoden in der diagnostischen Pathologie: Springer Verlag, 1999.

69. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32(2):219-29.

70. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.

71. Nakasu S, Nakajima M, Matsumura K, Nakasu Y, Handa J. Meningioma: proliferating potential and clinicoradiological features. *Neurosurgery* 1995;37(6):1049-55.

72. Solcia E, Kloppel G, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumors. In: World Health Organization International Histological Classification of Endocrine Tumors., ed. 2 ed. New York: Springer, 2000.

73. Durst J, Rohen,J.W. Chirurgische Operationslehre, vol. 2.: Schattauer, 1996.

74. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J AM Stat. Assoc* 1958(53):457-81.

75. Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J* 2005;46(3):417-22.

76. Panzuto F, Nasoni S, Falconi M, Corleto VD, Capurso G, Cassetta S, et al. Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(4):1083-92.

77. Anastassiou G, Duensing S, Steinhoff G, Zorn U, Grosse J, Dallmann I, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): a potential prognostic marker involved in leukocyte infiltration of renal cell carcinoma. *Oncology* 1996;53(2):127-32.

78. Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2006;97(4):706-10.

79. Ho JW, Poon RT, Sun CK, Xue WC, Fan ST. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005;11(2):176-81.

80. Perschbacher K, Jackson-Boeters L, Daley T. The adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary gland tissues and salivary gland malignancies. *J Oral Pathol Med* 2004;33(4):230-6.

81. Noack F, Sotlar K, Thorns C, Smrcek J, Diedrich K, Feller AC, et al. VEGF-, KIT protein- and neutral endopeptidase (NEP/CD10)-positive myofibroblasts-precursors of angiogenesis in chorioangiomas? *Placenta* 2003;24(7):758-66.

82. Demirkesen C, Buyukpinarbasili N, Ramazanoglu R, Oguz O, Mandel NM, Kaner G. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: a comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. *Pathology* 2006;38(2):132-7.

83. Vlaykova T, Muhonen T, Hahka-Kemppinen M, Pyrhonen S, Jekunen A. Vascularity and prognosis of metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997;74(3):326-9.

84. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann SF, Kittler H, Pehamberger H. Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2004;40(3):358-64.

85. Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res* 1998;18(4A):2701-10.

86. Penfold CN, Partridge M, Rojas R, Langdon JD. The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34(1):37-41.

87. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg* 2004;32(3):176-81.

88. Romani AA, Borghetti AF, Del Rio P, Sianesi M, Soliani P. The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. *J Surg Oncol* 2006;93(6):446-55.

89. Roos E. Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991;10(1):33-48.

90. Ibrahim S, Jilani I, O'Brien S, Rogers A, Manshouri T, Giles F, et al. Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003;97(8):1914-9.

91. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* 2002;51(4):268-75.

92. Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2005;36(9):955-61.

93. Salvesen HB, Gulluoglu MG, Stefansson I, Akslen LA. Significance of CD 105 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Apmis* 2003;111(11):1011-8.

94. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22(3):248-53.

95. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology* 2005;25(3):201-6.

96. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch* 2006;448(2):127-34.

97. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004;17(2):197-203.

98. Schimming R. [Tumor angiogenesis--value and significance in squamous epithelial carcinoma of the mouth cavity]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002;6(4):217-30.

99. Corteze Netto G, Birlem Bleil C, Hilbig A, Barbosa Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology* 2008;28(1):17-23.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: *SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER APAAP-METHODE* 11
ABB. 2: *SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WHIPPLE-OPERATION* 37
ABB. 3: *CD31-SPEZIFISCHE MVD, GRUPPE 1, 100X UND 200X VERGRÖßERUNG* 40
ABB. 4: *CD31-SPEZIFISCHE MVD, GRUPPE 2, 100X UND 200X VERGRÖßERUNG* 41
ABB. 5: *CD105-SPEZIFISCHE MVD, GRUPPE 1, 100X UND 200X VERGRÖßERUNG* 442
ABB. 6: *CD105-SPEZIFISCHE MVD, GRUPPE 2, 100X UND 200X VERGRÖßERUNG* 43
ABB. 7: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DES KI-67-LABEL-INDEX* 45
ABB. 8: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER TUMORKLASSIFIKATION* 47
ABB. 9: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER TUMORGRÖßE* 48
ABB. 10: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER OP-METHODE* 49
ABB. 11: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DES PATIENTEN-GESCHLECHTES* 50
ABB. 12: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER HORMONAKTIVITÄT DER TUMOREN* 51
ABB. 13: *KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT DER TUMORREZIDIVE* 52
ABB. 14: *REGRESSIONSKURVE DER CD31- UND CD105-SPEZIFISCHEN MVD* 60

8.2 Tabellenverzeichis

TAB. 1: *KLASSIFIKATION DER NEUROENDOKRINEN TUMOREN DES PANKREAS* 9

TAB. 2: *ZUSAMMENFASSUNG DER PATIENTENDATEN* 35

TAB. 3: *TUMORSPEZIFISCHE FAKTOREN* 44

TAB. 4: *UNIVARIANTE ANALYSE PROGNOSTISCHER FAKTOREN FÜR DAS ÜBERLEBEN BEI NEPT* 46

TAB. 5: *KORRELATION DER MVD MIT KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN VARIABLEN BEI ENDOTHELMARKIERUNG DER NEPT MIT DEM GEFÄßMARKER CD31* 54

