UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumorbiologie

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Pantel

Die prognostische Relevanz von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Ösophaguskarzinompatienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Dominique Eichstädt
geboren in Finsterwalde

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 07.05.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sonja Lodges

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung ... 5

2 Einleitung ... 6

2.1 Das Ösophaguskarzinom ... 6

2.1.1 Epidemiologie ... 6

2.1.2 Histologie ... 6

2.1.3 Metastasierung beim Ösophaguskarzinom ... 6

2.1.4 Diagnostik und Einteilung ... 7

2.1.5 Klinik ... 8

2.1.6 Therapie ... 8

2.2 Die Stadieneinteilung nach der UICC-TNM-Klassifikation ... 10

2.3 Der Metastasierungsprozess ... 12

2.4 Disseminierte Tumorzellen ... 14

2.4.1 Disseminierte Tumorzellen und das Ösophaguskarzinom ... 14

2.5 Zirkulierende Tumorzellen und verschiedene Tumorentitäten ... 15

2.5.1 Die prognostische Relevanz von *CTCs* bei Ösophaguskarzinompatienten ... 15

2.6 Aufarbeitungsmethoden für zirkulierende Tumorzellen ... 18

2.6.1 Das *CellSearch*-System und die Detektion von *CTCs* ... 19

2.6.2 Die manuelle Aufarbeitung mit anschließender Ariol-Auswertung ... 21

2.7 Klinische Anwendung und Forschung ... 26

2.8 Ziele ... 27

3 Material und Methoden ... 28

3.1 Die Studie ... 28

3.2 Das Patientenkollektiv ... 28

3.3 Die *CTC*-Anreicherungsmethoden ... 30

3.3.1 Die manuelle Blutaufarbeitung bei der Ariol-Methode ... 30

3.3.2 Die Aufarbeitung und Auswertung mit dem *CellSearch*™–System ... 33

3.4 Die Reagenzien und Verbrauchsmaterialien ... 34

3.5 Die statistische Analyse ... 35

4 Ergebnisse ... 36

4.1 Detektionsraten der beiden Methoden ... 36

4.2 Methodenvergleich *CellSearch*- und Ariol-Methode ... 40

4.3 Die Stadienabhängigkeit der *CTC*-Verteilung ... 41

4.4 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patienten-Charakteristiken und klinischen Parametern ... 43

4.4.1 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patientien-Charakteristiken und klinischen Parametern (Ariol) 43

4.4.2 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patientien-Charakteristiken und klinischen Parametern (*CellSearch*) ... 44

4.5 Univariate Überlebensanalysen Gesamtkollektiv ... 45

4.5.1 Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter ... 46

4.5.2 Log-rank-Analysen für das Gesamtüberleben für klinische Parameter ... 50

4.6 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie ... 55

4.6.1 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie für klinische Parameter und *CTC* (Ariol) 55

4.6.2 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie für klinische Parameter und *CTC* (*CellSearch*) ... 56

4.6.3 Überlebensanalyse bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom ... 58

4.6.4 Univariate Überlebensanalyse bei Patienten mit Adenokarzinom ... 60

4.7 Subgruppen-Analyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus ... 62

4.7.1 Subgruppen-Analyse in Bezug auf Lymphknotenstatus für klinische Parameter und *CTC*

(Ariol) 62
4.7.2 Subgruppen-Analyse in Bezug auf Lymphknotenstatus für klinische Parameter und *CTC* (*CellSearch*) ... 64
4.7.3 Univariate Überlebensanalyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus ... 65

5 Diskussion ... 70
5.1 Die Studie ... 70
5.1.1 Die Vergleichbarkeit der bisherigen *CTC*-Studien beim Ösophaguskarzinom ... 70
5.2 Wie ist die Detektionsrate von *CTCs* bei Patienten in den verschiedenen Krankheitsstadien? ... 73
5.3 Der Zeitpunkt der Blutentnahme ... 76
5.4 Welche immunomagnetische Anreicherungsmethode ist sensitiver und erweist sich als geeigneter? ... 76
5.5 Die klinische Relevanz von *CTCs* beim Ösophaguskarzinom ... 78
5.5.1 Hat das Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen einen prognostischen Stellenwert? 79
5.6 Die *Cut-off*-Werte ... 81
5.7 Die Subgruppenanalyse ... 81
5.7.1 Subgruppenanalyse in Bezug auf die Histologie ... 81
5.7.2 Subgruppenanalyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus ... 84

6 Zusammenfassung ... 85
6.1 Conclusion ... 86

7 Abkürzungsverzeichnis ... 87

8 Literaturverzeichnis ... 89

9 Anhang ... 98

10 Danksagung ... 99

11 Eidesstattliche Versicherung ... 100

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Zirkulierende Tumorzellen (Englisch: *Circulating Tumor Cells*, kurz „*CTCs*“) sind Zellen, welche sich vom Ursprungstumor lösen und durch das Blut zirkulieren. Sie sind bei verschiedenen Karzinomarten nachgewiesen worden und ihr Vorhandensein kann mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf der Tumorerkrankung einhergehen (Cristofanilli, 2004; Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008; Rink *et al.*, 2011). In der *CTC*-Forschung gibt es umfangreiche Forschungsarbeiten, wie zum Beispiel für das Mammakarzinom. Mehrere Studien belegen hier einen Zusammenhang zwischen den im Blut zirkulierenden Zellen und einer schlechten Überlebensprognose (Zhang *et al.*, 2012; Franken *et al.*, 2012; Cristofanilli, 2004). Bei Patienten mit metastasiertem Prostata- oder Kolorektalkarzinom ist die prognostische Relevanz von *CTCs* ebenfalls nachgewiesen (Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008). Bisher gibt es nur wenige Studien zu der Bedeutung von *CTCs* beim Ösophaguskarzinom (Hiraiwa *et al.*, 2008; Kaganoi *et al.*, 2004; Koike *et al.*, 2002; Liu et al., 2007; Nakashima *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2010) und nur eine Studie betrachtet das Adenokarzinom des Ösophagus (Sclafani *et al.*, 2013). Die meisten dieser Arbeiten untersuchten kleinere Stichproben. Das Ösophaguskarzinom tritt mit einer Inzidenz von 6-8 Neuerkrankungen pro Jahr je 100000 Einwohner viel seltener auf als das Mamma-, Kolorektal- oder Prostatakarzinom (Robert Koch Institut, kurz „RKI“, 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim Ösophaguskarzinom beträgt nur circa 20 % (RKI 2012). Die meisten Patienten erleiden trotz vollständiger Resektion des Tumors im Verlauf eine Metastasenbildung oder ein Lokalrezidiv und das, obwohl zum Zeitpunkt der Operation keine systemische Ausbreitung der Erkrankung nachweisbar war (Schneider *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass es sich um okkulte Mikrometastasen bzw. isolierte Tumorzellen mit metastatischem Potential handelt, welche durch die aktuell in den Kliniken verwendete Diagnostik nicht detektiert werden können. Der suffiziente Nachweis von *CTCs* als Hinweis auf eine systemische Ausbreitung der Tumorerkrankung könnte in Zukunft einen wegweisenden prognostischen Marker darstellen und zum verbesserten präoperativen *Staging* beitragen, so wie auch beim Mammakarzinom bereits eine Integration von *CTCs* in das TNM-System erfolgte - als M0 (i+).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen prognostischen Wert *CTCs* beim Ösophaguskarzinom haben. Aus diesem Grund wurde das präoperativ abgenommene Blut von Ösophaguskarzinom-Patienten auf die Anwesenheit von *CTCs* untersucht.

Ein weiteres Ziel war ein Methodenvergleich zur *CTC*-Detektion. Es wurden zwei verschiedene immunomagnetische Anreicherungsmethoden verwendet. Das *CellSearch*™-System (Janssen Diagnostics, South Raritan, NJ) einerseits, welches bereits für Blutaufarbeitungen beim metastasierten Mamma-, Prostata- und Kolorektalkarzinom zur Karzinomzelldetektion von der amerikanischen Arzneimittelbehörde (englisch *Food and Drug Administration*, (*FDA*)) zugelassen ist und die Detektionsplattform Ariol™ (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) andererseits, für welche es bisher noch keine offizielle Zulassung gibt. Der grundlegende Unterschied ist, dass die Tumorzellen bei der Ariol-Methode mit zwei Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene angereichert werden (Deng *et al.*, 2008) und bei der *CellSearch*-Methode nur mit einem. Außerdem erfolgt die Aufarbeitung sowie die Auswertung des Blutes beim *CellSearch*-System überwiegend automatisiert, während beim Ariol-System das zuvor manuell aufgearbeitete Blut dann automatisch ausgewertet wird. Angelehnt an die Arbeit von Deng et al. wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass eine *CTC*-Anreicherung mit 2 *Catcher*-Antikörpern die Tumorzell-Detektionsrate erhöht und damit einer Anreicherung mit nur einem *Catcher*-Antikörper überlegen ist (Deng *et al.*, 2008).

2 Einleitung

2.1 Das Ösophaguskarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Ösophaguskarzinom ist mit weniger als einem Prozent aller Tumore zwar ein seltener, jedoch ein aggressiver Tumor. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt circa 20 % und die Überlebenschancen verringern sich mit zunehmender Tumorausdehnung, Dedifferenzierung der Tumorzellen sowie der Anwesenheit von Regional- und Fernmetastasen (Chang *et al*., 2008; Rice *et al.*, 2009, RKI 2012). Die schlechten prognostischen Aussichten sind abgesehen von der Aggressivität des Karzinoms auch auf die oft späte Entdeckung des Tumors zurückzuführen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist der Tumor bei über 90 % der Patienten bereits über das frühe T1-Krankheitsstadium hinaus fortgeschritten. Laut Robert Koch Institut erkranken Männer vier- bis fünfmal häufiger als Frauen (RKI 2012).

2.1.2 Histologie

Es gibt verschiedene histologische Erscheinungsformen des Ösophaguskarzinoms.
In 50- 60 % der Fälle handelt es sich um ein Plattenepithelkarzinom, welches sich vor allem im mittleren Drittel der Speiseröhre manifestiert und mit Risikofaktoren wie Rauchen und Alkohol assoziiert ist. An Häufigkeit zugenommen hat in den letzten Jahren das Adenokarzinom, welches im unteren Speiseröhrendrittel bevorzugt auf einer Barrettmetaplasie wächst und mittlerweile etwas mehr als ein Drittel aller Ösophaguskarzinome ausmacht (RKI 2012). Diese beiden histologischen Formen unterscheiden sich auch in der regionalen Verteilung. So ist das Plattenepithelkarzinom vor allem im asiatischen Raum verbreitet, während das Adenokarzinom gehäuft in einigen europäischen Ländern wie zum Beispiel Schottland auftritt (World Cancer Report 2009). Neben den beiden histologischen Hauptformen kann es in selteneren Fällen auch zu einer Manifestation anderer Entitäten wie Leiomyosarkomen kommen.

2.1.3 Metastasierung beim Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom metastasiert bevorzugt in Lymphknoten, Leber (siehe Abbildung 1), Lunge und Knochen (Quint *et al*., 1995). Früh metastasiert es in die Lymphknoten. In den frühen Tumorstadien bestehen bezüglich der Lymphknotenmetastasierung Unterschiede zwischen dem Adenokarzinom und dem Plattenepithelkarzinom. Es konnte gezeigt werden, dass wenn bei einem Adenokarzinom nur die Tunica mucosa (T1a) betroffen war, 1,2 % lymphogen metastasierten und bei einem Befall bis in die Tunica submucosa (T1b) 20 % lymphogen metastasierten. Beim Plattenepithelkarzinom zeigte sich eine häufigere Metastasierung. So metastasierten 6,5 % bei einer Tumorausdehnung bis in die Tunica mucosa und 50 % bei einer Ausdehnung bis in die Tunica submucosa. Im Stadium T2 finden sich bei 70 % der Patienten Lymphknotenmetastasen unabhängig von der Histologie. Bei einem Tumorbefall aller Wandschichten oder sogar über die Organgrenze hinaus, haben 80-100 % der Patienten befallene Lymphknoten. Die durchschnittliche Überlebensdauer von Patienten mit Lymphknotenmetastasen beträgt 6 Monate.
Bei der hämatogenen Tumormetastasierung manifestieren sich die Metastasen häufig in der Lunge oder in der Leber, aber auch in Knochen, Nebennieren, Nieren und Gehirn kommt es zu Fernmetastasen. Zudem ist ein Voranschreiten der Tumorerkrankung auch über organüberschreitendes Wachstum in die umgebenden Strukturen wie Trachea, die Bronchien und das Mediastinum möglich (Baumhoer *et al*, 2005).

Bei einer Forschungsarbeit, welche unterschiedliches Therapieansprechen bei Patienten mit Ösophaguskarzinom (n= 802) untersuchte und für einen Großteil der Patienten ein 3-Jahres *Follow-up* durchführte, entwickelten 10-12 % der Patienten trotz Behandlung (Operation oder Operation und Chemotherapie) Metastasen (Bancewicz *et al.*, 2002).

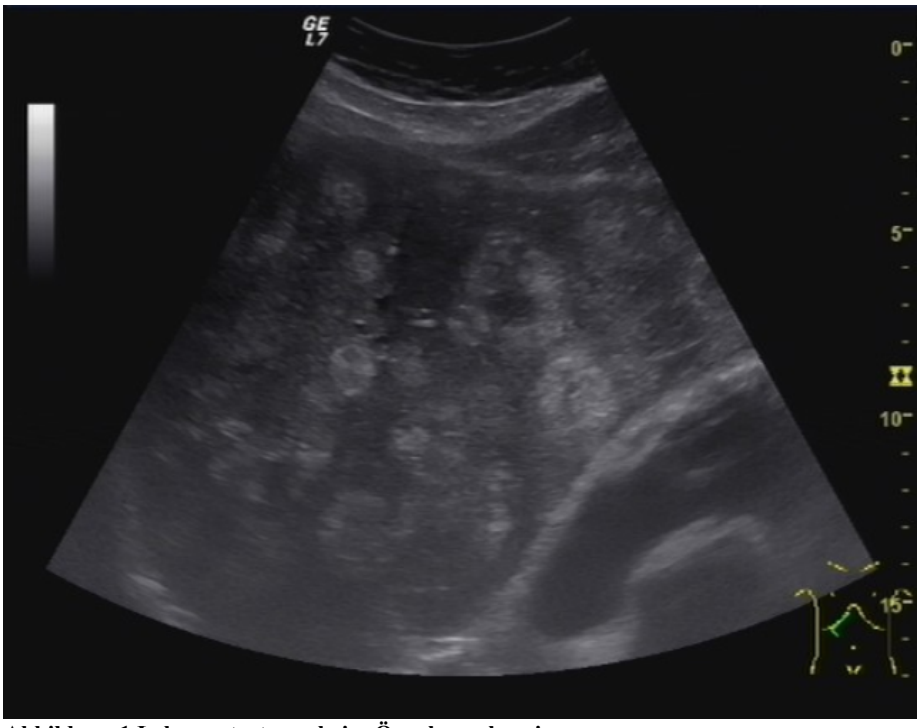

Abbildung 1 Lebermetastasen beim Ösophaguskarzinom

2.1.4 Diagnostik und Einteilung

Bei Patienten mit Verdacht auf eine Neoplasie des Ösophagus sollte frühzeitig eine Endoskopie mit Biopsieentnahmen von allen suspekten Läsionen durchgeführt werden, da diese die spezifischste und sensitivste Untersuchung zur Detektion von Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes darstellt. Mithilfe von B-Bild-Sonografie des Abdomens und Computertomografie von Thorax und Abdomen werden Fernmetastasen ausgeschlossen bzw. nachgewiesen. Ergänzend kann eine B-Bild-Sonografie des Halses zum Ausschluss von zervikalen Lymphknotenmetastasen durchgeführt werden. Bei Patienten mit kurativer Therapieoption wird ein endoluminaler Ultraschall (EUS) durchgeführt. Zum Ausschluss von Metastasen der Leber und/oder des Peritoneums kann beim Adenokarzinom in fortgeschrittenen Stadien (cT3, cT4) eine diagnostische Laparoskopie durchgeführt werden. Die Abbildung 2 zeigt den diagnostischen Pfad übersichtlich dargestellt. Die Stadieneinteilung sowie die histologische Klassifikation erfolgen nach der TNM-Klassifikation der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC). Im Abschnitt 2.2. wird näher auf das *Staging* eingegangen. Bisher gibt es keinen Tumormarker, welcher in der Klinik zur Diagnose oder zur Therapieüberwachung empfohlen wird (Leitlinie Magenkarzinom-Diagnostik und Therapie des Magens und ösophagogastralen Übergangs 2012; S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus 2015), sodass man allein auf die bildgebende Diagnostik angewiesen ist. Diese ist in der Lage Läsionen ab mehreren Millimetern zu identifizieren, alles darunter bleibt unerkannt. Beispielweise beträgt die Sensitivität der Computertomografie bei der Detektion hepatischer Metastasen circa 70–80 % (Baumhoer *et al*, 2005).

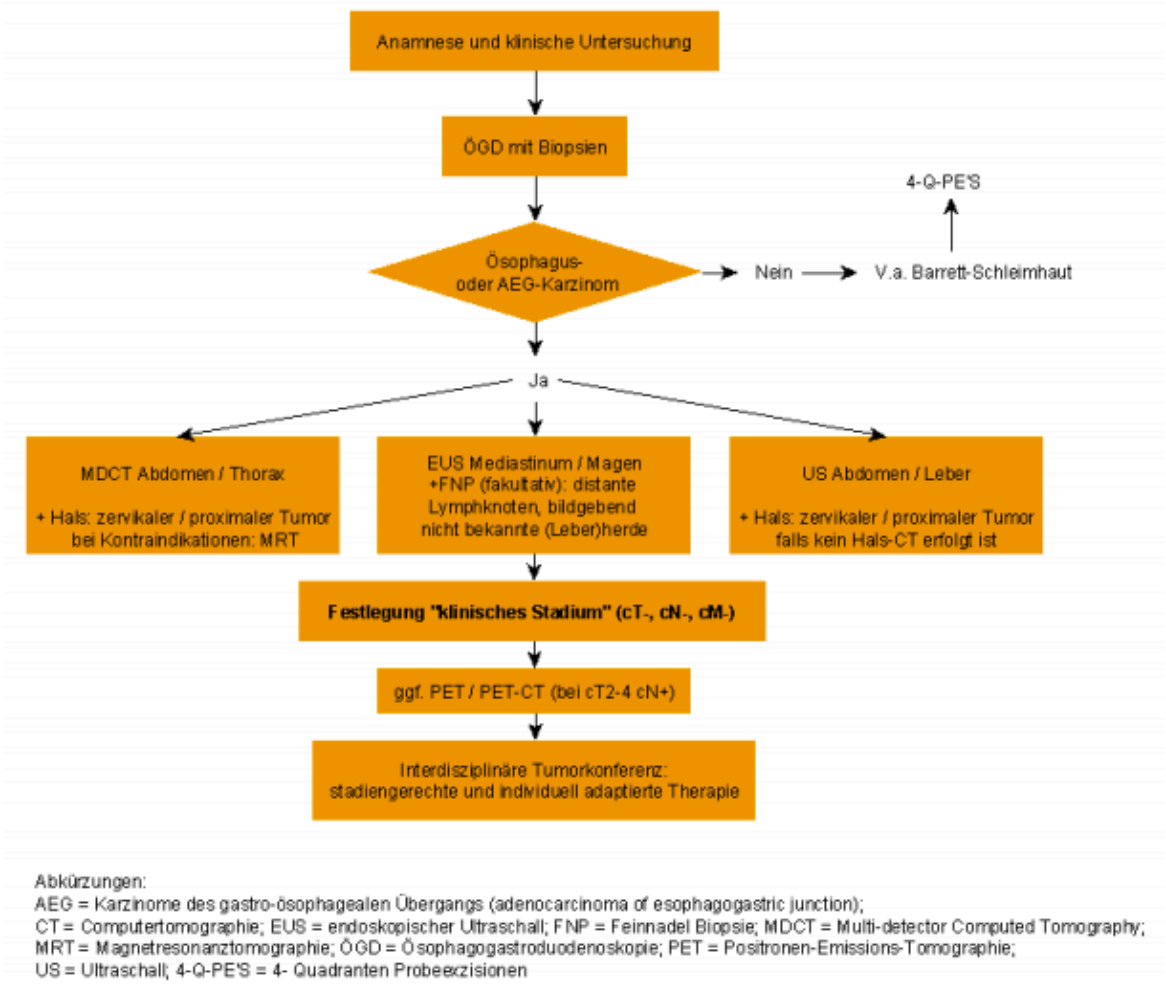

Abbildung 2 Diagnostik des Ösophaguskarzinoms aus der S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus 2015“

2.1.5 Klinik

Die Klinik des Ösophaguskarzinoms kann vor allem in frühen Krankheitsstadien unspezifisch sein. Symptome machen sich häufig erst spät bemerkbar. Verlegt der Tumor bereits einen Teil des Ösophaguslumens kann es zu Dysphagie sowie rezidivierendem Erbrechen und Aspirationen kommen. Auch Gewichtsverlust, Inappetenz, Dyspepsie und Dysphonie werden beobachtet.

2.1.6 Therapie

In einem interdisziplinären Tumorboard sollte jeder Ösophaguskarzinom-Patient besprochen werden. Unter Berücksichtigung von *Staging*-Informationen, Komorbiditäten sowie Ernährungszustand und Patientenpräferenz wird eine offizielle Therapieempfehlung beschlossen. Allgemein wird über die Therapie stadienabhängig sowie nach aktuellen Leitlinienempfehlungen entschieden.
Eine kurative endoskopische Resektion kann bei einer hochgradigen intraepithelialen Neoplasie oder einem mukosalen Karzinom im Plattenepithel/ Barettösophagus angestrebt werden. Die Mehrzahl der Tumore sind zum Diagnosezeitpunkt kein Frühkarzinom mehr, sodass die Therapie häufiger in einer Ösophagektomie besteht. Je nach Lokalisation des Tumors wird eine subtotale oder totale Ösophagektomie durchgeführt. Die Operation stellt den Goldstandard dar (Jiao and Krasna, 2002). Es wird angestrebt den Tumor sowie die

regionären Lymphknoten vollständig zu resezieren. Gelingt es, den Tumor ohne mikro- oder makroskopische Tumorzellreste zu entfernen, vergrößern sich die Überlebenschancen des Patienten (Lerut *et al.*, 1994). Beim Nachweis von Fernmetastasen wird von einer Operation Abstand genommen. Präoperativ kann bei Patienten in gutem Allgemeinzustand und Plattenepithelkarzinom im Stadium T3 oder bei einem resektablen T4-Stadium eine Radiochemotherapie erfolgen. Chemotherapeutika sind zum Beispiel 5-Fluorouracil (5-FU)/ Cisplatin sowie FOLFOX (Oxaliplatin, Folinsäure, 5-FU) oder Carboplatin/ Paclitaxel. Bei Patienten mit operablen Plattenepithelkarzinom kann eine alleinige Radiotherapie erfolgen.
Befindet sich der Patient in einem fortgeschrittenen, inoperablen Stadium, wählt man einen palliativen Ansatz, welcher eine Lebensqualitätsverbesserung zum Ziel hat. Es geht vor allem darum, die Schluckfähigkeit des Patienten so lang wie möglich zu erhalten oder gegebenenfalls wiederherzustellen. Durch eine endoskopische Therapie kann bei einem stenosierenden Ösophaguskarzinom beispielsweise ein selbstexpandierender *Stent* eingelegt werden (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4). Ist die Erhaltung des passierbaren Ösophaguslumens nicht möglich, kann die Ernährung über eine perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) sichergestellt werden. Zusätzlich kommen vor allem Radiochemotherapien in Frage sowie eine adäquate Schmerztherapie und unterstützende Maßnahmen. Als Chemotherapeutika verwendet man beispielsweise eine Kombination aus Cisplatin und 5-Fluorouracil (van Meerten & van der Gaast, 2005, S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus 2015").
Zusätzlich sollte stadienunabhängig die psychoonkologische Betreuung der Patienten ein Bestandteil der multimodalen Therapie sein.

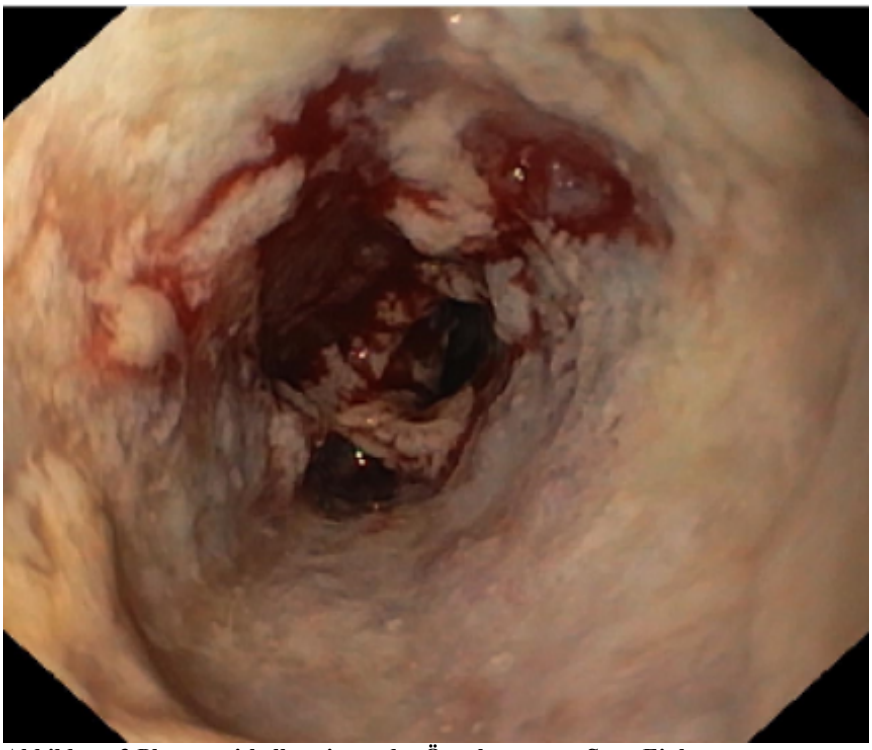

Abbildung 3 Plattenepithelkarzinom des Ösophagus vor *Stent*-Einlage

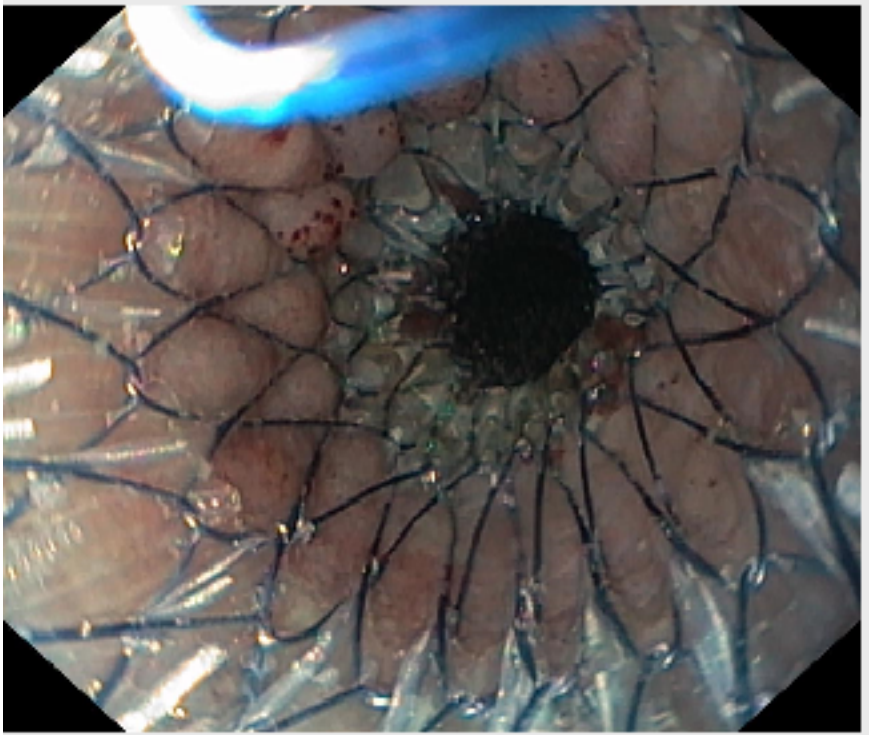

Abbildung 4 Plattenepithelkarzinom des Ösophagus nach *Stent*-Einlage

2.2 Die Stadieneinteilung nach der UICC-TNM-Klassifikation

Die Abkürzung UICC steht für *Union Internationale Contre le Cancer*. Es handelt sich um eine internationale Organisation, welche sich mit der Erforschung, Behandlung und Prävention von Krebserkrankungen beschäftigt. Im Jahr 2009 gab es eine Aktualisierung sowie die Veröffentlichung der siebten Auflage (Gospodarowicz *et al*.,2009). Die entwickelte Klassifikation basiert hauptsächlich auf anatomischen Kriterien. Ziel ist die Planung der bestmöglichen Therapie, die Überwachung selbiger und eine Einschätzung der voraussichtlichen Prognose (Sobin, 2001). Zudem hilft sie bei der Einteilung von Patienten für klinische Studien und bei einer einheitlichen Kommunikation zwischen den medizinischen Einrichtungen (Ludwig and Weinstein, 2005). Die verschiedenen Charakteristika dieser Einteilung beinhalten die Ausdehnung des Tumors (T), den Befall von Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Metastasen (M). In Tabelle 1 ist die Erklärung der Variablen für das Ösophaguskarzinom dargestellt. Anhand dieser Faktoren wird die Stadieneinteilung, wie in Tabelle 2 aufgeführt, vorgenommen. Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad (G) der Tumorzellen angegeben, welcher die Ähnlichkeit der entarteten Zelle mit dem Ursprungsgewebe beschreibt. In den vergangenen Jahren sind verschiedene neue Variablen von Forschungsgruppen vorgeschlagen worden, welche in anfänglichen Studien zwar einen großen Einflussfaktor zu spielen schienen, in späteren Studien jedoch nicht bestätigt werden konnten (Union internationale contre le cancer, 2014) Umso wichtiger ist die Erforschung potenzieller neuer Biomarker. Die Onkologie fokussiert sich zunehmend auf „*targeted therapies*“, die wie oben beschrieben bestimmte Merkmale der Tumorzellen ausnutzen. Auch *CTCs* stellen einen potenziellen Biomarker für das Ösophaguskarzinom dar, was in dieser Arbeit evaluiert werden soll. Es gibt einige Grundvoraussetzungen, die ein neuer Marker erfüllen sollte. Dazu gehören unter anderem Sensitivität, Spezifität, eine Labor- und Klinik-unabhängige Bestimmbarkeit, welche reproduzierbar ist und einen angemessenen Kosten-Nutzen-Wert hat (Ludwig and Weinstein, 2005).

Tabelle 1 Variablen der TNM Klassifikation des Ösophaguskarzinoms nach der 7.Auflage

TNM-Variable	Bedeutung
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Tumor vorhanden
Tis	Carcinoma in situ/ *High grade dyplasia*
T1a	Tumorausbreitung bis Lamina propria /Muscularis mucosae
T1b	Tumorausbreitung bis Submucosa
T2	Tumorausbreitung bis Muscularis propria
T3	Tumorausbreitung Adventitia
T4a	Tumor infiltriert Pleura, Perikard, Zwerchfell
T4b	Tumor infiltriert andere angrenzende Strukturen, z.b. Aorta, Wirbelsäule, Trachea
NX	Regionäre Lymphkonten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknoten befallen
N1	1-2 regionale Lymphknoten befallen
N2	3-6 regionale Lymphknoten befallen
N3	≥ 7 Lymphknoten befallen
M0	Keine Fernmetastasierung
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2 UICC-TNM-Einteilung für das Ösophaguskarzinom nach der 7.Auflage

UICC	Tumorausbreitung (T)	Lymphknotenbefall (N)	Fernmetastasierung (M)
I0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1, T2	N1	M0
IIIA	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1, T2	N2	M0
IIIB	T3	N2	M0
IIIC	T4a	N1, N2	M0
	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

2.3 Der Metastasierungsprozess

Viele Krebspatienten sterben an den Folgen von Metastasierung. Bereits 1889 beschrieb Stephen Paget das „*Seed and Soil*“ –Konzept. Er entwickelte die Hypothese, dass es nicht zufällig zur Bildung von Tochtergeschwülsten in bestimmten Organen käme, sondern dieser Prozess durch eine Interaktion zwischen den Zellen (Saat) und dem Umgebungsmilieu im Gewebe (Boden) geprägt sei. Er nahm an, die Wachstumsbedingungen in einigen Organen seien für gewisse Tumorarten besonders günstig, und so erklärte er sich das Phänomen der signifikanten Streuung von verschiedenen Tumoren in spezifische Organe.
Die Richtigkeit von Pagets Annahmen hat sich bis zur heutigen Zeit gehalten. So kommen nach aktuellem Stand der Forschung in der „*Seed and Soil*“-Hypothese drei Ansätze zusammen. Erstens, der Tumor und seine Metastasen setzen sich aus Tumor und Umgebungszellen wie beispielsweise Fibroblasten zusammen. Die Tumorzellen eines Primarius sind heterogen und nicht jede Zelle besitzt das Potenzial zur Streuung (Baccelli *et al.*, 2013). Damit kommen wir zum zweiten Ansatz, welcher besagt, um einen Ableger zu bilden, muss eine Zelle in der Lage sein, alle Schritte der Metastasierungskaskade, vom invasiven Wachstum bis zur Vermehrung in einem dem Ursprungsort verschiedenen Organ zu durchlaufen (Fidler, 1990). Und drittens, dass sich Metastasen nur in bestimmten Organen entwickeln können und dieser Prozess abhängig von den Umgebungsfaktoren ist, welche die entartete Zelle zum Wachsen braucht (Fidler, 2003). Aber nicht nur Saat und Boden müssen zueinander passen, sondern auch anatomische und mechanische Gegebenheiten, wie Blutversorgung und Lymphabflussgebiet, beeinflussen den Ort der Metastasenbildung (Langley and Fidler, 2011). Intuitiv könnte man zu dem Schluss kommen durch komplette Entfernung des Primärtumors den Prozess des Voranschreitens der Krankheit stoppen und den Patienten heilen zu können. Doch trotz therapeutischer Fortschritte, entwickelt auch ein Patientenanteil, welcher erfolgreich R0 - also ohne zurückgebliebene mikroskopische Tumorreste - reseziert wurde und zum Zeitpunkt der Operation mit unseren heutigen diagnostischen Verfahren ohne nachweisbare Metastasen war, im Velauf Metastasen. Während man früher annahm, Metastasierung sei ein Prozess, der in späten Krankheitsstadien stattfindet und das Risiko für eine systemische Ausbreitung der Erkrankung sich mit der Tumorgröße erhöht, weiß man heute, dass es bereits in frühen Krankheitsphasen zur Streuung von Tumorzellen über die Blutbahn kommt (Hüsemann *et al.*, 2008). Diese maligne veränderten Zellen besitzen die Fähigkeit sich vom Zellverband zu lösen und in das Blut und Knochenmark und/oder in andere Organe zu disseminieren. Selbst durch hoch auflösende Bildgebungsverfahren kann man diese zeitige systemische Ausbreitung der Erkrankung nicht darstellen. Bisher entzieht sich der Prozess also der standardisierten Klinikdiagnostik. Anders verhält es sich im Labor. Durch moderne Labortechnik und -methoden ist es möglich, einzelne Tumorzellen in Lymphknoten, Knochenmark und Blut nachzuweisen (Pantel and Alix-Panabières, 2010; Stoecklein *et al*., 2008). Pantel und Brakenhoff haben zwei Wege der Metastasierung beschrieben, in denen die Zellen entweder über den Lymphknoten als Zwischenstation oder direkt hämatogen in entfernte Organe streuen (Pantel and Brakenhoff, 2004). Die Metastasierungskaskade besteht vereinfacht dargestellt aus sieben verschiedenen Schritten (siehe Abbildung 5). Nur Zellen, welche jede Etappe erfolgreich durchlaufen, werden eine Metastase bilden können. So müssen die Tumorzellen in der Lage sein sich vom Tumorzellverband zu lösen, invasiv durch die Extrazellularmatrix in den Blutstrom einzudringen, im Blut zu überleben, an einer Stelle haften zu bleiben, um wieder aus dem Blut in anderes Gewebe einzudringen und in dieser neuen Umgebung nicht nur zu überleben, sondern sich auch zu teilen bis ein neuer Tumorzellverband (Metastase) entstanden ist. Abbildung 5 zeigt die einzelnen Schritte graphisch dargestellt (Valastyan and Weinberg, 2011).