TAB. 6: *KORRELATION DER MVD MIT KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN VARIABLEN BEI ENDOTHELMARKIERUNG DER NEPT MIT DEM GEFÄßMARKER CD105* 56

TAB. 7: *KORRELATION DER MVD BEI CD31- UND CD105-MARKIERUNG IN ZUSAMMENHANG MIT DER TUMORKLASSIFIKATION* 57

TAB. 8: *KORRELATION DES VERHÄLTNISSES DER CD31-SPEZIFISCHEN ZUR CD105-SPEZIFISCHEN MVD MIT DEN KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN VARIABLEN* 59

TAB. 9: *ZWEISEITIG SIGNIFIKANTE KORRELATION* 61

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BAO	engl. basal acid output
BSA	engl.: Bovine Albumin Serum
bzw.	beziehungsweise
Cg A	Chromogranin A
cm	Zentimeter
DEPKR	duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DP	distale Pankreasresektion (entspricht der Pankreaslinksresektion)
Fa.	Firma
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
GH	engl.: growth hormone (Wachstumshormon)
H	engl.: hour (Stunde)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
5-HIES	5-Hydroxy-Indolessigsäure
5-HT	Serotonin
kDa	Kilo Dalton
KE	Konzentrationseinheit
l	Liter
Lig.	Ligamentum
LOH	engl.: loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
MEN	multiple endokrine Neoplasien
mg	Milligramm

MHC	engl.: major histocompatibility complex
mmol	millimol
MSCT	Mehrzeilentechnik der CT
MVD	engl.: microvessel density, mikrovaskuläre Gefäßdichte
µ	Mikro
N	normal
nec	engl.: neuroendocrine
NEPT	Neuroendokrine Pankreas-Tumoren
NET	Neuroendokrine Tumore
No.	engl.: number
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OP	Operation
PECAM	engl.: platelet endothelial cell adhesion molecule
PET	Positronenemissionstomographie
pg	Pikogramm
pH	Potenz und Maß der Wasserstoffionenkonzentration
PHI	Peptid-Histidin-Isoleucin
PPPD	pyloruserhaltende partielle Pankreatiko-Duodenektomie
SRS	Somatostatinrezeptorszintigraphie
SSA	Somatostatinanaloga
Tab.	Tabelle
TGF	engl.: Transforming-growth-factor
TGF-β	engl.: Transforming-growth-factor type beta
TGF-β-RII	engl.: Transforming-growth-factor type beta Rezeptor II
TGF-β-RIII	engl.: Transforming-growth-factor type beta Rezeptor III
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
VIP	engl.: vasoactive intestinal polypeptide (Vasoaktives Intestinales Polypeptid)
WHO	engl.: World-Health-Organization
V.	Vena

v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

Für die freundliche Überlassung des interessanten Themas bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Emre F. Yekebas, Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE).

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für die Bereitstellung der Räume und der technischen Geräte seines Labors.

Mein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. med. Uta Reichelt, die mir bei der praktischen Einarbeitung mit Rat und Tat gern beiseite und als Ansprechpartnerin immer zur Verfügung stand. Ich möchte mich außerdem bei Frau Dr. med. Sabrina Thieltges für die gute Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des allgemeinchirurgischen und hepatobiliären Labors des UKE, die mir immer behilflich waren. Hervorheben möchte ich insbesondere Frau Antje Heinecke (MTA), Frau Petra Merkert (MTA), und Frau Petra Schröder (MTA), die mich in die Technik der Immunhistochemie eingewiesen haben und bei deren Ausführung zu Hilfe waren, sowie Frau Silke Brilloff (MTA) und Frau Kathleen Schlagner (MTA).

Frau Dr. med. Susann Koops danke ich für die Hilfestellung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung und für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Vor allem aber möchte ich mich hier ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung, ihre Hilfe und ihr Vertrauen bedanken.

8.5 Curriculum vitae

Name: Seehase, Melanie Marja Kristiina

Geboren am: 04.07.1978 in Hamburg

Bildungsweg:

1985-1989	Grundschule Grützmühlenweg Hamburg
1989-1998	Gymnasium Hummelsbüttel Hamburg
1998	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife in Hamburg
1998-2000	Berufsausbildung zur Arzthelferin, Orthopädische Praxisgemeinschaft Mönckebergstrasse, Hamburg
2000-2001	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock
2001-2003	Freie Universität Berlin
April 2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Berlin
Seit 2003	Universität Hamburg
2006-2007	Praktisches Jahr Radiologie, Prof. Adam (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) Chirurgie, MD G.B. O´Mahoney (Wexford General Hospital, Wexford, Irland) Innere Medizin, Prof. v. Ohlshausen (Asklepios Klinik Altona)
Oktober-Dezember 2007	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit März 2008	Assistenzärztin in der 1. Medizinischen Abteilung der Asklepios Klinik St. Georg, Prof. Müller-Wieland

8.6 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 und 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 Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....