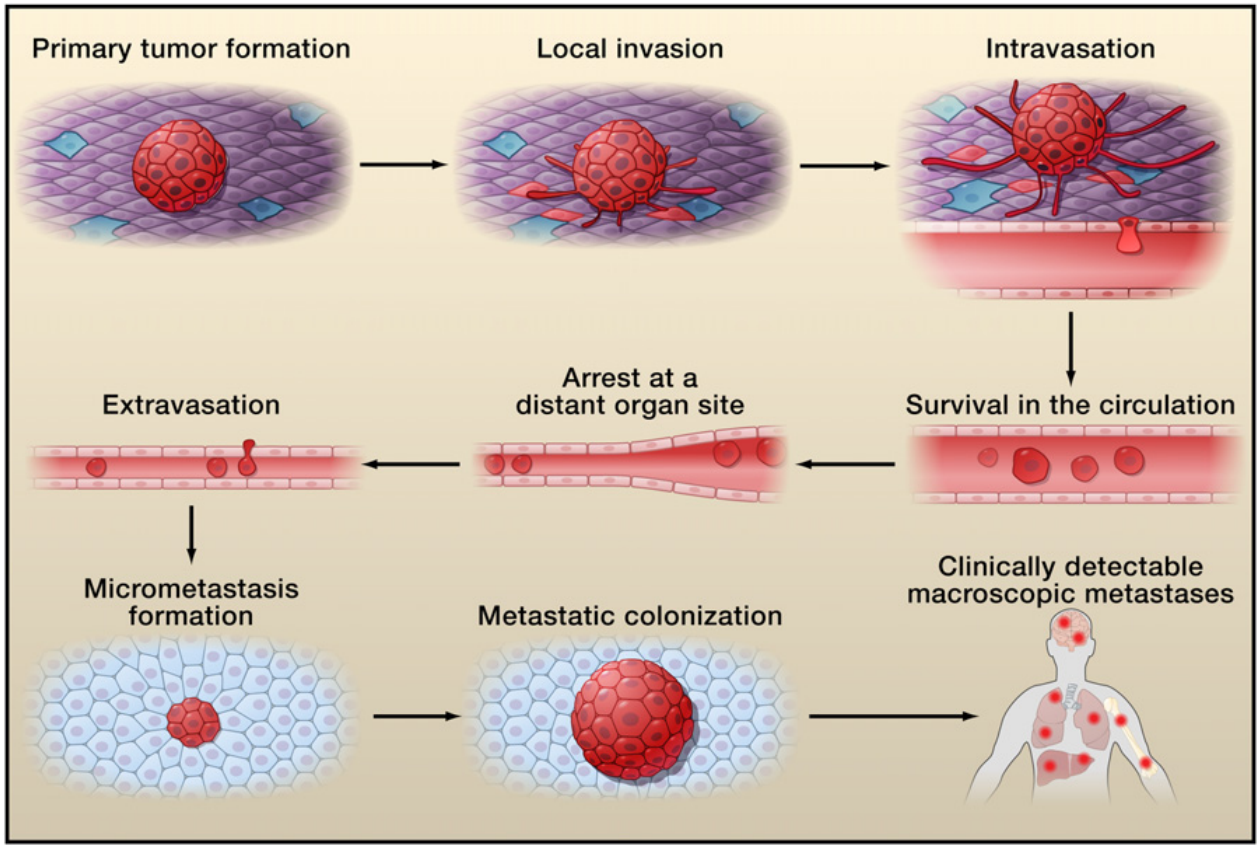

Abbildung 5 Die Schritte von Primärtumor bis zur Metastase (The Invasion-Metastasis Cascade; Valastyan S, Weinberg A: Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms; Cell 2011, 276)

Beim Metastasierungsprozess spielen *CTCs* die zentrale Rolle. Es handelt sich hierbei um einzelne oder zu Aggregaten zusammengelagerte Zellen, welche sich vom Ursprungstumor oder Tochtergeschwülsten lösen und frei durch das Blut zirkulieren. Sie stellen eine Übergangsform zwischen dem Primärtumor und der Metastase dar. Die Tumorzellen sind im Blut zahlreichen Stressoren wie zum Beispiel Scherkräften oder Platzmangel in Kapillaren ausgesetzt, welche zu Anoikis führen können. Das Wort Anoikis kommt aus dem griechischen und bedeutet obdachlos. Bei diesem Prozess wird bei einer Epithelzelle, die den Integrin-abhängigen Matrix-Zell-Kontakt verloren hat, automatisch die Apoptose (programmierter Zelltod) ausgelöst (Liotta and Kohn, 2004). Da die Ösophaguskarzinomzellen epithelialen Ursprungs sind, betrifft dies auch die Zellen in dieser Arbeit. Zum anderen sind Tumorzellen mit 20-30 µm größer als die Kapillaren in den Endstromgebieten, welche einen Durchmesser von circa 8 µm messen. Die Zirkulation eines Teils der *CTCs* durch das Blut könnte somit innerhalb von Minuten stagnieren (Valastyan and Weinberg, 2011).
Zudem beträgt die vermutete Halbwertzeit für die im Blut schwimmenden Tumorzellen wohl ebenfalls nur Stunden (Meng *et al.*, 2004).
Wissenschaftler haben Tumorzellen radioaktiv *gelabelt* und beobachtet, wie viele Zellen 24 Stunden nach Eintritt in die Blutbahn noch vital waren. Es waren weniger als 0,1 % und auch nur ein kleiner Anteil von 0,01 % hatte nach damaligen Methoden Metastasierungspotenzial (Fidler, 1970). Chambers et al. arbeiteten in ihrem Review heraus, dass Metastasierung ein ineffizienter Prozess ist (Chambers *et al.*, 2002).
Auch Scherkräfte im Blut und die Zellen des Immunsystems, im Speziellen die natürlichen Killerzellen, stellen weitere Schwierigkeiten dar. Anscheinend entgehen einige *CTCs* diesen Problemen, indem sie in einem Embolus aus Blutplättchen geschützt durch das Blut flottieren. Die Thrombozyten bilden somit einen Schutzwall gegen die natürliche Abwehr des Körpers und die Scherkräfte der Blutzirkulation (Valastyan and Weinberg, 2011).

Man hat beobachtet, dass es besonders bei der Manipulation am Tumor während einer Operation zur Aussaat von Tumorzellen in die Blutbahn kommt (Demicheli *et al*., 2008). Dies konnte auch für das Ösophaguskarzinom demonstriert werden (Liu *et al.*, 2007).
Gelingt es den *CTCs* die Blutbahn wieder zu verlassen und sich in einem Organ niederzulassen, bilden nicht alle zirkulierenden Tumorzellen sofort Sekundärtumore. Sie können jahrelang in einem Ruhezustand, in dem sie sich nicht teilen, im Knochenmark von Patienten ausharren. Man bezeichnet sie dann als schlafende Tumorzellen. Unklar ist bisher, durch welche Mechanismen diese Zellen aus ihrem Ruhezustand wieder zurück in die Aktivität gebracht werden (Rack *et al.*, 2013). Meng et al. untersuchten das Blut von Patienten, welche sich vor über sieben Jahren einer vollständigen Brustkrebsentfernung unterzogen hatten und bis zum Zeitpunkt der Studie rezidivfrei geblieben waren. Sie fanden bei 36 % der Frauen zirkulierende Tumorzellen im Blut ohne den Nachweis von Tochtergeschwülsten. Sie stellten die Vermutung auf, dass es sich auch hierbei um schlafende Tumorzellen handele (Meng *et al.*, 2004).

2.4 Disseminierte Tumorzellen

Befinden sich einzelne Tumorzellen im Knochenmark oder in Lymphknoten, werden sie disseminierte Tumorzellen (sog. *Disseminated Tumor Cells*, kurz *DTCs*) genannt. Das Vorhandensein dieser Karzinomzellen nach Entfernung des Primärtumors bezeichnet man als minimale residuale Erkrankung (Pantel and Brakenhoff, 2004). Ein Teil der *DTCs* kann im Knochenmark ruhen, Metastasen bilden oder aber zu anderen Organen streuen, in welchen die Umgebungsbedingungen zur Metastasierung günstiger sind, wie es beim Bronchialkarzinom beobachtet werden kann (Pantel *et al.*, 2008). Sie können Tumorstammzellprofile exprimieren und deren Eigenschaften besitzen, wie zum Beispiel die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika oder die lange Persistenz im Knochenmark (Pantel *et al*., 2008). Verschiedene Studien haben eine prognostische Relevanz für *DTCs* bei Patienten mit Tumoren epithelialen Ursprungs nachgewiesen (Diel *et al.*, 1996; Bidard *et al.*, 2008). Braun et al. konnten in einer *gepoolten* Analyse zeigen, dass isolierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten zum Zeitpunkt der Primärdiagnostik mit einem signifikant kürzeren rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert waren und zudem die *DTC*-positiven Patienten öfter Fernmetastasen entwickelten (Braun *et al.*, 2005). In der Arbeit von Effenberger et al. stellten sich *DTCs* bei Patienten mit Pankreaskarzinom in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor heraus (Effenberger *et al.*, 2012).

2.4.1 Disseminierte Tumorzellen und das Ösophaguskarzinom

Bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom bewiesen mehrere Studien die Relevanz von *DTCs*. Macadam et al. zeigten, dass sich die Anwesenheit von *DTCs* im Knochenmark von Ösophaguskarzinompatienten als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und Rezidiventwicklung erwies (Macadam *et al*., 2003). Dieses Ergebnis konnte durch weitere Forschungsgruppen bestätigt werden (Thorban *et al*., 2000; Vashist *et al*., 2012).
Nicht nur das Knochenmark, sondern auch Lymphknoten wurden auf disseminierte Tumorzellen untersucht (Buskens *et al*., 2008). Izbicki et al. konnten bei Patienten mit Ösophaguskarzinom ohne makroskopischen Tumorbefall der Lymphknoten Mikrometastasen mittels immunhistochemischer Färbung nachweisen. Diese Mikrometastasen hatten einen starken nachweisbaren Einfluss auf das progressionsfreie sowie Gesamtüberleben (Izbicki *et al.*, 1997). Dass sich in den vergangenen Jahren zunehmend auf im Blut zirkulierende statt disseminierte Tumorzellen konzentriert wird, obwohl die meisten beschriebenen Studien doch die Relevanz der *DTCs* beschreiben, liegt an dem Prozedere der Probengewinnung. Um bei

einem Patienten einen *DTC*-Status zu erheben, bedarf es einer Untersuchung des Knochenmarkes oder einer Untersuchung der Lymphknoten. Die Knochenmarkaspiration ist eine aufwendige, invasive und schmerzhafte Prozedur für den Patienten und eignet sich deswegen auch nicht gut zu ambulanten Nachkontrollen. Zudem birgt sie mehr Risiken als eine einfache Blutentnahme. Der *DTC*-Lymphknotenstatus kann erst postoperativ erstellt werden. Blutentnahmen in regelmäßigen Abständen als Routinenachsorge sind weder aufwendig noch schmerzhaft und dadurch praktikabler. Aus diesen Gründen wird sich zunehmend auf die Detektion von Tumorzellen aus dem peripheren Blut konzentriert.

2.5 Zirkulierende Tumorzellen und verschiedene Tumorentitäten

Mehrere Studien zu unterschiedlichen Tumorentitäten zeigen eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von *CTCs* und einem schlechten klinischen *Outcome* (Cohen *et al*., 2008; Cristofanilli, 2004; de Bono *et al.*, 2008; Hayesi *et al*., 2006; Rink *et al*., 2011; Riethdorf *et al*., 2007). Beispielsweise bei Brustkrebspatienten ging der alleinige Fund einer einzelnen *CTC* mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko einher (Bidard *et al.*, 2010). *CTCs* werden bei einigen Tumoren (zum Beispiel metastasierten Mamma-, Prostata- und Kolorektalkarzinomen) bereits zur erweiterten Diagnostik sowie zum Therapiemonitoring eingesetzt (Cristofanilli, 2004; de Bono *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009). Ob *CTCs* zukünftig auch Anwendung beim Ösophaguskarzinom finden könnten, soll in dieser Arbeit untersucht werden. Genetische und phänotypische Eigenschaften dieser Zellen können verschieden vom Ursprungstumor sein und bieten somit einen neuen Therapieansatz. Zum Beispiel hat man bei Mammakarzinom-Patienten mit einem *HER*2neu (Englisch: human epidermal growth factor receptor 2) -negativen Primärtumor *HER*2neu-positive *CTCs* gefunden (Klaus Pantel and Alix-Panabières, 2010; Riethdorf *et al*., 2010). Dieser überraschende Fund öffnet ein neues Spektrum von Therapieansätzen. Zusammenfassend kann gesagt werden: *CTCs* sind im Blut von Krebspatienten detektierbar und ihre klinische Relevanz hat sich bei verschiedenen epithelialen Tumoren beim Mamma-, Prostata-, Lungen- und Kolonrektalkarzinom bestätigt (Cristofanilli, 2004; Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008; Krebs *et al.*, 2011).

2.5.1 Die prognostische Relevanz von *CTCs* bei Ösophaguskarzinompatienten

CTCs konnten auch in gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden (Allard *et al.*, 2004). Wenige Studien wurden zu diesem Thema bisher durchgeführt. Sie unterscheiden sich allesamt im Studiendesign und sind deswegen schwer zu vergleichen (Eliasova *et al.*, 2013). Trotz Unterschieden weisen sie auf eine klinische Relevanz, sowie einige von ihnen auf eine prognostische Bedeutsamkeit der *CTCs* hin (Tabellen 3 und 4).

Tabelle 3 Prognostische Relevanz von *CTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom (1)

Studie	**Kaganoi et al.**	**Hiarawa et al.**	**Tanaka et al.**	**Yin et al.**
Jahr	2004	2008	2010	2012
Patientenzahl	70	38	244	72
Diagnose	*ESCC*	*ESCC*	*ESCC*	*ESCC*
Methode	RT-PCR (*SCCA* mRNS)	*CellSearch* (≥ 2 *CTCs*)	RT-PCR (*CEA* mRNS/ *SCC* mRNS)	RT-PCR *CEA*, *CK*19, Survivin

Zeitpunkt BE	Bei Aufnahme, präoperativ, intraoperativ, postoperativ	Präoperativ, postoperativ	Präoperativ, intraoperativ	Vor und nach Radiotherapie
Rate *CTC*	33 % bei Aufnahme	21,7 %	13,9% präoperativ 16,8% intraoperativ	38,9-54,2 %
Klinisch-pathologische Parameter	*SCCA* mRNS bei Aufnahme und T-Stadium, Veneninvasion	*CTC* und Pleuralkarzinose	*CTC*-Status intraoperativ und LK-Metastastasen sowie Lymphinvasion	*CTC* und LK-Metastasen
PFS	Signifikant kürzer (UV)	/	Signifikant kürzer für *CTC*-Status intraoperativ (MV)	Signifikant kürzer (UV)
OS	Signifikant kürzer (UV)	Signifikant kürzer für Pat. mit metastasiertem Ösophagus-Karzinom. und ≥ 2 *CTC*	N.S.	/

K.A. Keine Angaben, N.S. Nicht signifikant, UV univariate Analyse, MV multivariate Analyse, *ESCC* (Englisch: *esophageal squamous cell carcinoma*) Plattenepithelkarzinom, SCCA (Englisch: *squamous cell carcinoma antigen)* Plattenepithelkarzinom-assoziiertes Antigen, BE Blutentnahme, *PFS* (Englisch: *progression free survival*) Progressionsfreies Überleben, *OS* (Englisch: *overall survival*) Gesamtüberleben, LK Lymphknoten

Tabelle 4 Prognostische Relevanz von *CTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom (2)

Studie	**Sclafani et al.**	**Matsushita et al.**	**Su et al.**
Jahr	2013	2015	2016
Patientenzahl	18	90	57
Diagnose	*AC* des Ösophagus, ösophagogastralen Übergangs sowie des Gastrums	*ESCC*	*ESCC*
Methode	*CellSearch*	*CellSearch*	Negativselektion und Durchflusszytometrie
Zeitpunkt BE	Vor Chemotherapie	Vor und nach Therapie (Chemo- oder Radiochemotherapie)	Vor palliativer Chemotherapie
Rate *CTC*	44 %	27,8 %	100 %

Klinisch-pathologische Parameter	K.A.	*CTC* und Metastasen	N.S	
PFS	N.S.	/	Signifikant (MV)	kürzer
OS	N.S.	Signifikant kürzer	Signifikant (MV)	kürzer

K.A. Keine Angaben, N.S. Nicht signifikant, UV univariate Analyse, MV multivariate Analyse, *ESCC* (Englisch: *esophageal squamous cell carcinoma*) Plattenepithelkarzinom, BE Blutentnahme, *PFS* (Englisch: *progression free survival*) Progressionsfreies Überleben, *OS* (Englisch: *overall survival*) Gesamtüberleben

Die Studie mit dem größten Patientenkollektiv wurde 2010 von Tanaka et al. durchgeführt. Sie untersuchten das Blut von 244 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus auf *CTCs* und deren Relevanz. Sie nutzten hierfür RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) und verwendeten *CEA*-Antigen (Carcioembryonales Antigen) und *SCC*-Antigen (Englisch: *squamous cell carcinoma*-Antigen) als Marker. Das Ergebnis galt als positiv, wenn mindestens ein Marker im Blut gefunden wurde. Die *CTC*-positive Gruppe hatte in der Überlebensanalyse eine signifikant höhere Rate an Rezidiven. Dies galt allerdings nur für die Blutabnahme nach der Operation. Sie schlussfolgerten somit, ein *CTC*-Status nach der Ösophagektomie sei ein guter Prädiktor für das Lokal- und Fernrezidivrisiko (Tanaka *et al.*, 2010). Kaganoi et al. führten eine ähnliche Studie durch. Sie untersuchten das Blut von 70 Patienten. Hierbei verwendeten sie auch RT-PCR zur Tumorzelldetektion. Positive Ergebnisse fanden sich bei 33 % der präoperativen Patienten und in der Überlebensanalyse zeigte sich für die *CTC*-positiven Patienten ein verkürztes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Kaganoi *et al.*, 2004). Ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom fanden auch Su et al., welche Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium vor Chemotherapie untersuchten (Su *et al.*, 2016). Auch Nakashima et al. konnten beobachten, dass es bei Patienten, welche *CTCs* im Blut hatten (prä-, intra- und postoperativ zusammengezählt), signifikant öfter zu einem Rezidiv, insbesondere zur Fernmetastasierung kam. Des Weiteren beobachteten sie eine vermehrte Aussaat der Tumorzellen zum Zeitpunkt der Operation (Nakashima *et al.*, 2003). Bestätigt wurde diese Beobachtung einige Jahre später von Liu et al., welche das Blut von 53 Ösophaguskarzinompatienten vor, während und nach der Operation auf *CTCs* untersuchten. Es fanden sich bei 60,4 % der Untersuchten zirkulierende Tumorzellen zum Zeitpunkt der Operation. Vor und nach dem Eingriff waren es 28,3 % und 42,9 %. Sie erstellten eine zusätzliche Variable welche sich aus dem Verhältnis der *CTC*-positiven Patienten 3 Tage nach der Operation zu den *CTC*-positiven Patienten direkt nach der Operation errechnet. So kamen sie zu dem Ergebnis, dass *CTCs* einen prädiktiven Aussagewert bezüglich der Entwicklung von Metastasen haben (Liu *et al.*, 2007). Koike et al. untersuchten 2002 das Blut von 43 Patienten mit Ösophaguskarzinom. Sie nutzten ebenfalls RT-PCR und Δ NP 63 als Marker. Sie fanden bei 17 von 33 (52 %) Patienten mit der Erstdiagnose Ösophaguskarzinom Δ NP 63 mRNS (Boten (englisch messenger)-Ribonukleinsäure) und sogar bei 6 von 10 (60 %) der Patienten mit Rezidiv eines Ösophaguskarzinoms. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und *CTCs*. Überlebensanalysen wurden nicht berechnet (Koike *et al.*, 2002). Bei fast allen vorangegangenen Studien wurde RT-PCR als Aufarbeitungsmethode

benutzt. Im Jahr 2008 bedienten sich Hiraiwa et al. einer anderen Methode. Mit dem *CellSearch*-System untersuchten sie das Blut von 130 Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, darunter 38 mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Dies war die erste Studie, die das *CellSearch*-System bei Ösophaguskarzinom-Patienten verwendete. Angelehnt an die Ergebnisse von Allard et al. definierten sie eine Blutprobe positiv, wenn sie mindestens 2 *CTCs* aufwies (Allard *et al.*, 2004). Fanden sich positive Ergebnisse bei Patienten mit einem bereits metastasierten Tumor des Gastrointestinaltraktes war das Überleben dieser Patienten in der multivariaten Überlebensanalyse signifikant schlechter. Ösophaguskarzinom-Patienten mit einem positiven Ergebnis wiesen signifikant häufiger eine Pleurakarzinose auf. In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich bei den Patienten mit metastasiertem Ösophaguskarzinom und positiven *CTC*-Status ebenfalls ein signifikant schlechteres Überleben (Hiraiwa *et al.*, 2008). Eine weitere Forschungsgruppe untersuchte das Blut von 22 Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Ösophagus oder Magens. Sie nutzte hierfür ebenfalls das *CellSearch*-System. Bei 44 % der Patienten fanden sich 2 *CTCs* und mehr im Blut. Diese Gruppe sprach schlechter auf die Chemotherapie an und zeigte eine kürzere Überlebenszeit (Sclafani *et al.*, 2013). Bei den letzten beiden Studien fallen jedoch die kleinen Patientenkohorten auf, welche die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Im Jahr 2015 untersuchten Matsushita et al. Patienten mit Ösophaguskarzinom, welche eine Chemo- oder Radiochemotherapie erhielten. Das Gesamtüberleben war signifikant kürzer bei *CTC*-positiven Patienten (Matsushita *et al.*, 2015). Yin et al. zeigten, dass der *CTC*-Status von Patienten mit Plattenepithelkarzinom nach Bestrahlung ein vielversprechender Prognosefaktor sein könnte (Yin *et al.*, 2012). Es existiert bisher keine Studie über den Vergleich der Anreicherung von Tumorzellen durch verschiedene immunomagnetische Methoden bei einem Patientenkollektiv mit Ösophaguskarzinom.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *CTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom durch verschiedene Methoden nachweisbar sind. In einigen Studien konnte eine prognostische Relevanz für *CTCs* nachgewiesen werden (Kaganoi *et al.*, 2004; Hiraiwa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010; Matsushita *et al.*, 2015). Andere Forscher konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Sclafani *et al.*, 2013). In der Mehrheit der Studien wurde PCR als Methode verwendet und es finden sich nur wenige Studien, welche *CellSearch* verwendet haben. Die Fallzahlen von zwei der Studien, die sich der *CellSearch*-Methode bedient haben, sind gering und deswegen nur bedingt aussagekräftig (Hiraiwa *et al.*, 2008; Sclafani *et al.*, 2013). Lediglich Matsushita et al. untersuchten ein größeres Kollektiv (Matsushita *et al.*, 2015). Nur eine Arbeit untersuchte die Bedeutung der *CTCs* beim Adenokarzinom des Ösophagus (Sclafani *et al.*, 2013). In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob sich die Ergebnisse in einem größer angelegten Studiendesign bestätigen lassen.

2.6 Aufarbeitungsmethoden für zirkulierende Tumorzellen

Wie bereits beschrieben sind bildgebende Verfahren, welche heutzutage in der klinischen Standarddiagnostik eingesetzt werden, trotz hoher Auflösung nicht in der Lage einzelne Tumorzellen darzustellen. Somit entziehen sie sich dem aktuellen klinischen Routine-*Staging*. Da Patienten in frühen Tumorstadien oft weniger als 5 *CTCs* pro 10 ml Blut haben, ist deren Detektion aufgrund der geringen *CTC*-Anzahl zusätzlich erschwert. Deswegen werden sensitive und spezifische Aufarbeitungsmethoden benötigt (Abbildung 6). Diese Methoden müssen auf Merkmalen basieren, welche die Tumorzellen von den restlichen Blutzellen unterscheiden (Pantel *et al.*, 2009). Für den Nachweis der Tumorzellen wird meist eine Kombination aus Anreicherungs- und Detektionsmethode verwendet. Es gibt mehrere *CTC*-Anreicherungsmethoden, welche auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen. Zu diesen gehören unter anderem die physikalische Separation der Zellen anhand der Zellgröße oder Dichte, die Anreicherung über spezielle Antikörper, oder PCR-basierte Methoden (Pantel and Alix-

Panabières, 2010).
In dieser Arbeit soll es um die Anreicherung von Tumorzellen anhand von immunomagnetischer Separation gehen. Hierfür werden die Oberflächenstrukturen der Zellen genutzt. Erkannt werden diese von spezifischen Antikörpern, welche mit Eisenpartikeln gekoppelt sind und somit nach Antigen-Antikörperbindung magnetisch separiert werden können. Man unterscheidet dabei eine Positivselektion, bei der die Tumorzellen anhand von Strukturen angereichert werden, die sie von anderen Blutzellen unterscheiden und eine Negativselektion, bei der man „Nicht-Tumorzellen" identifiziert und aus der Probe selektiert. Verwendet wird bei der Negativselektion zum Beispiel ein Antikörper gegen den CD45-Rezeptor. Dieser ist eine Tyrosinphosphatase, welche auf Leukozyten exprimiert und für die Immunantwort benötigt wird. Auf epithelialen Tumorzellen ist der Rezeptor nicht vorhanden. Bei den Oberflächenmarkern zur Positivselektion handelt es sich häufig um *EpCAM* (Englisch: *epithelial cell adhesion molecule*) und Zytokeratine (Englisch: *cytokeratin*, kurz: *CKs*). Die meisten Zellen epithelialer Tumore exprimieren *CKs* und können somit von anti-*CK*-Antikörpern markiert werden (Heatley *et al*., 1995). *EpCAM* ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf malignen und gutartigen Epithelzellen exprimiert wird. Epithelzellen kommen normalerweise nicht im Blut vor. Somit können durch *EpCAM*-Antikörper die *EpCAM*-positiven Tumorzellen aus dem Blut selektiert werden (Went *et al.*, 2004). Auch bei Ösophaguskarzinomzellen wurde *EpCAM* nachgewiesen (Hiraiwa *et al.*, 2008). Mehrere Studien haben belegt, dass die über *EpCAM* angereicherten Tumorzellen mit der Krankheitsprognose korrelieren (Cristofanilli, 2004; Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008).

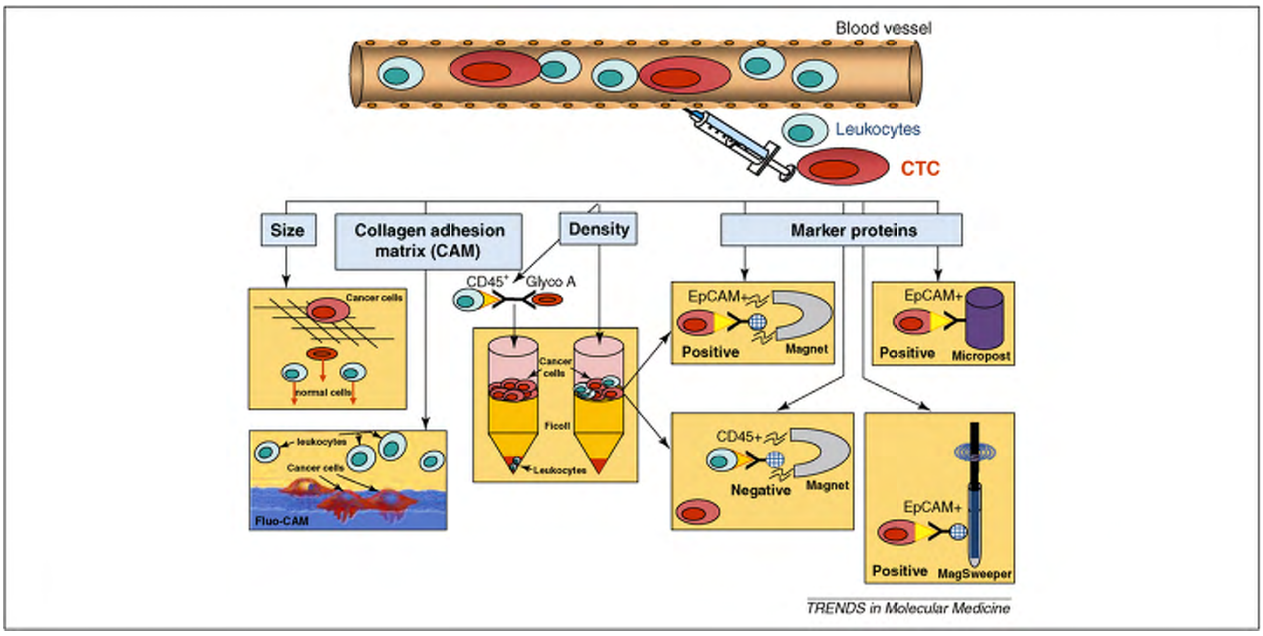

Abbildung 6 ***Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives*****. Klaus Pantel und Catherine Alix-Panabieres 2010**

2.6.1 Das *CellSearch*-System und die Detektion von *CTCs*

Das *CellSearch*™-System (Abbildung 7) ist das erste und bisher einzige standardisierte, halbautomatische und von der *FDA*-zertifizierte System zur Detektion von *CTCs*. Die Zulassung gilt bisher nur für Patienten mit metastasiertem Brust-, Prostata- oder Kolorektalkarzinom. Die Technik besteht aus dem *CellTracks® AutoPrep®* System und dem *CellTracks Analyzer II®* oder *CellSpotter® Analyzer*. Die Auslese der Tumorzellen aus dem peripheren Blut basiert bei dieser Methode auf einer Positivselektion anhand von Ferrofluid-markierten *EpCAM*-Antikörpern, mit denen die *EpCAM*-exprimierenden Zellen magnetisch aus der Probe separiert werden. Identifiziert werden die Tumorzellen anschließend über eine

Fluoreszenzfärbung. Verwendet werden anti-*CK*-Antikörper, welche spezifisch für Epithelzell-typische Zytokeratine sind, DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol), um den Zellkern sichtbar zu machen und anti-CD45-Antikörper, welche Leukozyten färben. Die Kriterien für ein positives Ergebnis sind, dass die Zelle *EpCAM*-positiv, *CK*-positiv, CD45-negativ ist und einen durch DAPI -gefärbten Zellkern hat (CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use. Janssen Diagnostics, LLC.). Im Jahr 2004 führten Cristofanilli et al. eine prospektive Studie an 177 Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom durch. Den Patienten wurde zu zwei Zeitpunkten Blut abgenommen: vor Beginn der Therapie und zum ersten *Follow-Up (kurz: FUP)*. Anhand der Ergebnisse bildeten sie zwei Kohorten. Eine hatte ≥ 5 *CTCs* pro Blutprobe und die andere < 5 *CTCs*. Für die erste Gruppe zeigte sich ein signifikant kürzeres progressions-freies Überleben sowie Gesamtüberleben. In der multivariaten Cox-Regressions-Analyse zeigte sich zu beiden Zeitpunkten das Vorhandensein der *CTCs* als signifikantester Prädiktor für verringertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Cristofanilli, 2004). Äquivalent aussagekräftige Studien gibt es für das metastasierte Kolorektalkarzinom (Cohen *et al.*, 2008) und das metastasierte Prostatakarzinom (de Bono *et al.*, 2008).

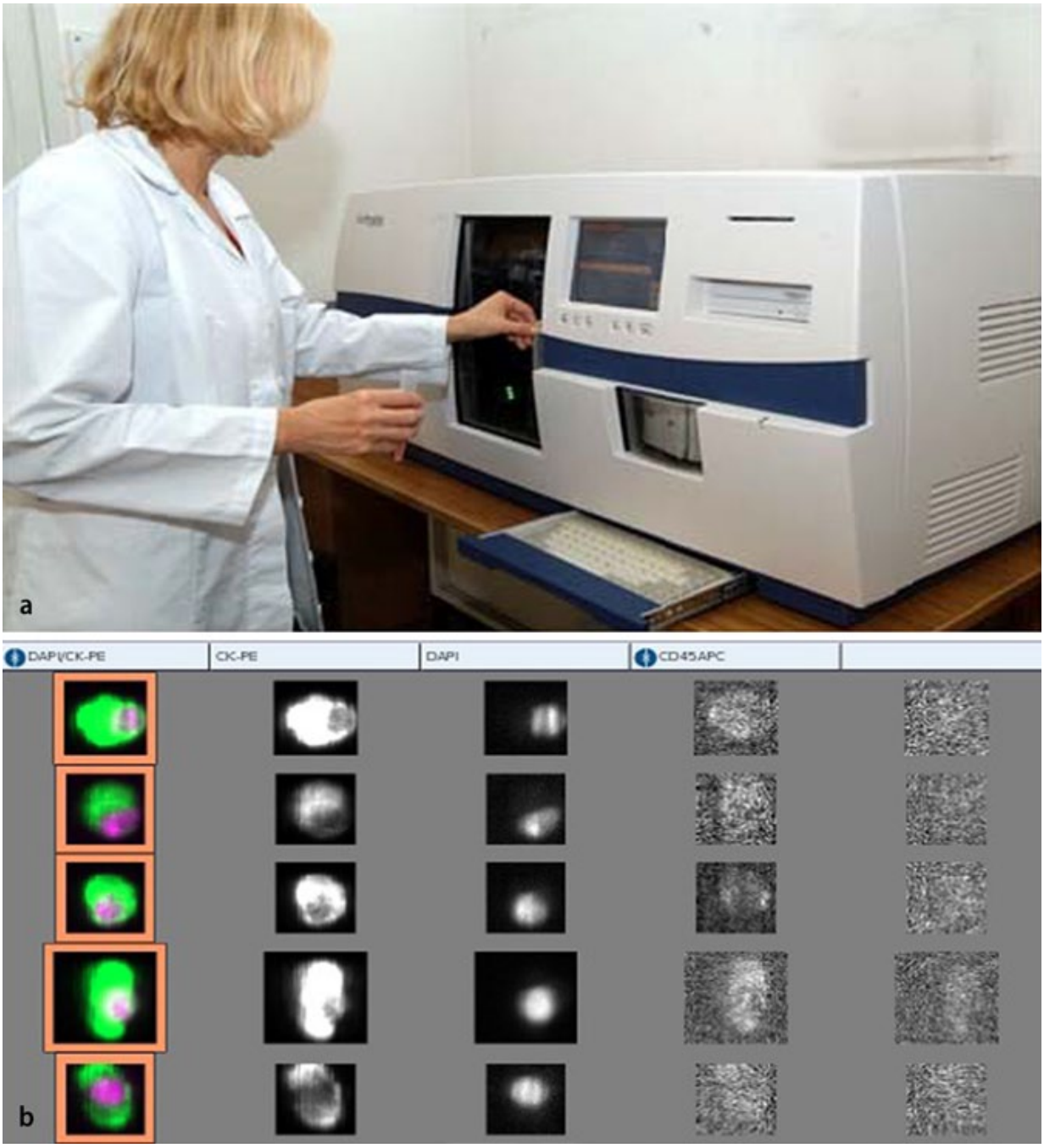

Abbildung 7 Teil a: CellTracks®, AutoPrep®-System ; Teil b positiver Fund einer *CTC* (Zirkulierende Zellen beim Mammakarzinom, B.Jäger, F.Schochter, C.Scholz, W. Janni 2013)

Zusätzlich bietet das *CellSearch*-System die Möglichkeit der Tumorzellisolierung und -charakterisierung. Auf den Zellen kann zum Beispiel der *HER*2-Status bestimmt werden. Dieser könnte wiederum in der Zukunft therapeutische Konsequenzen haben, wie zurzeit in der DETECT III Studie überprüft wird (DETECT Studiengruppe).

2.6.2 Die manuelle Aufarbeitung mit anschließender Ariol-Auswertung

Im Jahr 2008 erschien eine Arbeit, welche drei Aufarbeitungsmethoden verglich: das *CellSearch*-System, eine manuelle *CTC*-Anreicherung alleinig mit anti-*CK*-Antikörpern und eine Anreicherung mit anti-*CK*-Antikörpern sowie anti-*EpCAM*-Antikörpern. Ausgewertet wurden die letzten beiden Vergleichsmethoden mit dem Ariol-System. Deng et al. fanden signifikant mehr *CTCs* mit der doppelten Antikörper-Anreicherung als mit der *CellSearch*-

Methode. Daraus schlossen sie, eine Anreicherung der Tumorzellen nicht nur mit *EpCAM*- sondern zusätzlich mit *CK*-Antikörpern würde die Ausbeute der Tumorzellen beim metastasierten Mammakarzinom erhöhen (Deng *et al.*, 2008).
In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Vergleich zwischen der *CellSearch*-Methode und einer manuellen Aufarbeitung des Blutes unter Verwendung von sowohl anti-*CK*-Antikörpern als auch anti-*EpCAM*-Antikörpern und anschließender Auswertung mit dem Ariol-System aufgestellt. Die wesentlichen Unterschiede der beiden Methoden sind, dass bei der *CellSearch*-Methode mit einem und bei der Ariol-Methode mit zwei Antikörpern angereichert wird. Zudem gibt es bei der Ariol-Methode mehr manuell durchgeführte Schritte. Es wird die komplette Anreicherung der Tumorzellen und die sich anschließende Färbung der Objektträger nicht von einem Gerät, sondern per Hand nach einem einheitlichen Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt der manuellen Aufarbeitung findet eine Positivselektion statt. Hierbei werden Zellen, welche *CKs* und/oder *EpCAM* exprimieren, von den Ferrofluid-Antikörpern markiert und anschließend magnetisch separiert. Im zweiten Arbeitsschritt folgt eine immunzytochemische Färbung mit Fluoreszenz-Antikörpern und dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Sichtbar werden hiermit vorhandene *CKs*, CD45 und der Nucleus. Die manuell gefärbten Objektträger werden von dem Ariol automatisch ausgewertet. Ist dieser Vorgang abgeschlossen können die *CTC*-verdächtigen Funde auf dem Monitor betrachtet, klassifiziert und mikroskopisch verifiziert werden. Die Objektträger sind nun digitalisiert und gespeichert. Bei der Auswertung gelten die gleichen Kriterien wie für die *CellSearch*-Auswertung. Es wird auf die Morphologie der Tumorzellen geachtet. Sie müssen oval oder rund sein (siehe Abbildung 8) und einen intakten Zellkern (siehe Abbildung 12) aufweisen. Weitere Kriterien zur Identifikation der Tumorzellen sind ein positives Färbungsergebnis für *CK* (siehe Abbildung 10) und ein negatives für den CD45-Rezeptor (siehe Abbildung 11). Die Kriterien für eine *CTC* sind also ebenfalls, dass die Zelle *EpCAM*-positiv und/oder *CK*-positiv, CD45-negativ ist und einen durch DAPI gefärbten Zellkern hat (siehe Abbildung 9). Im Abschnitt „Material und Methoden“ (3.3.1.) wird detaillierter auf die einzelnen Arbeitsschritte eingegangen. Da Tumorzellen heterogen sind und verschieden starke Expressionen von Oberflächenmarkern wie *EpCAM* und *CKs* aufweisen, wird davon ausgegangen durch die manuelle Methode eine größere Ausbeute an *CTCs* zu erlangen. Durch die im Vergleich zur *CellSearch*-Methode erweiterte Anreicherung besteht mit der Ariol-Methode die Möglichkeit, Tumorzellen vom Typ *CK*+/*EpCAM*+, *CK*+/*EpCAM*-/*low*, und *CK*-/*low*/*EpCAM*+ zu detektieren. Tabelle 5 stellt die Unterschiede zwischen den Methoden vereinfacht dar.

Tabelle 5 Vergleich zwischen der *CellSearch*- und der Ariol-Methode

	Manuelle Aufarbeitung	***CellSearch***
***Catcher* Antikörper**	anti-*EpCAM*-AK anti-*CK*-AK	anti-*EpCAM*-AK
Detektierbare Tumorzellphänotypen	*CK*+& *EpCAM*+ *CK*+& *EpCAM*-/low *CK*-/low& *EpCAM* +	*EpCAM*+
Durchführung	halbautomatisiert	automatisiert
Auswertung	Ariol	*Celltracker*
Zulassung durch *FDA*	nein	Metastasiertes Mamma-, Prostata- und Kolorektal-Karzinom
Standardisierte Aufarbeitungsschritte	Aufarbeitung nein, Auswertung ja	ja
Laborunabhängige Reproduzierbarkeit	bisher nicht untersucht	ja

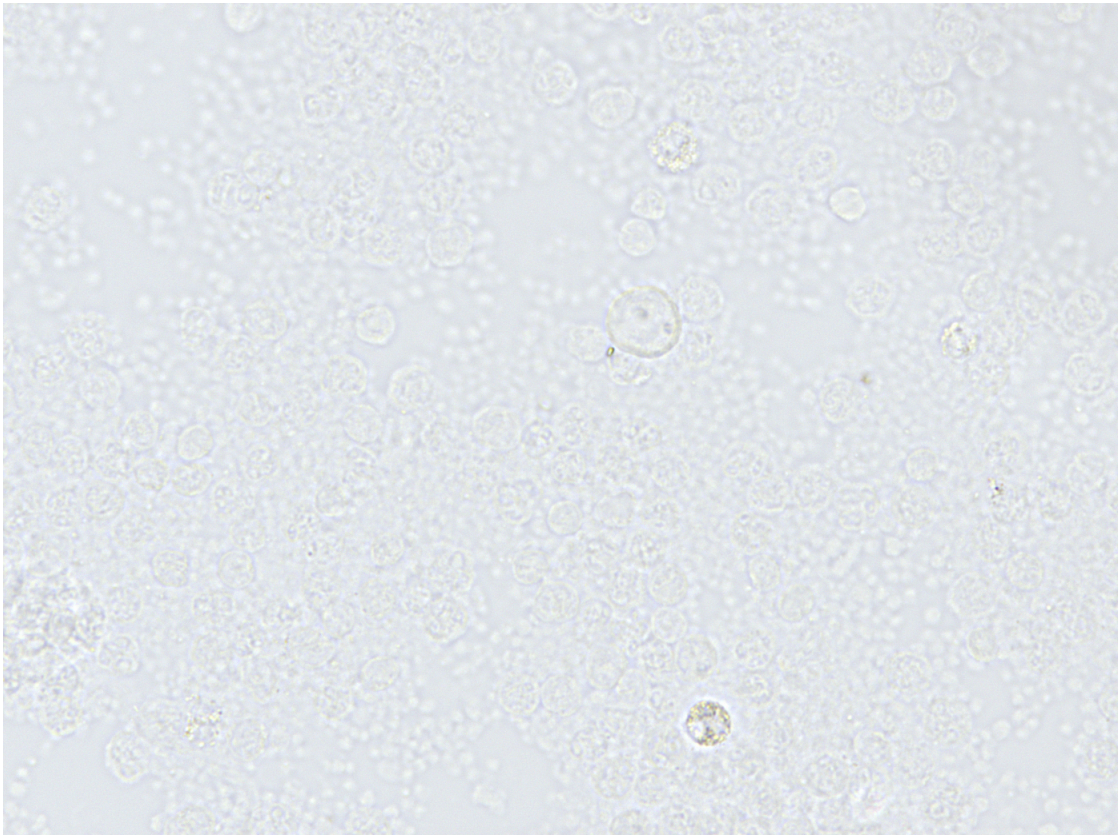

Abbildung 8 *CTC* Nativbild im Ariol-Durchlicht-Kanal

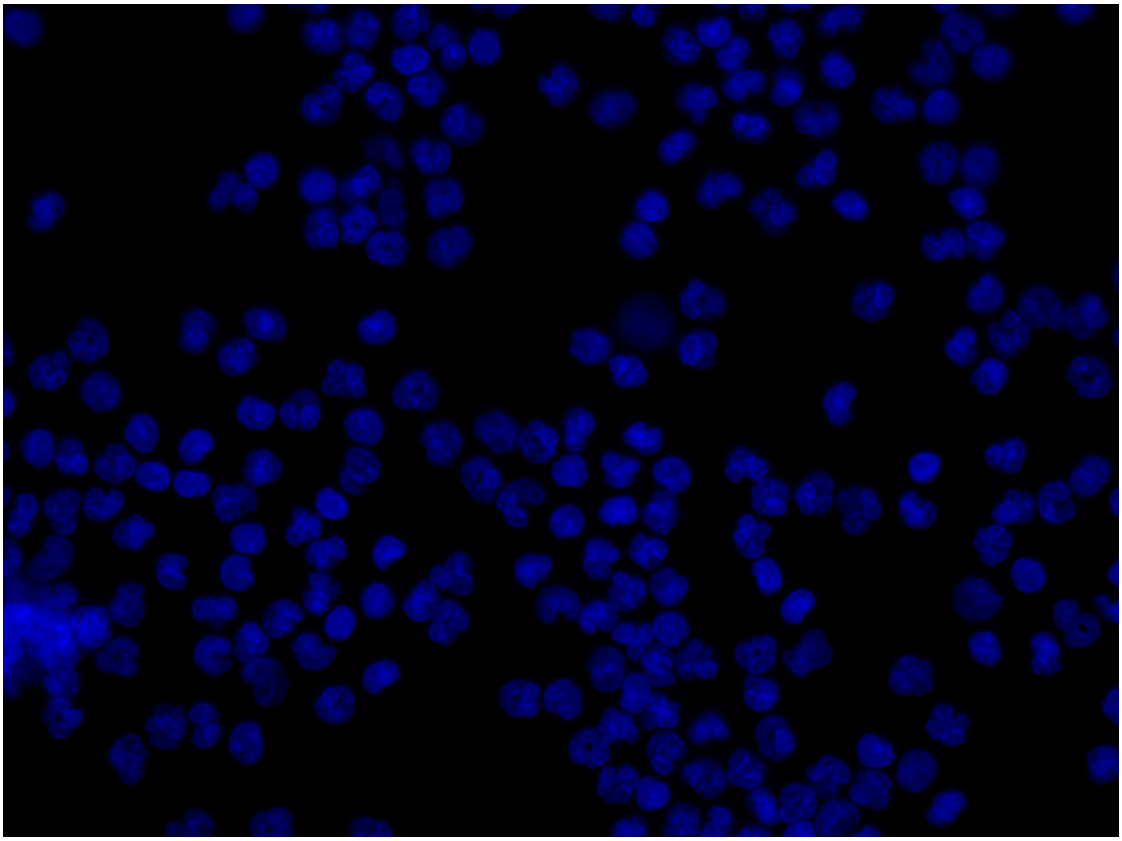

Abbildung 9 *CTC* im Ariol-DAPI-Kanal

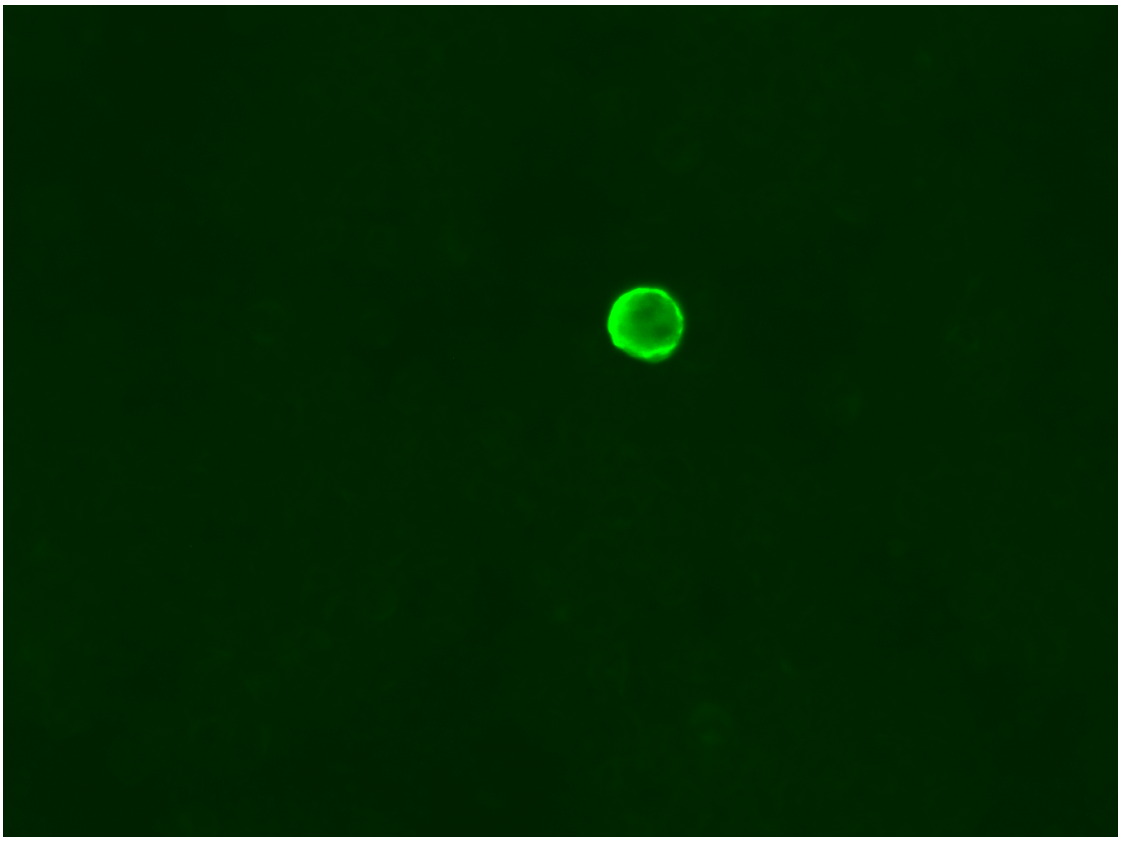

Abbildung 10 *CTC* im Ariol-FITC-Kanal

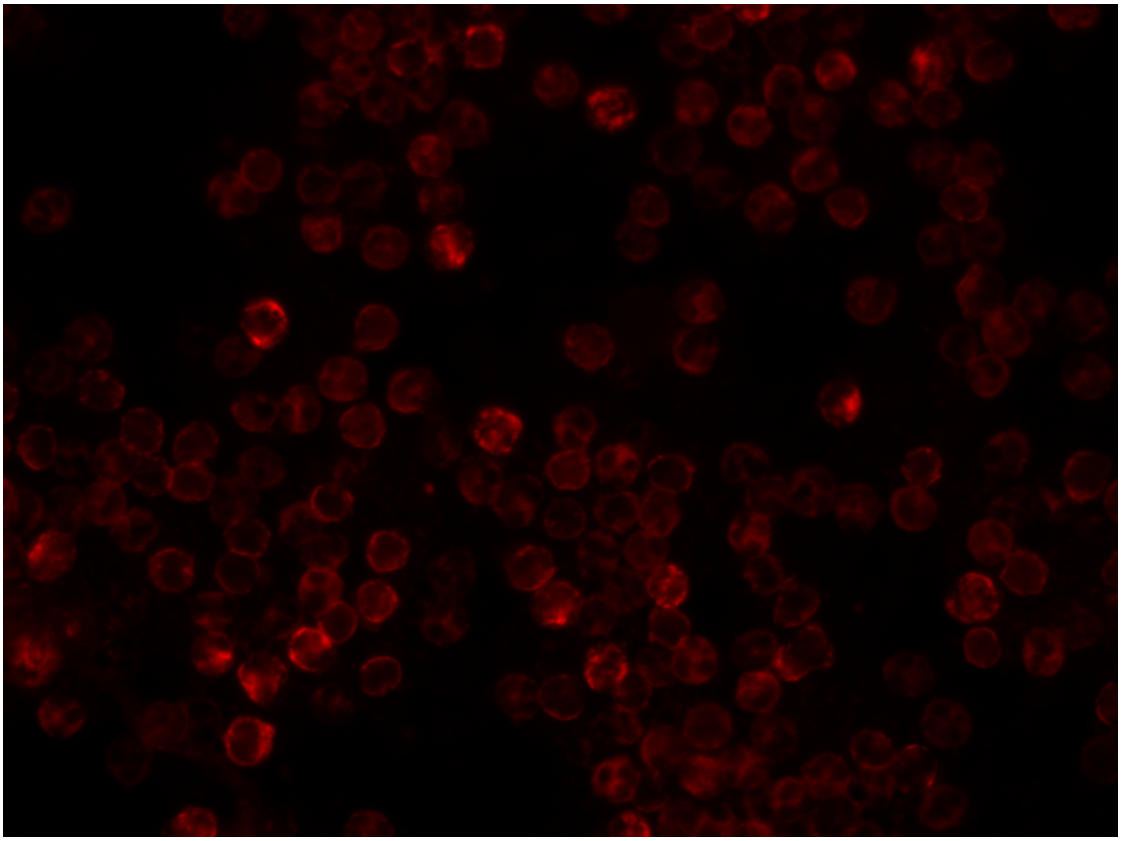

Abbildung 11 *CTC* im Ariol-TexasRed-Kanal

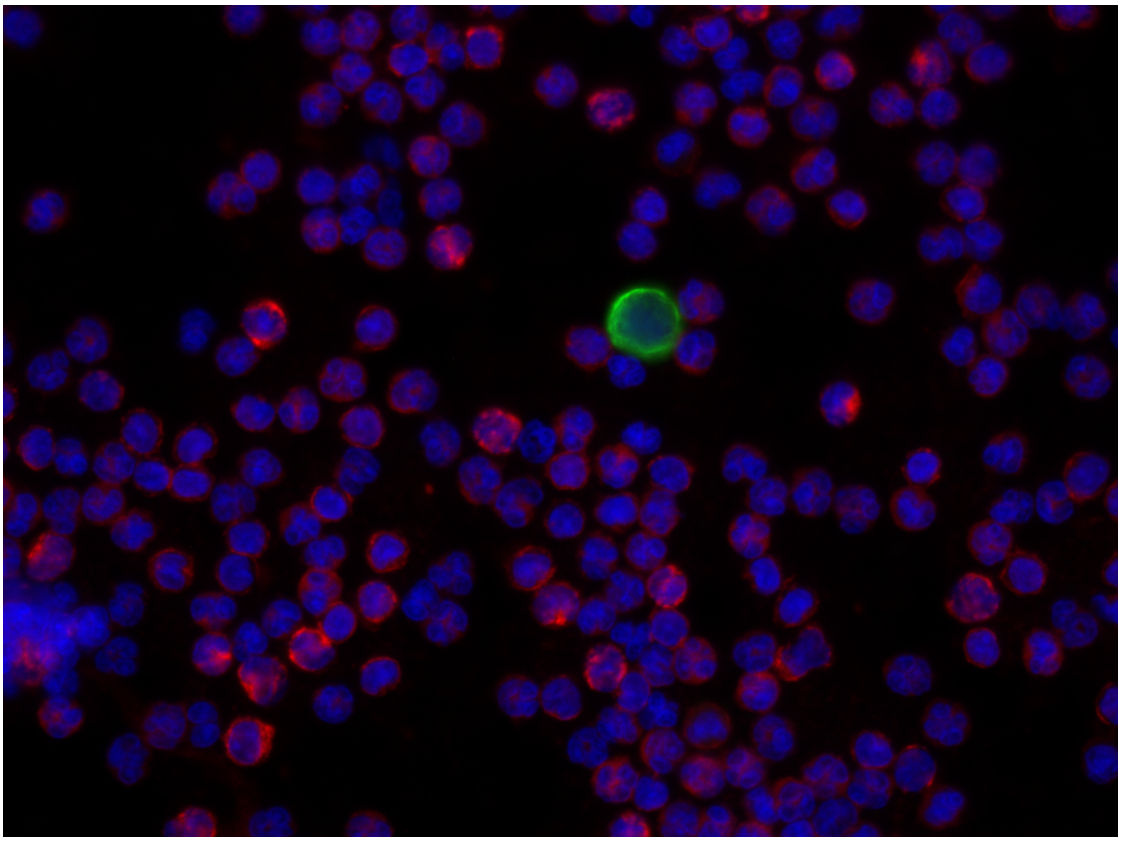

Abbildung 12 *CTC* im Ariol-Komposit-Bild

2.7 Klinische Anwendung und Forschung

Zirkulierende Tumorzellen bieten Möglichkeiten für neue Therapieansätze. Da *CTCs* anscheinend oft mitotisch nicht aktiv sind und somit Chemotherapeutika entgehen können (Müller *et al*., 2005; Pantel *et al*., 1993), verspricht man sich von neuen Ansätzen wie Antikörpertherapien eine Verbesserung der bisherigen Therapiemöglichkeiten. Eine Antigen-Antikörper-Bindung funktioniert nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und völlig unabhängig von der Proliferationsaktivität der Zelle. So könnten potentiell auch die schlafenden Tumorzellen eradiziert werden. Zudem sind Tumorzellen in der Lage, die *MHC*-Klasse-I-Moleküle (Englisch: *major histocompatibility*) herunter zu regeln, dadurch können sie der Immunabwehr des Körpers leichter entgehen (Izbicki *et al*., 1997). Durch die Markierung mit dem Antikörper wird die Zelle jedoch wieder angreifbar und kann von der körpereigenen Abwehr beseitigt werden. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen mit dem Antikörper Rituximab. Durch eine Bindung an das CD20-Antigen auf B-Lymphozyten können die Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt und beseitigt werden. Antikörper können auch verwendet werden um die Signaltransduktion, z.B. wachstumsrelevante Rezeptoren, zu blockieren. Grundvoraussetzung für Antikörpertherapien im Allgemeinen sind spezifische Zielstrukturen. Eine solche Struktur steht schon einige Zeit im Mittelpunkt der Tumorzellforschung. Gemeint ist der *HER2*-Rezeptor. *HER2* ist eine Tyrosinkinase und gehört zu der *EGF*-Rezeptor-Familie (Englisch: *epidermal growth factor*). Es handelt sich um ein sogenanntes Protoonkogen, was bedeutet, eine Mutation in diesem Gen kann zur unkontrollierten Proliferation von Zellen und damit zur Tumorentstehung führen. Eine Überexpression von *HER2* in manchen Mammatumoren ist schon seit vielen Jahren bekannt (Slamon *et al.*, 1989). Dank dieser Erkenntnis konnte für einen Teil der Mammakarzinompatienten, welcher einen *HER2*-positiven Ursprungstumor hat, eine erfolgreiche Therapie mit dem *HER2*-Antikörper (Trastuzumab) angewendet werden. Der Antikörper bindet an den *HER2* und verhindert die Weiterleitung von Wachstumssignalen.
Nach diesem Erfolg wurde nicht nur auf anderen Tumoren sondern auch auf *CTCs* und *DTCs* nach einer *HER2*-Überexpression gesucht. Das Ergebnis war überraschend. Auch auf *CTC*/*DTC* konnte eine *HER2*-Überexpression nachgewiesen werden, obwohl zum Teil sogar der Primärtumor *HER2*-negativ war (Solomayer *et al.*, 2006; Riethdorf *et al.*, 2010). Somit könnten vielleicht auch Tumorpatienten mit *HER2*-negativem Primärtumor von einer Trastuzumab-Therapie profitieren. Diesem Sachverhalt wird in der *TREAT*-*CTC*-Studie nachgegangen. Hier bekommen Brustkrebspatienten, bei denen *CTCs* im Blut gefunden wurden und die einen HER2-negativen Primärtumor haben, eine adjuvante Therapie mit Trastuzumab. Die *CTCs* werden dabei nicht auf *HER2* getestet.
Bei der multizentrischen *DETECT*-III-Studie werden metastasierte Patienten mit *HER2*-negativem Primärtumor aber *HER2*-positiven *CTCs* mit Lapatinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, therapiert. Ziel ist es, die Wirksamkeit dieser Therapie zu evaluieren. Eine deutschlandweite multizentrische, einarmige Phase-II-Studie (*Detect* IV) ist angelaufen, welche in einem Studien-Arm bei Patienten mit Hormonrezeptor-positivem, *HER*2-negativem metastasiertem Mammakarzinom und *HER2*-negativen *CTCs* die Wirksamkeit von Everolimus plus eine endokrine Standardtherapie testet. Ein zweiter Studien-Arm ist ebenfalls geplant. Bei den genannten *DETECT*-Studien sind die Therapieentscheidungen von den Eigenschaften der *CTCs* abhängig. Auch bei Ösophaguskarzinompatienten gab es schon eine Untersuchung zu dieser Thematik. Stoecklein et al. zeigten, dass eine *HER2*-neu Genamplifikation nur dann einen prognostischen Wert hatte, wenn sie auf den *DTCs* zu finden war. Welchen *HER2*-Status der Primärtumor hatte war in dieser Studie nicht von Relevanz (Stoecklein *et al.*, 2008). Es wird auch geprüft, ob man durch die wiederholte Bestimmung von *CTCs* Therapieansprechen und -monitoring überprüfen kann. In den USA lief eine Studie der *Southwest Oncology Group*, welche die *CTC*-Anzahl bei Patienten nach

drei Wochen Chemotherapie überprüft. Findet sich eine erhöhte Anzahl von *CTCs* wird die Chemotherapie umgestellt. Normalerweise würde man das Therapiemanagement erst umstellen, wenn ein Fortschreiten der Erkrankung in der Bildgebung sichtbar wird. Die Forschungsgruppe wollte herausfinden, ob eine frühzeitigere Therapieumstellung bei erhöhter *CTC*-Zahl eine Auswirkung auf den folgenden Krankheitsverlauf hat (*SWOG*-S0500). Zwar erwies sich der *CTC*-Status als prognostischer Faktor, jedoch verbesserte sich das Überleben der Patienten mit erhöhten *CTCs* trotz Chemotherapie-Umstellung nicht. Sie schlussfolgerten, dass für diese Patientengruppe die Standardtherapien nicht ausreichend seien (Smerage *et al.*, 2014). Im palliativen Therapiemanagement zeigten sich *CTCs* als Surrogatmarker bezüglich der Therapiewirksamkeit (Hayes *et al.*, 2006).

2.8 Ziele

Für verschiedene epitheliale Tumore, wie zum Beispiel das Mammakarzinom, hat sich die Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut als wertvoller prognostischer Marker bewiesen. Bisher existiert keine Arbeit, welche durch manuelle immunomagnetische Anreicherung und anschließende immunzytochemische Färbung gefundene Tumorzellen bei Ösophaguskarzinompatienten im frühen Krankheitsstadium auf ihre prognostische Relevanz untersucht. Auch die Bedeutung dieser Zellen in der Metastasierungskaskade ist nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Dissertation ist es herauszufinden, ob auf diese Weise detektierte zirkulierende Tumorzellen bei Patienten mit Ösophaguskarzinom im frühen Krankheitsstadium einen prognostischen Stellenwert haben.
Zirkulierende Tumorzellen könnten in Zukunft beim Ösophaguskarzinom einen vielversprechenden Biomarker darstellen.
Bestätigt sich in dieser und weiterführenden Studien durch Überlebensanalysen eine klinische Aussagekraft der *CTCs*, gäbe es die Möglichkeit, eine genauere Abschätzung als bisher bezüglich der Krankheitsprogression und Metastasenbildung zu treffen und damit bisher nicht erkennbare Risikopatienten zu identifizieren. Adjuvante und neoadjuvante Therapien könnten auf ihre Wirksamkeit überprüft und gegebenenfalls umgestellt werden. Dies könnte zu einer bedeutenden Entscheidungshilfe in der Therapieplanung und -monotoring werden. Die Tumorzellen könnten auf Multiresistenzen überprüft werden, und durch neue Zielstrukturen auf den *CTCs* könnte die Therapie erweitert und optimiert werden.
Ein weiteres Ziel ist es zu prüfen, ob eine Aufarbeitungsmethode mit zusätzlichem *Catcher*-Antikörper einer Methode mit nur einem *Catcher*-Antikörper überlegen ist.

3 Material und Methoden

3.1 Die Studie

Die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg hat diese Studie und die im Rahmen selbiger durchgeführten Blutentnahmen an den teilnehmenden Patienten genehmigt.
Vor der Blutentnahme wurden alle Teilnehmer von einem ärztlichen Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf über die Studie aufgeklärt und gaben schriftlich sowohl ihr Einverständnis zur Teilnahme als auch zur Verwendung ihrer anonymisierten Daten zu Forschungszwecken.
Es wurde das Blut von insgesamt 122 Patienten mit Ösophaguskarzinom gesammelt, welche sich im Zeitraum von März 2010 bis Juli 2012 zur geplanten Ösophagektomie in der Universitätsklinik vorstellten. Der Zeitpunkt der Blutentnahme war ein Tag vor der Operation.
In den Monaten von März 2010 bis März 2011 wurde die Laborarbeit und Auswertung des Materials durch Dr. med. Matthias Reeh im Institut für Tumorbiologie, Arbeitsgruppe Effenberger, begonnen (69 Patienten). Im April 2011 wurde ich in die Forschungsgruppe aufgenommen und führte nach Erlernen der Techniken die Laborarbeit bis Juli 2012 weiter.
Dreimonatlich wurde mit Hilfe der Einwohnermeldeämter, Hausärzte und unserer chirurgischen Poliklinik eine Katamnese durchgeführt.

3.2 Das Patientenkollektiv

Von den insgesamt gesammelten 122 Proben wurden drei Patienten aufgrund anderer postoperativer Diagnosen (1 Patient mit malignem Melanom, 2 Patienten mit Barettösophagus) ausgeschlossen. Von den übrigen 119 Patienten waren 24 Patienten (20,2 %) weiblich und 95 (79,8 %) männlich. Das durchschnittliche Alter eines Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme betrug 64,2 Jahre.
Bei fünf Patienten wurde aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums gegen eine Ösophagektomie entschieden.
Aus den Patientenakten ließ sich entnehmen, dass 11 der Teilnehmer in ihrer Vergangenheit an einem Zweitkarzinom anderer Entität litten.
Es wurden die für die siebte TNM-Klassifikation benötigten Daten wie Tumoreindringtiefe, Lymphknotenstatus und Metastasierung erhoben, aus denen sich das UICC-Stadium ergibt.
Zusätzlich wurden die Histologie des Tumors, der Differenzierungsgrad der Tumorzellen, die Lymphinvasion, die Veneninvasion, sowie die Beschaffenheit der Resektionsränder dokumentiert. Die Histologie ergab bei 84 (70,6 %) Patienten ein Adenokarzinom, bei 31 (26,1 %) ein Plattenepithelkarzinom, 2 (1,7 %) Patienten hatten ein anaplastisches Karzinom und 2 (1,7 %) Patienten ein Karzinom, welches sowohl Adeno- als auch Plattenepithelanteile besaß. Der komplette Datensatz ist zur Übersichtlichkeit in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Darstellung der histopathologischen Parameter für das gesamte Patientenkollektiv

Charakteristik	Anzahl der Fälle	Gültige Prozente
Geschlecht		
- gesamt	119	100 %
- männlich	95	79,8 %
- weiblich	24	20,2 %

Histologie		
- gesamt	119	100 %
- Adenokarzinom (*AC*)	84	70,6 %
- Plattenepithelkarzinom (*SCC*)	31	26,1 %
- gemischt *AC/SCC*	2	1,7 %
- anaplastisch	2	1,7 %
- fehlend	0	0,0 %
Tumoreindringtiefe (T)		
- gesamt	119	100 %
- TIS	2	1,7 %
- 1a	8	6,7 %
- 1b	20	16,8 %
- 1 (nicht näher klassifiziert)	1	0,8 %
- 2	22	18,5 %
- 3	50	42,0 %
- 4a	9	7,6 %
- 4b	4	3,4 %
- 4 (nicht näher klassifiziert)	2	1,7 %
- fehlend	1	0,8 %
Lymphknotenstatus (N)		
- gesamt	119	100 %
- 0	52	43,7 %
- 1	25	21,0 %
- 2	17	14,3 %
- 3	21	17,6 %
- fehlend	4	3,4 %
Metastasierung (M)		
- gesamt	119	100 %
- 0	111	93,3 %
- 1	7	5,9 %
- fehlend	1	0,8 %
Differenzierungsgrad (G)		
- gesamt	119	100 %
- 1	13	10,9 %
- 2	46	38,7 %
- 3	47	39,5 %
- 4	3	2,5 %
- 1-2	1	0,8 %
- 2-3	9	7,6 %
- fehlend	0	0,0 %
Resektionsrand (R)		
- gesamt	119	100 %
- 0	99	83,2 %
- 1	15	12,6 %
- 2	0	0,0 %
- fehlend	5	4,2 %

UICC		
- gesamt	119	100 %
- I0	2	0,8 %
- IA	24	21,0 %
- IB	6	5,0 %
- IIA	15	12,6 %
- IIB	7	5,9 %
- IIIA	17	14,3 %
- IIIB	13	10,9 %
- IIIC	21	17,6 %
- IV	14	11,8 %
- fehlend	0	0,0 %
Lymphinvasion (L)		
- gesamt	119	100 %
- ja	61	51,3 %
- nein	49	41,2 %
- fehlend	9	7,6 %
Veneninvasion (V)		
- gesamt	119	100 %
- ja	30	25,2 %
- nein	80	67,2 %
- fehlend	9	7,6 %

3.3 Die *CTC*-Anreicherungsmethoden

Die Ariol-Methode basiert auf dem von Deng et al. (Deng et al., 2008) publizierten Protokoll und wurde in dieser Arbeit modifiziert angewendet. Vor der Aufarbeitung von Patientenmaterial wurde die Methode anhand von Spickversuchen geübt und gefestigt. Für die Spickversuche wurde das Blut von Freiwilligen ohne maligne Erkrankungen verwendet. Es wurde mit Tumorzellen der Brustkrebszelllinie *MCF*-7 (*Michigan Cancer Foundation*- 7) gespickt und nach Protokoll aufgearbeitet.
Bei der *CellSearch*-Methode wurde das Blut von qualifizierten Mitarbeitern aus dem Institut für Tumorbiologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf aufgearbeitet und die Auswertung der Proben durchgeführt.

3.3.1 Die manuelle Blutaufarbeitung bei der Ariol-Methode

(1) Blutabnahme

Zunächst wurden 1-2 ml EDTA-Blut abgenommen und verworfen, um die Laborproben nicht mit Hautepithelzellen zu verunreinigen.
Im Anschluss wurden mit einem speziellen Blutentnahme-System (Immunicon, New Jersey, USA) zwei *CellSave*-Röhrchen mit jeweils 7,5 ml Blut abgenommen.
Eine der Proben wurde nun mit der *CellSearch*-Methode, die andere mit der Ariol-Methode ausgewertet.
Die *CellSave*-Röhrchen enthielten bestimmte Stabilisatoren aufgrund derer die Blutproben bis zur Verarbeitung maximal 72 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden konnten.

(2) Lyse der Erythrozyten

Im ersten Arbeitsschritt wurde das Blut in ein 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt.
Fünf Milliliter Erythrozytenlysepuffer (Genetix CTC Kit Cat- No.: A1000, New Milton, Großbritannien) wurden mit 45 ml destilliertem Wasser frisch vermischt und das Falcon-Röhrchen mit dem Lysepuffer im Verhältnis 1:5 aufgefüllt. Danach wurde das Falcon-Röhrchen mehrmals mit der Hand umgedreht und anschließend auf einen *Orbital Rotator* (Roller mixer SRT1/ Stuart, Staffordshire, Großbritannien) gelegt. Dort ließ man es 10 Minuten drehen bis es durch die Lyse eine durchsichtige, kirschrote Farbe annahm. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 700 g bei 20-22° Celsius in der Zentrifuge (Multifuge 3 SR/ Thermo- Fisher, Waltham, USA) zentrifugiert. Zum Andrehen und Stoppen des Gerätes wurden jeweils neun Sekunden eingestellt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde dann in Dilutionslösung (Miltenyi, Cell Enrichment and Detection Kit, Bestell- Nr.: 130-060-101; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) über eine raue Plastikplatte geschrubbt und so vom Boden gelöst.

(3) *CTC*- Anreicherung

Alle Reagenzien, welche bei der Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen verwendet wurden, wurden bei der Zugabe am Rand des Gefäßes vorsichtig hoch und runter pipettiert, um eine gute Verteilung von Zellen und Zusätzen sicherzustellen.
Im ersten Schritt wurden 100 µl FcR *Blocking* Reagent (Miltenyi Cell Enrichment and Detection Kit, Bergisch Gladbach, Deutschland) zu dem gelösten Zellpellet gegeben, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach wurde ein Permeationspuffer (Genetix *CTC* Enrichment Kit, A1000 New Milton, Großbritannien) verwendet, um die Zelldurchlässigkeit zu erhöhen und damit ein Eindringen nachfolgender Reagenzien zu erleichtern. Es wurden 100 µl dieses Puffers in die Probe pipettiert. Nun wurden 60 µl des Fixierungspuffers (Cell Fixation Buffer/CTC Kit, Genetix) hinzugegeben. Jetzt mussten jeweils 100 µl anti- Zytokeratin- und 100 µl anti-*EpCAM*- Microbeads (Miltenyi, Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit/Miltenyi anti-*EpCAM* Antikörper, Bestell- Nr: 130-061-101) hinzugefügt werden. Die Probe blieb für 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurde alle 10 Minuten mit dem Vortexmischer (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) geschüttelt. Es wurde ein Verdünnungspuffer aus 5 ml Verdünnungslösung (Cell Enrichment and Detection Kit, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) und 45 ml destilliertem Wasser hergestellt. Mit diesem wurde die Probe bis auf 10 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 20-22° Celsius und 300 Umdrehungen pro Minute (Multifuge 3 SR/ Thermo-Fisher, Waltham, USA) zentrifugiert. Der neu entstandene Überstand wurde dekantiert und 450 µl des Dilutionspuffers hinzugegeben. Um das Zellpellet zu lösen wurde mit dem Falcon-Röhrchen vorsichtig über eine raue Plastikplatte geschrubbt und anschließend kurz mit dem Vortex-Gerät vermengt, ohne dabei Schaum entstehen zu lassen. Sechs Objektträger (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurden beschriftet, in Zytospannplatten (Hettich, Kirchlengern, Deutschland) eingebaut und die Zytospinkammern (Hettich, Kirchlengern, Deutschland) befestigt. Für die immunomagnetische Selektion der *CTCs* aus der Probe wurden 6 Säulen (MACS Seperation Columns, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) in einen Magnetständer (OctoMACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) gehängt und eine Auffangvorrichtung unter die Säulen gestellt. In jede Säule wurde 1 ml Dilutionspuffer gegeben, damit sich die Flüssigkeit in den magnetischen *beads* verteilt. Ab diesem Zeitpunkt musste die Säule Flüssigkeits-bedeckt bleiben. Mit einer 1 ml-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde das Blut auf die Säulen verteilt, dabei wurden pro Säule 500 µl pipettiert. Zellreste wurden durch hoch und

runter pipettieren des Dilutionspuffers aus dem Falcon-Röhrchen gelöst und auf die Säulen verteilt. Abschließend wurde erneut je 1 ml Dilutionspuffer in die Säulen pipettiert. Es wurde gewartet bis der erste Tropfen die magnetischen *beads* passiert. Dann wurden die Säulen aus der Vorrichtung genommen und zügig zum Objektträger gebracht. Schließlich wurde mit dem dazugehörigen Stempel die Flüssigkeit durch die Säule gedrückt. Hierbei lösten sich die Zellen, welche zuvor an den magnetischen *beads* hafteten, und gelangten auf den Objektträger.

(4) Präparation der Objektträger

Mit einer Rotofix 32-Zentrifuge (Hettich, Kirchlengern, Deutschland) wurden die Objektträger drei Minuten lang bei 800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, wobei die Spitze der Pipette den Objektträger nicht berühren durfte. Nun wurde nochmals eine Minute bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.
Es folgte eine Zeitspanne von mindestens 60 Minuten, in der die Proben bei Raumtemperatur trocknen konnten. Danach wurden sie behutsam in Alufolie gewickelt und in einer Kühltruhe bei -80 ° Celsius bis zur Weiterverwendung gelagert.

(5) Färbung

Bevor die Proben zum Färben verarbeitet werden konnten mussten die Objektträger aus der Kühltruhe geholt und im Kühlschrank für ungefähr eine Stunde aufgetaut werden.
Bei der Arbeit mit den Fluoreszenzreagenzien war es wichtig, die Lichtexposition auf ein Minimum zu beschränken. Aus diesem Grund wurde in einer lichtundurchlässigen Färbekammer gefärbt. Auf den Boden dieser Schale wurden feuchte Papierstreifen gelegt, um die Luftfeuchtigkeit anzuheben.
Die Objektträger wurden aus dem Kühlschrank genommen und das Zellsediment mit einem Fettstift (Dakopen) umrandet. Ab diesem Zeitpunkt mussten die Objektträger feucht gehalten werden.
Sie wurden für drei Minuten mit Waschpuffer (Genetix CTC Detection Kit) bedeckt, welcher anschließend seitlich auf ein Papiertuch abgeklopft wurde. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal sowie zwischen den einzelnen Färbeschritten wiederholt.
Auf jeden Objektträger wurden nun zwei Tropfen *Image IT Signal Enhancer* (Invitrogen) gegeben, welches 30 Minuten zum Einwirken brauchte.
Nach der halben Stunde wurde der Rest *Image IT Signal Enhancer* abgeklopft und die Objektträger wie oben beschrieben abermals mit Waschpuffer behandelt.
Nun konnte der Antikörpercocktail vorbereitet werden. Hierzu wurde ein dunkel gefärbtes Eppendorf *Tube* (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet.
Pro Objektträger wurden jeweils 0,33 µl der beiden anti-Zytokeratin-Antikörper (Anti-Pan Zytokeratin (AE1/AE3) Alexa Fluor 488 und Pan-Keratin (C11) Alexa® 488 Mouse mAB) und 2 µl anti-CD45-Antikörper (Alexa Fluor® 647 anti-human CD45, Biolegend) und 100 µl Waschpuffer.
Nach 45 Minuten Einwirkzeit wurde die Flüssigkeit auf ein Papiertuch abgeklopft und alle Objektträger zweimal für drei Minuten mit Waschpuffer behandelt und vorsichtig von dem restlichen Wasser befreit.
Auf ein Deckgläschen wurde ein Tropfen *Vecta Shield Dapi Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gegeben, welches die DNS und damit den Zellkern färbt. Im letzten Schritt wurden die Deckplättchen vorsichtig auf die Objektträger platziert, ohne dass hierbei Luftblaseneinschlüsse entstanden.

Für mindestens eine Stunde wurden die Proben bei 4° Celsius im Kühlschrank gelagert. Danach waren sie bereit zur Auswertung.

(6) Auswertung der Objektträger

Die Proben wurden größtenteils durch das Ariol SL-50 (Leica Biosystems, Richmond, USA) und zu einem kleinen Anteil mit dem LEICA-Mikroskop (Leica DMLB, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. Das Ariol SL-50-System setzt sich zusammen aus einem halbautomatischen Mikroskop und einer Analysesoftware. Es kann automatisch Objektträger scannen und analysieren. Das Mikroskop ist mit einer Kamera ausgestattet über die Bilder auf den dazugehörigen Computer projiziert, Fotos gemacht und gespeichert werden können. Zusätzlich gibt es den *Slide-Loader*, in welchem die Objektträger liegen. Er beinhaltet Raum für bis zu 50 Objektträger. Das Mikroskop, die Kamera, der Computer und der *Slide-Loader* bilden zusammen den *Analyzer*.
Die manuell gefärbten Objektträger wurden zur eindeutigen Identifizierbarkeit mit einem Barcode versehen. Anschließend wurden sie in das System eingelesen und zum Scannen vorbereitet. Die Analyse-Software musste hierfür manuell kalibriert werden. Hierzu wurden die Fluoreszenzsensibilität, der Leuchtkraftschwellenwert und die Belichtungszeit für die einzelnen Kanäle FITC, Texas Red, DAPI und Durchlicht eingestellt. Anschließend wurden die Proben automatisch gescannt. Nachdem alle *Slides* durchgelaufen waren konnten die auffälligen Befunde von dem Auswertenden auf dem Monitor in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen (FITC/TXRED/DAPI) und im Durchlichtkanal *Brightfield* betrachtet werden. Im FITC-Kanal leuchten Zytokeratine grün, im Texas *Red Kanal* CD45-Rezeptoren rot und im DAPI Kanal Zellkerne blau. Im Durchlichtkanal konnte verifiziert werden, ob es sich wirklich um eine Zelle oder um ein Artefakt handelte. Die Auswertungssoftware von *Applied Imaging* (Genetix, San Jose, USA) zeigte alle im FITC-Kanal fluoreszierenden Ereignisse als auffällige Befunde an. Diese konnten nun von dem Betrachter ebenfalls in den anderen Kanälen und in einer Kompositaufnahme angeschaut und ausgewertet werden. Die Kriterien für eine *CTC* waren ein positives Ergebnis für Zytokeratin (grün), ein intakter durch DAPI gefärbter Zellkern (blau) und ein Fehlen von CD45-Rezeptoren (fehlendes rot). Die positiven Ergebnisse wurden durch einen erfahrenen Wissenschaftler als Zweitgutachter bestätigt und die Bilder auf der Speicherplattform gesichert.
Aufgrund technischer Schwierigkeiten wurde gelegentlich mit einem manuellen LEICA-Mikroskop (Leica DMLB) gearbeitet. Die positiven Funde wurden ebenfalls durch einen Wissenschaftler bestätigt und die Koordinaten mit dem *England Finder* festgehalten. Nachdem das Ariol wieder einsatzfähig war, konnte das Ergebnis zusätzlich mit dem Ariol verifiziert und die Fotos gespeichert werden.

3.3.2 Die Aufarbeitung und Auswertung mit dem *CellSearch*™–System

Das *CellSearch*™-System ist das erste standardisierte, halb automatische, *FDA*-geprüfte System zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit metastasiertem Brust-, Prostata- und Kolorektal-Karzinom.
Es besteht aus dem *CellTracks*® *AutoPrep*® System und dem *CellTracks Analyzer* II® oder *CellSpotter*® *Analyzer* (CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use. Janssen Diagnostics, LLC).
Die zweite Blutprobe wurde für die Aufarbeitung mit der *CellSearch*-Methode verwendet. Genau wie bei der manuellen Anreicherung wurde den Patienten mit dem *CellSave* Blutentnahme Set 7,5 ml Blut abgenommen. Bei der folgenden Tumorzellanreicherung handelte es sich um einen automatisierten Prozess. Nachdem die Probe manuell zentrifugiert wurde, erfolgten alle weiteren Anreicherungsschritte automatisiert. Mit Hilfe eines

Ferrofluidreagenzes, also Nanopartikeln mit magnetischem Kern, welche von einer polymeren Schicht von *EpCAM*-Antikörpern umgeben sind, wurden die *EpCAM*-positiven Zellen aus der Probe selektiert (CELLSEARCH® *Circulating Tumor Cell Kit* (Epithelial) Instructions for Use. Janssen Diagnostics, LLC).
Auch die sich anschließende Immunfluoreszenzfärbung wurde automatisch durchgeführt.
Das System verwendete Antikörper gegen CD45 und Zytokeratin 8, 18, 19 und den Farbstoff DAPI, welcher die DNA sichtbar macht und somit den Zellkern färbt.
Die Auswertung erfolgte semiautomatisch. Im ersten Schritt wurden die Tumorzellen durch das Fluoreszenz-Mikroskop detektiert und in der Galerie angezeigt. Im zweiten Schritt wurden die präsentierten Zellen von einem Wissenschaftler betrachtet und ausgewertet.

3.4 Die Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Während des Forschungsprojektes kam es zur Einstellung der Herstellung des anti-CD45-Antikörpers (Antihuman CD45 mAB Dylight 549), weswegen ab Juni 2012 mit einem anti-CD45-Antikörper der Fima Biolegend (Biolegend, San Diego, USA) nach eingehender Testung weitergefärbt wurde (Alexa Fluor® 647 anti-human CD45).
Ein Wechsel des anti-Zytokeratin-Antikörpers fand aus demselben Grund ebenfalls statt. Ab Juli 2012 verwendeten wir anstelle des anti-*human* Zytokeratin mAB FITC die beiden Antikörper anti-Pan Zytokeratin (AE1/AE3) Alexa Fluor®488 (eBioscience Inc. San Diego, CA) und Pan-Keratin (C11) Alexa® 488 Mouse mAB (Cell Signaling Technology ®, Deutschland). Die neuen anti-Zytokeratin-Antikörper wiesen erfreulicherweise ein erweitertes Zytokeratin-Spektrum auf. Der anti-Pan Zytokeratin (AE1/AE3) Alexa 488 detektiert die Zytokeratine 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 16 und 19 und der Pan-Keratin (C11) Alexa® 488 Mouse mAB detektiert die Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18.
Zur besseren Überschaubarkeit sind die verwendeten Geräte (Tabelle 7), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 8) und Reagenzien (Tabelle 64 im Anhang) im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 7 Die verwendeten Geräte mit Hersteller

Gerät	Hersteller
CellSearch™ System	Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, USA
Ariol SL-50	Leica Biosystems, Richmond, USA
Leica DMLB	Leica, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotofix 32 für Objektträger	Hettich, Kirchlengern, Deutschland
Waage CP224S-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Pipette Eppendorf research 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf research 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf research 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf research 0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Magnetständer	OctoMACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Roller mixer SRT1 (Orbital Rotator)	Stuart, Staffordshire, Großbritannien

Tabelle 8 Die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
EDTA- Röhrchen 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CellSave Blutentnahme Sets CellSave	Immunicon, New Jersey, USA
Venenpunktionsbesteck Venifix®A	B|Braun, Melsungen, Deutschland
50 ml Röhrchen Falcon tube	Corning, Lowell, USA
15 ml Röhrchen Cellstar® tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
2 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
100-1000 µl Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10-100 µl Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0,5-10 µl Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0,1-2,5 µl Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 ml Falcon Serological Pipet	Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ.USA
Transfer pipettes, High Performance	VWR, Leicestershire, Groß Britannien
Poly-Prep Slides	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Objektträger-Deckgläser	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Magnetsäulen und Stempel (MACS Seperation Columns)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Zyto-Spannplatte	Hettich, Kirchlengern, Deutschland
Zyto-Kammer mit Dichtung	Hettich, Kirchlengern, Deutschland

3.5 Die statistische Analyse

Zur Analyse des Datensatzes wurde das Statistikprogramm SPSS Version 22 verwendet. Die klinischen Parameter wurden nach Zustimmung der Patienten der Datenbank des Universitätsklinikums entnommen. Die Katamnese-Daten stammen aus der chirurgischen Poliklinik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, von den jeweiligen Hausärzten und Einwohnermeldeämtern.
Die Überlebensanalysen wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode und des Log-rank-Tests berechnet.
Die Korrelationen zwischen den einzelnen klinischen und pathologischen Parametern und dem *CTC*-Status wurden abhängig von den Größen der Subgruppen mit dem Chi-Quadrattest oder dem Exakten Test nach Fisher erstellt. Eine statistische Signifikanz galt ab einem p-Wert < 0.05. Zum Vergleich der Aufarbeitungsmethoden wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet und es wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen berechnet, um die Übereinstimmung der Beobachtung zu messen. Bei einer Übereinstimmung aller Beobachtungen beträgt Kappa= 1, entspricht die Zahl der übereinstimmenden Beobachtungen dem Zufall, beträgt Kappa= 0. Ab einem Wert von Kappa> 0,6 liegt eine gute Übereinstimmung vor.

4 Ergebnisse

4.1 Detektionsraten der beiden Methoden

Mit der Ariol-Methode wurden 119 Patientenproben bearbeitet.
Der Auswertung entfielen 4 Patientenproben aufgrund von organisatorischem Verschulden.
Von den übrigen 115 Proben fanden sich bei 19 zirkulierende Tumorzellen. Dies entspricht einer Detektionsrate von 16,5 % (Abbildung 13).
Tabelle 9 zeigt die Anzahl der *CTCs* bei den verschiedenen Patienten. Im Durchschnitt fand sich pro Patient eine Anzahl von 1,47 Tumorzellen (von 0 bis 100). Bei einem Patienten fanden sich 100 Tumorzellen, die zum Teil in großen *Clustern* im Blut zirkulierten (siehe Abbildungen 14, 15, 16, 17).

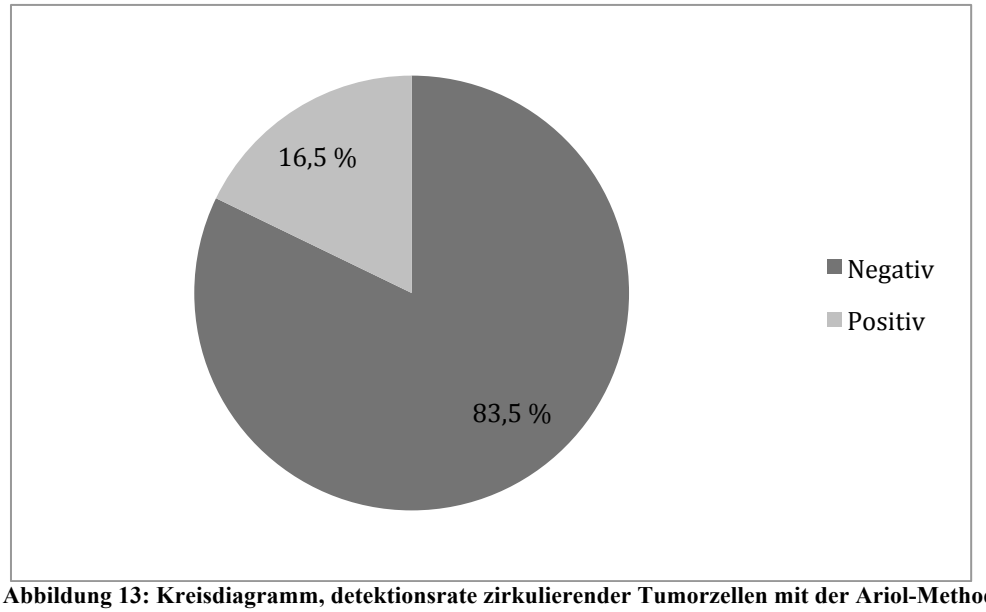

Abbildung 13: Kreisdiagramm, detektionsrate zirkulierender Tumorzellen mit der Ariol-Methode

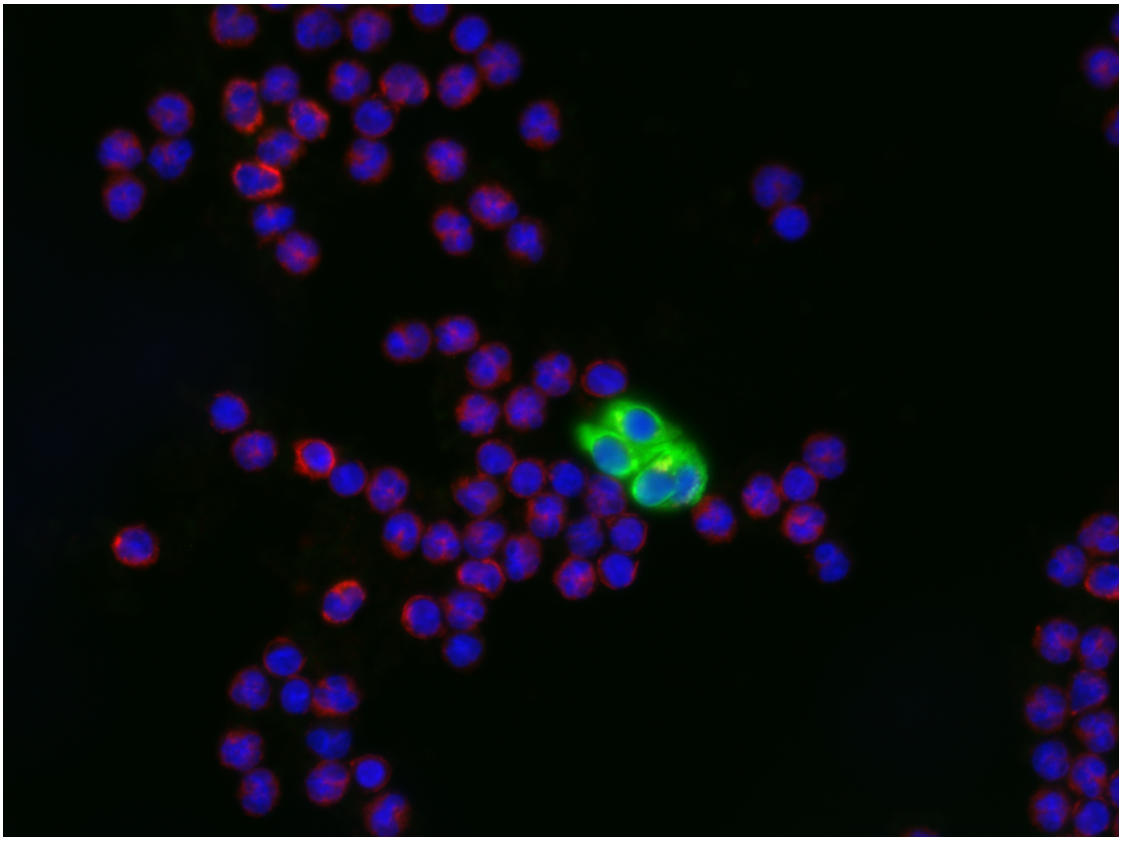

Abbildung 14 *CTC-Cluster* (1) im Ariol Compositbild

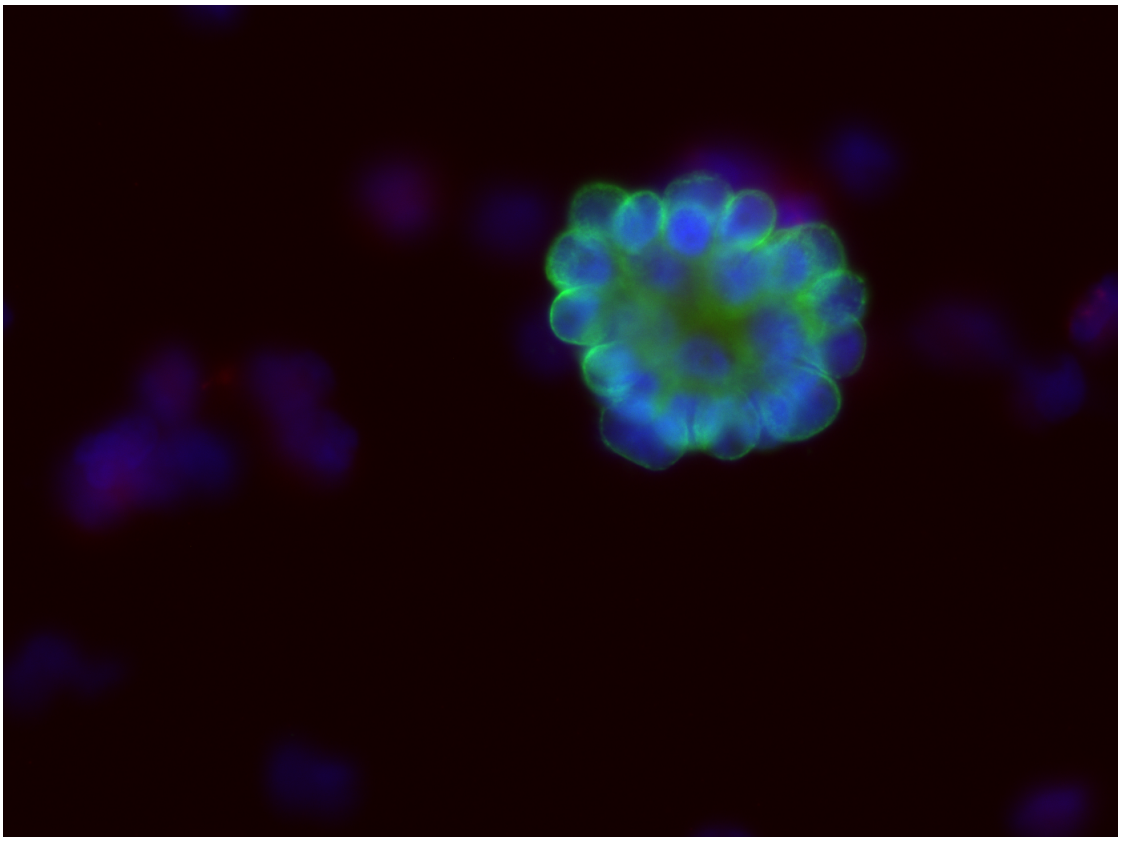

Abbildung 15 *CTC-Cluster* (2) im Ariol Compositbild

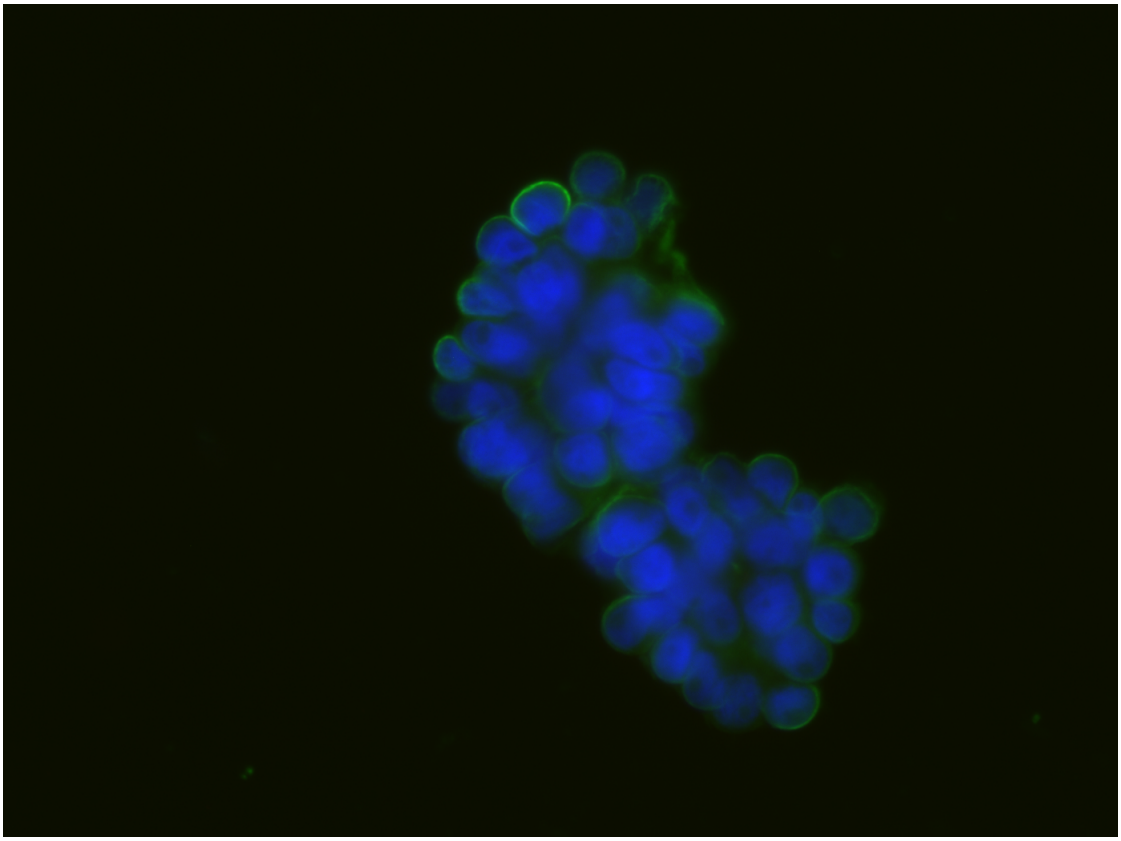

Abbildung 16 *CTC-Cluster* (3) im Ariol Compositbild

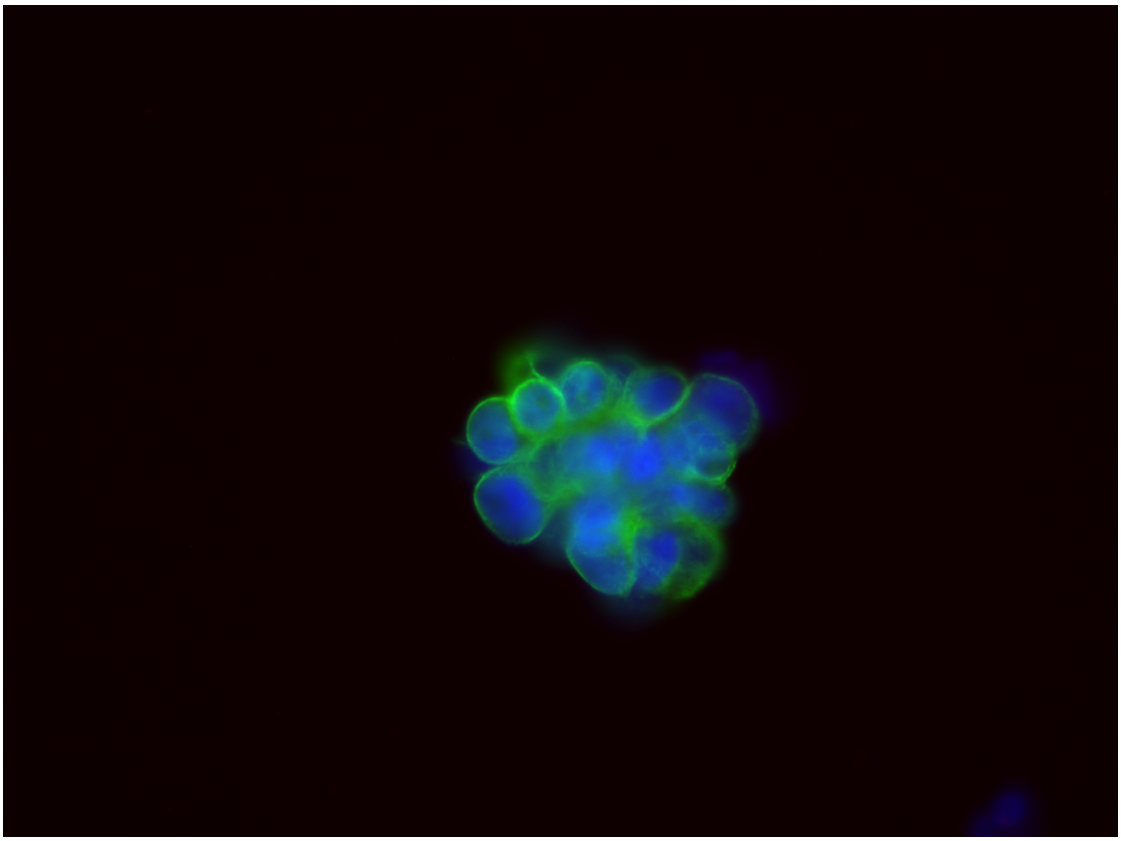

Abbildung 17 *CTC-Cluster* (4) im Ariol Compositbild

Tabelle 9 Aufteilung der *CTC*-positiven Patienten nach Anzahl der Tumorzellen (Ariol-Methode)

Anzahl Tumorzellen Ariol	Anzahl Patienten
0	96
1	9
2	4
3	1
4	1
5	2
35	1
100	1

Mit der *CellSearch*-Methode wurden 119 Patientenproben verarbeitet, davon wurden 18 von dem Gerät nicht prozessiert und entfielen so für die Auswertung und den Vergleich. Von den übergebliebenen 101 Proben fanden sich bei 18 Patienten *CTCs*. Dies entspricht prozentual einer Detektionsrate von 17,8 % (Abbildung 18). Bei einem Patienten fanden sich 56 Tumorzellen. Tabelle 10 zeigt die Anzahl der *CTCs* bei den verschiedenen Patienten.
Im Durchschnitt fanden sich pro Patient 1,22 Tumorzellen (von 0 bis 56). In Tabelle 10 sind die genauen *CTC*-Anzahlen aufgelistet.

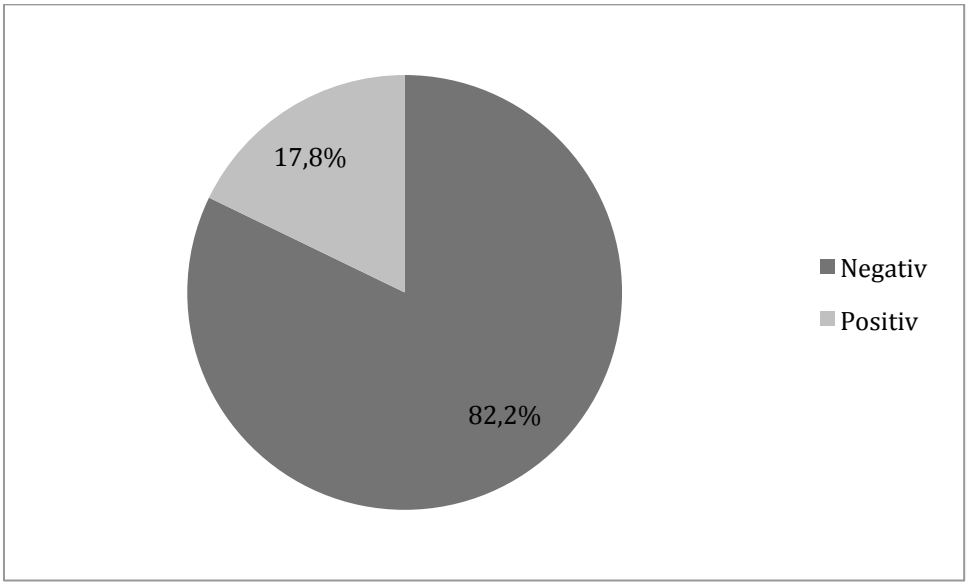

Abbildung 18 Kreisdiagramm, Detektionsrate zirkulierender Tumorzellen mit der *CellSearch*-Methode

Tabelle 10 Aufteilung der *CTC*-positiven Patienten nach Anzahl der Tumorzellen (*CellSearch*-Methode)

Anzahl Tumorzellen *CellSearch*	Anzahl Patienten
0	83
1	9
2	4
3	2
13	1
31	1
56	1

4.2 Methodenvergleich *CellSearch*- und Ariol-Methode

In der folgenden Tabelle 11 sind alle Ergebnisse, die in einer der beiden Methoden oder beiden positiv waren, dargestellt.

Tabelle 11 Auswertungsgegenüberstellung Ariol- und *CellSearch*-positive Fälle

Pat. Nr.	Ariol positiv	*CS* positiv	Ariol und *CS* positiv
1	Ja	Nein	Nein
6	Ja	Ergebnis fehlt	Kein Ergebnis
9	Nein	Ja	Nein
11	Ja	Ja	Ja
12	Nein	Ja	Nein
16	Nein	Ja	Nein
20	Nein	Ja	Nein
22	Ja	Ergebnis fehlt	Kein Ergebnis
24	Ja	Ja	Ja
31	Ja	Nein	Nein
32	Nein	Ja	Nein
33	Ja	Ergebnis fehlt	Kein Ergebnis
34	Ja	Nein	Nein
36	Ja	Ja	Ja
40	Ja	Ja	Ja
47	Nein	Ja	Nein
50	Ja	Nein	Nein
53	Ja	Nein	Nein
55	Ja	Nein	Nein
57	Ja	Ergebnis fehlt	Kein Ergebnis
58	Ja	Nein	Nein
61	Ja	Nein	Nein
63	Nein	Ja	Nein
69	Nein	Ja	Nein
70	Ja	Nein	Nein
78	Ergebnis fehlt	Ja	Kein Ergebnis
79	Nein	Ja	Nein
80	Nein	Ja	Nein
85	Ja	Nein	Nein
90	Nein	Ja	Nein
99	Nein	Ja	Nein
101	Nein	Ja	Nein
104	Ja	Ergebnis fehlt	Kein Ergebnis

Pat. Nr.= Patientennummer, *CS*= *CellSearch*

Betrachtet man nur die Ergebnisse, die entweder in der einen oder der anderen Methode positiv waren, so hatten 4 Patienten (Nummer 11, 24, 36, 40) bei beiden Methoden ein positives Ergebnis (siehe Tabelle 12). Bei 6 Patienten konnten wir die positiven Ergebnisse nicht vergleichen, da in einem Fall (Patientennummer 78) das Ergebnis bei der Ariol-Methode fehlte und in 5 Fällen (Patientennummern 6, 22, 33, 57, 105) die Ergebnisse aus der *CellSearch*-Methode.

Tabelle 12 *CellSearch*-/Ariol-*CTC*-positive Patienten mit Krankheitsstadium

Pat. Nr.	Ariol/*CellSearch* positiv	UICC-Stadium	Fernmetastasen
11	Ja	IIIb	nein
24	Ja	IV	ja
36	Ja	IV	ja
40	Ja	IIIa	nein

Tabelle 13 bietet eine Übersicht über alle gemessenen Ergebnisse in beiden Methoden für insgesamt 97 Patienten.

Tabelle 13 Vergleich der Aufarbeitungsmethoden Ariol- und *CellSearch*-Methode

	***CTC CellSearch* negativ**	***CTC CellSearch* positiv**	**Gesamtsumme**
***CTC* Ariol negativ**	70	13	83
***CTC* Ariol positiv**	10	4	14
Gesamtsumme	80	17	97

Dreizehn Proben waren in der *CellSearch*-Methode positiv und in der Ariol-Methode negativ. Zehn Proben hatten in der Ariol-Methode Tumorzellen und in der *CellSearch*-Methode keine. Insgesamt waren 4 Proben in beiden Methoden positiv, 70 Proben waren in beiden Methoden negativ. Es gab eine Messübereinstimmung bei 74 (76,3 %) Proben.

Der Übereinstimmungswert der beiden Methoden wurde mit Cohens Kappa berechnet. Der Wert liegt bei 0,119 und zeigt kaum Übereinstimmung der beiden Messmethoden an.

4.3 Die Stadienabhängigkeit der *CTC*-Verteilung

Den beiden Tabellen 14 und 15 kann entnommen werden, dass unabhängig von der Aufarbeitungsmethode die Häufigkeit von *CTC*-positiven Patienten der hier untersuchten Stichprobe in dem Krankheitsstadium UICC IV deutlich höher ist als in den anderen Stadien. Aufgrund der kleinen Fallzahlen in den Subgruppen und um die statistische Aussagekraft zu stärken wurden die Krankheitsstadien 0, I und II in eine Gruppe sowie die Krankheitsstadien III und IV in eine zweite Gruppe zusammengefasst. In fast allen Krankheitsstadien außer UICC 0 und UICC I wurden *CTCs* gefunden.
Dabei kann aus den Zahlen geschlossen werden, dass die Detektionsrate unabhängig von der Aufarbeitungsmethode in einem frühen Krankheitsstadium signifikant geringer ist (Ariol-Methode: UICC-Stadium 0, I und II haben 9,4 % Tumorzellen vs. UICC III und IV 22,6 % Tumorzellen, p= 0,049 (Exakter Test nach Fisher); *CellSearch*-Methode: Stadium 0, I und II haben 13,0 % Tumorzellen vs. UICC III und IV 21,8 % Tumorzellen, p= 0,011 (Exakter Test nach Fisher)).

Tabelle 14 Die UICC-Stadien und *CTC* Ariol

	***CTC* Ariol positiv**	***CTC* Ariol negativ**	**Gesamtsumme**
UICC 0	0 (0,0 %)	2	2
UICC I	0 (0,0 %)	30	30
UICC II	5 (23,8 %)	16	21
UICC III	10 (20 %)	40	50
UICC IV	4 (33,3 %)	8	12
Gesamtsumme	19 (16,5 %)	96	115

Tabelle 15 Die UICC-Stadien und CTC *CellSearch*

	***CTC CellSearch* positiv**	***CTC CellSearch* negativ**	**Gesamtsumme**
UICC 0	0 (0,0 %)	2	2
UICC I	4 (15,4 %)	22	26
UICC II	2 (11,1 %)	16	18
UICC III	8 (18,2 %)	36	44
UICC IV	4 (36,4 %)	7	11
Gesamtsumme	18 (17,8 %)	83	101

Die Tabellen 16 und 17 zeigen, dass *CTCs* unabhängig von der Detektionsmethode bereits vor einer nachweisbaren Lymphknotenmetastasierung nachweisbar sind. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 16 Lymphknotenstatus und *CTC* Ariol

	***CTC* Ariol positiv**	***CTC* Ariol negativ**	**Gesamtsumme**
Lymphknoten negativ	5 (10 %)	45 (90 %)	50
Lymphknoten positiv	13 (22 %)	47 (78 %)	60

Tabelle 17 Lymphknotenstatus und *CTC CellSearch*

	***CTC CellSearch* positiv**	***CTC CellSearch* negativ**	**Gesamtsumme**
Lymphknoten negativ	8 (17 %)	39 (83 %)	47
Lymphknoten positiv	9 (18 %)	42 (82 %)	51

4.4 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patienten-Charakteristiken und klinischen Parametern

4.4.1 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patientien-Charakteristiken und klinischen Parametern (Ariol)

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *CTCs* und Tumoreindringtiefe und dem UICC-Stadium. Bei Patienten mit einem höheren T-Stadium fanden sich signifikant häufiger *CTCs* (p= 0,017, Exakter Test nach Fisher) als bei Patienten mit niedrigem T-Stadium. Dies spiegelte sich auch im UICC-Stadium wieder: Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien hatten ebenfalls signifikant häufiger *CTCs* (p= 0,011, Exakter Test nach Fisher) als solche im frühen Stadium. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den klinischen Merkmalen Lymphknotenstatus, Metastasen, Differenzierungsgrad, Geschlecht, Histologie, Resektion, Alter, Resektionsrand und *CTCs*. Jedoch bildet sich eine Tendenz ab, dass bei Patienten mit Metastasen häufiger *CTCs* gefunden werden. Tabelle 18 stellt die Häufigkeitsanalyse zwischen *CTCs* und klinischen Parametern dar.

Tabelle 18 *CTC*-Ariol und klinische Parameter

Charakteristikum	Alle	*CTC* > 0	p-Wert
Alle	115	19 (16,5 %)	
Alter			0,796
≤ 60 Jahre	43	8 (18,6 %)	
> 60 Jahre	72	11 (15,3 %)	
Geschlecht			1,000
Männlich	92	15 (16,3 %)	
Weiblich	23	4 (17,4 %)	
Tumorgröße			0,017
T1	31	1 (3,2 %)	
T2	21	2 (9,5 %)	
T3	47	11 (23,3 %)	
T4	15	5 (33,3 %)	
Fehlend	1		
Lymphknotenstatus			0,101
N0	50	5 (10,0 %)	
N1	25	4 (16,0 %)	
N2	16	3 (18,8 %)	
N3	20	7 (35,0 %)	
Fehlend	4		
Metastasierung			0,057
M0	108	16 (14,8 %)	
M1	6	3 (50,0 %)	
Fehlend	1		
UICC			0,011
0	2	0 (0,0 %)	
I	30	0 (0,0 %)	
II	21	5 (0,0 %)	
III	50	10 (20,0 %)	
IV	12	4 (33,3 %)	

Differenzierungsgrad			0,104
1	13	0 (0,0 %)	
2	46	7 (12,2 %)	
3	43	11 (25,6 %)	
4	3	1 (33,3 %)	
Fehlend	10		
Resektionsrand			0,411
R0	98	15 (15,3 %)	
R1	12	3 (25,0 %)	
Fehlend	5	1 (20,0 %)	
Resektion			1,000
Ja	92	18 (19,6 %)	
Nein	4	1 (25,0 %)	
Histologie			0,775
AC	66	14 (21,2 %)	
SCC	27	4 (14,8 %)	
Fehlend	4	1 (25,0 %)	

4.4.2 Häufigkeitsanalyse von *CTC* mit Patientien-Charakteristiken und klinischen Parametern (*CellSearch*)

Es fanden sich bei Patienten im metastasierten Stadium signifikant öfter *CTCs* mittels *CellSearch* als bei Patienten im nicht metastasierten Stadium (p= 0,039 Exakter Test nach Fisher). Bei den übrigen klinischen Parametern Tumoreindringtiefe, Lymphknotenstatus, UICC-Stadium, Histologie, Differenzierungsgrad, Resektion, Alter, Resektionsrand und Geschlecht ergaben sich keine Zusammenhänge zwischen Patienten mit und Patienten ohne *CTCs*. Tabelle 19 stellt die Häufigkeitsanalyse zwischen *CTCs* und klinischen Parametern dar.

Tabelle 19 *CTC-CellSearch* und klinische Parameter

Charakteristikum	Alle	*CTC* > 0	p-Wert
Alle	101	18 (17,8 %)	
Alter			0,181
≤ 60 Jahre	39	4 (10,3 %)	
> 60 Jahre	62	14 (22,6 %)	
Geschlecht			0,550
Männlich	78	13 (16,7 %)	
Weiblich	23	5 (21,7 %)	
Tumorgröße			0,067
T1	24	3 (12,5 %)	
T2	20	1 (5,0 %)	
T3	42	8 (19,0 %)	
T4	15	6 (40 %)	
Fehlend	0		

Lymphknotenstatus			0,156
N0	47	8 (17, 0 %)	
N1	19	1 (5,3 %)	
N2	16	3 (18,8 %)	
N3	17	6 (35,3 %)	
Fehlend	2		
Metastasierung			0,039
M0	95	15 (15,8 %)	
M1	5	3 (60,0 %)	
Fehlend	1		
UICC			0,534
0	2	0 (0,0 %)	
I	26	4 (15,4 %)	
II	18	2 (11,1 %)	
III	44	8 (18,2 %)	
IV	11	4 (36,4 %)	
Differenzierungsgrad			0,404
1	10	1 (10,0 %)	
2	40	6 (15,0 %)	
3	40	9 (22,5 %)	
4	2	1 (50,0 %)	
Fehlend	9	1	
Resektionsrand			0,693
R0	85	14 (16,5 %)	
R1	13	3 (23,1 %)	
Fehlend	3	1	
Resektion			0,449
Ja	98	17 (17,3 %)	
Nein	3	1 (33,3 %)	
Histologie			0,381
AC	69	14 (20,3 %)	
SCC	29	3 (10,3 %)	
Fehlend	3	1	

4.5 Univariate Überlebensanalysen Gesamtkollektiv

Von 119 Patienten verstarben innerhalb der ersten vier Wochen 18 Patienten im Krankenhaus an postoperativen Komplikationen. Diese Patienten wurden aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Eingeschlossen wurden die übrigen 101 Patienten. Innerhalb des ersten Jahres verstarben 39 Patienten. Wir führten eine univariate Überlebensanalyse mit der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-rank-Test für das progressionsfreie und das gesamte Überleben durch und haben die Überlebenskurven für die Patienten in Bezug auf den *CTC*-Status dargestellt. Dabei wählten wir die in der Tabelle 20 aufgeführten *Cut-off*-Werte.

Tabelle 20 *Cut-off*-Werte Tumorzellen

Merkmal	Positiv	Negativ	Fehlend	Gesamt
***CTC* Ariol > 0**	17	82	2	101
***CTC* Ariol > 1**	9	90	2	101
***CTC* Ariol > 2**	6	93	2	101

***CTC* CellSearch > 0**	13	33	15	101
***CTC* CellSearch > 1**	5	81	15	101
***CTC* CellSearch > 2**	2	84	15	101

4.5.1 Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Das durchschnittliche progressionsfreie Überleben der 101 Patienten betrug 399,6 Tage. Der Median lag bei 320 Tagen. Die Überlebenszeiten von Patienten mit *CTCs* in den Gruppen Tumoreindringtiefe (p< 0,001, Log-rank-Test), Lymphknotenstatus (p< 0,001, Log-rank-Test), Metastasierung (p< 0,001, Log-rank-Test), Resektion (p= 0,044, Log-rank-Test), Resektionsrand (p= 0,028, Log-rank-Test) und dem UICC-Stadium (p< 0,001, Log-rank-Test) waren signifikant kürzer (Tabelle 21).

Tabelle 21 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	< 0,001
Lymphknoten	Ja	< 0,001
Metastasierung	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,485
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,075
Histologie	Nein	0,887
Resektion	Ja	0,044
Resektionsrand	Ja	0,028
Zweittumor	Nein	0,256
UICC**	Ja	< 0,001

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC 1, UICC 2, UICC 3 und UICC 4 gruppiert

Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben (Ariol)

Das progressionsfreie Überleben der Patienten mit *CTCs* unterschied sich nicht signifikant von denen ohne *CTCs*. Die p-Werte sind in Tabelle 22 dargestellt (Abbildungen 19, 20, 21).

Tabelle 22 Log-rank-Test für progressionsfreies Überleben (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,100
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,435
***CTC* Ariol> 2**	Nein	0,071

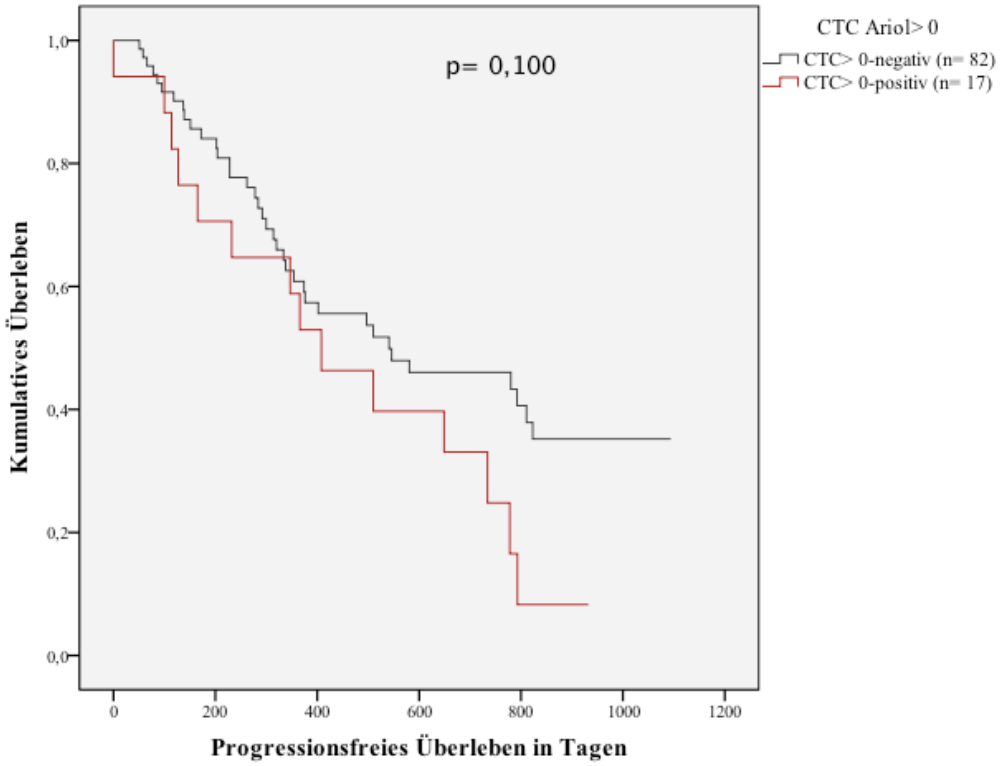

Abbildung 19 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* Ariol> 0

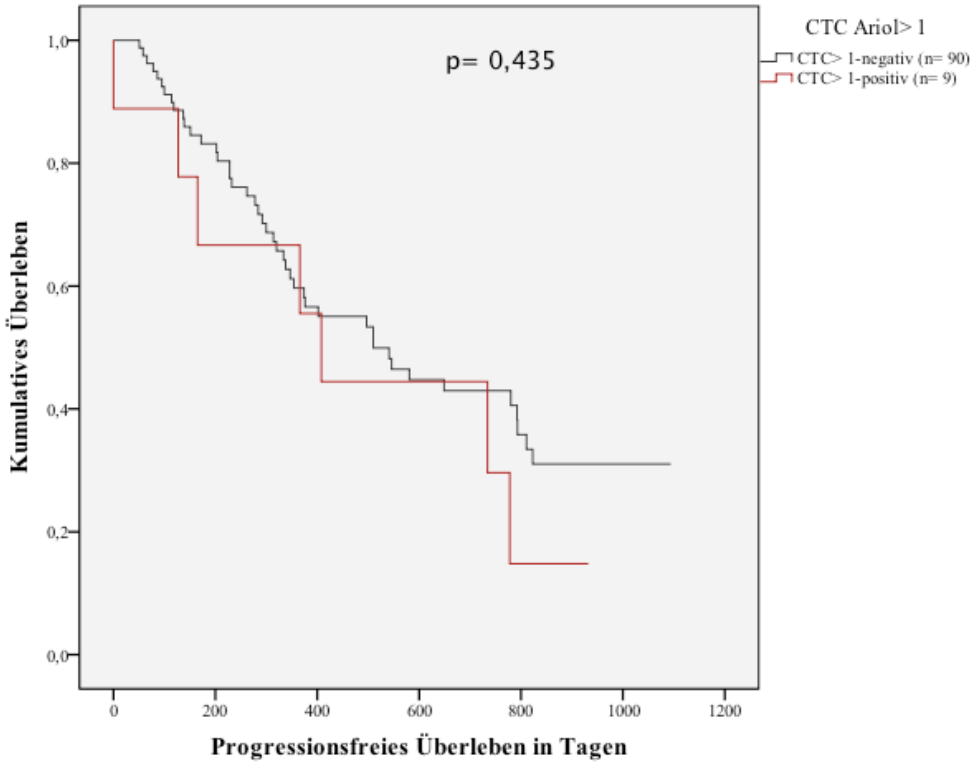

Abbildung 20 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* Ariol> 1

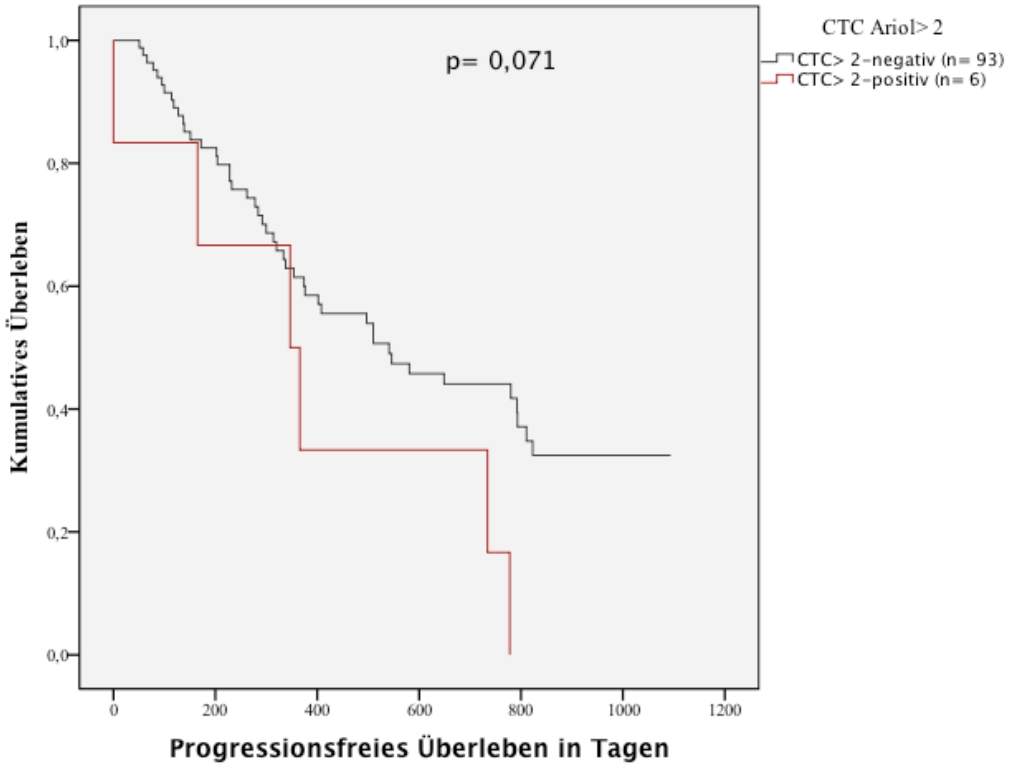

Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* > 2

Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben (CellSearch)

Das progressionsfreie Überleben der Patienten mit *CTC CellSearch*> 0 (p= 0,039, Log-rank-Test), *CTC CellSearch*> 1 (p= 0,027, Log-rank-Test) und *CTC CellSearch*> 2 (p< 0,001, Log-rank-Test) unterschieden sich signifikant von denen ohne bzw. weniger *CTCs* (Tabelle 23). In den Kaplan-Meier-Kurven ist zu sehen, dass die *CTC*-positiven Patienten während der *Follow-Up*-Zeit eine signifikant kürzere progressionsfreie Überlebenszeit hatten (Abbildungen 22, 23, 24).

Tabelle 23 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Ja	0,039
***CTC CellSearch*> 1**	Ja	0,027
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

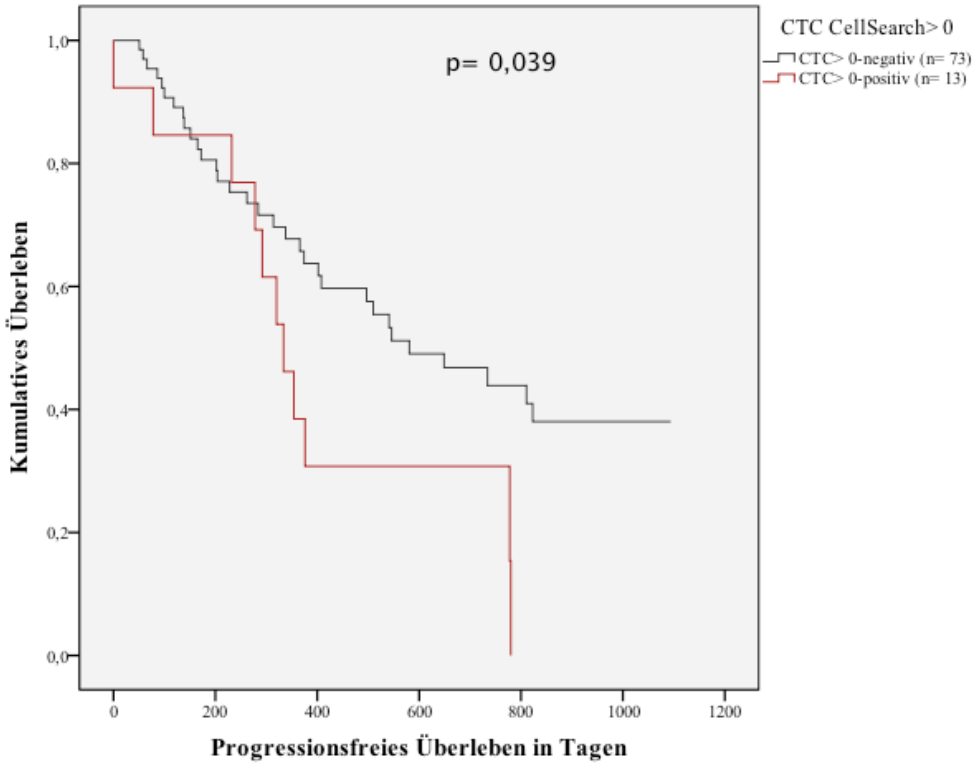

Abbildung 22 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC CellSearch*> 0

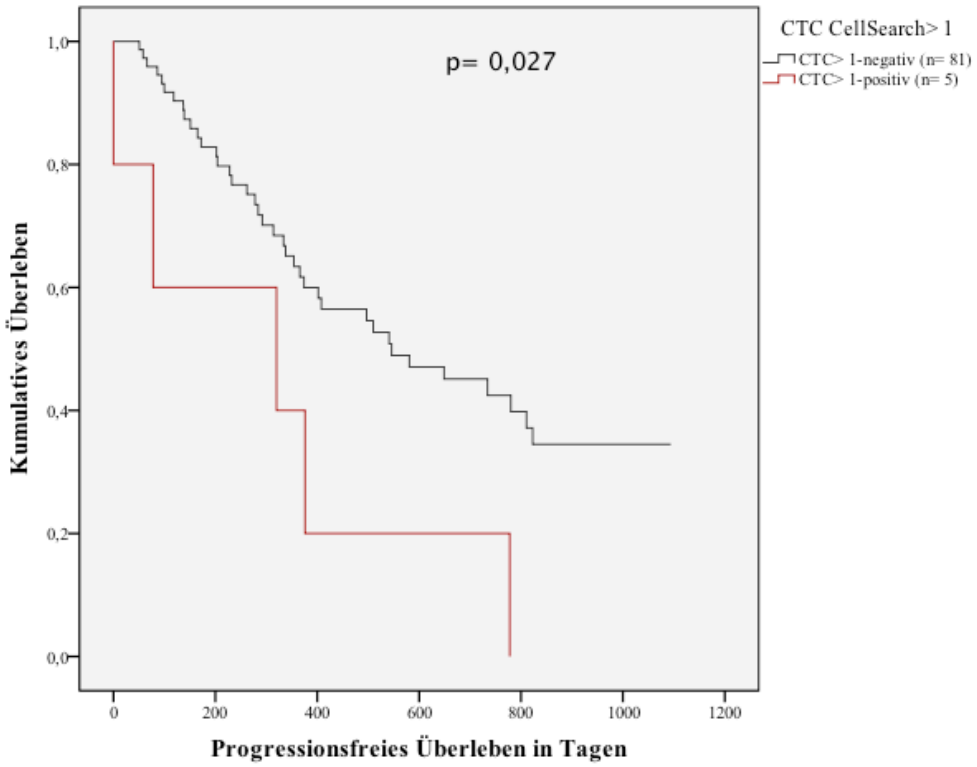

Abbildung 23 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC CellSearch*> 1

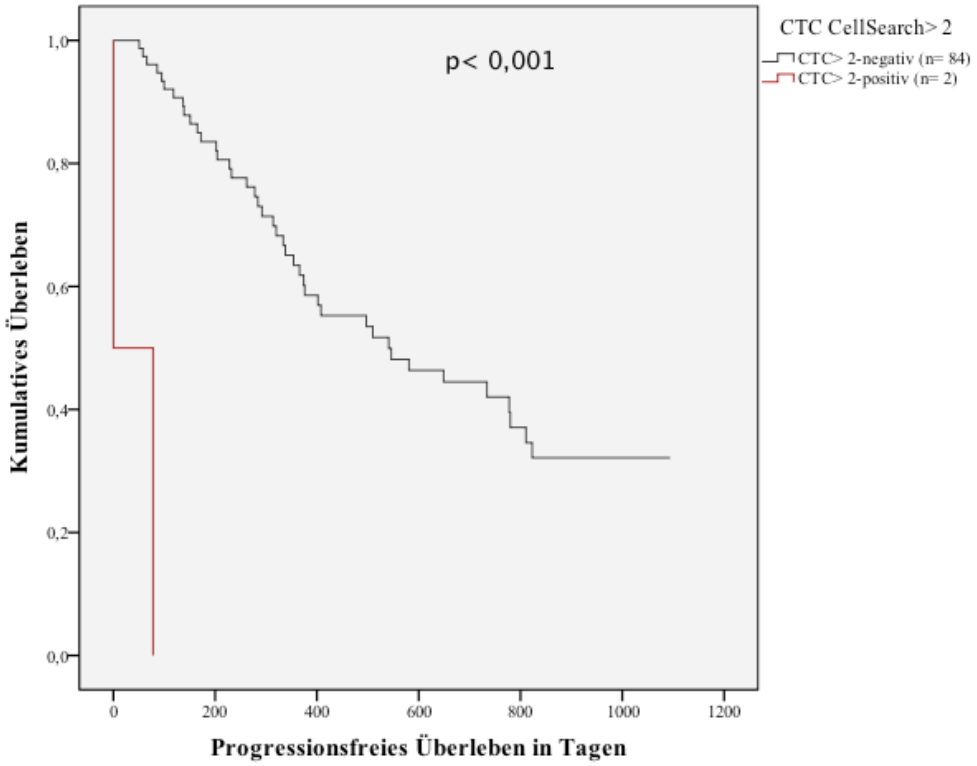

Abbildung 24 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC CellSearch*> 2

4.5.2 Log-rank-Analysen für das Gesamtüberleben für klinische Parameter

Das durchschnittliche Gesamtüberleben betrug 451,5 Tage. Der Median lag bei 404 Tagen. Zwischen den Überlebenszeiten in den Gruppen Tumoreindringtiefe (p< 0,001, Log-rank-Test), Lymphknotenstatus (p= 0,002, Log-rank-Test), Metastasierung (p< 0,001, Log-rank-Test), Alter (p= 0,008, Log-rank-Test), Resektion (p= 0,045, Log-rank-Test), Resektionsrand (p= 0,025, Log-rank-Test) und dem UICC-Stadium (p< 0,001, Log-rank-Test) unterschieden sich die Überlebenszeiten signifikant (Tabelle 24).

Tabelle 24 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben für klinische Parameter

Faktor	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	< 0,001
Lymphknoten	Ja	0,002
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,376
Alter (über oder unter 60Jahren)	Ja	0,008
Histologie	Nein	0,894
Resektion	Ja	0,045
Resektionsrand	Ja	0,025
Zweittumor	Nein	0,241
UICC**	Ja	< 0,001

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC1, UICC2, UICC3 und UICC4 gruppiert

Log-rank-Analysen für das Gesamtüberleben (Ariol)

Das Gesamtüberleben der Patienten mit *CTC* Ariol> 0 und *CTC* Ariol> 1 unterschied sich nicht signifikant von denen ohne *CTCs* (Tabelle 25). Bei Patienten, welche mehr als 2 Tumorzellen im Blut aufwiesen, war das Gesamtüberleben signifikant kürzer (p= 0,002, Log-rank-Test). Die Überlebenskurven sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abbildungen 25, 26, 27).

Tabelle 25 Log-rank-Test für *CTC* und das Gesamtüberleben (Ariol)

Faktor	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,270
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,264
***CTC* Ariol> 2**	Ja	0,002

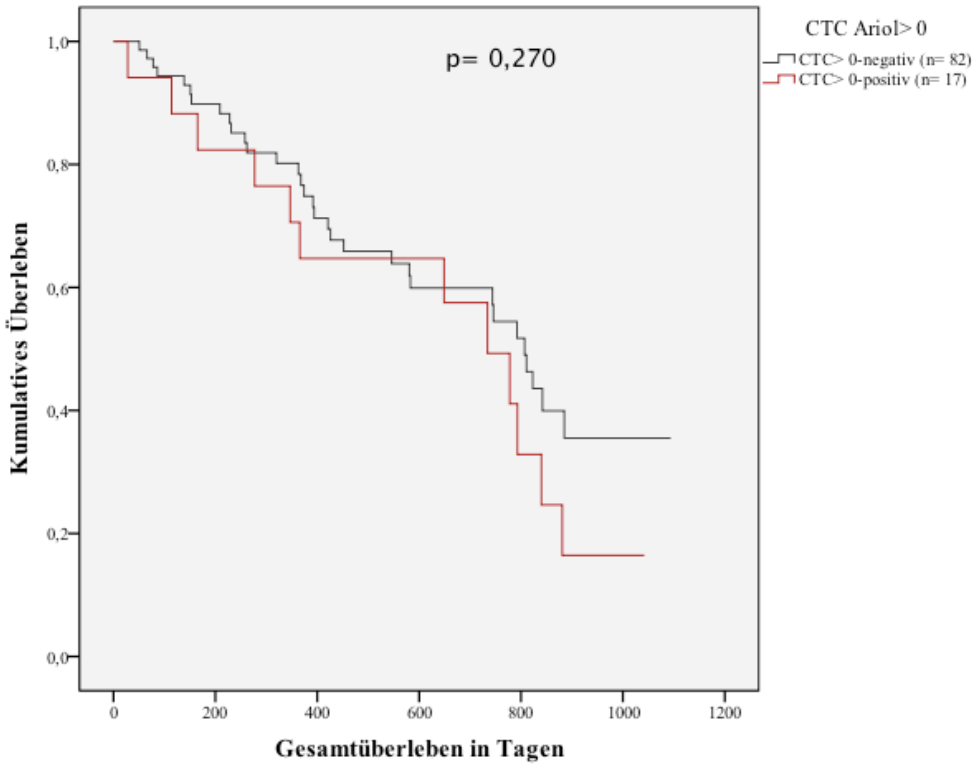

Abbildung 25 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* Ariol> 0 und das Gesamtüberleben

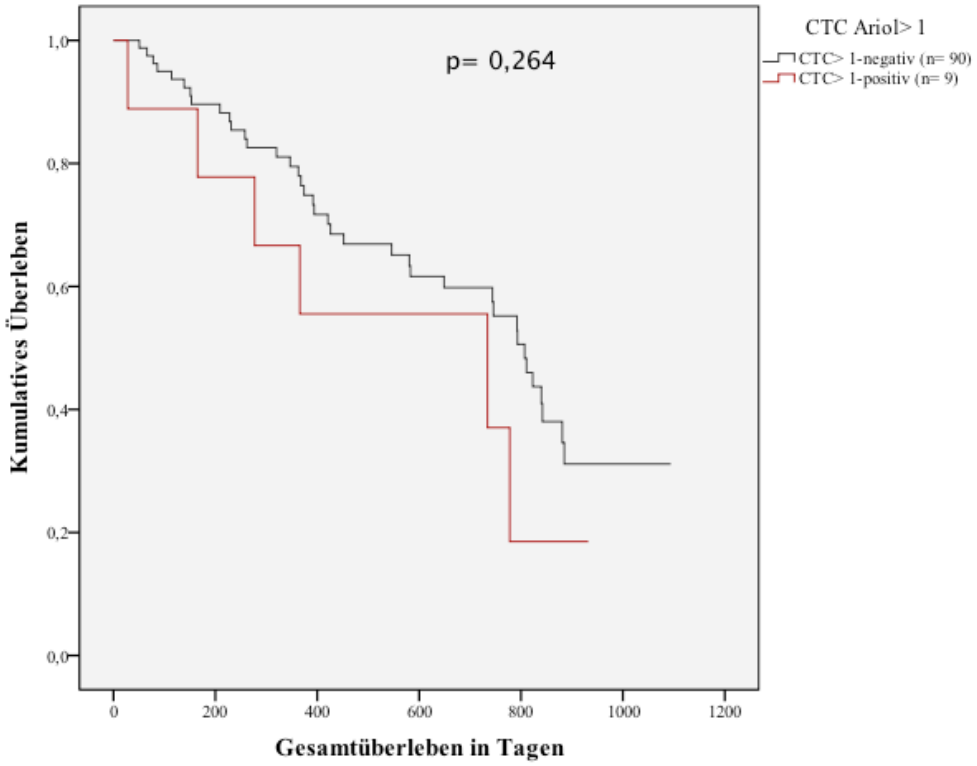

Abbildung 26 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* Ariol> 1 und das Gesamtüberleben

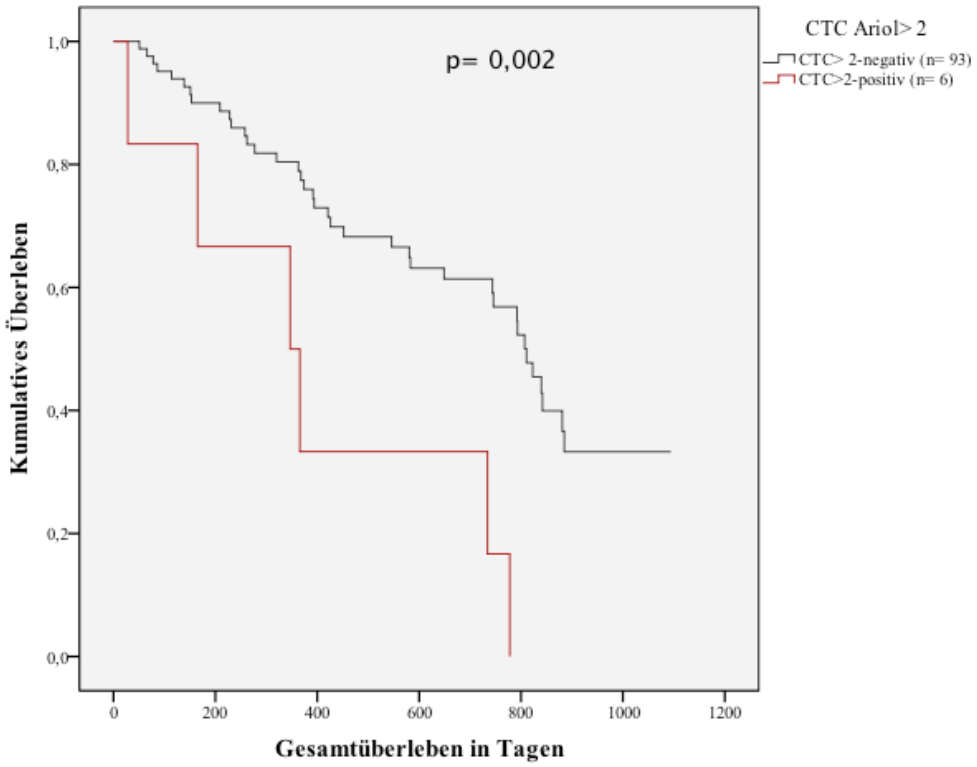

Abbildung 27 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* Ariol> 2 und das Gesamtüberleben

Log-rank-Analysen für das Gesamtüberleben (CellSearch)

Das Gesamtüberleben der Patienten mit *CTC CellSearch*> 0 unterschied sich nicht signifikant von denen ohne *CTC* (Tabelle 26). Das Gesamtüberleben der Patienten mit *CTC*> 1 (p= 0,004, Log-rank-Test) und *CTC*> 2 (p< 0,001, Log-rank-Test) war signifikant kürzer als bei Patienten ohne *CTCs*. Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 28, 29, 30).

Tabelle 26 Log-rank-Test für *CTC* und das Gesamtüberleben (*CellSearch*)

Faktor	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,188
***CTC CellSearch*> 1**	Ja	0,004
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

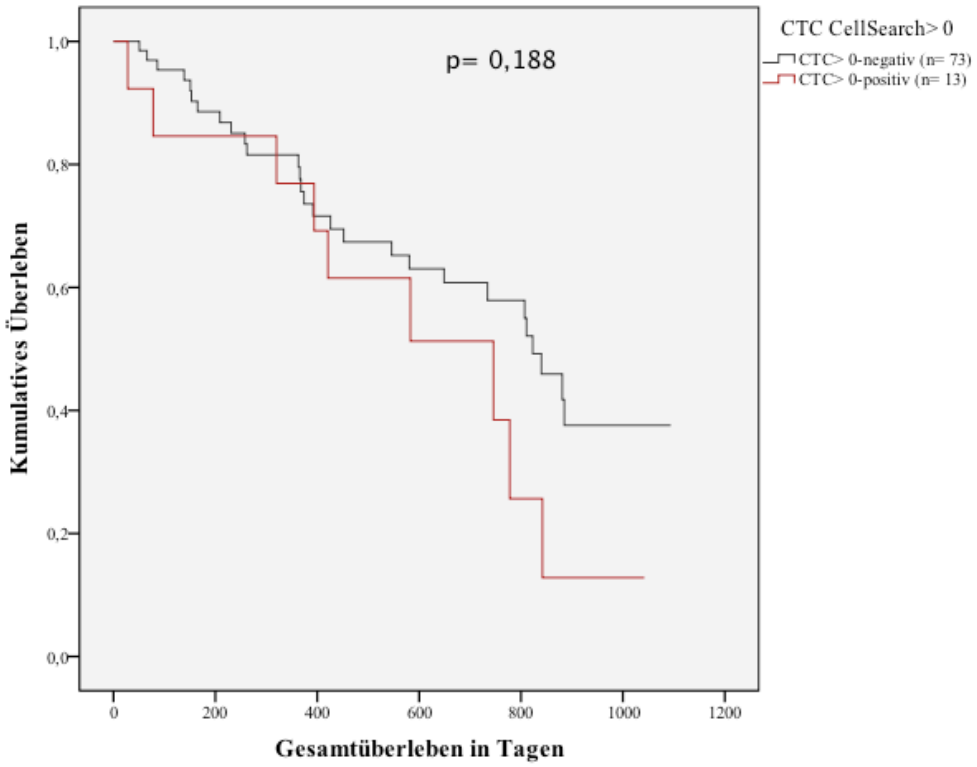

Abbildung 28 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC CellSearch*> 0 und Gesamtüberleben

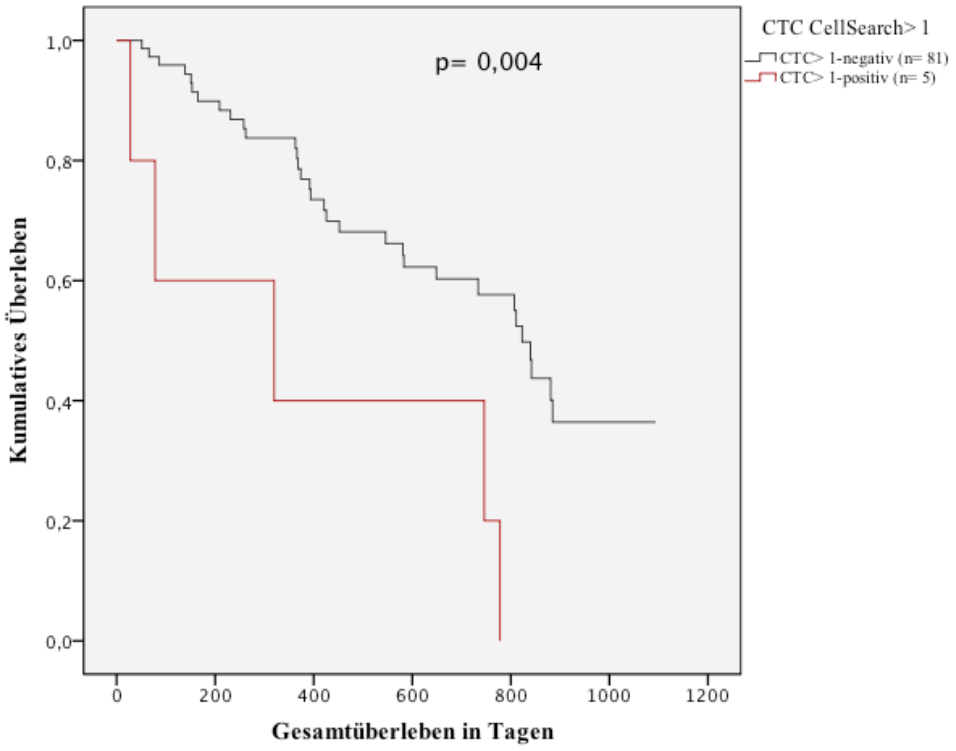

Abbildung 29 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* CellSearch> 1 und Gesamtüberleben

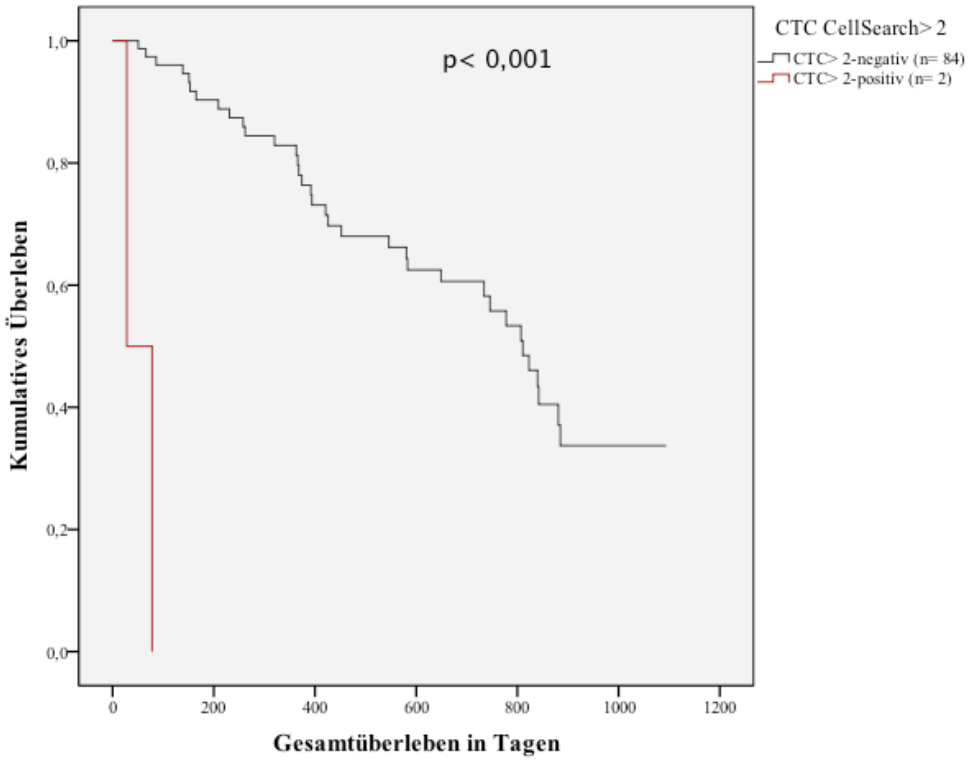

Abbildung 30 Kaplan-Meier-Kurve für *CTC* CellSearch> 2 und Gesamtüberleben

4.6 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie

Von 119 Patienten hatten 31 (26.1 %) ein Plattenepithelkarzinom (Englisch: *Squamous Cell Carcinoma*, kurz: *SCC*), 84 (70,6 %) ein Adenokarzinom (Englisch *Adenocarcinoma*, kurz: *AC*), 2 ein anaplastisches Karzinom (1,7 %) und 2 (1,7 %) ein gemischtes Plattenepithel-Adenokarzinom. In den folgenden Berechnungen untersuchten wir Patienten mit Adenokarzinom und Patienten mit Plattenepithelkarzinom als eigenständige Gruppen von insgesamt 115 Patienten.
Wir untersuchten die Zusammenhänge zwischen *CTCs*, welche wir mit der Ariol-/ *CellSearch*-Methode fanden und den klinischen Parametern für Patienten mit Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom und führten anschließend eine Überlebensanalyse mit dem Log-rank-Test durch.

4.6.1 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie für klinische Parameter und *CTC* (Ariol)

Von den 115 Patienten entfielen 4 Patienten der Auswertung, da hier das *CTC*-Ergebnis fehlte. Somit standen 111 Patienten für diese Subgruppen-Analyse zur Verfügung. Von den 111 Patienten hatten 80 ein Adenokarzinom und 31 ein Plattenkarzinom. Bei 4 von 31 (12,9 %) Patienten mit Plattenepithelkarzinom fanden wir *CTCs*. Siebenundzwanzig Patienten hatten keine *CTCs* im Blut. Von 80 Adenokarzinom-Patienten fanden sich bei 14 (17,5 %) Patienten Tumorzellen, die Blutproben der übrigen 66 Patientenblutproben fielen negativ aus (Tabelle 27).

Tabelle 27 Histologie und *CTC* Ariol

Histologie-Typ	*CTC* Ariol negativ	*CTC* Ariol positiv	Gesamtsumme
SCC	27 (87,1 %)	4 (12,9 %)	31
AC	66 (82,5 %)	14 (17,5 %)	80
Gesamtsumme	93 (83,8 %)	18 (16,2 %)	111

SCC=Plattenepithelkarzinom, *AC*=Adenokarzinom

Bei den Patienten mit Adenokarzinom fanden sich signifikante Zusammenhänge zwischen zirkulierenden Tumorzellen und der Tumoreindringtiefe (p= 0,007, Exakter Test nach Fisher), Metastasierung (p= 0,037, Exakter Test nach Fisher) und dem UICC-Stadium (p= 0,006, Exakter Test nach Fisher). In der Gruppe mit Patienten mit Plattenepithelkarzinom fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 28).

Tabelle 28 *CTC* und klinisch-pathologische Parameter in der Subgruppe Histologie (Ariol)

Merkmal	*AC*	*CTC* > 0	p-Wert	*SCC*	*CTC*> 0	p-Wert
Alle	80	14 (17,5 %)		31	4 (12,9 %)	
Alter			1,000			0,601
≤ 60 Jahre	31	5 (16,1 %)		11	2 (18,2 %)	
> 60 Jahre	49	9 (18,4 %)		20	2 (10,0 %)	
Geschlecht			1,000			1,000
Männlich	69	12 (17,4 %)		21	3 (14,3 %)	
Weiblich	11	2 (18,2 %)		10	1 (10,0%)	

Tumorgröße			0,007			0,499
T1	23	0 (0,0 %)		7	1 (14,3 %)	
T2	13	2 (15,4 %)		8	0 (0,0 %)	
T3	31	7 (22,6 %)		13	3 (23,1 %)	
T4	12	5 (41,7 %)		3	0 (0,0 %)	
Fehlend	1					
Lymphknoten-status			0,278			0,151
N0	31	3 (9,7 %)		17	2 (11,8 %)	
N1	17	4 (23,5 %)		7	0 (0,0 %)	
N2	13	2 (15,4 %)		2	0 (0,0 %)	
N3	16	5 (31,3 %)		4	2 (50,0 %)	
Fehlend	3			1		
Metastasierung			0,037			1,000
M0	74	11 (14,9 %)		30	4 (13,3 %)	
M1	5	3 (60,0 %)		1	0 (0,0 %)	
Fehlend	1					
UICC			0,006			0,710
0	0	0 (0,0 %)		2	0 (0,0 %)	
I	22	0 (0,0 %)		7	0 (0,0 %)	
II	10	3 (30,0 %)		10	2 (20,0 %)	
III	39	7 (17,9 %)		9	2 (22,2 %)	
IV	9	4 (44,4 %)		3	0 (0,0 %)	
Differenzierungs-grad			0,206			1,000
1	9	0 (0,0 %)		3	0 (0,0 %)	
2	27	4 (14,8 %)		19	3 (15,8 %)	
3	35	10 (28,6 %)		7	1 (14,3 %)	
4	1	0 (0,0 %)		0	0 (0,0 %)	
Fehlend	8			2		
Resektionsrand			0,647			0,360
R0	67	11 (16,4 %)		27	3 (11,1 %)	
R1	9	2 (22,2 %)		3	1 (33,3 %)	
Fehlend	4	1		1		
Resektion			0,544			1,000
Ja	76	13 (17,1 %)		30	4 (13,3 %)	
Nein	4	1 (25,0 %)		1	0 (0,0 %)	

SCC=Plattenepithelkarzinom, *AC*=Adenokarzinom

4.6.2 Subgruppen-Analyse in Bezug auf die Histologie für klinische Parameter und *CTC* (*CellSearch*)

Von den 115 Patienten schlug die *CTC*-Auswertung bei 18 Patienten fehl. Von den übrigen 101 Patienten hatte ein Patient ein anaplastisches und einer ein gemischtes Adeno-Plattenepithelkarzinom. Somit standen 98 Patienten für die *CellSearch*-Histologie-Subgruppenanalyse zur Verfügung. In dieser Gruppe fanden sich 29 Patienten mit Plattenepithelkarzinom und 69 mit Adenokarzinom. Von den 29 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom fanden sich bei 3 (10,3 %) Patienten *CTCs*. 69 Patienten hatten ein Adenokarzinom, 14 (20,3 %) davon hatten *CTCs* (Tabelle 29).

Tabelle 29 Histologie und CTC *CellSearch*

Histologie-Typ	*CTC CS* negativ	*CTC CS* positiv	Gesamtsumme
SCC	26 (89,7 %)	3 (10,3 %)	29
AC	55 (79,7 %)	14 (20,3 %)	69
Gesamtsumme	81 (82,7 %)	17 (17,3 %)	98

SCC=Plattenepithelkarzinom, *AC*=Adenokarzinom, *CS*=*CellSearch*

Bei Patienten mit Adenokarzinom zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den *CTCs* und der Tumoreindringtiefe (p= 0,024, Exakter Test nach Fisher) sowie bei der Metastasierung (p= 0,025, Exakter Test nach Fisher). Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *CTCs* und dem Geschlecht (p= 0,023, Exakter Test nach Fisher). So fanden sich bei 20 Männern keine *CTCs*, während 3 von 9 Frauen *CTCs* hatten (Tabelle 30).

Tabelle 30 *CTC* und klinisch-pathologische Parameter in der Subgruppe Histologie (*CellSearch*)

Merkmal	*AC*	*CTC* > 0	p-Wert	*SCC*	*CTC*> 0	p-Wert
Alle	69	14 (20,3 %)		29	3 (10,3%)	
Alter			0,219			0,268
≤ 60 Jahre	27	3 (11,1 %)		11	0 (0,0 %)	
> 60 Jahre	42	11 (26,2 %)		18	3 (16,7 %)	
Geschlecht			0,436			0,023
Männlich	57	13 (22,8 %)		20	0 (0,0 %)	
Weiblich	12	1 (8,3 %)		6	3 (33,3 %)	
Tumorgröße			0,024			0,842
T1	18	3 (16,7 %)		6	0 (0,0 %)	
T2	12	0 (0,0 %)		8	1 (12,5 %)	
T3	27	5 (18,5 %)		12	2 (16,7 %)	
T4	12	6 (50 %)		3	0 (0,0 %)	
Fehlend	0			0		
Lymphknoten-status			0,192			0,744
N0	30	5 (16,7 %)		16	3 (18,8 %)	
N1	11	1 (9,1 %)		7	0 (0,0 %)	
N2	13	2 (15,4 %)		2	0 (0,0 %)	
N3	14	6 (42,9 %)		3	0 (0,0 %)	
Fehlend	1			1		
Metastasierung			0,025			1,000
M0	64	11 (17,2 %)		28	3 (10,7 %)	
M1	4	3 (75,0 %)		1	0 (0,0 %)	
Fehlend	1					
UICC			0,222			1,000
0	0	0 (0,0 %)		0	0 (0,0 %)	
I	19	3 (15,8 %)		7	1 (14,3 %)	
II	8	1 (12,5 %)		9	1 (11,1 %)	
III	34	6 (17,6 %)		8	1 (12,5 %)	
IV	8	4 (50,0 %)		3	0 (0,0 %)	

Differenzierungs-grad			0,905			0,428
1	7	1 (14,3 %)		3	0 (0,0 %)	
2	22	4 (18,2 %)		18	2 (11,1 %)	
3	33	8 (24,2 %)		6	1 (16,7 %)	
4	0	0 (0,0 %)		0	0 (0,0 %)	
Fehlend	7	1		2	0	
Resektionsrand			0,394			1,000
R0	57	10 (17,5 %)		25	3 (12,0 %)	
R1	10	3 (30,0 %)		3	0 (0,0 %)	
Fehlend	2	1		1		
Resektion			0,367			1,000
Ja	67	13 (19,4 %)		28	3 (10,7 %)	
Nein	2	1 (50,0 %)		1	0 (0,0 %)	

SCC=Plattenepithelkarzinom, *AC*=Adenokarzinom, *CS*=*CellSearch*

4.6.3 Überlebensanalyse bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom

Es wurden 24 Patienten in die Überlebensanalyse miteinbezogen.

Univariater Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom waren die Unterschiede zwischen den progressionsfreien Zeiten im Log-rank-Test bei den Merkmalen Lymphknotenstatus (p= 0,008, Log-rank-Test) und Metastasen (p< 0,001, Log-rank-Test) und Resektion (p< 0,001, Log-rank-Test) signifikant (Tabelle 31).

Tabelle 31 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom

Merkmal	Signifikanz	p-Wert des Log-rank Tests
Tumoreindringtiefe*	Nein	0,195
Lymphknoten	Ja	0,008
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,612
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,132
Resektion	Ja	< 0,001
Resektionsrand	Nein	0,550
Zweittumor	Nein	0,589
UICC**	Nein	0,093

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC1, UICC2, UICC3 und UICC4 gruppiert

Univariate Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben (Ariol)

Die Überlebenszeiten für die Merkmale *CTC* Ariol> 0 und *CTC* Ariol> 1 unterschieden sich nicht signifikant von den Überlebenszeiten der Patienten ohne Tumorzellen.
Für *CTC* Ariol> 2 konnte kein Log-rank-Test berechnet werden, da es keine gültigen Fälle mit Patienten mit *CTC* Ariol> 2 gab (Tabelle 32). Es gab nur einen Patienten, welcher zwar mehr als zwei *CTCs* im Blut hatte, jedoch an postoperativen Komplikationen verstarb und

deswegen nicht für die Überlebensanalyse zur Verfügung stand.

Tabelle 32 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert des Log-rank Tests
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,248
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,861
***CTC* Ariol> 2**	Keine Fälle	-

Univariate Log-rank-Analyse für das progressionsfreie Überleben (*CellSearch*)

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom waren die Unterschiede zwischen den progressionsfreien Zeiten im Log-rank-Test bei dem Merkmal *CTC CellSearch*> 0 (p= 0,037, Log-rank-Test) signifikant. Für die Merkmale *CTC CellSearch*> 1 und *CTC CellSearch*> 2 konnte kein Log-rank-Test berechnet werden, da es keine gültigen Fälle mit Patienten mit *CTC CellSearch*> 1/ *CTC CellSearch*> 2 in den Subgruppen gab (Tabelle 33). Es gab nur einen Patienten, der mehr als eine *CTC CellSearch*> 1 hatte, und dieser verstarb an postoperativen Komplikationen und wurde deswegen aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen.

Tabelle 33 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Ja	0,037
***CTC CellSearch*> 1**	Keine Fälle	-
***CTC CellSearch*> 2**	Keine Fälle	-

Log-rank-Test für das Gesamtüberleben für klinische Parameter

Im Gesamtüberleben zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Tumoreindringtiefe (p= 0,032, Log-rank-Test), dem Lymphknotenstatus (p< 0,001, Log-rank-Test), dem Metastasenstatus (p< 0,001, Log-rank-Test), Resektion (p< 0,001, Log-rank-Test) und dem Tumorstadium (p= 0,007, Log-rank-Test). In den Gruppen der Patienten mit *CTC* Ariol> 2, *CTC CellSearch*> 1, *CTC CellSearch*> 2 gab es keine Fälle und somit konnte kein Log-rank-Test durchgeführt werden (Tabelle 34).

Tabelle 34 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	0,032
Lymphknoten	Ja	< 0,001
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,752
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,675
Resektion	Ja	< 0,001
Resektionsrand	Nein	0,790
Zweittumor	Nein	0,645
UICC**	Ja	0,007

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC1, UICC2, UICC3 und UICC4 gruppiert

Univariate Log-rank-Analyse für das Gesamtüberleben (Ariol)

Unabhängig von der Anzahl der *CTCs* ergaben sich bei den Gesamtüberlebenszeiten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit Patienten ohne *CTCs*. In der Gruppe der Patienten mit *CTC* Ariol> 2 gab es keine Fälle und somit konnte kein Log-rank-Test durchgeführt werden (Tabelle 35).

Tabelle 35 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,879
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,747
***CTC* Ariol> 2**	Keine Fälle	-

Log-rank-Analyse für das Gesamtüberleben (*CellSearch*)

Bei der Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit *CTC*> 0 gab es keinen signifikanten Unterschied verglichen mit *CTC*-freien Patienten. In den Gruppen der Patienten mit *CTC CellSearch*> 1 und *CTC CellSearch*> 2 gab es keine Fälle und somit konnte kein Log-rank-Test durchgeführt werden (Tabelle 36).

Tabelle 36 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,127
***CTC CellSearch*> 1**	Keine Fälle	-
***CTC CellSearch*> 2**	Keine Fälle	-

4.6.4 Univariate Überlebensanalyse bei Patienten mit Adenokarzinom

Es wurden 70 Patienten in die Überlebensanalyse mit einbezogen.

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Bei Patienten mit Adenokarzinom waren die Unterschiede zwischen den progressionsfreien Zeiten im Log-rank-Test bei den Merkmalen Tumoreindringtiefe (p= 0,001, Log-rank-Test) Lymphknotenstatus (p= 0,006, Log-rank-Test), Metastasen (p< 0,001, Log-rank-Test), Alter (über oder unter 60 Jahren) (p= 0,006, Log-rank-Test) und UICC (p< 0,001, Log-rank-Test) signifikant (Tabelle 37).

Tabelle 37 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Adenokarzinom

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	0,001
Lymphknoten	Ja	0,006
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,399
Alter (über oder unter 60Jahren)	Ja	0,006
Resektion		

Resektionsrand	Nein	0,210
Zweittumor	Nein	0,066
UICC**	Ja	< 0,001

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC1, UICC2, UICC3 und UICC4 gruppiert

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (Ariol)

Patienten mit Adenokarzinom und mehr als 2 *CTCs* im Blut erlitten signifikant schneller ein Fortschreiten der Tumorerkrankung als Patienten ohne *CTCs* (p= 0,045, Log-rank-Test). Bei Patienten mit weniger als 2 *CTCs* im Blut zeigten sich in den progressionsfreien Überlebenszeiten keine Unterschiede zu den *CTC*-freien Patienten (Tabelle 38).

Tabelle 38 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei den Patienten mit Adenokarzinom (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,191
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,349
***CTC* Ariol> 2**	Ja	0,045

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (*CellSearch*)

Patienten mit Adenokarzinom und mehr als einer *CTC* im Blut (*CTC*> 1 (p= 0,016, Log-rank-Test) und *CTC*> 2 (p< 0,001, Log-rank-Test)) erlitten signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben als Patienten ohne *CTCs* und als Patienten, bei denen das *CTC*-Ergebnis ab einer gefundenen *CTC* (*CTC*> 0) als positiv gewertet wurde (Tabelle 39).

Tabelle 39 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit Adenokarzinom (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,254
***CTC CellSearch*> 1**	Ja	0,016
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

Log-rank-Test für das gesamte Überleben für klinische Parameter

Bei Patienten mit Adenokarzinom waren die Unterschiede zwischen den Überlebenszeiten im Log-rank Test bei den Merkmalen Tumoreindringtiefe (p< 0,001, Log-rank-Test), Lymphknotenstatus (P= 0,005, Log-rank-Test), Metastasen (p= 0,001, Log-rank-Test), UICC (p= 0,001, Log-rank-Test) und Resektionsrand (p< 0,001, Log-rank-Test) signifikant (Tabelle 40).

Tabelle 40 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Adenokarzinom

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	< 0,001
Lymphknoten	Ja	0,005
Metastasen	Ja	0,001
Geschlecht	Nein	0,051
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,004
Resektion	Nein	0,330

Resektionsrand	Ja	< 0,001
Zweittumor	Nein	0,084
UICC**	Ja	0,001

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.
** Das UICC-Stadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in UICC0, UICC1, UICC2, UICC3 und UICC4 gruppiert

Log-rank Test für das Gesamtüberleben (Ariol)

Patienten mit Adenokarzinom und mehr als 2 *CTCs* (p= 0,002, Log-rank-Test) im Blut verstarben signifikant häufiger an der Tumorerkrankung als Patienten ohne *CTCs*. Bei Patienten mit *CTC*> 0 und *CTC*> 1 im Blut zeigten sich im Gesamtüberleben kein Unterschied zu den *CTC*-freien Patienten (Tabelle 41).

Tabelle 41 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Adenokarzinom (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,076
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,275
***CTC* Ariol> 2**	Ja	0,002

Log-rank Test für das Gesamtüberleben (*CellSearch*)

In den Gruppen von Patienten welche mehr als eine *CTC* (p= 0,005, Log-rank-Test) oder mehr als 2 *CTCs* (p< 0,001, Log-rank-Test) im Blut hatten, zeigte sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben. Patienten mit mehr als 0 *CTCs* im Blut unterschieden sich in der Gesamtüberlebenszeit nicht signifikant von Patienten ohne *CTCs* (Tabelle 42).

Tabelle 42 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Adenokarzinom (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,127
***CTC CellSearch*> 1**	Ja	0,005
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

4.7 Subgruppen-Analyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus

Insgesamt erhielten 114 Patienten eine Lymphknotenresektion.
52 (43,7 %) Patienten hatten den Lymphknotenstatus N0, 25 (21,0 %) N1, 17 (14,3 %) N2, 20 (26,8 %) N3. Bei 5 (4,2 %) Patienten wurden die Lymphknoten nicht reseziert.
Patienten mit positiven Lymphknoten erhielten von uns die Abkürzung LK+, Patienten ohne befallene Lymphknoten LK0.

4.7.1 Subgruppen-Analyse in Bezug auf Lymphknotenstatus für klinische Parameter und *CTC* (Ariol)

Von den 114 Patienten, bei denen eine Lymphknotenresektion durchgeführt wurde, gelang es bei 110 das Blut auf *CTCs* zu untersuchen. In dieser Gruppe hatten 60 Patienten befallene Lymphknoten. Von diesen 60 Patienten hatten 13 Patienten (21,7 %) Tumorzellen im Blut während es bei der Gruppe ohne befallene Lymphknoten (n= 50) nur 5 Patienten (10,0 %) waren (Tabelle 43). Zwischen den beiden Gruppen ergab sich im Chi-Quadrat-Test jedoch

kein signifikanter Unterschied (p= 0,810, Exakter Test nach Fisher).

Tabelle 43 Lymphknotenstatus und *CTC* (Ariol)

Lymphknotenstatus	*CTC* negativ	*CTC* positiv	Gesamtsumme
LK0	45 (90,0 %)	5 (10,0 %)	50
LK+	47 (77,0 %)	13 (21,7 %)	60
Gesamtsumme	92 (83,6 %)	19 (16,4 %)	110

LK0= keine positiven Lymphknoten, LK+= positive Lymphknoten

Bei Patienten ohne befallene Lymphknoten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen zirkulierenden Tumorzellen und der Tumoreindringtiefe (p= 0,002, Exakter Test nach Fisher).
Bei Patienten mit positiven Lymphknoten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Metastasen (p= 0,044, Exakter Test nach Fisher)(Tabelle 44).

Tabelle 44 *CTC* und klinisch-pathologische Parameter in der Subgruppe Lymphknotenstatus (Ariol)

Merkmal	LK0	*CTC* > 0	p-Wert	LK+	CTC> 0	p-Wert
Alle	50	5 (10,0 %)		60	13 (21,7 %)	
Alter			1,000			0,520
≤ 60 Jahre	18	2 (11,1 %)		22	6 (27,3 %)	
> 60 Jahre	32	3 (9,4 %)		38	7 (18,4 %)	
Geschlecht			1,000			1,000
Männlich	40	4 (10,0 %)		47	10 (21,3 %)	
Weiblich	10	1 (10,0 %)		13	3 (23,1 %)	
Tumorgröße			0,002			0,642
T1	24	0 (0,0 %)		7	1 (14,3 %)	
T2	11	0 (0,0 %)		10	2 (20,0 %)	
T3	14	5 (35,7 %)		32	6 (18,8 %)	
T4	1	0 (0,0 %)		11	4 (36,4 %)	
Fehlend						
Histologie			1,000			0,716
SCC	17	2 (11,8 %)		13	2 (15,4 %)	
AC	31	3 (9,7 %)		45	10 (22,2 %)	
Fehlend	2			2		
Metastasierung			1,000			0,044
M0	49	5 (10,2 %)		58	11 (19,0 %)	
M1	1	0 (0,0 %)		2	2 (100 %)	
Fehlend						
Differenzierungs-grad			0,719			0,535
1	9	0 (0,0 %)		2	0 (0,0 %)	
2	24	3 (12,5 %)		22	4 (18,2 %)	
3	13	2 (15,4 %)		27	8 (29,6 %)	
4	1	0 (0,0 %)		2	1 (50 %)	
Fehlend	3			7		
Resektionsrand			1,000			0,675
R0	48	5 (10,4 %)		50	10 (20,0 %)	
R1	2	0 (0,0 %)		10	3 (30,0 %)	
Fehlend						

Resektion				
Ja	50	5 (10,0 %)	60	13 (21,7 %)
Nein	0	0 (0,0 %)	0	0 (0,0 %)

4.7.2 Subgruppen-Analyse in Bezug auf Lymphknotenstatus für klinische Parameter und *CTC* (*CellSearch*)

Von den 115 Lymphknoten-resezierten Patienten entfielen 17 Patienten den folgenden Berechnungen, da kein *CTC*-Status bestimmt werden konnte. Bei den restlichen 98 Patienten fanden wir bei der LK0-Gruppe bei 8 (17,0 %) von 47 Patienten *CTCs*. Bei den 51 LK+-Patienten fanden wir bei 9 (17,6 %) Patienten *CTCs* (Tabelle 45). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war im Chi-Quadrat-Test nicht signifikant.

Tabelle 45 Lymphknotenstatus und *CTC* (*CellSearch*)

Lymphknotenstatus	*CTC* negativ	*CTC* positiv	Gesamtsumme
LK0	39 (83,0 %)	8 (17,0 %)	47
LK+	42 (82,4 %)	9 (17,6 %)	51
Gesamtsumme	81 (82,7 %)	17 (17,3 %)	98

LK0= keine positiven Lymphknoten, LK+= positive Lymphknoten, *CS=CellSearch*

Bei den Lymphknoten-negativen Patienten gab es keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede zwischen Patienten mit *CTCs* und Patienten ohne *CTCs*. In der Gruppe von Patienten mit positiven Lymphknoten fanden sich signifikante Zusammenhänge zwischen *CTCs* und der Tumorgröße (p= 0,001, Exakter Test nach Fisher), Metastasierung (p= 0,005, Exakter Test nach Fisher) und dem Differenzierungsgrad (p= 0,003, Exakter Test nach Fisher) (Tabelle 46).

Tabelle 46 *CTC* und klinisch-pathologische Parameter in der Subgruppe Lymphknotenstatus (*CellSearch*)

Merkmal	N0	*CTC* > 0	p-Wert	N+	CTC> 0	p-Wert
Alle	47	8 (17,0 %)		51	9 (17,6 %)	
Alter			0,130			1,000
≤ 60 Jahre	18	1 (5,6 %)		19	3 (15,8 %)	
> 60 Jahre	29	7 (24,1 %)		32	6 (18,8 %)	
Geschlecht			0,073			0,666
Männlich	36	4 (11,1 %)		39	8 (20,5 %)	
Weiblich	11	4 (36,4 %)		12	1 (8,3 %)	
Tumorgröße			0,623			0,001
T1	20	3 (15,0 %)		4	0 (0,0 %)	
T2	11	1 (9,1 %)		9	0 (0,0 %)	
T3	15	4 (26,7 %)		27	4 (14,8 %)	
T4	1	0 (0 %)		11	5 (45,5 %)	
Fehlend						
Histologie			1,000			0,173
AC	16	3 (18,8 %)		12	0 (0,0 %)	
SCC	30	5 (16,7 %)		37	8 (21,6 %)	
Fehlend	1			2	1	

Metastasierung			1,000			0,005
M0	46	8 (17,4 %)		49	7 (14,3 %)	
M1	1	0 (0,0 %)		2	2 (100 %)	
Fehlend						
Differenzierungs-grad			0,422			0,003
1	7	1 (14,3 %)		2	0 (0,0 %)	
2	21	6 (28,6 %)		19	0 (0,0 %)	
3	15	1 (6,7 %)		23	7 (30,4 %)	
4	1	0 (0,0 %)		1	1 (100 %)	
Fehlend	3			6	1	
Resektionsrand			1,000			0,353
R0	44	8 (18,2 %)		41	6 (14,6 %)	
R1	3	0 (0,0 %)		10	3 (30,0 %)	
Fehlend						
Resektion						
Ja	47	8 (17,0 %)		51	9 (17,6 %)	
Nein	0	0 (0,0 %)		0	0 (100 %)	

4.7.3 Univariate Überlebensanalyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus

Mit Hilfe des Log-rank-Tests verglichen wir die Überlebenszeiten für progressionsfreies und gesamtes Überleben in Bezug auf Tumoreindringtiefe, Lymphknoten, Metastasen, Geschlecht, Alter, Resektion, Resektionsrand, Zweittumor, *CTC* Ariol> 0, *CTC* Ariol> 1, *CTC* Ariol> 2, *CTC CellSearch*> 0, *CTC CellSearch*> 1 und *CTC CellSearch*> 2. Die Analyse führten wir für Patienten mit und Patienten ohne Tumor-befallene Lymphknoten durch.

4.7.3.1 Univariate Überlebensanalyse bei Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (LK0)

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Die Merkmale Tumoreindringtiefe (p= 0,035, Log-rank-Test), Metastasierung (p= 0,019, Log-rank-Test), Resektionsrand (p= 0,025, Log-rank-Test) und Zweittumor (p= 0,003, Log-rank-Test) hatten einen signifikanten Einfluss auf die progressionsfreie Überlebenszeit. In der Gruppe Resektion konnte keine Analyse berechnet werden, da es keine Ereignisse gab (Tabelle 47).

Tabelle 47 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten ohne tumorbefallenen Lymphknoten

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	0,035
Histologie	Nein	0,952
Metastasen	Ja	0,019
Geschlecht	Nein	0,383
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,176
Resektion	Kein Ereignis	-
Resektionsrand	Ja	0,025
Zweittumor	Ja	0,003

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (Ariol)

Zwischen Patienten mit und ohne *CTCs* im Blut ergaben sich unabhängig von dem *Cut-off*-Wert keine signifikanten Unterschiede im progressionsfreien Überleben (Tabelle 48).

Tabelle 48 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten ohne tumorbefallene Lymphknoten (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,750
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,510
***CTC* Ariol> 2**	Nein	0,200

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (*CellSearch*)

Zwischen Patienten mit und ohne *CTCs* im Blut ergaben sich, unabhängig von dem *Cut-off*-Wert, keine signifikanten Unterschiede im progressionsfreien Überleben (Tabelle 32). Es gab keine Patienten in dieser Überlebensanalyse, welche mehr als 2 *CTCs* im Blut hatten (Tabelle 49).

Tabelle 49 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten ohne tumorbefallene Lymphknoten (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,199
***CTC CellSearch*> 1**	Nein	0,530
***CTC CellSearch*> 2**	Kein Fälle	-

Log-rank-Test für das Gesamtüberleben für klinische Parameter

Der Unterschied zwischen den Überlebenszeiten in den Gruppen Tumoreindringtiefe (p= 0,005, Log-rank-Test), Metastasierung (p< 0,001, Log-rank-Test), Resektionsrand (p= 0,004, Log-rank-Test), Zweittumor (p< 0,001, Log-rank-Test), Alter (p= 0,042, Log-rank-Test) und dem UICC-Stadium (p< 0,001, Log-rank-Test) unterschied sich signifikant von den Referenzgruppen. In der Gruppe Resektion konnte keine Analyse berechnet werden, da es keine Fälle gab (Tabelle 50).

Tabelle 50 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten ohne tumorbefallene Lymphknoten

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Ja	0,005
Histologie	Nein	0,488
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,092
Alter (über oder unter 60Jahren)	Ja	0,042
Resektion	Keine Fälle	-
Resektionsrand	Ja	0,004
Zweittumor	Ja	< 0,001

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.

Log-rank-Test für das Gesamtüberleben (Ariol)

Bei den Patienten mit mehr als 2 *CTCs* im Blut war die Gesamtüberlebenszeit signifikant kürzer als in der Vergleichsgruppe (p= 0,035, Log-rank-Test) (Tabelle 51).

Tabelle 51 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten ohne tumorbefallene Lymphknoten (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,286
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,185
***CTC* Ariol> 2**	Ja	0,035

Log-rank-Test für das Gesamtüberleben (*CellSearch*)

Das Gesamtüberleben der Patienten mit *CTC*> 0 und *CTC*> 1 unterschied sich nicht signifikant von den Vergleichsgruppen. Für *CTC*> 2 konnte kein Log-rank-Test berechnet werden, da es keine Fälle gab (Tabelle 52).

Tabelle 52 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten ohne tumorbefallene Lymphknoten (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,218
***CTC CellSearch*> 1**	Nein	0,358
***CTC CellSearch*> 2**	Keine Fälle	-

4.7.3.2 Univariate Überlebensanalyse bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben für klinische Parameter

Der Unterschied zwischen den Überlebenszeiten bei Patienten mit und ohne Metastasen (p= 0,010, Log-rank-Test) war signifikant. Kein Ergebnis konnte in der Gruppe Resektion berechnet werden, da es zu keinem Ereignis kam (Tabelle 53).

Tabelle 53 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Nein	0,305
Histologie	Nein	0,757
Metastasen	Ja	0,010
Geschlecht	Nein	0,658
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,325
Resektionsrand	Nein	0,500
Zweittumor	Nein	0,564

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (Ariol)

Unabhängig von den *Cut-off*-Werten zeigten sich in den progressionsfreien Überlebenszeiten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 54).

Tabelle 54 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten

(Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,508
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,867
***CTC* Ariol> 2**	Nein	0,631

Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben (*CellSearch*)

Fanden sich mehr als 2 *CTCs* im Blut von Patienten, so unterschied sich die progressionsfreie Überlebenszeit signifikant von der von Patienten mit weniger als 2 *CTCs* im Blut (p< 0,001, Log-rank-Test) (Tabelle 55).

Tabelle 55 Log-rank-Test für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten (*CellSearch*)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,115
***CTC CellSearch*> 1**	Nein	0,149
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit positiven Lymphknoten für klinische Parameter

Der Unterschied zwischen den Überlebenszeiten in der Gruppe Metastasierung (p< 0,001, Log-rank-Test) war signifikant. In der Gruppe Resektion konnte keine Analyse berechnet werden, da es keine Fälle gab (Tabelle 56).

Tabelle 56 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
Tumoreindringtiefe*	Nein	0,304
Histologie	Nein	0,558
Metastasen	Ja	< 0,001
Geschlecht	Nein	0,938
Alter (über oder unter 60Jahren)	Nein	0,069
Resektion	Keine Fälle	-
Resektionsrand	Nein	0,548
Zweittumor	Nein	0,999

*Das Tumorstadium wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen in T1, T2, T3 und T4 zusammengefasst.

Log-rank Test für das Gesamtüberleben (Ariol)

Unabhängig von den Cut-off-Werten zeigten sich in den Gesamtüberlebenszeiten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 57).

Tabelle 57 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten (Ariol)

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC* Ariol> 0**	Nein	0,796
***CTC* Ariol> 1**	Nein	0,841
***CTC* Ariol> 2**	Nein	0,136

Log-rank Test für das Gesamtüberleben (*CellSearch*)

Fanden sich mehr als 2 *CTCs* im Blut von Patienten, so unterschieden sich die Gesamtüberlebenszeiten signifikant von der von Patienten mit weniger als 2 *CTCs* im Blut ($p < 0{,}001$, Log-rank-Test) (Tabelle 58).

Tabelle 58 Log-rank-Test für das Gesamtüberleben bei Patienten mit tumorbefallenen Lymphknoten

Merkmal	Signifikanz	p-Wert
***CTC CellSearch*> 0**	Nein	0,644
***CTC CellSearch*> 1**	Nein	0,089
***CTC CellSearch*> 2**	Ja	< 0,001

5 Diskussion

5.1 Die Studie

Trotz aktueller umfangreicher präoperativer *Staging*-Methoden ist das Überleben von kurativ operierten Ösophaguskarzinom-Patienten schlecht (Bancewicz *et al.*, 2002). Die Erweiterung der *Staging*-Verfahren um zusätzliche, sensitive Methoden erscheint notwendig. *CTCs* haben bei bestimmten Tumoren eine prognostische Relevanz (Cohen *et al.*, 2008; Cristofanilli, 2004; de Bono *et al.*, 2008) und könnten potentiell auch beim Ösophaguskarzinom zu einem akkurateren Einschätzen der Aggressivität der Erkrankung beitragen.
Nach aktuellem Kenntnisstand ist dies die größte Studie zur präoperativen Detektion von *CTCs* mittels immunomagnetischer Techniken bei Ösophaguskarzinom-Patienten und Methoden-unabhängig die zweitgrößte Studie zu *CTCs* beim Ösophaguskarzinom allgemein. Von den bisher durchgeführten Studien betrachtet diese Arbeit zusätzlich die größte Kohorte an Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus.
Zwei verschiedene immunomagnetische Verfahren wurden verglichen, die *CellSearch*-Methode, welche sich bereits bei anderen Karzinomen als diagnostisches Instrument bewährt hat, sowie die Ariol-Methode, welche einen zusätzlichen *Catcher*-Antikörper verwendet. Aufgrund der bekannten Heterogenität von Tumorzellen und basierend auf den Ergebnissen einer vorhergehenden Studie wurde durch den zusätzlichen Antikörper bei der Ariol-Methode von einer höheren *CTC*-Detektionsrate ausgegangen (Deng *et al.*, 2008).
Obwohl diese Arbeit im Vergleich zu den anderen *CTC*-Studien beim Ösophaguskarzinom ein umfangreicheres Patientenkollektiv hat, ist die Aussagekraft der Ergebnisse bei einem Kollektiv von 119 Patienten dennoch eingeschränkt.
Durch die Analyse von Patientensubgruppen, wie es zum Beispiel beim T- oder UICC-Stadium notwendig ist, werden die Zahlen pro Gruppe teilweise zu gering, um eine von anderen Risikofaktoren unabhängige Statistik im Rahmen einer multivariaten Überlebensanalyse durchzuführen.
Das Ösophaguskarzinom ist im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, ein seltener Tumor. Die Größe unseres Kollektivs ist dadurch bedingt, dass sich trotz zweijähriger Laufzeit der Studie nur durchschnittlich ein Patient pro Woche zur Ösophagektomie bei Ösophaguskarzinom vorgestellt hat. Es wurde zudem eine monozentrische Studie durchgeführt, also eine ausschließliche Untersuchung von Patienten, welche sich im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf vorgestellt haben.
Um den sicheren prognostischen Wert dieser Ergebnisse zu bestätigen wird es nötig sein, multizentrische Studien mit größeren Patientenkollektiven durchzuführen. Doch um die Motivation und Rechtfertigung für eine große multizentrische Studie zu schaffen, sind Ergebnisse aus kleineren Studiendesignen notwendig. Die *CTC*-Forschung zum Mammakarzinom hat ebenfalls mit kleineren Forschungen begonnen und sich, angefangen von monozentrischen über multizentrische Studien und Metaanalysen hin zu klinisch-therapeutischen Studien, wie beispielweise den DETECT und GEPAR Studien, gesteigert (Alix-Panabières and Pantel, 2016; Riethdorf *et al.*, 2017).

5.1.1 Die Vergleichbarkeit der bisherigen *CTC*-Studien beim Ösophaguskarzinom

Die wenigen Studien zu dem Forschungsbereich Ösophaguskarzinom und *CTCs* unterscheiden sich hinsichtlich verschiedener Faktoren, und zwar der Methode, eingeschlossenes Patientenkollektiv, Histologie, Fallzahl, Statistik, Tumorstadium, Definition für *CTC*, Zeitpunkt der Materialgewinnung sowie *Cut-off*-Wert für ein positives Ergebnis und Versionen der UICC/*AJCC*-TNM-Klassifikationen. Tabelle 59 stellt einen Teil der Studien

und ihre Unterschiede dar. Nur wenige Studien benutzen das *CellSearch*-System, eine immunomagnetische Aufarbeitungsmethode. Diese Studien unterscheiden sich jedoch in anderen Aspekten ihrer Beschaffenheit von dieser Arbeit. So sind beispielsweise die Patientenzahlen geringer. Bei Hiraiwa et al. wurden 38 Patienten mit Ösophaguskarzinom eingeschlossen (Hiraiwa *et al.*, 2008). In der Arbeit von Sclafani et al. untersuchte man nicht nur Patienten mit einem Ösophaguskarzinom (n= 11), sondern auch Patienten mit Magenkarzinom. Die Überlebensanalysen wurden, sicherlich bedingt durch die geringe Stichprobe, mit der Gesamtkohorte an eingeschlossenen Patienten berechnet, statt gesondert für Ösophaguskarzinom- und Magenkarzinom-Patienten (Sclafani *et al.*, 2013). Matsushita et al. untersuchten mit 90 Patienten ein größeres Patientenkollektiv, jedoch befanden sich nur 14 der 90 Patienten in den frühen Krankheitsstadien (UICC I, UICC II) und die Mehrheit der Patienten erhielt eine Chemotherapie oder Bestrahlung, nur ein kleiner Teil (n=16) erhielt als Behandlung zusätzlich eine Operation (Matsushita *et al.*, 2015).
Bezüglich der Histologie liegt der Hauptfokus der Forschung auf dem Plattenepithelkarzinom. Sclafani et al. und Bobek et al. waren die einzigen, die das Adenokarzinom des Ösophagus untersucht haben (Sclafani *et al.*, 2013; Bobek *et al.*, 2014). Die anderen Studien untersuchten das Plattenepithelkarzinom, bis auf eine Arbeit, welche allerdings nur einen Adenokarzinom-Patienten einschloss (Hashimoto *et al*., 2008). Die vorliegende Arbeit betrachtet als erste die Bedeutung der *CTCs* bei einer größeren Kohorte Patienten mit Adenokarzinom (n=84) und bietet somit erste wichtige Einblicke in die Bedeutung von *CTCs* beim Adenokarzinom des Ösophagus.
Ein weiterer Unterschied ist das Tumorstadium. Wir untersuchten ein Patientenkollektiv, das sich circa zur Hälfte im Anfangsstadium der Erkrankung befand und auch mit kurativem Ansatz behandelt wurden. Sclafani et al. haben ausschließlich Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung untersucht, Liu et al. nur Patienten ohne Metastasen. Bei Hiraiwa et al. wurden die beiden Gruppen vermischt, es handelte sich jedoch überwiegend um Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. In unserer Arbeit befanden sich lediglich ein Zehntel (11,2 %) der Patienten im UICC-Stadium IV.
Weitere Forschungsgruppen bedienten sich bei der *CTC*-Detektion anderer Aufarbeitungsmethoden als in dieser Arbeit. Ein Großteil verwendete RT-PCR, wobei sich auch diese Studien in vielen weiteren Punkten unterscheiden.
Die Definitionen für *CTCs* waren teilweise trotz einheitlicher Aufarbeitungsmethoden verschieden, die Größe des untersuchten Patientenkollektivs variierte mit 244 (Tanaka *et al.*, 2010) bis 11 Patienten (Sclafani *et al.*, 2013) sehr stark und es gab zudem verschiedene Zeitpunkte für die Blutentnahme. So wurde zum Beispiel bei einigen Studien prä- sowie postoperatives Blut verarbeitet (Hiraiwa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010). Hierdurch wurde auch die prognostische Relevanz der *CTCs* zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Gerade im Hinblick auf die Operationsrisiken wäre vor allem ein präoperativer Prognosemarker vorteilig. *Cut-off*-Werte unterschieden sich ebenfalls. Bei den Forschungsgruppen, welche die *CellSearch*-Methode verwendeten, werteten Hiraiwa et al. ihre Proben erst als positiv, wenn sie mindestens zwei Tumorzellen fanden. Matsushita et al. werteten die Proben ab einer *CTC* als positiv (Matsushita *et al.*, 2015). Auf die *Cut-off*-Werte dieser Arbeit wird im Kapitel (5.4.) „Die *Cut-off*-Werte“ eingegangen. Bei den Arbeiten, in denen RT-PCR verwendet wurde, unterschieden sich die Tumor-spezifischen mRNSs ebenfalls. So bediente man sich zum Beispiel in zwei Arbeiten *CEA*mRNS (Nakashima *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007), in einer Arbeit *SCCA*mRNS (Kaganoi *et al.*, 2004) und einer weiteren Arbeit sowohl *CEA*mRNS als auch *SCCA*mRNS (Tanaka *et al.*, 2010). Als Gemeinsamkeit untersuchten die 4 Arbeiten alle die Relevanz von *CTC*s bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom.
Zusätzlich unterscheiden sich die Versionen der TNM-Klassifikation. Es arbeitete eine Gruppe mit der 5. Klassifikation (Kaganoi *et al.*, 2004), eine andere Forschungsgruppe mit der 6. Klassifikation (Tanaka *et al.*, 2010), während in unserer Arbeit die 7. Klassifikation

verwendet wurde.
Viele der Studien zu *CTCs* und Ösophaguskarzinom wurden im asiatischen Raum durchgeführt, vermutlich weil es hier, wie bereits in der Einleitung beschrieben, eine größere Inzidenz aufweist (WCR 2009).
Zusammengefasst machen es diese Unterschiede auch nach circa 15 Jahren Forschung schwer, einen Status quo für die bisherige Forschung zu *CTCs* und Ösophaguskarzinom zu erstellen und einen schlüssigen Vergleich herzustellen. Interessanterweise hat eine erschienene Metaanalyse zum Mammakarzinom jedoch ergeben, dass die Ergebnisse zu *CTCs* beim Mammakarzinom nicht abhängig waren von der Detektionsmethode oder dem Zeitpunkt der Blutentnahme (Zhang *et al.*, 2012).

Tabelle 59 Unterschiede der Studien

Studie	(Liu *et al.*, 2007)	(Sclafani *et al.*, 2013)	(Tanaka *et al.*, 2010)	(Nakashima *et al.*, 2003)	(Hiraiwa *et al.*, 2008)	(Kaganoi *et al.*, 2004)	(Matsushita *et al.*, 2015)
Aufarbeitungs-methode	RT-PCR	*CellSearch*	RT-PCR	RT-PCR	*CellSearch*	RT-PCR	*CellSearch*
Anzahl Patienten	53 *SCC*	18 (7 MK + 11 *SCC*)	244 *SCC*	54 *SCC*	38 *SCC* (total 130 *GC*)	70 *SCC*	90 *SCC*
Kriterien für positives Ergebnis	*CEA*mRNS	> 1 *CTC* (Zelle mit intaktem Zellkern sowie CD45-/*EpCAM**)	*CEA*mRNS/ *SCCA*mRNS	*CEA*mRNS	≥ 2 *CTC* (Zelle mit intaktem Zellkern sowie CD45-/*EpCAM**)	*SCCA*mRNS	≥ 1 *CTC*
Krankheitsstadium	Anfangsstadium	Metastasiert	Anfangsstadium	Anfangsstadium	überwiegend Metastasiert (79 vom 130)	Anfangsstadium	Überwiegend fortgeschritten
Herkunftsland	China	GB	Japan	Japan	Japan	Japan	Japan
Histologie	*SCC*	*AC*	*SCC*	*SCC*	*SCC*	*SCC*	*SCC*

Zeitpunkt BE	1.) 1 Tag vor OP und 2.) bei OP und 3.) 3 Tage nach OP	Vor CT	1.) vor OP und 2.) nach OP	1.) vor OP und 2.) vor Tumorentnahme und 3.) nach Tumorentnahme	Vor OP oder Vor CT oder Nach CT	1.) Bei Aufnahme 2.) bei Anästhesie-Einleitung 3.) während der Manipulation am Ösophagus 4.) 6 Stunden postoperativ	1.) Vor Therapie 2.) nach Therapie
UICC/*AJCC*-Klassifikation	Nicht beschrieben	Nicht beschrieben	6. Klassifikation	5.Klassi-fikation	Nicht beschrieben	5.Klassi-fikation	7.Klassifikation

MK=Magen-Karzinom, *EC*=Ösophagus-Karzinom, *GC*=Gastrointestinales Karzinom, CT=Computertomographie, BE=Blutentnahme, GB=Großbritannien

5.2 Wie ist die Detektionsrate von *CTCs* bei Patienten in den verschiedenen Krankheitsstadien?

Allard et al. fanden mithilfe des *CellSearch*-Systems bei verschiedenen gastrointestinalen Tumoren *CTCs*. Sie stellten dabei fest, dass die Anzahl der *CTCs* gering war. Je kleiner die Anzahl der tatsächlich zirkulierenden Tumorzellen ist, desto weniger wahrscheinlich ist die Detektion der Zellen (Allard *et al.*, 2004). Ein frühes Krankheitsstadium meint in dieser Arbeit UICC 0/I/II und ein spätes Krankheitsstadium UICC III/IV. In dieser Arbeit wurden Patienten untersucht, die sich primär zur kurativen Therapie des Karzinoms in Form einer Ösophagektomie vorstellten. In der Regel handelt es sich hierbei um Patienten im frühen Krankheitsstadium nach Erstdiagnosestellung. Jedoch fand sich bei einigen Patienten, bei denen die Tumorerkrankung gerade erst diagnostiziert wurde, bereits eine systemische Tumorausbreitung durch Fernmetastasierung oder ein fortgeschrittenes lokales Tumorwachstum über die Organgrenzen des Ösophagus hinaus (Tabelle 6), so dass nur ungefähr die Hälfte der Patienten in einem frühen Krankheitsstadium war (Ariol: UICC I/II: 46 %; *CellSearch*: UICC I/II 48 %). Die Tabellen 14 und 15 zeigen die Häufigkeiten der verschiedenen Krankheitsstadien und die dazugehörigen *CTC*-Detektionsraten. Durch die Ariol-Methode wurden bei 16,5 % und durch die *CellSearch*-Methode bei 17,8 % der Patienten (UICC I-IV) *CTCs* detektiert.
Die Ergebnisse ähneln denen von Tanaka et al., welche präoperativ bei 13,9 % der Patienten (34/244; Methode: RT-PCR, UICC I-IV) *CTCs* fanden. Die höchste Detektionsrate fand sich mit 25 % *CTC*-positiven Patienten im Stadium IV (Tanaka *et al.*, 2010).
Nakashima et al. fanden präoperativ bei 9,3 % (5/54 (Tumorstadium I/II: 21 Patienten, Tumorstadium III/IV: 33 Patienten); Methode: RT-PCR) der untersuchten Patienten *CTCs*.

Betrachtet man bei Nakashima et al. die einzelnen Tumorstadien, so fanden sich in Stadium I 22 % der Patienten, in Stadium II 41,7 % der Patienten, in Stadium III 80 % und in Stadium IV 61 % *CTC*-positive Patienten. In früheren Stadien waren es hier ebenfalls geringere *CTC*-Detektionsraten (Nakashima *et al.*, 2003). Nakashima et al. hatten 39 % und Tanaka et al. 54 % der Patienten in frühen Stadien, also circa die Hälfte des untersuchten Kollektivs. Eine ähnliche Verteilung findet sich in unserer Studie.
Hashimoto et al. konnten präoperativ nur bei 2 % (1/49), (Tumorstadium I/II: 18 Patienten, Tumorstadium III/IV: 31 Patienten); Methode: RT-PCR) der Patienten *CTCs* entdecken. Dies könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass die präoperative Tumorzelldetektion geringer ist als die postoperative, zum anderen dadurch, dass 49 Patienten ein kleines Patientenkollektiv ist, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten (Hashimoto *et al.*, 2008).
Kaganoi et al. detektierten bei 33 % (23/70; Methode: RT-PCR), Liu et al. bei 28,3 % (15/53; Methode: RT-PCR) der präoperativen Patienten *CTCs*. Bei beiden Forschungsgruppen hatte der überwiegende Teil der Patienten ein frühes Krankheitsstadium (Kaganoi 67 %; Liu 66 %). Zwar sind dies verglichen mit unseren Methoden höhere Detektionsraten, doch sieht man in Tab. 61, dass die *CTC*-Detektionsraten in den frühen Krankheitsstadien ebenfalls geringer waren. Zudem benutzten sie andere Detektionsmethoden (Kaganoi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Tabelle 60 zeigt die präoperativen Detektionsraten.
Koike et al. detektierten sogar bei 52 % (17/32; Methode: RT-PCR) der Patienten mit der Erstdiagnose eines Ösophaguskarzinoms *CTCs* (Koike *et al.*, 2002). Bei der zuletzt beschriebenen Studie wurde jedoch nur ein Teil der Patienten operiert und es befand sich keiner der 33 untersuchten Patienten im T1-Stadium, nur 2 im T2-Stadium, 16 im T3- und 13 im T4-Stadium. Ebenso war es bei Ito et al., welche insgesamt bei 7 von 28 Patienten (25 %) *CTCs* entdeckten, wobei sich aber bereits 23 Patienten des Gesamtkollektivs im fortgeschrittenen Tumorstadium befanden. Nur 5 Patienten waren in frühen Krankheitsstadien, davon war ein Patient *CTC*-positiv (20 % *CTC*-Detektionsrate in frühen Stadien; 26 % in fortgeschrittenen Stadien (Ito *et al*., 2004).
Es lässt sich zusammenfassend eine breite Variabilität der Detektionsrate erkennen, sicherlich auch durch Unterschiede wie beispielsweise verschiedene Zielsequenzen bei der PCR als *CTC*-Detektionsmethode und andere wesentliche Charakteristiken bedingt, welche im vorhergehenden Abschnitt ausführlich beschrieben wurden. Wie in Tabelle 61 jedoch zu sehen ist, sind die Detektionsraten bei den untersuchten Studien trotz dieser genannten Unterschiede in den späten Krankheitsstadien (Stadium III/IV) höher als in den frühen Stadien (UICC 0-II). Dies stützt die Annahme, dass eine fortgeschrittene Tumorerkrankung mit einer vermehrten Tumorzellaussaat einhergeht, welche sich in den höheren *CTC*-Detektionsraten wiederspiegelt. Zudem bestätigt es die Ergebnisse von Hiraiwa et al, welche bei Patienten mit fortgeschrittenen gastrointestinalen Karzinomen signifikant mehr *CTCs* fanden (Hiraiwa *et al.*, 2008). Eine kürzlich erschienene Übersichtsarbeit konnte nachweisen, dass in den späten Krankheitsstadien sogar signifikant häufiger *CTCs* nachweisbar sind (Qiao *et al*., 2016).

Tabelle 60 Detektionsrate *CTC* präoperativ

Studie	Methode	Anzahl Pat.	Stadium I/II	Stadium III/IV	Detektionsrate
Liu et al., 2007	Real time-reverse transcription-PCR	53	35	18	28,3 % (15/53)
Tanaka et al., 2010	RT-PCR	244	131	113	13,9 % (34/244)

Nakashima et al., 2003	RT-PCR	54	21	33	9,3 % (5/54)
Kaganoi et al., 2004	RT-PCR	70	48	22	33% (23/70)
Hashimoto et al. , 2008	RT-PCR	49	18	31	1 % (1/49)
Bobek et al., 2014	MetaCell®	43	9	34	62,8 % (27/43)
Ariol-Methode	Ariol	115	53	62	16,5 % (19/115)
***CellSearch*-Methode**	*CellSearch*	101	48	55	17,8 % (18/101)

Tabelle 61 Detektionsrate in frühen und späten Krankheitsstadien

Studie	Stadium I/II	*CTCs*	Stadium III/IV	*CTCs*
Ariol	53	5 (9,4 %)	62	14 (22,6 %)
CellSearch	46	6 (13,0 %)	55	12 (21,8 %)
Nakashima et al., 2003	21	7 (33,3 %)	33	24 (72,7 %)
Hashimoto et al., 2008	18	4 (22,0 %)	31	9 (29,0 %)
Liu et al., 2007	35	9 (25,7 %)	18	6 (33,3 %)
Tanaka et al., 2010	131	18 (13,7 %)	113	16 (14,2 %)
Kaganoi et al., 2004	48	9 (18,6 %)	22	14 (63,6 %)
Ito et al., 2004	5	1 (20,0 %)	23	6 (26,1 %)
Koike et al., 2002	4	2 (50,0 %)	29	15 (51,7 %)

Ösophaguskarzinom-*CTC*-Studien, welche zudem die Detektionsraten vor und nach Tumorentfernung verglichen, fanden nach Tumorentfernung höhere *CTC*-Detektionsraten. Es wird vermutet, dass es durch die Manipulation am Tumor zu einer vermehrten Tumorzell-Aussaat kommt (Nakashima *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010). Obwohl in den späten Stadien häufiger *CTCs* detektiert werden, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *CTCs* bereits in frühen Krankheitsstadien nachweisbar sind. Wie die Tabelle 16 und 17 aus dem Ergebnisteil zeigen, fanden wir auch bei Patienten ohne Lymphknoten-Metastasen *CTCs* im Blut. Die Tumorzellaussaat in das Blutsystem scheint ein früher Prozess zu sein und teilweise noch vor der Manifestierung von detektierbaren Lymphknoten- sowie Fernmetastasen zu geschehen. Das bestätigt die Beobachtungen von Klein et. al. sowie Hüsemann et al. (Hüsemann *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009). Klein et al. schlussfolgerten dass Tumorzell-Dissemination ein früher und notwendiger Schritt der Tumorausbreitung ist, der jedoch alleinig nicht ausreicht zur Metastasenbildung (Klein *et al.*, 2009). Hüsemann et al. fanden ebenfalls eine systemische Tumorzellstreuung zu einem frühen Erkrankungszeitpunkt bei Patientinnen mit Mammakarzinom, woraus sie schlussfolgerten, dass Metastasierung nicht notwendigerweise erst im späten Stadium des Tumorvoranschreitens stattfindet (Hüsemann *et al.*, 2008). Diese Beobachtung legt

gleichzeitig nahe, dass *CTCs* ein Teil der Metastasierungskaskade darstellen könnten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *CTCs* in allen Krankheitsstadien nachweisbar sind und man sie häufiger in späten Krankheitsstadien sowie nach Ösophagektomie detektiert.

5.3 Der Zeitpunkt der Blutentnahme

In den bisher beschriebenen Studien wurde das Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Zwei Studien konnten postoperativ eine höhere *CTC*-Detektionsrate erzielen (Nakashima *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007). Unsere Intention war es jedoch, das präoperative *Staging* um einen weiteren prognostischen Marker zu ergänzen, weswegen wir den Zeitpunkt der Blutentnahme vor der Operation wählten. Anhand der Informationen des *Stagings* wird über die Therapie entschieden. Deswegen benötigen die Behandler möglichst viele Informationen über die Ausbreitung und Aggressivität der Erkrankung. Man hofft, durch die Charakterisierung der *CTCs* neue Therapieangriffspunkte zu erlangen. Zusätzliche Informationen über das Ausmaß der Tumorerkrankung wären vor allem zum Zeitpunkt der Entscheidung über die initiale Therapie wichtig. Denkbar wäre eine Detektion der *CTCs* auch zur Überprüfung des Therapieerfolgs, zum Beispiel bei Chemotherapie oder im Rahmen der Nachsorge. Letztlich haben verschiedene die *CTC*-Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre Berechtigung, doch benötigen wir größere Kohorten, welche zu einem einheitlichen Zeitpunkt eine Blutentnahme bekommen, um die statistische Aussagekraft zu stärken.

5.4 Welche immunomagnetische Anreicherungsmethode ist sensitiver und erweist sich als geeigneter?

Um bei der immunomagnetischen Positivanreicherung detektiert zu werden, muss die Tumorzelle als Grundvoraussetzung bestimmte Oberflächenmarker exprimieren: Bei der *CellSearch*-Methode *EpCAM* und bei der Ariol-Methode *EpCAM* und/oder *CK*. Bekanntlich sind Tumorzellen jedoch heterogen und damit ist die Expression der Marker nicht uniform. Nicht alle *CTCs* zeigen *EpCAM* auf ihrer Oberfläche (Went *et al.*, 2004) und epitheliale Marker werden bei der EMT herunterreguliert (Kölbl *et al.*, 2016). Bei der *CellSearch*-Methode kann es demzufolge zu falsch negativen Ergebnissen kommen, wenn *EpCAM*-negative *CTCs* im Blut vorhanden sind (Mikolajczyk *et al.*, 2011; Gorges *et al.*, 2012). Es gibt Studien, welche *CellSearch* und eine *EpCAM*-unabhängige Methode verglichen und bei der *EpCAM*-unabhängigen Methode häufiger *CTCs* detektierten (Krebs *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Somit ist es möglich, dass die tatsächliche *CTC*-Rate im untersuchten Patientenkollektiv über 18 % liegt. Andererseits kann es ebenso zu falsch positiven Ergebnissen kommen, weswegen man eine morphologische Beurteilung der Zelle vornimmt, um das Risiko falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren. Nicht jede *EpCAM*-exprimierende Zelle scheint eine maligne Zelle zu sein. So wurden auch bei gesunden Menschen ohne Nachweis einer malignen Erkrankung *EpCAM*-exprimierende Zellen im Blut gefunden. (Allard *et al.*, 2004; Hiraiwa *et al.*, 2008). Es könnte sich bei den *EpCAM*-exprimierenden Zellen um eine Verunreinigung der Probe mit Epithelzellen handeln. Denkbar wäre auch, dass bei den gesunden Blut-Spendern eine bisher nicht diagnostizierte Tumorerkrankung besteht.
Basierend auf den Erkenntnissen von Went et al. und angelehnt an die Veröffentlichung von Deng et al. wurde davon ausgegangen, durch eine Methode, welche zwei verschiedene Oberflächenstrukturen zur Detektion verwendet, die *CTC*-Ausbeute im Blut erhöhen zu können (Went *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2008). Doch die Hypothese hat sich in dieser Arbeit nicht bestätigt. Nicht durch die Ariol-Methode sondern durch Verwendung der *CellSearch*-Methode konnte eine höhere *CTC*-Rate erzielt werden. Wenn der Ergebnisverlust bedingt durch beide Methoden abgezogen wird (*CellSearch*: 18 Proben; Ariol: 4 Proben), bleibt ein

Gesamtkollektiv von 97 gültigen Patientenproben, die mit beiden Methoden aufgearbeitet und ausgewertet werden konnten. Von diesen Proben waren 14 (14,4 %) mit der Ariol-Methode und 17 (17,5 %) mit der *CellSearch*-Methode positiv. Bei 4 Proben ergaben beide Methoden ein positives Ergebnis. Bei 70 Patienten ergaben beide Methoden ein negatives Ergebnis. Die Messübereinstimmung von 76,3 % der beiden Methoden ist erstaunlich gering. Dies kann an der Heterogenität der *CTCs* liegen. So könnte man vermuten, dass die *CTCs* in den unterschiedlichen Krankheitsstadien stärker in ihrer Heterogenität variieren als die *CTCs* in einem Krankheitsstadium. Bei Deng. at al wurden alleinig Patienten im Krankheitsstadium UICC IV untersucht, während in dieser Arbeit alle Krankheitsstadien berücksichtigt wurden.
Wie bereits erwähnt ist zu vermuten, dass bedingt durch die Heterogenität von Tumorzellen, nicht alle *CTCs* detektiert werden konnten, da nicht alle *CTCs EpCAM* exprimieren (Mikolajczyk *et al.*, 2011). Nicht nur eine *EpCAM*-Expression kann fehlen, auch *CKs* können herauf- bzw. herunterreguliert werden (Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, 2005; Joosse *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde mit *CK* 7 und 8 als *Catcher*-Antikörper bei der Ariol-Methode und mit *CK* 8, 18 und 19 für die immunzytochemischen Färbungen gearbeitet. *CK* 8, 18 und 19 können bei Tumorzellen herunterreguliert sein (Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, 2005), wodurch es bei der Ariol-Methode im Anreicherungsschritt zu einer erniedrigten *CTC*-Ausbeute und bei beiden Methoden bei der Färbung zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.
Bei der EMT werden *EpCAM* und auch ein Teil der *CKs* herunterreguliert, die Zellen verlieren ihre Zell-Zell-Kontakte und werden dadurch mobil. Gerade Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften scheinen die EMT zu durchlaufen (Mani *et al.*, 2008). Um eine Tumormetastasierung zu verhindern, scheinen genau diese Zellen ein vielversprechender Therapieangriffspunkt. Es wird angenommen, dass die epithelialen Tumorzellen den mesenchymalen folgend eher passiv in die Blutbahn gelangen und nicht zwingend Metastasen bilden (Joosse and Pantel, 2013). Zahlreiche Studien haben jedoch den prognostischen Wert von epithelialen Tumorzellen im Blut gezeigt (Cristofanilli, 2004; Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008; Rink *et al.*, 2011). Selbst wenn diese Zellen selber keine Metastasen bilden, scheinen sie dennoch eine Krankheitsprogression oder eine aggressivere Tumorbiologie anzuzeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen ebenfalls für die Relevanz der *EpCAM*- und/oder *CK*-positiven *CTCs*.
Die Herunterregulation von *EpCAM* könnte auch erklären, warum bei Patienten keine *CTCs* gefunden wurden, welche im Verlauf Metastasen entwickelten. Mit Sicherheit kann gesagt werden, dass die Methoden in dieser Arbeit in 23,7 % der Fälle zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, und beide Methoden haben Vor- und Nachteile, welche im Folgenden erläutert werden.
Es gibt bislang noch keinen Goldstandard für die Detektion von *CTCs*. Die einzige Aufarbeitungsmethode, welche in verschiedenen Laboren reproduzierbare Ergebnisse gezeigt hat, ist das seit 2004 von der *FDA* anerkannte halbautomatische *CellSearch*-System.
Bei der *CellSearch*-Methode wird das Gros der Arbeit vom System übernommen. Das Gerät ist in der Lage mehrere Proben gleichzeitig auszuwerten. Die einzelnen Arbeitsschritte werden durch die Automatisierung und interne Kontrolle mit immer gleichbleibender Korrektheit ausgeführt. Die Ergebnisse sind Labor-unabhängig reproduzierbar (Allard *et al.*, 2004).
Im Umgang mit der *CellSearch*-Technik benötigt man speziell für die Geräte geschulte Mitarbeiter und erfahrene Auswerter, welche die Endergebnisse beurteilen. Trotz geschulter Auswerter sind die Endergebnisse nicht immer uniform (Arjan *et al*., 2007).
Dennoch gibt es auch technische Limitationen. Einige Ergebnisse fehlen, da sie von dem Gerät nicht prozessiert wurden. Präoperativ wurde pro Patient je eine Blutprobe für die *CellSearch*-Methode und eine für die Ariol-Methode abgenommen. Zu dem Zeitpunkt, als festgestellt wurde, dass das Blut vom *CellSearch* nicht verarbeitet werden konnte, war nicht

mehr genug Material vorhanden, um eine wiederholte Blutauswertung für beide Systeme durchzuführen. Somit kann es zu einem Ergebnisverlust kommen.
Im Unterschied dazu ist die Ariol-Methode halb-automatisiert. Manuell werden die Schritte der *CTC*-Anreicherung, -Färbung und die Evaluation der durch die Analyse-Software positiv markierten Ereignisse ausgewertet. Ihre Genauigkeit ist somit bestimmt durch die Expertise der für die Durchführung verantwortlichen Personen. Sorgfältigkeit bei der Arbeit ist die Voraussetzung für ein valides Ergebnis. Auch die Auswertung ist abhängig von den Fertigkeiten des Auswertenden. Bei dem Ariol gab es ebenfalls technische Schwierigkeiten, welche zu Ausfällen des Gerätes geführt haben. Sind die Proben aber einmal gefärbt, müssen sie zeitnah ausgewertet werden, da sonst die Farbintensität der fluoreszierenden Reagenzien nachlässt. So war es zeitweilig notwendig auf das nicht-automatisierte LEICA Mikroskop auszuweichen. Die Auswertungsarbeit mit dem manuellen Mikroskop ist zeitaufwendig. Pro Objektträger wird circa eine halbe Stunde zum *CTC-Screening* gebraucht. Das sind bei 6 Objektträgern mindestens 3 Stunden. Nimmt man die Aufarbeitung des Blutes und die Färbung hinzu, benötigt man 9 Stunden pro Patient. Ein Zeitaufwand, der für die Auswertung einer Patientenprobe im klinischen Alltag nicht denkbar wäre. Bei der Auswertung der Objektträger fanden sich teilweise sehr viele Leukozyten, welche das Erkennen der *CTCs* erschwerten. Diesem Problem könnte man zukünftig vielleicht entgehen, indem man der Positivselektion eine Negativselektion der CD45-positiven Zellen voranstellt, was jedoch neue Herausforderungen mit sich brächte (Lustberg *et al.*, 2012).
Zusammenfassend ist abzusehen, dass sich eine halb-automatisierte Methode, die sich in der Detektionsrate nur gering von einer automatisierten Methode unterscheidet und deren prognostische Aussagekraft in Bezug auf das Ösophaguskarzinom derzeit nicht überlegen ist, wahrscheinlich nicht im klinischen Alltag durchzusetzen vermag. Dazu kommen der Zeitaufwand und die Kosten für zusätzliches Personal. Trotz multipler bestehender Detektionsmethoden für *CTCs* bleibt das *CellSearch*-System bis zum aktuellen Zeitpunkt das einzige, welches von der *FDA* offiziell zugelassen wurde. Nichtsdestotrotz haben beide Methoden eine prognostische Bedeutung und damit ihre Anwendungsgebiete. Ein manuelles System hat in der Forschung große Vorteile, Aufarbeitungsprotokolle können verändert und optimiert werden. Beide Systeme bieten die Möglichkeit für Veränderungen, wie die Testung neuer Antikörper-Cocktails.
Es sollte eine größere Fallzahl an Patienten mit beiden Methoden untersucht werden, um dieses Ergebnis zu überprüfen.

5.5 Die klinische Relevanz von *CTCs* beim Ösophaguskarzinom

Es gibt unterschiedliche Studienergebnisse zur klinischen Relevanz der *CTCs* beim Ösophaguskarzinom. Mehrere Arbeiten weisen auf die Relevanz der *CTCs* beim Ösophaguskarzinom hin, bei denen sich jedoch wie bereits beschrieben die Blutentnahmezeitpunkte unterschieden. Wurde das Blut prä- sowie postoperativ auf *CTCs* untersucht, fand man bei *CTC*-positiven Patienten signifikant häufiger Lymphknoten-Metastasen und fortgeschrittenere Tumorstadien (Nakashima *et al.*, 2003). Bestimmte man alleinig den postoperativen *CTC*-Status, so fanden sich bei Patienten mit Lymphinvasion oder Lympknoten-Metastasen signifikant häufiger *CTCs* (Tanaka *et al.*, 2010). Eine andere Forschungsgruppe konnte keine bedeutsamen Zusammenhänge zwischen *CTCs* und klinischen Parametern nachweisen (Hashimoto *et al.*, 2008). Bei letzterer handelt es sich jedoch um eine kleine Fallzahl (n= 49) und sie benutzten eine andere Methode (RT-PCR) als in dieser Arbeit. In dieser Arbeit wurde das Blut präoperativ abgenommen. Einige Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen präoperativ bestimmten *CTCs* und

histopathologischen Parametern nachweisen (Koike *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2010). Andere Arbeiten konnten jedoch Zusammenhänge feststellen, zum Beispiel zwischen *CTCs* und Metastasen (Kaganoi *et al.*, 2004; Matsushita *et al.*, 2015) oder zwischen präoperativ bestimmten *CTCs* und Lymphknotenstatus, UICC-Stadium, Veneninvasion, der Tumorgröße (Kaganoi *et al.*, 2004) und Pleurakarzinose (Hiraiwa *et al.*, 2008). Man erklärte sich die Beobachtung, dass *CTCs* signifikant häufiger bei größeren Primärtumoren vorkommen, durch eine Tumorinfiltration der Kapillaren und einen dadurch vermehrten Tumorzelleinstrom in das Blut (Kaganoi *et al.*, 2004).
In dieser Arbeit wurden mit der Ariol-Methode signifikant häufiger *CTCs* gefunden bei Patienten mit zunehmender Größe des Primärtumors (T-Stadium) und des UICC-Stadiums. Dies stützt die Ergebnisse von Kaganoi et al. Es scheint sich zudem eine Tendenz zu einem Vorhandensein von *CTCs* bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung zu zeigen. Dies zeigte sich auch bei Patienten, welche sich zum Diagnosezeitpunkt bereits im metastasierten Stadium befanden. So hatten 50 % dieser Patienten mittels Ariol-Methode *CTCs* im Blut, während es bei Patienten ohne Metastasen nur 14,8 % waren. Bei der *CellSearch*-Methode war dieser Unterschied sogar signifikant. Jedoch waren bei dieser Methode die Häufigkeitsunterschiede der *CTCs* bei der Größe des Primärtumors und dem UICC-Stadium zwar im Trend erkennbar, jedoch nicht signifikant. Interessanterweise scheinen *CTCs* in dieser Arbeit unabhängig von der Methode bei einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung häufiger vorhanden zu sein. Hiraiwa et al. konnten ebenfalls zeigen, dass das Vorhandensein von mindestens 2 *CTCs* mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium einherging (Hiraiwa *et al.*, 2008). Ähnliche Ergebnisse gab es bei einer Studie zu *DTCs* und Ösophaguskrazinom. Eine Forschungsgruppe aus dem UKE, welche die Relevanz von *DTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom untersuchte, zeigte, dass ein positiver *DTC*-Status mit einer fortgeschrittenen Größe des Primärtumors und vorhandenen Metastasen korrelierte (Vashist *et al.*, 2012).

5.5.1 Hat das Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen einen prognostischen Stellenwert?

Bei den *CTC*-*CellSearch*-positiven Patienten kam es häufiger zu Krankheitsrückfällen. Von den 13 Patienten, in deren Blut mithilfe der *CellSearch*-Methode *CTCs* detektiert wurden, entwickelten 11 Patienten im Verlauf einen Krankheitsrückfall. Dies entspricht einer Rückfallquote von 84,6 %. Von den übrigen 73 *CTC*-negativen Patienten entwickelten prozentual nur circa die Hälfte (43,8 %) einen Krankheitsrückfall.
Ähnlich sah es bei den Ariol-Ergebnissen aus. Von den *CTC*-Ariol-positiven Patienten entwickelten 82,4 % ein Rezidiv, bei den Patienten ohne *CTCs* waren es hingegen nur 45,1 %. Unabhängig von der Aufarbeitungsmethode kam es also bei Patienten mit *CTCs* häufiger zu einem Krankheitsfortschreiten. In den univariaten Überlebensanalysen konnten diese Beobachtungen zum Teil bestätigt werden. Obwohl die mit der Ariol-Methode *CTC*-positiven Patienten schneller ein Voranschreiten der Erkrankung zeigten, war diese Beobachtung in der univariaten Überlebensanalyse für das progressionsfreie Überleben nicht signifikant (*CTC* Ariol > 0: p= 0,100, *CTC* Ariol> 1: p= 0,435, *CTC* Ariol> 2: p= 0,071).
Eindeutiger war es bei den Patienten, welche mit der *CellSearch*-Methode als *CTC*-positiv identifiziert wurden. Unabhängig vom *Cut-off*-Wert war das progressionsfreie Überleben signifikant kürzer im Vergleich zu Patienten, welche keine *CTCs* im Blut aufwiesen (*CTC CellSearch*> 0: p= 0,039, *CTC CellSearch* >1: p= 0,027, *CTC CellSearch* > 2: p< 0,001). Fanden sich bei einem Patienten *CTCs* mit der *CellSearch*-Methode, so scheint dies einen prognostischen Stellenwert für das progressionsfreie Überleben zu haben. Matsushita et al nutzten ebenfalls *CellSearch* und schlussfolgerten aus ihrer Studie, dass *CTCs* ein wertvoller Hinweis auf die Prognose und das Therapieansprechen sein könnten (Matsushita *et al.*, 2015).

Tanaka et al. konnten in der multivariaten Analyse bestätigen, dass ein positiver *CTC*-Status mit einem signifikant kürzeren Überleben einherging. Dieses Ergebnis war jedoch abhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme. Präoperativ bestimmte *CTCs* hatten keinen Einfluss auf das Überleben, während postoperativ bestimmte *CTCs* einen Einfluss hatten. Sie zweifelten deswegen an der Hypothese, dass präoperative *CTCs* Metastasierungspotential haben könnten (Tanaka *et al.*, 2010). Obwohl in dieser Arbeit keine multivariate Analyse berechnet wurde, weisen die *CellSearch*-Ergebnisse doch auf einen prognostischen Stellenwert der präoperativ bestimmten *CTCs* hin.
Neben den klassischen Faktoren, die das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten signifikant beeinflussten (Tumoreindringtiefe ($p< 0,001$), Lymphknotenstatus ($p= 0,002$), Metastasen ($p< 0,001$), Alter ($p=0,008$), Resektion ($p= 0,045$), Resektionsrand ($p= 0,025$) und UICC-Stadium ($p< 0,001$)), bewährten sich *CTCs* unabhängig von der Aufarbeitungsmethode ebenfalls als Einflussfaktor.
Patienten, bei denen sich mit der Ariol-Methode mehr als 2 *CTCs* im Blut fanden, wiesen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben auf ($p= 0,002$). Bei Patienten mit *CTC* Ariol> 0 und *CTC* Ariol> 1 zeigte sich kein Einfluss auf das Überleben.
Patienten, die mehr als eine *CellSearch*-detektierte *CTC* im Blut aufwiesen, hatten ebenfalls ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (*CTC CellSearch*> 1: $p= 0,004$, *CTC CellSearch*> 2: $p< 0,001$). Auf dem Boden dieser Ergebnisse scheint ein *Cut-off* von 2 *CTCs* bezüglich der prognostischen Aussagekraft sinnvoll.
Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse einer anderen Arbeit zur *CellSearch* Methode, in der Patienten mit metastasiertem Ösophaguskarzinom und ≥ 2 *CTCs* ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben hatten (Hiraiwa *et al.*, 2008).
Für das Gesamtkollektiv der Patienten mit metastasierten gastrointestinalen Karzinomen war ein positiver *CTC*-Status in der univariaten Analyse mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Dieses Ergebnis bestätigte sich in der multivariaten Überlebensanalyse. Der *CTC*-Status erwies sich als unabhängiger Prognosefaktor.
Auch in der Arbeit von Kaganoi et al. war das progressionsfreie sowie Gesamtüberleben der Patienten mit *CTCs* signifikant kürzer in der univariaten Überlebensanalyse (Kaganoi *et al.*, 2004). Andere Forschungsgruppen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Fallzahlen der Forschungsgruppen gering waren (Hashimoto *et al.*, 2008; Sclafani *et al.*, 2013). Obwohl es bei Sclafani et al. keinen signifikanten Unterschied gab, war die Überlebenszeit der *CTC*-positiven Patienten kürzer im Vergleich zu den *CTC*-negativen. Eine Arbeit führte zwar keine klassische Überlebensanalyse im Sinne einer uni- bzw. multivariaten Analyse durch, konnte in einer Chi-Quadrat-Häufigkeitsanalyse jedoch zeigen, dass Patienten mit positivem *CTC*-Status signifikant häufiger ein Voranschreiten der Erkrankung, insbesondere in Form von Metastasenbildung, zeigten, als Patienten mit *CTC*-negativem Status (Nakashima *et al.*, 2003).
Gemeinsam mit dieser Arbeit gibt es weitere Studien, welche die durch Überlebensanalysen prognostische Relevanz von *CTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom untersuchten. Von diesen deuten die hier vorliegenden Ergebnisse sowie der Großteil der Studien auf eine prognostische Relevanz der *CTCs* hin (siehe auch Einleitung Tabelle 3). Nur in einer Studie konnten keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden, doch war eine Tendenz zu einem schlechteren Überleben bei den *CTC*-positiven Patienten zu sehen. Wie bereits beschrieben war dies die Studie mit der kleinsten Fallzahl und demzufolge der geringsten statistischen Aussagekraft (Sclafani *et al.*, 2013). Zwei der Studien untersuchten ausschließlich das Überleben von Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der aktuelle Forschungsstand weisen zusammenfassend auf eine prognostische Relevanz zirkulierender Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom hin (Qiao *et al.*, 2016). Ein Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf der Bedeutung von *CTCs* bei der Subgruppe von Patienten, welche mit einem kurativen Ansatz behandelt werden und es

konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass ein präoperativer *CTC*-Status von prognostischer Aussagekraft ist. Bestätigt sich in einem umfangreicheren Studiendesign eine prognostische Aussagekraft in der multivariaten Analyse, scheint es sinnvoll, einen *CTC*-Status präoperativ zu erheben und Patienten mit positiven Ergebnissen in ein engmaschiges Nachsorge-Programm einzubeziehen. Die Relevanz von *CTCs* beim Ösophaguskarzinom muss in größeren prospektiven Multicenterstudien überprüft werden. Zudem bedarf es zur schlüssigen Vergleichbarkeit eines einheitlicheren Studiendesigns bezüglich Zeitpunkt der Blutentnahme, Aufarbeitungsmethode, Detektion, *Cut-off*-Wert und Krankheitsstadium.

5.6 Die *Cut-off*-Werte

Die Schwellen bei der immunomagnetischen *CellSearch*-Methode für einen positiven *CTC*-Status mit nachgewiesenem prognostischen Wert unterscheiden sich in den Publikationen zu verschiedenen Karzinomen. Beim metastasierten Prostata- sowie Mammakarzinom schreibt man den *CTCs* ab einer Mindestzahl von 5 einen prognostischen Wert zu (Cristofanilli, 2004; Budd *et al.*, 2006; de Bono *et al.*, 2008). Beim metastasierten Kolorektalkarzinom sind es ≥ 3 CTCs (Cohen *et al.*, 2008, 2009). Allard et al. untersuchten große Stichproben von Patienten mit und ohne maligne Erkrankung sowie gesunde Menschen. Anhand ihrer Ergebnisse definierten sie einen positiven *CTC*-Status ab 2 *CTCs*. Die Untersuchungen zur Höhe der einzelnen *Cut-off*-Werte bei Allard et al. fanden jedoch an einem metastasierten Patientenkollektiv statt. Zudem untersuchten sie das Blut gesunder Menschen und das Blut von Patienten mit einer gutartigen Erkrankung. Die Subgruppe der Patienten, welche sich in frühen Krankheitsstadien vor nachweisbarer Metastasierung befinden, wurde nicht miteinbezogen. Bei Patienten mit Metastasen finden sich wie bereits beschrieben häufiger und eine größere Anzahl *CTCs* im Vergleich zu Patienten in frühen Krankheitsstadien (Hiraiwa *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2016). Matsushita et al. arbeiteten mit dem *CellSearch*-System und wählten den *Cut-off*-Wert bei einer *CTC*. Zudem testeten sie 15 gesunde Patienten auf *CTCs* und fanden keine (Matsushita *et al.*, 2015). Da die in dieser Arbeit untersuchte Stichprobe großteilig aus Metastasen-freien Patienten bestand und es wenig Vorarbeiten zur anzahligen Bedeutung von immunomagnetisch-detektierten *CTCs* beim Ösophaguskarzinom gibt, wurden mehrere *Cut-off*-Werte betrachtet (siehe Tabelle 20 Ergebnisteil *Cut-off*-Werte). Anhand der Ergebnisse kann gesehen werden, dass die meisten *CTC*-positiven Patienten unabhängig von der Detektionsmethode ein bis zwei *CTCs* hatten (Ariol-Methode pro Patient durchschnittlich 1,47 *CTCs*; *CellSearch*-Methode pro Patient durchschnittlich 1,22 *CTCs*). Angelehnt an die Arbeit von Allard et al. und diese Ergebnisse wählten wir den maximalen *Cut-off*-Wert bei > 2. Die Ergebnisse der univariaten Analyse geben Hinweise darauf, dass schon das Vorhandensein einer einzelnen *CTC* im Blut von Bedeutung sein kann.
Es besteht jedoch die Annahme, dass nicht die alleinige Anwesenheit („*CTCs* ja/ nein“) sondern die *CTC*-Anzahl von Bedeutung ist (Hashimoto *et al.*, 2008). Weiterhin ist davon auszugehen, dass das maligne Potential von einzelnen *CTCs* Metastasen zu bilden sicherlich heterogen ist (Alix-Panabières and Pantel, 2016; Bardelli and Pantel, 2017).
Weitere Arbeiten mit umfangreicheren Stichproben sind notwendig, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnis zu verifizieren.

5.7 Die Subgruppenanalyse

5.7.1 Subgruppenanalyse in Bezug auf die Histologie

Die einzelne Betrachtung der Histologie-Typen teilt die Gesamtkohorte in zwei unterschiedlich große Stichproben auf. Mehr als 2/3 der untersuchten Patienten hatten ein Adenokarzinom. Es gibt nur eine weitere Studie, die gezielt diesen Histologie-Typ und die

klinische Relevanz von *CTCs* betrachtet hat. Leider hat diese Studie nicht nur das Adenokarzinom des Ösophagus, sondern auch des Gastrums betrachtet (Sclafani *et al.*, 2013). Die Ergebnisse scheinen somit unspezifisch. Eine weitere Arbeit hat sich gemischte Histologie-Typen angeschaut, allerdings waren es großteilig Plattenepithelkarzinome und nur ein Patient hatte ein Adenokarzinom (Hashimoto *et al.*, 2008). Bobek et al. untersuchten ein Patientenkollektiv mit 43 Patienten mit Ösophaguskarzinom, von denen 20 ein Adenokarzinom hatten. Ziel der Studie war nicht die klinische oder prognostische Relevanz der *CTCs* zu untersuchen, sondern sie zu detektieren und zu kultivieren (Bobek *et al.*, 2014). Diese Arbeit betrachtet als erste die klinische Bedeutung von *CTCs* beim Adenokarzinom des Ösophagus. Die meisten der bisherigen Studien wurden zur Bedeutung von *CTCs* beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus durchgeführt (Koike *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004; Kaganoi *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Hiraiwa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010).

5.7.1.1 CTC im Ariol bei Patienten mit Adenokarzinom (1)

Hier wiesen 17,5 % der Patienten *CTC*> 0 auf. Bei 60 % der Patienten mit Metastasen fanden sich *CTCs,* im Vergleich dazu hatten nur 14,9 % der Patienten ohne Metastasen *CTCs*. Dieser Unterschied war signifikant (p= 0,037; Exakter Test nach Fisher). Ähnlich war es bei der Tumoreindringtiefe. Patienten mit höherem T–Stadium hatten signifikant häufiger *CTCs* (T1: 0 % vs. T4: 41,7 %). Diese Ergebnisse spiegelten sich ebenfalls im UICC-Stadium wieder (p= 0,006; Exakter Test nach Fisher). *CTCs* bei Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus scheinen ein Zeichen fortgeschrittener Erkrankung zu sein. Dies zeigte sich auch in der Überlebensanalyse. So hatten Patienten, welche mehr als 2 *CTCs* im Blut hatten, ein signifikant kürzeres progressionsfreies und Gesamtüberleben (p= 0,045; p= 0,002; Log-rank-Test).

5.7.1.2 CTC im CellSearch bei Patienten mit Adenokarzinom (2)

Hier wiesen 20,3 % der Patienten *CTC*> 0 auf. Wie bei der Ariol-Methode hatten Patienten mit *CTCs* signifikant häufiger Metastasen (p= 0,025) und hatten häufiger ein höheres T-Stadium (p= 0,024). Auch wenn es beim UICC-Stadium zu keinen signifikanten Häufungen kam, war zu erkennen, dass Patienten in höheren Stadien öfter *CTC*-positiv waren. *CTCs* scheinen somit Methoden-unabhängig gehäuft bei Patienten mit fortgeschrittenen Erkrankungen aufzutreten. In der Überlebensanalyse war bereits das Vorhandensein von mehr als einer *CTC* mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien (*CTC*> 1: p= 0,016, *CTC*> 2: p< 0,001) sowie Gesamtüberleben (*CTC*> 1: p= 0,005, *CTC*> 2: p< 0,001) verknüpft.

5.7.1.3 Fazit CTC bei Patienten mit Adenokarzinom

Unabhängig von der Detektionsmethode scheint das Vorhandensein von *CTCs* bei Patienten mit Adenokarzinom von klinischer Relevanz zu sein. Sclafani et al. konnten ebenfalls beobachten, dass die Überlebenszeiten von Patienten mit *CTCs* kürzer waren als bei *CTC*-negativen Patienten. Zwar bestätigte sich diese Beobachtung nicht in der univariaten Überlebensanalyse, jedoch relativiert sich das Ergebnis der Studie vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl (n= 18) (Sclafani *et al.*, 2013).

5.7.1.4 CTC im Ariol bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (1)

CTCs fanden sich bei 12,9 % der Patienten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *CTC*-positiven und *CTC*-negativen Patienten in Bezug auf histopathologische Parameter gefunden werden. Dieses Ergebnis muss vor dem Hintergrund der geringen

Fallzahl betrachtet werden (n= 31). So hatten von den 31 Patienten beispielsweise 30 keine Metastasen und ein Patient hatte eine Metastase, war jedoch *CTC*-negativ. Ein prognostischer Einfluss der *CTCs* auf das progressionsfreie oder Gesamtüberleben konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der kleinen Subgruppe lassen sich keine validen Rückschlüsse auf die tägliche Praxis ziehen.

5.7.1.5 CTC im CellSearch bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (2)

Bei 10,3 % der Patienten fanden sich *CTCs*. Abgesehen von einer signifikant unterschiedlichen Verteilung der *CTCs* bei den Geschlechtern (Frauen hatten signifikant häufiger *CTCs* im Vergleich zu Männern), gab es keine Signifikanzen. In der univariaten Analyse zeigte sich für Patienten, welche *CTC*-positiv waren, ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben (p= 0037). Durch fehlende Ergebnisse aufgrund technischer Schwierigkeiten ist die Stichprobe jedoch noch kleiner (n= 29), weswegen den Ergebnissen keine klinische Bedeutung zugewiesen werden kann.

5.7.1.6 Fazit CTC bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Trotz der kleinen Fallzahl zeigt sich in dieser Arbeit bei den mit der *CellSearch*-Methode bestimmten *CTC*-positiven Ergebnissen eine prognostische Bedeutung. Zwar relativiert sich diese aufgrund der kleinen Fallzahl, nichtsdestotrotz stützt sie die bereits gängigen Forschungsergebnisse (Kaganoi *et al.*, 2004; Hiraiwa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010). Li et al. untersuchten 61 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und fanden nur bei einem Patienten *CTCs*, welcher bereits Metastasen hatte. Sie schlussfolgerten, dass das *CellSearch*-System keine ausreichend gute Methode sei, um *CTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom zu bestimmen (Li *et al.*, 2015). Dieses Ergebnis konnten wir nicht bestätigen.
Die klinischen und prognostischen Bedeutungen von immunomagnetisch-detektierten *CTCs* bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom müssen in einem umfangreicheren Studiendesign geprüft werden. Interessanterweise war die *CTC*-Detektionsrate bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom Methoden-unabhängig geringer als beim Adenokarzinom. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Bobek et al., welche bei 75 % der Patienten mit Adenokarzinom *CTCs* und bei 52 % der Patienten mit Plattenepithelkarzinom *CTCs* detektierten. Sie nutzten eine Aufarbeitungsmethode, welche auf Größenselektion basiert (MetaCell®), (Bobek *et al.*, 2014). Es könnte also möglich sein, dass es beim Plattenepithelkarzinom eine geringere Anzahl an *CTCs* gibt verglichen mit dem Adenokarzinom.
Eine weitere Ursache könnte sein, dass die in unserer Arbeit verwendeten *Catcher*-Antikörper beim Adenokarzinom zu einer höheren *CTC*-Detektion führen. Zum Beispiel wäre es möglich, dass die *CTCs* beim Adenokarzinom häufiger *EpCAM* exprimieren. Went et al. untersuchten die *EpCAM*-Expression verschiedener Gewebe und fanden, dass das Plattenepithel des Ösophagus nur eine geringe *EpCAM*-Exprimierung aufwies, während Adenokarzinome des Kolons, Pankreas oder der Prostata eine starke *EpCAM*-Exprimierung aufwiesen (Went *et al.*, 2004). Unsere Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass auch die *CTCs* des Adenokarzinoms des Ösophagus eine stärkere *EpCAM*-Expression aufweisen als die *CTCs* des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

5.7.2 Subgruppenanalyse in Bezug auf den Lymphknotenstatus

5.7.2.1 CTC und Lymphknotenstatus

Werden die Patienten in eine LK-positive und eine LK-negative Subgruppe unterteilt, verteilen sich die *CTC-CellSearch*-positiven Patienten relativ gleichmäßig auf die beiden Gruppen (LK0: 17,0 %; LK+: 17,6 %). Bei den *CTC*-Ariol-positiven Patienten fanden sich bei den Lymphknoten-positiven Patienten zwar häufiger *CTCs*, doch war dieser Unterschied nicht signifikant (LK0: 10 %; LK+: 23 %). Eine Forschungsgruppe untersuchte den Lymphknotenstatus und *DTCs* bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. Sie fanden im Gegensatz dazu bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger *DTCs* (Vashist *et al.*, 2012). Methoden-unabhängig gab es in den Gruppen keinen prognostischen Einfluss der *CTCs*.

5.7.2.2 CTC im Ariol und Lymphknotenstatus

Bei Patienten ohne Lymphknoten-Metastasen gab es mit zunehmender Größe des Primärtumors und fortgeschrittenerem UICC-Stadium signifikant häufiger *CTCs*. Bestanden bereits Lymphknoten-Metastasen so gab es bei Patienten, welche *CTC*-positiv waren, signifikant häufiger Fernmetastasen. Somit scheinen die *CTCs* unabhängig vom Lymphknoten-Status klinisch bedeutsam und Ausdruck einer fortgeschrittenen bzw. fortschreitenden Erkrankung zu sein.

5.7.2.3 CTC CellSearch und Lymphknotenstatus

Interessanterweise gab es bei den Patienten ohne Lymphknoten-Metastasen keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede in der *CTC*-Verteilung. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Lymphknoten-positiven Patienten signifikant häufiger *CTCs* mit steigender Tumorgröße, bei bereits vorhandenen Metastasen und zunehmender Dedifferenzierung der Zellen. So scheinen die *CTCs* hier mit einer fortgeschrittenen Erkrankung einherzugehen.

5.7.2.4 Fazit CTC und Lymphknotenstatus

Das Vorhandensein von *CTCs* scheint unabhängig vom Lymphknotenstatus und der Aufarbeitungsmethode ein Voranschreiten der Erkrankung bzw. eine vorangeschrittene Erkrankung anzuzeigen. In den bisher beschriebenen Arbeiten zu *CTCs* beim Ösophaguskarzinom wurde die Einteilung der Patienten nach Lymphknoten-Status nicht beschrieben.

6 Zusammenfassung

Es wurde die klinische Bedeutung von *CTCs* beim Ösophaguskarzinom untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten, welche sich zur Ösophagektomie am UKE in den Jahren 2010-2012 vorstellten. Der überwiegende Teil des Patientenkollektivs befand sich in den Krankheitsstadien UICC I-III. Es konnte eine akzeptable Stichprobe an Adenokarzinom-Patienten und die bisher kaum betrachtete Bedeutung der *CTCs* bei diesem Histologie-Subtyp untersucht werden. Insgesamt wurden 84 Blutproben von Adeno- und 31 von Plattenepithelkarzinom-Patienten gesammelt.
Bei der Blutaufarbeitung fand ein Methodenvergleich zwischen der halbautomatisierten Ariol-Methode und der von der *FDA*-akkreditierten *CellSearch*-Methode statt. Methoden-unabhängig konnten bereits in frühen Krankheitsstadien *CTCs* nachgewiesen werden. Die Detektionsraten unterschieden sich nur marginal. Bei der Ariol-Methode waren insgesamt 16,5 % und bei der *CellSearch*-Methode 17,8 % *CTC*-positiv. Auch bei Patienten, bei denen weder Fern- noch Lymphknotenmetastasen nachweisbar waren, wurden *CTCs* detektiert. Durch die *CellSearch*-Methode konnte eine etwas höhere Detektionsrate erzielt werden. Eine höhere *CTC*-Rate mittels Nutzung eines zusätzlichen *Catcher*-AK durch die Ariol-Methode wurde nicht erzielt.
Beide Methoden haben Vor- und Nachteile, welche sich im Verlauf bemerkbar machten. Eine Messübereinstimmung der Methoden gab es in 74 von 97 mit beiden Methoden analysierbaren Fällen, davon 4 mit doppelt-positivem *CTC*-Befund und 70 mit doppelt-negativem Befund. Obwohl die Methoden oft verschiedene Ergebnisse erbrachten, scheinen die detektierten *CTCs* unabhängig von der Messmethode klinische Bedeutsamkeit und prognostische Aussagekraft zu haben. In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben bereits ab einer mittels *CellSearch* bestimmten *CTC*. Auch bei den mittels Ariol-Methode als *CTC*-positiv identifizierten Patienten war das progressionsfreie Überleben kürzer, jedoch nicht signifikant. Ab 2 *CTCs* (*CTC*> 1), egal durch welche Methode bestimmt, war das Gesamtüberleben der Patienten signifikant schlechter. Insgesamt schien das Vorhandensein der *CTCs* mit einer vorangeschrittenen Erkrankungssituation einherzugehen. Beide Aufarbeitungsmethoden scheinen somit ihre Bedeutsamkeit und somit ihre Anwendbarkeit unter Beweis zu stellen. Patienten wurden ihrer Tumorhistologie nach in zwei Gruppen geteilt. Die Gruppe mit Adenokarzinomen, welche in die Überlebensanalyse eingeschlossen wurde, war ungefähr doppelt so groß. Bei dieser Gruppe ging das Vorhandensein der *CTCs* mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und einem schlechteren klinischen *Outcome* einher (*PFS*: *CTC*-Ariol> 2 (p= 0,045), *CTC*-*CellSearch*> 1 (p= 0,016), *CTC*- *CellSearch* > 2 (p< 0,001); *OS*: *CTC*-Ariol> 2 (p= 0,002), *CTC*- *CellSearch* > 1 (p= 0,005), *CTC*- *CellSearch* > 2 (p= 0,005)) Die Gruppe der Patienten mit Plattenepithelkarzinom war so gering, dass sich die Ergebnisse vor dem Hintergrund der geringen statistischen Aussagekraft relativieren. In zukünftigen Studien sollte die Bedeutung der Methoden an größeren Patientenkollektiven validiert werden. Die *CTC*-Messungen haben das Potential das präoperative *Staging* von Ösophaguskarzinom-Patienten zu präzisieren. Ein *cut-off*-Wert von 2 scheint für die *CTC*-Bestimmung beim Ösophaguskarzinom unterschiedlicher Stadien am geeignetsten zu sein. In Zusammenschau scheint vor allem die Anwendung der *CellSearch*-Methode im klinischen Alltag denkbar.

6.1 Conclusion

The role of circulating tumor cells in patients with esophageal cell carcinoma was examined. Included were patients who were admitted to the *Universitätskrankenhaus Eppendorf* between 2010 and 2012 with esophageal cancer and were treated with an esophagectomie. The majority of those patients were staged UICC I-III. Most patients had an adenocarcinoma of the esophagus (84 patients), and 31patients had a squamous cell carcinoma.
CTC analysis was performed using the FDA approved CellSearch and Ariol. The results were compared.
Even in early stages of the disease CTCs were detected. Using both these methods the detection rates were quite similar. Using Ariol 16,5 % of the patients had CTCs and using CellSearch 17,8 % had CTCs. The overall detection rate using CellSearch was slightly higher. By using an addional catcher antibody with the ariol system a higher detection rate could not be achieved.
CTCs were also detected in patients with neither lymphatically nor haematogenically spread metastasis.
Both techniques have advantages and disadvantages. In 74 of 97 cases both methods showed the same results. Of those cases, 4 had a positive and 70 had a negative result in ariol as well as in CellSearch. Even though the techniques often came to different results, both techniques seem to have their own clinical relevance as well as prognostic value.
Univariate survival analysis showed a significantly shorter progression-free survival if patients had 1 or more *CTCs,* using the CellSearch technique. Patients who were tested *CTC*-positive using the Ariol technique seemed to have a shorter progression-free survival, but the difference wasn't significant.. If patients had 2 CTCs (*CTC*> 1) overall survival was significantly shorter, no matter which technique had been used to determine the *CTC* count. In general the presence of CTCs seems to indicate an advanced stage of disease. Both techniques are of clinical importance. Depending on their histology (squamous cell carcinoma or adenocarcinoma) we divided patients into 2 groups. The adenocarcinoma-group was approximately twice the size of the squamous cell carcinoma-group. In the group of patients with adenocarcinoma the presence of CTCs indicated advanced disease and a worse clinical outcome (*PFS*: *CTC*-Ariol> 2 (p= 0,045), *CTC*- *CellSearch* > 1 (p= 0,016), *CTC*- *CellSearch* > 2 (p< 0,001); *OS*: *CTC*-Ariol> 2 (p= 0,002), *CTC*- *CellSearch* > 1 (p= 0,005), *CTC*-*CellSearch* > 2 (p= 0,005)). Considering the small size of the group of patients with squamous cell carcinoma the impact on the resulting statistics is rather low. In future studies the clinical impact of the techniques should be validated using a larger group of patients. Measuring CTCs could improve the staging of patients with esophageal cancer. A cut-off value for *CTC* positivity should be 2 CTCs for esophageal cancer. In conclusion especially the CellSearch method could be used in a clinical context.

7 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 62 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
AC	Adenokarzinom
AEG	Karzinome des gastro-ösophagealen Übergangs
Anti-EpCam	Anti Epithelian Adhesion Molecule
AK	Antikörper
BE	Blutentnahme
CA	Karzinom
CD20-Antigen	Glykosyliertes Phosphoprotein auf der Membranoberfläche von B-Lymphozyten
CD45	Tyrosin-Proteinphosphatase C
CEA	Carcinoembrionic Antigen
CK	Zytokeratin
CT	Computertomografie
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
CS	CellSearch
DAPI	4`6- diamino-2-phenylindole
DTC	Disseminierte Tumorzellen
EGF-Rezeptor	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ESCC	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FDA	Food and Drug Administration of the USA
FNP	Feinnadelbiopsie
FUP	Follow up
G	Differenzierungsgrad
GB	Großbritannien
HER2neu	human epidermal growth factor receptor 2 (Wachstumsrezeptor Faktor)
K.A.	Keine Angabe
L	Lymphinvasion
LK	Lymphknoten
M	Metastasen
MACS	Magnetic Cell Seperation/ Metallic Matrix-Assisted Cell Sorting
MCF-7	Michigan Cancer Foundation- 7
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MHC-Klasse-I-Moleküle	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min.	Minuten
MK	Magenkarzinom
ml	Milliliter
mRNS	Boten-RNS
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	Multivariate Überlebensanalyse

N	Lymphknotenstatus
Nr.	Nummer
N.S.	Nicht signifikant
ÖGD	Ösophagoduodenoskopie
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben
OT	Objektträger
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	Progressionsfreies Überleben
R	Resektionsstatus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
SCCA	Plattenepithelkarzinom-assoziiertes Antigen
Pat.	Patient
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
T	Ausdehnung des Tumors, Tumorgröße, Tumoreindringtiefe
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
US	Ultraschall
UV	Univariate Überlebensanalyse
V	Veneninvasion

8 Literaturverzeichnis

Alix-Panabières, C. and Pantel, K. (2016) 'Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy', *Cancer Discovery*, 6(5), pp. 479–491.

Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G. J. and Uhr, J. W. (2004) 'Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Non', *Clinical Cancer Research*, 10, pp. 6897–6904.

Arjan G. J. Tibbe, M. Craig Miller, and L. W. M. M. T. (2007) 'Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells', *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(1), pp. 8–15.

Baccelli, I., Schneeweiss, A., Riethdorf, S., Stenzinger, A., Schillert, A., Vogel, V., Klein, C., Saini, M., Bäuerle, T., Wallwiener, M., Holland-letz, T., Höfner, T., Sprick, M., Scharpff, M., Marmé, F., Sinn, H. P., Pantel, K., Weichert, W. and Trumpp, A. (2013) 'Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay', *Nature Biotechnology*, 31(6), pp. 539–545.

Bancewicz, J., Clark, P., Smith, D., Donnelly, R., Fayers, P., Weeden, S., Girling, D., Hutchinson, T., Harvey, a, Lyddiard, J., Al-Jilaihawi, an, Bown, S., Cottier, B., Jeyasingham, K., Lea, R., Matthews, H., Moghissi, K., Morritt, G., Myskow, M., Pagliero, K., Rowland, C., Yosef, H. and Canc, M. R. C. O. (2002) 'Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial', 359, pp. 1727–1733.

Bardelli, A. and Pantel, K. (2017) Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet), Cancer Cell., 31 (2), pp. 172 - 179.

Bidard, F.-C., Mathiot, C., Delaloge, S., Brain, E., Giachetti, S., de Cremoux, P., Marty, M. and Pierga, J.-Y. (2010) 'Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21(4), pp. 729–33.

Bidard, F. C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., De Rycke, Y., Thiery, J. P., Sigal-Zafrani, B., Mignot, L., Sastre-Garau, X. and Pierga, J. Y. (2008) 'Disseminated tumor cells of breast cancer patients: A strong prognostic factor for distant and local relapse', *Clinical Cancer Research*, 14(11), pp. 3306–3311.

Bobek, V., Matkowski, R., Gürlich, R., Grabowski, K., Szelachowska, J., Lischke, R., Schützner, J., Harustiak, T., Pazdro, A., Rzechonek, A. and Kolostova, K. (2014) 'Cultivation of circulating tumor cells in esophageal cancer', *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 52(3), pp. 171–177.

de Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V, Terstappen, L. W. W. M., Pienta, K. J. and Raghavan, D. (2008) 'Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate

cancer.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(19), pp. 6302–9.

Braun, S., Vogel, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Pierga, J.-Y., Marth, C., Gebauer, G., Pierga, J., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G. Y. C., Ph, D., Bliss, J., Sc, M., Vincent-salomon, A. and Pantel, K. (2005) 'A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 353, pp. 793–802.

Budd, G. T., Cristofanilli, M., Ellis, M. J., Stopeck, A., Borden, E., Miller, M. C., Matera, J., Repollet, M., Doyle, G. V, Terstappen, L. W. M. M. and Hayes, D. F. (2006) 'Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(21), pp. 6403–9.

Buskens, C. J., Ten Kate, F. J. W., Obertop, H., Izbicki, J. R. and van Lanschot, J. J. B. (2008) 'Analysis of micrometastatic disease in histologically negative lymph nodes of patients with adenocarcinoma of the distal esophagus or gastric cardia.', *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E*, 21(6), pp. 488–95.

Chambers, A. F., Groom, A. C. and MacDonald, I. C. (2002) 'Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.', *Nature reviews. Cancer*, 2(8), pp. 563–72.

Chang AC, Ji H, Birkmeyer NJ, Orringer MB, B. J. (2008) 'Outcomes after transhiatal and transthoracic esophagectomy for cancer.', *The Annals of thoracic surgery*, 2(85) pp. 424–429.

Cohen, S. J., Punt, C. J. a, Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M. a, Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V, Tissing, H., Terstappen, L. W. M. M. and Meropol, N. J. (2009) 'Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(7), pp. 1223–9.

Cohen, S. J., Punt, C. J. a, Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V, Tissing, H., Terstappen, L. W. M. M. and Meropol, N. J. (2008) 'Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(19), pp. 3213–21.

Cristofanilli, M. (2004) 'Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.', *New England Journal of Medicine*, 33(3 Suppl 9), pp. S9-14.

Demicheli, R., Retsky, M. W., Hrushesky, W. J. M., Baum, M. and Gukas, I. D. (2008) 'The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations.', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(11), pp. 1821–8.

Deng, G., Herrler, M., Burgess, D., Manna, E., Krag, D. and Burke, J. F. (2008) 'Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients.', *Breast cancer research : BCR*, 10(4), p. R69.

Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Minckwitz, G. Von, Solomayer, E. F., Kaul, S. and Bastert, G. (1996) 'Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Comparison With Nodal Status', *Journal of the National Cancer Institute*, 88(22), pp. 1652–1658.

Effenberger, K. E., Schroeder, C., Eulenburg, C., Reeh, M., Tachezy, M., Riethdorf, S., Vashist, Y. K., Izbicki, J. R., Pantel, K. and Bockhorn, M. (2012) 'Disseminated tumor cells in pancreatic cancer-an independent prognosticator of disease progression and survival', *International Journal of Cancer*, 131(4), pp. 475–483.

Eliasova, P., Kolostova, K., Kobierzycki, C. and Bobek, V. (2013) 'Clinical studies monitoring circulating and disseminated tumor cells in gastrointestinal cancers.', *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 51(4), pp. 265–77.

Fidler, I. J. (1970) 'Metastasis : Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled', *Journal of the National Cancer Institute*, 45.

Fidler, I. J. (1990) 'Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis : Twenty-eighth G . H . A . Clowes Memorial Award Lecture Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis : Twenty-eighth', pp. 6130–6138.

Fidler, I. J. (2003) 'The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited', *Nature Publishing Group*, 3.

Franken, B., deGroot, M. R., Mastboom, W. J., Vermes, I., vanderPalen, J., Tibbe, A. G. and Terstappen, L. W. (2012) 'Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer', *Breast Cancer Research*. BioMed Central Ltd, 14(5), p. R133.

Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T. M., Krahn, T. and von Ahsen, O. (2012) 'Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition', *BMC Cancer*, 12(1), p. 178.

Gospodarowicz, M., Wittekind, C. and Sodin, L. (2009) *TNM 7 th edition due December 2009*. Available at: http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM Classification of Malignant Tumours_Website_16 November 2010_0.pdf (Accessed: 31 December 2016).

van Hagen, P., Hulshof, M. C. C. M., van Lanschot, J. J. B., Steyerberg, E. W., Henegouwen, M. I. V. B., Wijnhoven, B. P. L., Richel, D. J., Nieuwenhuijzen, G. a. P., Hospers, G. a. P., Bonenkamp, J. J., Cuesta, M. a., Blaisse, R. J. B., Busch, O. R. C., ten Kate, F. J. W., Creemers, G.-J., Punt, C. J. a., Plukker, J. T. M., Verheul, H. M. W., Bilgen, E. J. S., van Dekken, H., van der Sangen, M. J. C., Rozema, T., Biermann, K., Beukema, J. C., Piet, a. H. M., van Rij, C. M., Reinders, J. G., Tilanus, H. W. and van der Gaast, a. (2012) 'Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer', *New England Journal of Medicine*, 366(22), pp. 2074–2084.

Hashimoto, T., Kajiyama, Y., Tsutsumi-ishii, Y., Nagaoka, I. and Tsurumaru, M. (2008) 'Circulating micrometastases of esophageal cancer detected by carcinoembryonic antigen mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Clinical implications', *Diseases of the Esophagus*, 21(8), pp. 690–696.

Hayes, D. F., Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Miller, M. C., Matera, J., Allard, W. J., Doyle, G. V. and Terstappen, L. W. W. M. (2006) 'Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(14 Pt 1), pp. 4218–4224.

Hayes, D. F., Cristofanilli, M., Budd, G. T., Survival, O., Ellis, M. J., Stopeck, A., Miller, M. C., Matera, J., Jeffreyallard, W., Doyle, G. V and Terstappen, L. W. W. M. (2006) 'Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival umor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12, pp. 4218–4224.

Heatley, M., Maxwell, P., Whiteside, C. and Toner, P. (1995) 'Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease.', *Journal of clinical pathology*, 48(1), pp. 26–32.

Hiraiwa, K., Takeuchi, H., Hasegawa, H., Saikawa, Y., Suda, K., Ando, T., Kumagai, K., Irino, T., Yoshikawa, T., Matsuda, S., Kitajima, M. and Kitagawa, Y. (2008) 'Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers.', *Annals of surgical oncology*, pp. 3092–100.

Hüsemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G. and Klein, C. a (2008) 'Systemic spread is an early step in breast cancer.', *Cancer cell*, 13(1), pp. 58–68.

Ito, H., Kanda, T., Nishimaki, T., Sato, H., Nakagawa, S. and Hatakeyama, K. (2004) 'Detection and quantification of circulating tumor cells in patients with esophageal cancer by real-time polymerase chain reaction.', *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 23(3), pp. 455–464.

Izbicki, R. J., Hosch, S. B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C. erich and Pantel, K. (1997) 'Prognostic Value of Immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer', *The New England journal of medicine*, 337.

Jiao, X. and Krasna, M. J. (2002) 'Clinical significance of micrometastasis in lung and esophageal cancer: a new paradigm in thoracic oncology.', *The Annals of thoracic surgery*, 74(1), pp. 278–84.

Joosse, S. a., Hannemann, J., Spoͤtter, J., Bauche, A., Andreas, A., Muͤller, V. and Pantel, K. (2012) 'Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: Impact on the detection of circulating tumor cells', *Clinical Cancer Research*, 18(4), pp. 993–1003.

Joosse, S. a and Pantel, K. (2013) 'Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells.', *Cancer research*, 73(1), pp. 8–11.

Kaganoi, J., Shimada, Y., Kano, M., Okumura, T., Watanabe, G. and Imamura, M. (2004) 'Detection of circulating oesophageal squamous cancer cells in peripheral blood and its impact on prognosis.', *The British journal of surgery*, 91(8), pp. 1055–60.

Klein, C. a (2009) ‘Parallel progression of primary tumours and metastases.’, *Nature reviews. Cancer*, 9(4), pp. 302–12.

Koike, M., Hibi, K., Kasai, Y., Ito, K., Akiyama, S. and Nakao, A. (2002) ‘Molecular detection of circulating esophageal squamous cell cancer cells in the peripheral blood.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(9), pp. 2879–2882.

Kölbl, A. C., Jeschke, U. and Andergassen, U. (2016) ‘The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells’, *International journal of Molecular Sciences*, 17, pp. 1–12..

Krebs, M. G., Hou, J., Sloane, R., Lancashire, L., Priest, L., Nonaka, D. and Ward, T. H. (2012) ‘Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches’, *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 7(2), pp. 306–315.

Krebs, M. G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J., Greystoke, A., Ward, T. H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Dive, C. and Blackhall, F. H. (2011) ‘Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non – Small-Cell Lung Cancer’, *Journal of Clinical Oncology*, 29(12).

Langley, R. R. and Fidler, I. J. (2011) ‘The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs.’, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 128(11), pp. 2527–35.

Lerut, T. E., de Leyn, P., Coosemans, W., Van Raemdonck, D., Cuypers, P. and Van Cleynenbreughel, B. (1994) ‘Advanced esophageal carcinoma.’, *World journal of surgery*, 18(3), pp. 379–87.

Li, H., Med, M., Song, P., Zou, B., Liu, M., Med, M., Cui, K., Med, M., Zhou, P., Li, S., Zhang, B. and Med, M. (2015) ‘Circulating Tumor Cell Analyses in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Epithelial Marker- Dependent and -Independent Approaches’, *Medicine*, 94(38), pp. 1–9.

Liotta, L. A. and Kohn, E. (2004) ‘Cancer and the homeless cell’, 430(August), pp. 973–974.
Liu, Z., Jiang, M., Zhao, J. and Ju, H. (2007) ‘Circulating tumor cells in perioperative esophageal cancer patients: quantitative assay system and potential clinical utility.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(10), pp. 2992–7.

Ludwig, J. a and Weinstein, J. N. (2005) ‘Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection.’, *Nature reviews. Cancer*, 5(11), pp. 845–56.

Lustberg, M., Jatana, K. R., Zborowski, M. and Chalmers, J. J. (2012) ‘Emerging Technologies for CTC Detection Based on Depletion of Normal Cells’, *NIH*. Edited by M. Ignatiadis, C. Sotiriou, and K. Pantel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Recent Results in Cancer Research), 195, pp. 1–13.

Macadam, R., Sarela, A., Wilson, J., MacLennan, K. and Guillou, P. (2003) ‘Bone marrow

micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma', *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 29(5), pp. 450–454.

Mani, S. a, Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. and Weinberg, R. a (2008) 'The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.', *Cell*, 133(4), pp. 704–15.

Matsushita, D., Uenosono, Y., Arigami, T., Yanagita, S. and Nishizono, Y. (2015) 'Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma', *Annals of surgical oncology*, (November 2014), pp. 3674–3680.

van Meerten, E. and van der Gaast, A. (2005) 'Systemic treatment for oesophageal cancer.', *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 41(5), pp. 664–72.

Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., Beitsch, P. D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T. P., Herlyn, D., Terstappen, L. W. M. M., Fehm, T., Tucker, T. F., Lane, N., Wang, J. and Uhr, J. W. (2004) 'Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy', pp. 8152–8162.

Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Tsinberg, P., Coutts, S. M., Zomorrodi, M., Pham, T., Bischoff, F. Z. and Pircher, T. J. (2011) 'Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood.', *Journal of oncology*, 2011, p. 252361.

Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Goetz, A., Ja, F. and Pantel, K. (2005) 'Circulating Tumor Cells in Breast Cancer : Correlation to Bone Marrow Micrometastases , Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity umor Cells in Breast Cancer : Correlation to Bone Marrow Micrometastases , Heterogeneous Resp', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11, pp. 3678–3685.

Nakashima, S., Natsugoe, S., Matsumoto, M., Miyazono, F., Nakajo, A., Uchikura, K., Tokuda, K., Ishigami, S., Baba, M., Takao, S. and Aikou, T. (2003) 'Clinical significance of circulating tumor cells in blood by molecular detection and tumor markers in esophageal cancer.', *Surgery*, 133(2), pp. 162–9.

Pantel, K. and Alix-Panabières, C. (2010) 'Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives.', *Trends in Molecular Medicine*, 16(9), pp. 398–406.

Pantel, K., Alix-panabières, C. and Riethdorf, S. (2009) 'Cancer micrometastases', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 6(6), pp. 339–351.

Pantel, K. and Brakenhoff, R. H. (2004) 'DISSECTING THE METASTATIC CASCADE', *Nature reviews. Cancer*, 4(June), pp. 448–456. .

Pantel, K., Brakenhoff, R. H. and Brandt, B. (2008) 'Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.', *Nature reviews. Cancer*, 8(5), pp. 329–40.

Pantel, K., Von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J. and Riethmüller, G. (1997) 'Disseminierte Tumorzellen : Diagnostik , prognostische Relevanz , Phaenotypisierung und therapeutische Strategien', *Der Chirurg*, 68, pp. 1241–1250.

Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Funke, I., Izbicki, R. and Riethmiiller, G. (1993) 'Differential Expression of Proliferation- Associated Molecules in Individual Micrometastatic Carcinoma Cells', *Journal of the National Cancer Institute*, 85, pp. 1419–1424.

Qiao, G.-L., Jiang, W., Ma, L., Chen, Y. and Qi, W.-X. (2016) 'Prognostic significance of circulating tumor cells in esophageal carcinoma : a meta-analysis', *OncoTargets and Therapy*, 9, pp. 1889–1897.

Quint, L. E., Hepburn, L. M., Francis, I. R., Whyte, R. I. and Orringer, M. B. (1995) 'Incidence and distribution of distant metastases from newly diagnosed esophageal carcinoma.', *Cancer*, 76(7), pp. 1120–5.

Rack, B., Müller, V., Fehm, T., Pestka, a., Kasimir-Baur, S., Friese, K. and Janni, W. (2013) 'Knochen als Rückzugsort für „dormant cells"', *Der Gynäkologe*, 46(4).

Rice, T. W., Rusch, V. W., Apperson-Hansen, C., Allen, M. S., Chen, L.-Q., Hunter, J. G., Kesler, K. a, Law, S., Lerut, T. E. M. R., Reed, C. E., Salo, J. a, Scott, W. J., Swisher, S. G., Watson, T. J. and Blackstone, E. H. (2009) 'Worldwide esophageal cancer collaboration.', *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E*, 22(1),

Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M. and Pantel, K. (2007) 'Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), pp. 920–8.

Riethdorf, S., Müller, V., Loibl, S., Nekljudova, V., Weber, K., Huober, J., Fehm, T., Schrader, I., Hilfrich, J., Holms, F., Tesch, H., Schem, C., von Minckwitz, G., Untch, M. and Pantel, K. (2017) 'Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells for Breast Cancer Patients Treated in the Neoadjuvant "Geparquattro" Trial', *Clinical Cancer Research*, 2(18),

Riethdorf, S., Müller, V., Zhang, L., Rau, T., Loibl, S., Komor, M., Roller, M., Huober, J., Fehm, T., Schrader, I., Hilfrich, J., Holms, F., Tesch, H., Eidtmann, H., Untch, M., von Minckwitz, G. and Pantel, K. (2010) 'Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(9),.

Rink, M., Chun, F. K. H., Minner, S., Friedrich, M., Mauermann, O., Heinzer, H., Huland, H., Fisch, M., Pantel, K. and Riethdorf, S. (2011) 'Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer.', *BJU international*, 107(10), pp. 1668–75.

Schneider, P. M., Baldus, S. E., Metzger, R., Kocher, M., Bongartz, R., Bollschweiler, E.,

Schaefer, H., Thiele, J., Dienes, H. P., Mueller, R. P. and Hoelscher, A. H. (2005) 'Histomorphologic Tumor Regression and Lymph Node Metastases Determine Prognosis Following Neoadjuvant Radiochemotherapy for Esophageal Cancer', *Annals of Surgery*, 242(5), pp. 684–692.

Sclafani, F., Smyth, E., Cunningham, D., Chau, I., Turner, A. and Watkins, D. (2013) 'Original Study A Pilot Study Assessing the Incidence and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Esophagogastric Cancers', pp. 1–6.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keth, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and Press, M. F. (1989) 'Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer', *Science*, 244.

Smerage, J. B., Barlow, W. E., Hortobagyi, G. N., Winer, E. P., Leyland-jones, B., Srkalovic, G., Tejwani, S., Schott, A. F., Rourke, M. A. O., Lew, D. L., Doyle, G. V, Gralow, J. R., Livingston, R. B. and Hayes, D. F. (2014) 'Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer : SWOG S0500', *Journal of Clinical Oncology*, 32(31),.

Sobin, L. H. (2001) 'Conference on Prognostic Factors and Staging in Cancer Principles , History , and Relation to Other Prognostic Factors', *Cancer supplement*, 91(8), pp. 1–4.

Solomayer, E. F., Becker, S., Pergola-Becker, G., Bachmann, R., Krämer, B., Vogel, U., Neubauer, H., Wallwiener, D., Huober, J. and Fehm, T. N. (2006) 'Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients.', *Breast cancer research and treatment*, 98(2), pp. 179–84.

Stoecklein, N. H., Hosch, S. B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C. H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W. T., Verde, P. E., Reichelt, U., Erbersdobler, A., Grau, R., Ullrich, A., Izbicki, J. R. and Klein, C. a (2008) 'Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer.', *Cancer cell*, 13(5), pp. 441–53.

Su, P., Wu, M., Wang, H., Lee, C., Huang, W., Wu, C., Chang, H., Chao, Y., Tseng, C. and Chiu, T. (2016) 'Circulating Tumour Cells as an Independent Prognostic Factor in Patients with Advanced Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Undergoing Chemoradiotherapy', *Nature Medicine*, (August), pp. 1–9.

Tanaka, K., Yano, M., Motoori, M., Kishi, K., Miyashiro, I., Shingai, T., Gotoh, K., Noura, S., Takahashi, H., Ohue, M., Yamada, T., Ohigashi, H., Yamamoto, T., Yamasaki, T., Doki, Y. and Ishikawa, O. (2010) 'CEA-antigen and SCC-antigen mRNA expression in peripheral blood predict hematogenous recurrence after resection in patients with esophageal cancer.', *Annals of surgical oncology*, 17(10).

Thorban, S., Rosenberg, R., Busch, R. and Roder, R. J. (2000) 'Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis.', *British journal of cancer*, 83(1).

Union internationale contre le cancer (2014) *UICC Classification*. Available at: http://www.uicc.org/resources/tnm/resources (Accessed: 3 April 2016).

Valastyan, S. and Weinberg, R. a (2011) ‘Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.’, *Cell*, 147(2), pp. 275–92.

Vashist, Y. K., Effenberger, K. E., Vettorazzi, E., Riethdorf, S., Yekebas, E. F., Izbicki, J. R. and Pantel, K. (2012) ‘Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and the Natural Course of Resected Esophageal Cancer’, *Annals of Surgery*, 255(6), pp. 1105–1112.

Went, P. T. H., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G. and Dirnhofer, S. (2004) ‘Frequent EpCam Protein Expression in Human Carcinomas’, *Human Pathology*, 35,.

Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., Heukeshoven, J. and Pantel, K. (2005) ‘Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells’, *Clinical Cancer Research*, 11(22), pp. 8006–8014.

Yin, X., Yuan, X., Xue, J., Wang, R., Zhang, Z. and Tong, J. (2012) ‘Clinical significance of carcinoembryonic antigen- , cytokeratin 19- , or survivin-positive circulating tumor cells in the peripheral blood of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy’, *Diseases of the Esophagus*, 25, pp. 750–756.

Zhang, L., Riethdorf, S., Wu, G., Wang, T., Yang, K., Peng, G., Liu, J. and Pantel, K. (2012) ‘Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer.’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20).

9 Anhang

Tabelle 63 Die verwendeten Reagenzien mit Hersteller

Reagenzien	Hersteller
Verdünnungspuffer (Miltenyi, Cell Enrichment and Detection Kit, Bestell-Nr: 130-060-101)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Lysispuffer (Genetix *CTC* Kit Cat- No: A1000)	Genetix, New Milton, Großbritannien
Permeabilisierungspuffer (Genetix CTC Enrichment Kit, A1000)	Genetix , New Milton, Großbritannien
Fc-R-*Blocking Reagent* (Miltenyi Cell Enrichment and Detection Kit)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschand
Fixierungspuffer (CTC Kit)	Genetix, New Milton, Großbritannien
Anti-Cytokeratin	
***EpCAM Microbeads* (Carcinoma Cell *Enrichment and Detection Kit*/ Miltenyi Anti- *EpCam* Antikörper Bestell- Nr: 130-061-101)**	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
***Wash buffer* (CTC Detection Kit)**	Genetix, New Milton, Großbritannien
Dakopen	
iT Signal Enhancer	Invitrogen, Kalifornien, USA
Anti-human Cytokeratin mAB FITC (Genetix5)	Genetix, New Milton, Großbritannien
***Antihuman* CD45 *mAB Dylight* 549 (Genetix 6)**	Genetix, New Milton, Großbritannien
Vectashield Mounting Medium Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, USA
MACS *Cytokeratin MicroBeads* (Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS *Anti- EpCam Microbeads* (Anti-EpCam Antikörper Bestell- Nr: 130-061-101)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Alexa Fluor®647 anti-human CD45 Antibody	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Pan Cytokeratin (AE1/AE3) Alexa Fluor®488	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Pan-Keratin (C11) Alexa® 488 Mouse mAB	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti-EpCAM Ferrofluid CellSearch (CellSearch Epithelial Cell Kit)	Janssen Diagnostics, South Raritan, USA
Farbreagenz CellSearch (CellSearch Epithelial Cell Kit)	Janssen Diagnostics, South Raritan, USA
AK CD45 Cellsearch (CellSearch Epithelial Cell Kit)	Janssen Diagnostics, South Raritan, USA
Dapi Cellsearch (CellSearch Epithelial Cell Kit)	Janssen Diagnostics, South Raritan, USA
MCF7	ATCC® HTB22™

10 Danksagung

Die Fertigstellung meiner Dissertation war Dank der Unterstützung und Hilfe verschiedener Menschen möglich. Vor allen möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Pantel für die Möglichkeit der Promotion im Institut für Tumorbiologie und die Bereitstellung des Themas herzlich danken. Des Weiteren danke ich im Besonderen meiner Betreuerin PD Dr. Katharina Harms-Effenberger, die immer ein Ansprechpartner für offene Fragen war, für die jahrelange kontinuierliche Unterstützung, für Ihre Denkanregungen, offene Kritik und Mühe. Für die großartige Unterstützung bei der statistischen Arbeit danke ich Eik Vetorazzi. Auch den Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie möchte ich von ganzem Herzen danken. Meiner Familie schulde ich Dank. Sie waren auch durch ihre Zuversicht stets motivierend und kraftgebend waren. Im Speziellen möchte ich meinen Großeltern für die liebevolle Begleitung danken. Nicht zuletzt möchte ich meine Freunde nennen, im Besonderen danke ich Eric Guhlmann, Dr. med. Julia Albrecht, Moritz Hanke sowie Dr. med. Raisa Pompe für ihre Anregungen.

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....